

## PCR-DGGE를 이용한 구기자-맥문동 막걸리의 발효 과정과 저장 기간 중 효모와 세균 균총의 변화

민진홍<sup>1</sup> · 남윤규<sup>2</sup> · 주정일<sup>2</sup> · 정재홍<sup>3</sup> · 이종수<sup>1</sup> · 김하근<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>배재대학교 생명유전공학과, <sup>2</sup>충남 농업기술원 청양 구기자 시험장, <sup>3</sup>청양대학 청양그린웰니스 RIS사업단

Received : February 16, 2012 / Revised : March 25, 2012 / Accepted : March 26, 2012

**Changes in Yeast and Bacterial Flora during Fermentation and Storage of *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* using PCR-DGGE.** Min, Jin-Hong<sup>1</sup>, Yun-Gyu Nam<sup>2</sup>, Jung-Il Ju<sup>2</sup>, Jae-Hong Jung<sup>3</sup>, Jong-Soo Lee<sup>1</sup> and Ha-Kun Kim<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea, <sup>2</sup>Cheongyang Boxhorn Experimental Station, Chungnam Agriculture Research & Extension Service, Cheongyang 345-872, Korea, <sup>3</sup>Cheongyang Green Wellness RIS, Cheongyang Provincial College, Cheongyang 345-702, Korea – In this study, we investigated the microbial flora changes in *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* during fermentation and storage periods. We brewed *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* for a week through two-stage fermentations and stored the fermentation broth for a month at 4°C or 20°C. We collected the samples periodically and analyzed microbial flora changes using viable cell counts and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Yeast viable cells were seen to have decreased to 13% of pre-storage levels after storage for 15 days at 20°C; however significant changes were not observed during storage at 4°C. Prolongation of storage time dramatically decreased the availability of viable cells. Yeast viable cell numbers had decreased to 38% of pre-storage levels at 4°C and 4.8% at 20°C after storage for 30 days. The results of the DGGE profile for yeast showed that *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces* sp. were the predominant strains at the beginning of fermentation and throughout the whole period of storage. Viable cell counts for total bacteria had decreased to 36% of pre-storage levels after storage for 15 days but did not significantly change for the full 30 days of storage at 4°C. Similarly, viable cell counts for bacteria had decreased to 5% while viable cell numbers did not significantly change for the full 30 days at 20°C. Viable cell counts for lactic acid bacteria were performed and the results were similar to those for total bacteria. The results of the DGGE profile for bacteria showed that *Weissella cibaria* was the predominant strain at the beginning of fermentation. However it had disappeared by the end of fermentation, and *Lactobacillus fermentum* and *Pediococcus acidilactici* became the predominant species during storage.

**Keywords:** *Gugija-Liriope tuber Makgeolli*, PCR-DGGE, microbial flora

### 서 론

전통주 중 하나인 막걸리는 다양한 약용식물 등의 부원료가 첨가되어 제조되기 때문에 여러 가지 생리기능성 물질들을 함유하고 있다. 따라서 최근 그 수요가 급증 하고 있다 [6]. 그러나 국내 유통과 해외 수출에서 가장 중요한 문제는 품질 저하 없이 비교적 장시간 저장 해야 하는 점이다 [7]. 이런 측면에서 알코올 발효와 저장연장에 가장 큰 영향을 주는 인자는 이들 공정에서의 미생물 분포와 이들의 상호작용이다.

구기자는 carotenoid, zeaxanthin, betaine,  $\beta$ -sitosterol 등을 다량 함유하고 있어 자양강장 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다 [12]. 또한 구기자는 항고혈압 활성 등의 우수한 생리 기능성을 가지고 있어서 [4, 9], 구기자 엑기스를 첨가하여 제조한 전통 구기자 탁주에 높은 항고혈압성 안지오텐신 전환 효소 저해 활성이 있다고 보고 된 바 있다 [12]. 맥문동도 역시  $\beta$ -sitosterol 등의 생리 기능성 물질을 함유하고 있기 때문에 면역증강, 혈당강화작용 등이 있는 것으로 알려져 있다 [11].

그러나, 구기자와 맥문동의 생리 기능성이 우수하다는 보고에도 불구하고 이들을 이용한 건강 주류 개발 그리고 이들에 대한 저장성 연구는 현재까지 이루어져 있지 않고 있다. 따라서 기호성과 생리기능성이 우수한 고품질의 구기자-맥문동 막걸리를 개발하고자 전보 [13]에서 전통 구기자-맥

\*Corresponding author

Tel: +82-42-520-5389 Fax: +82-70-4362-6305

E-mail: hakun@pcu.ac.kr

문동 전통주(약주) 제조에 적합한 알코올 발효 효모로서 *Saccharomyces cerevisiae* C-2를 선발하였고, 이들의 최적 발효 조건과 선발된 효모를 이용한 저장 중 품질 특성과 생리기능성의 변화를 보고하였다. 본 연구는 *S. cerevisiae* C-2를 사용하여 제조한 전통 구기자-맥문동 막걸리의 최적 저장기간을 확립하기 위해 수행하였다. 이를 위해 발효기간과 발효를 마친 후 저장 기간 동안 효모와 세균 특히 젖산균의 변화를 평판배지를 이용한 생균수 측정과 동시에 DGGE를 사용하여 전기영동에 의해 분리된 rRNA 유전자 DNA밴드들의 염기서열을 결정하여 시료에 존재하는 미생물을 동정하였다. 이를 통해 발효 및 저장 과정 동안 막걸리 안에서 일어난 미생물 군총 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 원료 및 균주

구기자(장명)와 맥문동(맥문동 1호)은 2010년 9월 청양 구기자 시험장에서 재배한 것을 분양 받아 사용하였고 뽕쌀은 2010년 이전에서 재배된 것을 시중에서 구입하여 사용하였다. 누룩은 SJ곡자 제품을 사용하였고, 효모는 전보[13]에서 우수 효모로 선발한 *S. cerevisiae* C-2를 사용 하였다.

### 주모 제조, 담금 및 발효

주모 제조 및 담금은 전보[1, 13]의 구기자 전통주 담금법을 일부 변형시켜 다음과 같이 실시하였다.

먼저, 뽕쌀 40g과 밀가루 5g을 50 mL에 넣고 곡자를 g 당 30 sp첨가한 다음 30°C에서 2일간 발효시켜 주모를 제조하였다. 본 담금은 뽕쌀 50g과 찹쌀 50g을 물 240 mL에 혼합하고 위와 같이 제조한 주모를 첨가한 후 25°C에서 5일간 발효시켰다. 이 발효액을 거르로 여과하여 얻은 상등액을 생 막걸리로 하여 4°C와 20°C에서 각각 저장하면서 효모와 총 세균 그리고 젖산균 수를 측정하였다.

### 효모와 세균 생균수 측정

먼저 효모는 각 시료를 일정 농도로 멸균수에 희석시킨 후 100 µL를 ampicillin(100 µg/µL)이 함유되어 있는 YPD 배지에 도말하여 30°C에 36시간 배양 후 집락수를 측정하였다. 총 세균 수와 젖산균 수는 각각의 희석시료 100 µL를 cycloheximide(50 µg/µL)가 함유되어 있는 PCA배지와 MRS 배지에 각각 도말 하여 30°C에서 48시간 배양하여 이들의 생균수를 측정하였다.

### DGGE를 이용한 미생물의 동정

막걸리 1 mL를 원심분리한 후 침전물을 bead beater를 이용하여 세포벽을 파괴하였다. DNA를 추출하기 위해 genomic DNA prep kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 사용하였다. 추출한 DNA는 16S rRNA 유전자와 18S rRNA 유

전자를 증폭하기 위해 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 16S rRNA 유전자 증폭은 GC338F(5'-CGCCGCGCGC-GCGGGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG)와 518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG) 프라이머 세트[8], 그리고 18S rRNA 유전자 증폭은 GCNS3(5'-CGCCGCGCGCGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGACTCTGGTGCCAGCAGCC)와 YM951R(5'-TTGGCAAATGCTTCGC) 프라이머 세트[3] 사용하였다.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE) 분석을 하기 위해 8% 폴리아크릴아마이드 젤에 7 M urea와 40%(v/v) formamide를 100%로 하여 박테리아 분석은 40-80%의 변성제가 들어있는 젤을 그리고 효모와 진균류 분석은 30-70%의 변성제가 들어있는 젤을 사용하였다. 변성제의 농도가 구배를 갖도록 제조된 젤을 1X TAE(20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM EDTA [pH 8.0]) running buffer가 첨가된 C.B.S DGGE-2004 system(CBS Scientific, San Diego, CA, USA)을 이용하여 80V에 15시간 동안 전기영동을 하였다. 전기영동이 완료된 젤을 RedSafe(Intron, Daejeon, Korea)로 30분 동안 염색을 시킨 후 젤을 분석하였다. DNA 밴드는 ImageMaster VDS(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 촬영하였다.

### DGGE 젤의 DNA 밴드 분석

폴리아크릴아마이드 젤에서 분리된 DNA 밴드들을 절단하여 1 mM의 Tris 완충용액(pH 8.0)에 넣어 DNA가 확산되어 나오도록 하였다. 이를 GC 클램프가 없는 동일한 프라이머 세트(즉, 세균은 338F와 518R 그리고 효모는 NS3와 YM951R)를 사용하여 PCR 반응으로 DNA를 증폭시켰다. PCR 반응에 의해 증폭된 산물을 2% 아가로스 젤 전기영동을 한 후 이를 QIAEX II agarose gel extraction kit(Qiagen Valencia, CA, USA)를 사용하여 회수한 후 DNA 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열은 BLAST를 이용하여 GenBank의 데이터베이스와 비교하여 가장 유사한 미생물을 확인할 수 있었다.

## 결과 및 고찰

### 구기자-맥문동 막걸리의 저장 중 효모 생균수의 변화

위와 같이 제조한 구기자-맥문동 막걸리를 4°C와 20°C에서 각각 보관하면서 일정한 간격으로 저장 중 효모 생균수의 변화를 조사하였다. 발효가 끝나 저장하기 시작한 시점에서 효모의 숫자는  $1.7 \times 10^8$  cfu/mL이었다(Fig. 1). 4°C에서 15일 저장한 후 효모 수는  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL로서 큰 변화가 없었다. 하지만 30일간 저장한 후에는  $6.5 \times 10^7$  cfu/mL로 초기 효모 균수의 약 62%가 감소되었다. 20°C에서 수행한 저장 실험에서는 15일간 저장한 후  $2.2 \times 10^7$  cfu/mL로 초기 효

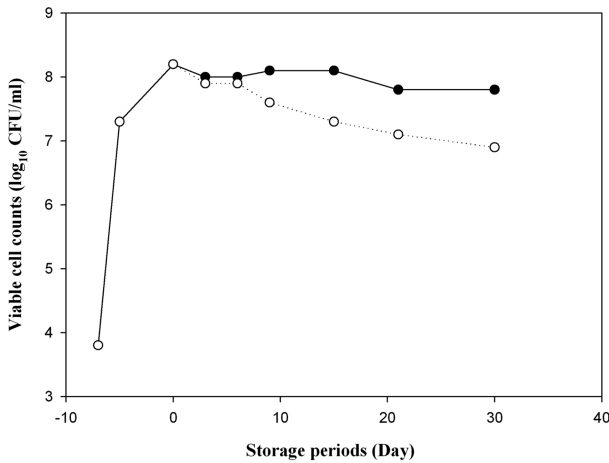


Fig. 1. Change of yeast viable cell counts of *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* during storage at 4°C (closed circle) and 20°C (open circle), respectively.

모균수의 87%가 감소 하였으며 30일간 저장한 후에는  $8.0 \times 10^6$  cfu/mL로서 초기 효모균수의 약 95.2%가 감소되었다(Fig. 1).

이 결과는 전통 막걸리의 경우 20°C에서 30일간 저장하였을 때 효모의 약 89%가 감소되었다는 결과[7]보다 효모가 더 많이 감소된 것이다.

**총 세균과 젖산균의 변화**

발효를 마친 시점에서 효모의 성장을 억제하기 위해 50 µg/µL의 농도로 cycloheximide 를 첨가하여 제조한 PCA평판배지에서 연속희석법으로 측정된 총 세균 수는  $9.7 \times 10^8$  cfu/mL이었다(Fig. 2). 이를 4°C에서 저장하였을 때 저장 15 일 시점에서  $3.5 \times 10^8$  cfu/mL로 총 세균 수가 약 64% 감소 하였다. 하지만 저장 30일 시점에서는  $3.6 \times 10^8$  cfu/mL로서 2주 동안 총 세균수의 변화는 크게 없었다. 그렇지만 시료를

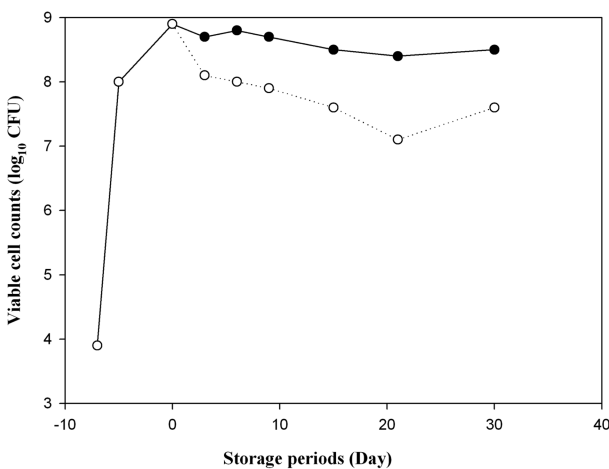


Fig. 2. Change of total bacteria viable cell counts of *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* during storage at 4°C (closed circle) and 20°C (open circle), respectively.

20°C에서 저장하였을 경우에는 초기 세균 수가  $9.7 \times 10^8$  cfu/mL에서 저장 15일 시점에서  $4.8 \times 10^7$  cfu/mL로 총 세균 수의 약 95%가 감소하였다. 그 이후 저장 30일 시점에서는  $4.4 \times 10^7$  cfu/mL로서 저장 15일 시점부터 2주 동안 총 세균 수는 크게 변화하지 않았다(Fig. 2). 20°C에서 저장하였을 때 저장 기간이 진행됨에 따라 4°C보다 효모와 총 세균 수의 더 많이 감소 한 것은 아마도 20°C에서 노화세포 증가와 자가 소화가 4°C보다 더 많이 일어났기 때문인 것으로 사료된다[5].

구기자-맥문동 막걸리중의 젖산균 변화는 cycloheximide (50 µg/gL)를 첨가하여 조제한 MRS 평판배지에서 연속희석법을 사용하여 조사하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 4°C와 20°C에서 30일 동안 저장할 때 젖산균 수의 변화 양상은 Fig. 2의 총 세균 수의 변화와 유사한 경향을 보였다.

**구기자-맥문동 막걸리의 주요 미생물 동정**

구기자-맥문동 막걸리 발효 과정 동안 그리고 발효 종료 후 30일 동안 저장하면서 미생물 변화를 DGGE로 분석하여 동정하였다. 발효 과정 중 그리고 4°C와 20°C에서 저장하는 동안 막걸리의 생균수 측정에 사용한 것과 동일한 시료로부터 DNA를 추출한 후 rRNA 유전자를 증폭시키기 위해 PCR반응을 수행하였다. 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭 산물들을 40-80%의 변성제가 들어 있는 폴리악릴아마이드 젤을 이용하여 분석하였다. 그 결과 4°C(Fig. 4A)와 20°C (Fig. 4B)에서 저장하는 동안 존재하는 세균들의 16S rRNA DNA 밴드들의 양상이 유사하였다. DGGE에서 나타난 세균의 DNA밴드들을 분석한 결과는 Table 1에 정리되어 있다. 시중에 유통되고 있는 상업용 막걸리의 PCR-DGGE분석 결과와 비교하여 보았을 때(data not shown), 구기자-맥문동 막걸리 발효 과정 중 존재하는 세균 군총으로부터 유래된 16S rDNA 밴드들의 양상은 시판용 막걸리들에 비해 비교적 단

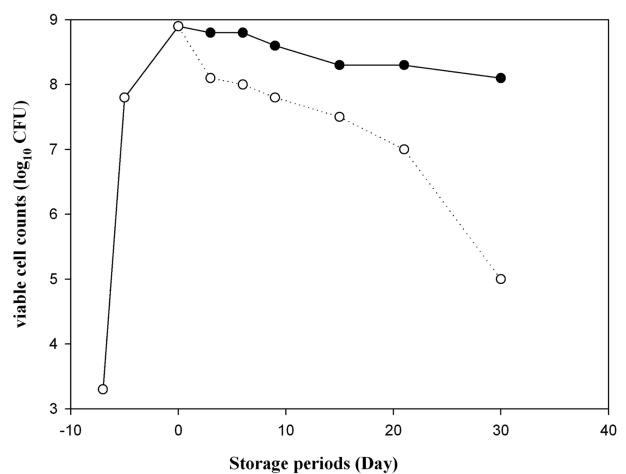
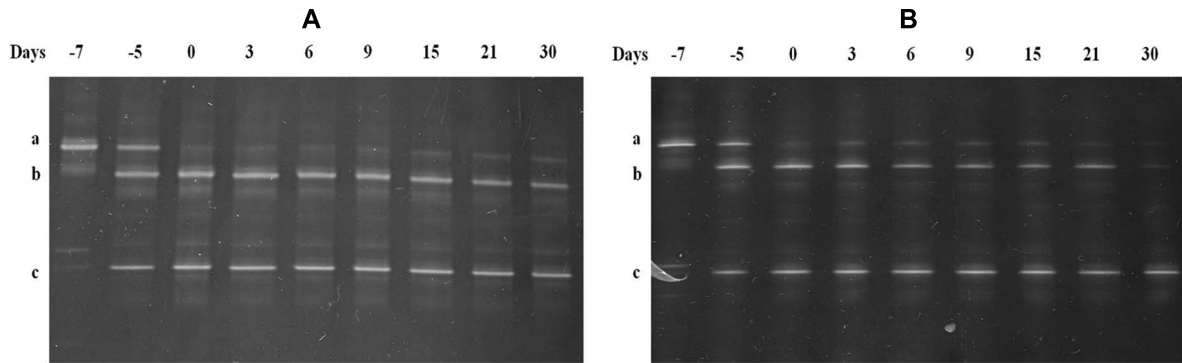


Fig. 3. Change of lactic acid bacteria viable cell counts of *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* during storage at 4°C (closed circle) and 20°C (open circle), respectively.



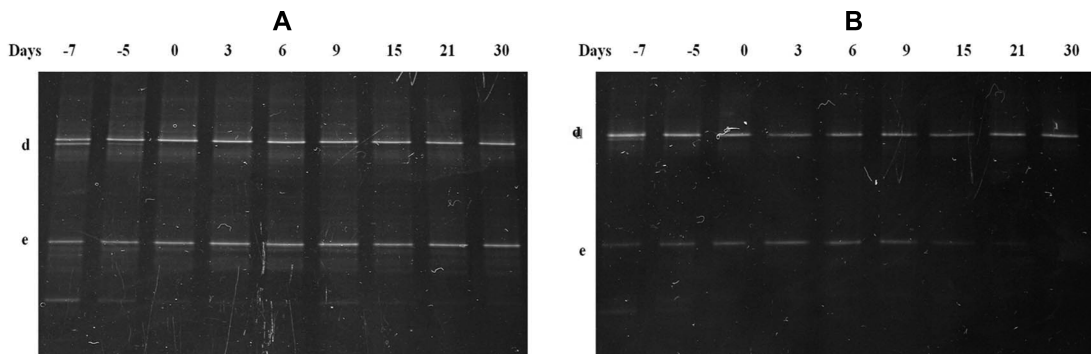
**Fig. 4** PCR-DGGE analysis of 16S rRNA gene amplification from *Gugija-Liriope Makgeolli* stored at 4°C (A) and 20°C (B) for various days. The identities of the excised 16S rDNA fragments (a-c bands) are described in Table 1.

**Table 1.** Identification of microorganisms of *Gugija-Liriope tuber Makgeolli*.

Bands	Putative species	Related Genbank sequence	Identity (%)
a	<i>Weissella cibaria</i>	AB572037.1	198/198(100%)
b	<i>Lactobacillus fermentum</i>	JF812168.1	198/198(100%)
c	<i>Pediococcus acidilactici</i>	HQ603181.1	197/197(100%)
d	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AB594476.1	400/400(100%)
e	<i>Saccharomyces</i> sp.	GQ166761.1	381/381(100%)

순하게 나타났다. 구기자-맥문동 막걸리 시료에서는 *Weissella cibaria*, *Lactobacillus fermentum* 그리고 *Pediococcus acidilactici*가 주요 박테리아로 동정되었는데, 이들은 모두 숙주세포에 유용한 역할을 하는 프로바이오틱으로 알려져 있다[2, 6, 10]. 흥미 있는 것은 발효가 개시되는 시점(-7 days)에서 *W. cibaria*가 우점균이었지만 발효가 종료된 시점(0 days)에서는 pH 등의 변화에 의해 *L. fermentum*과 *P. acidilactici*로 대체된다는 점이다. 즉 *W. cibaria*의 DNA 밴드가 발효 초기에 가장 진하게 나타나다가 발효 종료 시점에서 급격히 감소하였고(Fig. 4, 밴드 a), 발효 개시일(-7 days)에 명확히 보이지 않던 *L. fermentum*(Fig. 4, 밴드 b)과 *P. acidilactici*(Fig. 4, 밴드 c)가 발효 2일째(-5 days)부터 뚜

렷이 보이기 시작하였다. 특히 20°C(Fig. 4B)에서 30일 동안 저장하면 *P. acidilactici*에 해당하는 DNA 밴드가 *L. fermentum*에 비해 상대적으로 더 진해지는 것으로 보아 *P. acidilactici*가 최종적인 우점균이 된다고 판단된다. 한편 *P. acidilactici*는 젖산 생산 및 pediocin이라고 알려진 박테리오킨을 만들어서 유해균의 성장을 억제하는 효과를 갖고 있다는 보고가 있다[2]. 시간에 따른 총 세균수 및 젖산균의 변화 양상(Fig. 2, 3) 그리고 DGGE로 분석한 세균 종의 동정 결과(Fig. 4)를 비교해 보면, 막걸리 발효 기간 및 저장 기간 중 이상발효젖산균인 *W. cibaria*와 *L. fermentum* 그리고 내산성균이면서 정상발효젖산균인 *P. acidilactici*들 이외에는 다른 세균들이 확인되지 않았으므로 구기자-맥문동 막걸리의 균총은 젖산균으로만 구성되어 있다고 결론 내릴 수 있다. 유사한 방법으로 발효 기간 중 그리고 저장 기간 중의 막걸리로부터 일정 간격으로 시료를 취해 DNA를 추출한 후 18S rRNA 유전자 증폭을 위해 PCR반응을 수행하였다. PCR 증폭 산물들을 30-70%의 변성제가 들어있는 폴리아크릴아마이드 젤을 이용하여 효모의 DNA 밴드들을 분석한 결과, 주 알코올 발효균인 *S. cerevisiae*와 미동정의 *Saccharomyces* 속 균들이 동정되었고 이는 Table 1에 정리 하였다. DGGE에서 나타난 DNA 밴드들은 4°C(Fig. 5A)와 20°C(Fig. 5B)



**Fig. 5** PCR-DGGE analysis of 18S rRNA gene amplification from *Gugija-Liriope Makgeolli* stored at 4°C (A) and 20°C (B) for various days. The identities of the excised 18S rDNA fragments (d and e bands) are described in Table 1.

에서 저장 기간 중 유사한 미생물 변화 양상을 보였다. 하지만 20°C에서 저장하였을 때 15일 이후부터 *Saccharomyces* sp.(Fig. 5B, 밴드 e)가 *S. cerevisiae*에 비하여 더 많이 사멸되는 양상을 보여 주었다. 시간에 따른 효모 생균수 변화(Fig. 1)와 저장 시간에 따른 DGGE에서의 효모종 변화 결과(Fig. 5)를 비교해 보면, 20°C에 저장하는 동안 15일 이후 일어난 효모의 급격한 감소는 *S. cerevisiae*보다는 *Saccharomyces* sp.의 감소에 기인한 것 같다.

발효가 종료된 구기자-맥문동 막걸리의 에탄올 함량은 8.3% 그리고 pH는 3.30으로 보고된 바 있는데[1], 이는 통상적인 발효 원액의 에탄올 함량인 13-15%와 pH 3.8-4.0에 비해 낮은 수준이다. 이는 부재료인 구기자와 맥문동 첨가에 의해 알코올 발효 및 세균의 균총 분포가 영향을 받은 결과 때문인 것으로 사료된다.

본 실험 목적 중 하나인 발효주의 저장 기간은 YPD 배지를 이용하여 효모의 생균수를 측정된 결과를 기준으로 하여 4°C에서는 15일까지 그리고 20°C에서는 저장하지 않는 것이 바람직하다고 판단되었다. 이는 본 연구에서 제조한 구기자-맥문동 막걸리를 4°C에서 저장하였을 때, 초기에  $1.7 \times 10^8$  cfu/mL에서 15일에  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL로 큰 변화가 없다가 그 이후 21일째에는  $7 \times 10^7$  cfu/mL로 효모의 수가 급격히 감소하였고, 20°C에서는 초기에  $1.7 \times 10^8$  cfu/mL에서 3일 만에 이미  $9 \times 10^7$  cfu/mL로 크게 감소하였기 때문이다. 하지만 20°C에서 3일, 6일, 9일 동안 저장한 막걸리 시료에 대해 관능검사를 시행하였을 때, 9일간 저장한 막걸리의 기호도는 3일 동안 저장한 막걸리의 그 것과 큰 차이를 보이지 않았다(data not shown). 20°C에서 9일간 저장한 막걸리 시료의 미생물 수는 크게 감소하더라도, 이때까지 생산된 유기산 등이 막걸리 풍미에 큰 영향을 미치지 않도록 한 것으로 사료된다.

## 요 약

구기자-맥문동 막걸리의 미생물 분포와 최적 저장 기간을 확립하기 위하여 먼저 구기자-맥문동 막걸리를 제조한 후 4°C와 20°C에 저장하면서 효모, 총 세균 그리고 젖산균의 생균 수 변화를 조사하였다. 발효가 완료되어 4°C에서 15일간 저장하는 동안 효모 수는 큰 변화가 없었다. 하지만 30일간 저장한 후에는 약 62%가 감소되었다. 20°C에서 수행한 저장 실험에서는 15일간 저장한 후 초기 효모균수의 87%가 감소하였으며 30일간 저장한 후에는 약 95.2%가 감소되었다. 구기자-맥문동 막걸리의 DGGE 분석에 의해 *S. cerevisiae*와 미동정의 *Saccharomyces* sp.가 동정되었는데 20°C에서 저장하였을 때 *Saccharomyces* sp.가 더 빨리 사멸하였다. 저장 기간 중 총 세균 수와 젖산균의 변화 양상은 유사하였다. 4°C에서 저장 하였을 때 저장 15일 시점에서 총 세균 수는 약 64%가 감소하였으나 그 이후 저장 30일

까지 총 세균수의 변화는 크게 없었다. 20°C에서 저장하였을 경우에는 초기 세균 수가 저장 15일 시점에서 총 세균수의 약 95%가 감소하였으며 그 이후 저장 30일 시점까지 총 세균수는 크게 변화하지 않았다. DGGE분석을 통해 발효 개시 시점에서는 *W. cibaria*가 우점균이었다가 점차 *L. fermentum*과 *P. acidilactici*가 증가하여 저장 기간 동안 이들이 우점균으로 존재 함을 확인하였다.

## Acknowledgement

This study was performed by support of Cheongyang Green Wellness Research Project (2010 RIS Fund).

## REFERENCES

- Baek, S. Y., Y. G. Nam, J. I. Ju, and J. S. Lee. 2011. Changes of quality characteristic during storage of *Gugija-Liriope tuber Makgeolli* made by *Saccharomyces cerevisiae* C-2. *Kor. J. Mycol.* **39**: 122-125.
- Daeschel, M. A., and T. R. Klaenhammer. 1985. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1538S-1541S
- Haruta, S., S. Ueno, I. Egawa, K. Hashiguchi, A. Fujii, M. Nagano, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 79-87.
- Lee, J. S., Y. C. Park, S. W. Paik, S. S. Lee, Y. K. Ahn, and J. S. Lee. 2008. Physiological functionality of *Gugija* products and an *in vivo* examination on anti-hypertension effects. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **21**: 115-120.
- Lee, M. Y., S. Y. Sung, H. K. Kang, H. S. Byun, S. M. Jung, J. H. Song, and J. S. Lee. 2010. Quality characteristics and physiological functionality of traditional rice wines in Chungnam province of Korean. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 177-182.
- Lee, K. W., J. Y. Park, H. R. Jeong, H. J. Heo, N. S. Han, and J. H. Kim. 2012. Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe.* **18**: 96-102.
- Min, J. H., S. Y. Baek, J. S. Lee, and H. K. Kim. 2011. Changes of yeasts and bacterial flora during the storage of Korean traditional *Makgeolli*. *Kor. J. Mycol.* **39**: 151-153.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Park, W. J., B. C. Lee, J. C. Lee, E. N. Lee, J. E. Song, D. H. Lee, and J. S. Lee. 2007. Cardiovascular biofunctional activity and antioxidant activity of *Gugija* (*Lycium chinensis*

- Miller) species its hybrids. *Kor. J. Medicinal.* **15**: 391-397.
10. Reque, E. de F., A. Pandey, S. G. Franco, and C. R. Soccol. 2000. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. *Brazilian J. Microbiol.* **31**: 303-307.
  11. Rhee, I. J., and J. Y. An. 2003. Hepatoprotectives effects of water extract of *Liriopsis tuber* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Kor. J. Pharmacol.* **34**: 166-171.
  12. Song, J. H., J. H. Jang, H. K. Kim, and J. S. Lee. 2009. Manufacture and quality characteristic of Korean traditional big blue *Lily-turf Takju*. *J. Natural Sciences*. Paichai University, Korea. **20**: 22-29.
  13. Song, J. H., S. Y. Baek, D. H. Lee, J. H. Jung, H. K. Kim, and J. S. Lee. 2011. Screening of fungal *Nuruk* and yeast for brewing of *Gugija-Liriopsis tuber* traditional rice wine and optimal fermentation condition. *Kor. J. Mycol.* **39**: 78-84