

미생물에 의한 니코틴 분해 연구(1) —니코틴 분해세균의 분리 및 동정

강 은 회 · 윤 경 하

한국연초 연구소 원료부
(1980. 2. 15 접수)

Study on the Microbial Degradation of Nicotine (1) —Isolation and Identification of Nicotinophiles

Eun Heuy Kang and Kyung Ha Yoon

Division of Raw Tobacco, Korea Tobacco Research Institute

Seoul, Korea
(Received Feb. 15, 1980)

초 록

143개의 여러가지 시료에서 니코틴 분해세균의 분포를 조사하고 니코틴 배지에서 성장능이 우수한 34균주를 선별하여 균주의 생물학적 특성과 니코틴 분해력을 조사함과 동시에 니코틴 분해력이 가장 우수한 균주를 선정하여 동정하였다.

니코틴 분해세균은 유기물이 풍부한 토양과 담배씨, 뿌리에 많이 분포되어 있었고 선별된 34균주는 Arthrobacter 4주, Pseudomonas (non-pigmented) 11주, Pseudomonas (pigmented) 2주, Alkaligenes 6주, Chromobacter 5주, Listeria 2주, Achromobacter 4주 등으로 분류되었다.

니코틴 분해력에 있어서는, Pseudomonas와 Alkaligenes가 다른 속(genus)보다 높고, 서식지별로 비교해 보면 담배씨와 뿌리에서 분리된 균주가 우수했으며 가장 우수한 균주는 97.1%의 분해율을 나타내는 균주번호 NCT27로서 Pseudomonas putida로 동정되었다.

Abstracts

From 143 sources of collected samples, the distribution of nicotinophiles were investigated and the biological characteristics as well as the rate of nicotine degradation were determined for the selected 34 strains which could grow successfully in the nicotine media, and one of the most effective strains was chosen and identified at the species level.

Nicotinophiles were distributed abundantly in the soils rich with organic materials, tobacco seed and root. The selected 34 strains were classified into 7 genus and identified with

4 strains of Arthrobacter, 11 strains of non-pigmented Pseudomonas, 2 strains of pigmented Pseudomonas, 6 strains of Alkaligenes, 5 strains of Chromobacter, 2 strains of Listeria and 4 strains of Achromobacter.

Pseudomonas and Alkaligenes were better than other genus in the rate of nicotine degradation and tobacco seed and root were also good sources for the isolation of effective nicotinophiles. Among 34 strains, strain NCT 27 which exhibited 97.1% of nicotine degradation rate was the best one for nicotine degradation and was identified with Pseudomonas putida.

서 론

니코틴은 담배특유의 성분이지만 함량이 많을 때는 자극성이 강하여 껍미의 저해 요인이 되기 때문에 잎담배의 니코틴 함량을 줄여서 껍미를 좋게하고, 인체에 대한 유해성을 줄여 보고자 하는 연구가 다각적으로 이루어지고 있다.

잎담배 숙성에서 알카로이드 성분의 변화는 탄수화물이나 다른 질소화합물의 변화에 비해 늦은 단계에서 일어나고, 니코틴이 비교적 안정된 물질이라는 점에서 볼때, 초기단계의 알카로이드 변화의 기작은 화학적인 요인에서 보다는, 미생물의 효소에 의한다고 생각된다(8).

Enders(7)에 의하면 저장과정에서 감소되는 알카로이드는 90% 이상이 미생물에 의한 것이라고 한다. 니코틴은 보통의 기질농도에서도 생물체에 유해하기 때문에 이것을 대사물질로 이용할 수 있는 세균의 종류는 매우 한정되어 있다(13). 따라서 미생물에 의한 알카로이드의 변화는 주로 미생물의 생물학적 특성을 중심으로 니코틴의 산화기작이 연구되었다(2, 9, 11, 12, 13, 17, 21).

최근에는 니코틴분해세균을 저니코틴 원료엽의 제조에 산업적으로 이용하고자 하여 Coussirat (1), (2) 등은 in vitro 실험에서 배양액의 pH, 온도의 변화와 니코틴분해력과의 관계를 연구한 바 있고, 内田節子 (22) 등은 니코틴분해 세균의 특성과 잎담배에서의 생장에 대해서, 그리고 Newton (14) 등은 니코틴 분해세균을 잎담배에 대량으로 처리하여 실험한 바 있다.

본 실험에서는 여러가지 시료에서 니코틴분해 세균의 분포를 조사하고 이들로부터 니코틴분해 세균을 분리, 선별하여 니코틴 분해력이 우수한 균주를 선정하고자 한다.

Table 1. Number of Sampling Sites by Habitat

| | Habitat | No. of Sample |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------------|
| Habitat related to tobacco. | cigarette | 20 |
| | leaf tobacco | 61 |
| | soil | 4 |
| | tobacco seed | 2 |
| | tobacco root | 2 |
| | byproduct | 3 |
| | manufacturing process | 13 |
| Natural habit | polluted water | 8 |
| | settled soil under polluted water | 2 |
| | standing water | 4 |
| | river | 5 |
| | waste | 3 |
| | soil | 16 |
| | Total | 143 |

실 험

1. 시료채취

시료는 Table 1에서 보는바와 같이 담배와 관

런이 없는 서식지와, 담배와 관련이 있는 서식지에서 무작위로 143개의 시료를 채취하여 poly-vinyl bag 또는 cap tube에 넣어 세균을 분리하기 전까지 냉장고에 보관하였다.

2. 균주의 분리 및 보존

분리용 배지는 Sguros (17)의 배지를 약간 변형하여 사용했는데 그 조성은 증류수 1000ml 당 nicotine 3.0ml, KH_2PO_4 2.0gr, KCl 5.0gr, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025gr, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002gr, yeast extract(DIFCO) 0.1gr, pH는 7.5이다.

니코틴의 첨가는 다른 성분들을 고압멸균출속에서 121°C로 10분간 멸균한후 무균적으로 행하였으며 고체배양에서는 2.0%의 agar를 첨가하여 사용했다. 세균의 분리방법은 시료 1.0gr 또는 1.0ml을 멸균 증류수로 $10^2 - 10^4$ 배로 희석하여, 희석액 0.1ml를 nicotine고체배지에 옮긴후, 멸균된 삼각 유리병으로 고르게 퍼서 30°C에서 3일간 배양하였다. 그후 생성된 군락의 수를 계산하고 형태적으로 서로 다른 군락을 분리하여 순수배양한 후, 5°C에 보관하였다.

3. 균주의 선별

순수배양균 1 loop를 50ml의 nicotine broth 배지가 들어있는 250ml 삼각 flask에 접종하여 gyrotary shaker(New Brunswick Scientific Co. Model G-25)에서 196 rpm으로 30°C에서 3일간 배양한 후, 일정량의 배정액을 spectrophotometer(Bausch & Lomb Spectronic 20) 610nm의 파장에서 혼탁도를 측정 비교하여 생장이 우수한 균주를 1차 선별하였다.

4. 균주의 동정

선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual (16)를 비롯하여 Cowan (3), Curtis(4), Sheldon(18) 등의 방법에 따라 속(genus)의 수준까지 동정하였고 Pseudomonas종의 동정을 위해서는 표준균주로 *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*와 *P. putida* 등을 사용했다.

5. 니코틴 분해력의 측정

선별된 균주의 니코틴 분해력의 측정은 용매 추출법(24)과 자외선 흡광도법(6)을 약간 변형하였다. 세균배양액 10ml를 시험관에 넣고 10%

의 trichloroacetic acid 1.0ml를 첨가하여 물중탕에서 5분간 가열한후 3000r. p. m.에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액을 0.5 N HCl로 희석한 다음 spectrophotometer(Beckman DU-20)의 259nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의해 잔여니코틴 함량을 계산하고 대조구와 비교해서 상대적인 감소율을%로 환산하였다.

Table 2. Distribution of Nicotinophiles in the Natural Habitat.

| Site | No. of bacteria($\times 10^4$)/g. of sample |
|---------------------------------|---|
| polluted water | 113 |
| settled soil | 7 |
| soil on the bank | 5000 |
| burnt waste | 300 |
| soil around ditch | 8000 |
| waste deposit | 50000 |
| Han river | 42 |
| soil near river | 700 |
| farm soil | 1373 |
| oil-settled soil | 10250 |
| sidewalk | 3600 |
| rice field | 225 |
| ditch | 120 |
| polluted water by tobacco waste | 250 |

결과 및 고찰

서식지에 따른 니코틴분해세균의 분포를 표 2와 3에 나타냈는데, 표에서 보는바와같이 담배와 관련이 없는 쓰레기더미에서 가장 높은 분포를 나타냈고, 담배종자, 담배뿌리, 그리고 유류 침지 토양 등에서도 높은 분포를 나타냈다. 담배와 관련된 서식지 별로는 씨앗, 뿌리, 생엽, 건조엽, 발효엽, 제조과정, 제품담배의 순서로 세균의 분포가 줄어드는 현상을 볼수 있었다. 이것은 담배가 제조되는 경로와 상응하는 것으로 보아, 담배가 생산되어 제품화되기까지의 처리

Table 3. Distribution of Nicotinophiles in the Habitat Related to Tobacco.

| Site | No. of bacteria ($\times 10^8$)/g. of sample |
|-----------------------|--|
| cigarette (home-made) | 186 |
| cigarette (foreign) | 128 |
| leaf tobacco | |
| fermented leaf | 1100 |
| cured (home-made) | |
| Burley | 1590 |
| Hyangcho | 562 |
| Flue-cured | 6321 |
| cured (foreign) | |
| Burley | 1300 |
| Flue-cured | 1180 |
| Cigar leaf | 540 |
| green leaf | 6000 |
| soil | 1272 |
| root | 11450 |
| seed | 26800 |
| tobacco powder | 2230 |
| manufacturing process | 199 |

과정에서 많은 세균이 소멸되는 것으로 생각된다.

143개의 시료로부터 니코틴 분해세균 121균주를 순수 분리하여 니코틴 배지에서 생장이 우수한 34균주를 일차 선별하였다. 선별된 34균주의 형태적, 생리적, 성장적, 특성을 조사한 결과 Arthrobacter, Pseudomonas (non-pigmented), Pseudomonas (pigmented), Alkaligenes, Chromobacter, Listeria 그리고 Achromobacter 등 7의 속(genus)으로 동정되었는데 그들의 특성을 Table 4, 5, 6에 표시하였다.

지금까지 보고된 니코틴 분해세균에 관한 연구를 보면 세균의 종류에는 Pseudomonas (10, 14, 21), Arthrobacter (1, 17), Bacterium sp. (23), Xanthomonas (22), Achromobacter (12), Bacillus (23), Cellulomonas (14)가 있으며 본 실험에서 동정된 Chromobacter와 Listeria에 대

해서는 보고된 바가 없다.

동정된 각 균주의 니코틴 분해력을 표 7에서 보면 균주번호 NCT27이 97.1%로 가장 높고, 균주번호 NCT 13이 12.6%로 가장 낮았다. 그리고 속(genus)별로 평균 니코틴 분해력을 비교해보면 Pseudomonas와 Alkaligenes가 높은 역가를 나타냈고 Arthrobacter와 Chromobacter가 낮은 값을 나타냈다.

이것은 Coussirat (2) 등에 의하면, 니코틴 대사기작에서 Arthrobacter속은 니코틴을 부분적으로 분해하지만 Pseudomonas속은 니코틴을 maleic acid 혹은 fumaric acid로 완전히 분해하는 서로 다른 과정을 거친다고 하는 사실로서 일부 설명될 수 있다. Table 8에서는 선별된 균주를 서식지별로 나누어서 평균 니코틴 분해력을 비교해 보았는데, 씨앗이나 뿌리에서 분리된 균주가 토양이나 제품담배에서 분리된 것에 비해 훨씬 높은 역가를 나타냈다. Coussirat (2), Frankenburg (9) Wada (21) 등도 각각 담배뿌리, 씨앗으로부터 니코틴 분해력이 우수한 세균을 분리하여 보고한 바가 있는데, 이와같은 결과는 본 연구의 결과와 일치한다.

그리고 잎담배 중에서는 비교적 니코틴함량이 높은 Burley엽에서 분리된 균주가 니코틴분해력이 우수했다. Burley엽은 음전종으로서 엽성분 중 당함량이 매우 적고 니코틴함량이 비교적 많기 때문에 니코틴을 영양원으로 하여 자랄수 있

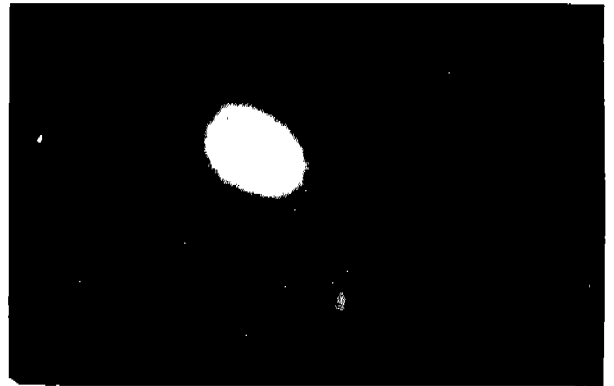


Fig. 1. Electron microscopic photograph of P. putida ($\times 17,000$).

Table 4. Cultural and Morphological Characteristics of the Identified Genus.

| No. of Identified strain | genus | | Pseudomonas (non-pigmented) | Pseudomonas (pigmented) | Alkaligenes | Chromobacter | Listeria | Achromobacter |
|--------------------------|--------------|-------------|-----------------------------|-------------------------|-------------|--------------|-------------|---------------|
| | Arthrobacter | | | | | | | |
| characters | 4 | 11 | 2 | 2 | 6 | 5 | 2 | 4 |
| Colony on the | | | | | | | | |
| Nicotine Agar | | | | | | | | |
| color | B. V. | G. Y. | B. V. | Oyster | G. Y. | G. Y. | Yellow | G. W. |
| size (mm) | 1.0-5.0 | pinpoint | 1.0-5.0 | 0.8-1.5 | 0.8-2.0 | 0.8-2.0 | 1.0 | pinpoint |
| form | circular | circular | circular | circular | circular | circular | circular | circular |
| elevation | convex | convex | convex | convex | convex | convex | convex | convex |
| edge | entire | entire | entire | entire | entire | entire | entire | entire |
| soluble pigment | blue | none | blue | none | none | none | none | none |
| transparency | opaque | translucent | opaque | translucent | translucent | translucent | translucent | opaque |
| <u>Microscopic</u> | | | | | | | | |
| <u>Observation</u> | | | | | | | | |
| Gram | variable | - | variable | - | - | - | + | - |
| spore | - | - | - | - | - | - | - | - |
| capsule | - | - | - | - | - | +, - | - | - |
| acid-fastness | - | - | - | - | - | - | - | - |
| motility | - | + | + | + | + | + | +, - | + |
| shape | pleomorphic | rod | rod | coccoid | coccoid | coccoid | curved rod | rod |
| size | variable | N. D | N. D | N. D | N. D | N. D | N. D | N. D |
| <u>Growth</u> | | | | | | | | |
| <u>Temperature</u> | | | | | | | | |
| 20°C | + | + | + | + | + | + | +, - | + |
| 30°C | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 40°C | +, - | - | - | +, - | +, - | +, - | + | - |

Symbols; ND=not determined, G. Y=grayish yellow, G. W=grayish white, B. V=blue violet

Table 5. Metabolic Characteristics of the Identified Genus.

| No. of Identified strain | genus | | Pseudomonas | | Pseudomonas | | Alkaligenes | | Chromobacter | | Listeria | | Achromobacter | |
|--------------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|-------|-------------|----------|--------------|-----|----------|-----|---------------|-----|
| | Arthrobacter | (non-pigmented) | (non-pigmented) | (pigmented) | 6 | 2 | 6 | 5 | 2 | 4 | | | | |
| characters | 4 | 11 | 2 | 2 | 6 | 2 | 6 | 5 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| O/F | O/- | O/- | O/- | O/- | O/- | O/- | O/- | O/+, - | O/- | O/- | O/- | O/- | O/- | O/- |
| KIA | K/- | K/- | K/- | K/- | K/- | K/- | K/- | A/A, K/A | K/- | K/- | K/- | K/- | K/- | K/- |
| H ₂ S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Indole | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methyl Red | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| VP | - | - | - | - | - | - | - | +, - | + | + | - | - | - | - |
| Simmon's | +, - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + |
| Citrate | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| fluorescence | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| gas from | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| glucose | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Acid production | | | | | | | | | | | | | | |
| from sugar | | | | | | | | | | | | | | |
| glucose | a + / - b | - | + / - | + / - | - | + / - | - | + / - | + | + | + | + | + | + |
| lactose | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + | + | + | + | + | + |
| sucrose | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + | + | + | + | + | + |
| xylose | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + | + | + | + | + | + |
| trehalose | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + | + | + | + | + | + |
| arabinose | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + | + | + | + | + | + |
| raffinose | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + | + | + | + | + | + |
| mannitol | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + / - | + | + | + | + | + | + |
| glycerol | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | - / - | + | + | + | + | + | + |

Symbols: a indicates growth in the broth sugar.

b indicates acid production in the broth sugar.

Table 6. Enzymatic Characteristics of the Identified Genus.

| genus | Pseudomonas (non-pigmented) | | Pseudomonas (pigmented) | | Alkaligenes | | Chromobacter | | Listeria | | Achromobacter | |
|--------------------------|-----------------------------|----------------|-------------------------|----|-------------|------------------|--------------|--------------|----------|----|---------------|--|
| | 4 | 11 | 2 | 2 | 6 | 5 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | |
| characters | 4 | 11 | 2 | 2 | 6 | 5 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | |
| catalase | ++ | + | + | + | + | + | ++ | + | + | + | + | |
| cyt. oxidase | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | ++ | ++ | ++ | |
| amylase | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | |
| cellulase | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | |
| gelatinase | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | |
| urease | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| nitrate reductase | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | |
| decarboxylase | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | |
| arginine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| ornithine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| lysine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| reactions in litmus milk | - | red. peptoniz. | - | - | peptoniz | alkaline coagul. | red. coagul. | red. coagul. | - | - | - | |

Table 7. The Rate of Nicotine Degradation by Selected Strains.

| Genus | Strain | Degradation (%) | Mean (%) |
|---------------------------------------|--------|-----------------|----------|
| <u>Arthrobacter</u> | NCT 15 | 25.1 | 37.3 |
| | NCT 23 | 13.6 | |
| | NCT 29 | 35.7 | |
| | NCT 30 | 55.8 | |
| <u>Pseudomonas</u> (non-pigmented) | NCT 02 | 88.0 | 91.3 |
| | NCT 05 | 90.4 | |
| | NCT 07 | 85.3 | |
| | NCT 08 | 56.3 | |
| | NCT 20 | 86.4 | |
| | NCT 21 | 88.8 | |
| | NCT 24 | 96.4 | |
| | NCT 27 | 97.1 | |
| | NCT 32 | 93.7 | |
| | NCT 33 | 93.8 | |
| <u>Pseudomonas</u> (pigmented) | NCT 25 | 88.6 | 91.2 |
| | NCT 26 | 93.9 | |
| <u>Alkaligenes</u> | NCT 01 | 94.5 | 90.5 |
| | NCT 06 | 84.3 | |
| | NCT 09 | 89.6 | |
| | NCT 14 | 88.2 | |
| | NCT 28 | 95.8 | |
| | NCT 31 | 90.5 | |
| <u>Chromobacter</u> | NCT 12 | 23.9 | 38.7 |
| | NCT 13 | 12.6 | |
| | NCT 16 | 87.8 | |
| | NCT 18 | 58.6 | |
| | NCT 22 | 10.7 | |
| <u>Listeria</u> | NCT 10 | 83.8 | 68.9 |
| | NCT 11 | 53.9 | |
| <u>Achromobacter</u> | NCT 03 | 86.7 | 78.7 |
| | NCT 04 | 75.1 | |
| | NCT 17 | 91.1 | |
| | NCT 19 | 61.8 | |

* The values above are averages of two determinations.

Table 8. Comparison of Nicotine Degradation Rate among the Habitats Related to Tobacco.

| genus | Pseudomonas | | | | | | Total Number of Strains | Mean Value of Nicotine Degradation Rate (%) |
|-----------------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|----------|-------------------------|---|
| | Arthrobacter | (non-pigmented) | (pigmented) | Alkaligenes | Chromobacter | Listeria | | |
| habitat | | | | | | | | |
| Leaf Tobacco | | | | | | | | |
| flue-cured | | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | | 8 |
| air-cured | | 2 | | | | | 1 | 3 |
| sun-cured | | 3 | | 4 | 2 | 1 | 3 | 13 |
| cigar | 1 | 1 | | | | | | 2 |
| Soil | 2 | | | | | | | 2 |
| Seed | | 1 | | | | | | 1 |
| Root | | 1 | | | | | | 1 |
| Manufacturing process | 1 | 1 | | 1 | | | | 3 |
| Cigarette | | | | | 1 | | | 1 |
| Total | 4 | 11 | 2 | 6 | 5 | 2 | 4 | 34 |
| | | | | | | | | 65.6 |
| | | | | | | | | 87.5 |
| | | | | | | | | 79.0 |
| | | | | | | | | 76.4 |
| | | | | | | | | 34.7 |
| | | | | | | | | 92.9 |
| | | | | | | | | 93.8 |
| | | | | | | | | 75.0 |
| | | | | | | | | 23.9 |
| | | | | | | | | 69.8 |

Figures in the table indicate the number of strains.

Table 9. Characteristics of Strain NCT 27 having the most Predominant Activity for Nicotine Degradation.

| characteristics | P. fluorescent group | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------|
| | P. aeruginosa ¹⁹⁾ | P. fluorescens ¹⁹⁾ | P. putida ¹⁹⁾ | strain NCT 27 |
| No. of flagella | 1 | 1 | 1 | 1 - 3 |
| pigment | | | | |
| fluorescent | + | + | + | + |
| phenazine | + | V | - | - |
| egg yolk reaction | - | + | - | N. T |
| Methionine req. | - | - | - | - |
| Denitrification | + | V | - | - |
| Growth at 4° C | - | + | V | - |
| 41° C | + | - | - | - (+) |
| Extracellular | | | | |
| <u>nydrolase</u> | | | | |
| poly- β /hydroxy -butyrate | - | - | - | - |
| lipase | + | + | - | - |
| gelatin | + | + | - | - |
| protease | + | + | - | - |
| starch | - | - | - | - |
| oxidase | + | + | + | + |
| arginine dehydrolase | + | + | + | + |
| Utilization as sole | | | | |
| carbon and energy | | | | |
| D-glucose | + | + | + | + |
| maltose | - | - | - | - |
| starch | + | + | - (+) | + |
| trehlose | - | + | - | - |
| inositol | - | + | - | - |
| glycine | N. T | - | + | + |

* V : variable

N. T : not tested

+ : positive

- (+) : usually negative, occasionally positive

- : always negative

으며 높은 농도의 니코틴에 적응되어진 균주가 분리될 수 있다고 생각된다.

가장 강력한 니코틴 분해균주로 선정된 strain NCT 27의 생물학적 특성은 Table 9, Fig. 1에 표시되어 있는데, 이것은 Coussirat (2), Tabuchi(22), Newton (14) 등에 의해 보고된 니코틴을 분해하는 Pseudomonas 중에는 일치하는 것이 없으며 Stanier (19)의 호기성 Pseudomonas 분류 key에 의해서 P. fluorescent group의 Pseudomonas putida로 동정되었다.

References

1. Coussirat J. C., et Pierre Schiltz., *Annales du Tabac. Sect.*, 2 : 155 (1973).
2. Coussirat J. C., Pierre Schiltz., *Annales du Tabac. Sect.*, 2 : 13 (1976).
3. Cowan S. T., *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd Ed. (1974).
4. Curtis Eklund, and C. E. Lankford., *Laboratory manual for general microbiology*. Prentice Hall (1977).
5. De Vries A., and M. Deboer., *Tob. Sci.*, 20 : 78 (1976).
6. Enders C., and Glawe R., *Biochem. Z.*, 312 : 277 (1942).
7. Frankenburg W. G., *Adv. in Enzymol.* Vol VI : 309 (1946).
8. Frankenburg W. G., and A. M. Gottscho., *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 : 509 (1955).
9. Griffith G. D., Richard U. B., and Willis A. Weed., *P. S. E. B. E.*, 108 : 162 (1961).
10. Hinz C. F., and J. Westenhoefer., *Tob. Sci.*, 10 : 98 (1966).
11. Hochstein L. I., and Sydney C. Rittenberg., *J. Biol. Chem.*, 239 : 151 (1959).
12. Hylin J. W., *J. Bacteriol.*, 76 : 36 (1959).
13. Ilyin G. S., *Proceeding Actes du Congrès.*, 251 (1970).
15. Newton et al., *U. S. Patent 4037609* (1977).
15. Paul E. Holmes and Sydney C. Rittenberg., *J. Biol. Chem.*, 247 (23) : 7628 (1972).
16. Robert S. Bree, E. G. D. Murray and Nathan R. Smith., *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th. Ed. (1957).
17. Sgueros D. L., *Science*, 124 : 427 (1948).
18. Scheldon, and Aarnson., *Experimental microbial ecology*. Academic Press, New York & London (1970).
19. Stanier R. Y., and N. J. Palleroni and M. Doudoroff., *J. Gen. Microbiol.*, 43 : 159 (1966).
20. T. Kasaki, S. Maeda et al., *Beiträge zur Tabakforschung International*, Vol. 9 No. 5 (1978).
21. Wada E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 72 : 145 (1957).
22. 内田節子, 専賣中研報, 118 : 197 (1976).
23. 田淵武士, 日本農化, 28 (10) : 806 (1954).
24. 한국연초연구소, 담배성분분석법, (1979).