



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

*Corso di Laurea Magistrale in:*

**Biologia Molecolare e Applicata**

**Approcci biotecnologici per la valorizzazione di acque  
di lavaggio delle trebbie da produzione di birra  
artigianale**

**Biotechnological approaches for the valorization  
of water from brewers' spent grains washing  
from brewing process**

Tesi di Laurea Magistrale di:

**Giovanna Di Napoli**

Relatore:

**Dott.ssa Laura Canonico**

Correlatore:

**Prof. Maurizio Ciani**

Sessione Estiva  
Anno Accademico 2021/2022

*A mio padre e mia madre,  
A colui che brinda con un bicchiere di vino,  
a colei che mi ha mostrato cosa sia l'amore fraterno,  
per sempre  
nel mio cuore*

# INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	6
1.1. LE MATERIE PRIME	8
1.1.1. MALTO D’ORZO	8
1.1.2. ACQUA	10
1.1.3. LUPPOLO	11
1.1.4. LIEVITO	13
1.2. IL PROCESSO DI PRODUZIONE	15
1.2.1. LA MALTAZIONE	15
1.2.2. L’AMMOSTAMENTO	17
1.2.3. LA FERMENTAZIONE	21
1.2.4. IL DOWNSTREAM	22
1.3. LA BIRRA ARTIGIANALE	23
1.4. L’UTILIZZO DI LIEVITI NON- <i>SACCHAROMYCES</i> IN AMBITO BRASSICOLO	24
1.5. LE CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA	26
1.5.1. ALCOLI SUPERIORI	27
1.5.2. ESTERI	28
1.5.3. COMPOSTI SOLFORATI	29
1.5.4. ACIDI ORGANICI	31
1.5.5. COMPOSTI CARBONILICI	31
1.5.6. COMPOSTI FENOLICI	32
1.5.7. MONOTERPENI	33

1.6. I SOTTOPRODOTTI BRASSICOLI E LA LORO VALORIZZAZIONE	34
CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI	40
CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI	42
3.1. CEPPI DI LIEVITO	42
3.2. ACQUE DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE	43
3.3. ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI	44
3.4. RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA	45
3.5. ANALISI MICROBIOLOGICHE	45
3.5.1. MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI	45
3.6. ANALISI CHIMICHE	47
3.6.1. DETERMINAZIONE DEGLI AMINOACIDI PRONTAMENTE ASSIMILABILI	47
3.6.2. DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RESIDUI	48
3.6.3. DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI	50
3.6.4. DETERMINAZIONE DELL'ACIDO LATTICO	50
3.6.5. DETERMINAZIONE DELL'ETANOLO	52
3.6.6. DETERMINAZIONE DEGLI ALCOLI SUPERIORI	52
3.6.7. ANALISI SENSORIALE	54
CAPITOLO 4 – RISULTATI	55
4.1. VALUTAZIONE DELL'ATTITUDINE FERMENTATIVA	55
4.2. PROFILO ANALITICO DEI PRODOTTI FERMENTATI	59
4.3. PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI PRESENTI	66
4.4. ANALISI SENSORIALE	72
CAPITOLO 5 – DISCUSSIONI	74

CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI	78
BIBLIOGRAFIA	80
SITOGRAFIA	87

## CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

La birra è una bevanda fermentata consumata in tutto il mondo e definita dalla legislazione italiana, con il D.P.R. n° 272 del 30/06/1998, come il prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica condotta con ceppi di *Saccharomyces carlsbergensis* o *Saccharomyces cerevisiae* di un mosto preparato con malto di orzo o di frumento (o di loro miscele) ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi. Il malto di orzo può essere sostituito con altri cereali, nella misura massima del 40%. La fermentazione alcolica del mosto può essere integrata con una fermentazione lattica ed è consentito l'impiego di estratti di malto torrefatto e degli additivi alimentari consentiti dal Decreto del Ministro della Sanità n° 209 del 27/02/1996.

Le origini di questa bevanda sono molto antiche. Si stima infatti che la produzione di “birra” sia iniziata nel sesto millennio a.C. ad opera degli abitanti della Mesopotamia meridionale (l'odierno Iraq sud-orientale): qui, durante degli scavi archeologici, è stata ritrovata una tavoletta d'argilla risalente al 6000 a.C. e contenente una delle più antiche ricette di birra conosciute. Successivamente intorno al 3000 a.C. la produzione di birra cominciò a diffondersi nell'antico Egitto prima, in Grecia e nell'Impero Romano poi, benché qui venisse ritenuta una bevanda “da barbari” e “da incivili” (*Poelmans and Swinnes, 2011*). Nel quinto secolo d.C. le popolazioni germaniche presero il controllo di gran parte dell'Impero Romano d'Occidente, portando la fama della birra alla ribalta e diffondendo il consumo di quest'ultima in tutta l'Europa (*Meussdoerffer, 2009*). Durante il Medioevo la storia della birra andò incontro ad una svolta rilevante: i monaci tedeschi, i principali produttori all'epoca, iniziarono ad aggiungere dell'estratto di luppolo con il fine di preservare le loro bevande più a lungo. Inoltre, l'amaro del luppolo bilanciava in maniera ottimale la dolcezza

data dal malto, l'altro principale ingrediente della birra tedesca (*Poelmans and Swinnes, 2011*). Con il tempo la birra divenne sempre più popolare e ciò, oltre a decretare un declino della produzione prettamente monastica e l'aumento di birrifici commerciali, rese necessaria l'introduzione di leggi che ne regolassero la commercializzazione. La prima ad essere emanata fu l'Editto della Purezza ("*Reinheitsgebot*") con la quale si stabiliva l'obbligo di utilizzare soltanto tre ingredienti: l'acqua, il malto d'orzo e il luppolo (*Bottero et al., 2009*). Era assente, invece, ogni riferimento all'impiego del lievito, il quale fu identificato dal ricercatore olandese Anton Van Leeuwenhoek nel 1680 e di cui si capì la cinetica fermentativa tra il 1860 e il 1870 grazie ai lavori di Louis Pasteur (*Harrison MA, 2009*).

Il Novecento aprì anche per la birra l'era industriale e le grandi industrie produttrici presero il sopravvento prima negli Stati Uniti, poi in tutto il mondo, sulle piccole birrerie locali, benché negli ultimi anni questo tipo di attività stia riscontrando grande interesse da parte di un pubblico sempre più attento e desideroso di prodotti complessi, variegati, che possano soddisfare i diversi gusti della clientela.

Secondo un recente studio della Kirin Beer University nel 2019 il consumo globale di birra si aggirava approssimativamente a 189,05 milioni di kilolitri, con un aumento dello 0,5% rispetto all'anno precedente. In vetta alla classifica del consumo pro-capite si trova la Repubblica Ceca (188,6 L pro capite), Austria (107,8 L pro capite) e Romania (100,3 L pro capite). L'Italia non figura neanche tra i primi 50 Paesi al mondo ed è tra gli ultimi in Europa, anche se vi sono segnali incoraggianti, con un aumento di quasi 5 litri a testa nel giro di un lustro. Nel 2020, tuttavia, a causa della pandemia da SARS-CoV-2 è stato registrato, per la prima volta in 3 anni, un calo del 6,7% nel consumo globale rispetto all'anno precedente, consumo che si è attestato a circa 176,50 milioni di kilolitri.

## 1.1. LE MATERIE PRIME

Le materie prime essenziali per la produzione di birra sono quattro: il malto, l'acqua, il luppolo e il lievito.

### 1.1.1 MALTO D'ORZO

Per definizione la birra è una bevanda che si ottiene dalla fermentazione di zuccheri provenienti dagli amidi dei cereali. Il cereale più usato per la produzione di birra è l'orzo (*Hordeum vulgare, vulgare L.*).



*Figura 1. Hordeum vulgare*

L'idoneità dell'orzo nella produzione di birra è dovuta a diverse ragioni: la glumella resistente protegge i grani dai danneggiamenti che potrebbe subire e facilita il processo di filtrazione durante l'ammolamento, nel corso della germinazione produce una quantità di enzimi maggiore rispetto agli altri cereali, ed infine anche la composizione chimica dell'orzo è quella più ottimale, considerando le percentuali delle principali macromolecole. Il chicco d'orzo è costituito da circa il 65% -68% di amido, dal 10% al 17% di proteine, dal 4% al 9%

di  $\beta$ -glucani, dal 2% al 3% di lipidi liberi e dall'1,5% al 2,5% di minerali (*Gupta et al, 2010*). La fibra alimentare totale varia dall'11% al 34% e la fibra alimentare solubile dal 3% al 20% (*Fastnaught, 2001*). Inoltre, presenta piccole quantità di vitamine come la B1, B2, C ed E. Come si può notare il composto principale è l'amido, il quale è costituito da due polimeri, amilosio e amilopectina. L'amilosio è un polimero lineare formato da molecole di glucosio unite tramite legami glucosidici  $\alpha$ -(1-4). L'amilopectina invece è il polimero più grande caratterizzato da una struttura ramificata dovuta alla presenza di legami glucosidici  $\alpha$ -(1-4) e  $\alpha$ -(1-6). Il rapporto tra amilopectina e amilosio è di circa 3:1 (*Fox, 2009*).

Per quanto riguarda le proteine queste possono essere distinte in quattro tipologie: le glutenine (30%), le prolamine (37%), le globuline (15%) e le albumine (11%). La giusta quantità di tali polimeri è molto importante per la riuscita di una buona birra in quanto va ad influenzare la persistenza della schiuma e la torbidità. È da specificare, però, che solo un terzo di tutte le proteine presenti nell'orzo si ritrovano nel prodotto finito (*Cabras et al., 2004*).

Altri tipi di cereali possono contenere più amido, tuttavia la maggiore presenza di grassi o la scarsità di enzimi non li rendono adatti alla produzione di birra.

Anche all'interno della stessa specie di *Hordeum vulgare* la varietà che si è mostrata più adatta nell'utilizzo in ambito brassicolo è l'orzo distico: esso presenta sulla spiga solo due file di chicchi, che risultano essere molto grandi, uniformi, resistenti alle fitopatie dell'area di coltivazione e capaci di assorbire velocemente l'acqua. Un altro aspetto importante da tenere in considerazione è infine l'umidità del seme, il quale non deve surriscaldarsi eccessivamente quando verrà essiccato dopo la raccolta, poiché potrebbe diventare inadatto all'utilizzo.

L'orzo, tuttavia, non viene usato direttamente nella produzione della birra, ma subisce un processo - detto maltazione - da cui si ottiene il malto d'orzo. Come il cereale, anche il malto contiene ancora amido, non ancora disgregato in zuccheri semplici adatti a essere fermentati.

### **1.1.2. ACQUA**

L'acqua è l'ingrediente principale della birra (ne costituisce circa il 90-95% del totale) e benché possa sembrare irrilevante, in realtà determina in maniera significativa il processo di produzione e il gusto del prodotto ottenuto. Per quanto concerne il processo produttivo, l'acqua influenza in particolare la fase di ammostamento; la solubilità del carbonato, l'alcalinità e la durezza dell'acqua determinano il pH del mosto: sopra o sotto i valori ideali gli enzimi possono rallentare o interrompere la propria attività, impedendo le necessarie trasformazioni chimiche del malto. Wolfgang Kunze, in *Technology Brewing and Malting* (2004), afferma che l'intervallo di pH ottimale per le amilasi e la degradazione dell'amido corrisponde a 5,5-5,6 e che tra i vantaggi del ridurre il pH di mash vi sono la riduzione dei tempi e l'ottimizzazione del processo di ammostamento, una filtrazione più rapida, un migliore rendimento, una migliore stabilità del colore, una migliore fermentazione e una migliore schiuma. In "*pH in Brewing: An Overview*" (2001), Charles Bamforth osservò che il pH sembra avere una forte incidenza sull'estrazione degli enzimi dal malto, come dimostrato dal lavoro di Stenholm e Home (1999), che hanno mostrato come un abbassamento del pH di mash da 5,7 a 5,4 abbia aumentato l'estrazione delle destrinasi limite.

Per quanto riguarda gli ioni coinvolti maggiormente nell'influenzare l'ottenimento e il gusto del prodotto essi sono il calcio, il magnesio, il sodio, il cloruro e il solfato.

Il calcio protegge, stabilisce e promuove l'attività enzimatica durante l'ammestamento; aiuta la coagulazione proteica, la formazione di sedimento, la precipitazione di ossalati, il metabolismo e la flocculazione del lievito. È estremamente insapore ma a concentrazione elevate può conferire un sapore minerale. Il magnesio rappresenta una sostanza nutritiva per il lievito, ma il mosto d'orzo ne contiene di solito in concentrazioni più elevate del necessario. In piccole quantità non influenza il sapore della birra, mentre a livelli maggiori può conferire uno spiacevole gusto acido e amaro (*Hammond et al, 2007*). Il sodio in basse concentrazioni può addolcire il carattere del malto, quando è associato al cloruro conferisce un sapore salato a concentrazioni superiori a 150 ppm (*Hammond et al, 2007*). A concentrazioni minori invece migliora la sensazione in bocca e la pienezza nelle birre chiare. Il solfato può rendere il carattere del luppolo più forte o più secco; in quantità relativamente moderate (200-400 ppm) aumenta il tempo di persistenza dell'amaro e accentua l'aroma del luppolo. Il cloruro invece fornisce una qualità più rotonda, piena e dolce al carattere del malto e alla birra, benché concentrazioni maggiori di 300 ppm possono avere effetti negativi sulla chiarificazione, sul corpo e sulla stabilità colloidale della birra stessa. La velocità di fermentazione invece è interessata quando la concentrazione supera i 500 ppm. Infine, molto importante è il rapporto solfato- cloruro, il quale influenza l'equilibrio luppolato- maltato o secchezza- pienezza della birra. (*Palmer and Kaminski, 2013*).

### **1.1.3. LUPPOLO**

Diverse erbe e spezie sono state impiegate per aromatizzare la birra nel corso della sua lunga storia, in particolare per bilanciare la dolcezza della sua componente maltata. Da diversi

secoli, però, è prevalso in modo quasi assoluto l'impiego del luppolo (*Humulus lupulus L.*), appartenente alla famiglia delle Cannabinaceae. Il luppolo è una pianta dioica, che presenta quindi piante maschili e femminili: solo le infiorescenze di quest'ultime, però, sono utilizzate in quanto qui si sviluppano particelle resinose (luppoline) che contengono principi attivi utili alla produzione della birra.



*Figura 2. Humulus lupulus L.*

I motivi per cui viene utilizzato il luppolo, a discapito di altre erbe, sono diversi: innanzitutto aromatizza e amara la birra, bilanciando la dolcezza del malto e conferendole il suo tipico aroma, ha un'azione antisettica e antiossidante, favorisce la precipitazione delle proteine migliorando la limpidezza e la stabilità della birra e, infine, affina la stabilità della schiuma. Le sostanze del luppolo che hanno una rilevanza nella produzione della birra sono gli  $\alpha$ -acidi, i  $\beta$ -acidi e gli oli essenziali. Gli  $\alpha$ -acidi sono presenti in quantità diverse a seconda delle varietà, luogo di coltivazione e raccolto (da un minimo del 2% ad un massimo del 19%) e i principali sono il co-umulone, l'ad-umulone e l'umulone (*De Keukeleire, 2000*). Sono poco acidi di per sé e poco solubili in acqua ma, grazie alla reazione di isomerizzazione a cui vanno incontro con il calore, si convertono in iso- $\alpha$ -acidi, i quali, al contrario, sono

solubili e conferiscono il caratteristico gusto amaro. In virtù del fatto che la reazione è favorita da alte temperature, i luppoli da amaro vengono aggiunti al mosto prima della fase di bollitura. (Moir, 2000). La concentrazione zuccherina del mosto, invece, limita l'efficacia dell'isomerizzazione; per questo motivo, a parità di tempo di bollitura, di tipo e quantità di luppolo, il grado di amaro di un mosto molto concentrato sarà minore. I  $\beta$ -acidi (upulone, co-lupulone e ad-lupulone), invece, sono meno importanti per la produzione di birra poiché non isomerizzano durante la bollitura e il loro contributo all'amaro risulta essere poco significativo.

Gli oli essenziali rappresentano in peso una piccola percentuale (0,5-2%) del luppolo, ma hanno una considerevole importanza per le loro proprietà aromatiche. Essi sono il mircene, l'umulene, il linalolo, il linalilisonato, il geraniolo e i diterpeni e si possono suddividere in idrocarburi e idrocarburi ossidati. (Hieronymus, 2016). I primi sono presenti direttamente nel luppolo: sottoposti a calore si ossidano rapidamente dando origine ai secondi. Per questa ragione a differenza delle sostanze amaricanti, per l'estrazione di oli (e quindi di aromi) dal luppolo non è necessaria né una bollitura né una prolungata infusione ad alte temperature. Anzi, anche se inizialmente una temperatura più alta può favorirne l'estrazione, il prolungarsi della bollitura determina una progressiva volatilizzazione degli oli (a causa della loro elevata volatilità) con conseguente perdita dei relativi aromi.

#### **1.1.4. LIEVITO**

L'elemento più importante nella produzione di birra è il lievito, elemento attivo del processo, il quale mediante reazioni metaboliche converte gli zuccheri presenti nel mosto in etanolo,

anidride carbonica ed altri prodotti secondari. In particolare, i ceppi di lievito usati a livello brassicolo appartengono al genere *Saccharomyces* e sono il *S. cerevisiae* e il *Saccharomyces pastorianus*.

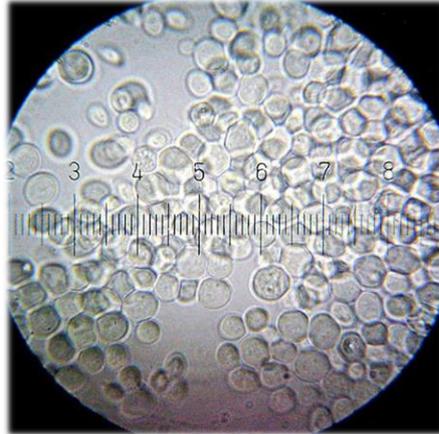


Figura 3. *Saccharomyces cerevisiae*

Il *S. cerevisiae* è conosciuto per la sua velocità di fermentazione, tollera moderati livelli di alcol etilico e sopravvive in condizioni anaerobiche di fermentazione. Lavora ad una temperatura ottimale di 20-30°C ma è capace di resistere anche a temperature che raggiungono i 40°C. È utilizzato per ottenere birre ad alta fermentazione chiamate Ale (18-22 °C) (Boulton and Quain, 2008). In generale producono una certa quantità di esteri, che conferiscono alla birra aromi fruttati, floreali o speziati.

Il *S. pastorianus* invece si distingue dal *S. cerevisiae* per la sua capacità di metabolizzare il melibiosio grazie ad una  $\alpha$ -galattosidasi (Tubb, 1986), per l'assimilazione del maltosio e del maltotriosio (Stewart, 2010) e per la temperatura ottimale a cui lavora, che per questa specie risulta essere inferiore ai 14°C. È impiegato per produrre birre a bassa fermentazione (dette Lager), in cui la maggior parte dei lieviti non si alza verso la parte superiore del fermentatore,

o lo fa a livelli minimi. Inoltre, producono una quantità limitata di esteri e la birra ha un gusto e un aroma più pulito, con il malto e il luppolo ben in evidenza.

## **1.2. IL PROCESSO DI PRODUZIONE**

### **1.2.1. LA MALTAZIONE**

L'orzo non viene usato direttamente tal quale nella produzione della birra, ma subisce un processo (detto maltazione) da cui si ottiene il malto d'orzo. Questa fase risulta essere fondamentale perché durante il suo svolgimento avviene: la sintesi di enzimi che serviranno successivamente, la disgregazione degli amidi stessi, che divengono più solubili e accessibili agli enzimi, la produzione di sostanze nutritive che favoriranno la fermentazione, la tostatura più o meno accentuata dei grani, dalla quale deriveranno il colore e gli aromi della birra e la rimozione di alcune sostanze che potrebbero determinare un sapore poco gradevole.



*Figura 4. Malto d'orzo*

Il processo di maltazione comprende tre fasi principali: la bagnatura dei semi, la germinazione, l'essiccazione e tostatura. Come prima cosa i grani vengono immersi in acqua per alcuni giorni, sia per lavarli, sia, soprattutto, per aumentarne il grado di umidità, che viene portato dal 14-15% a circa il 45%. Ciò favorirà la fase successiva, ovvero la germinazione: grazie all'azione degli ormoni della crescita, le gibbellerine, si ha lo sviluppo embrionale di un "germoglio", che, nutrendosi delle sostanze dell'endosperma (le sostanze amidacee), determina la disgregazione di quest'ultimo e la formazione di enzimi amilasici, endoglucanasici e proteolitici. In base alla temperatura di germinazione si distingue un malto chiaro (15-18 °C), il quale avrà un basso contenuto proteico e un malto scuro ottenuto, invece, grazie ad una germinazione svolta per più tempo a 23-25°C e che sarà caratterizzato da una maggiore concentrazione proteica. Dopo circa una settimana il processo viene interrotto per evitare che l'acrospira, continuando a svilupparsi, formi il fusto principale della pianta dell'orzo (*Herbert, 2013*). Si passa dunque alla fase di essiccazione e tostatura che, oltre ad interrompere al punto giusto la germinazione, serve anche a ridurre l'umidità del malto verde, in modo da aumentarne la conservabilità, fornire al malto l'aroma e il colore desiderati e facilitare l'eliminazione delle radichette. Nella prima fase dell'essiccazione viene mantenuta una temperatura di 50-60° C, l'umidità è ridotta a circa 10-12%, e le radichette sono eliminate meccanicamente. A questo punto la temperatura è aumentata, fino a 80-85° C: si avrà così, per effetto del calore un'ulteriore riduzione di umidità fino al 4% ma anche la formazione di sostanze aromatiche e coloranti (*Herbert, 2013*).

### 1.2.2. L'AMMOSTAMENTO

L'ammestamento rappresenta la fase cruciale della produzione della birra poiché influenza il tipo e la qualità del risultato finale. Il suo obiettivo è quello di produrre un mosto contenente quantità adeguate di zuccheri fermentabili e nutrienti per il lievito. Tutto ciò avviene grazie all'idrolisi enzimatica delle macromolecole presenti nei grani (amido e proteine) in molecole più semplici (zuccheri e peptidi o aminoacidi) (*Stewart, 2013*). I fattori principali che regolano tali attività enzimatiche, e che, di conseguenza, determinano la composizione del mosto finale sono il pH, la concentrazione del mosto e le soste a temperature specifiche che vengono effettuate. Il mosto è riscaldato infatti fino a temperature ottimali, le quali, per garantire la termostabilità degli enzimi, devono essere bilanciate tra la temperatura necessaria per attivarli e quella che invece è capace di disattivarli (*Montanari et al, 2005, Evans et al, 2003*).

Per poter effettuare l'ammestamento è necessario prima macinare il malto, in modo da aumentare la superficie di contatto con l'acqua e favorire le reazioni enzimatiche. Il malto è poi unito ad acque tiepida per permettere l'azione degli enzimi e il rilascio delle sostanze. Il bilanciamento acqua/cereale dell'ammestamento ha un rapporto ideale e viene solitamente fissato nella finestra dei 2-4 litri d'acqua per kg di macinato: una miscela troppo densa o troppo liquida non consentirebbe infatti l'attività ottimale degli enzimi. La miscela che si ottiene è quindi riscaldata, effettuando una prima sosta a 45-55 °C per circa 20 minuti. In questo modo sono attivate le proteasi, che scindono le proteine in polipeptidi, convertiti successivamente in peptidi e aminoacidi liberi grazie all'azione delle peptidasi attive nello stesso range di temperatura. Il risultato di tali reazioni enzimatiche sarà l'aumento di forme azotate facilmente assimilabili dai lieviti e una riduzione delle proteine, le quali, se in

eccesso, possono causare problemi di torbidità nella birra finita. D'altro canto, però un'azione protratta di tali enzimi sui malti può portare a birre acquose e con una schiuma poco persistente, essendo le proteine fondamentali anche per la tenuta di questa. La seconda sosta è effettuata ad una temperatura di 58- 63°C per circa 20-40 minuti: sono così attivate le  $\beta$ -amilasi, le quali degradano gli amidi in maltosio, uno zucchero altamente fermentabile dal lievito. Una loro più intensa azione porta a mosti maggiormente fermentabili e quindi a birre più alcoliche, secche e con minor corpo (*Montanari et al, 2005*). Un'ultima sosta è effettuata a 68-73 °C, così da attivare le  $\alpha$ -amilasi, le quali agiscono sui legami  $\alpha$ -1,4 - D-glucosidici, degradando l'amido in maniera random e producendo soprattutto zuccheri non fermentescibili come le destrine, non utilizzate da *S. cerevisiae* ma responsabili dell'aumento del corpo della birra.

Possono essere effettuate anche delle soste aggiuntive: una a 30-52°C per 20-40 minuti così da attivare le fitasi, enzimi che rompono la fitina (sale insolubile formato da fosfati del malto legati all'acido fitico) in fosfato di calcio o di magnesio ed acido citrico, abbassando così il livello di pH dell'impasto; l'altra a 37-46°C per 15-20 minuti per attivare invece le  $\beta$ -glucanasi, che degradano i  $\beta$ -glucani, polisaccaridi delle pareti cellulari del malto che possono causare intorbidamenti e problemi durante la filtrazione (*Jin et al, 2004*). Quest'ultima fase è però solitamente evitata, visto che tali enzimi vengono attivati anche nella fase di maltazione.

Mediamente il mosto risultante contiene circa il 90-92% di carboidrati (principalmente zuccheri fermentabili e destrine) e circa il 6-7% di altri composti responsabili del colore, degli aromi e della tenuta della schiuma (*Briggs et al, 2004*). Il prodotto principale è il maltosio (circa il 42% del totale degli zuccheri finali del mosto), un disaccaride costituito da

una coppia di molecole di glucosio, seguito da maltotriosio (15%, formato da tre molecole di glucosio). Altre tipologie di zucchero ottenute dall'ammestamento sono glucosio e fruttosio (9%), maltotetraosio (6%, formato da 4 molecole di glucosio), saccarosio (5%, costituito da una molecola di glucosio unita a una di fruttosio). Tutti gli zuccheri citati sono processabili dal lievito, alcuni immediatamente, altri (maltotriosio e maltotetraosio) più lentamente o solo da alcune specie. La percentuale rimanente degli zuccheri del mosto è costituita da destrine, ossia da complessi di glucosio non attaccabili.

Per quanto concerne la realizzazione pratica dell'ammestamento questa può essere svolta in due diversi modi: o tramite infusione, per cui la miscela acqua/cereale è portata progressivamente a determinate temperature mediante riscaldamento diretto; o tramite decozione, che consiste nel portare a ebollizione solo una parte dell'impasto, che verrà successivamente aggiunta alla miscela principale, consentendo l'aumento di temperatura voluto.

A questo punto il mosto deve essere separato dalla parte solida (le trebbie esauste) tramite la filtrazione. Dapprima viene fatto defluire il primo mosto (contenuto in estratto 16-20%), poi le trebbie esauste sono lavate più volte con acqua calda per estrarre quanti più nutrienti possibili e recuperare nuovo mosto. Durante questa fase è molto importante la temperatura, poiché un suo aumento diminuisce la viscosità e il filtraggio è velocizzato. Tuttavia, temperature superiori a 80°C sono sfavorevoli, in quanto le  $\alpha$ -amilasi sono distrutte e l'amido non dissolto non può essere scisso (*Wunderlich et al., 2009*).

Dopo la filtrazione il mosto è portato ad ebollizione per diversi motivi: per inattivare gli enzimi che hanno agito durante l'ammestamento, concentrare il mosto stesso grazie all'evaporazione, sterilizzarlo, far precipitare coaguli di proteine (la cui rimozione influisce

sulla trasparenza e stabilità della birra), eliminare alcuni composti volatili che potrebbero dare caratteristiche spiacevoli al gusto e all'aroma, caramellizzare in maniera più o meno accentuata il mosto così da influenzare la sua colorazione, estrarre sostanze aromatiche e amare dal luppolo eventualmente aggiunto in questa fase.

Il luppolo infatti può essere addizionato in momenti diversi a seconda delle caratteristiche organolettiche che vogliono essere ottenute: all'inizio della bollitura per consentire l'estrazione degli  $\alpha$ -acidi nel caso in cui si desidera produrre una birra amara o alla fine se si vogliono estrarre solo i composti aromatici (*Wunderlich et al., 2009*).

I residui di luppolo e le sostanze precipitate durante la bollitura (*hot trub*) possono causare molti problemi sia al metabolismo dei lieviti che durante la chiarificazione e la filtrazione. Per questo motivo sono eliminate grazie ad una centrifuga (*whirlpool*), al cui centro si formerà un cono di residui proteici e di luppolo. Si procede quindi con il travaso del mosto caldo nel sistema a controcorrente per raffreddarlo velocemente. I motivi per cui è auspicabile che il raffreddamento avvenga rapidamente sono vari: il mosto a temperatura di ebollizione è sterile, ma a temperature inferiori (tra i 50 – 70 °C) può essere suscettibile di infezioni; nel mosto caldo, ma non più bollente, si continua a formare del solfuro dimetile e un raffreddamento veloce favorisce la formazione e il deposito del *cold trub*, derivante dalla degradazione di proteine e polifenoli. In genere però solo gli *hot trub* sono eliminati, poiché l'allontanamento dei *cold trub* causa un'attenuazione delle caratteristiche organolettiche della birra. Infine, la temperatura viene fatta scendere fino a 10-20°C, in base alla birra desiderata così da effettuare una bassa o alta fermentazione. (*Cabras et al., 2004; Manzoni, 2006*)

### 1.2.3. LA FERMENTAZIONE

Il mosto raffreddato e ossigenato è inoculato con il lievito per far avvenire la fermentazione: dopo una fase lag - durante la quale le cellule di lievito utilizzano le sostanze presenti nel mosto per preparare la parete cellulare – si verifica la respirazione aerobica che si protrae fino all'esaurimento dell'ossigeno, per passare poi alla fermentazione alcolica. In quest'ultima fase lo zucchero viene convertito in acido piruvico, il quale è successivamente ridotto ad acetaldeide, con il contemporaneo rilascio di CO<sub>2</sub>. Infine, grazie al consumo di NADH l'acetaldeide viene ridotta ad etanolo.

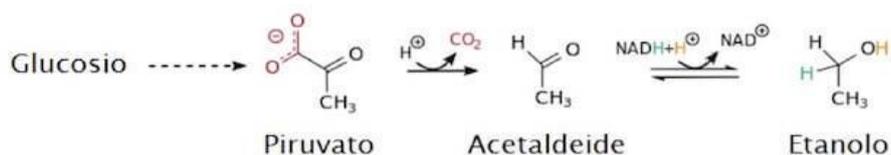


Figura 5 Fermentazione alcolica (<https://www.chimica-online.it/>)

Lo svolgimento della fermentazione dipende molto dalle caratteristiche della coltura starter (selezionata per la sua vitalità, la resistenza all'alcol e capacità di produrre composti secondari gradevoli), dall'inoculo, dall'apporto di nutrienti presenti nel mosto, dalla presenza di ossigeno e della temperatura a cui viene fatta avvenire (Lodolo, et al., 2008). Fondamentale è anche l'attività di monitoraggio da parte dei produttori, i quali sono tenuti a controllare non solo la temperatura ma anche l'umidità e il pH (da un valore a inizio fermentazione di 5,2-5,3 si arriverà ad un valore di 4,1- 4,2 a fine fermentazione).

Il processo di fermentazione è suddiviso a sua volta in due fasi, una fermentazione primaria e una secondaria. La fermentazione primaria dura circa 7 giorni ed è molto tumultuosa: quasi

tutti gli zuccheri infatti sono fermentati e si formano gran parte dei composti secondari, responsabili dell'aroma della birra. Quando viene raggiunto un certo grado di attenuazione, la maggior parte del lievito viene separato e allontanato dalla birra, che subisce una fermentazione secondaria di 3-5 settimane a temperature di 0-2°C, per la bassa fermentazione e 7-10°C per l'alta fermentazione, così da consentire una maturazione del prodotto (*Sols et al., 1971*) Durante la maturazione gli zuccheri residui sono fermentati, i composti volatili come aldeidi e composti solforati sono rimossi dalle bolle di CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-wash), il diacetile viene degradato, l'aroma e il gusto sono affinati e, grazie alla sedimentazione dei lieviti, la birra si chiarifica. (*Wunderlich et al., 2009*).

#### **1.2.4. IL DOWNSTREAM**

Una volta terminata la maturazione la birra può essere sottoposta a step facoltativi, ad esempio può essere corretta la concentrazione di CO<sub>2</sub> mediante addizione diretta, possono essere aggiunte delle proteasi che evitano la comparsa di torbidità, possono essere filtrate e pastorizzate per aumentarne la shelf-life di circa 2 mesi rispetto ad una birra non pastorizzata. Le pastorizzazioni attualmente utilizzate sono: la pastorizzazione a Flash, svolta a 71-75 °C per 15-30 secondi, e la pastorizzazione a freddo, condotta grazie ad agenti chimici o membrane filtranti. In questo caso la breve durata e le basse temperature permettono di pastorizzare il prodotto senza surriscaldarlo, evitando così di alterare il profilo aromatico ottenuto (*Harrison MA, 2009*).

### 1.3. LA BIRRA ARTIGIANALE

In Italia, nel 2016, la legge riguardante la regolazione igienica sulla produzione e commercio di birra (legge n° 1352) è stata integrata con la seguente definizione di birra artigianale: “la birra prodotta da birrifici piccoli e indipendenti e non soggetta a processi di pastorizzazione e microfiltrazione”. Nella stessa legge vi è anche la definizione di piccolo birrificio, il quale deve essere legalmente ed economicamente indipendente da altri birrifici, deve usare locali fisicamente separati da quelli di altri birrifici e la loro produzione annua non deve essere superiore a 200000 hL, includendo in tale quantità anche la birra prodotta per terze parti.

Le differenze tra una birra artigianale e una industriale sono notevoli: dal momento che la birra artigianale non viene sottoposta a pastorizzazione e microfiltrazione avrà una shelf-life minore, ma anche un profilo aromatico molto più complesso. Le birre artigianali sono poi sottoposte spesso ad un processo di rifermentazione in bottiglia, grazie all’aggiunta di zuccheri (5-9 g/L) e lievito ( $10^5$  - $10^6$  cellule/ml). In questo modo si verifica un aumento di etanolo e CO<sub>2</sub> e le aldeidi sono convertite in alcoli, modificando così l’aroma del prodotto. Questo può andare incontro a trasformazioni anche durante la fase di maturazione e di conservazione, poiché i lieviti presenti potrebbero autolisarsi, liberando aminoacidi, peptidi, nucleotidi, acidi grassi ed enzimi.

L’aumento dell’interesse dei consumatori per le birre artigianali ha dato vita a quella che è definita “*the craft beer revolution*”, osservata per la prima volta negli Stati Uniti d’America nel 1970. Il mercato di birre artigianali ha visto infatti un incremento costante negli ultimi anni, rispetto ai prodotti delle grandi aziende multinazionali. Ad esempio, nel periodo 2009–2019 il numero dei birrifici artigianali in Italia è più che triplicato, passando da 242 a 841 e la produzione ha raggiunto i 523.000 ettolitri nel 2019 (Massaglia et al, 2021). Il ritmo è

rallentato decisamente negli ultimi due anni mostrando un contraccolpo abbastanza fisiologico dovuto alla pandemia da SARS-CoV-2, ma il bilancio si è comunque mantenuto in positivo. Questa tendenza internazionale è influenzata da diversi fattori, come la crescita del reddito pro capite e la disponibilità di numerose alternative grazie alla produzione di birre di alta qualità (*Salanta et al., 2020*). La preferenza dei consumatori per la birra artigianale è dovuta al desiderio di vivere nuove esperienze di gusto e ad un atteggiamento contrario al consumo di birra tradizionale. (*Pokrivčák et al., 2019*). La loro assunzione si basa, in un approccio qualitativo, su un desiderio di distinzione ed è percepito come un'esperienza che offre piacere, godimento, senso di identità e sostegno alle piccole realtà commerciali locali (*Costa Jardim et al. 2018*). I consumatori preferiscono le birre artigianali poiché presentano una complessità di sapori (come note di malto d'orzo, aromi tostati, fruttati, di cereale, miele) che aumentano la percezione di un prodotto di qualità superiore. Inoltre, i produttori spesso enfatizzano il sapore tipico e caratteristico di queste bevande grazie all'aggiunta di frutta, erbe e spezie che possono trasformare una birra “normale” in una birra “speciale”.

#### **1.4. L'UTILIZZO DI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES IN AMBITO BRASSICOLO**

La produzione di birra si basa sul metabolismo dei lieviti e i ceppi delle specie utilizzate influenzano in modo significativo il sapore e l'aroma del prodotto finale. La specie per eccellenza che viene impiegata è il *S. cerevisiae*, starter eccellente, soprattutto in ambito

industriale in quanto avvia velocemente le fermentazioni, è capace di resistere all'etanolo, si replica in poco tempo ed è semplice da coltivare. Al giorno d'oggi però la ricerca è sempre più orientata verso lo studio di nuove specie di lievito da utilizzare in ambito brassicolo. Ciò è dovuto sia a motivi commerciali ma anche al desiderio di migliorare le proprietà del prodotto. Questa tendenza coinvolge sia specie *Saccharomyces*, come il *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces ludwigii*, ma anche specie non *Saccharomyces*, le quali possono rappresentare una risorsa soprattutto nella produzione di birre artigianali e a bassa gradazione alcolica.

I *Brettanomyces spp.* sono fondamentali per la produzione di birre lambic, in quanto producono aromi che normalmente i *Saccharomyces spp.* non sono in grado di apportare. Spesso i *Brettanomyces spp.* conferiscono aromi affumicati, erbacei, speziati e medicinali nelle bevande. (Gibson et al, 2017). D'altro canto, i *Brettanomyces* possono produrre la  $\beta$ -glucosidasi, un enzima responsabile dell'idrolisi dei glicosidi, che si trovano comunemente nel luppolo. Pertanto, questo potrebbe aumentare o modificare l'aroma del luppolo a causa dei numerosi monoterpeni rilasciati (Capece et al, 2018).

*Lachancea thermotolerans* è un lievito che può essere utilizzato con successo nella produzione di birre artigianali grazie alla sua capacità di fermentare fino al 4–9% v/v producendo elevate quantità di acido lattico dagli zuccheri e interessanti effetti sull'aroma della birra (Callejo et al., 2019) Le birre ottenute alla temperatura di fermentazione più bassa (14°C) sono associate a note sensoriali come fruttato, floreale, acido e chiodi di garofano (Domizio et al, 2016). Inoltre, la capacità di produrre quantità significative di acido lattico rende questo ceppo idoneo all'uso nella produzione di birre acide senza il coinvolgimento di batteri lattici.

Un altro lievito adatto alla produzione di birra a bassa gradazione è la *Torulaspora delbrueckii*, poiché mostra una parziale incapacità di utilizzare il maltosio. Questo ceppo ha l'ulteriore vantaggio di essere resistente ai vari fattori di stress incontrati durante la fermentazione e di produrre 2-fenilettilacetato, un estere floreale. Le birre ottenute con *T. delbrueckii* sono caratterizzate da un buon profilo aromatico e da una bassa gradazione alcolica (2,66% v/v) (Bellut et al, 2018; Canonico et al,2016). Anche il ceppo *Pichia kluyveri* può essere utilizzato per la produzione di birre poco alcoliche a causa della sua limitata capacità di fermentare il glucosio mentre cambia in modo significativo i composti del luppolo in composti aromatici positivi; produce, inoltre, molto meno diacetile rispetto al *S. cerevisiae*, la produzione di composti esteri desiderabili è elevata e porta a una minore presenza di acidi indesiderati come l'acido ottanoico e l'acido decanoico (Bellut et al, 2018). *Zygosaccharomyces rouxii* è il lievito più xerotollerante: questa elevata tolleranza osmotica potrebbe essere potenzialmente utilizzata nella produzione di birra ad alta gravità poiché alcuni ceppi hanno dimostrato di fermentare gli zuccheri del mosto. Questo ceppo di lievito è anche considerato adatto alla produzione di bevande fermentate a basso contenuto alcolico a causa della sua incapacità totale o parziale di fermentare il maltosio. Dopo un processo di fermentazione con *Z. rouxii*, gli esteri e gli alcoli superiori sono i principali composti aromatici attivi identificati nella birra (Capece et al, 2018; Bellut et al, 2018).

## **1.5. LE CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA**

Le caratteristiche organolettiche della birra dipendono non solo dal tipo di malto e di luppolo che vengono utilizzati ma anche dalla specie e dal ceppo di lievito inoculato: i lieviti infatti

possono produrre, attraverso vie metaboliche, più di 500 diversi composti che influenzano il sapore e l'aroma. I composti che hanno il maggior impatto sul gusto sono gli esteri, alcoli superiori, composti che contengono zolfo e composti carbonilici come aldeidi e chetoni. Nonostante giochino un ruolo fondamentale nel determinare il sapore e l'aroma del prodotto finale, viene considerato un difetto quando alcuni di questi raggiungono livelli elevati (*White and Zainasheff, 2010*).

### **1.5.1. ALCOLI SUPERIORI**

I principali alcoli superiori presenti nelle bevande alcoliche sono gli alcoli alifatici (propanolo, isobutanolo, alcol isoamilico, alcol amilico) e alcoli aromatici (2-feniletanolo, tirosolo, triptofolo). Sono prodotti dal lievito durante la fermentazione, attraverso vie cataboliche (percorso di Ehrlich) e anaboliche (il metabolismo degli aminoacidi). Nella via catabolica, dagli aminoacidi del mosto vengono prima prodotti, tramite la reazione di transaminazione, i 2-ossoacidi. Successivamente tali composti in eccesso vengono convertiti in aldeidi e quindi in alcoli dalle decarbossilasi e dall'alcool deidrogenasi, rispettivamente. Nella via anabolica o biosintetica invece, gli alcoli superiori sono sintetizzati dai 2-ossoacidi durante la sintesi degli aminoacidi dalla fonte di carboidrati (*Willaert and Nedovic, 2006*). Diverse tecniche di produzione e diversi ceppi di lievito portano a differenti livelli di alcoli superiori. La composizione in aminoacidi influisce molto sulla loro formazione: il mezzo di crescita integrato con valina, isoleucina e leucina induce rispettivamente la formazione di isobutanolo, alcol amilico e alcol isoamilico (*He et al, 2014; Ferreira and Guido, 2018*).

Gli alcoli superiori sono direttamente coinvolti nella formazione di aromi e nella qualità della birra (*Hammond et al, 2007*). Gli alifatici conferiscono infatti un aroma di solvente e alcolico e producono una sensazione di calore in bocca. L'alcol aromatico 2-feniletanolo

(valore soglia: 40 mg/L) ha un odore dolce e contribuisce positivamente al gusto della birra, in cui gli aromi di tirosolo e triptofolo non sono invece desiderati. (*Willaert and Nedovic, 2006*). Gli alcoli superiori infine non influenzano solo le caratteristiche organolettiche della birra ma sono anche responsabili della formazione di esteri, che costituiscono il principale gruppo di composti determinanti il sapore della suddetta bevanda.

### **1.5.2. ESTERI**

Gli esteri che hanno una maggiore influenza sul gusto sono l'acetato di etile (aroma di solvente con valore soglia 30 mg/L), l'acetato di isoamile (aroma di banana, valore soglia 1,6 mg / L), l'isobutil acetato (aroma fruttato e dolce, valore soglia 1,6 mg / L), esanoato di etile (aroma di mela dolce, valore soglia 0,005 mg/L), etile ottanoato (aroma di mela acida valore soglia 0,5 mg/L), etile decanoato (valore soglia 1,5 mg/L), e il feniletilacetato (aroma floreale, di rose e miele, valore soglia 3,8 mg / L). Tali composti sono formati nel citoplasma dei lieviti e, essendo liposolubili, sono riversati rapidamente attraverso la membrana cellulare nel substrato fermentato (*Ferreira and Guido, 2018*). La proporzione di esteri trasferiti nel substrato diminuisce con l'aumentare della lunghezza della catena dell'acido grasso. Inoltre, la loro distribuzione tra l'interno e l'esterno della cellula dipende dalle specie di lievito utilizzate, con una più alta proporzione di esteri formati che permangono nelle cellule di lieviti lager (*S. carlsbergensis*) e anche dalla temperatura, con gli esteri che sono trattenuti maggiormente a basse temperature (*Ferreira and Guido, 2018*). Gli esteri sono il prodotto di una condensazione enzimatica tra l'acetilCoA e un alcol superiore. Molti sono gli enzimi coinvolti nelle reazioni, i più caratterizzati dei quali sono l'alcol acetiltransferasi (AATasi) I e II. I fattori che determinano il tasso di formazione degli esteri sono due: la concentrazione dei due substrati (acetilCoA e gli alcoli) e l'attività totale degli enzimi

coinvolti. Parametri come la temperatura, l'aggiunta di acidi grassi, i livelli di azoto e ossigeno possono influenzare la sintesi degli esteri andando a cambiare i livelli di acetilCoA. L'ossigeno e le sostanze presenti nel mosto promuovono infatti la crescita dei lieviti e il loro uso dell'acetilCoA, lasciando una scarsa quantità disponibile per la produzione degli esteri. (Verstrepen *et al*, 2003) I livelli di acetilCoA sono determinati anche dai cambiamenti delle condizioni di fermentazione. Altri studi hanno evidenziato che la disponibilità degli altri substrati, gli alcoli superiori, può essere il principale fattore limitante per la sintesi degli esteri. Infine, è stato dimostrato che l'attività dell'AATasi segue uno schema molto simile a quello della produzione di esteri, con l'attività enzimatica che è repressa sia dall'ossigeno che dall'integrazione di acido linoleico nel mezzo (Verstrepen *et al*, 2003).

### **1.5.3. COMPOSTI SOLFORATI**

Vi sono molti composti solforati che contribuiscono al sapore della birra: i più importanti sono il solfito (pungente: soglia, 10 mg L<sup>-1</sup>), acido solfidrico (uovo marcio: soglia, 8 µg L<sup>-1</sup>) e dimetilsolfuro (cavolo cotto: soglia, 30 µg L<sup>-1</sup>) (Ferreira and Guido, 2018). Molti derivano direttamente dalle materie prime, malto e luppolo, ma alcuni sono prodotti attraverso il metabolismo del lievito. Infatti, i composti solforati sono essenziali per i lieviti per la formazione di amminoacidi come metionina e cisteina, proteine e coenzima A e sono prodotti dagli ioni solfato, solfito e solfuro che sono presenti nel mosto. Ad esempio, l'idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S) e l'anidride solforosa sono ottenuti dai lieviti durante la fermentazione. Il ceppo di lievito e le condizioni di fermentazione producono quantità diverse di composti solforati. Normalmente, la maggior parte dell'H<sub>2</sub>S formato durante la fermentazione viene eliminato dalla birra attraverso lo sviluppo di anidride carbonica. Tuttavia, un lievito di scarsa qualità può portare a fermentazioni meno vigorose e dunque ad

una birra contenente  $H_2S$  residuo (*Ferreira and Guido, 2018*). Ricerche recenti sulla formazione di  $H_2S$  hanno scoperto che esso viene prodotto in quantità maggiori se il lievito di birra viene coltivato in presenza di concentrazioni crescenti di cisteina. La metionina invece inibisce l'aumento di  $H_2S$  indotto dalla cisteina e livelli elevati di azoto riducono la sua produzione (*Duan et al., 2004*). Poiché la soglia sensoriale di  $H_2S$  è molto bassa, anche tracce di questo composto possono alterare le caratteristiche organolettiche della birra. Sebbene un gusto solfidrico sia una parte essenziale del sapore di alcune birre, nella maggior parte dei casi, l' $H_2S$  deve essere eliminato durante la maturazione della birra o, in alternativa, bisogna prevenire la sua presenza utilizzando lieviti di birra che producono ridotte quantità di acido solfidrico. L'altro importante composto nella birra responsabile degli aromi di zolfo è il dimetilsolfuro (DMS). A concentrazioni moderate (30–100 ppm) è considerato un componente essenziale delle birre lager. Tuttavia, ad alte concentrazioni, ha un sapore relativamente sgradevole e un aroma di mais dolce cotto. Le due vie principali che portano alla formazione del DMS nella birra sono in primo luogo la degradazione termica della S-metilmetionina (SMM) durante l'essiccazione in forno del malto e le fasi calde del processo di birrificazione (bollitura del mosto) e, in secondo luogo, la riduzione del dimetilsolfossido (DMSO) da parte dei lieviti durante la fermentazione. Il DMS è volatile e in parte viene perso durante l'ammostamento e l'ebollizione del mosto. Tuttavia, il DMSO è stabile al calore e persiste invariato durante queste fasi (*Briggs et al, 2004*). Ci sono prove che suggeriscono che la conversione enzimatica del DMSO in DMS da parte del lievito di birra sia importante e che, in alcune circostanze, potrebbe essere la principale fonte di DMS nella birra. Quando la concentrazione di DMSO nel mosto è elevata, anche il livello di DMS nella birra sarà elevato (*Ferreira and Guido, 2018*).

#### **1.5.4. ACIDI ORGANICI**

Altri composti che influenzano il sapore della birra e l'acidità totale finale sono gli acidi organici. I principali acidi organici volatili presenti sono l'acido acetico (valore soglia: 175 mg/L), valerico, butirrico, caprilico, caproico e laurico, i quali se presenti in alte concentrazioni apportano un sapore aspro e salato ma anche sapori sgradevoli di formaggio e di sudore. Per quanto concerne invece gli acidi non volatili prodotti dai lieviti e che influiscono sul sapore e sull'aroma, essi sono l'acido ossalico (ossidato, valore soglia: 500 mg/L), l'acido malico (mela, valore soglia: 700 mg/L), fumarico (acido, valore soglia: 400 mg/L), succinico (acido, valore soglia: 220 mg/L), lattico (acido, valore soglia: 400 mg/L), citrico (aspro, valore soglia: 400 mg/L) e piruvico (salato, da foraggio, valore soglia 300 mg/L). Tali composti sono sottoprodotti della glicolisi, del ciclo dell'acido citrico e del metabolismo degli aminoacidi e acidi grassi e la loro presenza dipende molto dal ceppo di lievito adoperato (*Michel et al, 2016*).

#### **1.5.5. COMPOSTI CARBONILICI**

I composti carbonilici, come l'acetaldeide, il diacetile e il 2-pentanedione, sono molecole non desiderate dai produttori di birra poiché influenzano negativamente le caratteristiche organolettiche del prodotto. L'acetaldeide è prodotta prevalentemente durante la fase di crescita del lievito come risultato del metabolismo degli zuccheri e la maggior parte di essa è convertita in etanolo. Ha un sapore di mela verde ed erbaceo sgradevole con un valore soglia di 10 mg/L; il diacetile (valore soglia: 0,1-0,15 mg/L) conferisce un sapore di burro ed è un sottoprodotto dell'anabolismo dell'amminoacido valina, formato dal glucosio. Il diacetile può essere riutilizzato dal lievito durante la maturazione e ridotto a 2,3 butandiolo,

che al contrario non ha un sapore indesiderato. Il 2,3 pentanedione infine è prodotto nella sintesi dell'amminoacido isoleucina nei mitocondri delle cellule di lievito, è noto per il suo sapore simile al toffee ed ha un valore soglia di 0,9 mg/L (Michel et al, 2016).

### 1.5.6. COMPOSTI FENOLICI

Nella birra è presente un'ampia gamma di composti fenolici, estratti dalle materie prime durante il processo di maltazione, ammostamento e produzione della birra.

Nel mosto e nella birra sono sempre presenti acidi idrocinnamici (HCA), estratti dai grani di malto e dal luppolo. Questi composti possono essere convertiti in derivati vinili grazie a diversi meccanismi, come la decarbossilazione termica durante l'ammostamento e la bollitura, e la decarbossilazione da parte di microrganismi che posseggono l'enzima decarbossilasi dell'acido fenolico (PAD). Gli intermedi vinili derivanti possono essere a loro volta ridotti dall'enzima vinilfenolo reductasi (VPR), così da generare composti etilici (Lentz,2018).

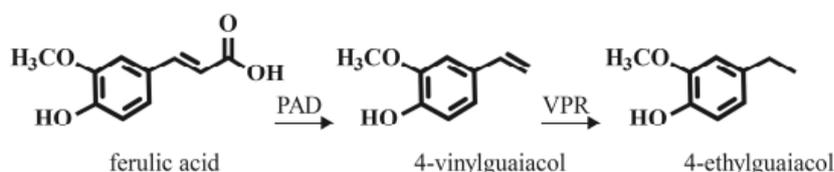


Figura 6: Conversione enzimatica dell'acido idrossicinnamico (acido ferulico) (Lentz, 2018)

Nel mosto e nella birra gli acidi idrocinnamici maggiormente presenti sono l'acido p-cumarico e l'acido ferulico, mentre i principali fenoli volatili ritrovati nel prodotto finito sono il 4-vinilguaiacolo e il 4-etilguaiacolo (derivati dall'acido ferulico) e il 4-vinilfenolo e il 4-etilfenolo (derivati dall'acido p-cumarico). I precursori HCA hanno soglie di aroma ben

al di sopra delle quantità che si trovano nella maggior parte delle birre: la soglia si assesta a 20–50 mg/L rispetto a 1–5 mg/L presenti nella birra (*Lentz, 2018*). I prodotti metabolici hanno invece soglie molto più basse, che vanno da 0,08 a 0,9 mg/L, valori facilmente ottenibili dai substrati disponibili. Nello specifico sono stati riportati i seguenti valori soglia: 4-etilfenolo, 0,9 mg/L (aroma fenolico, astringente); 4-etilguaiacolo, 0,13 mg/L (aroma fenolico, dolce); 4- vinilguaiacolo, 0,3 mg/L (aroma fenolico, amaro, garofano); e 4- vinilfenolo 0,2 mg/L (aroma fenolico, affumicato) (*Michael et al., 2016*). In molti stili di birra il carattere fenolico non è desiderato ed è considerato un difetto per cui al giorno d'oggi la maggior parte dei ceppi di lieviti usati in ambito brassicolo ha una mutazione naturale che impedisce loro di produrre il 4- vinilguaiacolo; la produzione di un carattere fenolico indica spesso che lieviti selvaggi hanno contaminato il prodotto. I composti fenolici includono anche polifenoli complessi che contribuiscono al corpo, alla torbidità della birra e alla stabilità nonché ritenzione di schiuma (*Callemien and Collin., 2009*).

### **1.5.7. MONOTERPENI**

I monoterpeni sono composti di origine vegetale che conferiscono un aroma floreale a bevande quali birra, vino e succhi di frutta. Nel caso dei monoterpeni presenti nella birra essi derivano dal luppolo e sono: il linalolo (5 µg/L, lavanda), l'α-terpineolo (2 mg/L, lilla), il β-citronellolo (8 µg/L, lime), il geraniolo (6 µg/L, rosa) e il nerolo (0,5mg/L, agrumi). Il lievito è capace di trasformare questi composti portando alla formazione di altri alcoli monoterpenici, i quali a fine fermentazione possono determinare una variazione del sapore del luppolo (*Michel et al., 2016*).

## 1.6. I SOTTOPRODOTTI BRASSICOLI E LA LORO VALORIZZAZIONE

Dal processo brassicolo si ottengono grandi quantità di sottoprodotti come trebbie, luppolo e lievito esausto, il cui smaltimento rappresenta un problema ambientale di importanza rilevante. Tuttavia, in virtù delle loro composizioni chimiche, tali sottoprodotti rappresentano delle risorse dal grande potenziale da utilizzare in vari processi biotecnologici, nei confronti dei quali la ricerca mostra un interesse sempre più crescente.

I grani esausti sono il residuo di fermentazione più abbondante, corrispondente a circa l'85% del totale generato. Si stima che per 10.000 hl di birra vengano prodotte circa 200 t di grani esausti umidi con un contenuto di acqua che va dal 70 all'80% (*Kunze, 1996*). Le trebbie esauste sono fondamentalmente composte dalle glumelle dei chicchi d'orzo, ma possono presentare dell'endosperma di amido residuo in funzione del regime di birrificazione utilizzato. Sono ricchi di cellulosa, emicellulosa (quasi il 50% (p/p) della composizione) e lignina e contengono anche un alto contenuto proteico. È stata rilevata la presenza di una grande quantità di zuccheri in questo materiale, di cui xilosio, glucosio e arabinosio sono i più abbondanti. La lignina contiene numerosi componenti fenolici, principalmente acidi come il ferulico, p-cumarico, siringico, vanillico e p-idrossibenzoico. I grani esausti contengono anche notevoli quantità di minerali presenti nelle ceneri (specialmente il silicio), così come cere, lipidi, gomme, amidi, resine, tannini, olii essenziali e vari altri costituenti citoplasmatici. I lipidi includono triacilgliceroli, diacilgliceroli, acidi grassi (acidi palmitico, oleico e linoleico), steroli, esteri di steroli e glicosidi sterolici, oltre a vari idrocarburi (compresi alcani e carotenoidi) (*Mussatto, 2009*). In questo substrato sono presenti anche

vitamine come: biotina, acido folico, niacina, acido pantotenico, riboflavina e timina. Tuttavia, la composizione chimica dei chicchi esausti dipende dalla varietà dell'orzo, dal tempo di raccolta e dalle condizioni di ammassamento (Huige, 2006).

Le trebbie, sia per le grandi quantità prodotte che per la loro composizione, rappresentano il sottoprodotto di maggiore interesse. Vengono utilizzate principalmente come mangime per animali, a causa del loro alto contenuto di proteine e fibre. Sono stati condotti anche diversi studi con l'obiettivo di utilizzare i grani esausti, molto umidi, come substrato per coltivazione di microrganismi, tra cui le specie di funghi *Pleurotus*, *Agrocybe*, *Lentinus*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, i quali possono utilizzare gli zuccheri fermentabili ancora presenti (Mussatto, 2009). I polisaccaridi possono essere idrolizzati così da ottenere glucosio, xilosio, arabinosio, mannosio, galattosio e gli acidi acetico e idrossicinnamici. Tali composti possono essere purificati e usati nell'industria alimentare tal quali o come substrati in processi fermentativi. Le trebbie possono anche essere impiegate come vettore per l'immobilizzazione cellulare e di enzimi, come tripsina e lipasi (Mussatto, 2009; Girelli et al, 2020).

A causa dell'alto contenuto proteico (circa il 20% della sostanza secca), i grani esausti sono una buona fonte di proteine vegetali da usare nell'industria alimentare e rappresentano una fonte di fibre a basso costo, che può fornire una serie di vantaggi se incorporata nella dieta umana, come ad esempio la prevenzione di alcune malattie, tra cui cancro, disturbi gastrointestinali, diabete e malattie coronariche (Gupta et al, 2010, Jackowski et al, 2020).

A causa del loro costo relativamente basso e dell'alto valore nutritivo, i grani esausti sono stati studiati per la produzione di fiocchi, pane integrale, biscotti e snack per aperitivi. Tuttavia, le trebbie sono troppo granulari per l'aggiunta diretta nel cibo e devono prima essere macinate in farina (Mussatto, 2009). La farina ad alto contenuto proteico preparata è

stata incorporata con successo in una serie di prodotti da forno, tra cui pane, muffin, biscotti, cereali misti, torte e cialde (Huige, 2006). Tuttavia, ci sono alcune limitazioni nell'uso della farina come additivo proteico o come parziale sostituto delle farine attualmente utilizzate, a causa del suo colore e sapore.

Le trebbie rappresentano un buon candidato per la produzione di acidi grassi volatili, i quali a loro volta sono impiegati in molti campi, come ad esempio nella produzione di bioenergia, nella rimozione di nutrienti da acque di scarto e nella produzione di bioplastiche. In particolare, le trebbie esauste vengono usate tal quali, senza subire pretrattamenti e ciò riduce la complessità e il costo del processo, combinando egregiamente produttività e valorizzazione di un sottoprodotto (Teixeira et al, 2020).

Diverse ricerche mostrano che le trebbie esauste sono un potenziale materiale per la produzione di carbone attivo, in quale è utilizzato come decolorante, per l'estrazione di solventi, per rimuovere impurità da diversi gas e per il trattamento di acque al fine di eliminare residui di metalli. In particolare, il contenuto di azoto relativamente alto nella massa secca (tra il 2-5%) ha un impatto positivo sulle proprietà di assorbimento del carbone attivo prodotto. Inoltre, è stato osservato che anche carbonio non attivo proveniente direttamente dai grani esausti può essere usato nei processi di assorbimento.

Le trebbie possono essere adoperate anche per la produzione di biometano, ad esempio effettuando un pretrattamento enzimatico per scomporre cellulosa, emicellulosa e proteine in piccoli monomeri. Tale idrolizzato è digerito poi anaerobicamente in metano, utilizzando o bioreattori in agitazione continua o bioreattori con letto di fango granulare espanso (Jackowski et al, 2020).

Se i grani esausti vengono sottoposti a carbonizzazione idrotermale o ad essiccamento possono diventare anche un combustibile solido: il contenuto di carbonio rende le trebbie

non significativamente diverse in termini di proprietà combustibili, rispetto alla biomassa lignocellulosica. Inoltre, il contenuto di ceneri varia tra 2 e 6%, valori simili a quelli di diversi tipi di biomassa agricola. Tali residui presentano molti nutrienti preziosi, come fosforo o potassio, per cui potrebbero essere utilizzati come fonte di nutrienti per le colture (*Alayu et al, 2020*). Infine, un'altra applicazione su cui si sta concentrando la ricerca è l'utilizzo dei grani esausti come materiale da costruzione, di riempimento e come materiale di rinforzo (*Jackowski et al, 2020*).

Il secondo sottoprodotto del processo brassicolo è rappresentato dalle cellule di lievito esauste: il loro elemento più abbondante è il carbonio, che rappresenta poco meno del 50% del peso secco. Altri importanti componenti elementari sono ossigeno (30–35%), azoto (5%), idrogeno (5%) e fosforo (1%). Per quanto riguarda invece la precisa composizione in macronutrienti essa varia in funzione delle condizioni fisiologiche e della fase del ciclo di crescita in cui si trovavano le cellule al momento del prelievo (*Briggs et al. 2004*). Sono anche ricche di vitamine, soprattutto niacina, mentre il contenuto di minerali si attesta a 5-10% del peso secco (*Huige 2006*). Grazie al suo elevato contenuto di proteine, vitamine e aminoacidi, il lievito esausto, dopo essere stato sottoposto ad essiccazione, può essere utilizzato come mangime per animali: è stato osservato come l'introduzione di lievito nella dieta bovina possa avere un effetto positivo, con un aumento del latte prodotto e un miglioramento della digestione (*Jaeger et al, 2020*). Il lievito essiccato trova applicazione anche nella produzione di integratori alimentari e di alimenti nutraceutici, grazie alle sue proprietà antiossidanti, dovute alla presenza di un alto livello di composti polifenolici; è anche una buona fonte di glutathione, un composto antiossidante, che, come la cisteina, può essere usato come agente riducente nella produzione di pasta per il pane (*Jaeger et al, 2020*).

Da esso, inoltre, possono essere estratti  $\beta$ -glucani, idrocolloidi di grande interesse farmacologico e alimentare, in quanto sono impiegati come agente addensante, stabilizzante ed emulsionante: alcuni ricercatori hanno studiato la possibilità di utilizzare tali  $\beta$ -glucani come protettori per lattobacilli probiotici durante la liofilizzazione, lo stoccaggio e il transito nel tratto gastrointestinale (*Romero and Gomez-Basauri 2003, Guedes et al, 2019*). Rompendo le cellule viene ottenuto poi l'estratto di lievito (un mix di aminoacidi, peptidi, nucleotidi ed altri composti solubili), adoperato sia nell'industria alimentare come insaporitore per zuppe, snack e salse ma anche in ambito microbiologico come fonte di nutrienti in terreni di coltura. (*Chae et al. 2001*). Oltre a fornire aromi, il lievito esausto si è dimostrato un potenziale materiale di partenza da impiegare come ingrediente nella formulazione di sostituti della carne e come agente incapsulante, ad esempio per un composto molto usato nell'industria alimentare quale l'acido ascorbico (*Jaeger et al, 2020; Marson et al, 2020*). Infine, ulteriori ricerche stanno investigando sul possibile utilizzo del lievito esausto come agente bioassorbente e come biocarburante (*Jaeger et al, 2020*).

Il luppolo esausto è un altro materiale di scarto: la sua fibra grezza è costituita da numerosi zuccheri, tra i quali il glucosio e lo xilosio sono i più abbondanti. Gli acidi carbossilici alifatici nel luppolo esausto includono invece acido ossalico, gluconico, treonico, lattico e acetico (*Fischer and Bipp 2005*). Una frazione dei componenti del luppolo finisce nel *trub*, soprattutto quando nel processo di produzione della birra vengono utilizzati pellet o estratti di luppolo. Gli *hot trub* sono costituiti da proteine (40-70%), sostanze amare (7,15%), altri composti organici, come i polifenoli, e sostanze minerali (20,30%); mentre i *cold trub* sono costituiti da proteine (50%), polifenoli (15-25%) e carboidrati ad alta massa molecolare (20–30%) (*Esslinger and Narziss 2005*). Nonostante la presenza di azoto, carbonio e proteine

non vi sono molte ricerche sul riutilizzo del luppolo esausto. Questo non può essere destinato tal quale all'alimentazione animale per le sostanze amaricanti presenti, che però possono essere degradate da lieviti selezionati come *Candida parapsilosis* (Huszcza and Bartmanska 2008). Se ottenuto separatamente dai grani esausti, un'alternativa per lo smaltimento del luppolo esausto è come pacciame o come fertilizzante, a causa dell'alto contenuto di azoto (Huige, 2006). Dal luppolo esausto si possono recuperare anche diversi composti di interesse industriale come aromi, resine e pectine. Esso è inoltre una ricca fonte di oli essenziali, che, isolati con distillazione a vapore, possono essere adoperati come insetticidi biologici (Mussatto, 2009; Karlovic et al, 2020). Alcune ricerche hanno evidenziato come gli estratti di luppolo esausto possono avere un effetto positivo sulla salute umana, in particolare hanno migliorato l'attività anticoagulante delle cellule endoteliali umane, riducendo così significativamente la reattività piastrinica. Infine, è stato riscontrato che l'aggiunta di *trub* al mosto aumenta la vitalità e la resa del lievito, grazie alla presenza di lipidi e zinco (Mussatto, 2009; Karlovic et al, 2020).

## CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni sta aumentando sempre più la sensibilità verso i problemi ambientali, con un generale interesse nel riutilizzare materiali di scarto e proporre tecnologie sostenibili. Anche nel mondo brassicolo, dunque, è nata una sfida: produrre meno sprechi di acqua e di energia e valorizzare i sottoprodotti che esso comporta, corrispondenti a circa 143,6 kg/m<sup>3</sup>.

Il principale sottoprodotto derivante dalla produzione di birra è rappresentato dalle trebbie, le quali sono, al giorno d'oggi, al centro di una grande attenzione da parte della ricerca, sia in virtù della loro quantità sia della loro composizione chimica, che include alti livelli di fibre, proteine e aminoacidi. Le trebbie, inoltre, sono caratterizzate da un elevato tasso di umidità (anche fino all'82%) e dalla presenza di zuccheri residui, che ne riducono drasticamente la conservabilità, determinando anche problemi di stoccaggio da parte dei birrifici. Tutto ciò riguarda soprattutto i birrifici artigianali ed è legato ad una diversa tipologia di produzione: mentre in un birrificio industriale, durante l'ammontamento, si tende ad estrarre più zuccheri residui possibili dalle trebbie, con il fine di ottimizzare i costi di produzione, nei birrifici artigianali ciò non avviene. Questo è dovuto al fatto che le birre artigianali non sono tutte uguali, bensì si differenziano in base allo stile che si desidera produrre. Di conseguenza, l'estrazione degli zuccheri residui dalle trebbie dovrà essere svolta tenendo in considerazione che la densità iniziale dei mosti non è sempre la stessa, ma ha un valore specifico a seconda dello stile brassicolo: per alcuni di questi non sarà possibile estrarre tutti gli zuccheri attraverso i lavaggi e le trebbie esauste ottenute presenteranno ancora un residuo zuccherino e di nutrienti. Considerato tutto questo, si è pensato di effettuare dei lavaggi di tali trebbie, ottenendo così un substrato con un basso contenuto di

zuccheri, da poter essere impiegato per la produzione di bevande a basso contenuto alcolico ma con un profilo sensoriale gradevole. I vantaggi di tale operazione sono molti: innanzitutto si avrebbe la valorizzazione di un sottoprodotto con un processo sostenibile a basso impatto ambientale ed energetico, le trebbie esauste presenterebbero meno zuccheri residui e sarebbero più facili da stoccare e il birraio otterrebbe, con pochi costi, un prodotto innovativo a bassa gradazione alcolica da introdurre sul mercato.

Per questo motivo, in questo studio è stata utilizzata come materia prima l'acqua di lavaggio delle trebbie, proveniente dall'ammestamento di un mosto Pils e amaricato con luppolo varietà Cascade, da impiegare (sia tal quale, sia addizionato con il 10% di mosto Verdicchio) come substrato di fermentazione di lieviti appartenenti a diverse specie non-*Saccharomyces*. Lo scopo di tale studio sperimentale è quello di valorizzare un sottoprodotto derivante da produzione di birra artigianale, ottenendo dei prodotti a bassa gradazione alcolica e con un profilo sensoriale complesso e particolare, valutando le loro prestazioni di fermentazione, il profilo analitico e volatile.

## CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

### 3.1. CEPPI DI LIEVITO

Per lo svolgimento di questa prova sono stati utilizzati ceppi di lievito non-*Saccharomyces* provenienti dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente (DiSVA) (tabella 1) e conservati alla temperatura di – 80°C in terreno contenente glicerolo (80%); lo starter commerciale *S. cerevisiae* US-05 (Fermentis, Lesaffre, Francia) è stato impiegato, invece, come ceppo di controllo nella fase di screening. I ceppi sono stati rinfrescati su terreno YPD agar (10 g/l di estratto di lievito, 20 g/l di peptone, 20g/l di glucosio e 18g/l agar) e conservati alla temperatura di 4°C.

Genere e specie	Codice	Provenienza
<i>W. anomalus</i>	3003	DBVPG
<i>P. kluyveri</i>	PRMB7 ½	Montepulciano bio a 7gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>T. delbrueckii</i>	33	Foglie papaya
<i>L. thermotolerans</i>	101	DBVPG 2700
<i>S. cerevisiae</i>	US-05	Safale fermentis

Tabella 1. Ceppi di lievito utilizzati nello studio

### **3.2. ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE**

Per l'avvio delle fermentazioni in questo studio non è stato impiegato un substrato convenzionale bensì è stata adoperata l'acqua di lavaggio delle trebbie provenienti da mosto PILS, preparato presso Birra dell'Eremo (Assisi, Italia) in un batch da 1500 L, utilizzando 100% malto Pils e luppolo Cascade. L'acqua di lavaggio delle trebbie è stata ottenuta al termine della fase di ammostamento, quando il mosto è stato allontanato dalla parte solida (dalle scorze di malto macinato) per essere convogliato nella caldaia di bollitura. Il processo di trasferimento ha previsto due fasi: durante la prima fase il mosto è stato reso limpido attraverso un letto filtrante costituito dalle trebbie stesse, mentre successivamente è stata eseguita la seconda fase, ossia il lavaggio delle trebbie, utilizzando acqua calda (75-78 °C) per favorire l'estrazione dello zucchero residuo presente sui grani. In particolare sono stati effettuati 3 lavaggi: con il primo lavaggio è stata raggiunta una densità pari a 1,2 °P, con il secondo pari a 1 °P, infine con il terzo pari a 0,4 °P. Dopo aver raccolto campioni per lo svolgimento delle analisi chimiche (determinazione degli zuccheri, dell'azoto assimilabile e dei polifenoli), le tre acque sono state unite e sottoposte in laboratorio al processo di luppolatura: 1 L di acque di lavaggio unite sono state addizionate con 18 g di luppolo Cascade e tenute in ebollizione per 1 ora. L'aliquota di mosto luppolato così ottenuta è stata poi aggiunta al resto delle acque.

A questo punto il substrato luppolato è stato diviso equamente in due batch: nel primo è stato mantenuto tal quale, mentre nel secondo è stato addizionato con il 10% di mosto di vino Verdicchio (annata 2017) pastorizzato. I due mosti così ottenuti sono stati impiegati separatamente come substrati per l'allestimento di micro-fermentazioni.

### 3.3. ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI

Le micro-fermentazioni sono state condotte in beute da 500 ml provviste di valvole di Müller, quest'ultime contenenti metabisolfito di potassio, così da consentire la fuoriuscita della CO<sub>2</sub> evitando la contaminazione del sistema. (Figura 7).



*Figura 7. Microfermentazioni*

Le pre-colture sono state allestite in estratto di malto al 10% e lasciate incubare a 25 °C per 48 ore. Dopo l'incubazione, le cellule sono state raccolte per centrifugazione (4000 rpm per 5 minuti), risospese in acqua sterile e si è proceduto all'inoculo, sia del substrato luppolato tal quale sia del substrato addizionato con 10% di mosto di Verdicchio, con 10<sup>6</sup> cellule/mL.

Le beute così inoculate sono state fatte fermentare alla temperatura di 18-20 °C per 22 giorni, registrando quotidianamente la diminuzione di peso dovuta alla perdita di CO<sub>2</sub>, fino a quando

non è stato ottenuto un valore pressoché costante, indice che la fermentazione era giunta al termine.

A questo punto, dopo aver saturato lo spazio di testa con azoto gassoso, le beute sono state poste ad una temperatura di 4°C per circa 7 giorni, al fine di consentire una chiarifica del prodotto.

### **3.4. RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA**

Terminato il periodo di sosta a 4°C le birre sono state sottoposte a rifermentazione in bottiglia, grazie all'attività dei lieviti residui ed ancora vitali. Per consentire ciò, durante la fase di imbottigliamento della birra sono stati aggiunti alla stessa 4 g/L di glucosio; per ciascun ceppo sono state utilizzate due bottiglie da 330 mL, le quali una volta sigillate con appositi tappi sono state mantenute a 18-20 °C per circa 7-10 giorni e infine stoccate a 4 °C. La bevanda risultate è stata successivamente analizzata mediante analisi sensoriale.

### **3.5. ANALISI MICROBIOLOGICHE**

#### **3.5.1. MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI**

Il monitoraggio della fermentazione è stato eseguito per via gravimetrica riportando giorno per giorno la perdita di peso, espressa come grammi di CO<sub>2</sub> svolta, fino al termine della fermentazione. La quantità di CO<sub>2</sub> prodotta è stata impiegata per valutare l'attività fermentativa.

Nella prova di micro-fermentazione l'inoculo, corrispondente a  $10^6$  cell/mL, è stato effettuato mediante camera di Thoma e verificato con conte vitali su piastra. Per effettuare le conte vitali sono state eseguite delle diluizioni seriali (figura 8). È stato prelevato 1 ml dal campione originario ed è stato posto in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile, ottenendo una diluizione 1/10 ( $10^{-1}$ ). Dopo aver agitato mediante ausilio di un vortex, è stato prelevato da questa 1 ml e posto in un'altra provetta sempre contenente 9 ml di acqua sterile per avere una diluizione  $10^{-2}$ . Si è proceduto così fino alla diluizione  $10^{-5}$ . Successivamente sono stati trasferiti 100  $\mu$ l di ogni sospensione sulle piastre Petri, precedentemente preparate con il terreno adeguato e piastrati su YPD Agar. Quindi, con una bacchetta di vetro ad "L", dopo essere stata immersa in alcol, fatta passare sulla fiamma, raffreddata sul bordo della piastra, è stato effettuato lo spatolamento dei 100  $\mu$ l di sospensione. Le piastre sono state messe ad incubare a 25°C per due o tre giorni, trascorsi i quali si è proceduto con il conteggio delle colonie cresciute.

Le conte vitali su piastra sono state eseguite anche a termine fermentazione per valutare la vitalità dei lieviti rimasti.

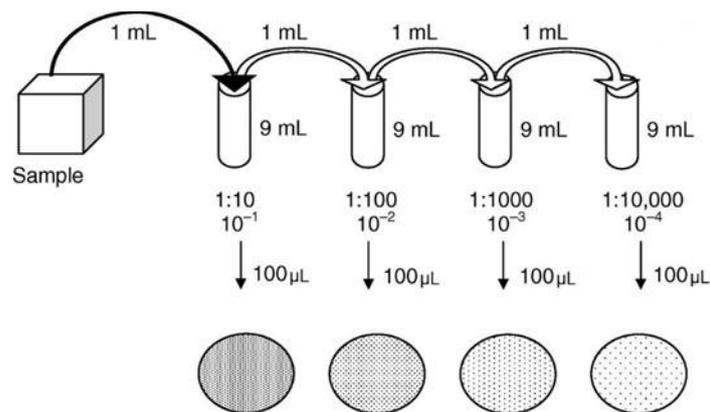


Figura 8. Diluizioni seriali

## **3.6. ANALISI CHIMICHE**

### **3.6.1. DETERMINAZIONE DEGLI AMINOACIDI PRONTAMENTE ASSIMILIBILI**

Per la determinazione degli aminoacidi prontamente assimilabili (azoto  $\alpha$ -aminico) sono stati prelevati da ogni campione 50  $\mu$ l di mosto e posti in una cuvetta di metilacrilato (1 cm di lunghezza e 4.5 ml di capacità), a cui successivamente sono stati aggiunti 3 ml di soluzione NOPA. Le cuvette sono state ricoperte con parafilm e agitate. Il bianco è stato preparato aggiungendo 50  $\mu$ l di acqua deionizzata con l'aggiunta di 3 ml di soluzione **NOPAW**. Dopo 10 minuti, si è effettuata la lettura nell'UV-Vis a 335 nm a temperatura ambiente (22-25 °C). L'assorbanza netta è stata calcolata sottraendo il bianco al campione.

La concentrazione degli aminoacidi è stata calcolata sulla base di una retta di taratura secondo la metodica descritta da Dukes & Butzke (1998).

Soluzione **NOPA**:

0.336 g di **OPA** (orto-ftaldialdeide), sono stati sciolti in etanolo e portati a volume a 50 ml.

A questa soluzione alcolica, è stata addizionata una soluzione acquosa contenente:

- 1,919 g di NaOH al 98 %
- 4,234 g di Acido Borico al 99 %
- 0,408 g di Nac (N-acetil-L-cisteina)

e portata a volume in pallone tarato da 500 ml con acqua deionizzata.

La soluzione **NOPA** è stabile a 4 °C per almeno tre settimane.

Soluzione **NOPAW**:

Stessa soluzione senza OPA.

### **3.6.2. DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RESIDUI**

Per determinare la quantità di zuccheri residui a fine fermentazione, nello specifico dei principali zuccheri presenti nella birra cioè maltosio, saccarosio e glucosio, è stato utilizzato il kit Megazyme.

Il kit contiene:

- Bottiglia 1: Buffer (25 ml, pH 7.6), azoturo di sodio (0.02% w/v)
- Bottiglia 2: NADP<sup>+</sup> + ATP (disciogliere in 12 ml di acqua distillata)
- Bottiglia 3: Esochinasi + glucosio-6-fosfato deidrogenasi
- Bottiglia 4:  $\beta$ -fruttosidasi in buffer di sodio citrato (pH 4.6) (disciogliere in 14 ml di acqua distillata)
- Bottiglia 5:  $\alpha$ -glucosidasi in buffer di sodio citrato (pH 6.6) (disciogliere in 14 ml di acqua distillata)
- Bottiglia 6: Soluzione standard di D-glucosio (5 ml, 0.4 mg/mL).

Preparate le soluzioni, si effettua l'analisi seguendo il protocollo sottostante (tabella 2)

<b>Pipettare in cuvette:</b>	<b>Bianco</b>	<b>Campione</b>	<b>Bianco</b>	<b>Campione D-Glucosio</b>
	<b>Saccarosio + D-Glucosio</b>	<b>Saccarosio + D-Glucosio</b>	<b>D-Glucosio</b>	
<b>Soluzione 4 (<math>\beta</math>-fruttosidasi)</b>	0,20 ml	0,20 ml	-	-
<b>Campione</b>	-	0,10 ml	-	0,10 ml
Incubare per 20 minuti. Poi aggiungere:				
<b>Acqua distillate</b>	2,10 ml	2,00 ml	2,30 ml	2,30 ml
<b>Soluzione 1 (buffer)</b>	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
<b>Soluzione 2 (NADP/ATP)</b>	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
Leggere l'assorbanza (A1) delle soluzioni a 340 nm dopo circa 3 minuti e aggiungere:				
<b>Sospensione 3 (HK/G6P-DH)</b>	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Leggere l'assorbanza (A2) delle soluzioni a 340 nm dopo 5 minuti				

*Tabella 2. Protocollo determinazione zuccheri*

Questo protocollo per la determinazione del saccarosio e del D-glucosio viene utilizzato anche per determinare maltosio + saccarosio + D-glucosio, sostituendo però alla soluzione 4 la soluzione 5 contenente l' $\alpha$ -glucosidasi.

### **3.6.3. DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI**

Il tenore in polifenoli è stato valutato utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu, costituito da una miscela di acido fosfotungstico e di acido fosfomolibdico, in grado di ossidare i fenoli presenti in una sospensione producendo una miscela di ossidi di tungsteno e di molibdeno (Gazzetta ufficiale della Comunità Europea, 3-10-90). Tale miscela si presenta di colore blu più o meno intenso a seconda del tenore in polifenoli presenti ed ha un massimo di assorbimento a 760 nm.

Protocollo:

- In un pallone tarato da 100 ml inserire 1 ml di campione (o diluizioni), per il bianco al posto del campione inserire 1 ml di acqua deionizzata;
- Aggiungere 50 ml di acqua deionizzata;
- Aggiungere 5 ml Reattivo Folin-Ciocalteu;
- Aggiungere 20 ml di soluzione carbonato di Na anidro al 20% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ );
- Portare a volume fino a 100 ml e attendere 30 minuti al buio
- Leggere l'Assorbanza a 760 nm e infine calcolare la concentrazione di polifenoli utilizzando la retta di taratura con acido gallico.

### **3.6.4. DETERMINAZIONE DELL'ACIDO L-LATTICO**

Durante questo studio è stata determinata la quantità di acido lattico a fine fermentazione, nello specifico per valutare l'attività di alcuni ceppi come *L. thermotolerans*, la quale è in grado di convertire gli zuccheri (in particolare glucosio) in acido L-lattico durante le prime

fasi della fermentazione alcolica. Per lo svolgimento di tale analisi è stato utilizzato il kit Megazyme per la determinazione dell'acido L-lattico, il quale contiene:

- Bottiglia 1: Buffer (25 mL, pH 10,0) + D-glutammato e azoturo di sodio (0,02% w/v);
- Bottiglia 2: NAD<sup>+</sup>/PVP (dissolvere in 5,5 mL di acqua deionizzata);
- Bottiglia 3: Sospensione di transaminasi D-glutammica-piruvica (1,1 mL);
- Bottiglia 4: Sospensione di L-lattato deidrogenasi (1,1 mL);
- Bottiglia 5: Soluzione standard di acido L-lattico (5 mL, 0,15 mg/mL) in azoturo di sodio 0,02% w/v.

Preparate le soluzioni si effettua l'analisi seguendo il protocollo sottostante (tabella 3):

<b>Pipettare nelle cuvette:</b>	<b>Bianco</b>	<b>Campione</b>
<b>Acqua deionizzata (~25°C)</b>	1,60 mL	1,50 mL
<b>Campione</b>	-	0,10 mL
<b>Soluzione 1 (buffer)</b>	0,50 mL	0,50 mL
<b>Soluzione 2 (NAD<sup>+</sup>/PVP)</b>	0,10 mL	0,10 mL
<b>Sospensione 3 (D-GPT)</b>	0,02 mL	0,02 mL
Leggere l'assorbanza delle soluzioni (A <sub>1</sub> ) dopo circa 3 minuti e aggiungere:		
<b>Sospensione 4 (L-LDG)</b>	0,02 mL	0,02 mL
Al termine della reazione (dopo 10 minuti) leggere le assorbanze delle soluzioni (A <sub>2</sub> ).		

*Tabella 3. Protocollo determinazione acido L-lattico*

### **3.6.5. DETERMINAZIONE DELL'ETANOLO**

La preparazione del campione per la valutazione del contenuto di etanolo prevede la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 ml) con filtro cut-off 0.2  $\mu\text{m}$ , a cui si aggiunge come standard interno l'1-pentanololo alla concentrazione di 100  $\mu\text{l}$ . A questo punto 1  $\mu\text{l}$  di campione viene iniettato direttamente nel gascromatografo serie GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan) con detector a ionizzazione di fiamma, utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus.

Il protocollo seguito è il seguente:

- temperatura dell'iniettore: 150°C;
- colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25 $\mu\text{m}$ );
- iniettore: split 10:2; iniettato 1  $\mu\text{l}$ ;
- temperatura: 40°C per 5 minuti, poi un gradiente di 5°C/min fino a 200°C isoterma di 200°C per 1 minuto;
- gas vettore: Azoto.

### **3.6.6. ANALISI DELLA COMPONENTE VOLATILE**

Per la determinazione della componente volatile, è stata utilizzata la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME), che può essere distinta in due tipologie: in spazio di testa SPME (HS-SPME), usata in questo studio, e ad immersione diretta SPME (DI-SPME).

L'analisi è stata svolta come riportato di seguito:

- porre 5 ml di campione in una vial con tappo di teflon e ancoretta magnetica, aggiungere 1 g di NaCl per 10 minuti
- Inserire la siringa attraverso il tappo e spingere la fibra, nello specifico la fibra a tripla fase divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS)
- Riporre l'intero sistema in termostato per 40 minuti a 50°C

Una volta preparata la fibra, è stata eseguita l'analisi mediante gas-cromatografia (GC). Innanzitutto, l'ago deve essere inserito con la fibra retratta nella porta dell'iniettore del gas-cromatografo, si prosegue premendo lo stantuffo ed esponendo la fibra per circa 5 minuti nella zona riscaldata dell'iniettore al fine di desorbire gli analiti sulla colonna. Infine, la fibra viene retratta e l'ago rimosso.

Le condizioni operative sono state le seguenti:

- temperatura dell'iniettore/rivelatore: 250 °C;
- colonna capillare Supelcowax 10 (30 m, 0.25 mm id);
- iniettore: splitless 60 sec.;
- temperatura del forno: T iniziale 50 °C per 5 minuti, poi un gradiente di 3 °C/min e isoterma di 220 °C per 20 minuti;
- gas vettore: Azoto.

### **3.6.7. ANALISI SENSORIALE**

Al termine del periodo di rifermentazione in bottiglia, le birre sono state sottoposte ad analisi sensoriale attraverso l'utilizzo di una scheda di degustazione nella quale sono presenti alcuni descrittori riguardanti l'aspetto visivo (colore, limpidezza, caratteristiche della schiuma), le note aromatiche (fruttate, floreali, tostate, ecc...) e le principali caratteristiche strutturali (acidità, dolcezza, astringenza, amaro, persistenza olfattiva).

## CAPITOLO 4 – RISULTATI

### 4.1. VALUTAZIONE DELL'ATTITUDINE FERMENTATIVA

L'attitudine fermentativa dei campioni in esame è stata valutata attraverso il monitoraggio della perdita di peso giornaliera, ovvero della quantità di CO<sub>2</sub> svolta.

I lieviti scelti per un loro potenziale impiego nella produzione di bevande a bassa gradazione alcolica, mediante l'utilizzo di acque di lavaggio delle trebbie tal quali, hanno mostrato la seguente cinetica fermentativa, riportata in figura 9.

Dal grafico riportante gli andamenti fermentativi delle prove svolte con le acque di lavaggio tal quali, si osserva che la prova condotta con *S. cerevisiae* US-05 (starter commerciale) è stata caratterizzata dalla cinetica fermentativa più alta, con una produzione di 1,37 g di CO<sub>2</sub> svolta. Seguono *T. delbrueckii* 33, la quale, con un andamento fermentativo molto simile al ceppo starter, ha riportato una produzione di 1,33 g di CO<sub>2</sub> e *L. thermotolerans* 101, che invece ha mostrato una cinetica fermentativa più lenta nei primi 7 giorni, producendo al termine della fermentazione 0,99 g di CO<sub>2</sub>. Infine, per quanto riguarda le specie *W. anomalus* 3003 e *P. kluyveri* PRMB7 ½ queste hanno riportato un andamento fermentativo molto lento, con una perdita di CO<sub>2</sub> di 0,51 g e 0,26 g rispettivamente.

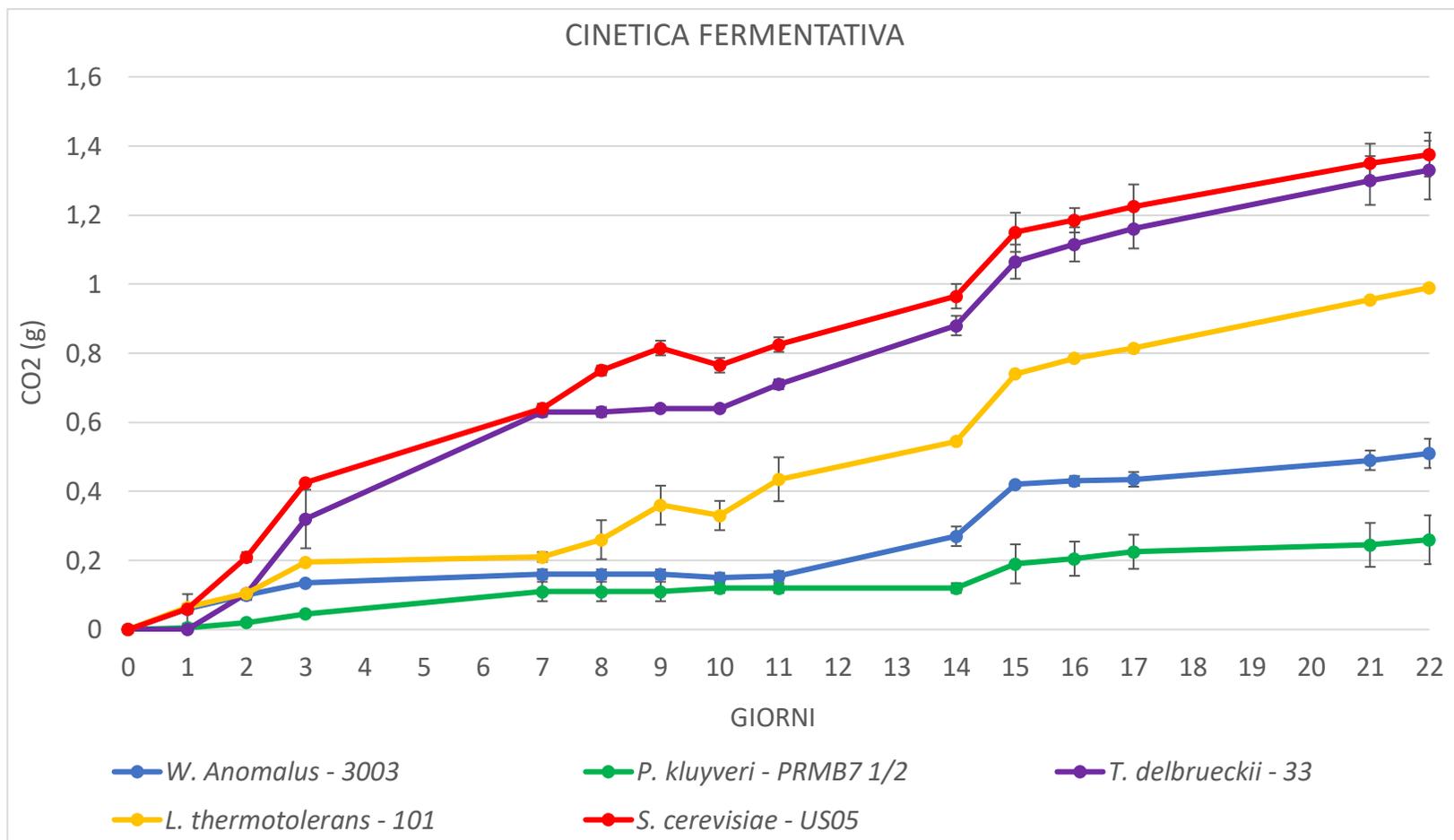


Figura 9 : Cinetica fermentativa di colture pure con lieviti non-Saccharomyces e *S. cerevisiae* US-05 (controllo) in acque di lavaggio delle trebbie tal quali.

Un andamento fermentativo diverso viene riportato per le prove svolte con le acque di lavaggio addizionate con il 10% di mosto di vino Verdicchio (figura 10). In questo caso la specie che ha riportato una cinetica fermentativa più alta è stata *T. delbrueckii* 33, con una produzione di CO<sub>2</sub> finale pari a 6,9 g. Seguono *L. thermotolerans* 101 con una quantità di CO<sub>2</sub> svolta pari a 5,76 g e *W. anomalus* 3003, il quale, benché nei primi tre giorni abbia mostrato un andamento molto lento, al termine dei 22 giorni di fermentazione ha riportato una produzione di 5,5 g di CO<sub>2</sub>. Il ceppo starter *S. cerevisiae* US-05, invece, ha presentato una cinetica fermentativa veloce nei primi 7 giorni, per poi rallentare, svolgendo 4,78 g di CO<sub>2</sub>. Infine, *P. kluyveri* PRMB7 ½, che, anche in questo caso, ha mostrato la cinetica fermentativa più bassa rispetto alle altre specie, con 3,23 g di CO<sub>2</sub> svolta.

Dopo 22 giorni di fermentazione, il prodotto ottenuto è stato posto in cella fredda a 4°C per la chiarificazione, per un periodo di tempo complessivo pari a 7 giorni, per poi essere imbottigliato e sottoposto a rifermentazione in bottiglia per 10 giorni a 20°C.

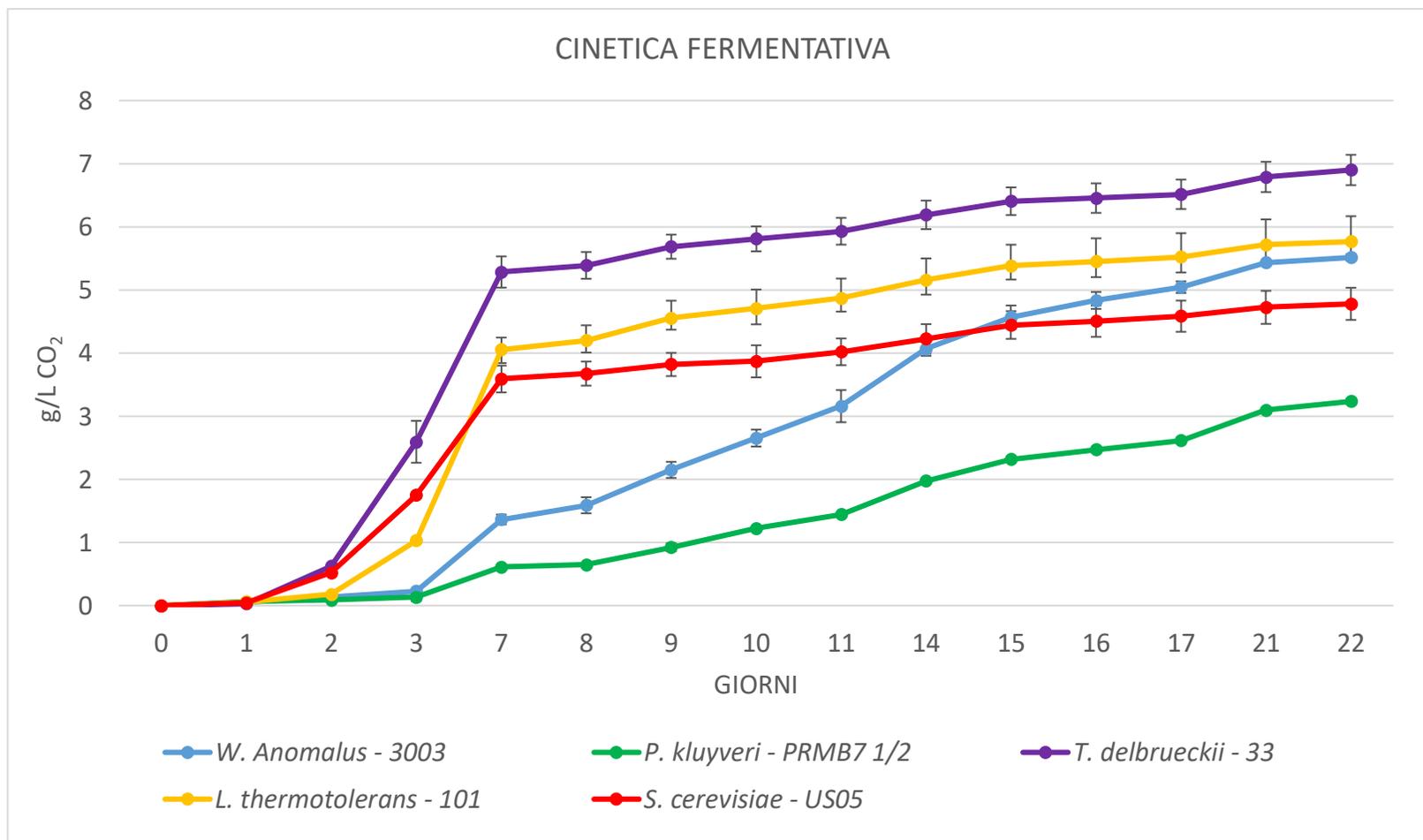


Figura 10. Cinetica fermentativa di colture pure con lieviti non-Saccharomyces e *S. cerevisiae* US-05 (controllo) in acque di lavaggio delle trebbie addizionate con mosto di vino Verdicchio

## 4.2. PROFILO ANALITICO DEI PRODOTTI FERMENTATI

I prodotti ottenuti dalla fermentazione sono stati poi analizzati per quanto riguarda i principali caratteri analitici: zuccheri residui, azoto prontamente assimilabile, polifenoli e acido lattico, nonché l'etanolo prodotto.

I risultati ottenuti a partire dalle acque unite e luppolate tal quali sono riportati in *tabella 6*.

Analizzando i dati relativi alla prova condotta utilizzando le acque luppolate tal quali, si osserva come tutti i ceppi abbiano fermentato completamente il saccarosio e il glucosio, benché siano rimasti dei residui di quest'ultimo nella prova svolta con *P. kluyveri* PRMB7 ½ (0,11 g/L). La capacità di metabolizzare, invece, il maltosio è risultata variabile tra le specie, con un residuo maggiore nelle prove che hanno mostrato un andamento fermentativo più basso, ovvero nelle prove condotte con *W. anomalus* 3003, dove è stata rilevata una quantità di maltosio residua pari a 3,53 g/L, e con *P. kluyveri* PRMB7 ½, caratterizzata da un residuo di maltosio di 3,54 g/L.

Per quanto riguarda i valori di azoto prontamente assimilabile, i dati mostrano una loro diminuzione in tutte le prove rispetto alla quantità presente nel mosto di partenza (41,47 mg/L). In particolare, si osserva nelle prove condotte con lo starter di controllo *S. cerevisiae* US-05 un residuo pari a 25,71 mg/L e con *L. thermotolerans* 101 di 27,76 mg/L. La concentrazione più alta è stata registrata invece nella tesi svolta con *P. kluyveri* PRMB7 ½, dove risulta essere pari a 38,01 mg/L.

I valori di acido L-lattico prodotto durante le fermentazioni confermano la capacità di *L. thermotolerans* 101 di produrre tale composto a partire da zuccheri, in particolare glucosio, durante le prime fasi della fermentazione alcolica. Tale ceppo, infatti, si è distinto per la

produzione maggiore di acido L-lattico, che si attesta a 0,32 g/L, mentre tutte le altre specie testate mostrano valori paragonabili a quello della specie di controllo *S.cerevisiae* US-05, con quantità che variano da 0,15 a 0,20 g/L.

I risultati relativi alla quantità di etanolo prodotto durante la fermentazione risultano essere coerenti con l'andamento fermentativo e con la quantità di CO<sub>2</sub> persa, nonché in accordo con lo scopo di tale studio, per cui era previsto l'ottenimento di prodotti a bassa gradazione alcolica. In particolare, si osserva una percentuale % v/v di etanolo maggiore nella prova condotta con lo starter di controllo *S. cerevisiae* US-05, dove risulta essere pari a 0,54 % v/v. Seguono le tesi svolte con *T. delbrueckii* 33 (0,49 % v/v) e con *L. thermotolerans* 101 (0,47% v/v), mentre le concentrazioni minori sono state ritrovate nei prodotti ottenuti con *W. anomalus* 3003 (0,27 % v/v) e *P. kluyveri* PRMB7 1/2 (0,12 % v/v).

Infine, analizzando i dati relativi alla componente polifenolica, è riportata una concentrazione pressoché invariata rispetto al substrato di partenza (28,33 mg/L) nella prova condotta con lo starter di controllo *S. cerevisiae* US-05, mentre negli altri prodotti si registra una diminuzione generale di polifenoli, con quantità che vanno da 23,33 mg/L (*W. anomalus* 3003) a 13,33 mg/L (*L. thermotolerans* 101 e *T. delbrueckii* 33). La perdita maggiore invece è stata osservata nella tesi svolta con *P. kluyveri* PRMB7 1/2, dove ne sono stati ritrovati 11,67 mg/L.

<b>CEPPI</b>	<b>GLUCOSIO (g/L)</b>	<b>SACCAROSIO (g/L)</b>	<b>MALTOSIO (g/L)</b>	<b>AZOTO <math>\alpha</math>- AMINICO (mg/L)</b>	<b>POLIFENOLI (mg/L)</b>	<b>ACIDO LATTICO (g/L)</b>	<b>ETANOLO (% v/v)</b>
<i>W. anomalus</i> <b>3003</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,53 ± 0,02	31,03 ± 0,45	23,33 ± 1,18	0,17 ± 0,00	0,27 ± 0,00
<i>P. kluyveri</i> <b>PRMB7 ½</b>	0,11 ± 0,04	0,00 ± 0,00	3,54 ± 0,04	38,01 ± 3,81	11,67 ± 5,89	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,00
<i>T. delbrueckii</i> <b>33</b>	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,02	32,95 ± 3,54	13,33 ± 1,18	0,20 ± 0,01	0,49 ± 0,00
<i>L. thermotolerans</i> <b>101</b>	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,19 ± 0,00	27,76 ± 0,36	13,33 ± 3,54	0,32 ± 0,03	0,47 ± 0,02
<i>S.cerevisiae</i> <b>US-05</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,03	25,71 ± 0,18	28,33 ± 5,89	0,20 ± 0,00	0,54 ± 0,01

Tabella 6 : Profilo analitico delle birre ottenute mediante lieviti non-Saccharomyces e *S. cerevisiae* US-05 con acque di lavaggio luppolate.

Zuccheri iniziali, azoto  $\alpha$ -aminico e polifenoli acque luppolate: glucosio (0,80 g/L); saccarosio (0,11 g/L); maltosio (3,90 g/L); azoto  $\alpha$ -aminico (41,47 mg/L); polifenoli (28,33 mg/L).

Per quanto concerne, invece, i prodotti ottenuti a partire dalle acque unite, luppolate e addizionate con il 10% di mosto di vino Verdicchio, i risultati sono riportati in Tabella 7.

Innanzitutto, si nota come, anche in questo caso, tutte le specie di lievito in esame sono state in grado di metabolizzare la scarsa quantità di saccarosio presente nel substrato di partenza (0,46 g/L). Tale capacità è riscontrata anche per il glucosio, benché residui di tali zuccheri siano stati riscontrati nella prova condotta con *P. kluyveri* PRMB7 ½ (1,91 g/L di glucosio e 0,20 g/L di saccarosio).

I dati relativi al maltosio residuo, infine, mostrano una maggiore variabilità: le concentrazioni più elevate sono state riportate dai campioni ottenuti con *S. cerevisiae* US-05 (2,28 g/L) e con *W. anomalus* 3003 (2,21 g/L). Residui minori sono stati registrati, invece, nelle prove condotte con *L. thermotolerans* 101 (0,95 g/L), *P. kluyveri* PRMB7 ½ (0,90 g/L) e *T. delbrueckii* 33 (0,84 g/L).

Anche nel caso dei prodotti ottenuti con acque addizionate con mosto di Verdicchio, si osserva un calo dell'azoto prontamente assimilabile, il quale prima della fermentazione risultava essere pari a 53,91 mg/L. Nel campione ottenuto con la specie di controllo *S. cerevisiae* il valore si assesta a 22,76 mg/L; negli altri fermentati, invece, la perdita è risultata essere inferiore: nella prova svolta con *P. kluyveri* PRMB7 ½ è stata riscontrata una quantità di azoto pari a 40,51 mg/L, mentre in quelle condotte con *W. anomalus* 3003 e *L. thermotolerans* 101 rispettivamente 28,14 mg/L e 25,19 mg/L. L'unica eccezione è rappresentata dalla tesi ottenuta con *T. delbrueckii* 33 dove la quantità di azoto prontamente assimilabile è inferiore rispetto a quella ritrovata nella specie di controllo, con un valore finale di 15,90 mg/L.

La quantità di polifenoli ritrovati in tali campioni è ridotta rispetto a quella che era stata riscontrata nel substrato di partenza. In particolare, la riduzione maggiore è stata registrata nel prodotto ottenuto con *T. delbrueckii* 33 dove la componente polifenolica risulta essere quasi del tutto rimossa, con un valore riportato pari a 1,67 mg/L, contro i 75,83 mg/L di partenza; una perdita significativa è registrata anche nella tesi ottenuta con *L. thermotolerans* 101 (6,67 mg/L). Nella tesi condotta con *S. cerevisiae* US-05 sono risultati essere presenti 23,33 mg/L di polifenoli, mentre in quella svolta con *W. anomalus* 3003 19,17 mg/L. L'unico prodotto che, infine, si è distinto per aver avuto una perdita minore della componente polifenolica è stato quello ottenuto con *P. kluyveri* PRMB7 1/2, con 50,83 mg/L di polifenoli presenti.

Anche lo studio condotto con le acque di lavaggio delle trebbie unite, luppolate e addizionate con mosto di vino Verdicchio ha confermato la capacità di *L. thermotolerans* di produrre acido L-lattico: infatti nella prova ottenuta è stata ritrovata una quantità di tale composto pari a 0,85 g/L, quantità superiore rispetto a quella ottenuta sia con la specie di controllo *S. cerevisiae* US-05, sia con le altre tre specie di lieviti non-*Saccharomyces*.

Infine, il contenuto di etanolo dei prodotti ottenuti con questo substrato sono in linea con l'andamento fermentativo registrato: tutti i campioni sono caratterizzati, infatti, da una bassa gradazione alcolica. In particolare, il prodotto ottenuto con *T. delbrueckii* 33 (specie che aveva registrato la perdita maggiore di CO<sub>2</sub>) presenta una percentuale di etanolo pari a 1,66 % v/v, seguito da quelli ottenuti con le specie *L. thermotolerans* 101 (1,40 % v/v), *W. anomalus* 3003 (1,32 % v/v) e *S. cerevisiae* US-05 (1,10 % v/v). La prova invece che ha registrato la quantità di etanolo più bassa (0,82 % v/v) è stata quella svolta con *P. kluyveri*

PRMB7  $\frac{1}{2}$ , a conferma dello scarso potere fermentativo riportato durante i 22 giorni di fermentazione.

CEPPI	GLUCOSIO (g/L)	SACCAROSIO (g/L)	MALTOSIO (g/L)	AZOTO ALFA AMINICO (mg/L)	POLIFENOLI (mg/L)	ACIDO LATTICO (g/L)	ETANOLO (% v/v)
<i>W. anomalus</i> 3003	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,21 ± 0,04	28,14 ± 0,18	19,17 ± 7,07	0,17 ± 0,00	1,32 ± 0,01
<i>P. kluyveri</i> PRMB7 ½	1,91 ± 0,02	0,20 ± 0,00	0,90 ± 0,03	40,51 ± 0,82	50,83 ± 2,36	0,18 ± 0,01	0,82 ± 0,01
<i>T. delbrueckii</i> 33	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,84 ± 0,00	15,90 ± 0,63	1,67 ± 1,18	0,18 ± 0,00	1,66 ± 0,06
<i>L. thermotolerans</i> 101	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,95 ± 0,00	25,19 ± 0,36	6,67 ± 1,18	0,85 ± 0,04	1,40 ± 0,00
<i>S.cerevisiae</i> US- 05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,28 ± 0,02	22,76 ± 1,27	23,33 ± 1,18	0,19 ± 0,00	1,10 ± 0,00

Tabella 7. Profilo analitico delle birre ottenute con lieviti non-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* US-05 da acque di lavaggio luppolate e con mosto di vino Verdicchio

Zuccheri iniziali, azoto  $\alpha$ -aminico e polifenoli acque luppolate e addizionate con mosto di vino Verdicchio: glucosio (16,73 g/L); saccarosio (0,46 g/L); maltosio (3,91 g/L); azoto  $\alpha$ -aminico (53,91 mg/L); polifenoli (75,83 mg/L).

### 4.3. PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI PRESENTI

Le concentrazioni dei principali composti volatili che sono stati saggiati nei campioni ottenuti a partire dalle acque unite e luppolate tal quali sono state riportate in *Tabella 8*.

Analizzando i dati, si osserva che le prove condotte con *L. thermotolerans* 101 e la specie di controllo *S. cerevisiae* US-05 hanno prodotto le quantità maggiori di etilbutirrato (aroma di ananas), pari rispettivamente a 0,74 mg/L e 0,73 mg/L, seguite dalla tesi condotta con *T. delbrueckii* 33, dove è stata registrata una quantità pari a 0,43 mg/L.

Per quanto riguarda l'acetato di isoamile, composto che conferisce alle birre un aroma di banana, le concentrazioni più elevate sono state ritrovate nelle prove ottenute con *S. cerevisiae* US-05, dove ha raggiunto i 0,92 mg/L, e con *L. thermotolerans* 101, in cui è risultata essere pari a 0,81 mg/L.

L'etilesanoato (aroma di mela) è stato rilevato in tutti i campioni con quantità molto basse, comprese tra 0,03 mg/L e 0,05 mg/L; per quanto riguarda il linalolo, monoterpene che conferisce un aroma di lavanda e luppolo, si ritrovano concentrazioni che variano tra i 0,01 mg/L (*S. cerevisiae* US-05) e 0,06 mg/L (*W. anomalus* 3003); concentrazioni che risultano essere simili a quelle del composto geraniolo, un altro monoterpene responsabile dell'aroma floreale, il quale in tutte le prove ha registrato valori compresi tra 0,01 mg/L (*W. anomalus* 3003 e *L. thermotolerans* 101) e 0,05 mg/L (*S. cerevisiae* US-05).

Il dietilsuccinato e il nerolo sono presenti in quantità irrisorie in tutti i campioni, generalmente con valori pari a 0,01 mg/L, così come l'etilottanoato, il quale, però, è assente nella prova condotta con *P. kluyveri* PRMB7 1/2.

Le tesi condotte con le specie *T. delbrueckii* 33 e *L. thermotolerans* 101 sono le uniche ad aver riportato la presenza dell'esanolo, composto responsabile dell'aroma erbaceo, con rispettivamente 0,06 mg/L e 0,02 mg/L.

Infine, il contenuto di feniletilacetato (aroma fruttato e di miele) è risultato essere maggiore nei campioni ottenuti con *P. kluyveri* PRMB7 ½ (0,77 mg/L) e con *S. cerevisiae* US-05 (0,54 mg/L), mentre il  $\beta$ -feniletanolo (aroma di rosa) presenta le concentrazioni maggiori nelle prove svolte con *L. thermotolerans* 101 (0,76 mg/L) e con *S. cerevisiae* US-05 (0,52 mg/L).

	<i>W. anomalus</i> 3003	<i>P. kluyveri</i> PRMB7 ½	<i>T.</i> <i>delbrueckii</i> 33	<i>L.</i> <i>thermotolerans</i> 101	<i>S.cerevisiae</i> US-05
<b>Etilbutirrato</b> (mg/L)	0,14 ± 0,01	0,18 ± 0,07	0,43 ± 0,06	0,74 ± 0,10	0,73 ± 0,07
<b>Acetato di isoamile</b> (mg/L)	0,63 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,67 ± 0,05	0,81 ± 0,09	0,92 ± 0,03
<b>Etilsanoato</b> (mg/L)	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,01
<b>Esilacetato</b> (mg/L)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Esanolo</b> (mg/L)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Etilottanoato</b> (mg/L)	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<b>Linalolo</b> (mg/L)	0,06 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,00
<b>Dietilsuccinato</b> (mg/L)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01
<b>Feniletilacetato</b> (mg/L)	0,39 ± 0,22	0,77 ± 0,16	0,44 ± 0,19	0,41 ± 0,28	0,54 ± 0,15
<b>Nerolo (mg/L)</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>Geraniolo</b> (mg/L)	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,00
<b>β-feniletanolo</b> (mg/L)	0,48 ± 0,006	0,18 ± 0,06	0,39 ± 0,05	0,76 ± 0,23	0,52 ± 0,04

Tabella 8. Profilo analitico delle birre ottenute mediante lieviti non-Saccharomyces e *S. cerevisiae* US-05 con acque di lavaggio luppolate.

Il profilo volatile delle prove ottenute a partire dal substrato addizionato con il 10% di mosto di vino Verdicchio è riportato nella tabella (tabella 9).

I valori di acetato di isoamile (aroma di banana) maggiori sono stati ritrovati nelle prove ottenute con *S. cerevisiae* US-05 (1,21 mg/L) e *L. thermotolerans* 101 (1,04 mg/L), benché nelle altre prove non siano state registrate quantità molto inferiori, essendo la concentrazione minima rilevata pari a 0,79 mg/L (*W. anomalus* 3003).

La quantità più elevata di etilbutirrato (aroma di ananas) è stata ottenuta nella prova svolta con *L. thermotolerans* 101, in cui è stata ritrovata una quantità pari a 0,79 mg/L, seguita da quella svolta con *S. cerevisiae* US-05 (0,54 mg/L) e con *T. delbrueckii* 33 (0,46 mg/L).

Anche impiegando il substrato addizionato con mosto di vino si registra la presenza di etilesanoato: in particolare però si notano dosi superiori di tale composto nelle prove condotte con *S. cerevisiae* US-05 (0,34 mg/L), *T. delbrueckii* 33 (0,22 mg/L) e *L. thermotolerans* 101 (0,15 mg/L), rispetto a quelle svolte con *P. kluyveri* PRMB7 ½ (0,06 mg/L) e *W. anomalus* 3003 (0,05 mg/L). L'esanolo è stato ritrovato, invece, soltanto nei campioni fermentati da *T. delbrueckii* 33, con una quantità che si assesta a 0,24 mg/L, e da *L. thermotolerans* 101 (0,22 mg/L).

I monoterpeni linalolo e geraniolo sono stati registrati in tutte le prove, anche in questo caso in quantità irrisorie: in particolare le concentrazioni di linalolo (aroma lavanda e luppolo) variano dai 0,01 mg/L e i 0,04 mg/L, mentre il geraniolo (aroma floreale) presenta concentrazioni che vanno dai 0,01 mg/L e i 0,10 mg/L (*S. cerevisiae* US-05).

Per quanto riguarda il feniletilacetato (aroma fruttato e di miele), la quantità maggiore è stata rilevata nel campione ottenuto con *T. delbrueckii* 33 (1,33 mg/L), mentre risulta essere quasi

del tutto assente nelle prove svolte con *S. cerevisiae* US-05 (0,06 mg/L) e *P. kluyveri* PRMB7 ½ (0,02 mg/L).

Infine, il contenuto di  $\beta$ -feniletanolo (aroma di rosa) è risultato essere maggiore nelle tesi condotte con *T. delbrueckii* 33 e con *W. anomalus* 3003, dove si registrano rispettivamente 1,14 mg/L e 1,02 mg/L, mentre ad avere le dosi minori sono i campioni ottenuti con *S. cerevisiae* US-05 (0,42 mg/L) e *P. kluyveri* PRMB7 ½ (0,40 mg/L).

	<i>W. anomalus</i> 3003	<i>P. kluyveri</i> PRMB7 ½	<i>T.</i> <i>delbrueckii</i> 33	<i>L.</i> <i>thermotolerans</i> 101	<i>S.cerevisiae</i> US-05
<b>Etilbutirrato</b> (mg/L)	0,35 ± 0,00	0,23 ± 0,07	0,46 ± 0,04	0,79 ± 0,06	0,54 ± 0,12
<b>Acetato di isoamile</b> (mg/L)	0,79 ± 0,07	0,85 ± 0,03	0,93 ± 0,10	1,04 ± 0,07	1,21 ± 0,16
<b>Etilsanoato</b> (mg/L)	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,34 ± 0,02
<b>Esilacetato</b> (mg/L)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Esanolo</b> (mg/L)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,00
<b>Etilottanoato</b> (mg/L)	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<b>Linalolo</b> (mg/L)	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01
<b>Dietilsuccinato</b> (mg/L)	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,00
<b>Feniletacetato</b> (mg/L)	0,47 ± 0,05	0,02 ± 0,01	1,33 ± 0,50	0,37 ± 0,05	0,06 ± 0,05
<b>Nerolo</b> (mg/L)	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>Geraniolo</b> (mg/L)	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,10 ± 0,09
<b>β-feniletanolo</b> (mg/L)	1,02 ± 0,28	0,40 ± 0,10	1,14 ± 0,23	0,68 ± 0,20	0,42 ± 0,10

Tabella 9. Profilo composti volatili delle birre ottenute con lieviti non-Saccharomyces e S.

*cerevisiae* US-05 da acque di lavaggio luppolate e con mosto di vino Verdicchio

#### 4.4. ANALISI SENSORIALE

Le bevande ottenute dopo la rifermentazione in bottiglia e successivo stoccaggio a 4°C sono state sottoposte ad analisi sensoriale, mediante degustazione.

Le descrizioni dei prodotti ottenuti a partire dalle acque di lavaggio luppolate tal quali sono riportate di seguito.

La bevanda fermentata da *S. cerevisiae* US-05 ha presentato al naso un sentore di cereale e malto, sentore, però, poco percepito all'assaggio, in cui ha prevalso, invece, un amaro importante. Il corpo è risultato essere assente, con una leggerissima effervescenza, così come non è stata rilevata formazione di schiuma.

Il prodotto ottenuto con *L. thermotolerans* 101 è risultato essere, tra questi campioni, il più interessante dal punto di vista sensoriale: esso ha presentato innanzitutto una carbonazione maggiore rispetto a quella ottenuta con la specie starter *S. cerevisiae* US-05. Al naso è stato percepito un sentore lattico e fruttato (lampone), mentre in bocca ha fornito un'acidità delicata, che si amalgamava bene con la nota luppolata.

La bevanda fermentata con *T. delbrueckii* 33 ha presentato al naso evidenti note di miele millefiori e di pesca gialla, diverse da quelle percepite poi all'assaggio, in cui è stato rilevato un sentore maltato e in cui è stata percepita una certa astringenza.

La presenza di difetti è stata, invece, registrata nei prodotti ottenuti con *W. anomalus* 3003 e *P. kluyveri* PRMB7 1/2: in entrambi sono state rilevate evidenti note di solvente, con una percezione anche di odori sulfurei nel secondo prodotto. Per quanto riguarda il corpo esso

era in entrambe assente, per cui le bevande sono risultate essere molto acquose e poco carbonate.

Per quanto riguarda invece le fermentazioni svolte a partire dalle acque luppolate e addizionate con il 10% di mosto di vino Verdicchio i risultati ottenuti sono i seguenti.

Il prodotto ottenuto con *S. cerevisiae* US-05 ha presentato al naso una nota di frutta acerba, tra cui si è distinta l'uva; all'assaggio invece si percepisce poco corpo e un amaro scarsamente pronunciato, accompagnato da astringenza data dal mosto. La bevanda fermentata da *W. anomalus* 3003 ha presentato al naso una nota di malto e solvente, con quest'ultimo che è stato percepito fortemente anche all'assaggio, mentre quella prodotta grazie a *T. delbrueckii* 33 si è distinta per avere la maggiore carbonazione ed è stata l'unica in cui si è assistito alla formazione di schiuma persistente. Per quanto riguarda i descrittori olfattivi e gustativi, sono stati ritrovate una nota fruttata e di miele più evidente, seguita da un sentore di malto più delicato.

Infine, le bevande ottenute con *L. thermotolerans* 101 e con *P. kluyveri* PRMB7 ½ sono risultate essere le più promettenti di tutto lo studio. La prima, caratterizzata da un accenno di schiuma persistente, ha presentato al naso una nota pronunciata di acido lattico e frutta a pasta gialla, mentre in bocca ha restituito un'acidità capace di pulire l'amaro (che diventa quasi impercettibile) e un sentore di frutta dolce e lampone, così come una nota di vino; la seconda, d'altro canto, è stata caratterizzata da sentori fruttati all'olfatto, restituendo al palato esteri di mela e dolcezza, ricordando con il proprio profilo sensoriale un prosecco o un sidro. È stata rilevata anche la presenza di effervescenza, la quale, benché non abbia raggiunto i livelli riscontrati nella bevanda ottenuta da *T. delbrueckii* 33, ha contribuito alla piacevolezza dell'assaggio.

## CAPITOLO 5 - DISCUSSIONI

L'obiettivo del presente studio è stato quello di produrre bevande/birra a bassa gradazione alcolica, utilizzando un substrato non convenzionale, ovvero le acque di lavaggio delle trebbie provenienti dall'ammestamento di un mosto utilizzato nella produzione di birra artigianale. In particolare, sono state effettuate due prove: in una è stato impiegato tale substrato luppolato, nell'altra, invece, è stato addizionato il 10% di mosto pastorizzato di vino Verdicchio, al fine di aumentare leggermente la quantità di zuccheri e nutrienti presenti.

Inoltre, per l'allestimento delle fermentazioni sono stati utilizzati lieviti non-*Saccharomyces* appartenenti alle specie *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus* e *P. kluyveri*.

La specie *S. cerevisiae* US-05, starter generalmente impiegato nella produzione di birra e utilizzato come controllo in questo studio, si è distinta per aver presentato, tra le prove svolte con il substrato luppolato, la cinetica fermentativa più alta e, di conseguenza, anche la quantità di etanolo maggiore. Per quanto riguarda l'utilizzo degli zuccheri presenti, è interessante notare come abbia consumato completamente il maltosio nella prova condotta con le acque luppolate tal quali, mentre residui maggiori sono stati rilevati nel substrato che presentava una quantità di glucosio iniziale più alta.

Anche per quanto concerne il consumo dell'azoto  $\alpha$ -aminico prontamente assimilabile, *S. cerevisiae* US-05 ha registrato il calo più elevato tra i campioni ottenuti con le acque luppolate tal quali. Inoltre, tale specie si è distinta per non aver riportato una perdita dei polifenoli nel campione ottenuto a partire da tali acque, perdita che invece è stata registrata nella tesi svolta con il differente substrato.

Analizzando i composti volatili presenti, si può notare come *S. cerevisiae* US-05 sia stata in grado di produrre quantità superiori di etilesanoato e acetato di isoamile in seguito all'aggiunta del mosto di vino Verdicchio, mentre in tale prova sono risultate essere inferiori le concentrazioni di etilbutirrato e di feniletilacetato (quest'ultimo quasi del tutto assente). Infine, per quanto riguarda i profili sensoriali non sono stati registrati risultati rilevanti.

La specie *T. delbrueckii* 33 ha spiccato per aver prodotto, invece, la maggior quantità di CO<sub>2</sub> tra i campioni ottenuti con le acque luppolate e addizionate con mosto di vino Verdicchio, mostrando quindi la cinetica fermentativa più elevata; così come è rilevante notare che vi è stata in questo campione una rimozione quasi completa della componente polifenolica. Rispetto alle altre specie, nella stessa prova, tale tesi ha presentato anche la percentuale di etanolo maggiore e la perdita più alta di azoto  $\alpha$ -aminico.

Per quest'ultimo analita, il lievito non-*Saccharomyces* in esame si distingue tra tutti per aver avuto, a fine fermentazione, una quantità di residui diversa tra le due prove (l'azoto residuo presente nella prova con mosto di vino risulta essere la metà rispetto alla prova con acque semplicemente luppolate), mentre i residui finali che si osservano con gli altri ceppi risultano essere simili tra le due prove.

Per quanto riguarda il profilo volatile rilevato, mentre nel campione ottenuto con le acque di lavaggio tal quali non si registrano risultati rilevanti, si osserva, invece, come l'aggiunta del mosto di vino Verdicchio abbia consentito a tale lievito di produrre quantità superiori di etilesanoato, esanolo, acetato di isoamile, fenilacetato e  $\beta$ -feniletanolo: quest'ultimi due composti presentano, infatti, in questa tesi le concentrazioni più alte registrate fra tutte le tesi valutate.

Per quanto concerne, infine, l'analisi sensoriale, entrambe le prove svolte con *T. delbrueckii* 33 hanno primeggiato per aver riportato la carbonazione maggiore e la presenza di evidenti note di miele.

Il lievito *W. anomalus* 3003 ha registrato una particolare cinetica nell'impiego del maltosio: le tesi svolte con questo lievito, infatti, hanno mostrato un consumo maggiore di tale zucchero nelle prove condotte con il substrato addizionato con il mosto di vino Verdicchio, mentre nell'altro substrato le quantità rilevate sono risultate essere vicine al valore di partenza. Per quanto riguarda gli altri caratteri analitici, è rilevante notare esclusivamente come, anche per tale specie, la presenza del mosto di vino abbia permesso al lievito di produrre quantità superiori di etilbutirrato, feniletilacetato e  $\beta$ -feniletanolo.

Infine, analizzando le caratteristiche organolettiche, entrambe le bevande ottenute con *W. anomalus* 3003, sono risultate essere non adatte al consumo a causa della prevalenza di un fastidioso sentore di solvente.

La specie *P. kluyveri* PRMB7 ½ si è distinta per aver mostrato in entrambe le prove la cinetica fermentativa più lenta e scarsa e, quindi, anche le percentuali di etanolo minori.

Il campione ottenuto a partire dalle acque luppolate e addizionate con mosto di vino Verdicchio ha presentato, tra tutti, la quantità di zuccheri maggiori, con residui sia di maltosio ma anche di glucosio e saccarosio.

Inoltre, mentre tra i campioni ottenuti a partire dalle acque luppolate tal quali *P. kluyveri* PRMB7 ½ si è distinta per aver presentato la perdita di polifenoli maggiore, nella seconda prova ha riportato, invece, la concentrazione più alta di tali composti rispetto a quella ritrovata nelle altre specie.

Considerando sempre le tesi svolte con le acque di lavaggio addizionate con mosto di vino Verdicchio rispetto a quelle svolte con le semplici acque luppolate, si osserva che la quantità di  $\beta$ -feniletanolo abbia subito un incremento, così come quella di acetato di isoamile, mentre la concentrazione di feniletilacetato sia stata inferiore (quasi del tutto assente). Infine, possiamo osservare che questa sia stata la specie ad aver beneficiato maggiormente dell'aggiunta di mosto di vino Verdicchio per quanto concerne il profilo sensoriale della bevanda ottenuta: infatti mentre il prodotto ottenuto a partire dalle acque luppolate tal quali presentava dei difetti, la bevanda ottenuta usando l'altro substrato ha eccelso all'assaggio per la presenza di note fruttate (esteri di mela) e per la sua dolcezza, nonché per la mancanza dei difetti prima riscontrati.

Per ultimo, il lievito *L. thermotolerans* 101 si è distinto per la sua capacità di produrre acido L-lattico a partire dal glucosio, presentando quantità superiori rispetto alle altre specie. Inoltre, tra le prove svolte si osserva, in accordo con la concentrazione dello zucchero precursore nei due substrati, una produzione maggiore di tale composto nella prova ottenuta con il substrato addizionato di mosto di Verdicchio.

Per quanto riguarda i composti volatili rilevati, tale lievito ha riportato quantità superiori di etilesanoato, esanolo e acetato di isoamile nel campione ottenuto a partire dal substrato addizionato con mosto di vino rispetto a quello ottenuto dal substrato lasciato tal quale, benché nella seconda prova abbia predominato per aver prodotto la quantità superiore di etilbutirrato e  $\beta$ -feniletanolo.

Infine, molto importanti sono i risultati riportati con l'analisi sensoriale dei prodotti rifermentati in bottiglia: infatti, *L. thermotolerans* 101 ha eccelso tra tutte le specie per aver prodotto, in entrambe le prove, bevande con un profilo sensoriale interessante. In particolare,

esse sono state caratterizzate dalla presenza di note fruttate (frutti a pasta gialla e lampone) e da acidità, che ha permesso di bilanciare delicatamente l'amaro dato dal luppolo, ricordando così birre acide a fermentazione spontanea.

Un aspetto da sottolineare, è che non è stato possibile confrontare i risultati ottenuti con altre ricerche scientifiche in quanto ancora non sono state condotte analisi su questi tipi di substrato, quindi è stato possibile solo effettuare un confronto con le fermentazioni testate in questo studio.

## **CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI**

I problemi ambientali, che oggi giorno la società si trova a dover fronteggiare, rappresentano uno stimolo per la ricerca, la quale si ritrova a dover proporre, con sempre più urgenza, processi sostenibili e con uno scarso impatto sull'ambiente. Tutto questo concerne non solo la produzione di energia ma anche la gestione dei rifiuti, siano essi urbani che industriali. Anche le realtà brassicole devono smaltire ingenti quantità di sottoprodotti (trebbie, lieviti e luppolo esausti), i quali, in virtù della loro composizione chimica, risultano essere dei materiali con un grande potenziale da poter essere valorizzati e sfruttati in numerosi ambiti.

Con il fine di valorizzare le trebbie esauste (il sottoprodotto ottenuto in maggiori quantità con il processo brassicolo), di facilitare il loro stoccaggio e di ottenere un prodotto innovativo da introdurre sul mercato, con la presenti Tesi si è indagato sul possibile impiego di un substrato non convenzionale, rappresentato dalle acque di lavaggio di trebbie per ottenere bevande a bassa gradazione alcolica. In particolare, sono state valutate le differenze tra gli andamenti fermentativi, i principali caratteri analitici e i principali composti volatili dei prodotti ottenuti utilizzando sia le acque di lavaggio luppolate tal quali sia addizionate

con il 10% di mosto di vino Verdicchio. Inoltre, sono stati impiegati per lo svolgimento delle fermentazioni, oltre alla specie starter di controllo *S. cerevisiae*, lieviti non-*Saccharomyces* in colture pure (*L. thermotolerans* 101, *W. anomalus* 3003, *P. kluyveri* PRMB7 1/2 e *T. delbrueckii* 33), con lo scopo di migliorare la complessità e qualità delle bevande.

Dalla ricerca è emerso, innanzitutto, che le acque di lavaggio delle trebbie rappresentano un potenziale substrato per la produzione di bevande con basso contenuto alcolico e con un profilo sensoriale gradevole grazie all'aggiunta di mosto di vino. Quest'ultima decisione infatti è risultata vincente, determinando un miglioramento generale delle caratteristiche organolettiche dei prodotti ottenuti.

Per quanto riguarda, invece, i lieviti impiegati, le specie che sono emerse per aver prodotto, grazie alla rifermentazione in bottiglia, le bevande con il profilo sensoriale migliore sono state *L. thermotolerans* 101 e *P. kluyveri* PRMB7 1/2, con la prima specie che è stata l'unica che ha fornito un risultato soddisfacente anche a partire dalle semplici acque luppolate tal quali. Altro dato da ricordare riguarda l'impiego di *W. anomalus* 3003, il quale al contrario ha prodotto delle bevande che non sono risultate essere idonee al consumo, avendo un profilo sensoriale sgradevole.

Ulteriori indagini sono necessarie per poter andare ad ottimizzare l'impiego delle acque di lavaggio delle trebbie, sia per quanto riguarda i tipi di mosto dalle quali possono provenire, ma anche andando a studiare i vari lieviti che possono essere impiegati nel processo fermentativo di questo substrato. Questi dati preliminari aprono uno scenario che potrebbe presentare diverse sfaccettature per poter immettere sul mercato delle bevande non-convenzionali andando ad usare dei sottoprodotti di lavorazione provenienti da processi industriali.

## BIBLIOGRAFIA

**Alayu, E., & Leta, S.** (2020). Brewery sludge quality, agronomic importance and its short-term residual effect on soil properties. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(4), 2337-2348.

**Baiano, A.** (2021). Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1829-1856.

**Bamforth, C. W.** (2001). pH in brewing: an overview. *Technical quarterly*.

**Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., De Schutter, D. P., ... & Arendt, E. K.** (2018). Application of non-Saccharomyces yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. *Fermentation*, 4(3), 66.

**Bottero L., Dabove L., Billia M.** Manuale della birra. Edizioni Gribaudo, Milano, (2009) p. 32

**Boulton, C., & Quain, D.** (2008). *Brewing yeast and fermentation*. John Wiley & Sons.

**Briggs, D. E., Brookes, P. A., Stevens, R. B. C. A., & Boulton, C. A.** (2004). *Brewing: science and practice* (Vol. 108). Woodhead Publishing.

**Cabras , Paolo, and Martelli, Aldo** “Chimica degli alimenti”. Piccin Editore (2004). pp. 557-598.

**Callejo, M. J., Tesfaye, W., González, M. C., & Morata, A.** (2019). Craft beers: Current situation and future trends. *New advances on fermentation processes*.

**Callemien, D., & Collin, S.** (2009). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer—A review. *Food Reviews International*, 26(1), 1-84.

**Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M.** (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, 56, 45-51.

**Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa, A., Siesto, G., Pietrafesa, R., Zambuto, M., & Romano, P.** (2018). Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International journal of food microbiology*, 284, 22-30.

**Chae, H. J., Joo, H., & In, M. J.** (2001). Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource technology*, 76(3), 253-258.

**da Costa Jardim, C., De Souza, D., Cristina Kasper Machado, I., Massochin Nunes Pinto, L., de Souza Ramos, R. C., & Garavaglia, J.** (2018). Sensory profile, consumer preference and chemical composition of craft beers from Brazil. *Beverages*, 4(4), 106.

**De Keukeleire, D.** (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica nova*, 23, 108-112.

**Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W.** (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 599-604.

- Duan, W., Roddick, F. A., Higgins, V. J., & Rogers, P. J.** (2004). A parallel analysis of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 62(1), 35-41.
- Esslinger, H. M.** (Ed.). (2009). *Handbook of brewing: processes, technology, markets*. John Wiley & Sons.
- Evans, E., van Wegen, B., Ma, Y., & Eglinton, J.** (2003). The impact of the thermostability of  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, and limit dextrinase on potential wort fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 61(4), 210-218.
- Fastnaught CE.** (2001) Barley fibre. In: Cho S, Dreher M, editors. Handbook of dietary fibre. New York: Marcel Dekker. p 519–42
- Ferreira, I. M., & Guido, L. F.** (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour: A review. *Fermentation*, 4(2), 23.
- Fischer, K., & Bipp, H. P.** (2005). Generation of organic acids and monosaccharides by hydrolytic and oxidative transformation of food processing residues. *Bioresource technology*, 96(7), 831-842.
- Fox, G. P.** (2009). Chemical composition in barley grains and malt quality. In *Genetics and improvement of barley malt quality* (pp. 63-98). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gibson, B., Geertman, J., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., ... & Sampaio, J. P.** (2017). New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research*, 17(4).
- Girelli, A. M., Astolfi, M. L., & Scuto, F. R.** (2020). Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*, 244, 125368.

- Guedes, J.D.S.; Pimentel, T.C.; Diniz-Silva, H.T.; Almeida, E.T.D.C.; Tavares, J.F.; De Souza, E.L.; Garcia, E.F.; Magnani, M.** (2019) Protective effects of  $\beta$ -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT* 116, 108496.
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E.** (2010). Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 318-328.
- Hammond, J. R., van Waesberghe, J. W., & Wheeler, R. E.** (2007). *Mashing and Mash Separation (Manual of Good Practice)*. Carl.
- Harrison, M. A.** (2009). Beer/Brewing. *Encyclopedia of Microbiology*.
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., ... & Chen, L.** (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157-163.
- Herbert A.,** (2013). ed. *Barley and malt: biology, biochemistry, technology*. Elsevier,
- Hieronimus, S.** (2016). *Gli ingredienti della birra: il luppolo: La guida pratica all'aroma e alla cultura del luppolo*. Edizioni LSWR.
- Huige, N. J.** (2006). Brewery by-products and effluents. In *Handbook of brewing* (pp. 670-729). CRC Press.
- Huszczka, E., & Bartmańska, A.** (2008). The implication of yeast in debittering of spent hops. *Enzyme and microbial technology*, 42(5), 421-425.
- Jackowski, M., Niedźwiecki, Ł., Jagiełło, K., Uchańska, O., & Trusek, A.** (2020). Brewer's spent grains—Valuable beer industry by-product. *Biomolecules*, 10(12), 1669.

**Jaeger, A., Arendt, E. K., Zannini, E., & Sahin, A. W.** (2020). Brewer's spent yeast (BSY), an underutilized brewing by-product. *Fermentation*, 6(4), 123.

**Jin, Y. L., Speers, A., Paulson, A. T., & Stewart, R. J.** (2004). Effects of  $\beta$ -glucans and environmental factors on the viscosities of wort and beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(2), 104-116.

**Karlović, A., Jurić, A., Ćorić, N., Habschied, K., Krstanović, V., & Mastanjević, K.** (2020). By-products in the malting and brewing industries—re-usage possibilities. *Fermentation*, 6(3), 82.

**Kunze, W.** (2004). Brewing malting. *Vlb, Berlin*, 18-152.

**Lentz, M.** (2018). The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. *Fermentation*, 4(1), 20.

**Lodolo, E. J., Kock, J. L., Axcell, B. C., & Brooks, M.** (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*—the main character in beer brewing. *FEMS yeast research*, 8(7), 1018-1036.

**Manzoni, Matilde** (2006) "Microbiologia industriale" Casa Editrice Ambrosiana,.

**Massaglia, S., Merlino, V. M., Blanc, S., Bargetto, A., & Borra, D.** (2021). Latent class analysis and individuals' preferences mapping: the new consumption orientations and perspectives for craft beer in North-West Italy. *British Food Journal*.

**Marson, G. V., Saturno, R. P., Comunian, T. A., Consoli, L., da Costa Machado, M. T., & Hubinger, M. D.** (2020). Maillard conjugates from spent brewer's yeast by-product as an innovative encapsulating material. *Food research international*, 136, 109365.

**Meussdoerffer, F. G.** (2009). A comprehensive history of beer brewing. *Handbook of brewing: Processes, technology, markets*, 1-42.

**Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M.** (2016). Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569-587.

**Moir, M.** (2000). Hops—a millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58(4), 131-146.

**Montanari, L., Floridi, S., Marconi, O., Tironzelli, M., & Fantozzi, P.** (2005). Effect of mashing procedures on brewing. *European Food Research and Technology*, 221(1), 175-179.

**Mussatto, S. I.** (2009). Biotechnological potential of brewing industry by-products. In *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation* (pp. 313-326). Springer, Dordrecht.

**Palmer, John J., and Colin Kaminski.** (2013). *Water: A comprehensive guide for brewers.* Brewers publications

**Pokrivčák, J., Supekova, S. C., Lančarič, D., Savov, R., Toth, M., & Vašina, R.** (2019). Development of beer industry and craft beer expansion. *Journal of Food & Nutrition Research*, 58(1).

**Poelmans, E., & Swinnen, J. F.** (2011). A brief economic history of beer. *The economics of beer, 1.*

**Romero, R., & Gomez-Basauri, J.** (2003). Yeast and yeast products, past, present and future: From flavors to nutrition and health. In *Nutritional Biotechnology in the Food and*

*Feed Industries. Proceedings of Alltech's 19th International Symposium. Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK (pp. 365-378).*

**Salanță, L. C., Coldea, T. E., Ignat, M. V., Pop, C. R., Tofană, M., Mudura, E., ... & Zhao, H.** (2020). Non-alcoholic and craft beer production and challenges. *Processes*, 8(11), 1382.

Sols, A. (1971). Energy-yielding metabolism in yeasts. *The yeasts*, 2, 271-307.

**Stenholm, K., & Home, S.** (1999). A new approach to limit dextrinase and its role in mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(4), 205-210.

**Stewart, G. G.** (2010) "Wort glucose, maltose or maltotriose—do brewer's yeast strains care which one." *Proceedings of the 31st Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section), Gold Coast, Paper. No. 4.*

**Stewart, G. G.** (2013). Biochemistry of brewing. In *Biochemistry of foods* (pp. 291-318). Academic Press.

**Teixeira, M. R., Guarda, E. C., Freitas, E. B., Galinha, C. F., Duque, A. F., & Reis, M. A.** (2020). Valorization of raw brewers' spent grain through the production of volatile fatty acids. *New Biotechnology*, 57, 4-10.

**Tubb, R. S.** (1986). A colony-colour method which differentiates  $\alpha$ -galactosidase-positive strains of yeast. *J. Inst. Brew.*, 92, 588-590.

**Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R.** (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of bioscience and bioengineering*, 96(2), 110-118.

**White, C., & Zainasheff, J.** (2010). *Yeast: the practical guide to beer fermentation*. Brewers Publications.

**Willaert, R., & Nedovic, V. A.** (2006). Primary beer fermentation by immobilised yeast—a review on flavour formation and control strategies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(8), 1353-1367.

**Wunderlich, S., & Back, W.** (2009). Overview of manufacturing beer: ingredients, processes, and quality criteria. In *Beer in health and disease prevention* (pp. 3-16). Academic Press.

## **SITOGRAFIA**

Figura 1: (<https://www.pexels.com/>)

Figura 2: (<https://bastonilaboratori.com/>)

Figura 3: (<https://it.wikipedia.org/>)

Figura 4: (<https://yolongbrewtech.com/>)

Figura 5: (<https://chimica-online.it/>)