



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

Corso di Laurea Magistrale in:

Scienze della Nutrizione e dell'Alimentazione

Lieviti probiotici non-convenzionali e valorizzazione dei sottoprodotti vegetali per una nuova bevanda fermentata

Non-conventional probiotic yeasts and valorisation of vegetable by-products for a new fermented beverage

Tesi di Laurea Magistrale di:

Celeste Fastellini

Relatore:

Prof.ssa Francesca Comitini

Correlatore:

Dott.ssa Laura Canonico

Sessione Straordinaria Febbraio
Anno Accademico 2023/2024

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE	5
1.1 ALIMENTI FUNZIONALI A BASE VEGETALE	5
1.2. IL ROOIBOS: ORIGINI E PROPRIETA' NUTRIZIONALI	10
1.3 ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE	13
1.4 VALORIZZAZIONE DEI SOTTO PRODOTTI DELL'INDUSTRIA ALIMENTARE	14
1.5 I LIEVITI	16
1.5.1 USO DI LIEVITI NON CONVENZIONALI: VANTAGGI DI UNA BEVANDA LOW ALCOOL E CINETICA FERMENTATIVA	17
1.6 PROFILO ORGANOLETTICO DEL MOSTO DI BIRRA	19
1.6.1 ALCOLI SUPERIORI	23
1.6.2ESTERI	24
1.6.3 COMPOSTI CARBONILICI	25
1.6.4 ACIDI ORGANICI	26
1.6.5 IDROCARBURI	27
1.6.6 COMPOSTI SOLFORATI	27
1.6.7 COMPOSTI FENOLICI	27
1.6.8 MONOTERPENI	28
CAPITOLO 2. SCOPO DELLA TESI	29
CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI	31
3.1. CEPPI DI LIEVITO	31
3.2 PREPARAZIONE DEL SUBSTRATO DI FERMENTAZIONE	32

3.2.1 ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE	32
3.2.2 PREPARAZIONE ROOIBOS	32
3.3 ALLESTIMENTO DELLA PROVA FERMENTATIVA	33
3.4 RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA	34
3.5 TERRENI DI COLTURA	35
3.6 ANALISI MICROBIOLOGICHE	35
3.6.1 MONITORAGGIO DELLA FERMENTAZIONE	35
3.6.2. DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RESIDUI	36
3.6.3 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO L-LATTICO	39
3.6.4 DETERMINAZIONE ETANOLO	40
3.6.5 DETERMINAZIONE ALCOLI SUPERIORI	41
3.6.6 ANALISI DELLA COMPONENTE VOLATILE	42
3.6.7 ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE (radicale DPPH)	43
3.7 ANALISI SENSORIALE	44
3.8 VITALITA' DOPO 5 MESI	45
CAPITOLO 4. RISULTATI	46
4.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA	46
4.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA	48
4.3 ANALISI CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE	49
4.3.1 ANALISI ZUCCHERI RISIDUI	49
4.3.2 CONCENTRAZIONE ACIDO LATTICO ED ETANOLO	50

4.4 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI	51
4.5 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI	52
4.6 ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE	57
4.7 ANALISI SENSORIALE	57
CAPITOLO 5. DISCUSSIONI	59
CAPITOLO 6. BIBLIOGRAFIA	63

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

1.1 ALIMENTI FUNZIONALI A BASE VEGETALE

La fiducia dei consumatori nel potere curativo degli alimenti non è un fenomeno recente, ma è una filosofia ampiamente accettata da generazioni. Sebbene Ippocrate non abbia forse dato inizio al movimento degli alimenti funzionali, affermò quasi 2.500 anni fa: "Lascia che il cibo sia la tua medicina e che la medicina sia il tuo cibo". Oggi, le convinzioni dei consumatori sui benefici per la salute di determinati alimenti e dei loro componenti sembrano aumentare a un ritmo senza precedenti (*Meyer, 1998*). Questa crescente attenzione e la maggior consapevolezza riguardo la nutrizione e la sostenibilità ambientale hanno fatto sì che il panorama alimentare si sia arricchito di alternative alle tradizionali fonti di nutrienti. Ad alimentare questo interesse vi sono anche indiscutibilmente l'aumento dei costi sanitari e le recenti scoperte scientifiche (*J. Valls et al., 2013*): un rapporto recente stima infatti che il mercato globale degli alimenti con caratteristiche salutari ammontasse a (circa) 168 miliardi di \$ nel 2013, con un tasso di crescita medio annuo dell'8,5%, e si prevede che supererà i 300 miliardi di dollari entro il 2020 (*Research and Markets, 2014*). Tra i prodotti che hanno suscitato maggior interesse tra i consumatori troviamo l'intera categoria degli alimenti funzionali, ossia alimenti freschi o trasformati che oltre alla funzione di base di fornire nutrienti, contengono disparate molecole bioattive in grado di migliorare una o più funzioni fisiologiche dell'organismo (*S. Kaur & M. Das., 2011*). Con il termine molecole bioattive si indica tutta una serie di composti contenuti negli alimenti sia di origine animale che vegetale, in grado di modulare alcune importanti funzioni biologiche di base andando ad influenzare direttamente o indirettamente l'espressione genica, agendo sulla metilazione del DNA (*K. Banwo et al., 2021*). Per comprendere a pieno questo concetto basta pensare al mondo delle api: la dieta delle larve porta a cambiamenti nell'espressione di circa 240 geni, che determina il loro sviluppo in api operaie o regine;

nelle regine sono più espressi geni associati ad enzimi fisiometabolici e crescita, mentre nelle operaie sono più espressi geni associati allo sviluppo (S. Foret et al., 2009).

La branca della scienza che studia gli effetti che i diversi nutrienti possono avere nei confronti del DNA o della cromatina attraverso modifiche della loro espressione è l'epigenetica nutrizionale. L'aspetto più interessante dei nutrienti come modulatori epigenetici del DNA è sicuramente quello della riduzione del rischio di sviluppare determinate patologie croniche come tumori o diabete, dimostrando come determinate molecole possano attivare o silenziare l'espressione di numerosi geni responsabili, ad esempio, della diminuzione di stress ossidativo, del miglioramento del sistema immunitario o del benessere gastrointestinale (Figura 1) (C. Carlberg et al., 2016).

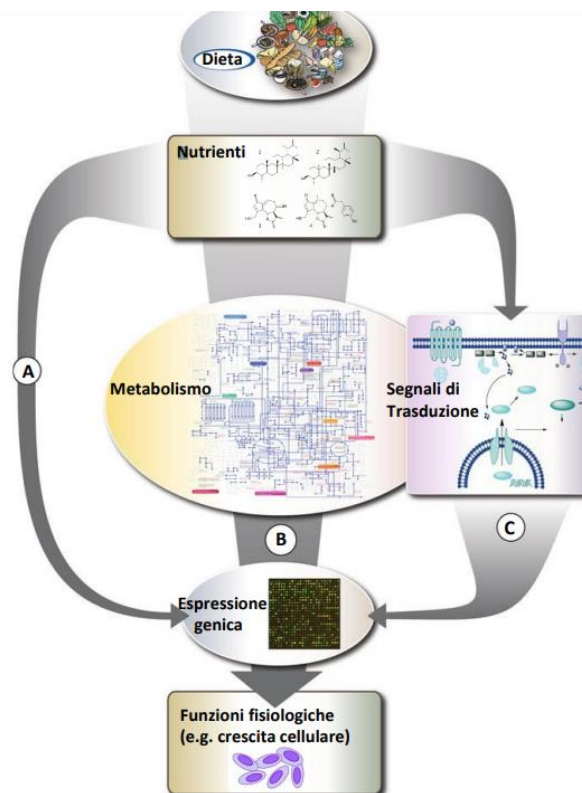


Figura 1. Come la dieta modula l'espressione genica (Carlberg et al., 2016).

Per comprendere e dimostrare questo concetto, uno studio ha dimostrato come l'epigallocatechinagallato (EGCG), flavonoide presente nel tè verde, sia in grado di esercitare un'azione anti tumorale. Questa catechina infatti è in grado di interagire con il dominio N-terminale della proteina p53, una proteina nota per le sue diverse attività antitumorali, dall'arresto della crescita cellulare per consentire la riparazione del DNA, alla riparazione stessa del DNA, all'avvio dell'apoptosi se il danno non può essere riparato. Generalmente questo dominio si lega ad un'altra proteina che ne porta alla rapida degradazione, impedendo la sua funzione onco protettiva, ma l'EGCG è in grado di legarsi nello stesso dominio e quindi di impedirne il riconoscimento e la degradazione così che possa svolgere il suo ruolo di onco soppressore, come mostrato in *Figura 2* (J. Zhao et al., 2021).

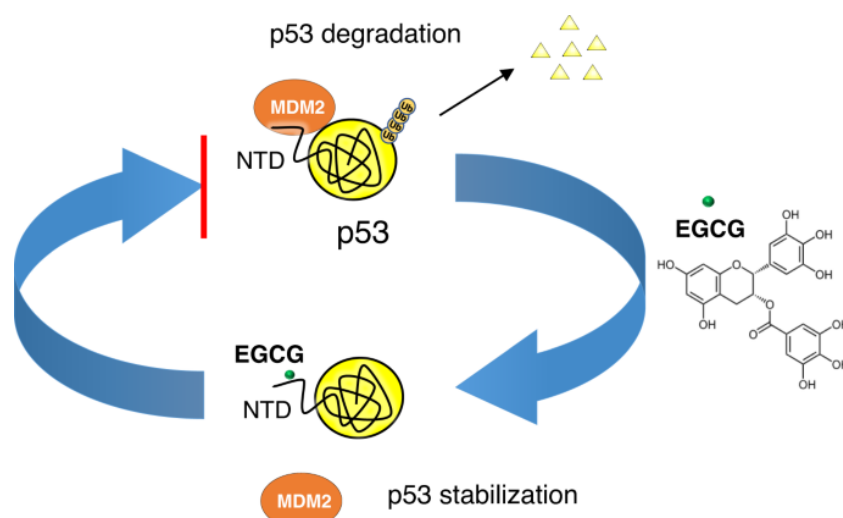


Figura 2. EGCG lega il dominio N-terminale di p53 e impedisce la sua interazione con MDM2 (J. Zhao et al., 2021).

Il termine “functional food” fu usato per la prima volta in Giappone nella metà degli anni '80 e nel 1991 il Ministero della Salute e del Welfare giapponese stabilirono la regolamentazione inerente alla etichettatura dei “Food for Specified Health Use (FOSHU)”. Questo portò senza dubbio una rivoluzione nel modo comune di intendere gli alimenti e l'alimentazione, dando il via a nuove ricerche mirate alla scoperta di nuove materie prime ed innovative tecniche di manipolazione dei cibi volti alla produzione di alimenti funzionali. Attualmente i composti fisiologicamente attivi più studiati sono contenuti in alimenti sia di origine vegetale (fitonutrienti come isoflavoni, flavonoidi ecc.) che

di origine animale (omega-3). Diversamente dal Giappone però in Italia e più globalmente in Europa sono state elaborate diverse definizioni di alimento funzionale e quella ad oggi comunemente accettata è quella dell'European Food Information Council (EUFIC), frutto del lavoro di una commissione di esperti europei in nutrizione e medicina, che hanno lavorato per tre anni al progetto Fufose (Funcional Food Science in Europe). Il lavoro conclusivo di tale commissione porta il nome di "Consensus Document" e stabilisce che "un alimento può essere considerato funzionale se dimostra in maniera soddisfacente di avere effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali di base, in modo tale che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia. Gli alimenti funzionali devono comunque restare "alimenti" e dimostrare la loro efficacia nelle quantità normalmente consumate nella dieta. Gli alimenti funzionali non sono pillole o pastiglie, ma prodotti che rientrano nelle normali abitudini alimentari" (*A.T. Diplock et al., 1999; M. Ashwell, 2002*). In Europa non esiste una normativa che regoli gli alimenti funzionali, i quali pertanto rientrano nella categoria «prodotti alimentari» disciplinata dal Reg. (CE) 178/2002, il quale "stabilisce principi e requisiti generali della legislazione alimentare" in quanto non sono considerati in una specifica categoria, ma piuttosto un concetto. Gli sforzi legislativi attualmente in fase di sviluppo sono diretti a limitare l'uso di dichiarazioni sulla salute sulle confezioni e nel marketing. Secondo il regolamento UE sulle indicazioni nutrizionali e sulla salute fatte su alimenti (CE n. 1924/2006), deve essere pubblicato un elenco di indicazioni autorizzate per tutti gli Stati membri e devono essere stabiliti profili nutrizionali anche per gli alimenti contenenti indicazioni sulla salute. Le indicazioni sulla salute possono essere "affermazioni funzionali" e "indicazioni sulla riduzione del rischio di malattia" (*P. Polito et al., 2013/14*). Appartengono a questa categoria più tipi di alimenti che possono essere sommariamente raggruppati in due macro categorie: alimenti fermentati e non fermentati. La sostanziale differenza sta nel concetto che i prodotti alimentari ottenuti dalla fermentazione da parte di batteri o lieviti permettono di introdurre nell'organismo circa 10000 volte la quantità di microrganismi normalmente assunti con la dieta, andando ad apportare tutta una serie di benefici alla salute legati all'arricchimento

del microbiota (*E. Valero-Cases et al., 2020*). Ad oggi infatti l'industria ha intrapreso la strada dell'aggiunta di microrganismi probiotici in quantità definite (10^6 - 10^7 UFC/mL) all'interno degli alimenti fermentati, al fine di ottenere un prodotto ovviamente sicuro che apporti miglioramenti ad una o più funzioni fisiologiche (*M.L. Marco et al., 2017*). Altro aspetto da non sottovalutare è sicuramente l'accettabilità del prodotto, per questo motivo lo studio di nuove classi di microrganismi in grado di fermentare le matrici vegetali apre il panorama alla possibilità di ottenere un prodotto migliorato dal punto di vista organolettico in quanto la fermentazione attraverso l'azione di decomposizione dei componenti principali degli alimenti (carboidrati, lipidi, proteine) da parte di microrganismi, come batteri, lieviti e muffe, porta alla produzione di metaboliti, tra cui acidi organici, probiotici e altre sostanze bioattive. La fermentazione, quindi, non solo migliora le caratteristiche organolettiche degli alimenti, ma può anche aumentarne la digeribilità e il contenuto di nutrienti, oltre a conferire loro proprietà probiotiche e prebiotiche che favoriscono il benessere intestinale e il corretto funzionamento del sistema immunitario (*R. Chourasia et al., 2023*). Ad oggi sul mercato troviamo soprattutto prodotti fermentati di natura lattiero-casearia, in quanto il latte è un ottimo substrato di partenza per la crescita e l'azione di batteri protecnologici. Tuttavia, le abitudini alimentari e le esigenze dei consumatori stanno cambiando e si presta sempre più attenzione alla sostenibilità ambientale, al benessere animale e ad eventuali intolleranze o allergie agli zuccheri del latte, anche esse sempre più comuni. Per tutte queste motivazioni la ricerca mira alla scoperta di nuove matrici vegetali adatte alla fermentazione per ottenere un prodotto vegano e sostenibile dal punto di vista della produzione (*S. Sethi et al., 2016*).

Le materie prime utilizzabili per ottenere una bevanda vegetale fermentata, che sia funzionale per l'organismo e sostenibile sono innumerevoli. Per iniziare serve una matrice ricca di zuccheri che fungano da fonte di nutrienti per i microrganismi fermentanti, come ad esempio il mosto di birra a base di malto d'orzo, il quale può essere fortificato aggiungendo un infuso di piante con proprietà

funzionali, ad esempio il tè. Ultimo ingrediente, ma non per importanza, sono i microrganismi che saranno i responsabili del processo di fermentazione.

1.2. IL ROOIBOS: ORIGINI E PROPRIETA' NUTRIZIONALI



Figura 4. Aspalathus linearis.

Tra gli infusi naturali a base vegetale, le tisane sono una delle bevande più popolari e ampiamente consumate, dove gli effetti benefici e salutari sono stati attribuiti alla presenza di abbondanti polifenoli. Tra questi, il rooibos è una bevanda ottenuta dall'infusione delle foglie di *Aspalathus linearis* (Figura 4), pianta appartenente alla famiglia delle *Fabaceae*. Innumerevoli studi effettuati soprattutto negli ultimi anni hanno dimostrato le capacità antiossidanti e anti infiammatorie di questa tisana che sta riscuotendo molti consensi nella categoria delle bevande a base erbacea da usare per arricchire e rendere funzionali bibite a base vegetale (Joubert e de Beer, 2014; A. Agarbati et al., 2024). Il rooibos è infatti caratterizzato dalla presenza di aspalathin (un diidrocalcone), composto che durante il naturale processo di fermentazione, diminuisce a causa della conversione ossidativa in flavanoni, flavoni e polifenoli, molecole di cui molti studi hanno dimostrato il potere benefico sia in vitro che in vivo (E. Damiani et al., 2019). Volgendo un occhio alla storia sappiamo dalla bibliografia

che la bevanda prodotta con il rooibos è usata da secoli dalle popolazioni khoisan che abitano la zona e che ne conoscono da sempre le proprietà. L'uso della bevanda è stato riportato dal botanico Carl Humberg nel 1772. I coloni olandesi del Sudafrica lo adottarono come alternativa economica al tè nero che doveva essere trasportato dalle navi provenienti dall'Europa. Tuttavia fino al XIX secolo l'uso del tè da parte degli olandesi era minimo. Nel 1904 Benjamin Ginsberg, un colono sudafricano di origine russa e discendente da una famiglia di commercianti di tè, intuì il potenziale del rooibos e cominciò a commerciare con le popolazioni khoisan che lo raccoglievano. Cominciò a vendere il suo "tè della montagna" ai coloni e divenne in breve il primo importatore di rooibos usando i contatti con la sua famiglia.

Negli anni trenta Ginsberg convinse un medico locale a sperimentare la coltivazione della pianta. I tentativi furono fruttuosi e consentirono a Ginsberg di incoraggiare gli agricoltori locali a cominciare la coltivazione, con la speranza di ottenerne un buon profitto. Il primo tentativo di coltivazione su larga scala fu un disastro a causa della piccola dimensione dei semi. Non sono più grandi di un granello di sabbia, e quindi sono difficili da rintracciare e raccogliere. Per questo motivo il prezzo dei semi arrivò a 80 sterline alla libbra, troppo alto per gli agricoltori locali.

Una delle donne che lavoravano per Ginsberg trovò un sistema efficiente e originale per la raccolta dei semi. Mentre gli altri portavano una manciata di semi pari a una scatola di fiammiferi, la donna era in grado di consegnarne regolarmente grossi sacchetti e fu persuasa a rivelare il suo segreto. Mentre era in cerca dei semi, si era accorta casualmente che le formiche facevano il suo stesso lavoro. Seguì le formiche fino al loro nido e, quando lo aprì, scoprì al suo interno un deposito di dimensioni ragguardevoli. Da allora il rooibos è diventato sempre più popolare in Sudafrica e ha cominciato a essere apprezzato anche nel resto del mondo (*F. Malgaroli, 2012*).

Il rooibos, privo di caffeina e povero di tannini, ha attirato molto interesse nella ricerca. Contiene numerosi minerali, in particolare flavonoidi come diidrocalconi (aspalatina e nothofagina),

fenilpropanoidi, flavoni e flavonoli che possono avere una varietà di effetti positivi sulla salute (*J.L. Marnewick et al., 2009*). Gli infusi realizzati con il rooibos contengono flavonoidi e acidi fenolici che hanno attività antiossidante perché svolgono un ruolo attivo nella prevenzione della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le malattie croniche, tra cui le malattie cardiovascolari e il diabete mellito, possono essere prevenute o curate riducendo le ROS altamente ossidanti e convertendole in radicali aroxilici meno dannosi. Oltre al metodo tradizionale di consumo del rooibos, sono facilmente accessibili una varietà di bevande al rooibos e integratori alimentari sotto forma di capsule e compresse. Da qui la spinta economica del mercato a promuovere il consumo di questo infuso e/o il consumo dei suoi componenti bioattivi. In effetti, la biodisponibilità dei metaboliti del rooibos e il loro impatto sulle malattie non trasmissibili legate allo stile di vita sono stati oggetto di diversi studi. I dosaggi dei vari tipi di tè al rooibos che avranno la massima biodisponibilità ed effetti terapeutici negli esseri umani sono un argomento chiave che ha generato molte discussioni. Sei tazze di tè (1.200 mL) al giorno, secondo alcuni ricercatori possono avere effetti positivi. Tuttavia, fino ad oggi non è stata condotta alcuna indagine dose-risposta sull'uomo. Inoltre, a causa della scarsità di studi clinici randomizzati, non è certo se i consumatori di rooibos sperimenteranno epatotossicità da sovradosaggio o consumo a lungo termine (*D. Afrifa et al., 2023*).

1.3 ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE



Figura 3. Trebbie esauste.

Il mosto di birra si ottiene dall'ammontamento del cereale, processo abbastanza lungo che prevede più fasi. Come prima cosa, i chicchi d'orzo puliti vengono posti in vasche con acqua a una temperatura compresa tra 5 e 18 °C per circa 2 giorni. L'acqua entra nell'embrione attraverso il micropilo e alla fine il contenuto di umidità del chicco raggiunge tra il 42 e il 48%. L'idratazione durante l'infusione avvia la germinazione e porta all'attivazione del metabolismo dell'aleurone. Dopo l'infusione, l'orzo viene trasportato in un recipiente di germinazione, dove viene girato da torni a vite e mantenuto a contatto con un flusso di aria umida che scorre attraverso il letto del chicco mantenendo la temperatura tra 15 e 21°C (S. Villacreces et al., 2022). La fase di germinazione promuove la sintesi e l'attivazione di enzimi nell'aleurone e nell'endosperma amidaceo, tra cui amilasi, proteasi, β -glucanasi e altri. L'azione di questi enzimi modifica la struttura dell'endosperma amidaceo. Al termine del processo di germinazione, che dura normalmente 6 o 7 giorni, l'endosperma è completamente e uniformemente modificato. L'orzo maltato viene essiccato a 40–60 °C fino a un contenuto di umidità del 4–5%, per evitare la contaminazione microbica e per generare componenti di sapore. Dopo questo passaggio, il malto essiccato viene conservato per 3 o 4 settimane, per raggiungere omogeneità ed equilibrio (S.I. Mussatto et al., 2006).

Nel birrifico, l'orzo maltato viene macinato, mescolato con acqua nel tino di ammostamento e la temperatura viene aumentata lentamente (da 37 a 78 °C) per promuovere l'idrolisi enzimatica dei costituenti del malto, principalmente amido, ma anche altri componenti come proteine, β -glucani e arabinoxilani, e per solubilizzare i loro prodotti di degradazione (*Y. Jin et al., 2004*). Durante questo processo, l'amido viene convertito in zuccheri fermentabili (principalmente maltosio e maltotriosio) e zuccheri non fermentabili (destrine), e le proteine vengono parzialmente degradate in polipeptidi e amminoacidi. Questa fase di conversione enzimatica (ammostamento) produce un liquido dolce noto come mosto. La frazione solida residua è nota come "bricolage di birra" (BSG) (*S.I. Mussatto et al., 2006*).

A questo punto, la frazione solida residua può subire il processo di batch sparging, ossia l'aggiunta di ulteriore acqua ad una temperatura di circa 78-80°C per il tempo necessario alla diluizione degli zuccheri residui. Successivamente alla filtrazione si otterrà l'acqua di lavaggio delle trebbie, sottoprodotto dell'industria brassicola con dimostrate proprietà funzionali, adatto all'impiego come matrice di fermentazione da parte di microrganismi per l'ottenimento di bevande *vegetali* (*S.I. Mussatto et al., 2006*)

1.4 VALORIZZAZIONE DEI SOTTO PRODOTTI DELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

Lo sviluppo di una bevanda fermentata funzionale usando l'acqua di lavaggio delle trebbie segue la scia della sostenibilità ambientale, rispecchiando a pieno il tema centrale dell'economia circolare, ossia il riutilizzo dei sottoprodotti provenienti dai processi delle lavorazioni alimentari. Le trebbie esauste sono infatti il sottoprodotto più abbondante del processo di produzione della birra (*W. Kunze et al., 2010*); basti pensare che ogni 100 litri di bevanda prodotta si ottengono circa 35-40 kg di questa sostanza che comprende la buccia che ricopre il chicco d'orzo, il pericarpo e i rivestimenti del seme rimanenti dalla fase di ammostamento. Andando ad analizzare la composizione nutrizionale di questo residuo secco vediamo che risulta essere formato per l'80% da fibre (solubili quali β -glucani, arabinogalattani, polisaccaridi pectici, xiloglucani e arabinoxilani altamente ramificati e insolubili,

quali cellulosa, lignina, xiloglucani, galattomannani e arabinosilani leggermente ramificati (cellulosa, emicellulosa e lignina) e per la restante percentuale da proteine quali gluteline, globuline e albumine. Inoltre la matrice cellulosica “intrappola” nel substrato anche numerosi composti bioattivi quali amminoacidi (istidina, lisina, metionina, fenilalanina e triptofano), vitamine e derivati fenolici, rendendo le trebbie di birra un prodotto funzionale che apporta benefici al di là del ruolo nutrizionale di base (T. Bonifacio-Lopes et al., 2020). Per riuscire a conservare il prodotto, è necessario pressarlo o essiccarlo in modo da avere un contenuto d’acqua inferiore al 10% (C. Andrighetto et al., 2021). Poiché il BSG è ricco di proteine, fibre e altri nutrienti, è stato fin dall’antichità ampiamente utilizzato nell'alimentazione animale (ad esempio, suini, pesci e pollame) e in misura limitata nell'alimentazione umana, come mostrato in *Figura 4*.

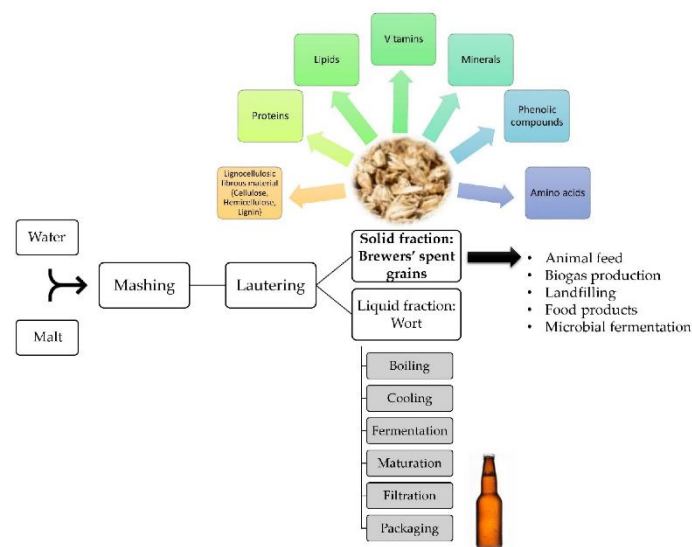


Figura 4. Processo di produzione della birra, ottenimento delle trebbie e loro possibili impieghi (T. Bonifacio-Lopes et al., 2020).

La versatilità delle trebbie è stata confermata da molti studi in cui hanno valutato quali potevano essere gli effetti tecnologici e sensoriali dell’utilizzo dei sottoprodotti collegabili alla birra nella produzione di formaggi freschi, formaggi a pasta molle di breve e media stagionatura, formaggi erborinati, formaggi caprini, yogurt e ricotta (G. Zeppa et al., 2013). Altri studi mostrano come l'aggiunta di una percentuale fino a un massimo del 15% di BSG a pane ottenuto dalla farina di grano e trattato con quattro enzimi in cui è stato aggiunto BSG (0-30%) aveva una maggiore durata di

conservazione e una consistenza e un volume migliorati (A. Baiano et al., 2023). Tutto questo per dire che le trebbie esauste possono essere un buon substrato di partenza per l'ottenimento di prodotti fermentati da parte di batteri lattici e lieviti; inoltre è possibile utilizzare una loro integrazione negli impasti acidi per la panificazione, oltre a contenere un elevato potere antiossidante interessante sia per l'aspetto protecnologico, ossia l'aumento della shelf-life, ma anche con potenziali effetti benefici per la salute.

1.5 I LIEVITI

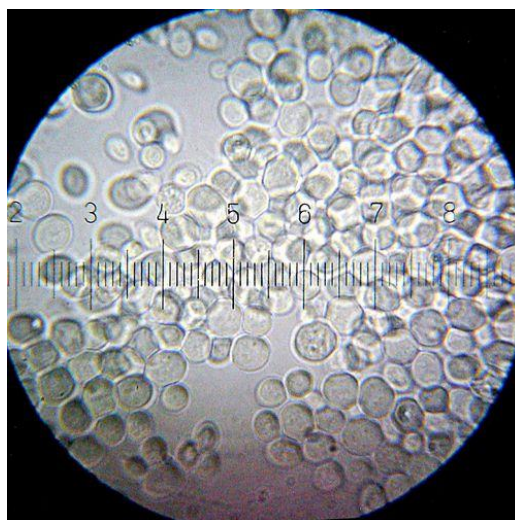


Figura 5. *Saccharomyces cerevisiae*.

Quando si parla di mosto di birra fermentato si fa convenzionalmente riferimento all'impiego di due ceppi di lievito, ossia *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5) e il *Saccharomyces pastorianus*. La fermentazione alcolica operata da questi tipi di lievito è un processo a due fasi, nella prima delle quali gli zuccheri complessi vengono scissi in zuccheri semplici che nella fase successiva vengono convertiti in etanolo (F. Zamora, 2009). Il *S.cerevisiae* è utilizzato per ottenere birre ad alta fermentazione chiamate Ale (18-22 °C) (C. Boulton and D. Quain, 2008), mentre il *S. pastorianus* si distingue dal *S. cerevisiae* per la sua capacità di metabolizzare il melibiosio grazie ad una α -galattosidasi (R.S. Tubb, 1986), per l'assimilazione del maltosio e del maltotriosio (G.G. 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).

Ad oggi la specie per eccellenza che viene impiegata nei processi di fermentazione è il *S. cerevisiae*, starter eccellente che domina la produzione di bevande 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. La sua spiccata capacità fermentativa fa sì che gran parte dello zucchero presente sul substrato venga utilizzato per produrre un'elevata quantità di etanolo, uno dei prodotti principali del metabolismo anaerobio di questi lieviti. Questa reazione è ben sintetizzata nella formula di Gay-Lussac: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2OH + 2 CO_2$ (F. Zamora, 2008).

1.5.1 USO DI LIEVITI NON CONVENZIONALI: VANTAGGI DI UNA BEVANDA LOW ALCOOL E CINETICA FERMENTATIVA

L'uso di ceppi starter selezionati di *Saccharomyces cerevisiae* nella fermentazione pura è ampiamente diffuso nell'ambito della vinificazione e della produzione brassicola. Infatti, *S. cerevisiae* è in grado di sopprimere la comunità microbica selvatica e dominare il processo. Negli ultimi anni, tuttavia, c'è stato un crescente interesse nell'uso di lieviti non-*Saccharomyces* nella vinificazione. Diversi studi hanno riconosciuto un impatto positivo sulla complessità del vino delle specie di lieviti non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste e/o sequenziali con ceppi starter di *S. cerevisiae*. L'influenza della coltura di lieviti non-*Saccharomyces* con le interazioni del lievito nella fermentazione mista può portare al prodotto finale che influenza sia il profilo analitico che quello aromatico. Inoltre, il lievito non-*Saccharomyces* nella fermentazione mista può contribuire a controllare i microrganismi di deterioramento e a ridurre il contenuto di etanolo.

Da un altro punto di vista, mediante l'impiego degli starter con attitudini funzionali, si potranno ottenere prodotti fermentati e anche potenzialmente probiotici, ma con un rilevante tasso alcolemico. Il contenuto di etanolo nelle bevande fermentate è uno dei punti chiave per la questione sanitaria e in questo contesto, l'OMS incoraggia le industrie delle bevande a trovare strategie idonee per raggiungere questo obiettivo. Per definizione una bevanda funzionale deve essere a basso o nullo

tasso alcolemico, con rispettivamente $\leq 0,5\%$ e $\leq 1,2\%$ di contenuto alcolico (K. Bellut et al., 2019). Per tanto l'approccio biologico più utilizzato a questo scopo è quello di ricercare lieviti non convenzionalmente usati nell'industria alimentare che siano scarsi fermentatori di zuccheri come maltosio e maltriosio, principali zuccheri contenuti nel mosto di birra. Aspetto molto importante da tenere in considerazione nell'ambito di utilizzo di ceppi di lievito non convenzionali è sicuramente lo stato di sicurezza di questi microrganismi. Infatti, in considerazione della lunga e ben documentata storia di utilizzo sicuro, *S. cerevisiae* è riconosciuto con uno status di Presunzione Qualificata di Sicurezza (QPS) in Europa. Lo status QPS viene concesso in base a una valutazione del rischio degli agenti biologici effettuata dal gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici (BIOHAZ) dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA).

Inoltre essendo *S. cerevisiae* il lievito per eccellenza selezionato dai mastri birrai, c'è da tenere in considerazione il fatto che la fermentazione guidata da altri tipi di lievito avrà una differente cinetica fermentativa e quindi il processo sarà sicuramente più lento e meno controllato.

Portando alcuni esempi presi dalla letteratura possiamo dire che *Brettanomyces spp.* sono fondamentali per la produzione di birre lambic, in quanto producono aromi affumicati, erbacei, speziati e medicinali nelle bevande. (B. Gibson et al., 2017). Possono produrre la β -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 (A. 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 (M. 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 (P. 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 *Torulaspota 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 *Torulaspota delbrueckii* sono caratterizzate da un buon profilo aromatico e da una bassa gradazione alcolica (2,66% v/v) (K. Bellut et al., 2018; L. 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 (K. 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 (A. Capece et al., 2018; K. Bellut et al., 2018).

1.6 PROFILO ORGANOLETTICO DEL MOSTO DI BIRRA

Oltre al lato funzionale e tecnologico, un aspetto da non sottovalutare è sicuramente il profilo organolettico di un nuovo prodotto per la sua performance sul mercato. Nello specifico, l'industria della birra artigianale è uno dei segmenti in crescita nel settore delle bevande e la sua crescente diffusione influenza anche le preferenze commerciali delle persone e le tendenze di consumo della birra, in Europa ma anche nel mondo (B. Aquilani et al., 2015). I micro birrifici prestano attenzione alla qualità delle materie prime per ottenere una birra artigianale caratterizzata e diversificata da profili aromatici e nutrizionali peculiari. Queste birre artigianali differiscono significativamente da

quelle industrializzate in cui l'obiettivo principale è quello di fornire un prodotto di qualità standardizzato e riconosciuto dal consumatore. Le birre artigianali hanno spesso un gusto unico derivante da specifici processi tecnologici e dalla selezione delle materie prime, spesso di provenienza locale (M. Cipollaro et al., 2018; S.M. Schnell e J.F. Reese, 2003). Probabilmente questo è il motivo principale per cui le birre artigianali attraggono i consumatori che cercano una "rivoluzione del gusto" (V. Alfeo et al., 2019). Quest'ultimo evidenzia la necessità di sviluppare birre artigianali che combinino un'elevata qualità aromatica e un valore nutrizionale migliorato. A tale proposito, i consumatori sono alla ricerca di prodotti sani e innovativi (B. Senkarcinova et al., 2019). Per queste ragioni, il mercato delle bevande spinge per lo sviluppo di birre speciali come birre a basso contenuto di alcol, ipocaloriche, senza glutine, dal sapore innovativo e salutari (H.Q. Yeo e S. Liu, 2014). In generale, la birra rappresenta una fonte di minerali, vitamine, polifenoli e fibre. Tra le birre funzionali, si segnalano la birra allo xantumulolo, la birra estrogenica e la birra probiotica (H.Q. Yeo e S. Liu, 2014). La birra probiotica si ottiene utilizzando microrganismi probiotici durante il processo di fermentazione. I probiotici sono definiti come "preparati cellulari o componenti di cellule microbiche che hanno un effetto benefico sulla salute e il benessere dell'ospite" (S. Salminen et al., 1999). In genere i microrganismi probiotici più noti sono i batteri lattici, in particolare *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* o *Streptococcus*. Solo *S. cerevisiae* var. *boulardii* è l'unico lievito commerciale utilizzato come probiotico per le sue proprietà come la temperatura corporea di sopravvivenza (37 °C), la resistenza agli acidi dello stomaco e agli acidi biliari e l'inibizione della crescita di numerosi patogeni microbici (D. Czerucka et al., 2007; T. Kelesidis e C. Pothoulakis, 2012; McFarland, 2010). Capece et al. (2018) e Mulero-Cerezo, Briz-Redón e Serrano-Aroca (2019) miravano a produrre birra artigianale utilizzando lievito fermentativo probiotico caratterizzato da una maggiore attività antiossidante, un contenuto alcolico inferiore e attributi sensoriali positivi. Un altro obiettivo nella produzione di birra artigianale è l'uso di legumi, indispensabili per la dieta umana in relazione alle loro preziose e nutritive molecole bioattive quali fibre, proteine, vitamine e alcuni preziosi fitochimici, che mostrano importanti attività biologiche

(S.S. Patil, 2016). Questi aspetti non erano stati combinati prima nello sviluppo di bevande innovative; pertanto, è stata proposta una bevanda arricchita di proteine a basso contenuto di alcol fermentata con microrganismi funzionali e con un'impronta aromatica migliorata.

E' stato dimostrato che l'impiego di lieviti non convenzionali per la fermentazione conferisca un profilo aromatico del tutto singolare al prodotto finale in quanto dal metabolismo di questi microrganismi, oltre ai prodotti finali quali etanolo, anidride carbonica ed energia, vengono prodotti anche composti volatili derivanti sia dalle materie prime che dalle tecnologie usate per il processo di produzione, sprigionati in seguito a reazioni biochimiche e responsabili dell'aroma caratteristico della bevanda. I maggior esponenti di questa categoria sono alcoli superiori, etil esteri e acetati. 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). Nella *Figura 8* è mostrato un elenco di tutti questi i composti e di seguito viene fornita una breve panoramica di alcuni dei più rilevanti.

Gruppi chimici	Composti volatili	Aroma o sapore	Concentrazione (mg/L)
Alcoli superiori	Propanolo	Alcolico/solvente	600mg/L
	Alcol amilico	Alcolico solvente	50-70mg/L
	Alcol isoamilico	Banana	50-65mg/L
	2-feniletanolo	Fruttato/Dolce	50-65mg/L
Esteri	Etil acetato	Solvente	33mg/L
	Isoamil acetato	Banana	1,6mg/L
	Feniletil acetato	Rosa/Mele/Miele	3,8mg/L
	Etil esanoato	Mele/Anice	0,23mg/L
	Etil ottanoato	Mele	0,9mg/L
Aldeidi e chetoni	Acetaldeide	Mela verde/Burro	10mg/L
	Diacetile	Burro	0,1/0,15mg/L
Acidi organici	Acido acetico	Aceto	175mg/L
	Acido laurico	Detergente	6,1mg/L
	Acido ossalico	Salato/Ossidato	500mg/L
	Acido citrico	Acido/Aspro	400mg/L
	Acido lattico	Acido/Aspro	400mg/L
	Acido piruvico	Foraggio	300mg/L
Composti fenolici	4-vinil guaiacolo	Amaro/Garofano	0,3mg/L
	4-vinil fenolo	Affumicato	0,2mg/L
Alcoli monoterpenici	Linalolo	Lavanda	5µg/L
	α-terpineolo	Lillà	2mg/L
	β-citronellolo	Limone/Lime	8µg/L

Figura 8. Principali composti volatili e loro valori soglia (Michel et al., 2016).

1.6.1 ALCOLI SUPERIORI

Gli alcoli superiori (di cui i più comuni sono propanolo, isobutanolo, alcol isoamilico) sono i composti volatili maggiormente presenti nelle bevande alcoliche fermentate. Sono chiamati alcoli superiori in quanto contengono più atomi di carbonio rispetto all'etanolo che è composto da due atomi di carbonio. Vengono prodotti sia attraverso vie cataboliche (pathway di Ehrlich, *Figura 9*) che anaboliche (il metabolismo degli aminoacidi). Nella via catabolica, gli aminoacidi presenti in eccesso nelle cellule derivanti dalla degradazione delle proteine del malto o sintetizzati dalle cellule per via anabolica, subiscono una reazione di transaminazione: si ottengono i rispettivi α -chetoacidi (2-ossiacidi). Successivamente tali composti in eccesso vengono convertiti in aldeidi e quindi in alcoli dalle decarbossilasi e dall'alcool deidrogenasi, rispettivamente.

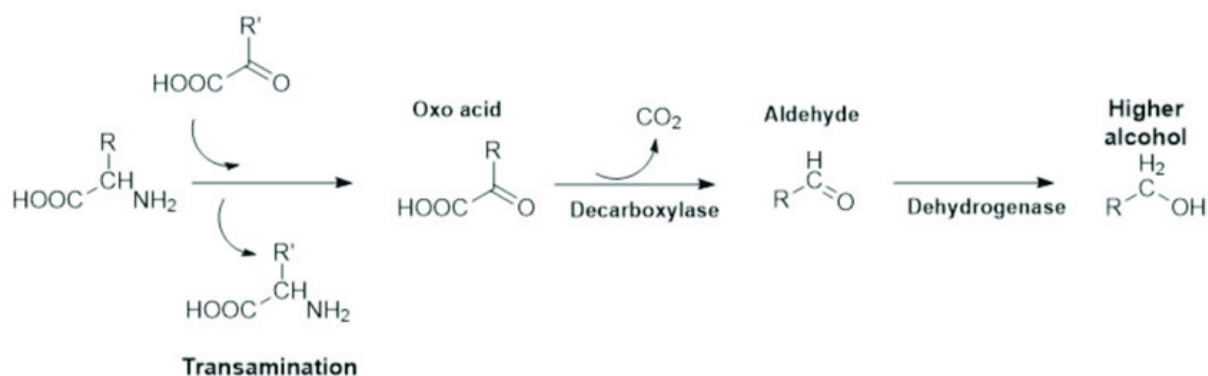


Figura 9. Pathway di Ehrlich (Inês M. Ferreira and Luís F. Guido, 2018).

Nella via anabolica o biosintetica invece, gli alcoli superiori sono sintetizzati dai 2-ossiacidi durante la sintesi degli aminoacidi dalla fonte di carboidrati (*R. Willaert and V.A. 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 (*Y. He et al., 2014; I.M. Ferreira and L.F. Guido, 2018*). Gli alcoli superiori sono direttamente coinvolti nella formazione di aromi e nella qualità della birra. I principali sono l'*n*-propanolo che contribuisce al loro aroma alcolico conferendo anche un retrogusto a tratti dolciastro;

l'alcol isoamilico, il secondo metabolita più abbondante, il quale contribuisce all'aroma alcolico-fruttato tipico delle birre in stile ale. E' responsabile infatti degli aromi dei frutti esotici in generale (ananas, mango, papaya, arancia, frutta della passione); il 2-metilbutanolo e isobutanolo che sono composti minori ma, insieme, rafforzano le proprietà aromatiche dell'alcol isoamilico. Gli alcoli superiori sono anche responsabili della formazione di esteri, che costituiscono il principale gruppo di composti determinanti il sapore della suddetta bevanda (*S. Holt et al., 2019*).

1.6.2ESTERI

Gli esteri sono i composti volatili maggiormente responsabili dell'aroma delle bevande alcoliche fermentate. Quelli 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), l' esanoato di etile (aroma di mela dolce, valore soglia 0,005 mg/L), 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). Questi composti vengono generalmente prodotti durante la fermentazione primaria tramite reazioni di condensazione tra acidi organici e alcoli, catalizzate dagli enzimi prodotti dai lieviti (*Ferreira and Guido, 2018*).

Possono essere suddivisi in due categorie: gli esteri acetati (ottenuti dalla condensazione tra gruppi acetati e etanolo/alcoli superiori) e gli esteri degli acidi grassi a catena media (MCFA), ottenuti dalla reazione tra etanolo/alcoli superiori e catene aciliche (acidi grassi) di media lunghezza. 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*).

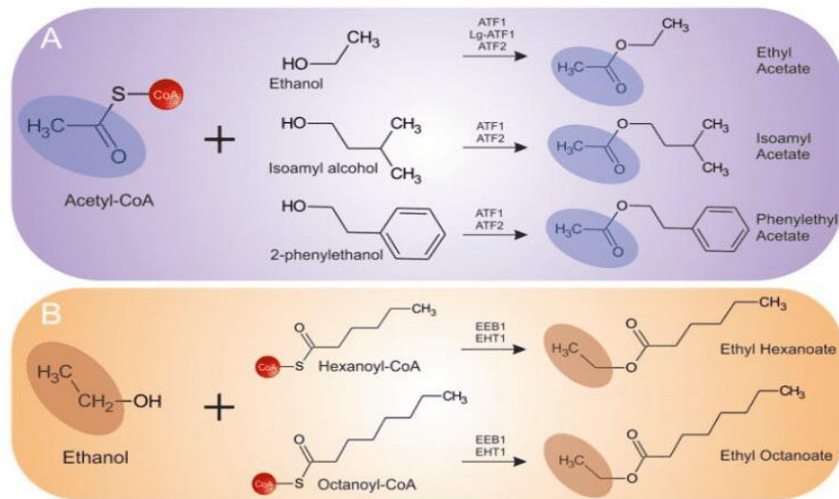


Figura 10. Reazioni di produzione di esteri (Pires et al., 2014).

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 (K.J. 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 (K.J. Verstrepen et al., 2003).

1.6.3 COMPOSTI CARBONILICI

I due principali composti volatili carbonilici sono l'acetaldeide e il diacetile. L'acetaldeide è un composto indesiderato dai produttori in quanto conferisce alla bevanda fermentata un sapore di mela

verde erbaceo sgradevole. L'acetaldeide è un prodotto intermedio del meccanismo produzione di alcol etilico e la restante parte che non viene convertita rimane nel substrato in concentrazioni al di sotto del valore soglia. In alcuni casi però, a causa dell'abbassamento di temperatura durante la fermentazione o a causa di presenza di ossigeno, questo composto può superare determinati valori e causare un difetto di sapore nella birra. 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 (*M. Michel et al., 2016*).

1.6.4 ACIDI ORGANICI

Il 50% degli acidi organici presenti nella birra derivano dal mosto, mentre la parte restante deriva dal metabolismo microbico. Gli acidi organici a corta catena di carbonio derivano sia dall'incompleto ciclo degli acidi tricarbossilici (durante la crescita anaerobica del lievito) sia dal catabolismo degli aminoacidi. Tali acidi (piruvato, acetato, lattato, citrato, succinato, malato, oxo-acidi) sono coinvolti nella riduzione del pH durante la fermentazione e conferiscono un gusto "acido" alla birra. Gli acidi grassi a media catena (C6-C12), liberati dall'anabolismo degli acidi grassi a lunga catena e dalla lisi cellulare, risultano tossici per i lieviti ed infine gli acidi grassi a lunga catena, provenienti principalmente dal mosto, sono considerati indesiderati nei confronti del gusto e della stabilità della schiuma. Gli acidi volatili principalmente presenti nella birra sono: acido butirrico, acido isobutirrico, acido valerico, acido iso-valerico, acido esanoico (acido caproico), acido ottanoico (acido caprilico), acido decanoico (acido caprico), acido dodecanoico (acido laurico). Tali acidi se presenti in concentrazioni superiori ai 6 mg/L possono essere responsabili di un sapore rancido, butirrico, di formaggio o di vecchio (*D. Smogrovicova et al., 1999; M. Michel et al., 2016*).

1.6.5 IDROCARBURI

Si ottengono da decarbossilazione catalizzata dagli enzimi fenil acrilico decarbossilasi e ferulico decarbossilasi, presenti esclusivamente nei lieviti utilizzati nel processo ad alta fermentazione, come il *S. cerevisiae*.

1.6.6 COMPOSTI SOLFORATI

Altri 30 prodotti che si ottengono durante la fermentazione sono i composti solforati, come l'acido solfidrico e l'anidride solforosa. Quest'ultima è desiderabile in quanto agisce come antiossidante e inoltre stabilizza i composti carbonilici reattivi (aldeidi e chetoni) responsabili di aromi sgradevoli. L'acido solfidrico invece è un composto indesiderato poiché determina un caratteristico odore di uova marce (*B. Vanderhaegen et al., 2003*). Altri composti sono il solfito (pungente: soglia, 10 mg L⁻¹) e il dimetilsolfuro (cavolo cotto: soglia, 30 µg L⁻¹) (*Ferreira and Guido, 2018*). Molti derivano direttamente dalle materie prime, mentre 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.

1.6.7 COMPOSTI FENOLICI

I composti fenolici sono caratteristici per quel retrogusto di speziato. La sintesi parte dagli acidi fenolici, come gli acidi idrocinnamici tipici del mosto di birra, che possono essere convertiti in derivati vinili grazie a diversi meccanismi, come 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 (*M. Lentz, 2018*). I lieviti che presentano questo enzima sono definiti POF.

1.6.8 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) (*M. Michel et al., 2016*).

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. Possiamo riconoscere circa 500 di questi composti aromatici, i quali conferiscono un profilo caratteristico per quanto riguarda l'accettabilità da parte del consumatore, ma gli stessi possono essere considerati un difetto se raggiungono livelli troppo elevati.

CAPITOLO 2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni è sempre più in crescita l'attenzione dei consumatori al benessere anche mediato da una dieta sana. Consapevole del fatto che per raggiungere un ottimo stato di salute occorre seguire una corretta alimentazione oltre che un corretto stile di vita, il consumatore medio mira all'acquisto di prodotti alimentari di qualità, andando a direzionare la domanda di mercato. Pertanto, le aziende stanno provvedendo all'immissione sugli scaffali di prodotti innovativi che propongano un miglioramento di una certa funzionalità fisiologica dell'organismo, al di là del loro fornire nutrienti di base. Al fine di ottenere questo risultato si sta puntando all'utilizzo di materie innovative contenenti molecole bioattive da aggiungere ad alimenti e bevande per funzionalizzarle, oppure sottoporre le materie prime ad innovative tecniche di lavorazione al fine di ottenere un prodotto migliorato che venga considerato funzionale per l'organismo. Al momento, le bevande sono di gran lunga le più interessanti categorie di alimenti funzionali a causa della praticità e della possibilità di soddisfare le richieste dei consumatori in termini di contenuto, dimensioni, forma e aspetto, nonché facilità di distribuzione e conservazione per prodotti refrigerati e stabili. Tra i composti bioattivi che possono arricchire le bevande si possono citare tra cui vitamine, minerali, antiossidanti, acidi grassi ω -3, estratti vegetali e fibre, prebiotici e probiotici (*L. Ayed et al., 2020*). La maggior parte delle bevande esistenti ad oggi sono bevande lattiero-casearie commerciali arricchite con componenti bioattivi, come gli acidi grassi ω -3, acido α -linoleico (C18: 3 n-3, ALA), acido eicosapentaenoico (C20: 5 n-3, EPA) e acido docosaesanoico; tuttavia l'aumento della percentuale di popolazione intollerante ad alcuni composti presenti nella matrice latte e la crescente tendenza della popolazione a seguire un'alimentazione vegetale ha portato alla ricerca di nuovi prodotti contenenti ceppi probiotici, in particolare bevande a base di frutta, verdura, cereali e soia. In questo contesto si colloca tale tesi che mira a selezionare substrati sostenibili derivanti da sottoprodotti e ricchi di fibre idonei alla crescita di ceppi di lievito selezionati che garantiscono da un lato un prodotto di qualità e dall'altro conferiscono proprietà funzionali al consumatore, dal momento che si ritrovano vivi in bottiglia fino al tempo medio di conservazione (TMC). Lo scopo di tale studio sperimentale per tanto è quello di

valorizzare un sottoprodotto derivante da produzione di birra artigianale, ottenendo un prodotto a bassa gradazione alcolica, potenzialmente probiotico, ricco di composti bioattivi che lo rendono funzionale e con un profilo sensoriale complesso e particolare, valutando le prestazioni di fermentazione dei lieviti impiegati, il profilo analitico e volatile. Quindi in questo lavoro i benefici di una bevanda fermentata a base di cereali e un infuso di rooibos con capacità antiossidante, sono stati miscelati e usati come substrato di fermentazione per ceppi di lievito probiotico per produrre una bevanda sana e a basso contenuto alcolico. Nello specifico, è stato utilizzato orzo, fonte di proteine alimentari, carboidrati, vitamine, minerali e fibre solubili (arabinosilano e β -glucano che abbassano l'indice glicemico) e fermentato con ceppi di lievito probiotico selezionati appartenenti alle specie *Meyerozyma guilliermondii*, *Lachancea thermotolerans*, *Debaryomyces hansenii*.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1. CEPPI DI LIEVITO

Per lo svolgimento di questa prova sono stati utilizzati ceppi di lievito non-*Saccharomyces*, riportati nella *Tabella 1* che appartengono alla Collezione di Lieviti del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) dell'Università Politecnica delle Marche (Italia). Si tratta di lieviti non commerciali, isolati da diverse matrici naturali e selezionati per le loro caratteristiche probiotiche, come precedentemente testato (*Agarbaty et al., 2020*, *Agarbaty et al., 2021*, *Agarbaty et al., 2024*). Un ceppo commerciale di *S. cerevisiae* US-05 (Fermentis, Lesaffre, France) è stato utilizzato come ceppo di controllo.

I ceppi sono stati rinfrescati su terreno YPD agar: estratto di lievito (10 g/l); peptone (20 g/l); glucosio (20 g/l); agar (20 g/l); e conservati alla temperatura di 4°C. Per la conservazione a lungo termine, invece, i ceppi sono stati crioconservati in terreno contenente glicerolo (80%) alla temperatura di -80°C.

Specie di lievito	Codice	Fonte di isolamento
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Lt 101	Uva
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Mg 112	Pane d'api
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Dh 36	Formaggio
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	US05	Fermentis, Lesaffre

Tabella 1. Ceppi di lievito utilizzati nello studio.

3.2 PREPARAZIONE DEL SUBSTRATO DI FERMENTAZIONE

3.2.1 ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE

Il substrato di fermentazione è stato ottenuto usando l'acqua di lavaggio delle trebbie provenienti da mosto PILS, fornito del birrificio "Birra dell'Eremo" di Assisi (PG), in un batch da 1,5 litri. L'acqua di lavaggio è il prodotto ottenuto alla fine della fase di ammostamento: il mosto è stato allontanato dalla parte solida (dalle bucce del malto macinato) e 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.

3.2.2 PREPARAZIONE ROOIBOS

Dopo aver messo da parte una quantità per le future analisi chimiche, le acque di lavaggio delle trebbie sono state unite con un 40% di infuso di foglie di rooibos ossidate (rooibos rosso), L'infuso di rooibos rosso è stato ottenuto come segue: sono state pesate 5 g di foglie di Rb e messe in una teiera di pyrex con l'aggiunta di 400 ml di H₂O Frasassi, precedentemente fatta bollire in bollitore d'acqua. L'infuso è stato fatto bollire al microonde per 5 minuti, fermandosi di tanto in tanto per raccogliere le foglie sui bordi. L'operazione è stata ripetuta fino ad ottenere 1,4 L di rooibos (*Figura 11*).



Figura 11. Infuso di rooibos durante bollitura.

L'infuso bollito è stato quindi filtrato attraverso un colino a maglie fini prima dell'uso e aliquotato in 8 beute dalla capacità di 450 mL l'una e chiuse con valvole di Muller contenenti metabisolfito.

3.3 ALLESTIMENTO DELLA PROVA FERMENTATIVA

I ceppi di lievito selezionati sono stati rinfrescati e sono state allestite delle pre-culture in falcon contenenti 40 ml di estratto di malto al 10%.

Le pre-culture sono lasciate incubare per 48/72 h a 25 °C. Trascorso questo tempo, le pre-culture sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 minuti, risospese in acqua sterile e sottoposte alla camera di toma per le conte di vitalità al fine di calcolare la quantità di pre-cultura da inoculare nel substrato di partenza per avere una concentrazione finale di 10^6 cellule/mL. Sono state riempite con 450 mL di substrato 2 beute per ogni ceppo, le quali successivamente all'inoculo sono state pesate e fatte fermentare alla temperatura di 18-20 °C per 20 giorni (*Figura 12*), registrando quotidianamente con una bilancia di precisione la diminuzione di peso dovuta alla perdita di CO₂ fino a quando non è stato ottenuto un valore pressoché costante, indice che la fermentazione era giunta al termine.



Figura 12. Substrato inoculato in fermentazione.

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

Trascorso il tempo nella cella fredda, il contenuto delle beute è stato trasferito in delle bottiglie precedentemente sterilizzate dalla capacità di 330 mL con l'aggiunta di 2,5 g di glucosio. Le bottiglie sono state quindi sigillate con appositi tappi come mostrato in *Figura 13* e lasciate rifermentare in bottiglia a 18-20°C per circa 7-10 giorni; trascorso questo periodo sono state conservate in cella fredda a 4 °C.



Figura 13. Fase di imbottigliamento.

3.5 TERRENI DI COLTURA

I terreni di coltura utilizzati sono:

1. YPD Agar (Yeast extract - Peptone - Dextrose), utilizzato per il mantenimento, la conservazione e le conte vitali su piastra dei lieviti, ed è costituito da:
 - Estratto di lievito (1%);
 - Peptone (2%);
 - Glucosio (2%);
 - Agar (2%).

3.6 ANALISI MICROBIOLOGICHE

3.6.1 MONITORAGGIO DELLA FERMENTAZIONE

L'evoluzione della fermentazione è stata monitorata per via gravimetrica registrando una volta al giorno la perdita in peso espressa come grammi di CO₂ svolta. Il calo in peso è stato monitorato fino

al termine della fermentazione e la quantità di CO₂ prodotta è stata utilizzata per esprimere l'attività fermentativa. Nella prova di micro fermentazione l'inoculo effettuato (10⁶ cell/mL,) è stato effettuato mediante camera di Thoma; la veridicità è stata verificata con conte vitali su piastra. Per effettuare le conte vitali sono state eseguite delle diluizioni seriali (*Figura 14*): si preleva 1 ml dal campione originario e si pone 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 µl 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 µl 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.

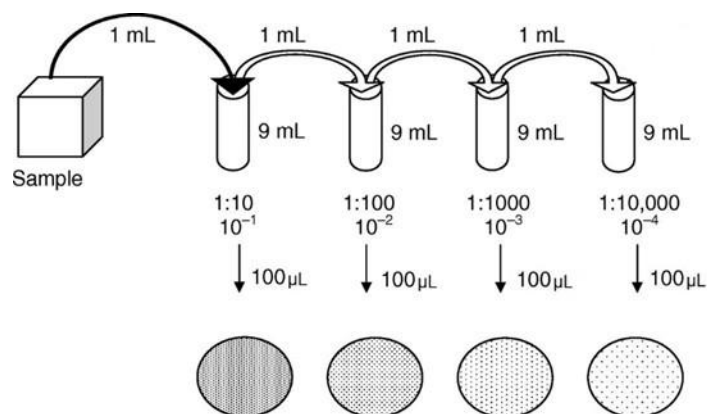


Figura 14. Diluizioni seriali.

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⁺ + ATP (disciogliere in 12 ml di acqua distillata);
- Bottiglia 3: Esocinasi + glucosio-6-fosfato deidrogenasi;
- Bottiglia 4: β -fruttosidasi in buffer di sodio citrato (pH 4.6) (disciogliere in 14 ml di acqua distillata);
- Bottiglia 5: α -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*).

Pipettare in cuvette:	Bianco	Campione	Bianco	Campione D-
	Saccarosio + D-Glucosio	Saccarosio + D-Glucosio	D-Glucosio	Glucosio
Soluzione 4 (β-fruttosidasi)	0,20 ml	0,20 ml	-	-
Campione	-	0,10 ml	-	0,10 ml
Incubare per 20 minuti. Poi aggiungi:				
Acqua distillate	2,10 ml	2,00 ml	2,30 ml	2,30 ml
Soluzione 1 (buffer)	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
Soluzione 2 (NADP/ATP)	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:				
Sospensione 3 (HK/G6P-DH)	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' α -glucosidasi.

In seguito alla misurazione dell'assorbanza occorre eseguire i calcoli riportati sotto per poter determinare la concentrazione dei tre zuccheri.

$$\Delta A = (A2-A1) \text{ campione} - (A2-A1) \text{ bianco}$$

Determinazione del saccarosio: $\Delta A \text{ saccarosio} = (\Delta A \text{ saccarosio} + \Delta A \text{ D-glucosio}) - (\Delta A \text{ D-glucosio})$

Determinazione del maltosio: $\Delta A \text{ maltosio} = ((\Delta A \text{ maltosio} + \text{saccarosio} + \text{D-glucosio}) - \Delta A \text{ D-glucosio}) - \Delta A \text{ saccarosio}$

Concentrazione glucosio = $0,7492 \times \Delta A \text{ D-glucosio}$

Concentrazione saccarosio = $1,4234 \times \Delta A \text{ saccarosio}$

Concentrazione maltosio = $0,7118 \times \Delta A \text{ maltosio}$

3.6.3 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⁺/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*):

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

Tabella 3. Protocollo determinazione acido L-lattico.

3.6.4 DETERMINAZIONE ETANOLO

Durante questo studio è stata determinata la quantità di etanolo a fine fermentazione, nello specifico per valutare l'attività di alcuni ceppi a produrre etanolo, considerando che ad eccezione del controllo, sono tutti ceppi a bassa fermentazione il quale scopo di utilizzo è quello di ottenere un prodotto che contenga la minor quantità possibile di etanolo. Per lo svolgimento di tale analisi è stato utilizzato il kit Megazyme per la determinazione dell'acido etanolo, il quale contiene:

- Bottiglia 1: Tampone (15 mL, pH 9,0) + sodio azide (0,02% p/v);
- Bottiglia 2: NAD⁺;
- Bottiglia 3: Soluzione di aldeide deidrogenasi (3,25 mL);
- Bottiglia 4: Soluzione di alcol deidrogenasi (1,3 mL);

- Bottiglia 5: Soluzione standard di etanolo (5 mL, 5 mg/mL).

Preparate le soluzioni si effettua l'analisi seguendo il protocollo sottostante (Tabella 4):

Pipettare nelle cuvette:	Bianco	Campione
Acqua deionizzata (~25°C)	2,10 mL	2,00 mL
Campione	-	0,10 mL
Soluzione 1 (buffer)	0,20 mL	0,20 mL
Soluzione 2 (NAD⁺)	0,20 mL	0,20 mL
Sospensione 3 (Aldeide deidrogenasi)	0,05 mL	0,05 mL
Leggere l'assorbanza delle soluzioni (A ₁) dopo circa 2 minuti e aggiungere:		
Sospensione 4 (Alcol deidrogenasi)	0,02 mL	0,02 mL
Al termine della reazione (dopo 5 minuti) leggere le assorbanze delle soluzioni (A ₂).		

Tabella 4. Protocollo determinazione etanolo.

3.6.5 DETERMINAZIONE ALCOLI SUPERIORI

La preparazione del campione per la valutazione degli alcoli superiori prevede la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 ml) con filtro cut-off 0.2 µm, a cui si aggiunge uno standard interno, l'1-pentanololo ad una concentrazione di 162 mg/l. A questo punto si procede all'analisi mediante gascromatografia (GC): 1 µl di campione viene iniettato direttamente nel gascromatografo Shimadzu GC-2014 con detector a ionizzazione di fiamma, utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus, secondo il protocollo che segue:

- temperatura dell'iniettore: 150°C;
- colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25 µm);
- iniettore: split 10:2; iniettato 1 µl;
- temperatura: T iniziale 35°C per 4 minuti, poi un gradiente di 5°C/min fino a 200°C e isoterma di 200°C per 1 minuto;
- gas vettore: Azoto. Ogni composto contenuto nel campione fornisce un segnale (picco) che permette la sua identificazione sulla base del tempo impiegato per arrivare al rivelatore.

3.6.6 ANALISI DELLA COMPONENTE VOLATILE

Per la determinazione della componente volatile, è stata utilizzata la tecnica di micro estrazione in fase solida (SPME), che può essere distinta in due tipologie: in spaziodi 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 5ml 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 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 ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE (radicale DPPH)

La determinazione dell'attività antiossidante delle cellule di lievito è stata eseguita utilizzando il radicale 1,1-difenile-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma). La prova permette di determinare il potere antiossidante mediante il potenziale di riduzione del radicale chimico DPPH attraverso il trasferimento di un idrogeno. Il DPPH è inizialmente di colore viola e diventa DPPH-H virando a giallo pallido (*Figura 15*). La quantità di DPPH-H formata dipende dalla concentrazione dell'antiossidante.

Procedura:

- Prelevare 800 µl di sospensione cellulare di lievito e porla nell' eppendorf fornita e contenente già 1 ml di radicale DPPH (0,2 mM) e vortexare;
- Preparare la soluzione del bianco aggiungendo 800 µl di acqua deionizzata ad una seconda provetta contenente il DPPH;
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio;
- Centrifugare a 12000 rpm per 5 minuti;
- Misurare l'assorbanza a 517 nm con spettrofotometro prelevando 1 ml di surnatante;
- La percentuale di riduzione del DPPH è stata calcolata come segue: $[1 - A_{\text{campione}} / A_{\text{bianco}}] \times 100$.

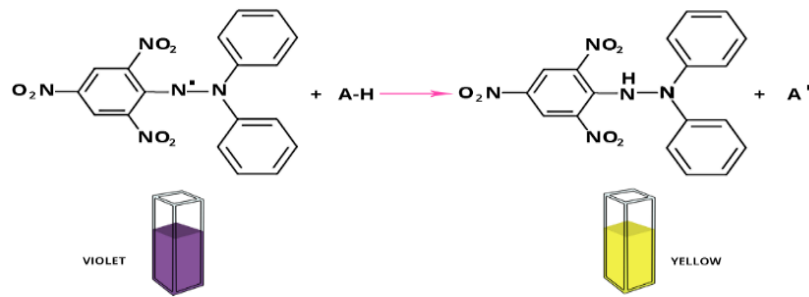


Figura 15. Riduzione del radicale DPPH.

3.7 ANALISI SENSORIALE

Terminato il periodo di rifermentazione in bottiglia, le birre sono state sottoposte ad analisi sensoriale (metodo A-EBC 13.10/1997). Il test è stato allestito sulla base di 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) (Figura 16). Ad un gruppo di 4 assaggiatori formati è stato chiesto di esprimere un parere su ogni categoria sensoriale, utilizzando una scala da 1 a 10. I risultati sono stati mediati e sottoposti ad analisi statistica. I dati così elaborati sono stati usati per costruire grafici che forniscono informazioni sia sul contributo di ciascun descrittore sulla qualità organolettica complessiva delle birre, sia sulle differenze significative tra le birre in relazione ad ogni descrittore.

CAPITOLO 4. RISULTATI

4.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA

Tre ceppi di lievito non-*Saccharomyces*, appartenenti alle specie *M. gulliermondii*, *L. thermotolerans* e *D. hansenii*, selezionati precedentemente per le loro caratteristiche funzionali e probiotiche, sono stati testati per valutare la loro attitudine fermentativa su un substrato a base di acque di lavaggio delle trebbie proveniente dall'ammestamento di birra addizionate a un infuso di rooibos. Le performance fermentative sono state comparate con l'attività fermentativa del ceppo di controllo *S. cerevisiae* US-05.

L'attitudine fermentativa dei campioni in esame è espressa come quantità di anidride carbonica (grammi) liberata (*Figura 17*).

I ceppi di lievito non-*Saccharomyces* testati hanno mostrato un andamento fermentativo molto simile tra loro fino al quarto giorno di fermentazione, per poi mostrare delle lievi differenze nel proseguo del percorso fermentativo. In particolare il ceppo *M. gulliermondii* 112, il quale ha riportato un andamento fermentativo più lento rispetto le altre specie testate, con una perdita finale di CO₂ di 3,89 g.

Al contrario, i ceppi *D. hanesnii* 36 e *L. thermotolerans* 101 hanno evidenziato un'attitudine fermentativa sovrapponibile tra loro e una quantità di CO₂ svolta 4,46 g e 4,3 g rispettivamente. Inoltre, il ceppo di controllo *S. cerevisiae* US-05, ha evidenziato un andamento fermentativo più veloce rispetto a tutti i ceppi testati, con un quantitativo di CO₂ finale svolta pari a 4,98 g.

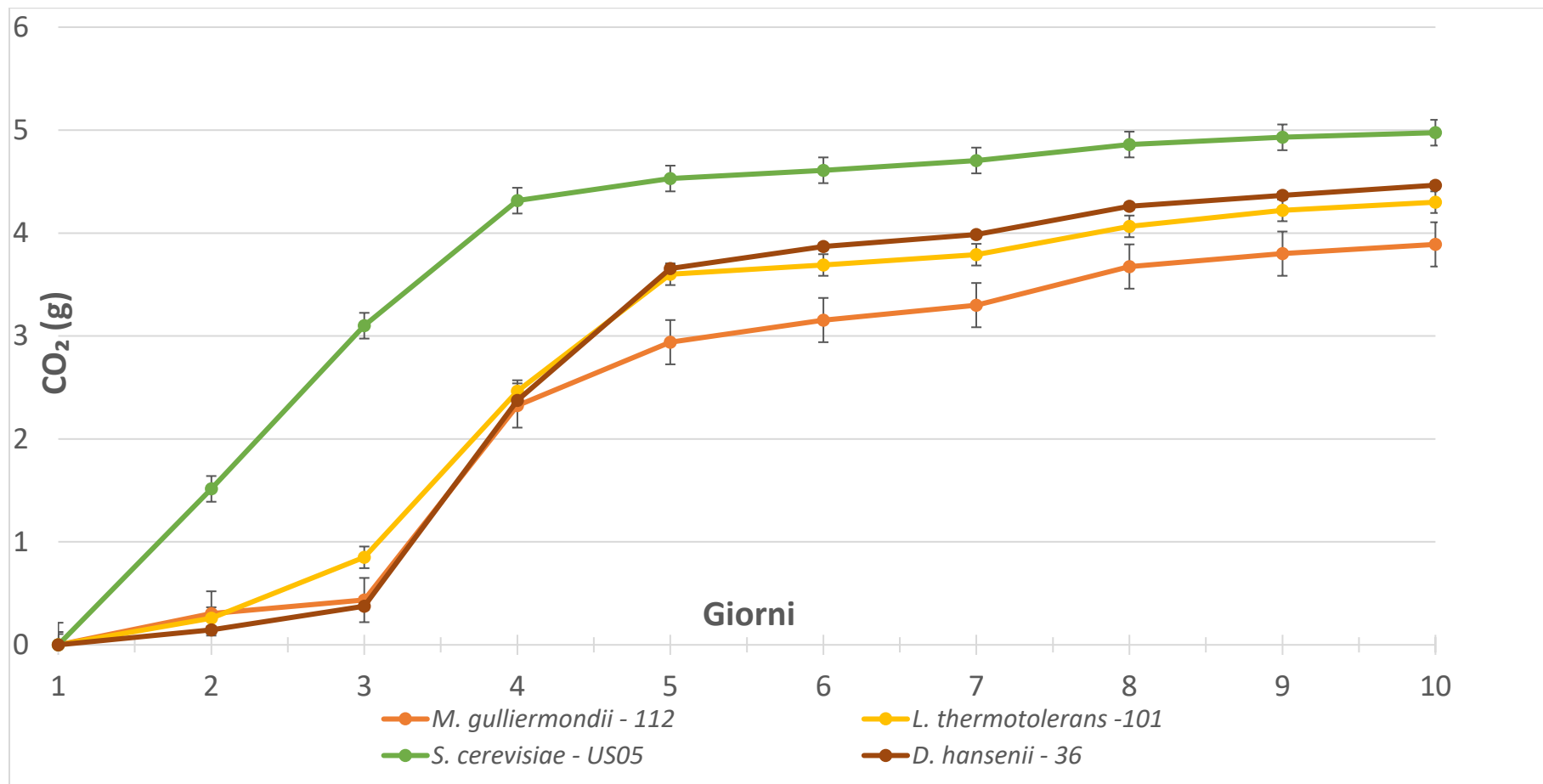


Figura 17. Cinetica fermentativa dei ceppi *S. cerevisiae* US-05, *M. guilliermondii* 112, *L. thermotolerans* 101 e *D. hansenii* 36 su acqua di lavaggio delle trebbie provenienti dall'ammestamento di birra addizionata con rooibos.

4.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA

Il monitoraggio dell'evoluzione della popolazione microbica è stato eseguito con le conte vitali su piastra all'inizio della fermentazione, al termine della fermentazione e dopo 5 mesi dalla rifermentazione in bottiglia.

Tutti i ceppi sono stati inoculati ad una concentrazione di circa 10^6 UFC/ml (*Figura 18*). A fine fermentazione, dopo 19 giorni, i ceppi di lievito testati hanno mostrato una concentrazione cellulare di circa 10^7 UFC/ml, con l'eccezione di *D. hansenii 36* che ha evidenziato una concentrazione cellulare di 10^8 UFC/ml.

Al termine della fermentazione, i fermentati sono stati sottoposti ad una fase di rifermentazione in bottiglia, al termine della quale sono stati poi stoccati a 4°C per 5 mesi. Trascorso tale periodo, è stata valutata la vitalità dei ceppi inoculati. Tutti i ceppi hanno mostrato una riduzione della vitalità rispetto a alla fine della fermentazione di circa 1 Log. ad eccezione di *L. thermotolerans 101*, che ha mostrato una concentrazione cellulare uguale a quella del tempo T19. I dati ottenuti dopo 5 mesi hanno comunque sottolineato una vitalità di 10^7 - 10^6 UFC/mL.

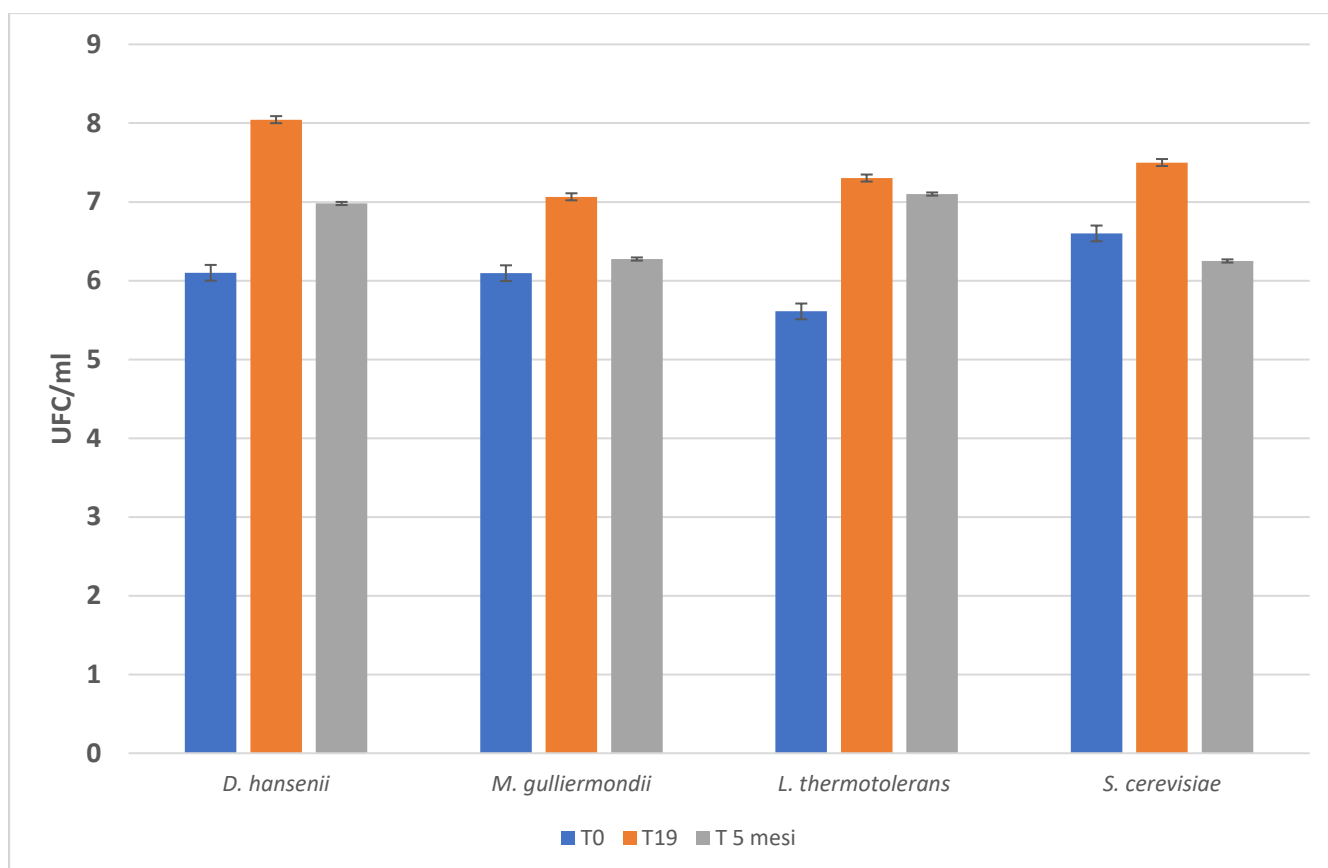


Figura 18. Evoluzione della popolazione microbica.

4.3 ANALISI CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

4.3.1 ANALISI ZUCCHERI RISIDUI

I risultati relativi al contenuto di zuccheri residui delle prove ottenute sono riportati nella *Tabella 5*.

Dai risultati ottenuti si evince che tutti i ceppi selezionati hanno consumato tutto il glucosio presente nel substrato iniziale (1,5 g/L), andamento simile per quanto riguarda il consumo di saccarosio, con l'eccezione dei ceppi *D. hansenii* 36 e *M. guilliermondii* 112 che hanno mostrato rispettivamente 0.61 g/L e 0.5 g/L di saccarosio residuo.

Per quanto riguarda il maltosio residuo, zucchero più abbondante nel substrato di partenza (13,5 g/L), dalle prove effettuate emerge una più alta quantità di questo zucchero residuo rispetto agli altri nella fermentazione condotta con *D. hansenii* 36, ascrivibile al basso potere fermentativo.

Il campione con minore concentrazione di maltosio residuo (0,13 g/L) è *S. cerevisiae US-05*, il ceppo di controllo con maggior potere fermentativo.

CEPPI	SACCAROSIO (g/L)	MALTOSIO (g/L)	GLUCOSIO (g/L)
<i>S. cerevisiae US-05</i>	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.03 ± 0.00
<i>L. thermotolerans 101</i>	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.03 ± 0.00
<i>D. hansenii 36</i>	0.61 ± 0.01	1.28 ± 0.02	0.06 ± 0.00
<i>M. guilliermondii 112</i>	0.50 ± 0.20	0.25 ± 0.01	0.07 ± 0.01

Tabella 5. Concentrazione zuccheri residui. Zuccheri iniziali presenti su substrato: saccarosio 2,8 g/L; glucosio 1,5 g/L; maltosio 13,5 g/L.

4.3.2 CONCENTRAZIONE ACIDO LATTICO ED ETANOLO

I risultati relativi alla quantità di etanolo prodotto durante la fermentazione sono riportati nella Tabella 6. Le % v/v di etanolo prodotto risultano essere coerenti con l'andamento fermentativo e con la quantità di CO₂ svolta durante la fermentazione.

Infatti si osserva una percentuale di etanolo maggiore nella prova condotta con lo starter *S. cerevisiae US-05*, che risulta essere pari a 0,77 % v/v. Nelle tesi svolte con *M. guilliermondii 112*, *L. thermotolerans 101* e *D. hansenii 36* si osservano rispettivamente 0,39 % v/v, 0,12 % v/v e 0,13 % v/v di etanolo.

I valori di acido L-lattico prodotto durante le fermentazioni confermano la capacità di *L. thermotolerans 101* di produrre questo composto a partire da zuccheri, 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 0,29 g/L; nelle altre prove i valori variano da 0,17 g/L a 0,19 g/L.

CEPPI	ACIDO LATTICO g/L	ETANOLO % v/v
<i>S. cerevisiae US05</i>	0.28 ± 0.01	0.77 ± 0.20
<i>L. thermotolerans 101</i>	0.29 ± 0.01	0.12 ± 0.05
<i>D. hansenii 36</i>	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.30
<i>M. guilliermondii 112</i>	0.19 ± 0.00	0.39 ± 0.21

Tabella 6. Valori acido lattico ed etanolo post fermentazione.

4.4 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

Nella *Tabella 7* sono riportati i risultati dei principali sottoprodotti della fermentazione. La produzione e la concentrazione finale di acetaldeide, un composto intermedio molto attivo della fermentazione alcolica, riflettono strettamente l'attività di fermentazione. Infatti, i lieviti *M. guilliermondii 112* e *L. thermotolerans 101* mostrano una quantità di acetaldeide rispettivamente di 4,61 mg/L e 7,8 mg/L, diversamente dal lievito *D. hansenii 36* che ha mostrato una concentrazione di 0,00 mg/L.

La produzione di etilacetato è risultata molto variabile tra i ceppi testati. *L. thermotolerans 101* ha mostrato la più bassa produzione di etilacetato; *M. guilliermondii 112* e *D. hansenii 36* hanno presentato concentrazioni di etil acetato rispettivamente di 851 mg/L 178,14 mg/L, le concentrazioni più alte non solo tra i ceppi non-*Saccharomyces* testati, ma anche a confronto con lo starter *S. cerevisiae*.

Gli alcoli superiori quali l'n-propanolo, l'isobutanolo e l'alcol amilico sono stati rilevati in minima quantità e talvolta non rilevati, forse a causa del catabolismo molto basso di amminoacidi in questo substrato. Il propanolo in quantità più elevate è stato rilevato nel campione ottenuto dal ceppo *D. hansenii* 36 (66,6 mg/L); nel ceppo *L. thermotolerans* 101 non è stato rilevato. Per quanto riguarda l'alcol isoamilico esso è stato riscontrato solo nei ceppi di *S. cerevisiae* e *D. hansenii* 36 con basse concentrazioni (rispettivamente 5,15 mg/L e 11,1 mg/L).

Composti secondari (mg/L)	<i>S. cerevisiae</i> US05	<i>M. guilliermondii</i> 112	<i>D. hansenii</i> 36	<i>L. thermotolerans</i> 101
Acetaldeide	8.35 ± 0.50	4.61 ± 0.12	0.00 ± 0.00	7.80 ± 1.90
Etilacetato	51.01 ± 2.8	851.38 ± 13.68	178.14 ± 5.7	18.78 ± 0.35
Propanolo	33.7 ± 0.00	33.5 ± 1.15	66.6 ± 12.9	0.00 ± 0.00
Isoamilico	20.62 ± 1.34	15.06 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Amilico attivo	5.15 ± 0.96	0.00 ± 0.00	11.1 ± 0.9	0.00 ± 0.00

Tabella 7. Principali composti secondari.

4.5 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

Le concentrazioni dei principali composti volatili che sono stati saggiati nei campioni sono riportate in Tabella 8.

Analizzando i dati, si osserva che le prove condotte con *L. thermotolerans* 101 e *M. guilliermondii* 112 hanno prodotto le quantità maggiori di etilbutirrato (aroma di ananas), pari rispettivamente a 0,19 mg/L e 0,26 mg/L.

Per quanto riguarda l'acetato di isoamile, composto che conferisce alle bevande un aroma di banana, le concentrazioni ritrovate sono molto basse e in alcuni casi il composto è completamente assente.

L'etilesanoato (aroma di mela, miele) è stato rilevato in maggiore quantità (0,03 mg/L) nel prodotto ottenuto con *D. hansenii* 36; la presenza di esilacetato è stata rinvenuta solo nel campione ottenuto con *M. guilliermondii* 112, con una concentrazione di 0,01 mg/L.

La tesi condotta *S. cerevisiae* US-05 è l'unica ad aver riportato la presenza di etilottanoato, composto responsabile dell'aroma floreale, con una concentrazione di 0,01 mg/L. Questo campione inoltre presenta la concentrazione più alta di esanolo (0,15 mg/L), composto che conferisce alla bevanda aroma di uva e ritrovato negli altri campioni in quantità molto basse che vanno da 0,03 mg/L nel campione ottenuto con *M. guilliermondii* 112 a 0,05 mg/L nel campione ottenuto con *D. hansenii* 36; questo composto è assente nel campione ottenuto con *L. thermotolerans* 101.

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 0,05 mg/L (*D. hansenii* 36). Facendo riferimento al geraniolo, monoterpene che conferisce un aroma floreale, è stato riscontrato in quantità molto piccole in tutte le prove.

Il nerolo e il dietilsuccinato sono presenti in quantità molto basse in tutti campioni e talvolta assenti.

Infine, il contenuto di feniletilacetato (aroma fruttato, miele) è risultato essere maggiore nei campioni ottenuti con *S. cerevisiae* US-05 (0,15 mg/L) e con *D. hansenii* 36 (0,08 mg/L), mentre il 2-feniletanolo (aroma di rosa) presenta le concentrazioni maggiori nelle prove svolte con *M. guilliermondii* 112 e con *S. cerevisiae* US-05 (4,29 mg/L e 8,76 mg/L rispettivamente).

Principali composti volatili (mg/L)	<i>S. cerevisiae</i> US05	<i>M. guilliermondii</i> 112	<i>D. hansenii</i> 36	<i>L. thermotolerans</i> 101
Etilbutirrato	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.04 ± 0.00	0.19 ± 0.07
Acetato di isoamile	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.09
Etilsanoato	0.02 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.03
Esilacetato	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Esanolo	0.15 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Etilottanoato	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Linalolo	0.01 ± 0.04	0.05 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Dietilsuccinato	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Feniletilacetato	0.15 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Nerolo	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Geraniolo	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2-feniletanolo	8.76 ± 0.41	4.29 ± 0.04	1.48 ± 0.01	3.53 ± 0.22

Tabella 8. Principali composti volatili in seguito alla micro fermentazione. I dati sono le medie ± deviazioni standard.

I principali composti volatili che sono stati saggiati nei campioni dopo 5 mesi sono riportati nella *Tabella 9*. Dal confronto di questi risultati con quelli ottenuti a fine fermentazioni non emergono sostanziali differenze. Un composto che incrementa la sua concentrazione nei campioni in seguito a rifermentazione è l'acetato di isoamile (aroma di banana), che risulta essere presente in tutte le prove condotte in quantità che vanno da 0,1 mg/L (*D. hansenii 36*) fino a 0,81 mg/L (*S. cerevisiae US-05*).

Un altro composto che si ritrova in quantità superiore al termine della rifermentazione in bottiglia è il linalolo, il quale è presente nei campioni ottenuti a fine fermentazione in quantità irrisoria. Il campione che presenta una maggior concentrazione di linalolo è quello ottenuto con *L. thermotolerans 101* (0,81 mg/L). I campioni ottenuti con *M. guilliermondii 112* e *D. hansenii 36* contengono una quantità di linalolo molto simile tra loro (rispettivamente 0,59 mg/L e 0,6 mg/L), mentre il campione ottenuto con *S. cerevisiae US-05* contiene una quantità di questo composto nettamente inferiore (0,04 mg/L). Al contrario, il 2-feniletanolo si trova in un quantitativo minore rispetto ai campioni testati a fine fermentazione, con valori che vanno da 0,51 mg/ (*L. thermotolerans 101*) a 1,12 mg/L (*M. guilliermondii 112*).

I valori relativi al quantitativo degli altri composti saggiati dopo 5 mesi dalla fermentazione, quali etilbutirrato, etilesanoato, esilacetato, esanolo, etilottanoato, dietilsuccinato, fenietilacetato, nerolo e geraniolo, sono comparabili ai risultati ottenuti in seguito al periodo di fermentazione dei campioni.

Principali composti volatili (mg/L)	<i>S. cerevisiae</i> US05	<i>M. guilliermondii</i> 112	<i>D. hansenii</i> 36	<i>L. thermotolerans</i> 101
Etilbutirrato	0.05 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.49 ± 0.00	0.05 ± 0.02
Acetato di isoamile	0.81 ± 0.1	0.49 ± 0.14	0.10 ± 0.09	0.36 ± 0.00
Etilsanoato	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Esilacetato	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Esanolo	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Etilottanoato	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Linalolo	0.04 ± 0.01	0.60 ± 0.00	0.59 ± 0.03	0.82 ± 0.1
Dietilsuccinato	0.09 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01
Feniletilacetato	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Nerolo	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Geraniolo	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00
2-feniletanolo	0.88 ± 0.59	1.12 ± 0.03	0.86 ± 0.02	0.51 ± 0.03

Tabella 9. Composti volatili dopo 5 mesi, in seguito a rifermentazione in bottiglia.

4.6 ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

I dati relativi all'attività antiossidante delle bevande ottenute sono riportati nella *Tabella 10*. I risultati dimostrano che l'attività antiossidante è superiore al 65% in tutti i ceppi testati, con valori che variano dal 66% (*D. hansenii 36*) a 68,2% (*M. gulliermondii 112*).

CEPPI	<i>S. cerevisiae</i> US05	<i>M. gulliermondii</i> 112	<i>D. hansenii 36</i>	<i>L. thermotolerans</i> 101
Attività antiossidante (DPPH %)	68.0 ± 0.2	68.2 ± 0.5	66.0 ± 0.0	67,5 ± 2.8

Tabella 10. Attività antiossidante.

4.7 ANALISI SENSORIALE

Le bevande ottenute dalla fermentazione dell'acqua di lavaggio delle trebbie addizionata con infuso di rooibos sono state sottoposte ad analisi gusto/olfattiva per quanto riguarda i principali descrittori (*Figura 18*).

La bevanda ottenuta dalla fermentazione con *S. cerevisiae US-05* si presenta di colore ambrato, torbida ed è caratterizzata da una schiuma piuttosto scarsa. Presenta all'olfatto un odore dolce con note di fruttato/estere e fruttato/citrico, come di mela e di buccia di agrumi. Questo aroma però non è stato ritrovato al momento dell'assaggio, in cui ha prevalso un sapore acido e con una certa astringenza e caratterizzato da una nota di cereale. Il corpo è risultato essere quasi assente, con una lieve effervescenza.

La bevanda ottenuta invece con *M. gulliermondii 112* si presenta alla vista di un bel colore giallo dorato e dall'aspetto limpido. Si è distinta dalle altre prove per essere caratterizzata da una piacevole frizzantezza, dovuta ad una maggiore carbonazione; questa caratteristica fa sì che sia presente una schiuma bianca e consistente. Dal punto di vista olfattivo presenta una nota di fruttato/estere e fruttato citrico, ricordando l'odore di frutta matura a pasta gialla dolce. Questa nota di dolce viene ritrovata

anche al momento dell'assaggio, ma la bevanda risulta essere caratterizzata da un sapore di acido e da una certa astringenza.

D. hansenii 36 mostra un profilo gusto-olfattivo caratterizzato da note di fruttato/estere (pera molto matura); all'assaggio presentano note di fruttato/citrico, di tostato e di cereale. Per quanto riguarda il corpo qui risulta essere assente, per cui la bevanda risulta acquosa e poco carbonata. Queste bevande hanno inoltre evidenziato come carattere negativo la percezione di DMS (dimetil solfuro) che richiama l'odore di vegetale cotto.

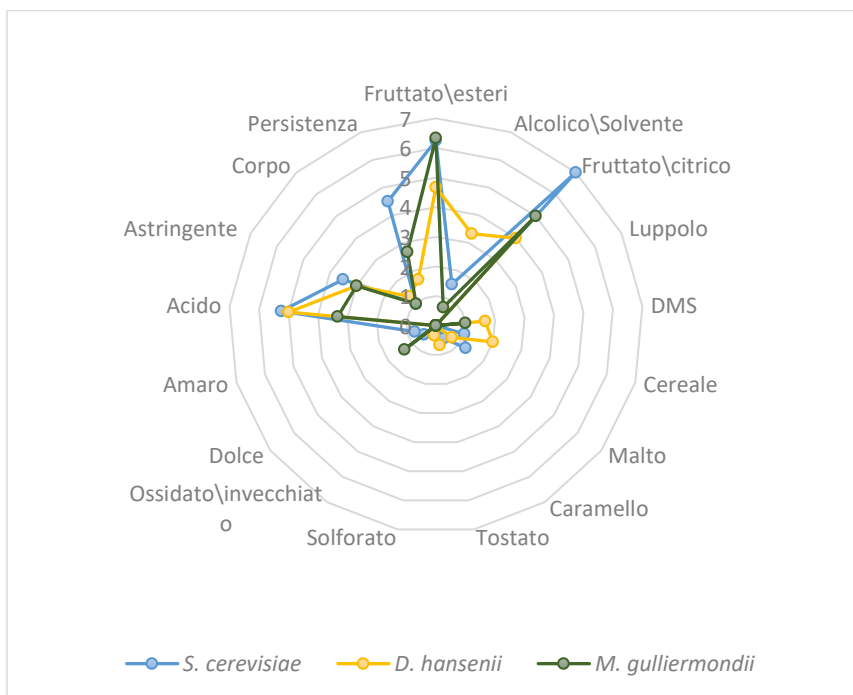


Figura 19. Profilo gusto/olfattivo riguardo i principali descrittori delle bevande ottenute dalla fermentazione di BSG addizionato con rooibos, in seguito alla fermentazione con i ceppi di lievito indicati.

CAPITOLO 5. DISCUSSIONI

Le analisi di mercato mostrano come il tasso annuo di crescita composto dei mercati globali delle bevande funzionali sia aumentato negli ultimi anni e continui ad aumentare, raggiungendo un valore stimato di 280 miliardi di dollari nei prossimi 5 anni (*Precedence Research, 2022*). Questi dati sono il risultato delle evidenze divulgate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità sui benefici per la salute di cibi e bevande funzionali, che ha contribuito all'aumento della sua popolarità a livello globale, suscitando l'interesse dei consumatori sempre più consapevoli dell'importanza della composizione e del valore nutrizionale dei loro alimenti, visto anche il declino della salute dovuto all'elevato consumo di cibi processati e di bassa qualità ed esercizio fisico insufficiente come risultato dei nuovi ritmi di vita frenetici (*A. Gupta et al., 2023*). In particolar modo l'interesse è rivolto al mondo delle bevande vegetali fermentate, data la loro praticità che permette l'assunzione di microrganismi probiotici nelle adeguate quantità (*N. Şanlıer et al., 2019*).

Alla luce di questo, il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di proporre una bevanda funzionale completamente vegetale come alternativa alle classiche bevande derivate dal latte, partendo quindi da un substrato di mosto, derivante dalle acque di lavaggio delle trebbie provenienti dal processo di ammostamento di birra, e rooibos miscelati per offrire un prodotto ricco di antiossidanti e proprietà funzionali. Dalla ricerca emerge che il consumo di rooibos è collegato a profili lipidici migliorati, livelli di glucosio nel sangue più bassi e uno stato antiossidante migliorato, sia negli individui apparentemente sani che in quelli a rischio (*D. Afrifa et al., 2023*). Uno studio condotto ne dimostra il potere anti diabetico mostrando come un consumo di 500 mL di questo infuso riduca la glicemia dopo 2 ore dall'assunzione nei pazienti affetti da diabete mellito (*N.M. Francisco, 2010*); un altro lavoro ha evidenziato il ruolo del rooibos nell'aumentare le difese antiossidanti, tramite un aumento della capacità antiossidante plasmatica dopo una singola dose di 500 mL di questo infuso fermentato, dovuto al suo contenuto di flavonoidi (*S.M. Wanjiku, 2009*).

I risultati del nostro lavoro dimostrano che le proprietà antiossidanti di questa nuova bevanda sono simili a quelli rilevati in altre bevande salutari come il tè nero (*Camellia sinensis*) e gli infusi di rooibos rosso e verde (P. Carloni et al., 2023 ; E. Damiani et al., 2019). Questa evidenza indica che queste proprietà sono legate al substrato di partenza, soprattutto alla presenza dell'infuso di rooibos, piuttosto che all'apporto metabolico dei lieviti.

Il secondo obiettivo è stato quello di condurre la fermentazione utilizzando lieviti funzionali comprovati al posto dei batteri lattici comunemente usati. In passato uno studio ha proposto una nuova bevanda fermentata e funzionale a base di mais utilizzando lievito probiotico in cocoltura con batteri lattici starter (Menezes et al., 2018). Sebbene le interazioni tra batteri lattici e *S. cerevisiae* siano già ampiamente applicate in molte fermentazioni come kefir, birra artigianale, kombucha o produzione di pasta madre, poco è stato studiato sul contributo unico dei lieviti probiotici per funzionalizzare una bevanda. Infatti, solo una manciata di studi ha dimostrato il contributo esclusivo dei lieviti probiotici (J.C. Amorim et al., 2018 ; Menezes et al., 2018). Inoltre, la bevanda proposta è caratterizzata dalla presenza di lieviti funzionali con tratti probiotici e da una bassa gradazione alcolica sempre seguendo la richiesta del mercato, data la limitata capacità dei lieviti di fermentare gli zuccheri del mosto (R. Liguori et al., 2015).

Sempre basandosi su una tematica molto attuale, ossia la problematica ambientale, in questo lavoro l'infuso di rooibos è stato aggiunto alle acque di lavaggio delle trebbie derivate dal processo di ammostamento della birra (BSG). Il BSG è il sottoprodotto più abbondante dell'industria brassicola e il considerevole numero di pubblicazioni degli ultimi 5 anni sulle potenziali applicazioni biotecnologiche del BSG nel campo alimentare rappresenta il crescente interesse scientifico su questo argomento (M. Jackowski et al., 2020). Con il fine di valorizzare questo prodotto di scarto ancora ricco di composti bioattivi e pochi zuccheri fermentescibili, di facilitare lo stoccaggio delle trebbie e di ottenere un prodotto innovativo da immettere sul mercato, questo substrato di partenza è usato per la fermentazione da parte di lieviti non-*Saccharomyces* selezionati da precedenti studi per le loro

attitudini funzionali e probiotiche (*L. thermotolerans* 101, *D. hansenii* 36, *M. guilliermondii* 112) (Agarbaty et al., 2020, Agarbaty et al., 2021, Agarbaty et al., 2024), con lo scopo di migliorare la complessità e qualità delle bevande in quanto l'attività metabolica dei lieviti porta alla produzione di composti aromatici peculiari distintivi per ogni ceppo, offrendo un'esperienza unica al consumatore (J.H. Swiegers e I.S. Pretorius, 2005).

I ceppi testati hanno mostrato un'evoluzione della fermentazione affidabile (simile a quella del ceppo di controllo *S. cerevisiae*), tutti e tre con una produzione di etanolo finale medio\bassa (da 0,12% a 0,39 % e quindi sfruttabili per la produzione di bevande low alcohol) e con profili volatili specifici e distintivi. Il ceppo *L. thermotolerans* 101 ha mostrato una produzione rilevante di acido lattico (0,29 g/L) in linea con precedenti studi (L. Canonico et al., 2022).

La specie di *D. hansenii* 36 presenta una cinetica fermentativa paragonabile a quella del controllo. Per quanto riguarda il profilo volatile spicca la produzione del composto secondario n-propanolo, alcol superiore maggiormente presente nelle birre in stile lager che contribuisce al loro aroma alcolico. Questa bevanda risulta caratterizzata da note olfattive-gustative dolci/fruttate, generalmente supportate dalla produzione di esteri e dalla nota dolce di acetato di isoamile, in accordo con un precedente studio che descrive la produzione di aromi volatili associati a burro, caramello, formaggio e frutta da parte di ceppi di *D. hansenii* provenienti da salsa di soia fermentata (D.M. Jeong et al., 2022). Al contrario, non sono state descritte note dolci nel kefir ottenuto dalla fermentazione di *D. hansenii* (A. Agarbaty et al., 2021). I risultati qui ottenuti confermano fortemente la stretta correlazione tra matrice di fermentazione, ceppo di lievito e produzione di sottoprodotti.

La bevanda che spicca per il suo profilo organolettico migliore è quella ottenuta da *M. guilliermondii* 112 che mostra note di dolcezza di frutta a pasta gialla, miele e caramello, risultato in linea con la produzione di composti volatili come acetato di isoamile etilacetato, responsabili delle

note di mela e pera, fruttate e dolci. I dati sono in accordo con quelli riportati da Dellacassa et al. (2017) che hanno descritto i vini di ananas ottenuti da ceppi di *M. guilliermondii* come caratterizzati da aromi di dolcezza come caramello, rosa e fruttato, sebbene questo lievito sia ancora poco studiato nelle bevande fermentate.

In sintesi, il mosto ottenuto da BSG riciclato potrebbe rappresentare un substrato favorevole per la produzione di bevande a basso contenuto di alcol utilizzando lieviti non convenzionali. Considerando la novità di questo studio, un aspetto da non sottovalutare è l'impiego sicuro dei microrganismi selezionati in ambito alimentare in quanto una regolamentazione europea in questo senso potrebbe aprire la strada a una commercializzazione più rapida di questi ceppi, considerando anche il nuovo utilizzo di lieviti non convenzionali per la produzione di alimenti e bevande.

Quindi questo studio rappresenta un lavoro preliminare da inserire in un più ampio contesto di ricerca, aprendo uno scenario con diverse sfaccettature per poter immettere sul mercato un prodotto funzionale, attento all'ambiente, sicuro e soprattutto che garantisca la conformità del contenuto nutrizionale fino alla fine della durata di conservazione. Tuttavia, per dimostrare i benefici del consumo di bevande fermentate non lattiero-casearie, sono necessarie ulteriori studi in vivo che affrontino combinazioni di matrici e di dosi nelle diverse popolazioni.

CAPITOLO 6. BIBLIOGRAFIA

Afrifa, D., Engelbrecht, L., Eijnde, B. O., & Terblanche, E. (2023). The health benefits of rooibos tea in humans (*aspalathus linearis*)-a scoping review. *Journal of Public Health in Africa*, *14*(11), 16.

Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M., Morresi, C., Damiani, E., Bacchetti, T., & Comitini, F. (2024). Functional potential of a new plant-based fermented beverage: Benefits through non-conventional probiotic yeasts and antioxidant properties. *International Journal of Food Microbiology*, *424*, 110857.

Agarbati, A., Ciani, M., Canonico, L., Galli, E., & Comitini, F. (2021). Exploitation of Yeasts with Probiotic Traits for Kefir Production: Effectiveness of the Microbial Consortium. *Fermentation*, *8*(1), 9.

Agarbati, A., Marini, E., Galli, E., Canonico, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2020). Characterization of wild yeasts isolated from artisan dairies in the Marche region, Italy, for selection of promising functional starters. *LWT*, *139*, 110531.

Alfeo, V., Todaro, A., Migliore, G., Borsellino, V., & Schimmenti, E. (2019). Microbreweries, brewpubs and beerfirms in the Sicilian craft beer industry. *International Journal of Wine Business Research*, *32*(1), 122–138.

Amorim, J. C., Piccoli, R. H., & Duarte, W. F. (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Research International*, *107*, 518–527.

Andrighetto, C., Dal Prà, R., De Dea, P., Gambetta, S., Masaro, S., Tapparo, M., Tutta, C. (2021) Trebbie di birra, da scarto a ingrediente degli alimenti funzionali.

Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., & Secondi, L. (2014). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, *41*, 214–224

Ayed, L., M'hir, S., & Hamdi, M. (2020). Microbiological, biochemical, and functional aspects of fermented vegetable and fruit beverages. *Journal of Chemistry*, *2020*, 1–12.

Baiano, A., La Gatta, B., Rutigliano, M., & Fiore, A. (2023). Functional bread produced in a circular economy perspective: the use of brewers' spent grain. *Foods*, *12*(4), 834.

Banwo, K., Olojede, A. O., Adesulu-Dahunsi, A. T., Verma, D. K., Thakur, M., Tripathy, S., Singh, S., Patel, A. R., Gupta, A. K., Aguilar, C. N., & Utama, G. L. (2021). Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. *Food Bioscience*, *43*, 101320.

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.

Bonifácio-Lopes, T., Teixeira, J. A., & Pintado, M. (2019). Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(16), 2730–2741

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

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

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.

Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2024). Recycled Brewer's spent Grain (BSG) and grape juice: a new tool for Non-Alcoholic (NAB) or Low-Alcoholic (LAB) craft beer using Non-Conventional yeasts. *Foods*, *13*(4), 505.

Canonico, L., Agarbati, A., Zannini, E., Ciani, M., & Comitini, F. (2022). Lentil Fortification and Non-Conventional Yeasts as strategy to enhance functionality and aroma profile of craft beer. *Foods*, *11*(18), 2787.

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.

Carlberg, C., Ulven, S. M., & Molnár, F. (2016). Adaption of the human genome to dietary changes. In *Springer eBooks* (pp. 71–86).

Carloni, P., Albacete, A., Martínez-Melgarejo, P. A., Girolametti, F., Truzzi, C., & Damiani, E. (2023). Comparative Analysis of Hot and Cold Brews from Single-Estate Teas (*Camellia sinensis*) Grown across Europe: An Emerging Specialty Product. *Antioxidants*, *12*(6), 1306.

Chourasia, R., Phukon, L. C., Abedin, M. M., Padhi, S., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2022). Bioactive peptides in fermented foods and their application: a critical review. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, *3*(1), 88–109.

Cipollaro, M., Sottini, V. A., & Fabbrizzi, S. (2018). The role of the raw materials in the development of a Tuscan craft beer chain. *Italian Review of Agricultural Economics*, *73*(3), 53–64.

Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007b). Review article: yeast as probiotics –*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *26*(6), 767–778.

Damiani, E., Carloni, P., Rocchetti, G., Senizza, B., Tiano, L., Joubert, E., De Beer, D., & Lucini, L. (2019). Impact of Cold versus Hot Brewing on the Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Rooibos (*Aspalathus linearis*) Herbal Tea. *Antioxidants*, *8*(10), 499

Dellacassa, E., Trenchs, O., Fariña, L., Debernardis, F., Perez, G., Boido, E., & Carrau, F. (2016). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) wine production in Angola: Characterisation of volatile aroma compounds and yeast native flora. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 161–167.

Diplock et al., Editors. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe – Consensus Document. *British Journal of Nutrition* 1999;81(1):1-27.

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.

Ferreira, I. M., & Guido, L. F. (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour: A review. *Fermentation*, *4*(2), 23.

Foret, S., Kucharski, R., Pittelkow, Y., Lockett, G. A., & Maleszka, R. (2009). Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. *BMC Genomics*, *10*(1).

FUFOSE – 1999: “European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe”. Coordinated by ILSI Europe, Scientific concept of functional foods in Europe, Consensus Document. *British Journal of Nutrition*; 81: S1-S27.

G. Zeppa, G. Tallone, M. Bertolino (2013). Utilizzo di birra e di suoi derivati nella produzione di formaggi innovativi.

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).

Gupta, A., Sanwal, N., Bareen, M. A., Barua, S., Sharma, N., Olatunji, O. J., Nirmal, N. P., & Sahu, J. K. (2023). Trends in functional beverages: Functional ingredients, processing technologies, stability, health benefits, and consumer perspective. *Food Research International*, 170, 113046.

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,

Ita, Alimentari, S. a. F. E., Veterinarie, A. M. 0.-. S. a. E., & Veterinarie, A. M. 0.-. S. a. E. (2013). *Utilizzo di birra e di suoi derivati nella produzione di formaggi innovativi*.

Jackowski, M., Niedźwiecki, Ł., Jagiełło, K., Uchańska, O., & Trusek, A. (2020). Brewer’s Spent Grains—Valuable Beer Industry By-Product. *Biomolecules*, 10(12), 1669.

Jeong, D. M., Yoo, S. J., Jeon, M., Chun, B. H., Han, D. M., Jeon, C. O., Eyun, S., Seo, Y., & Kang, H. A. (2022). Genomic features, aroma profiles, and probiotic potential of the *Debaryomyces hansenii* species complex strains isolated from Korean soybean fermented food. *Food Microbiology*, 105, 104011.

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

Joubert, E., & De Beer, D. (2011). Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. *South African Journal of Botany*, 77(4), 869–886.

Joubert, E., & De Beer, D. (2014). Antioxidants of rooibos beverages. In *Elsevier eBooks* (pp. 131–144).

Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861–875.

Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2011). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5(2), 111–125.

Kunze, W. (2010). *Technology brewing & malting*. Vlb, Berlin, 18-152.

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

Liguori, R., Soccol, C., De Souza Vandenberghe, L. P., Woiciechowski, A., & Faraco, V. (2015). Second Generation Ethanol Production from Brewers' Spent Grain. *Energies*, 8(4), 2575–2586.

Malgaroli, F.(2012). La grande caccia al tè rosso del Sudafrica. *Repubblica.it*.

Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2016). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102.

Marnewick, J. L. (2009). Rooibos and Honeybush: Recent advances in chemistry, biological activity and Pharmacognosy. In *ACS symposium series* (pp. 277–294).

McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18), 2202.

Menezes, A. G. T., Ramos, C. L., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2018). Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. *Food Research International*, 111, 187–197.

Meyer, A. S., Donovan, J. L., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., & Frankel, E. N. (1998). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human Low-Density lipoprotein oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1783–1787.

Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: 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.

Mulero-Cerezo, J., Briz-Redón, Á., & Serrano-Aroca, Á. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* Var. bouldardii: valuable probiotic starter for craft beer production. *Applied Sciences*, 9(16), 3250.

Mussatto, S. I. (2009). Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products. In *Springer eBooks* (pp. 313–326).

Obe, M. A. (2001). Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific validity for all claims. *Public Health Nutrition*, 4(3), 859–862

Polito, P., Procacci, S., Brunori, A., Vitali, F. ENEA - Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione del Sistema Agro-Industriale Laboratorio Innovazione Agro-Industriale Centro Ricerche Casaccia, Roma.

Patil, S. S., Brennan, M. A., Mason, S. L., & Brennan, C. S. (2016). The effects of fortification of legumes and extrusion on the protein digestibility of wheat based snack. *Foods*, 5(2), 26.

Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949.

Rautenbach, F., & Marnewick, J. (2009b). *Antioxidant status of South African beverages and its role on the chemical parameters in human blood*. Electronic Theses and Dissertations.

REGOLAMENTO (CE) N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002.

Regolamento (CE) n. 1924/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 dicembre 2006 , relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari.

Research and Markets: Global Functional Food and Nutraceuticals Market (2014 - 2020) - By Type (Foods, Beverages, Supplements); Benefits (Health and Wellness, Disease Prevention, Fitness, Beauty); Origin & Ingredient.

Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 107–110.

Şanlıer, N., Gökçen, B. B., & Sezgin, A. C. (2017). Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 506–527.

Schnell, S. M., & Reese, J. F. (2003). Microbreweries as tools of local identity. *Journal of Cultural Geography*, 21(1), 45–69.

Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. (1999). *British Journal of Nutrition*, 81(4), S1–S27.

Senkarcinova, B., Dias, I. a. G., Nespor, J., & Branyik, T. (2019). Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *LWT*, 100, 362–367.

Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3408–3423.

Šmogrovičová, D., & Dömény, Z. (1999). Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. *Process Biochemistry*, 34(8), 785–794.

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.

Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in Applied Microbiology*, 131–175.

Sylvester Holt, Marta H Miks, Bruna Trindade de Carvalho, Maria R Foulquié-Moreno, Johan M Thevelein, The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 43, Issue 3, May 2019, Pages 193–222.

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

Valero-Cases, E., Cerdá-Bernad, D., Pastor, J., & Frutos, M. (2020). Non-Dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. *Nutrients*, *12*(6), 1666.

Valls, J., Pasamontes, N., Pantaleón, A., Vinaixa, S., Vaqué, M., Soler, A., Millán, S., & Gómez, X. (2013). Prospects of Functional Foods/Nutraceuticals and Markets. In *Springer eBooks* (pp. 2491–2525).

Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., & Verachtert, H. (2003). Bioflavoring and beer refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *62*(2–3), 140–150.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J., 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.

Villacreces, S., Blanco, C. A., & Caballero, I. (2021). Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food Bioscience*, *45*, 101495.

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.

Yeo, H. Q., & Liu, S. (2014). An overview of selected specialty beers: developments, challenges and prospects. *International Journal of Food Science & Technology*, *49*(7), 1607–1618.

Zamora, F. (2008). Biochemistry of alcoholic fermentation. In *Springer eBooks* (pp. 3–26).

Zhao, J., Blayney, A., Liu, X., Gandy, L., Jin, W., Yan, L., Ha, J., Canning, A. J., Connelly, M., Yang, C., Liu, X., Xiao, Y., Cosgrove, M. S., Solmaz, S. R., Zhang, Y., Ban, D., Chen, J., Loh, S. N., & Wang, C. (2021). EGCG binds intrinsically disordered N-terminal domain of p53 and disrupts p53-MDM2 interaction. *Nature Communications*, *12*(1).