

김치 유산균을 이용한 사워 맥주의 특성 평가

이하연*  · 임재길  · 고윤미  · 고윤지  · 최성진  · 함진관 

강원도농업기술원 농식품연구소

Evaluation of sour beer using kimchi lactic acid bacteria

Ha Yeon Lee* , Jae Geel Lim , Yun Mi Ko , Yoon-Ji Goh , Sung Jin Choi , and Jin Kwan Ham 

Agro-food Research Institute, Gangwon-do Agricultural Research & Extension Services, Chuncheon 24203, Republic of Korea

(Received November 16, 2020; Revised December 4, 2020; Accepted December 8, 2020)

Lactic acid bacteria (LAB) have been used in souring mash or wort to produce traditional sour beer styles such as lambic and gueuze, through spontaneous fermentation. This method, however, is time-consuming, thus, many brewers prefer a faster method using LAB starters. In this study, we evaluated the fermentation properties of 18 LAB strains isolated from South Korean kimchi for use in a souring starter. All strains were assessed for acidification, exopolysaccharide (EPS) production, diacetyl production, hop resistance, and β -glucosidase activity. As a result, three strains (*Lactiplantibacillus pentosus* L213, *Limosilactobacillus fermentum* L240, *Lactiplantibacillus plantarum* AFY-10) selected exhibited low pH, non EPS and diacetyl production, and β -glucosidase activity. Analysis of properties, including LAB count, pH, lactic acid, and acetic acid of the three kimchi-strain sour beers were evaluated against sour beer fermented with Sour Pitch. The fermentation characteristics of each sour beer, including free sugar, alcohol by volume, pH, attenuation, foam stability, diacetyl, and free amino nitrogen (FAN) were also compared. Multivariate analysis of variance of volatile aroma compounds distinguished the three kimchi LAB-strain beers from the Sour Pitch-strain beer. We anticipate that kimchi LAB may be a promising starter for sour beer production.

Keywords: beer, kimchi, lactic acid bacteria, souring, sour beer

유산균은 세계적으로 식품의 보존과, 관능적 특성 및 영양학적 가치를 개선하기 위하여 사용되어 왔다(Hugenholtz, 2013). 맥주 산업에서 유산균은 사워 맥주(Sour beer)를 양조하기 위하여 맥아즙을 산성화시키거나 산성 맥아(acid malt)를 제조할 때 맥아 표면에 생육하고 있는 미생물 군집을 조절하기 위한 용도로 사용되어 왔다(Lowe *et al.*, 2005; Ciosek *et al.*, 2020). 효모, 초산균과 함께 유산균은 독일의 베를리러 바이세(Berliner Weisse), 벨지안 괴즈(Belgian Gueuze)와 램빅(Lambic)과 같은 전통식 사워 맥주를 제조하는데 사용되었다(Van Oevelen *et al.*, 1977; Waters *et al.*, 2015).

사워 맥주는 오랜 역사를 가진 맥주 스타일 중 하나로, 최근에는 맥주 제품의 포트폴리오를 다양화하기 위한 방법으로서 맥주 양조자들에게 새롭게 각광 받고 있다(Bokulich *et al.*, 2012). 전통적인 사워 맥주 제조 방법은 개방된 환경에서 양조를 하여 야생에서 유래한 효모와 유산균 또는 초산균이 동시에 관여하기 때문에 발효 과정이 복잡하고, 시간이 오래 걸리며, 균일한 품질의 맥주를 제조하기가 어렵다(Van Oevelen *et al.*, 1977; Verachtert and Derdelinckx, 2014). 최근에는 이러한 전통식 방법의 단점을 극복하기 위한 대체 방법으로 유산균 스타터를 이용하여 품질을 균일하게 하고, 발효공정 중 어느 단계에서 유산균을 접종하는지 등의 연구가 보고되었다(Peyer *et al.*, 2017; Osburn *et al.*, 2018; Chan *et al.*, 2019).

사워 맥주에 사용되는 유산균은 보통 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*속이다(Spitaels *et al.*, 2015). 사워 맥주는 맥아즙에 홉을 넣고 끓이는 자비 공정(hopping) 전후 단계에서 유산균을 접종하여 제조된다(Suzuki *et al.*, 2006).

*For correspondence. E-mail: hylee87@korea.kr;
Tel.: +82-33-248-6548; Fax: +82-33-248-6555

자비 공정 이후에 맥아즙을 산성화시키는 것은 유산 발효를 통한 바람직한 휘발성 향기 성분이 생성되는 장점이 있는 반면, DMS (dimethyl sulfide)의 이성질체화 감소나 제거와 같은 산성화된 맥아즙을 끓였을 때의 단점을 갖고 있다(Lewis and Bamforth, 2007). 또한 유산균은 사워 맥주가 아닌 일반 맥주의 부패를 일으킬 수도 있기 때문에 양조 과정의 온도가 떨어졌을 때 교차 오염을 줄이기 위하여 자비 공정 전에 사워링(souring)하는 것이 선호되기도 한다(Suzuki *et al.*, 2006).

최근 한국에서도 수제 맥주 산업이 증가함에 따라 다양한 수제 맥주가 판매되고 있으며, 유산균을 이용한 사워 맥주 제품이 출시되고 있다. 하지만 이를 제조하기 위해 사용되는 미생물은 대부분 수입에 의존하고 있으며, 국내 연구는 전무한 실정이다. 본 연구에서는 사워 맥주 종류로서의 김치 유산균의 가능성을 평가하고자 분리 균주와 시판 균주로 사워 맥주를 제조하여 발효 특성 및 향기 성분을 분석 및 비교하였다.

재료 및 방법

유산균 분리

강원 지역 농가에서 전통 발효 김치 4종을 수집하여 MRS agar (BD Difco)에 도말하고, Gaspak (BD)을 이용하여 혐기적 조건으로 37°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 단일 균집을 육안으로 색상, 크기 등의 형태학적 특징을 비교하여 선별한 다음, 동일한 배지와 조건에서 획선 평판법(streaking)으로 순수 분리하여 김치 유산균을 획득하였다.

유산균 동정

분리된 미생물의 분자계통학적 분석을 위하여 AccuPrep[®] genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였고, MacroGen에 의뢰하여 785F (5'-GGATTA GATACCCTGGTA-3')와 907R (5'-CCGTC AATTCMTTTR AGTTT-3') primer를 이용하여 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 DNA를 증폭시킨 후, DNA 분석기(3730xl DNA analyzer, Thermo Fisher Scientific)로 16S rRNA 유전자 염기 서열을 분석하였다. 염기서열 분석 결과는 National Center for Biotechnology Institute (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)의 GenBank database와 EzCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)를 이용하여 상동성을 비교 후 동정하였다.

계통 분석

분석된 16S rRNA 유전자 염기서열은 SeqMan software (DNASTar)를 사용하여 편집한 후, NCBI의 Nucleotide BLAST에 입력하여 비교적 유전적 거리가 가까운 염기 서열 정보를 수집하였다. NCBI 데이터베이스를 통해 수집한 염기 서열은 BioEdit program (Hall, 1999)을 이용하여 정렬한 뒤, MEGA 10.1 (Tamura *et al.*, 2013)을 사용하여 재배열한 후, neighbor-joining 방법(Saitou and Nei, 1987)을 이용하여 계통수를 작성하였다.

사워 맥주용 유산균 탐색

사워 맥주용 유산균 탐색을 위하여 산 생성, 균체 외 다당류 생성, 디아세틸 생성, 홉 내성, β -glucosidase 활성을 평가하였다. 산 생성을 평가하기 위하여 MRS 배지에 bromocresol green (Sigma Aldrich)을 0.01% 첨가하여 배지의 pH가 낮아질수록 초록색에서 노란색으로 변하는 원리를 이용하였다. 균체 외 다당류(exopolysaccharide) 생성은 2% sucrose를 첨가한 DME agar (8.5°P dry malt extract, 1.5% agar)에 유산균을 접종하여 37°C에서 48시간 동안 배양하여 콜로니 주변에 점액물질(slime)이 생성된 균주를 EPS 생성 양성 균주로 판정하였다. 디아세틸 생성 측정은 formulated fruit simulation medium (FSM) broth (1% glucose, 1% fructose, 0.5% sorbitol, 0.2% malic acid, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.005% MnSO₄·H₂O, 0.1% K₂HPO₄, 0.01% EDTA, 0.2% ammonium citrate, 1% vegetable peptone, 0.1% Tween 80, pH 6.1) 배지 200 μ l에 유산균 20 μ l를 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 새로운 96-well plate에 100 μ l를 옮기고, 4% α -naphthol solution (w/v)을 50 μ l 분주하여 현탁하고 30% potassium hydroxide (Sigma Aldrich)을 첨가한 후, 30°C에서 30분 반응하여 분홍색으로 변하는 것을 디아세틸 생성 양성으로 판정하였다(Ruiz Rodríguez *et al.*, 2019). 홉 내성 평가를 위하여 iso α -acid의 농도가 1, 5, 10, 20 IBU (International Bitterness Unit, iso α -acid ppm)가 되도록 30% iso-Hop (BarthHaas)을 첨가한 DME agar에 유산균을 접종하여 37°C에서 48시간 배양하였다. β -Glucosidase 활성 평가는 escuin agar법을 응용하여 0.5% esculin (Sigma Aldrich), 1.0% ferric ammonium citrate (Sigma Aldrich)가 첨가된 DME agar를 제조 후, 유산균을 접종하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 흑색환(black zone)을 생성하는 균주를 양성 균주로 판정하였다(Shim *et al.*, 2014).

사워 맥주 제조

분쇄된 맥아 Pilsen Malt 2-Row (Briss malt & Ingredients

co.)를 당화조에 넣고 증류수를 천천히 부어 65°C에서 45분, 72°C에서 15분, 78°C에서 2분간 반응시켜(Dysvik et al., 2019) 비중이 1.040 되도록 당화하였다. 100°C에서 5분간 맥아즙을 살균한 후, 냉각기를 이용하여 40°C가 되도록 냉각시킨 다음, 88% lactic acid (Sigma Aldrich)을 첨가하여 맥아즙의 pH를 4.5로 조정하였다. DME broth (8.5°P dry malt extract)에서 40°C, 24시간 전배양한 김치 유산균 및 시판 유산균 *Lactiplantibacillus plantarum* (Wildbrew Sour Pitch, Lallemand)을 1×10^7 CFU/ml 농도가 되도록 맥아즙에 접종하였다. 사워링(Souring)과정은 40°C에서 40시간 동안 수행하였다. 사워링이 끝난 후, 홉 펠릿(Citra hop, 13.1% α -acids)을 0.4 g/L 농도로 넣고 100°C에서 60분 동안 끓인 후, 냉각기를 이용하여 25°C 미만으로 맥아즙을 냉각시켰다. 알코올 발효를 위하여 시판 효모 *Saccharomyces cerevisiae* US-05 (Fermentis)를 1×10^7 CFU/ml 농도로 접종하여 20°C에서 14일간 발효하여 사워 맥주를 제조하였다.

유산균 수

0.85% NaCl solution으로 희석한 시료 1 ml를 Lactic acid bacteria count plate (3M)에 접종한 후 Gaspak (BD)을 이용하여 37°C에서 2일간 배양하여 계수하였다.

pH, 플라토, 알코올 도수, 비중

pH는 pH meter (Mettler Toledo)를 이용하여 측정하였다. 플라토는 Plato 측정 기계(Atago)를 이용하여 측정하였다. 알코올 도수와 비중은 시료 원액을 구조토로 여과해서 사용하였고, 시료 50 ml 당 구조토 0.5 g을 첨가한 후, 여과지(5A, Adventec)를 사용하여 여과한 후, 알코올 측정기(ALEX 500, Anton Paar)를 이용하여 측정하였다.

발효도

알코올 측정기(ALEX 500, Anton Paar)를 이용하여 맥주의 초기 비중(original gravity, OG)과 최종 비중(final gravity, FG)을 측정하여 아래 식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{발효도(\%)} = (\text{OG} - \text{FG}) / (\text{OG} - 1) \times 100$$

디아세틸

디아세틸 농도는 420 nm 파장에서 분광 광도계(EPOCH2, BioTek)를 이용한 비색법으로 측정하였다. 0.175 M isoniazide 용액 10 ml에 acetic acid를 넣어 산성화시킨 후, 2.9×10^{-4} M diacetyl solution 5 ml와 0.15 M ZR (IV)염 1 ml를 첨가하였

다. 3 M HCl과 4 M NaOH를 혼합하여 pH 1.7로 조정한 후, 제조한 용액을 50 ml 정용 부피 플라스크에 옮겨 정제수로 희석하였다. 시료 25 ml와 NaCl 포화용액 70 ml를 혼합한 후에 isoniazide 용액이 20~30 ml로 포집될 때까지 증류하였다. 이 값을 calibration curve와 대조하여 디아세틸 함량을 측정하였다(García-Villanova and Estepa, 1993; Guerra-Hernández et al., 1995).

거품 안정성

거품 안정성은 100 ml 뷰렛에 시료 원액 50 ml를 붓고 30초 뒤 거품 이외의 하층액을 cock를 열어 제거한 후, 다시 cock를 막고 230초 동안 거품이 깨지도록 한다. 이 때, 깨진 거품 양(b)과 남은 거품 양(c)을 측정하여 계산하였다(Bamforth, 1985). 거품 안정성의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Foam stability} = 230 / \{2.303 \log[(b + c) / c]\}$$

유리아미노산질소

유리아미노산질소(FAN) 농도를 측정하기 위하여 시료를 멸균 증류수로 50배 희석한 후 Free Amino Nitrogen Assay Kit (Bio Assay Systems)를 사용하여 매뉴얼 방법대로 측정하였다. 50배로 희석한 시료 5 μ 에 Reagent A 150 μ 와 Reagent B 5 μ 를 혼합한 용액 150 μ 를 첨가한 후 100°C에서 10분간 반응시켰다. 상온에서 냉각 후, 1분 이내 원심 분리하여 96-well plate에 100 μ 씩 분주하고 575 nm 파장에서 분광 광도계(EPOCH2, BioTek)로 흡광도를 측정하였다. 표준 용액은 glycine (Sigma Aldrich)을 사용하였다.

유기산 분석

시료 원액을 0.45 μ m filter로 여과한 후 사용하였다. 분석기기는 HPLC (1260 infinity II, Agilent)를 사용하였으며, 컬럼은 Kinetex C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m, Phenomenex), 가드 컬럼은 UHPLC C18 (AJ0-8768, Phenomenex)을 사용하였다. 컬럼 온도는 25°C, 시료 주입량은 10 μ l이며, 이동상은 25 mM potassium phosphate를 사용하여 0.7 ml/min 유속으로 크로마토그래피를 실시하고, UV detector로 210 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

휘발성 향기 성분 분석

SPME (solid phase microextraction) 방법으로 휘발성 향기 성분을 분석하였다. 시료 원액을 0.45 μ m filter로 여과한 후 20

ml vial에 시료 5 ml을 취하여 sodium chloride (Sigma Aldrich) 1 g을 넣고 60°C에서 500 rpm으로 30분 동안 65 µm PDMS/DVB fiber (Sigma Aldrich)에 흡착시킨 후에 GC-TOF/MS (7890A, Agilent Technologies)로 분석하였다. 컬럼은 ZB-WAX (30 m × 0.32 mm × 0.25 µm, Phenomenex)를 이용하여 시료를 주입구 250°C에서 5분 동안 흡착시켰고, 이동식 기체는 He 가스를 이용하여 1.13 ml/min 유속으로 분석하였다. 오븐 온도는 8°C/min 속도로 240°C까지 올리고 3분간 유지하도록 하였고, 전송 라인 온도는 250°C로 설정하였다. TOF/MS 조건은 230°C, 15 spectra/s, 35-501 m/z로 설정하였다. 검출된 물질은 NIST (National institute of standards and technology) library를 활용하여 동정하였다.

통계 분석

각 실험 결과는 3번 반복 실험 결과의 평균과 표준 편차로 나타내었고, IBM SPSS statistics software (SPSS 12.0, IBM)로 Duncan's multiple range test를 통하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 상관 분석은 정규 분포를 따르는 변수만 선별하여 Pearson의 상관 계수로 나타내었다.

다변량 통계 분석

SIMCA software (SIMCA 14.0, Umetrics)을 사용하여 PCA (Principal Component Analysis) 및 PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)를 실시하였다. PLS-DA 분석을 통해 VIP (Variable Importance in Projection)을 얻어 유의성 변수를 추출하였고, 더욱 정확한 결과를 위하여 표준편차는 1.0 미만인 것을 선택하였다.

결과 및 고찰

사위 맥주용 김치 유산균 탐색

강원 지역에서 수집한 김치에서 *Lactiplantibacillus pentosus* 8주, *Lactiplantibacillus plantarum* 6주, *Latilactobacillus curvatus* 3주, *Limosilactobacillus fermentum* 1주, 총 18균주의 유산균을 분리하였다. 사위 맥주용 김치 유산균 선발을 위하여 산 생성, 균체 외 다당류(exopolysaccharide) 생성, 디아세틸 생성, 홉 내성, β-glucosidase 활성을 평가하여 Table 1에 나타내었다. 사워링을 할 경우, 통상적으로 48시간 이내에 마치기 때문

Table 1. Strain properties of lactic acid bacteria isolated from kimchi

No.	Strain name	Species	Acid production ^a	EPS production ^b	Diacetyl production ^c	HopTolerance ^d	β-Glucosidase activity ^e
1	L193	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.47	-	-	+++++/+	-
2	L196	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	3.48	+++	-	++++/-	-
3	L198	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.45	-	-	++++/-	-
4	L208	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.39	++++	-	++++/-	-
5	L209	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	3.45	-	-	++++/-	-
6	L210	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.50	-	-	++++/-	-
7	L213	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.42	-	-	+++++/+	+
8	L217	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	3.46	-	-	+++++/+	-
9	L221	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.49	-	-	+++++/+	+
10	L222	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.45	-	-	+++++/+	+
11	L229	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.45	-	-	+++++/+	-
12	L237	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.46	-	-	+++++/+	++
13	L240	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	3.42	-	-	+++++/+	++
14	L241	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.43	-	-	+++++/+	-
15	L257	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.46	-	-	+++++/+	-
16	L258	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.47	-	-	+++++/+	-
17	L261	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.45	-	-	+++++/+	+
18	AFY-10	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.40	-	-	+++++/+	++

^a pH value.

^b Slime production : no result (-), 1 mm (+), 2 mm (++) , 3 mm (+++) , 4 mm (++++), 5 mm (++++).

^c Reaction color : no result (-), slightly light pink (+), light pink (++) , pale pink (+++) , pink (++++), dark pink (++++).

^d Colony size (5 IBU/10 IBU) : no result (-), 1 mm (+), 2 mm (++) , 3 mm (+++) , 4 mm (++++), 5 mm (++++).

^e Black zone size : no result (-), 1 mm (+), 2 mm (++) , 3 mm (+++) , 4 mm (++++), 5 mm (++++).

에 산 생성능은 사워 맥주용 유산균의 가장 중요한 특성 중 하나로 18균주 중 최종 pH가 3.5 미만인 유산균은 L208, L213, L240, L241, AFY-10 균주이었다. 또한 분리된 유산균이 맥주 부패 미생물로 작용하는지 확인하기 위하여 EPS와 디아세틸 생성을 확인한 결과, L196, L208 균주가 EPS를 생성하였고, 디아세틸은 모든 균주에서 생성되지 않는 것으로 나타났다. 맥주 부패 미생물로 알려진 일부 유산균은 맥주에 산성화, 혼탁함, 인공적인 버터 향이 나는 디아세틸을 생성하고, 기름 같은 점액 물질인 EPS를 생성하여 맥주 품질을 저하시킨다고 보고되었다(Van Oevelen and Verachtert, 1979; Pittet et al., 2011). 특히 *Pediococcus* 속은 디아세틸과 EPS를 생성한다고 알려졌으며, 낮은 온도에서도 높은 생육을 보이기 때문에 라거와 에일 양조 모두에서 흔한 오염원이 될 수 있으며(Jespersen and Jakobsen, 1996), 가장 자주 분리되는 맥주 부패 미생물은 그람 양성균 *Levilactobacillus brevis*, *Fructilactobacillus lindneri*, *P. damnosus*, 그람 음성균 *Pectinatus cerevisiiphilus*, *P. frisingensis*, *Megasphaera cerevisiae*로 알려졌다(Suzuki et al., 2006). 홉 내성 평가 결과를 보면, 5 IBU의 홉 농도에서 18 균주 모두 생육이 우수하였으나, 2배 농도인 10 IBU에서 모든 균주의 생육이 1/5 수준으로 눈에 띄게 감소하였다. 분리

유산균들이 홉이 있는 환경에서 전혀 생육하지 못하는 것은 아니지만 IBU가 증가하였을 때 생육이 감소하는 것으로 보아 홉 내성이 아닌 홉 민감성(hop-sensitive)을 갖는 것으로 사료된다. 일반적으로 맥주의 쓴맛을 내는 홉의 iso α -acids 성분은 맥주에 17~55 ppm 정도 존재하며, 이 성분은 대부분 세균에 대한 항균 효과를 나타내지만 일부 홉 내성을 갖는 맥주 부패 미생물은 비 홉 내성 미생물에 비하여 8~20배 높은 홉 저항성을 가져 맥주의 부패를 일으킨다고 보고되었다(Teuber and Schmalreck, 1973; Simpson and Smith, 1992; Simpson, 1993; Sakamoto and Konings, 2003). 사워 맥주에 사용되는 유산균이 맥주 제조의 생물학적인 위험 요소로 작용되어서는 안 되기 때문에 홉 내성 균주보다는 홉 민감성 균주가 선호된다(Peyer et al., 2017). 18균주 모두 홉 내성을 보이지 않아 맥주 부패 위험성은 없는 것으로 사료된다. β -Glucosidase는 배당체를 분해하여 비배당체로 전환시켜주는 효소로 와인 제조에서 β -glucosidase 활성이 있는 유산균은 향이 나지 않는 glycosidic aroma precursors로부터 향기가 나는 비배당체로 전환시키는 능력이 있다고 보고되었다(Boio et al., 2002; D'Incecco et al., 2004; Matthews et al., 2004). 사워 맥주 제조에도 유산균의 β -glucosidase 활성이 향기 성분 생성에 영향을

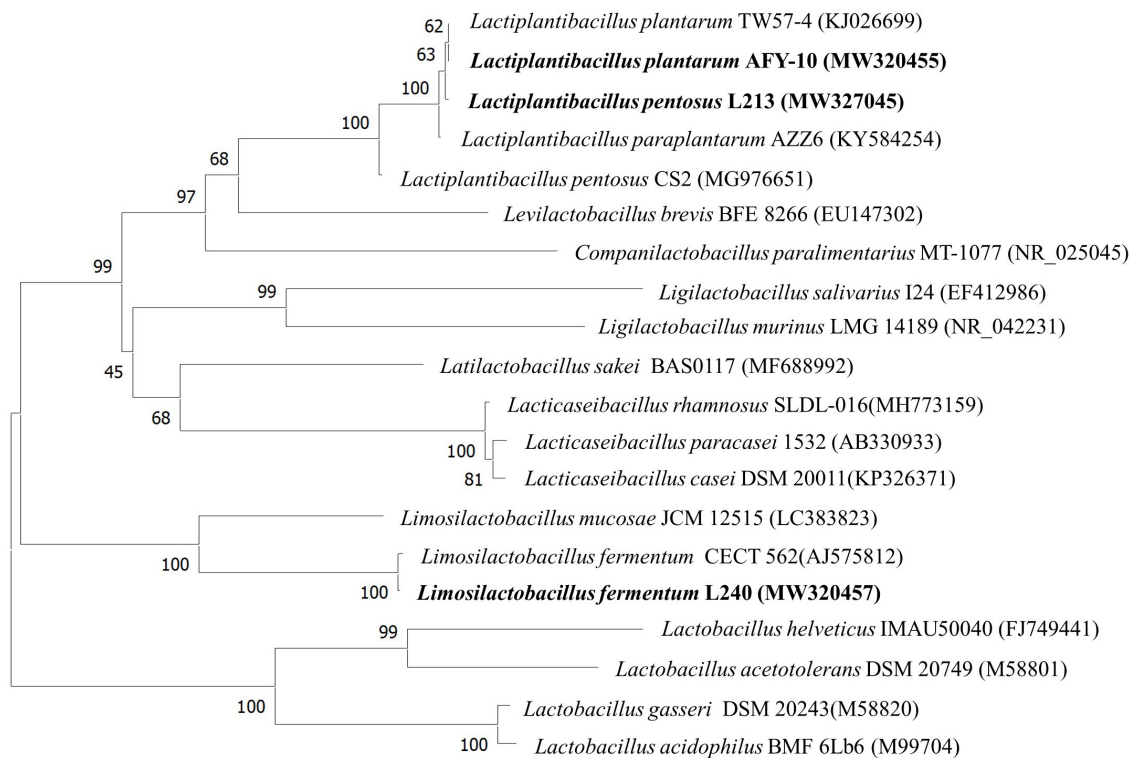


Fig. 1. Phylogenetic tree of three strains isolated kimchi used in sour beer in this study with reference strains based on 16S rRNA gene sequences. GenBank accession numbers are indicated in parentheses. Distance trees were constructed by the neighbor-joining (NJ) method on a set of 1,000 bootstrap replicates.

줄 것으로 사료되어 β -glucosidase 활성을 평가하였다. 그 결과 7균주 L213, L221, L222, L237, L240, L261, AFY-10 유산균이 β -glucosidase 활성이 있는 것으로 나타났다. 최종적으로 본 사위 맥주용 유산균 탐색 결과를 토대로 L213, L240, AFY-10 균주는 산 생성능이 우수하고, EPS와 디아세틸을 생성하지 않으며, 흡에 대한 민감성과 β -glucosidase 활성을 나타내어 사위 맥주 제조에 적용 가능성이 높은 것으로 사료되어 사위 맥주용 후보 균주로 선발하였고, 계통학적 분석은 Fig. 1에 나타내었다.

사워링 시간에 따른 유산균 수, pH, 유기산 변화

사위 맥주용 선발 유산균 3종 및 시판 유산균을 이용하여 흡을 첨가하는 자비공정 전 단계에서 사워링을 수행한 후, 사워링 발효 시간에 따른 유산균 수, pH, 유산, 초산 농도의 변화를 Fig. 2에 나타내었다.

먼저 유산균 수(Fig. 2A)를 보면 균주를 달리한 4개의 사위 맥주 모두 발효 시간이 경과할수록 유산균 수가 증가하였다. 사워링이 끝난 시점에서 L213 균주로 제조한 사위 맥주의 유산균 수가 1×10^9 CFU/ml로 가장 많았고, AFY-10 균주 제조 사위 맥주는 7×10^8 CFU/ml, L240 균주 제조 사위 맥주는 $5 \times$

10^8 CFU/ml, 시판 유산균 Sour Pitch로 제조한 사위 맥주는 2×10^8 CFU/ml로 나타났다. AFY-10 균주는 시판 균주로 사용되는 Sour Pitch와 동일 종임에도 불구하고 3배 이상 생육하는 것을 확인하였다. 사위 맥주는 유산균에 의해서 생성되는 주요 대사 산물인 유산 때문에 신맛이 나며(Makanjuola *et al.*, 1992; Lowe and Arendt, 2004; Abdel-Rahman *et al.*, 2013; O'Bryan *et al.*, 2015), pH는 3.3~3.9, 유산 농도는 약 3~6 g/L 인 것으로 보고되었다(Tonsmeire, 2014; Peyer, 2017). 사워링이 종료된 이후 pH는 모든 사위 맥주에서 3.3 미만으로 나타났다(Fig. 2B). 가장 빠른 속도로 pH가 떨어진 것은 AFY-10 균주로 16시간 내에 이미 pH 3.5에 도달하였다. Sour Pitch는 사워링 20시간에 pH 3.5에 도달하여 AFY-10 균주에 비하여 4시간이 더 소요되었다. L213와 L240 균주는 40시간 경과 후, pH가 각각 3.37, 3.33이었고, L240 균주가 가장 낮은 속도로 pH가 떨어졌다. 유산과 초산을 발효 시간에 따라 확인한 결과(Fig. 2C and D), Sour Pitch와 L240 균주로 제조한 사위 맥주의 유산 농도는 16시간에 각각 2.24 g/L, 2.15 g/L로 나타났으며, 이는 시판 유산균인 *Levilactobacillus brevis* WLP672 (White Labs)으로 사워링한 Ciosek 등(2020)의 연구에서 사워링 24시간 후, 유산 농도가 약 2 g/L에 도달한 결과와 유사하였다. L213 균주와

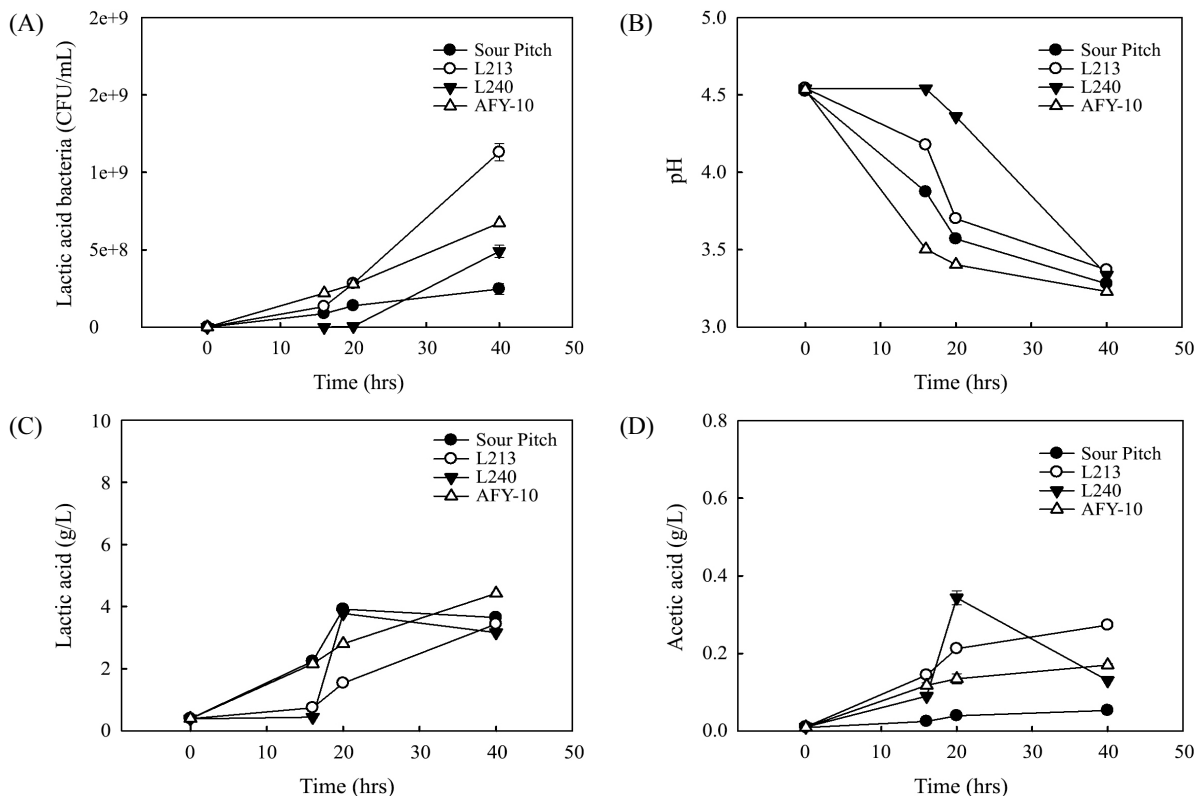


Fig. 2. Change of LAB (A), pH (B), lactic acid (C), and acetic acid (D) with different LAB strains during souring.

L240 균주는 AFY-10, Sour Pitch 두 균주에 비하여 pH와 유사하게 유산 생성 속도도 느렸다. 사워링이 끝난 40시간에 유산 농도는 모두 3.0 g/L 이상이었으며, AFY-10 (4.43) > Sour pitch (3.65) > L213 (3.44) > L240 (3.17)로 나타났다. 초산 농도는 4개 균주로 제조한 사워 맥주 모두 0.3 g/L 보다 낮았으며, 40시간 측정 결과는 L213 (0.27) > AFY-10 (0.17) > L240 (0.13) > Sour Pitch (0.05) 순으로 확인되었다. AFY-10 균주는 Sour Pitch와 동일 종이지만 초산 농도가 3배 이상 높았다.

사워 맥주 발효 특성

유산균 종류를 달리한 사워 맥주의 사워링 및 알코올 발효 직후의 유리당을 측정하여 Table 2에 나타내었다. Glucose, fructose, maltose, maltotriose 4종에 대한 유리당을 비교한 결과, 균주마다 농도가 유의적으로 다른 것이 확인되었다. 특히 L240 균주로 제조한 사워 맥주에서 fructose, maltose, maltotriose가 모두 유의적으로 가장 낮게 나타나 알코올 발효 단계에서 효모의 발효도가 가장 높을 것으로 예상되었다. Sour Pitch와 AFY-10 균주로 제조한 사워 맥주는 두 균주가 동일 종에도 불구하고 glucose, fructose, maltose의 농도가 유의적으로 차이가 낮으며, maltotriose만이 유의적인 차이가 없었다. 모든 사워 맥주는 알코올 발효 후에 glucose와 fructose가 모두 소모되었고, 남아있는 maltose의 농도는 0.20~0.27 g/L로 유의적인 차이가 없었다. Maltotriose 농도는 사용한 균주마다 상이한

것으로 나타났는데, L213와 AFY-10 균주로 제조한 사워 맥주에는 1.5 g/L 이상이 남아있었고, Sour Pitch로 제조한 사워 맥주가 0.49 g/L로 가장 낮은 농도를 나타내었다. 이는 사워링 후의 맥아즙의 환경이 유산균에 의해 달라지게 되며, 이후 효모에 의한 알코올 발효에 영향을 주는 것으로 판단된다. 김치에서 분리한 유산균 3종과 시판 유산균으로 제조한 사워 맥주의 발효 특성을 Table 3에 나타내었다. 먼저 알코올 도수는 시판 균주 Sour Pitch로 제조한 사워 맥주가 4.24%로 가장 높았고, L213과 L240으로 제조한 사워 맥주는 각각 4.11%, 4.10%로 유의적 차이가 없었으며, AFY-10으로 제조한 사워 맥주의 알코올 도수가 3.86%로 가장 낮았다. Sour Pitch와 AFY-10 균주는 동일 균주임에도 불구하고 알코올 도수는 AFY-10 균주로 제조한 사워 맥주가 더 낮았다. AFY-10 균주와 Sour Pitch 균주의 사워링 직후 최종 유산 농도가 각각 4.42 g/L (0.44%)와 3.65 g/L (0.37%)로 유산 농도의 차이가 낮는데, 이 결과가 알코올 발효 단계에서 *S. cerevisiae* US-05 효모의 생육에 영향을 미친 것으로 사료된다. Narendranath 등(2001)의 연구에 따르면 0.2~0.8% (w/v)의 유산 농도에서 유산 농도의 증가는 효모에 스트레스를 주어 효모의 생육 속도와 포도당 소모, 에탄올 생성을 감소시켰다고 보고하였다. 유산 농도 0.2%, 0.4%에서 *S. cerevisiae*의 건조 무게가 각각 1.44 mg/ml, 0.66 mg/ml였다고 보고한 것과 비교하여 유산 농도가 0.37~0.44%에 해당하는 AFY-10과 Sour Pitch 두 균주의 사워링 이후 유산 농도의

Table 2. Free sugar concentration in souring and alcohol fermentation with different kimchi LAB strains

Condition	Strain	Free sugar (g/L)			
		Glucose	Fructose	Maltose	Maltotriose
Souring	Sour pitch	5.57 ± 0.02 ^d	5.55 ± 0.01 ^d	50.12 ± 0.05 ^d	10.93 ± 0.03 ^c
	L213	4.46 ± 0.02 ^a	5.27 ± 0.02 ^c	51.61 ± 0.53 ^c	11.12 ± 0.31 ^c
	L240	4.75 ± 0.00 ^b	5.14 ± 0.03 ^a	43.46 ± 0.38 ^c	8.51 ± 0.23 ^d
	AFY-10	5.39 ± 0.02 ^c	5.21 ± 0.01 ^b	41.09 ± 1.12 ^b	11.14 ± 0.11 ^c
Alcohol fermentation	Sour pitch	N.D.	N.D.	0.27 ± 0.00 ^a	0.49 ± 0.01 ^a
	L213	N.D.	N.D.	0.20 ± 0.00 ^a	1.78 ± 0.01 ^c
	L240	N.D.	N.D.	0.26 ± 0.00 ^a	1.42 ± 0.02 ^b
	AFY-10	N.D.	N.D.	0.25 ± 0.00 ^a	1.97 ± 0.01 ^c

Table 3. Sour beer quality with different kimchi LAB strains

Analysis	Sour pitch	L213	L240	AFY-10
ABV (%)	4.24 ± 0.01 ^c	4.11 ± 0.01 ^b	4.10 ± 0.00 ^b	3.86 ± 0.01 ^a
pH	3.27 ± 0.01 ^c	3.27 ± 0.00 ^c	3.24 ± 0.02 ^b	3.17 ± 0.00 ^a
Attenuation (%)	80.73 ± 0.20 ^b	78.36 ± 0.10 ^a	82.54 ± 0.22 ^c	79.89 ± 1.96 ^a
Foam stability	22.30 ± 6.78 ^b	30.01 ± 5.40 ^b	12.62 ± 0.91 ^a	48.58 ± 1.24 ^c
Diacetyl (mg/L)	0.63 ± 0.00 ^b	0.72 ± 0.01 ^d	0.65 ± 0.01 ^c	0.50 ± 0.00 ^a

차이는 효모의 에탄올 생성에 영향을 미쳐 알코올 도수가 차이가 나는 것으로 판단된다. AFY-10 균주로 제조한 사워 맥주의 알코올 도수가 다소 낮았지만, 사워 맥주의 알코올 도수는 일반적으로 3~5%이므로 사워 맥주를 제조하는 데에는 적합한 것으로 사료된다. pH는 AFY-10으로 제조한 사워 맥주가 3.17로 유의적으로 가장 낮았으며 이는 Fig. 2 결과에서 AFY-10 균주로 사워링 했을 때, pH가 가장 낮고 유산의 농도가 가장 높았던 결과와 관련이 있을 것으로 판단된다. 발효도(attenuation)는 맥아즙의 당분이 얼마나 소모되었는지 나타내는 지표로 L240 균주로 제조한 사워 맥주가 82.5%로 유의적으로 가장 높았으며, L213 균주와 AFY-10으로 제조한 사워 맥주는 각각 78.4%, 79.9%로 낮았다. 앞서 사워링(souring) 직후 측정된 맥아즙의 유산 및 초산 농도 결과에서 다른 균주들과 비교했을 때, L213 균주는 높은 초산을 생성하였고, AFY-10 균주는 높은 유산을 생성하였다. 이러한 높은 유기산의 농도는 사워링 후, 알코올 발효 단계에서 효모 발효에 영향을 미친 것으로 사료된다. 거품 안정성은 소비자에게 시간적으로 중요하게 여겨지는 맥주 품질 지표 중 하나(Ono *et al.*, 1983)로 유산균을 달린 사워 맥주에서 거품 안정성은 AFY-10 (48.58) > L213 (30.01) > Sour Pitch (22.30) > L240 (12.62) 순으로 나타났으며, AFY-10 균주로 만든 사워 맥주의 거품 안정성이 유의적으로 가장 높았고, L240 균주로 제조한 사워 맥주가 가장 낮았다. 디아세틸 농도는 L213 (0.72) > L240 (0.65) > Sour Pitch (0.63) > AFY-10 (0.50) 순으로 AFY-10 균주로 제조한 사워 맥주가 가장 낮은 것으로 나타났다. 디아세틸은 효모의 아미

노산의 일종인 발린(valine) 합성의 부산물로서 알코올 발효 동안 생성되며(Krogerus and Gibson, 2013), 버터나 버터스 카치 같은 향으로 맥주에서는 이취(off-flavor)로 알려졌다(Wainwright, 1973; Meilgaard, 1975; Vaughan *et al.*, 2005). 디아세틸은 맥주의 발효 후기와 숙성 단계에서 효모에 의해서 다시 자화되고 감소된다고 보고되었다(Brányik *et al.*, 2008). 유리아미노산질소(FAN)는 효모의 단백질 및 펩타이드 대사 과정 중 감소되며, 최종 맥주에 FAN 농도가 높을수록 쓴맛, 혼탁도, 거품 안정성 등에 영향을 미쳐 맥주 품질의 안전성을 감소시키므로 값이 줄어드는 것이 중요하다(Schildbach, 1978). FAN 농도를 사워링과 알코올 발효 단계로 각각 측정하여 Table 4에 나타내었다. 맥아즙의 FAN 농도는 172.43 mg/L로 나타났고, 사워링 이후, FAN 농도가 모든 사워 맥주에서 증가하였는데 AFY-10 (294.24) > Sour Pitch (283.16) > L213 (273.67) > L240 (204.07) 순이었다. L240 균주에 의한 FAN 농도가 유의적으로 가장 낮았으며, 나머지 3주의 유산균으로 제조한 사워 맥주에서 유의적 차이는 나타나지 않았다. 이는 사워링 단계에서 *Lb. amylovorus* FST2.11 균주가 분비한 protease에 의하여 FAN (Rathore *et al.*, 2012)의 농도가 증가한 결과와 일치하였다. 하지만 효모에 의한 알코올 발효 후, 사워 맥주에서 검출된 FAN 농도는 균주마다 다르게 나타났는데 이는 pH, 유산, 초산 농도 등의 사워링 이후의 환경이 효모 생육에 영향을 미친 것으로 판단된다.

위의 발효 특성 변수들 간의 상관 관계를 분석하여 Table 5에 나타내었다. 특히 사워링 단계에서 유산 발효에 의하여 생

Table 4. Free amino nitrogen concentration in souring and alcohol fermentation with different kimchi LAB strains

Condition	FAN (mg/L)			
	Sour pitch	L213	L240	AFY-10
Wort	172.43 ± 0.78 ^d			
Souring	283.16 ± 0.52 ^f	273.67 ± 0.52 ^f	204.07 ± 0.90 ^e	294.24 ± 1.48 ^f
Alcohol fermentation	109.15 ± 2.22 ^c	83.84 ± 0.39 ^b	49.04 ± 0.20 ^a	75.93 ± 1.22 ^{ab}

Table 5. Correlation of sour beer properties with different kimchi LAB strains

Correlation analysis	Lactic acid	pH	ABV	Attenuation	Diacetyl	Maltose	Maltotriose
Lactic acid	1	-0.771**	-0.721**	-0.704*	-0.844**	0.119	0.327
pH	-0.771**	1	0.918**	0.339	0.907**	-0.245	-0.572
ABV	-0.721**	0.918**	1	0.564	0.718**	0.132	-0.832**
Attenuation	-0.704*	0.339	0.564	1	0.254	0.591*	-0.561
Diacetyl	-0.844**	0.907**	0.718**	0.254	1	-0.524	-0.215
Maltose	0.119	-0.245	0.132	0.591*	-0.524	1	-0.590*
Maltotriose	0.327	-0.572	-0.832**	-0.561	-0.215	-0.590*	1

*, **, Significant at $p < 0.05$ or $p < 0.001$, respectively.

성된 유산이 맥주 품질 전반에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 유산의 농도가 증가할수록 pH ($r = -0.771$), 알코올 도수($r = -0.721$), 발효도($r = -0.704$), 디아세틸($r = -0.844$)은 음의 상관관계를 보였다($p < 0.05$). 유산의 농도가 증가하여 알코올 도수와 발효도가 감소한 점은 유산이 효모 생육 저해제로 작용한다는 결과와 일치하였다(Narendranath et al., 2001; Thomas et al., 2001). 본 연구에서 40시간 사워링을 통하여 pH 3.3 미만에서 알코올 발효시킨 점을 감안하여 사워링 시간을 보다 단축시켜 적절한 pH에서 알코올 발효를 진행한다면 더욱 만족스러운 맥주 품질을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

사워 맥주 향기 성분 분석 및 다변량 통계 분석

김치에서 분리한 유산균으로 제조한 사워 맥주의 사워링과 알코올 발효 시 주요 휘발성 향기 성분을 Table 6에 나타내었다. 의미 있는 향기 성분을 얻기 위하여 기여도(VIP) 값이 1.0 이 넘는 향기 성분만 추출하였다. 주요 향기 성분은 총 9종으로 ethyl decanoate, ethyl 9-decanoate, phenethyl acetate, ethyl laurate, phenethyl alcohol, octanoic acid, ethyl palmitate, ethyl 9-hexadecenoate, n-decanoic acid가 검출되었다. 특히 달콤하고, 꽃향이 나는 phenethyl alcohol은 VIP값이 5.07로 가장 높았다. Phenethyl alcohol은 알코올 발효 이후 크게 증가하였는데 이는 효모의 알코올 발효 중 생성되는 주요 향기 성분 중 하나로 보고되었다(Dysvik et al., 2019). 사워링과 알코올 발효 이후 향기 성분의 증감 변화를 비교하기 위하여 향기 성분 결과를 열지도로 나타내었다(Fig. 3). Phenethyl acetate를 비롯한 6개의 에스테르는 알코올 발효 이후 증가하였는데 사워링에 사용한 유산균 균주마다 상이하게 나타났다. Sour pitch와 AFY-10 균주는 L213 균주와 L240 균주와 비교하여 ethyl

decanoate와 ethyl 9-hexadecenoate의 생성이 낮은 것으로 나타났다는데 이는 *Lactiplantibacillus plantarum* 종의 특성으로 추정된다. Ethyl 9-decanoate와 ethyl laurate는 각각 Sour Pitch와 AFY-10 균주에서 낮게 생성되었는데 이는 균학적 특징으로 보인다. 유산균은 알데하이드, 알코올, 에스테르, 유기산, 케톤 등 다양한 향기 성분을 만들어내는 것으로 보고되어(Salmerón et al., 2015; Dongmo et al., 2016; Stefanovic et al., 2017), 추후 사워 맥주용 김치 유산균의 상업적 이용을 위해서 맥주 관능에 대하여 전문적으로 훈련된 패널을 대상으로 관능 평가를 실시해야 할 것으로 사료된다.

다변량 통계 분석법을 시도하여 PCA와 PLS-DA 분석 결과

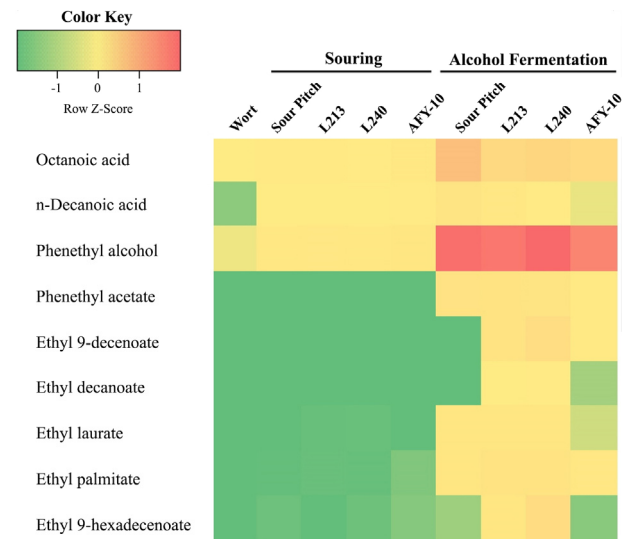


Fig. 3. Heat map of main volatile aroma compounds analyzed by HS-SPME-GC-TOF/MS.

Table 6. Volatile aroma compounds of sour beer with different kimchi LAB strains in souring and alcohol fermentation

Compound	RT ^a	VIP score ^b	Odor description ^c	Identification method ^d
Ethyl decanoate	07:20	3.93	Sweet, fruity, apple, grape	MS
Ethyl 9-decanoate	08:06	2.64	Fruity, fatty	MS
Phenethyl acetate	09:56	1.48	Floral, rose, sweet, fruity	MS
Ethyl laurate	10:17	1.11	Sweet, floral, creamy, dairy	MS
Phenethyl alcohol	11:17	5.07	Sweet, floral	MS
Octanoic acid	13:18	3.68	Fatty, cheesy, brandy	MS
Ethyl palmitate	15:12	1.40	Fruity, creamy, milky, balsamic	MS
Ethyl 9-hexadecenoate	15:34	2.36	-	MS
n-Decanoic acid	15:42	1.36	Sour, buttery	MS

^a RT, retention time (min:sec).

^b VIP, Variable importance in projection, VIP > 1.0.

^c Odor descriptions are based on The Good Scents Company Information System (<http://www.thegoodscentscompany.com>). "-" means not reported.

^d MS, compounds identified by MS spectra.

를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4A와 같이 주성분 1(PC 1)이 41.9%, 주성분 2(PC 2)가 15.8%로 전체 변동에 대하여 57.7%를 설명하였다. 주성분 1의 x축의 음의 방향에서는 알코올 발효한 사워 맥주가 x축의 양의 방향에서는 사워링한 사워 맥주가 높게 발현되었다. 앞서 열지도에서 알코올 발효 전후에 따라 향기 성분이 증가한 것과 연관이 있는 것으로 판단된다. 이는 향기 성분 함량에 기인하는 것으로 Fig. 3에서 보듯이 Sour Pitch는 알코올 발효 후, L213와 L240 균주와 일부 에스테르 성분의 함량 차이가 큰 것과 일치하였다. PCA는 독립 변수를 이용하여 새로운 주성분을 구한 뒤, 회귀식을 구하지만, PLS-DA는 독립 변수와 종속 변수를 동시에 고려하여 새로운 변수를 찾은 후, 이를 이용해 회귀식을 구하므로 PCA 보다는 PLS-DA 분석으로 더욱 개선된 결과를 획득할 수 있다고 보고되었다(Leem, 2016). PLS-DA 결과(Fig. 4B)를 보면 주성분 1(PC 1)은 66.8%, 주성분 2(PC 2)는 11.4%로 전체 변동에 대하여 78.2%를 설명하여 PCA 분석보다 더 높은 설명력을 보여주었다. PLS-DA의 주성분 1의 x축 양의 방향에서 발현되는

것은 모두 사워링 이후의 사워 맥주로 균주별 차이가 크지 않은 반면 x축 음의 방향에서 발현되는 알코올 발효 후 사워 맥주의 향기 성분은 균주별 차이가 사워링 전보다 상대적으로 더 큰 것이 확인되었다. 특히 김치 유산균 L213, L240, AFY-10 3주로 제조한 사워 맥주는 주성분 2의 y축 양의 방향에서 발현되는 것으로 나타나고, 외국 시판 유산균인 Sour Pitch로 제조한 사워 맥주는 y축 음의 방향에서 발현되어 김치 유산균으로 제조한 사워 맥주의 향기 성분이 Sour Pitch로 제조한 사워 맥주와 뚜렷하게 구별되는 것을 확인하였다. 이는 김치 유산균으로 사워 맥주 제조 시 기존 외국산 종균과는 구별되는 관능적 특징에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

적 요

유산균은 동시 다발적 발효를 거치는 람빅, 괴즈와 같은 전통 사워 맥주 스타일을 제조하기 위한 맥아즙의 산미 형성 목적으로 사용되어 왔다. 하지만 이 방법은 시간이 오래 소요되어 많은 양조사들은 유산균 스타터를 이용한 빠른 방법을 선호한다. 본 연구에서는 김치 유산균을 사워 맥주용 종균으로 사용하기 위하여 한국 김치에서 분리한 18주의 유산균에 대한 발효 특성을 평가하였다. 모든 균주는 산 생성능, 균체 외 다당류 생성, 디아세틸 생성, 홉 내성, β -글루코시다아제 효소 활성이 평가되었다. 그 결과 *Lactiplantibacillus pentosus* L213, *Limosilactobacillus fermentum* L240, *Lactiplantibacillus plantarum* AFY-10 3종의 균주는 산 생성능이 우수하고, 균체 외 다당류 및 디아세틸을 생성하지 않으며, β -글루코시다아제 효소 활성을 갖는 것으로 나타났다. 선발된 3종의 유산균과 시판 유산균 Sour Pitch를 이용하여 사워링을 한 후에 유산균 수, pH, 유산, 초산을 분석하였다. 또한 최종 4개의 사워 맥주의 유리당, 알코올 도수, pH, 발효도, 거품 안정성, 디아세틸, 유리아미노산질소를 비교하였다. 휘발성 향기 성분 분석의 다변량 통계 분석을 통하여 김치 유산균으로 제조한 사워 맥주가 Sour Pitch로 제조한 사워 맥주와 뚜렷하게 구별되는 것을 확인하였다. 본 연구를 통하여 김치 유산균이 사워 맥주 제조의 유망한 종균이 될 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 말

이 논문은 2020년도 농촌진흥청 지역특화작목기술개발사업(PJ013550) 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

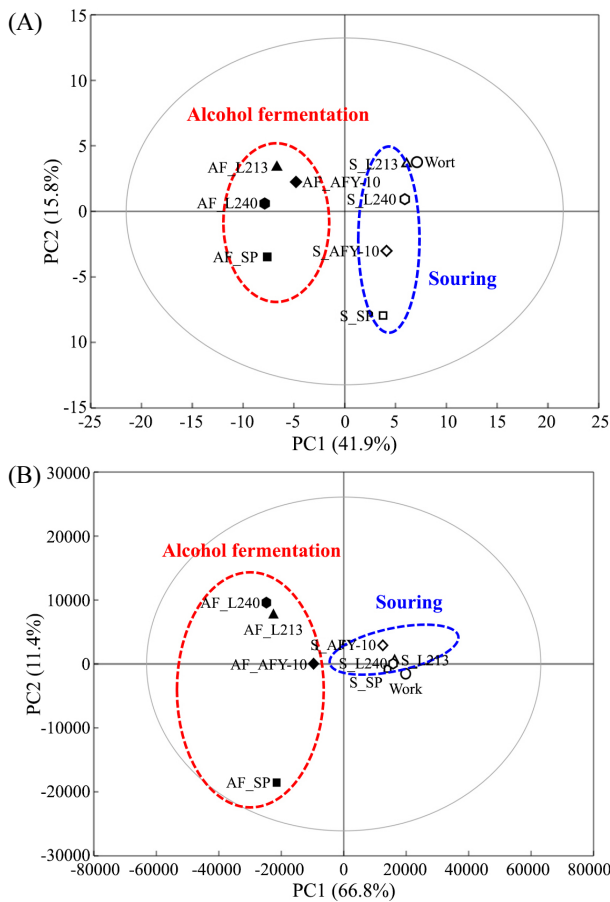


Fig. 4. PCA (A) and PLS-DA (B) of multivariate analysis of volatile aroma compounds in souring and alcohol fermentation.

References

- Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, and Sonomoto K.** 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* **31**, 877–902.
- Bamforth CW.** 1985. The foaming properties of beer. *J. Inst. Brew.* **91**, 370–383.
- Boio E, Lloret A, Medina K, Carrau F, and Dellacasa E.** 2002. Effect of β -glucosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tanta wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2344–2349.
- Bokulich NA, Bamforth CW, and Mills DA.** 2012. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS ONE* **7**, e35507.
- Brányik T, Vicente AA, Dostálek P, and Teixeira JA.** 2008. A review of flavour formation in continuous beer fermentations. *J. Inst. Brew.* **114**, 3–13.
- Chan MZA, Chua JY, Toh M, and Liu SQ.** 2019. Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during co-fermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. *Food Microbiol.* **82**, 541–550.
- Ciosek A, Rusiecka I, and Poreda A.** 2020. Sour beer production: impact of pitching sequence of yeast and lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* **126**, 53–58.
- D’Incecco N, Bartowsky E, Kassara S, Lante A, Spettoli P, and Henschke P.** 2004. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.* **21**, 257–265.
- Dongmo SN, Procopio S, Sacher B, and Becker T.** 2016. Flavor of lactic acid fermented malt based beverages: current status and perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* **54**, 37–51.
- Dysvik A, Liland KH, Myhrer KS, Westereng B, Rukke EO, De Rouck G, and Wicklund T.** 2019. Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production. *J. Inst. Brew.* **125**, 342–356.
- García-Villanova RJ and Estepa RMG.** 1993. Spectrophotometric determination of total vicinal diketones with isoniazide and a zirconium salt. *Fresenius J. Anal. Chem.* **347**, 276–279.
- Guerra-Hernández EJ, Estepa RG, and Rivas IR.** 1995. Analysis of diacetyl in yogurt by two new spectrophotometric and fluorimetric methods. *Food Chem.* **53**, 315–319.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98.
- Hughenoltz J.** 2013. Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 155–159.
- Jespersen L and Jakobsen M.** 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 139–155.
- Kroeger K and Gibson BR.** 2013. 125th anniversary review: diacetyl and its control during brewery fermentation. *J. Inst. Brew.* **119**, 86–97.
- Leem JY.** 2016. Discrimination model of cultivation area of alismatis rhizoma using a GC-MS based metabolomics approach. *Yakhak Hoeji* **60**, 29–35.
- Lewis M and Bamforth C.** 2007. Chapter 9, Modification. pp. 93–104. *In* Essays in brewing science. Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Lowé DP and Arendt EK.** 2004. The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *J. Inst. Brew.* **110**, 163–180.
- Lowé DP, Arendt EK, Soriano AM, and Ulmer HM.** 2005. The influence of lactic acid bacteria on the quality of malt. *J. Inst. Brew.* **111**, 42–50.
- Makanjuola DB, Tymon A, and Springham DG.** 1992. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 350–357.
- Matthews A, Grimaldi A, Walker M, Bartowsky E, Grbin P, and Jiranek V.** 2004. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5715–5731.
- Meilgaard MC.** 1975. Flavor chemistry of beer: Part II: flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *Tech. Quart. Master Brew. Assoc. Am.* **12**, 151–168.
- Narendranath NV, Thomas KC, and Ingledew WM.** 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 171–177.
- O’Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC, and Ndahetuye JB.** 2015. Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: types and mechanisms of action. pp. 117–129. *In* Taylor TM. (ed.), Handbook of Natural Antimicrobials for Food and Safety and Quality, Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, United Kingdom.
- Ono M, Hashimoto S, Kakudo Y, Nagami K, and Kumada J.** 1983. Foaming and beer flavor. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **41**, 19–23.
- Osborn K, Amaral J, Metcalf SR, Nickens DM, Rogers CM, Sausen C, Caputo R, Miller J, Li H, Tennessen JM, et al.** 2018. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiol.* **70**, 76–84.
- Peyer LC.** 2017. Doctor thesis. Lactic acid bacteria fermentation of wort as a tool to add functionality in malting, brewing and novel beverages. University College Cork, Cork, Ireland.
- Peyer LC, Zarnkow M, Jacob F, De Schutter DP, and Arendt EK.** 2017. Sour brewing: impact of *Lactobacillus amylovorus* FST2.11 on technological and quality attributes of acid beers. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **75**, 207–216.
- Pittet V, Morrow K, and Ziola B.** 2011. Ethanol tolerance of lactic acid bacteria, including relevance of the exopolysaccharide gene *Gtf*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **69**, 57–61.
- Rathore S, Salmerón I, and Pandiella SS.** 2012. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiol.* **30**, 239–244.

- Ruiz Rodríguez LG, Mohamed F, Bleckwedel J, Medina R, De Vuyst L, Hebert EM, and Mozzi F.** 2019. Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Front. Microbiol.* **10**, 1091.
- Saitou N and Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Sakamoto K and Konings WN.** 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* **89**, 105–124.
- Salmerón I, Loeza-Serrano S, Pérez-Vega S, and Pandiella SS.** 2015. Headspace gas chromatography (HS-GC) analysis of imperative flavor compounds in *Lactobacilli*-fermented barley and malt substrates. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 1363–1371.
- Schildbach R.** 1978. Studies of the nitrogen content and nitrogen composition of barley, malt and beer. *Brewers Dig.* **52**, 42–47, 53.
- Shim KS, Park GG, and Park YS.** 2014. Bioconversion of puffed red ginseng extract using β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Eng. Prog.* **18**, 332–340.
- Simpson WJ.** 1993. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Inst. Brew.* **99**, 405–411.
- Simpson WJ and Smith AR.** 1992. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *J. Appl. Microbiol.* **72**, 327–334.
- Spitaels F, Wieme AD, Janssens M, Aerts M, Van Landschoot A, De Vuyst L, and Vandamme P.** 2015. The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food Microbiol.* **49**, 23–32.
- Stefanovic E, Thierry A, Maillard MB, Bertuzzi A, Rea MC, Fitzgerald G, McAuliffe O, and Kilcawley KN.** 2017. Strains of the *Lactobacillus casei* group show diverse abilities for the production of flavor compounds in 2 model systems. *J. Dairy Sci.* **100**, 6918–6929.
- Suzuki K, Iijima K, Sakamoto K, Sami M, and Yamashita H.** 2006. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* **112**, 173–191.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, and Kumar S.** 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729.
- Teuber M and Schmalreck AF.** 1973. Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. *Arch. Microbiol.* **94**, 159–171.
- Thomas KC, Hynes SH, and Ingledew WM.** 2001. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 819–828.
- Tonsmeire M.** 2014. American sour beer: Innovative techniques for mixed fermentations, pp. 228–285. Brewers Publications, Boulder, Colorado, USA.
- Van Oevelen D, Spaepen M, Timmermans P, and Verachtert H.** 1977. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* **83**, 356–360.
- Van Oevelen D and Verachtert H.** 1979. Slime production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **37**, 34–37.
- Vaughan A, O'Sullivan T, and Sinderen D.** 2005. Enhancing the microbiological stability of malt and beer - a review. *J. Inst. Brew.* **111**, 355–371.
- Verachtert H and Derdelinckx G.** 2014. Belgian acidic beers: daily reminiscences of the past. *Cerevisia* **38**, 121–128.
- Wainwright T.** 1973. Diacetyl—a review: Part I—analytical and biochemical considerations: Part II—brewing experience. *J. Inst. Brew.* **79**, 451–470.
- Waters DM, Mauch A, Coffey A, Arendt EK, and Zannini E.** 2015. Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal-based beverages: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**, 503–520.