



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

생물고분자 생산 초산균과  
에탄올 효모의 혼합배양

濟州大學校 大學院

食品工學科

李 炫 姪

2014年 2月

# 생물고분자 생산 초산균과 에탄올 효모의 혼합배양

指導教授 高 榮 煥

李 炫 妮

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2014年 2月

李炫妮의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ 朴 恩 珍

委 員 \_\_\_\_\_ 金 賢 貞

委 員 \_\_\_\_\_ 高 榮 煥



濟州大學校 大學院

2014年 2月

# Mixed Culture of a Biopolymer-Producing Acetic Acid Bacterium and an Ethanol Yeast

Hyun Jung Lee

(Supervised by professor Young Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the  
degree of Master of Engineering

2014. 02.

This thesis has been examined and approved.

Eun-Jin Park, Thesis director, Prof of Food Science and Engineering  
Hyun Jung Kim, Prof of Food Science and Engineering  
Young Hwan Ko, Prof of Food Science and Engineering

February 2014

Department of Food Science and Engineering  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

LIST OF TABLES .....	ii
LIST OF FIGURES .....	iii
<b>Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>1. 서론 .....</b>	<b>3</b>
<b>2. 재료 및 방법 .....</b>	<b>12</b>
2.1. 균주의 분리, 배양 및 동정 .....	12
2.1.1. 초산세균의 분리 및 배양 .....	12
2.1.2. 분리된 균주의 동정 .....	12
2.1.3. 에탄올 효모 .....	13
2.2. Biopolymer 분리 및 <sup>13</sup> C-NMR을 이용한 구조분석 .....	14
2.3. 초산균 생육에 미치는 에탄올 농도의 영향 .....	14
2.3.1. 생물고분자 정량 .....	14
2.3.2. 산도측정 .....	14
2.4. 초산균과 에탄올 효모의 혼합배양 .....	15
2.4.1. 당도 측정 .....	15
2.4.2. 에탄올 정량 .....	15
2.4.3. 효모세포 계수 .....	16
<b>3. 결과 및 고찰 .....</b>	<b>17</b>
3.1. 분리균주의 동정 .....	17
3.2. Biopolymer의 구조 .....	22
3.3. 초산균 생육에 미치는 에탄올 농도의 영향 .....	24
3.4. 초산균과 에탄올 효모의 혼합 배양 .....	28
<b>4. 요약 .....</b>	<b>33</b>
<b>5. 참고문헌 .....</b>	<b>35</b>

[LIST OF TABLES]

Table 1. Test results of an acetic acid bacterium NOK21 by API20 NE kit .....	18
Table 2. Partial DNA sequences of 16S-rRNA gene from NOK21 bacterial isolate .....	20
Table 3. Changes in total acidity and biopolymer concentration during cultivation of NOK21 isolate at different level of ethanol concentration .....	26
Table 4. Changes in total acidity, yeast population, and concentrations of ethanol and biopolymer during mixed culture of an acetic acid bacterium NOK21 and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Pilsner at different levels of glucose concentration .....	30

[LIST OF FIGURES]

Fig. 1. Bacterial cellulose membrane. ....	6
Fig. 2. Mechanism of acetic acid production. ....	10
Fig. 3. Microscopic examination of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Pilsner cells after staining with crystal violet(X400). ....	13
Fig. 4. Morphology of an acetic acid bacterium NOK21. ....	17
Fig. 5. Phylogenetic tree of the isolate NOK21 by neighbor-joining(NJ) method comparing partial 1,380bp sequences of 16S-rRNA genes. .....	21
Fig. 6. <sup>13</sup> C-NMR spectra of absorbent cotton(A) and biopolymer from NOK21 culture(B). ....	23
Fig. 7. Back bone structures of cellulose and acetylated biopolymer. .....	24
Fig. 8. Changes in total acidity(top) and biopolymer concentration (bottom) during cultivation of NOK21 isolate at different level of ethanol concentration. ....	27
Fig. 9. Effects of glucose concentration on total acidity during growth for 12 days. ....	31
Fig. 10. Effects of glucose concentration on yeast population during growth for 12 days. ....	31
Fig. 11. Effects of glucose concentration on ethanol concentration during growth for 12 days. ....	32
Fig. 12. Effects of glucose concentration on biopolymer concentration during growth for 12 days. ....	32

## Abstract

From the pellicle membrane of rancid wine, an acetic acid bacterium NOK21, which was intended to be used as an inoculum for fermented sour drinks or a producer of biopolymer applicable to diet food, pharmaceuticals, cosmetics or bioplastic industries, was isolated and purified.

The isolated bacterium was Gram-negative, aerobic, and rod-shaped bacterium, which could assimilate capric acid as a carbon source. The partial 1,380bp nucleotide sequences of its 16S-rRNA gene were determined and compared with those of some known bacterium through blast search of GenBank data in NCBI, USA. The bacteria showing greater than 99.7% homology mostly belonged to *Gluconacetobacter hansenii* species. The *G. hansenii* has been well-known as an acetic acid bacteria producing cellulose polymer.

The thick insoluble membrane formed by the NOK21 was subjected to solid  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy to analyze the types of its constituting carbon atoms. The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the water-insoluble polymer suggested that the biopolymer was not pure cellulose. It was estimated to be a new acetylated biopolymer such as hyaluronic acid(hyaluronan) containing carboxyl, amide(or ester) and acetyl groups.

The changes in culture acidity and biopolymer concentration during cultivations were measured to investigate the effects of ethanol concentrations from 0 to 8% on NOK21 bacterial growth.

The growth rate showed the greater in the medium containing 3% ethanol where the bacteria produced both acid and insoluble biopolymer. The biopolymer concentration reached the maximum 5.2g/ℓ in 3% ethanol-containing medium whereas the highest acidity 3.97% was observed



in the 5% ethanol-containing medium. No bacterial growth was observed in the medium containing greater than 6% ethanol.

When the bacteria NOK21 and yeast *Saccharomyces cerevisiae* were co-cultivated simultaneously in the medium containing glucose 2~20%, both acid and biopolymer were produced only in the media containing relatively low glucose concentration at 2% and 5%. In addition, ethanol was produced prior to the acid and biopolymer production, which suggested that the yeast converted glucose to ethanol first, and the bacteria oxidized ethanol into acetic acid and synthesized biopolymer. Although the yeast made ethanol to a great degree at glucose concentration higher than 10%, no production of either acid or biopolymer was observed probably due to the inhibition of NOK21 bacterial growth. Meanwhile, the yeast cell concentration was maintained at quite constant level at  $1.0 \times 10^7$  cells/ml throughout all the media containing glucose 2~20%. The greater glucose concentration in the culture medium showed a tendency of higher ethanol production.

This research demonstrated that the isolate NOK21 belonged to acetic acid bacterial group like *G. hansenii* and synthesized organic acid and new acidic biopolymer like hyaluronan during co-cultivation with ethanol-fermenting yeast *S. cerevisiae*. These results will be useful for the mass production of such fermented health drinks as Kombucha and hydrogel-like biopolymer.

## 1. 서론

새로운 고분자 제조기술의 발달로 유기화학적으로 합성된 수많은 고분자 물질들이 시판되고 있다. 이들 합성 고분자는 동식물이나 해조류 등 자연의 생물체로부터 추출된 생물고분자와 함께 병용되고 있다. 최근에는 유기합성 고분자물질들을 대체하기 위한 방법으로 미생물 유래의 생물고분자(biopolymer)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

미생물은 다양한 생물고분자를 생산한다고 알려져 있으며, 이들 미생물이 생산한 생물고분자는 이미 알려진 고분자 물질과는 다르게 생산조건에 따라 구성 성분, 결합순서, 분자량, 결합양식, 결합위치 및 결합지가 다른 다양한 형태로 존재한다. 또한 그에 따라 독특한 물성과 생리활성을 나타낼 수 있으므로 각종 산업의 신소재로서 이용 가능성이 크다. 미생물을 이용한 발효 생산법은 시간과 장소에 제한 받지 않고 대량 생산할 수 있는 장점을 가지고 있어, 동식물자원의 고갈과 더불어 점차적으로 이용가치가 커질 것으로 예상된다.

미생물이 생산하는 생물고분자들은 xanthan gum, dextran, pullulan, levan, gellan gum, poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate(PHA) 및 polyglutamic acid(PGA), curdlan, wellan, rhamsan 등이 있으며, 이러한 고분자물질들은 그 종류와 이용도가 다양하고, 생태계의 생물학적 기능으로 자연분해되는 특징이 있고, 유전자 조작 기술을 이용한 균주 개량으로 수율을 증가시키고, 독특한 기능을 갖는 새로운 생물고분자의 개발과 응용이 가능하다. 그리고 독특한 고분자적 성질이 있음을 이용하여 식품공업뿐만 아니라 화학공업에서도 물성개량제, 유화제, 안정제, 응고제, 피막형성제, 보습제 및 저칼로리 음식의 성분으로 사용하거나 액체의 점성을 증가시켜 식품의 질감과 감각적 특성을 부여하는 등 다양한 용도로 이용되고 있다[1].

식물병원성 박테리아인 *Xanthomonas* 속에 의해서 합성되는 결사슬달린 음이온성 heteropolysaccharide를 xanthan gum이라 한다. xanthan gum 수용액은 낮은 농도에서도 높은 점성을 보일 뿐 아니라, 넓은 범위의 온도, pH, 염 농도에서도 점성이 변하지 않고 장시간 동안 일정하게 유지되는 독특한 물성학적 특성으로

식품첨가물, 의약, 제약 등의 분야에 널리 사용되고 있다[2].

Dextran은 균체 외로 분비되는 dextransucrase에 의해 생성되며  $\alpha$ -D-glucopyranose가  $\alpha$ -(1→6) glucosidic결합으로 이루어져 있는 대표적인 생물고분자이다. dextran은 안전성과 난분해성이 있어서, 잔류 석유의 회수, 제지 섬유제품의 점도 개선, 경도부여 및 고착제로, 화장품이나 도료의 현탁제, 필름의 코팅제, 주류와 음료의 향기 성분과 기포의 포지성을 개선하는 첨가물, 시럽, 아이스크림, 젤리 등의 식품첨가물로 사용되며, 특히 의료용으로는 혈장대체제 혹은 혈액흐름촉진제 등으로 사용된다[3].

Pullulan은 흑효모라고 불리는 *Aureobasidium pullulans*에 의하여 합성되는 수용성 세포외 다당류(water-soluble extracellular-polysaccharide)로서 maltotriose를 기본단위로 하여  $\alpha$ -(1,4)와  $\alpha$ -(1,6)결합으로 중합된  $\alpha$ -glucan으로 알려져 있다. pullulan은 독성이나 돌연변이성 등이 전혀 없는 가식성(可食性) 다당류로서 포장용 재료, 식품원료 및 물성개량제로 적합하여, 화장품, 의약품 등의 코팅제, 필름 형성제 등 광범위하게 생물고분자로 사용되고 있다[4].

*Pseudomonas elodea*에 의하여 생성되는 gellan 형태의 세포외 다당류는 새로운 음이온성 heteropolysaccharide로, 포도당, 글루쿠로닉산(glucuronic acid), 포도당과 람노오스(rhamnose)가 연속적인 순서로 연결된 사당체가 한 개의 반복단위체를 이루는 구조로 되어있다[5]. 특이한 물성 때문에 점증제, 현탁제, 안정제 및 식품, 의약공업 등에 그 응용성이 증대되고 있는 수용성 고분자이다. gellan 수용액은 낮은 농도에서 높은 점성을 나타낼 뿐만 아니라 효소에 대한 저항력이 강하고 멸균조작 후에도 변성이 유발되지 않기 때문에 미생물 배양배지와 식물세포 배양시 한천(agar) 대용품으로도 각광받고 있다[6].

생분해성 플라스틱인 poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate(PHA)는 최근 난분해성 플라스틱으로 인한 환경문제가 심각해짐에 따라 그 대체물질로서 연구가 활발하게 진행되고 있는 대표적인 생물고분자물질이다. 또한 PHA는 생분해성과 함께 생체적합성, 기체 차단성, 광학활성과 다른 고분자와 혼합 용이성 등 그 다양한 특성으로 인해 수술용 봉합사, 인공장기, 포장재, 자외선 차단용 화장품과 폴리에스터 대체용 등으로 용도를 개발하기 위한 연구가 이루어지고 있다[7].

Polyglutamic acid(PGA)는 주로 합성법으로 얻고 있으나 미생물에 의해서도 polyglutamic acid가 생합성되는 것이 알려졌다. 특히, 미생물에 의한 polyglutamic acid는 합성법으로 얻어진 것과는 달리  $\gamma$  위치의 carboxylic acid가 peptide 결합을 하고 있는 일종의 단백질인  $\gamma$ -polyglutamic acid( $\gamma$ -PGA)를 생산하는 것으로 밝혀졌다.  $\gamma$ -PGA는 *Bacillus* 속 세균에 한하여 생산되는 것으로 알려져 있으며, 생분해되며 인체에 대한 독성이 없고, 생산비가 비교적 저렴하다. 우리의 전통 콩 발효식품인 청국장 등의 주요 성분이  $\gamma$ -PGA이다. 제주대학교에서도 *Bacillus licheniformis*를 이용한 발효생산 연구가 진행되고 있으며, 일본에서는 *Bacillus natto*를 중심으로  $\gamma$ -PGA의 효율적인 발효 합성법을 수립하여 식품품질개량제로서 시판되기에 이르렀고, 화장품에도 응용하기 위하여 개발 중이다[8].

Curdian은 *Agrobacterium* 속에 속하는 미생물이 생산하여 체외로 분비하는 다당류로서 포도당이  $\beta$ -1,4 결합으로 이어진 중합체이다. curdian은 중성 pH에서 물에 녹지 않으나 약 알칼리 용액에서 녹는다. 54°C 정도의 온도에서 녹아 젤을 형성할 경우 더 높은 온도로 가열하면 녹아서 액상으로 환원되나 100°C 이상의 높은 온도에서 젤을 형성하는 경우에는 다시 액상으로 환원되지 않는다. 이러한 특성 때문에 식품 산업에서 주로 증량제나 저칼로리 식품의 첨가제 및 천연검을 대체할 목적으로 많이 사용되고 있다. 커드란의 황산염 유도체는 HIV(human immunodeficiency virus)에 대한 항바이러스능이 입증되어 의학 분야에까지 적용 분야를 넓혀가고 있다.

Wellan은 *Alcaligenes* 속의 미생물이 생산하는 다당류이며 기본 구조는 gellan과 같으나, rhamnose 혹은 mannose 결사슬을 갖고 있는 점이 다르다. wellan은 xanthan과 성질이 유사하나, 열에 대한 안정성이 xanthan에 비하여 우수하다. 우수한 열 안정성 때문에 높은 온도에 사용되는 굴착기와 같은 공구의 윤활제로 개발되고 있다. 또한, 높은 pH에서 칼슘 이온과의 반응성이 우수하므로 시멘트와 콘크리트 등과 반응하여 높은 강도와 유연성을 갖는 구조물을 만들 수 있으므로 건축분야에서 적용하기 위한 연구가 진행 중에 있다.

Rhamsan도 wellan과 *Alcaligenes* 속의 세균이 생산하는 다당류로 기본 구조는 wellan 및 gellan과 같으나, 이당류의 결사슬을 갖고 있는 점이 다르다.

rhamsan은 낮은 전단력과 낮은 농도에서도 높은 점도를 갖는다. 독특한 물성으로 비료 현탁액, 안료 현탁액, 세척제, 페인트와 도료의 첨가제로 사용될 수 있다[5].

한편, 식초는 주로 조미료와 음료로 이용되었으나 최근에 식초 생산과정에서 형성되는 피막을 이용한 신소재 개발에 관심이 높아지고 있다. 이 피막은 초산균이 생성하는 cellulose로 생물고분자(biopolymer)이다[9](Fig. 1).



Fig. 1. Bacterial cellulose membrane formed from acetic acid bacteria.

Cellulose를 생산하는 초산균은 양조과정이나 식초발효과정에서 오염균으로 발효액의 표면에 피막을 형성하거나 불쾌한 냄새를 발생시키는 균으로 인식되어 왔으나, 1886년 Brawn이 피막의 성분이 cellulose임을 규명한 이래 많은 연구가 이루어지고 있다[10].

생물고분자(biopolymer) 중에서도 cellulose는 자연계에서 가장 풍부한 biomass로 알려져 있으며 식물체뿐만 아니라 세균에 의해서도 생산된다. 미생물 셀룰로오스의 생산균주로는 *Acetobacter*속, *Rhizobium* 속, 그리고 *Agrobacterium* 속 등이 보고되고 있으며, 그 중에서 특히 우수한 균주는 *Acetobacter xylinum*(최근에 균주명이 *Gluconacetobacter xylinus*으로 재분류되었다)으로 알려져 있다. *A. xylinum*을 호기적 조건에서 정지 배양하면 배양액 표면에 얇은 막(pellicle)의 형태로 3차원 망상조직의 셀룰로오스가 형성되며,

이 pellicle 내에서 균체가 증식하는 것으로 보고되었다[11].

이러한 망상구조의 피막은 무작위로 형성된 결정형 섬유소 셀룰로오스 (cellulose)이며, 그 너비는 100 nm보다 작고 반지름이 2~4 nm인 무수히 많은 미세한 마이크로 피브릴로 이루어져 있다. 이러한 bacterial cellulose(BC) 미세섬유(microfibril)의 밀도는 1600 kg/m<sup>3</sup>이다. 또한, 높은 결정화도(84~89 %)와 78 MPa인 고유의 물리적 성질은 일반적으로 보고된 Macro-scale의 천연 섬유보다 높거나 유리섬유의 탄성률(70 GPa)과 비슷한 성질을 보일뿐 아니라, 충분한 공극을 가지며, 생체적합성이 매우 우수한 특징을 보인다. Brown(1976) 등은 일찌기 최초로 *A. xylinum*를 배양하는 가운데 배지의 윗부분에서 자라나는 하얀색의 균막층(pellicle)을 발견하였고, 이를 셀룰로오스라고 보고하였다[12].

일반적으로 식물의 섬유질은 1차 구조가  $\beta$ -1,4-glucan 결합으로 이루어진 cellulose와 hemicellulose 그리고 lignin을 포함하는 heteropolysaccharide로 이루어져 있는 반면에, BC는 99%이상이 glucose의  $\beta$ -1,4 결합만의 순수한 셀룰로오스로 2~4nm의 미세섬유(microfibril)가 수소결합에 의한 3차원적 망상구조를 이루고 있으며 결정도가 매우 높은 특징을 가지고 있다. 또한 보수성, 흡착성이 우수하고 원하는 형태로 성형이 가능하며, 특히 고강도 고탄력의 특징을 가지고 있다. 이러한 특성 때문에 산업적으로 여러 용도로 개발 이용되어지고 있다. 방위산업 분야로 방탄조끼의 응용 연구, 의료 분야에서는 인공피부, 창상 피복제, 인공관절 및 미세한 섬유구조를 이용한 반투막 제조, 음향산업 분야에서는 고음질의 스피커 진동판 제조, 제지 분야는 종이의 도공액 첨가제, 정보기록용지 및 종이의 탄성율, 인장강도 등이 향상된 고품질의 용기제조에 이용될 수 있다. 또한 셀룰로오스는 난소화성, 고점성의 특성을 가지고 있기 때문에 식품의 증량제, 선도 유지제 및 조직감 향상에 이용될 수 있어, 식이 섬유의 소재로 개발되고 있다[13].

BC는 생체적합성과 기계적 성질이 우수하며, 인공피부, 인공연골, 창상보호제, 인공혈관, 화상치료제 등에 응용 할 수 있는 첨단 소재로서 Biofill, Bioprocess®와 Gengifles® 등의 상품명으로 의료용 재료로 활용되고 있다. 특히 2도, 3도 화상의 경우 손상된 피부점막을 순간적으로 덮는 인공 피부로서 끈적끈적한 박테리아 셀룰로오스가 Biofill®로 널리 사용되고 있다. 300회 이상

의 치료결과에 관한 연구 및 보고에 의하면, 진통완화 효과, 상처부위에 높은 결합성, 수술 후 안정 효과, 감염률의 감소, 투명성에 의한 상처 부위의 감염여부 확인, 낮은 처리비용과 시간 등의 장점이 있다[12].

상처드레싱뿐만 아니라 조직 공학에서 요구되는 튼튼한 뼈대에 이르기까지 다양한 종류의 의료제품의 조제에도 적용될 수 있다. 이러한 신소재는 조직 공학, 약물 전달, 그리고 의료용 의식물 등과 같이 많은 생물 의약과 생물 공학에 이용되고 있다. 미생물 셀룰로오스는 지속성이 있고 생체 친화적이어서 조직 공학을 위한 우수한 후보 물질이라는 것이 제시되었다. 상처 치유와 기관 대체물과 같은 몇 가지 경우에 있어서, 많은 임상 시험이 수행되어 이러한 분야에서의 효율성을 보여주었다[11].

천연 식품 소재의 제2의 피부라고 불리는 새로운 개념의 차세대 신소재인 BC는 화장품 업계에서는 바이오셀룰로오스로 일컫는다. 3차원 망상구조로 이루어진 바이오셀룰로오스는 종래의 부직포 마스크 팩보다 표면적이 넓고 치밀하여 찢어지지 않고, 제2의 피부처럼 피부 밀착력이 뛰어나고 10배 이상의 습윤성을 보유하고 있어 고농축 에센스의 증발을 막아 피부 흡수율을 높여줄 수 있다. 또한 자연 친화적인 천연소재로 피부안정성이 매우 우수하여, 실제 산업에서 바이오셀룰로오스를 기반으로 한 다양한 마스크 팩이 출시되고 있다.

식이섬유에는 가용성과 불용성 두 종류가 있는데, 펙틴(과일), 알긴산(해조류), 구아검(아이스크림) 등의 가용성 식이섬유와는 달리, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌(옥수수, 콩, 채소), 키틴(갑각류 껍질) 등은 불용성 식이섬유에 속한다. 불용성 식이섬유는 팽윤성으로 인하여 위장에서 포만감과 장관에서의 연동촉진, 그리고 흡착성으로 인하여 잉여 담즙산과 중금속, 이물질 등을 흡착하여 그 유해작용을 감소시킨다. 식품산업에서는 BC의 겔 형성능과 수분흡수성 등의 특성을 다양하게 활용할 수 있다. BC는 다이어트 식품 소재로서도 활용 가능성이 높다. 이를 첨가하여 식감이 뛰어나며, 보수성을 이용하여 특정한 맛, 성분 또는 향을 첨가하면 특유의 제품을 생산할 수 있다.

다공성 셀룰로오스 재료인 BC는 금속 또는 전도성 필름과 같은 고밀도 물질과는 다른 전기적 특성이 필요한 전자 기기로의 활용을 확대할 수도 있다. BC의 표면에 전도성 고분자를 중합하거나, 전처리로 실란처리를 통해서 전도성을 향

상시키는 연구 등을 진행하였으며, 그 결과 실란 전처리 과정을 통하여 BC의 3차원 망상구조의 표면에 전도성 고분자인 폴리아닐린과 아미노실란 처리로 개질된 셀룰로오스 표면의 아민기와 친화력을 보여 치밀하고 균일하게 고분자를 중합시킬 수 있었으며 그로 인해 전도성이 향상됨을 알 수 있었다. 따라서 제조된 전도성 고분자/BC 복합재료는 생체적합성과 전기전도성이 동시에 요구되는 화학·생물학적 센서, 저용량 에너지 장치 등에 적용될 수 있을 것으로 보인다.

BC는 인장강도 및 기계적 성질이 높아 고강도 재료로서 사용이 가능하며, 실제로 일본의 SONY사에서는 이를 사용하여 스피커의 음향진동판에 활용하여 고성능 헤드폰을 판매한다. 음향진동판은 음파속도(sonic velocity)와 내부적으로 음파가 흡수되는 성질인 손실계수(internal loss)가 높아야 한다. 일반적으로 음파속도는 인장탄성계수를 밀도로 나눈 값인 비인장탄성계수의 제곱근에 비례한다. 하지만 박테리아 셀룰로오스는 높은 음파속도(5000 m/s)에도 불구하고 손실계수가 높아 음향기구인 스피커와 헤드폰의 진동판에 이용되고 있다[12].

BC는 그 독특한 물리화학적 그리고 기계적 특성으로 다양한 방면에 적용이 가능하지만, 생산량과 사용량은 비교적 적는데, 이는 만족할만한 수준의 효율적인 균주와 배양배지의 비용 때문이다. BC의 가장 효율적인 생산자는 초산발효 세균(acetic acid bacteria)으로 알려진 그람 음성균인 *A. xylinum*(*Gluconacetobacter xylinus*로 재분류 됨)이다. *A. xylinum*는 단일로, 쌍으로 또는 사슬로서 존재하고 binary fission에 의하여 재생되며 편모로 움직이고 내세포자를 형성하지 않는다. *A. xylinum*의 성장에 적합한 온도는 25-30°C 범위로 pH는 5.4~6.2이다. *A. xylinum*은 액체와 고체 배지의 표면에 cellulose 성분의 pellicle를 형성하며, 정지배양 하에서 액체배지의 표면에 형성되는 젤라틴 또는 가죽 같은 매트(mat)에는 세균세포가 들어있다. 교반배양 하에서는 외피의 침착으로 인하여 cellulose가 불규칙적인 입자와 섬유가닥으로 이루어진 부유물질을 형성한다. 고체 한천(agar) 배지에서 *A. xylinum*은 동일한 또는 물결모양의 가장자리, 투명하거나 하얀색, 부드럽거나 거친, 평평하거나 볼록한 형태로서 균락을 형성한다[14].

초산의 생성과정은 효모에 의한 탄수화물의 알코올 발효와 초산균에 의한 에탄올의 산화-두 단계로 이루어진다[9](Fig. 2).



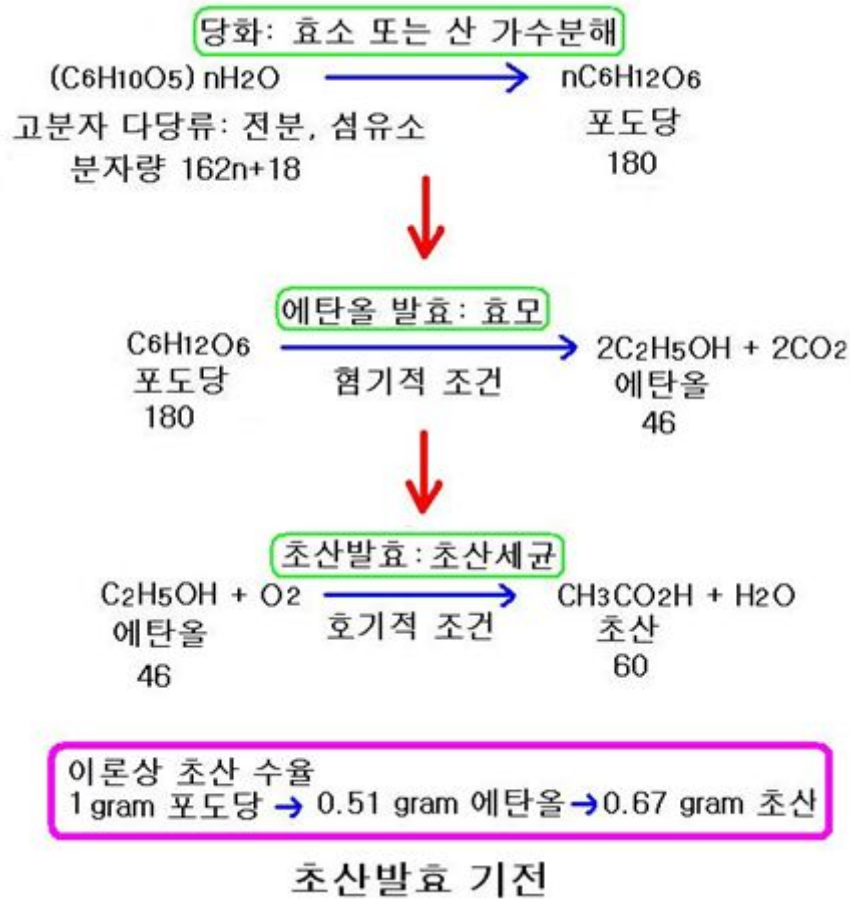


Fig. 2. Mechanism of acetic acid production.

알코올 발효는 효모 또는 세균이 포도당( $C_6H_{12}O_6$ )을 분해시켜 두 분자의 피루브산( $C_3H_4O_3$ )을 만든 다음, 연이어 피루브산이 에탄올( $C_2H_5OH$ )과 이산화탄소( $CO_2$ )로 전환되면서 에너지를 얻는 호흡방식이다. 한편 초산균은 포도당의 분해로 생긴 알코올( $C_2H_5OH$ )을 호기적 조건에서  $O_2$ 로 산화시켜 초산( $CH_3COOH$ )을 만든다. 초산균은 에탄올을 산화시켜 초산을 생성할 뿐만 아니라, 균종에 따라서는 초산을 이산화탄소와 물로 완전 산화시키기도 한다. 이론상 1g의 포도당으로부터 0.51g의 에탄올이 생성되고, 0.51g의 에탄올을 산화시키면 0.67g의 초산이 얻어진다.

효모는 혐기적 조건에서 당을 분해하여 알코올과 이산화탄소를 만들어 내는 대표적인 균주로는 *Saccharomyces* 속이 있으며, 맥주발효 과정에서 *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* 등과 청주에서 *S. sake*, 고량주에서 *S.*

*manchuricus* 등이 발견된다. 알코올을 산화시켜 초산을 생성하는 초산균은 호기적 발효를 하는 균주로서 *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. schuetzenbachii*, *Gluconobacter oxydans* 등이 있으며, 이들 세균은 Gram 음성, 호기성 단간균 또는 장간균으로 포자는 형성하지 않는다[15].

에탄올 발효와 초산발효가 동시에 진행되는 대표적인 예로 Kombucha 제조 과정을 들 수 있다. Kombucha는 설탕과 차와 적당한 초산세균 알코올 발효효모 미생물의 조합만 있으면, 가정에서 단순하고 쉽고 안전하게 건강에 유익한 발효음료를 만들 수 있다. 배양 적온은 24℃~29℃이며, 비교적 높은 온도가 낮은 온도에 비해서 짧은 기간에 균일한 제품을 생산하고, 저온에서는 곰팡이에 의한 오염 가능성이 증가한다. Kombucha의 조성은 발효온도와 기간에 따라 차이가 있으나, 대체로 다음과 같은 성분이 함유되어 있다[16, 17]. Pellicle(발효액 표면을 덮는 거칠고 질긴 섬유상 피막), caffeine, acetic acid, citric acid, propionic acid, gluconic acid, glucuronic acid, 2-keto-gluconic acid, succinic acid 등의 유기산, ethyl alcohol(ethanol), ethyl acetate 등의 에스테르(esters)와, vitamin B1(thiamine), vitamin B2(riboflavin), vitamin B3(niacin), vitamin B5(pantothenic acid), vitamin B6(pyridoxine), vitamin B12(cyanocobalamin), vitamin B15(pangamic acid), biotin(folic Acid), niacinamide, nicotinic acid, vitamin C 등의 비타민류가 있다.

본 연구에서는 산패된 포도주의 피막으로부터 균주를 분리하여 Kombucha와 같은 발효음료와 생물고분자 생산에 이용하고자 하였으며, 분리된 균주를 알코올 효모와 혼합배양하여 효모의 알코올발효 과정과 초산균의 초산발효 과정에 따라 이 두 가지 발효가 동시에 이루어 질 수 있는지, 또, 그 과정에서 어떠한 성분 변화가 일어나는지 알아보려고 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주의 분리, 배양 및 동정

#### 2.1.1. 초산세균의 분리 및 배양

산패된 포도주의 표면에 생겨난 질기고 두터운 막으로부터 세균을 분리하였다. 세균의 순수분리 및 배양에 기본적으로 SH배지(20g/ℓ dextrose, 5g/ℓ yeast extract, 5g/ℓ bactopectone, 2.7g/ℓ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.15g/ℓ citric acid)[18, 19]를 사용하였고, 배양온도는 28℃였다. 한천 고체배지상에 단일균락을 분리하였고, 분리된 세균을 액체배양하여 표면에 생물막 형성여부를 검정하였다. 생물막은 매우 질기고 단단하였으며, 표면은 점질성으로 부드럽고 미끄러웠다.

#### 2.1.2. 분리된 균주의 동정

분리된 균주를 동정하기 위하여 그람염색과 API20 NE test를 시행하였고, 전문기관(Solgent Co., Ltd., 대전)에 의뢰하여 순수분리된 균주의 16S-rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 비교하였다.

16S-rRNA 유전자 염기서열 분석방법은 다음과 같다. 배양된 세균의 균체로부터 전체 유전자 DNA를 분리하였다. universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')로 16S-rRNA 유전자에 해당하는 부위를 PCR(GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems)로 증폭시켰다. PCR 반응 온도 및 시간은 95℃(DNA 변성 온도)에서 15min, 95℃에서 20sec, 50℃(annealing 온도)에서 40sec, 72℃(Taq DNA polymerase 반응 온도)에서 1min 30sec, 72℃에서 5min으로 30cycle 반복하였다. PCR product는 Solgent사의 PCR purification kit로 정제하였고, 1% agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하였다. 정제된 16S-rRNA 유전자의 PCR product를 Bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit(Applied Biosystems)(bigdye는 형광물질로 labeling 된 ddNTP)로 반응시켜 구성염기의 종류에 따라 4종의 형광물질로 labeling시키고, PCR sequencing 반응에 참여하지 않은 잔여 ddNTP

는 acetate와 70% EtOH을 사용한 DNA 침전법으로 제거하였다. 정제된 DNA를 탈이온 formamide(Hi-Di formamide)에 녹인 다음 capillary electrophoresis와 laser detector 장치가 장착된 ABI 3730XL DNA Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 USA)에 running시켜서 자동으로 형광물질이 검출되고, 염기서열이 결정되도록 하였다. 전체 16S rRNA 유전자 1542kb중에서 1380 bp를 결정하여, NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 구축된 GenBank data base를 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)하고, 뉴클레오티드 염기서열을 비교하였다.

### 2.1.3. 에탄올 효모

초산세균이 에탄올을 초산으로 산화시키는 점을 고려하여 *Saccharomyces cerevisiae* Pilsner를 혼합배양용 에탄올 발효효모로 사용하였으며, crystal violet으로 염색한 후, 400X 광학현미경으로 관찰한 모습은 Fig. 3과 같다. 이 효모의 최적 발효온도는 10~13℃로 비교적 낮으며, 에탄올 농도 15%에서도 생존 가능하다. 효모는 계대배양과 보존은 PDA(potato dextrose agar, Difco) 배지를 사용하였다.

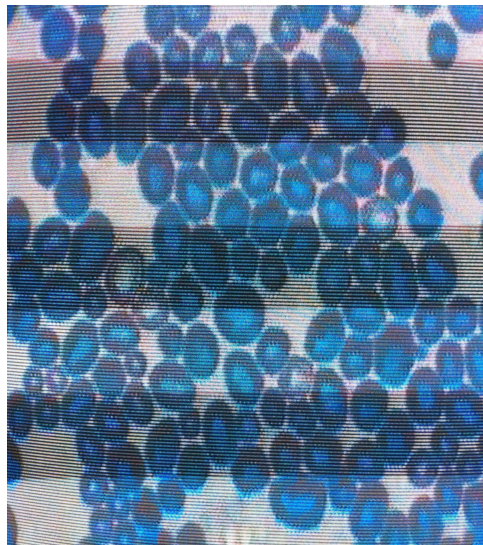


Fig. 3. Microscopic examination of *Saccharomyces cerevisiae* Pilsner cells after staining with crystal violet(X400).

## 2.2. Biopolymer 분리 및 $^{13}\text{C}$ -NMR을 이용한 구조분석

초산발효과정에서 생긴 균막(pellicle)이 어떤 종류의 생물고분자인지 확인하고자 하였다. 초산균을 SH배지에 배양하였을 때 표면에 생성된 불용성 피막을 수거하여 0.5M NaOH 용액으로 90°C에서 1시간 동안 처리하고, 이어서 증류수로 3회 세척하여 불순물을 씻어내고 정제하였다. 정제된 고분자를 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하고, 고체  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy로 분석하였다[19].  $^{13}\text{C}$ -NMR 분석에 사용된 기기는 400MHz Avance II<sup>+</sup> Bruker Solid-state NMR(한국기초과학지원연구원 대구센터)이며,  $^{13}\text{C}$  CP/MAS (cross-polarization/magic-angle spinning) 방법으로 분석하였고, 운용조건은 다음과 같다: spinning rate, 8 kHz; delay time(d1), 3 sec; contact time(p15), 2 ms; radio frequency, 100.623 MHz; calibration, TMS(tetramethylsilane)(0ppm).

## 2.3. 초산균 생육에 미치는 에탄올 농도의 영향

SH배지를 멸균시킨 후에 95% 에탄올을 섞어서 에탄올 최종농도를 0~8%로 만들었다. 에탄올 함유 SH배지를 각 100ml씩 삼각 플라스크에 넣고, 초산균을 1백금이씩 접종하여 28°C에 정지배양하면서, 5일 간격으로 총 3회 동안 생물고분자의 생성량과 배양액의 산도를 측정하였다.

### 2.3.1. 생물고분자 정량

초산세균을 정지 배양 후에 불용성 생물고분자막에 부착된 세포들을 제거하기 위해 90°C에서 0.5M NaOH 용액에 1시간 동안 담가두었다가 증류수로 3회 세척하여 각종 불순물을 제거하였다. 그 후 105°C에서 항량이 될 때까지 건조시키고 전자저울로 무게를 칭량하였다[19].

### 2.3.2. 산도측정

배양액 10ml에 증류수를 더하여 100ml로 만들고 삼각플라스크에 20ml씩 넣고, 그 속에 페놀프탈레인을 1~2방울 떨어뜨린 후, 0.1N NaOH로 적정하여 소모된 양을 측정하였다[20, 21]. 산도는 초산을 기준으로 다음식과 같이 계산하였다.

$$\text{총산도(초산기준) (\%)} = V \times A \times D \times \frac{1}{S} \times 100$$

V: 0.1N-NaOH 용액의 소모량 (ml)

A: 0.1N-NaOH 용액 1ml에 상당하는 초산의 양 (0.006 g)

D: 희석배수 (10배)

S: 시료의 채취량 (20ml)

#### 2.4. 초산균과 에탄올 효모의 혼합배양

보편적인 탄소원인 포도당은 효모의 발효 작용으로 에탄올로 전환되고, 에탄올은 초산세균에 의해서 초산으로 전환된다. 따라서 에탄올 효모와 초산세균을 동시에 혼합배양하면 포도당으로부터 초산과 더불어 섬유질성 생물고분자를 생산할 수 있다.

포도당을 2%, 5%, 10%, 15% 그리고 20% 각각 함유하는 SH배지를 만들고, 200 ml의 배지에 초산균과 에탄올 효모를 각각 1백금이 씩 접종하여 28℃에서 정치 배양하였다. 배양 중에 3일 간격으로 총 4회에 걸쳐 생물고분자의 생산량과 효모세포 수, 당도, 산도, 에탄올 함량을 각각 측정하였다.

##### 2.4.1. 당도 측정

배양액 중의 당도는 굴절당도계(ATAGO, N-1 α, Japan)로 측정하였다[20, 21].

##### 2.4.2. 에탄올 정량

배양액 중의 에탄올 함량은 물과 에탄올 혼합물의 비중 차이를 이용한 주정계로 측정하였다. 배양액을 100ml씩 채취하여 등근 플라스크에 넣고 heating mantle로 가열시켜, 약 70ml의 증류액을 받았다. 증류액에 증류수를 보충하여 100ml로 정용한 후에 냉각시켜 온도가 15℃로 떨어지면 주정계로 에탄올 함량을 측정하였다. 측정값은 Gay-Lussac의 주정환산표를 이용하여 보정하였다[22, 23].

#### 2.4.3. 효모세포 계수

배양액을 100배 희석하여 세포 계수용 슬라이드 글라스(Counting cell, 1ml/1  $\mu$ l, Graticules limited, England)에 넣고, 광학현미경(Olympus, Japan)하에서 단위 부피 1 $\mu$ l당 들어있는 효모수를 세었다. 효모 세포의 농도는 희석배수를 곱한 후 세포 수/ml로 환산하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 분리균주의 동정

산패된 포도주에 두텁고 매끄러운 피막을 형성하는 세균 NOK21(Fig. 4)을 분리하여 SH한천 배지에 배양한 결과 표면이 다소 거칠면서(smooth to rough), 흐린 흰색(pale white) 균락을 만들었다. 균락 모양은 가장자리가 완만한 구형이었고, 중앙부가 가장자리에 비해서 약간 올라가 있었다. 이 세균은 catalase 양성, 호기성 간균으로 그람음성이었다. API20 NE kit를 사용하여 생리화학적 특성을 조사한 결과, NOK21 균주는 capric acid를 탄소원으로 이용하여 생육하였다(Table 1).

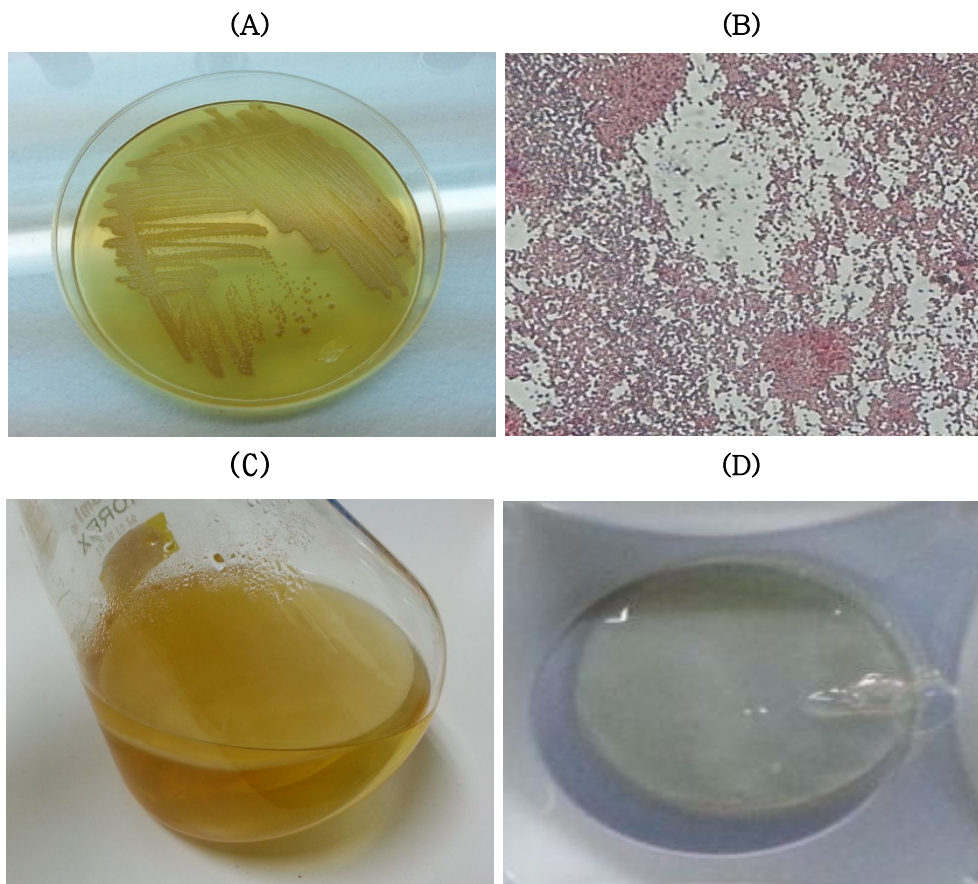


Fig. 4. Morphology of an acetic acid bacterium NOK21.

(A), Colonies on SH agar; (B), Gram-stained cells under microscope;  
(C), Pellicle on culture medium; (D), Biopolymer membrane.



Table 1. Test results of an acetic acid bacterium NOK21 by API20 NE kit

Reaction or enzyme production	Result
Reduction of nitrates to nitrites	Negative
Indole production	Negative
Glucose fermentation	Negative
Arginine dihydrolase	Negative
Urease	Negative
Hydrolysis of esculin	Negative
Hydrolysis of gelatin (protease)	Negative
$\beta$ -Galactosidase	Negative
Glucose assimilation	Negative
Arabinose assimilation	Negative
Mannose assimilation	Negative
Mannitol assimilation	Negative
N-Acetyl-glucosamine assimilation	Negative
Maltose assimilation	Negative
Gluconate assimilation	Negative
Capric acid assimilation	Positive
Adipic acid assimilation	Negative
Malate assimilation	Negative
Citrate assimilation	Negative
Phenyl acetic acid assimilation	Negative

\* Caution: These data need to be confirmed.

NOK21을 동정하기 위하여, 16S-rRNA 유전자의 일부 염기서열 1,380bp를 분석한 결과를 Table 2.에 나타내었다. NOK21의 16S-rRNA 유전자 염기서열을 NCBI의 GenBank data와 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 1,380bp에 상당하는 염기서열 중에 3개의 뉴클레오타이드가 서로 다른 균주(99.8% 일치하는 균주)로는 *Acetobacteraceae bacterium M438*과 *Acetobacteraceae bacterium J2*가 있었다. *Acetobacteraceae*는 분류학상 과(Family)의 명칭으로, 그 밑에 *Gluconacetobacter*를 비롯한 여러 개의 속(Genus)이 포함된다. 따라서 M438과 J2 균주는 미동정 균주이다. 그 다음으로 4개의 뉴클레오타이드가 다른 균주(99.7% 일치하는 균주)로는 *Gluconacetobacter hansenii* NBRC 14820, *G. hansenii* NBRC 14817, *G. hansenii* NBRC 14816(ATCC 23769), *G. hansenii* NBRC 105051, *G. hansenii* NCIB 8746, 그리고 *G. kombuchae* LMG 23726T 등이 있었다. 16S-rRNA 유전자를 기준으로 NOK21과 99.7%에 가까운 유사성을 보이는 균주는 대부분 *G. hansenii*이다. *G. kombuchae*도 *G. hansenii*와 매우 유사한 생리, 형태적 특성을 갖고 있다. Kombucha(발효시켜 만든 black tea의 일종)를 만드는 주요 세균이 *G. kombuchae*로 액체배양하면 표면에 섬유질성의 피막을 만든다 [19, 24].

16S-rRNA 유전자의 염기서열을 비교하여 가장 밀접한 것끼리 이어서 계통수(phylogenetic tree)를 만들었다(Fig. 5). 본 연구에서 분리된 NOK21은 에탄올을 산화시켜 초산을 생산하고, 섬유질성 고분자막을 만드는 것으로 알려진 *G. hansenii*[25]과 동일한 종으로 추정된다.

Table 2. Partial DNA sequences of 16S-rRNA gene from NOK21 bacterial isolate

---

---

GACGACGTGGTTCGGCTGCGTCCTTGCGGTTTCGCTCACCGGCTTAAGGTCAAACCAA  
CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCA  
TGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAAT  
CCGAACTGAGACGGCTTTTGGAGATCCGCTCGGCATCGCTGCCTGGCTTCCCCTGT  
CACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATGAGGACTTGACGT  
CATCCCCACCTTCCTCCGGCTTGTCACCGGCAGTTCCTTTAGAGTGCCCACCCAGAC  
GTGCTGGCAACTAAAGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA  
CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCTGGAGGTCTCTTGCGAGAAA  
TGCCCATCTCTGGACACAGCCTCCGCATGTCAAGTCCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTG  
CTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGT  
TTCAACCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGTGTGCTTATCGCGTTAACTACGACACT  
GAATGGCCAAGCCATCCAACATCCAGCACACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGG  
TATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTCATGAGCCAGG  
TTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACGAATTTACCTCTACACTGG  
GAATTCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTCGTCACGTATCAAATGCAGCCCCCAGGT  
TAAGCCCGGGAATTTACATCTGACTGTAACAACCGCCTACGCGCCCTTTACGCCCA  
GTCATTCCGAGCAACGCTTGCCCCCTTCGATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTA  
GCCGGGGCTTCTTCTGCGGGTACCGTCATCATCGTCCCCGCTGAAAGTGCTTTACAA  
TCCGAAAACCTTCTTACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCC  
AATATTCCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTG  
GCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTATCGATCATCGCCTTGGTAGGCTTTTACCCACC  
AACTAGCTAATCGAACGCAGGTTCTCCACAGGCGACTCGCGCCTTTGACCCTCAGG  
TGTCATGCGGTATTAGCTTCAGTTTCCCAAAGTTATCCCCACCCATGGACAGATCCC  
TACGCGTTACTCACCCGTCCGCCACTAACCCCGAAAGGTTTCGTGCGACTGCATGGTA  
AGCATGCCG

---

---

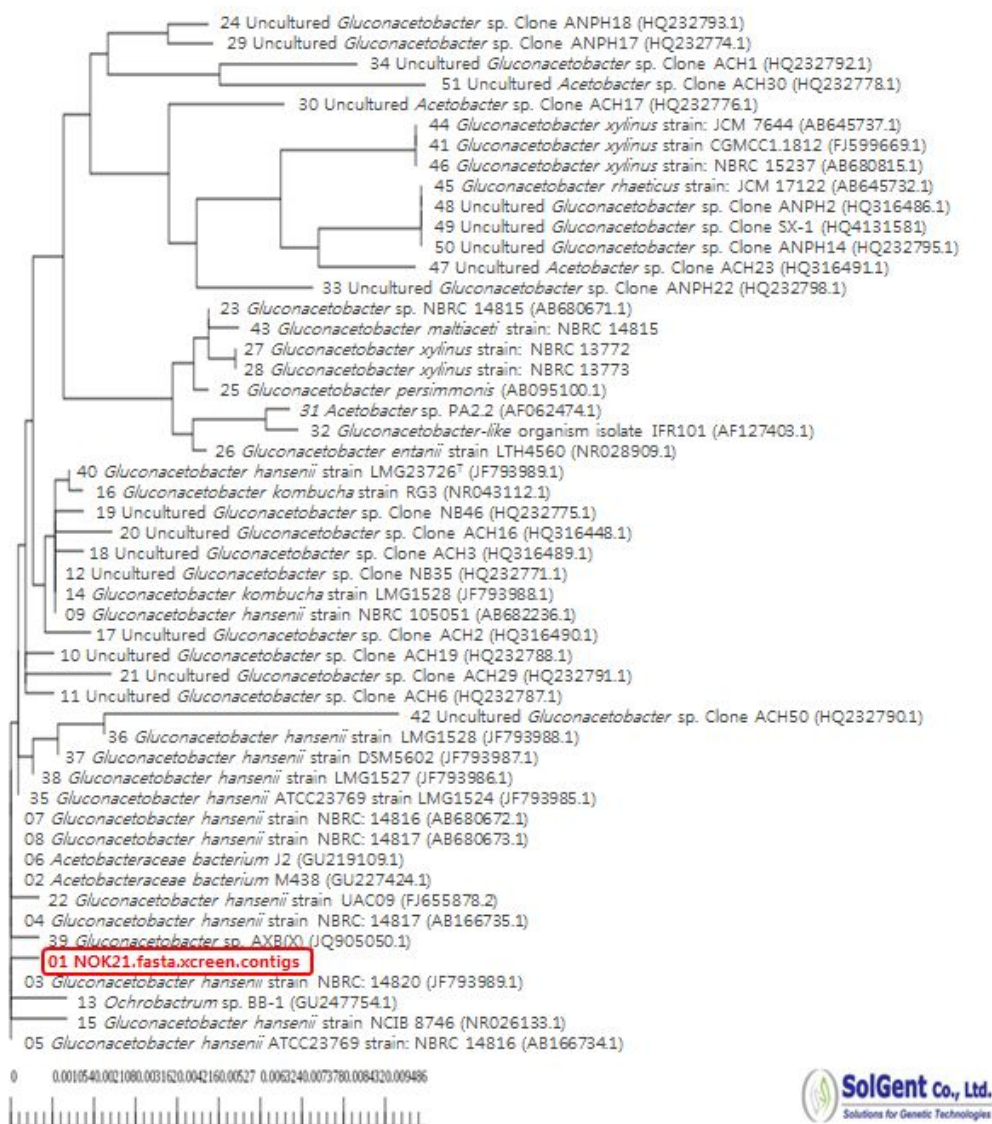


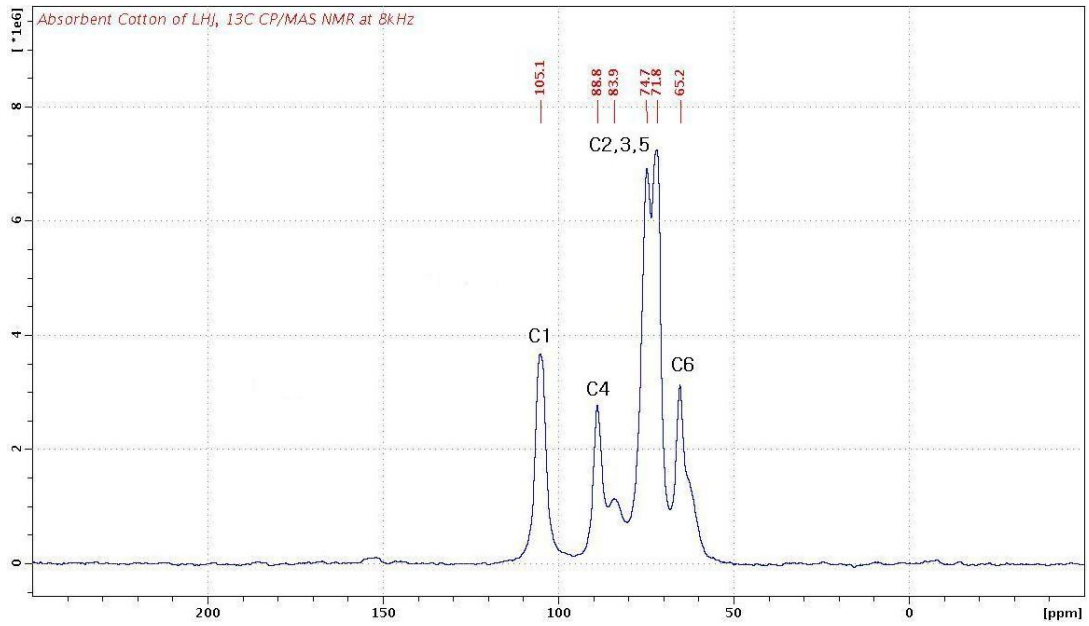
Fig. 5. Phylogenetic tree of the isolate NOK21 by neighbor-joining(NJ) method comparing partial 1,380bp sequences of 16S-rRNA genes.

### 3.2. Biopolymer의 구조

초산세균 NOK21를 배양했을 때 얻어진 불용성 고분자막 성분을 분석하고자 solid  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy로 구성 탄소원자의 종류를 분석하였다. 먼저 대조구로서 탈지면(absorbent cotton)을 분석한 결과(Fig. 6(A)), 기대했던 대로 cellulose의 골격구조를 이루는 포도당의 탄소원자가 나타났다(Fig. 7)[26, 27, 28]. TMS를 기준으로 포도당의 1번 탄소(C1)는 105.1ppm, 4번 탄소(C4)는 88.8ppm, C2, C3, C5 는 74.7에서 71.8ppm 사이, C6는 65.2 ppm에 각각 나타났다. NOK21의 고분자를 분석한 결과, 포도당의  $\beta$ -1.4 결합으로 이루어진 순수한 cellulose가 아니고, 우론산(uronic acid, RCOOH), 에스테르(ester, RCOOR) 또는 또는 아마이드(amide, RCONH-) 그리고 아세틸기(acetyl group,  $\text{CH}_3\text{COO-}$ )에 해당하는 탄소 원자들을 함유하고 있다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 180.7ppm에 우론산(RCOOH)의 carbonyl group 탄소, 171.9ppm에 에스테르 또는 아마이드의 carbonyl group 탄소, 104.6ppm에 6탄당 pyranose의 C1 탄소에 해당하는  $-\text{OC}(\text{HR})\text{O}-$ , 76.8 ppm에  $(\text{R}_3)\text{COR}$ , 59.4ppm에 6탄당 pyranose의 C6 탄소에 해당하는  $(\text{R}_3)\text{COH}$ , 그리고 26.5ppm에  $\text{CH}_3\text{COO}$ 의 methyl group 탄소가 각각 피크로 나타났다. 다만, 76.8 ppm에 나타난 피크가  $(\text{R}_3)\text{COR}$ 에 해당하는 C2, C3, C4, C5, 4종의 탄소를 모두 반영하고 있는지는 불분명하다. 우론산은 glucuronic acid로 고분자를 합성할 때 반복단위체로 참여하고, 에스테르결합은 반복단위체의 중합반응 후에 탄수화물 고분자의 수산화기(-OH) 또는 아미노기(- $\text{NH}_2$ )가 아세트산( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )와 반응하여 생성된 것으로 추정된다[29]. 따라서 NOK21의 고분자는 순수한 cellulose 형태가 아니고, 히아루론산(hyaluronic acid, hyaluronan)을 포함한 아세틸화된 산성 다당류로 추정된다.

여러 가지 형태의 다당류 중에 가능성 있는 예를 Fig. 7에 제시하였다. 이 다당류는 생성환경과 물에 녹지 않고 질긴 정형의 물리적 성질로 추정하건데, 섬유질과 비슷한 규칙적인 골격을 유지하고 있을 것이다.

(A)



(B)

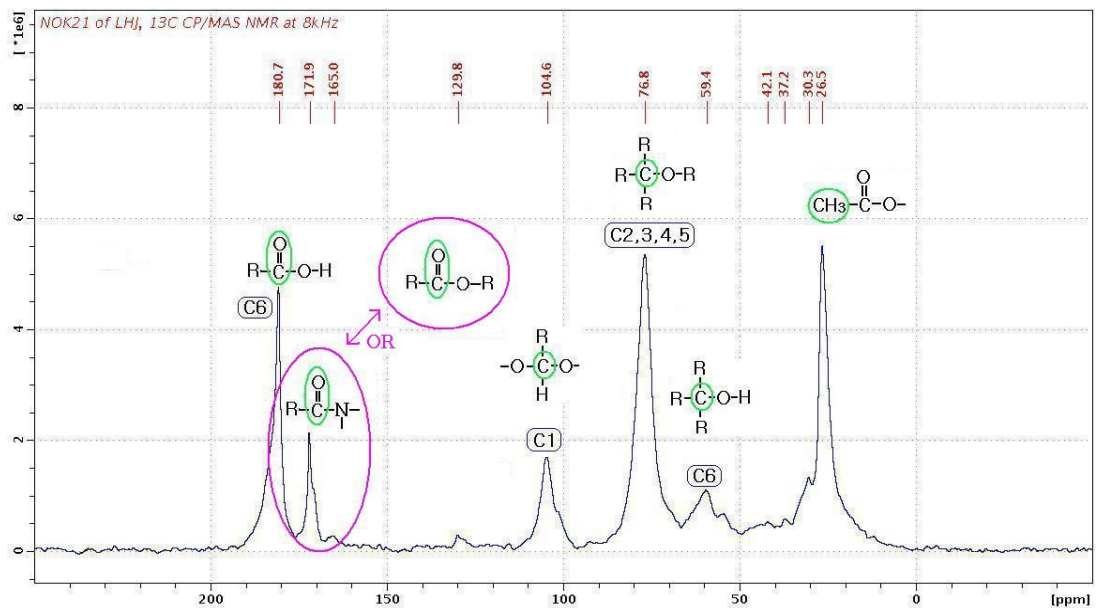


Fig. 6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of absorbent cotton(A) and biopolymer from NOK21 culture(B).

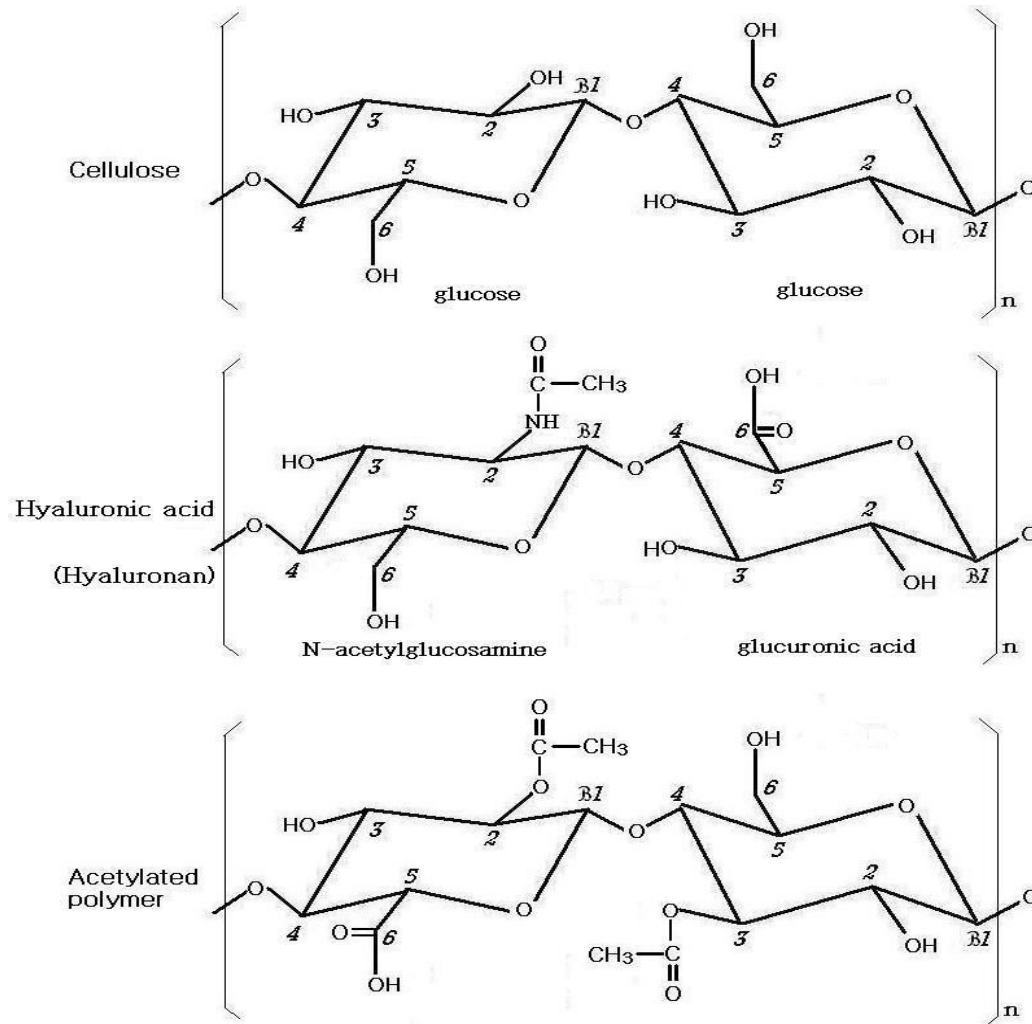


Fig. 7. Back bone structures of cellulose and acetylated biopolymer.

### 3.3. 초산균 생육에 미치는 에탄올 농도의 영향

NOK21 균주는 과일 양조주에서 피막을 형성하며 왕성하게 자란 세균이다. 이 세균이 에탄올을 산화시켜 초산을 생성할 것이라고 예측할 수 있다. NOK21의 생육에 미치는 에탄올 농도를 조사하기 위하여, 배지 중의 에탄올 농도를 0에서 8%까지 달리하여 배양기간에 따른 초산과 생물고분자 농도의 변화를 측정하였다

(Table 3, Fig. 8). 배지 구성성분상 산의 생성여부에 관계없이 적정에 기본적으로 소모되는 0.1N NaOH 량을 기준으로 계산하였을 때, 산도 0.2~0.3%에 상당하였다. 산의 생성은 생물고분자의 합성과 직결되어 있었으며, 에탄올 농도 3% 처리구를 제외하고, 전체 실험구에서 배양 초기 5일 동안은 산이나 피막 모두 생성되지 않았다. 에탄올 농도 3% 수준에서 가장 빠른 속도로 산을 생성하고 피막을 만들었다. 에탄올 농도가 6% 이상에서 배양했을 때는 배양기간에 관계없이 산을 생성하지 않았을 뿐만 아니라, 피막에 해당하는 생물고분자도 생성되지 않았다. 이는 NOK21 세균의 내성에 관한 문제로, 알코올 농도 6% 이상에서는 생육하지 못하기 때문이라고 판단된다. 에탄올 농도 5%에서도 비교적 높은 농도의 산과 생물고분자를 생산하였으나, 에탄올의 독성으로 인하여 세균의 생육이 저해되었을 것이다. 에탄올 농도 5%에서 배양 15일 만에 3.97% 상당하는 최고의 산도를 보였다. 에탄올 농도 1~4%에 걸쳐서 산의 농도가 배양 10일째에 비해서 배양 15일 째에 감소한 것은 산의 생성속도보다 초산을 산화시켜 이산화탄소와 물을 만들고 에너지를 획득하는 산의 소비 속도가 빠르기 때문이며, 이 때 얻어진 에너지를 생물고분자 합성에 사용하였다고 본다. 그래서 생물고분자의 농도는 배양 10일째에 비해서 15일째에는 증가하였다.

생물고분자의 농도는 천천히 증가하여 배양 15일째 가장 높았고, 에탄올 농도 3%에서 최대 농도 5.2 g/l 를 나타내었다. 그리고 에탄올 농도 0~3% 구간에서 에탄올 농도가 높을수록 산농도와 생물고분자의 농도가 증가한 것은, 에탄올의 산화로 초산이 생성되고, 초산은 acetylated polymer(Fig. 7) 합성에 이용되었기 때문이라고 추정된다.



Table 3. Changes in total acidity and biopolymer concentration during cultivation of NOK21 isolate at different level of ethanol concentration

	Cultivation time (day)	Ethanol concentration(%)								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
Total acidity (%)	5	0.22	0.22	0.22	0.78	0.19	0.21	0.16	0.19	0.20
	10	0.46	1.11	1.99	2.98	3.20	0.64	0.20	0.19	0.18
	15	0.48	1.10	1.49	2.38	2.83	3.97	0.25	0.21	0.21
Biopolymer concentration (g/ l )	5	-	-	-	1.8	-	-	-	-	-
	10	0.9	2.1	2.5	4.1	3.2	1.0	-	-	-
	15	2.2	3.5	3.7	5.2	4.0	3.4	-	-	-

-: Not detected.

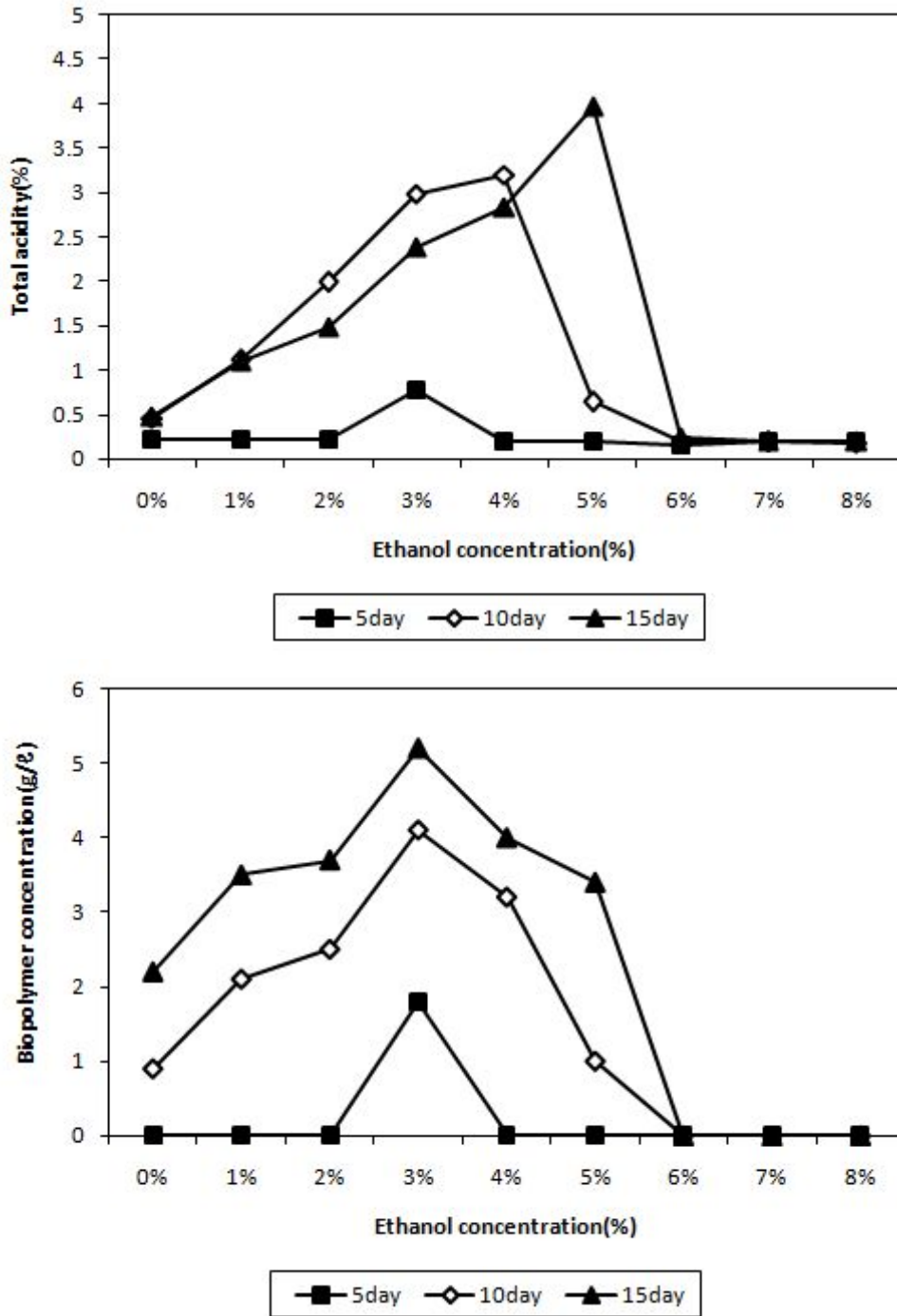


Fig. 8. Changes in total acidity(top) and biopolymer concentration(bottom) during cultivation of NOK21 isolate at different level of ethanol concentration.

### 3.4. 초산균과 에탄올 효모의 혼합 배양

Kombucha(또는 버섯차)는 단맛~신맛이 나는 검은색 발효차인데, 러시아, 중국, 인도, 동남아, 호주 등지에서 건강을 증진시키는 음료로 오래전부터 알려져 왔다. 이 발효차는 찻잎 추출물에 설탕을 섞어 실온에서 일주일 내지 한 달 정도 정치 발효시키면 만들어진다. 발효과정에는 초산균과 에탄올 효모가 공동으로 작용한다[30]. 따라서 NOK21 균주도 에탄올 발효 효모와 공생하리라고 기대되었다.

포도당을 2~20% 함유하는 SH배지에서 초산균과 효모를 혼합배양 하면서 3일간격으로 생물고분자의 생산량과 효모의 균수, 당도, 산도, 알코올 함량을 측정한 결과는 Table 4.에 일괄 정리하였다. 배지 구성성분상 초산의 생성여부에 관계없이 적정에 기본적으로 소모되는 0.1N-NaOH 량을 기준으로 계산하여 얻어진 배경치가 산도 0.26~0.34%에 상당하였다.

포도당 농도가 2%와 5%일 때, 에탄올이 먼저 생기고 나서 산과 생물고분자가 생산되었다. 이로부터 효모가 포도당을 에탄올로 발효시키고, 이어서 세균 NOK21이 에탄올을 초산으로 산화시키고, 생물고분자를 합성했음을 알 수 있다. 2% 포도당 농도에서 초산과 생물고분자 생산량이 함께 증가하는데 효모가 생성한 알코올을 초산균이 초산으로 전환하면서 알코올함량이 감소하는 것으로 보인다.

포도당 농도 5%에서 배양했을 때, 생물고분자는 12일째 1.15 g/l 생산되었는데, 효모에 의한 알코올 발효가 먼저 일어나고 9일 이후에 초산균의 증식이 일어나면서 에탄올은 1.8%에서 0.8%로 감소하고 산도는 0.58%로 증가한 것으로 해석될 수 있다.

포도당 농도 10% 이상에서는 효모가 자라면서 에탄올이 왕성하게 만들어졌으나, 초산도 생성되지 않고 생물고분자도 생산되지 않았다. 이는 초산세균 NOK21의 생육이 대대적으로 저해되었음을 의미한다. 그 원인으로서는 당 농도의 증가로 초래된 배지의 높은 삼투압, 효모에 의해서 배양초기에 생성된 에탄올의 독성, 효모의 생육에 따른 용존산소 농도의 감소 등이 있을 수 있다.

배지 중의 당 농도는 굴절당도계로 측정한 값으로, 순수한 포도당의 농도가 아니며, 당 이외의 성분도 측정값에 영향을 미칠 수 있다. 기본적인 배지는

2.0° Brix를 나타내었다.

포도당 농도에 따른 총산의 변화(Fig. 9)를 보면, 포도당 농도 10% 이상에서는 산도가 배지의 구성분에 기인한 0.26~0.34% 범위에 머물러, 초산이 생성되지 않았음을 알 수 있다. 포도당 농도 5%보다 2%에서 먼저 초산이 생성되었다. 그 원인은 분명치 않으나, 초산균의 생육이 저해되었음을 알 수 있다.

포도당 농도에 따른 효모의 농도(Fig. 10)는  $0.68 \times 10^7 \sim 4.95 \times 10^7$  cells/ml 범위에서 비교적 일정하게 유지되었으며, 포도당 농도가 20%인 삼투압이 높은 조건에서도 생존하였다. 그러나 포도당 농도가 10~20%로 높은 경우, 배양 후기에 세포 농도가 감소하였다. 이는 포도당 농도에 비례하여 에탄올 농도가 증가하고, 에탄올이 효모의 생육을 저해했기 때문이라고 해석된다.

포도당 농도에 따른 에탄올의 농도 변화는 Fig. 11에 제시하였다. 포도당의 농도가 높을수록 에탄올의 농도도 높은 경향을 보였고, 15~20%인 경우에는 배양 후기에 에탄올 농도가 증가하였다. 전체적으로 에탄올 발효 이론상 수율(에탄올 농도가 포도당 농도의 50% 수준)보다 훨씬 낮게 나왔다. 포도당 2%에서는 배양 후기 9일 이후에 에탄올이 사라졌는데, 이는 탄소원인 포도당이 다 소모되어 더 이상 에탄올은 생성되지 않고, 기 생성된 에탄올은 초산으로 산화되었기 때문이다.

배양 중 포도당 농도에 따른 생물고분자 농도 변화는 Fig. 12에 제시하였다. 포도당 농도가 10~20%로 비교적 높은 경우에는 생물고분자가 합성되지 않았다. 이는 기질 에탄올이 존재해도, 초산이 생성되지 않은 포도당 농도 범위와 일치한다. 따라서 10% 이상의 포도당 농도에서는 초산 발효 세균 NOK21이 거의 생육하지 않았음을 알 수 있다. 그리고 포도당 농도 5%보다 2%에서 더 빨리 초산균이 자라고 생물고분자도 고농도로 합성됨을 나타내었다. 특이하게도 NOK21의 생물고분자 합성은 일반적인 세균에 의한 2차대사산물의 합성보다 매우 느리게 진행되어 배양 12일이 되어서야 농도 2.20g/l 에 도달하였다.

위와 같은 실험 결과는 분리주 NOK21이 에탄올 발효효모와 공생하면서 포도당을 기질로 이용하여 초산과 생물고분자를 합성함을 보여주었다. 이는 Kombucha 발효과정에서 발생하는 미생물 생태 변화 과정과 유사하다[31].

Table 4. Changes in total acidity, yeast population, and concentrations of ethanol and biopolymer during mixed culture of an acetic acid bacterium NOK21 and *Saccharomyces cerevisiae* Pilsner at different levels of glucose concentration

	Cultivation time (day)	Glucose concentration(%)				
		2	5	10	15	20
Total acidity (%)	3	0.32	0.26	0.32	0.32	0.34
	6	0.43	0.30	0.26	0.34	0.38
	9	0.60	0.29	0.27	0.30	0.33
	12	0.78	0.58	0.29	0.30	0.34
Yeast population (cell number/ml)	3	$4.95 \times 10^7$	$3.13 \times 10^7$	$1.58 \times 10^7$	$1.39 \times 10^7$	$1.18 \times 10^7$
	6	$2.32 \times 10^7$	$1.39 \times 10^7$	$1.39 \times 10^7$	$1.27 \times 10^7$	$0.68 \times 10^7$
	9	$3.44 \times 10^7$	$2.02 \times 10^7$	$1.43 \times 10^7$	$1.68 \times 10^7$	$0.93 \times 10^7$
	12	$2.49 \times 10^7$	$1.25 \times 10^7$	$0.93 \times 10^7$	$0.91 \times 10^7$	$0.68 \times 10^7$
Ethanol concentration (%)	3	1.7	1.6	2.4	3.6	2.6
	6	1.0	1.8	3.0	5.8	4.4
	9	0	1.6	3.8	5.6	3.6
	12	0	0.8	2.4	5.1	5.3
Biopolymer concentration (g/l)	3	-	-	-	-	-
	6	0.75	-	-	-	-
	9	1.65	-	-	-	-
	12	2.20	1.15	-	-	-
Soluble solid concentration (° Brix)	3	2.0	2.9	6.2	9.2	12.8
	6	2.0	2.9	3.9	5.0	11.0
	9	2.0	2.8	3.9	5.0	7.5
	12	2.0	2.9	3.9	5.0	7.0

-: Not detected.

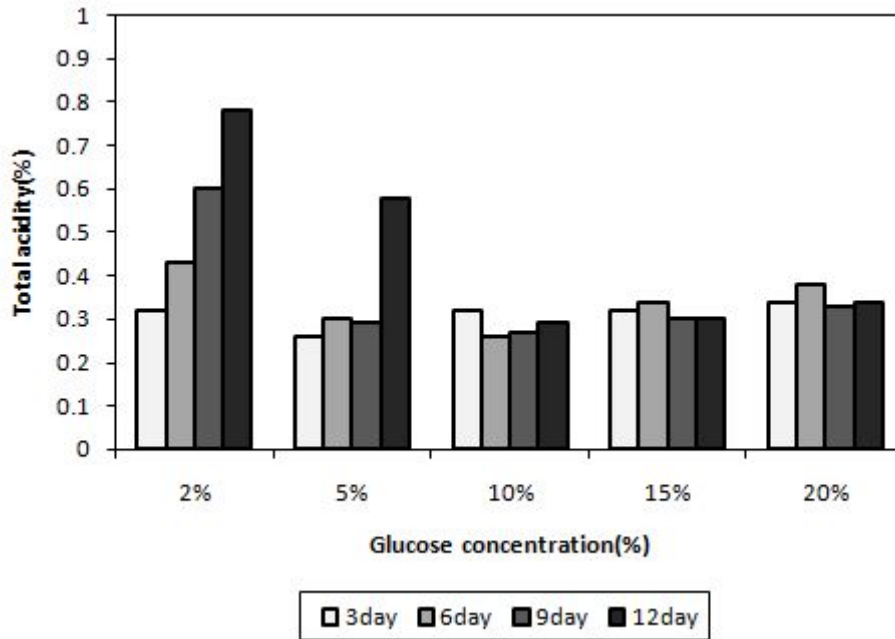


Fig. 9. Effects of glucose concentration on total acidity during growth for 12 days.

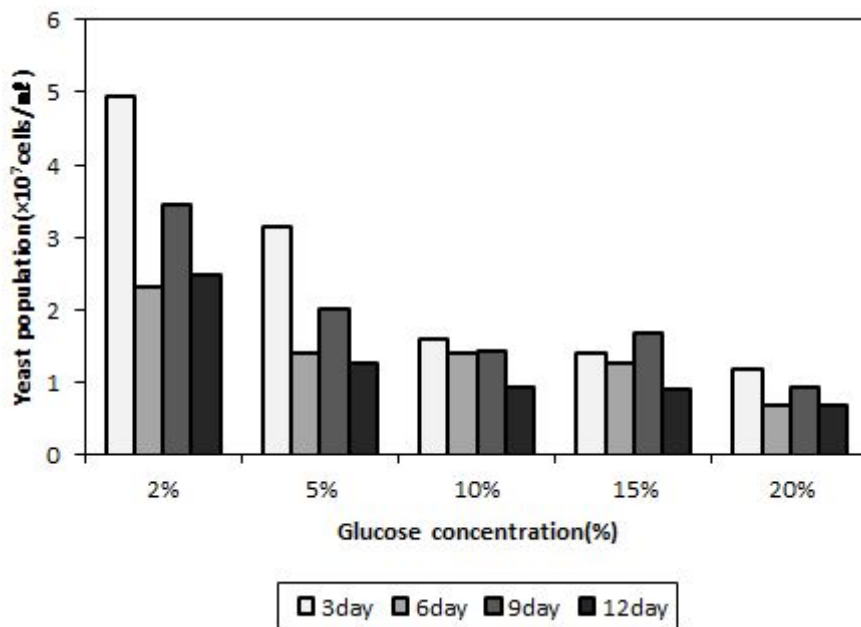


Fig. 10. Effects of glucose concentration on yeast population during growth for 12 days.

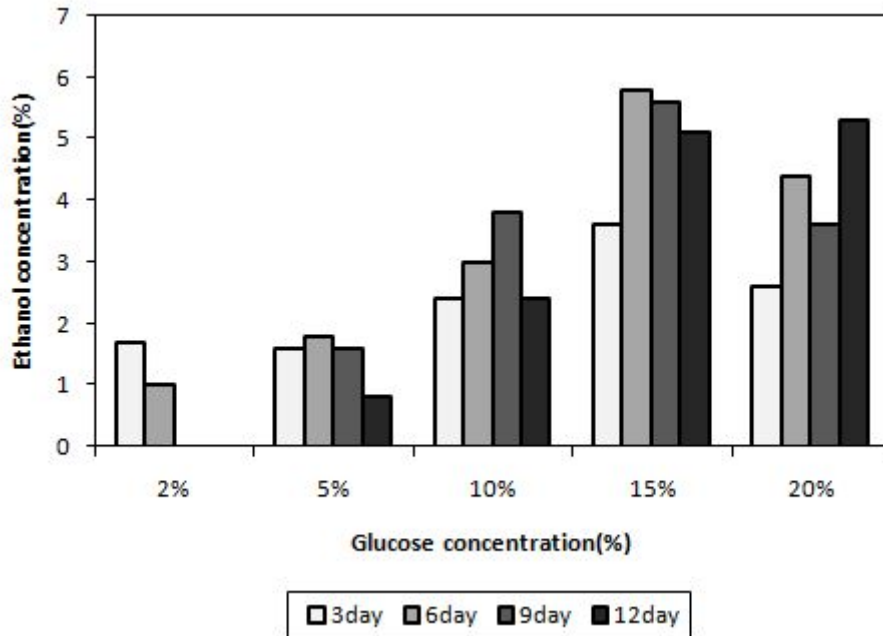


Fig. 11. Effects of glucose concentration on ethanol concentration during growth for 12 days.

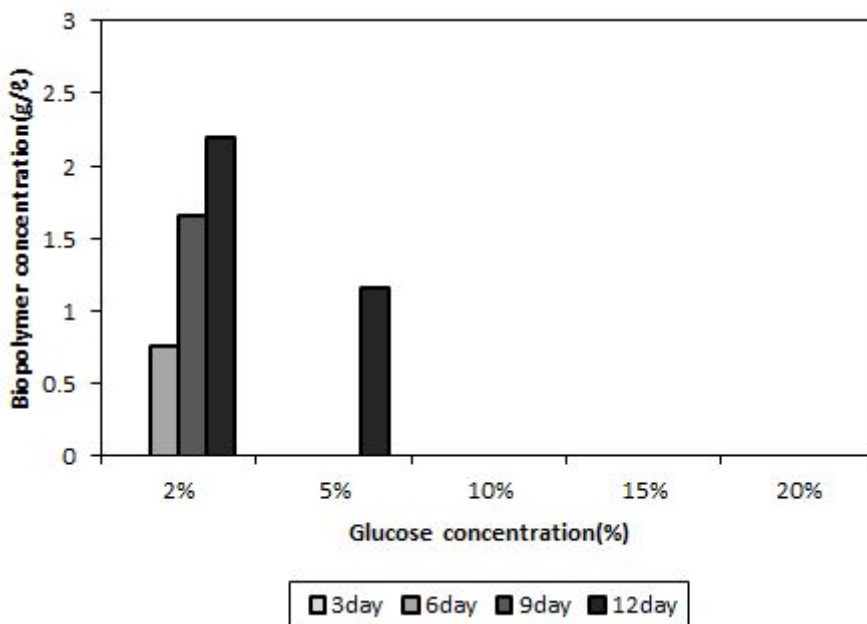


Fig. 12. Effects of glucose concentration on biopolymer concentration during growth for 12 days.

#### 4. 요약

산패 포도주에 형성된 피막(pellicle)로부터 초산발효 세균을 순수 분리하여, 발효음료의 생산이나 식용, 의료용, 화장품용 또는 생분해성 플라스틱 합성용 생물고분자(biopolymer)의 생산에 활용하고자 하였다.

분리주 NOK21은 그람음성의 호기성 간균이며, capric acid를 탄소원으로 이용할 수 있었다. 16S-rRNA 유전자의 일부 염기서열 1,380bp를 분석하여 NCBI의 GenBank data와 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 1,380bp에 해당하는 염기서열 중에 99.7% 이상 일치하는 균주 대부분이 *Gluconacetobacter hansenii*이었다. *G. hansenii*는 에탄올을 산화시켜 초산을 생산하고, 섬유질성 고분자막을 만드는 것으로 보고되어 있다.

NOK21이 생산하는 두터운 불용성 피막의 구성 성분을 solid  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy로 구성 탄소원자의 종류를 분석하였다. NOK21의 고분자를 분석한 결과, 포도당의  $\beta$ -1.4 결합으로 이루어진 순수한 cellulose가 아니고, 우론산(uronic acid, RCOOH), 에스테르(ester, RCOOR) 또는 아미드(amide, RCONH-) 그리고 아세틸기(acetyl group,  $\text{CH}_3\text{COO-}$ )에 해당하는 탄소 원자들을 함유하고 있다. 따라서 NOK21의 고분자는 순수한 cellulose 형태가 아니고, 아세틸화된 고유의 다당류로 추정되며, 히아루론산(hyaluronic acid, hyaluronan)일 가능성도 있다.

에탄올 농도가 NOK21의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 배지 중의 에탄올 농도를 0에서 8%까지 달리하여 배양기간에 따른 초산과 생물고분자 농도의 변화를 측정하였다. 생육속도는 에탄올 농도 3% 수준에서 최고였고, 산을 생성하고 피막 생물고분자를 만들었다. 생물고분자의 농도는 에탄올 농도 3%에서 최대 농도 5.2 g/l 를 나타내었다. 한편 에탄올 농도 5%에서 배양 15일 만에 3.97% 상당하는 최고의 산도를 보였다. 그러나 에탄올 농도 6% 이상에서는 초산균의 생육이 관찰되지 않았다.

포도당을 2~20% 함유한 배지에서 초산균과 에탄올 발효 효모 *S. cerevisiae*를 혼합 배양하였을 때, 포도당 농도가 비교적 낮은 2%와 5%일 때에는, 에탄올이



먼저 생기고 나서 산과 생물고분자가 생산되었다. 이로부터 효모가 포도당을 에탄올로 발효시키고, 이어서 세균 NOK21이 에탄올을 초산으로 산화시키고, biopolymer를 합성했음을 알 수 있었다. 포도당 농도 10% 이상에서는 효모가 자라면서 에탄올이 왕성하게 만들어졌으나, 초산세균 NOK21의 생육은 저해되어 초산과 피막 생물고분자는 생성되지 않았다. 그러나 효모의 농도는 배지 중 포도당 농도의 변화에도 불구하고  $1.0 \times 10^7$  cells/ml 수준에서 비교적 일정하게 유지되었다. 또한 포도당의 농도가 높을수록 에탄올의 농도도 높은 경향을 보였다.

본 연구에서 포도주로부터 분리된 NOK21은 *G. hansenii*와 유사한 초산발효 세균이며, 에탄올 발효효모와 공생하면서 포도당을 기질로 이용하여 초산과 산성의 biopolymer를 합성함을 보여주었다. 이러한 연구 결과는 Kombucha와 같은 발효 음료의 생산과 히아루론산과 같은 생물고분자의 대량생산에 유용할 것이다.

## 5. 참고문헌

- [1] Lee SH, Son GM, Choi C. Rheological properties of biopolymer produced by *Bacillus coagulans* CE-74. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29(2): 198-203(2000)
- [2] Kim JH, Yoo YH, Lee KY, Yun JS. A study on the production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 5(1): 25-36(1990)
- [3] Yoon MH, Koo YM. Mechanism of dextran synthesis by dextransucrase. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 9(1): 1-7(1994)
- [4] Jeong YI, Kim DW, Kim JH, Park DH, Lee KY. A study on the pullulan production using whey. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 9(2): 91-97(1994)
- [5] Lee JW. Production of microbial gums. Kor. J. Microbiol. 27(1): 23-32(2001)
- [6] Chung BW, Park SH, Dewey D. Y. Ryu. Production of gellan gum by *Pseudomonas elodea*(I) - Estimation of metabolic parameters and rheological properties of culture broth -. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 5(3): 235-240(1990)
- [7] Kim JY, Kim SW, Oh DK, Lim HS, Kim JH. Optimal production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and polysaccharide methylan by *Mentyllobacterium organophilum* from methanol. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 10(2): 176-182(1995)
- [8] Lee SY, Kang TS, Kim KS, Yu JH. Isolation of the biodegradable peptide polymer-producing bacterial strain and characterization of the polymer produced by this strain. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 8(3): 209-216(1993)
- [9] Jeong YJ, LEE IS. A view of utilizing cellulose produced by *Acetobacter* bacteria. Food Industry and Nutrition. 5(1): 25-29(2000)
- [10] Lee OS, Jeong YJ. Industrial application and biosynthesis of

- bacterial cellulose. Food Industry and Nutrition. 6(1): 10-14(2001)
- [11] Kang TJ, Lee SJ, Choi DH. 미생물 셀룰로오스의 의료 제품 이용. BioWave (<http://bric.postech.ac.kr/webzine>). 11(1): 1-12(2009)
- [12] Jeon SR, Park JW, Kim HJ. Manufacturing and applications of bacterial cellulose. J. Korean Ind. Eng. Chem. 16: 37-45 (2013)
- [13] Ko JY, Shin KS, Yoon BD, Choi WY. Isolation and identification of *Acebacter xylinum* GS11 producing cellulose. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28(3): 139-146(2000)
- [14] Kang TJ, Cha JY. Cellulose의 특징과 이용. BioWave (<http://bric.postech.ac.kr/webzine>). 9(7): 1-11(2007)
- [15] Kim SW, Park JH, Jun HK. Analysis of optimum condition for production of an onionic vinegar by two-step fermentations. J. Life Sci. 18(10): 1410-1414 (2008)
- [16] Chen C, Liu BY. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. J. Appl. Microbiol. 89(5): 834-839(2000)
- [17] Bauer-Petrovska B, Petrushevska-Tozi L. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. Int. J. Food Sci. Technol. 35(2): 201-205(2000)
- [18] Hestrin S, Schramm M. Synthesis of cellulose by *Aecetobacter xylinum*. Biochem J. 58: 345-352(1954)
- [19] Nguyen VT, Flanagan B, Gidley MJ, Dykes GA. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. Curr. Microbiol. 57(5): 449-453(2008)
- [20] Lee SW, Kwon JH, Yoon SR, Jeong YJ. Quality characteristics of brown rice vinegar by different yeasts and fermentation condition. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39(9): 1366-1372(2010)
- [21] Lee OS, Jang SY, Jeong YJ. Effect of ethanol on the production of cellulose and acetic acid by *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32(2): 181-184(2003)

- [22] Lee SY, Yoo KM, Moon BK, Hwang IK. A study on the development of vinegar beverage using yacon roots(*Smallanthus sonchifolius*) and analysis of components changes during the fermentation. Korean J. Food Cookery Sci. 26(1): 95-103(2010)
- [23] Jang SY, Sin KA, Jeong YJ. Quality characteristics of apple vinegar by agitated and static cultures. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39(2): 308-312(2010)
- [24] Dutta D, Gachhui R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57(Pt 2): 353-357(2007)
- [25] Iyer PR, Geib SM, Catchmark J, Kao TH, Tien M. Genome sequence of a cellulose-producing bacterium, *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769. J. Bacteriol. 192(16): 4256-4257(2010)
- [26] Atalla RH, Vanderhart DL. The role of solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. Solid State Nucl. Magn. Reson. 15(1): 1-19(1999)
- [27] Newman RH, Davies LM, Harris PJ. Solid-state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance characterization of cellulose in the cell walls of *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant Physiol. 111: 475-485(1996)
- [28] Kono H, Yunoki S, Shikano T, Fujiwara M, Erata T, Takai M. CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 1. Complete assignment of the CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of the native cellulose. J. Am. Chem. Soc. 124(25): 7506-7511(2002)
- [29] Kono H, Erata T, Takai M. CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 2. Complete assignment of the  $^{13}\text{C}$  resonance for the ring carbons of cellulose triacetate polymorphs. J. Am. Chem. Soc. 124(25): 7512-7518(2002)
- [30] Dufresne C, Farnworth E. Tea, Kombucha, and health: a review. Food Res. Int. 33(6): 409-421(2000)

[31] Teoh AL, Heard G, Cox J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. Int. J. Food Microbiol. 95(2): 119-126(2004)

## 감사의 글

석사논문을 마무리하며, ‘더 잘할 걸!’ 하는 아쉬움의 마음과 ‘이제 끝났구나!’ 하는 기쁨의 마음이 교차합니다. 대학원 생활을 뒤돌아보니 제가 이 논문을 마무리하기까지 주변의 많은 격려와 도움이 있었다는 것을 새삼 깨닫게 되었습니다. 그동안 도움을 주신 많은 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저 부족함이 많았던 저를 끝까지 이끌어주시고 지도해 주신 고영환 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 가운데도 논문심사를 맡아 부족한 부분을 세심하게 검토하여 주시고 조언을 아낌없이 해주신 박은진 교수님, 김현정 교수님께도 감사드립니다. 학부과정부터 대학원과정, 그리고 학과 조교로 지내는 동안 늘 관심과 조언으로 보살펴 주신 송대진 교수님, 김수현 교수님, 강영주 교수님, 하진환 교수님, 임상빈 교수님께도 감사드리며 항상 편안하시고 건강하시길 기원합니다.

대학원 생활동안 얻은 소중한 인연이며, 많은 도움을 주신 해원오빠, 경민오빠, 지현언니, 경진오빠, 충우오빠, 경열이, 소연이, 강진아 선생님, 최영진 선생님, 문애경 선생님께도 감사의 마음을 전합니다.

학과 조교로 지내는 동안 조교쌤으로 때로는 누나, 언니로 잘 따라 주었던 학부생들에게도 고마운 마음을 전합니다. 무엇보다 조교로 함께 지내며 서로에게 힘이 되었던 화정아 정말 고맙다.

부족한 딸을 항상 사랑과 믿음으로 지켜봐주시는 아빠, 하늘에서나마 자랑스럽게 지켜봐주실 엄마, 내 동생 상래, 힘들 때 친언니처럼 돌봐준 주혜언니, 그리고 6년이라는 시간동안 내 옆을 지켜준 성욱오빠에게도 말로는 다 표현할 수 없는 고마움과 사랑하는 마음을 전합니다.

바쁘다는 이유로 연락도 못하고, 만나기도 힘들었지만 항상 응원해 준 친구들과, 언니들, 오빠들, 동생들... 그리고 지면을 통해서 일일이 언급하지 못했지만 항상 저를 아끼고 사랑해주시는 모든 분들께 다시 한번 진심으로 감사드립니다.