UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in:

Biologia Molecolare e Applicata

Screening di lieviti per la produzione di birra ad alta e bassa fermentazione

Screening of yeasts for the production of Ale and Lager beers

Tesi di Laurea Magistrale di:

Letizia Giuva

Relatore:

Prof. Maurizio Ciani

Correlatore:

Dott.ssa Laura Canonico

Anno Accademico 2021/2022

INDICE:

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE 5

1.1- LA BIRRA ARTIGIANALE 7

1.2- MATERIE PRIME 9

1.2.1- ACQUA 9

1.2.2- ORZO 10

1.2.3- LUPPOLO 12

1.2.4- LIEVITO 14

1.3- PROCESSO PRODUTTIVO 16

1.3.1- MALTIZZAZIONE 17

1.3.2- AMMOSTAMENTO 19

1.3.3- FERMENTAZIONE 22

1.3.4- DOWNSTREAM 24

1.4- CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE 25

1.4.1- ALCOLI SPERIORI 25

1.4.2- ESTERI 26

1.4.3- ACIDI ORGANICI 27

1.4.4- COMPOSTI CARBONILICI **28**

1.4.5- COMPOSTI FENOLICI **29**

1.4.6- COMPOSTI SOLFORATI **29**

CAPITOLO 2- SCOPO DELLA TESI **30**

CAPITOLO 3- MATERIALI E METODI **31**

3.1- CEPPI **31**

3.2- LA PRECOLTURA **32**

3.3- CONDIZIONI FERMENTATIVE **33**

3.4- RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA **35**

3.5- ANALISI MICROBIOLOGICHE **36**

3.6- ANALISI CHIMICHE **37**

3.6.1- DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RESIDUI **37**

3.6.2- DETERMINAZIONE DEGLI ALCOLI SUPERIORI **39**

3.6.3- DETERMINAZIONE DELL'ETANOLO **39**

3.7- ANALISI SENSORIALE **40**

3.8- ANALISI STATISTICA **40**

CAPITOLO 4- RISULTATI **41**

4.1- VALUTAZIONE DELL'ATTITUDINE FERMENTATIVA **41**

4.2- PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA **44**

4.3- PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI **47**

4.4- ANALISI SENSORIALE **53**

CAPITOLO 5- DISCUSSIONI **56**

CAPITOLO 6- CONCLUSIONI **58**

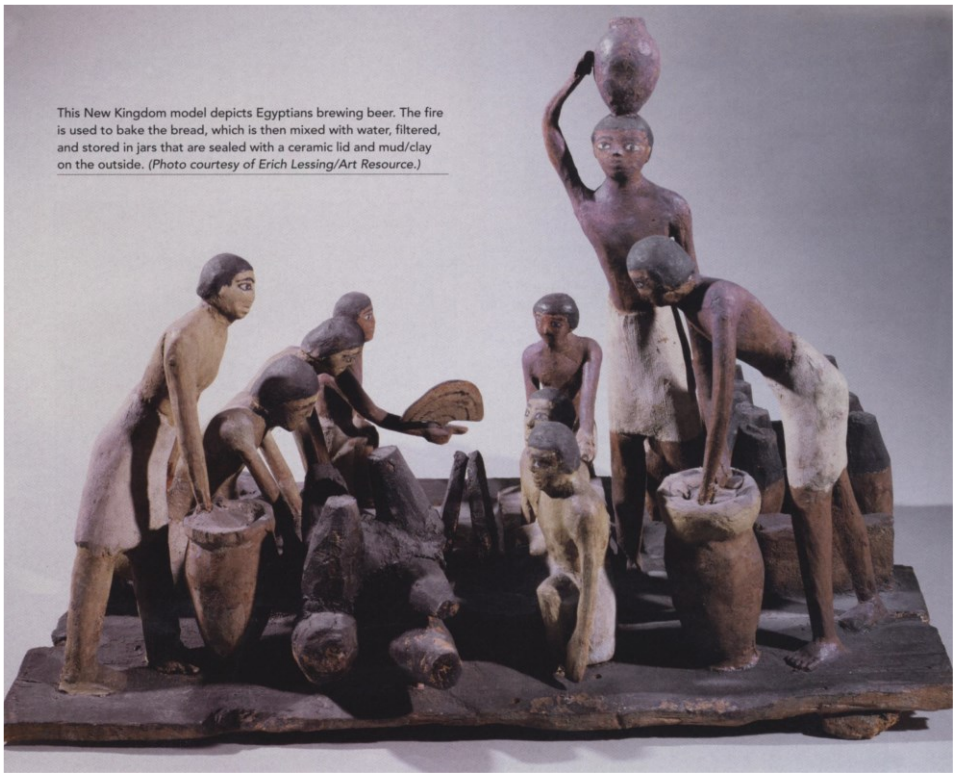
CAPITOLO 7- BIBLIOGRAFIA **60**

7.1- SITOGRAFIA **60**

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

La storia della birra ha origini molto antiche, risalente a più diecimila anni fa. Tra miti e leggende che vedono protagonista la sua origine, le prime testimonianze storiche affondano le radici nel Medio-Oriente, intorno al 7000 a.C., nell'attuale regione tra Siria e Palestina. Le prime popolazioni a produrre questa bevanda fermentata, allora considerata alla stregua dell'acqua, furono i Sumeri, gli Assiri e i Babilonesi, diffondendosi ben presto anche nel nord Africa nella popolazione abitante le sponde del Nilo: gli Egizi. In Egitto, la birra era considerata un bene primario utilizzato come metodo di pagamento per feste e matrimoni, mentre in Mesopotamia era associata non solo alle festività, ma anche alla musica e alla prostituzione, come riportato nella letteratura Sumera. La birra, dunque, è stata importante a livello sociale.

Oltre a tale contesto, si sono scoperti altri utilizzi di questa bevanda fermentata anche nella nostra nazione, per mano prima degli Etruschi e poi dei Romani: come bottino di guerra, per uso cosmetico e medico venendo prescritto come disinfettante, per la cura di tosse, costipazione e mal di stomaco e veniva offerta in dono agli dei nei culti religiosi: le popolazioni mesopotamiche adoravano divinità per lo più di sesso maschile, ma faceva eccezione però la dea Ninkasi, il cui nome significa letteralmente "Signora che fa la birra", gli egizi la offrivano alla dea Hathor, dea egizia del cielo e protettrice delle donne e delle regine, e i nostri antenati alla dea Cerere, dea romana della terra e della maternità. Tradizionalmente, dunque, c'era un'associazione tra birra e la figura femminile che deriva, con molta probabilità, dal fatto che il processo di produzione era attuato dalle donne e non era inusuale che i templi avessero una loro struttura dedicata alla produzione della birra, una sorta di antenato degli attuali birrifici. (*Michael M Homan, 2004*)



(Michael M. Homan, Near Archeology, vol 67, n°2, june, 2004 pp.84-95)

Andando avanti nella storia, il periodo storico che segnò una vera e propria svolta nella produzione della birra è il Medioevo; nei monasteri cominciarono le prime sperimentazioni con le materie prime e l'aggiunta del luppolo, col fine di migliorarne la conservazione nel tempo.

Nel 23 aprile del 1516, il Duca Guglielmo IV di Baviera emanò la legge denominata "Reinheitsgebot", o Editto di Purezza, in cui si obbligava i birrai ad utilizzare solo acqua, malto d'orzo, luppolo e, certamente, i lieviti la cui scoperta, però, avvenne più tardi per mano di Luis Pasteur, tra il 1855 e il 1876. Piccola curiosità è che il Duca stipulò questa legge per evitare l'utilizzo del frumento, poiché quell'anno il raccolto fu molto difficile.

Il 16 agosto 1962 abbiamo la legge n° 1352, Art. 1 che regola la produzione di birra che cita: "La denominazione "birra" è riservata al prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con

ceppi delle specie *Saccharomyces carlsbergensis* o di *Saccharomyces cerevisiae* di un mosto preparato con malto, anche torrefatto, di orzo o di frumento o di loro miscele ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi." Si è successivamente aggiunto: "La fermentazione alcolica del mosto può essere integrata con una fermentazione lattica", "Nella produzione della birra è consentito l'impiego di estratti di malto torrefatto e degli additivi alimentari consentiti dal decreto del Ministero della sanità 27 febbraio 1996, n. 209" e "Il malto di orzo o di frumento può essere sostituito con altri cereali, anche rotti o macinati o sotto forma di fiocchi, nonché con materie prime amidacee e zuccherine nella misura massima del 40% calcolato sull'estratto secco del mosto.

1.1- LA BIRRA ARTIGIANALE

Nel nostro paese, la birra, per quanto la sua produzione sia antica e documentata già dai tempi di Etruschi e Romani, è sempre stata in secondo piano, essendo l'Italia un paese principalmente dedito alla produzione di vini. Dal 1996, data di apertura del primo birrificio artigianale, ad oggi c'è stato un importante accrescimento del numero di questi anche grazie all'approvazione della legge in merito alla regolazione di questo settore. Il 6 luglio 2016, infatti, è stata approvata la legge n°154/2016, andando ad integrare la legge 1354/1962, introducendo all'articolo 2 il comma 4 bis:

"Si definisce birra artigianale la birra prodotta da piccoli birrifici indipendenti e non sottoposta, durante la fase di produzione, a processi di pastorizzazione e microfiltrazione. Ai fini del presente comma si intende per piccolo birrificio indipendente un birrificio che sia legalmente ed economicamente indipendente da qualsiasi altro birrificio, che utilizzi impianti fisicamente distinti da quelli di qualsiasi altro birrificio, che non operi sotto licenza

e la cui produzione annua non superi i 200.000 ettolitri, includendo in questo quantitativo le quantità di prodotto per conto terzi".

L'Europa, grazie alla particolare tradizione birraria, si contraddistingue a livello mondiale per la produzione ed esportazione e importazione di birra. L'Italia è tra i paesi europei con il tasso più basso di consumo di birra, sebbene però, nel 2013, si è evidenziato che l'Italia ne sia tra i maggiori paesi produttori superando addirittura paesi come l'Austria, l'Irlanda e la Danimarca che hanno una consolidata tradizione birraria (*Report Annuale Assobirra 2013*). Nel 2020, invece, è stato registrato un calo dell'8,4% delle produzioni e dell'11,4% dei consumi a causa dell'emergenza sanitaria mondiale causata dal SARS-CoV-2 (*Report Annuale Assobirra 2020*).

Più in generale, a livello di commercializzazione, le birre Lager sono quelle più rappresentate, occupando il 90% del mercato delle birre, mentre le Ale rappresentano un 5%; il restante è rappresentato da quelle birre prodotte da fermentazioni miste o spontanee di lieviti e batteri (*Petruzzi et al., 2016*).

La differenza principale tra una birra artigianale prodotta in microbirrifici e quella prodotta industrialmente è la pastorizzazione e la filtrazione. La prima viene consumata generalmente non filtrata e non pastorizzata comportando delle differenze di caratteristiche organolettiche del prodotto sia per la tecnologia di produzione dello stesso.

La filtrazione, che garantisce una maggiore stabilità chimico-fisica, e la pastorizzazione, che assicura la stabilità biologica, garantiscono una più lunga conservabilità, rendendo però il sapore e l'aroma della birra omologato, standardizzato, caratteristico di quel marchio e produzione. Una birra cruda, non pastorizzata, contenente lieviti al suo interno, è un prodotto

in continua evoluzione e maturazione. Più in generale, una birra artigianale che, con una fase di rifermentazione e all'aggiunta di zucchero (5-9 g/l) e lievito starter (105-106 cellule/ml) influenza a livello del profilo aromatico e sensoriale il prodotto finale, conferendo il suo bioflavour distintivo (*Canonico et al., 2014*).

1.2- MATERIE PRIME

Le materie prime utilizzate per la produzione di birra sono malto, acqua, luppolo e lieviti. L'orzo distico è il cereale più utilizzato, ma è ammesso anche l'utilizzo di altre graminacee, come ad esempio l'avena, il miglio, il frumento e mais. La legislazione italiana concede l'utilizzo di queste alternative purché non si superi una concentrazione del 40%. L'utilizzo di diversi cereali o combinazioni di questi conferiscono un particolare "flavour", o gusto, ai diversi stili di birra.

Il malto è l'ingrediente più importante per la produzione di birra, a partire dalla granella dell'orzo distico che, posto in opportune condizioni, germina convertendo gli amidi in maltosio e destrine.

1.2.1- ACQUA

La birra è costituita per circa il 90% d'acqua rappresentando l'ingrediente quantitativamente più presente (*Baiano et al., 2012*); la sua composizione è in grado di influenzare il gusto ed anche il processo di produzione della birra stessa (*Harrison, 2009*). Essendo la birra un prodotto per uso alimentare, la potabilità è il requisito fondamentale per

tutte le diverse tipologie di acque utilizzate; ogni acqua ha una composizione diversa determinata dalla concentrazione di Sali minerali e possono essere classificati da acque dolci, fino a molto dure; l'unità di misura sono i gradi francesi (°f): un grado rappresenta 10 mg di carbonato di calcio ($CaCO_3$) per litro di acqua (1°f = 10 mg/l = 10 ppm – parti per milione).

È proprio questo parametro appena illustrato ad influenzare il processo produttivo: la composizione dell'acqua, infatti, condiziona il pH del mosto, influenzando a sua volta l'attività enzimatica degli enzimi presenti in questo. Le acque dure, ad esempio, hanno un effetto alcalinizzante e tendono a fare innalzare il pH del mosto (l'optimum del mosto è compreso tra 5.2 e 5.4): ad un pH troppo basico è necessaria una filtrazione del mosto, che determinerà una resa in estratto meno efficiente, una più lenta idrolisi di amido e proteine, una minore concentrazione di FAN (Free Amino Nitrogen) e azoto solubile (*Ferreira and Guido, 2018*). Un pH superiore a 5.4, inoltre, può determinare effetti negativi sulle proprietà organolettiche, favorendo, ad esempio, l'estrazione dei polifenoli dal malto (es. tannini), alterando la stabilità aromatica, cosa invece favorita da un pH basso che, inoltre, aumenta anche la resistenza alle contaminazioni microbiche durante le fasi di produzione.

1.2.2 - ORZO

Il cereale più utilizzato nella produzione di birra è l'orzo (*Hordeum vulgare*), facente parte della famiglia delle *Graminacee*; è un cereale la cui origine risalirebbe ad una specie selvatica originaria del Medio Oriente, coltivata a partire da circa il 7000 a.C. e da qui diffusosi in tutto il mondo.

In particolare, nelle birre europee, viene utilizzato il malto d'orzo distico, scelto poiché fornisce cariossidi più uniformi e grosse, resistenza alle fitopatie nelle zone di coltivazione, rapido assorbimento d'acqua, basso contenuto proteico, e che hanno un comportamento molto regolare in maltazione.

L'orzo è composto da: 70-85% di carboidrati, di cui circa il 55% è rappresentato dall' amido, e il restante da zuccheri semplici (saccarosio, glucosio e fruttosio), cellulosa ed emicellulosa, che conferiscono resistenza meccanica e rigidità al seme; l'amido, previa idrolisi, risulta essere il principale substrato utilizzato dai lieviti durante il processo fermentativo, mentre emicellulosa e cellulosa, facilitano il processo di filtrazione.

Le proteine, invece, rappresentano il 10.5-11.5%, di cui solo un terzo si troveranno nel prodotto finito. Alcune di queste hanno un effetto positivo in quanto importanti per la formazione di schiuma, migliorando granulometria, persistenza e compattezza; se in eccesso possono, invece, avere un effetto negativo, comportando velature e intorbidamenti. Le proteine dell'orzo possono essere suddivise in quattro gruppi principali: gluteline (30%), prolamine (37%) che sono le principali proteine che vengono degradate enzimaticamente, durante la maltizzazione e ammostamento, globuline (15%) che possono solubilizzare e determinare intorbidimenti e, infine, le albumine (11%).

L'1.5-2% è rappresentato dai lipidi che, presenti sottoforma di trigliceridi, determinando un effetto negativo sulla qualità della schiuma e della birra più in generale. Sono presenti, inoltre, piccole quantità di vitamine (B1, B2, C, E), importanti per il metabolismo dei lieviti,

e sostanze polifenoliche (sostanze bioattive), che se solubilizzate possono essere responsabili di un gusto aspro e di intorbidamenti (*Aron and Shellhammer, 2010*).

1.2.3 - LUPPOLO

La prima a descrivere ad indicare e descrivere il luppolo fu, nel XII secolo, la badessa Hildegard Von Bingen nel suo trattato *Physica* (libro I, capitolo 61 "*De Hoppo*").

Il luppolo è una pianta angiosperma, rampicante (*Humulus lupulus L.),* appartenente alla famiglia delle *Cannabinaceae*. È un ingrediente fondamentale del processo produttivo della birra, benché sia quello meno presente in termini di quantità. L'aspetto funzionale che viene colto più facilmente dal consumatore è quello di conferire sapore amaro alla birra ed arricchirne l'aroma. Inoltre, come già accennato nel quadro storico medioevale, funge da conservante naturale, grazie alle spiccate proprietà antibatteriche. L'uso del luppolo, infine, aiuta a coagulare le proteine in sospensione nella birra rendendola più limpida, incrementando la persistenza della schiuma.

La pianta, tipica del centro e del nord Europa, dove cresce anche spontanea, è perenne e può raggiungere i 7 metri di altezza; è una dioica, cioè presenta una distinzione tra piante maschili e femminili. Generalmente, per la produzione di birra, vengono coltivate piante da luppolo femminili non fecondate, poiché sono i fiori femminili (coni) ad essere utilizzati (Fig. 1). La pianta ha la sua fioritura nel periodo estivo, tra giugno e settembre, momento in cui i coni presentano nell'inflorescenza una sostanza polverosa e di colore giallo-aranciato o rossastro, la luppolina. La luppolina, prodotta da delle ghiandole alla base del cono, contiene resine amare che occupano il 15-20% del luppolo, oli essenziali, tannini e terpeni.

Le resine, in particolare, sono responsabili del sapore amaro della birra, aiutano nella stabilizzazione della schiuma e hanno attività antimicrobica (*Krottenthaler, 2009*); le sostanze nelle resine responsabili dell'azione amaricante sono: α-acidi (umulone, coumulone e adumulone) e β-acidi (lupulone, colupulone e adlupulone), definite anche come resine molli. *(Ocvirk and Košir, 2020*). La concentrazione degli α-acidi varia dal 2 al 17% e il loro potere amaricante è dieci volte superiore a quello dei β-acidi; il potere amaricante, più in generale, non dipende solo dagli α-acidi, ma anche dalla loro isomerizzazione in iso-α-acidi sono molto più solubili ed amari (*Cabras et al., 2004*) e la loro isomerizzazione avviene durante l'ebollizione, ad alte temperature e con acqua dure, ovvero con pH basici.

I β-acidi, essendo meno solubili, hanno un minor potere amaricante, ma contribuiscono a dare un sapore amaro alla birra quando sono ossidati, quando invecchiano.

I luppoli, dunque, possono essere classificati in tre categorie: luppoli da amaro, che hanno una percentuale di α-acidi che va dal 6% al 10%, solitamente aggiunti all'inizio della bollitura; luppoli da aroma, in cui la percentuale di α-acidi non supera il 5%, addizionati verso la fine; luppoli ambivalenti, che hanno una percentuale di α-acidi abbastanza elevata (6-8% circa) e al tempo stesso un buon aroma. Pertanto, il luppolo ha un'azione diversa in rapporto al momento in cui viene aggiunto al mosto.

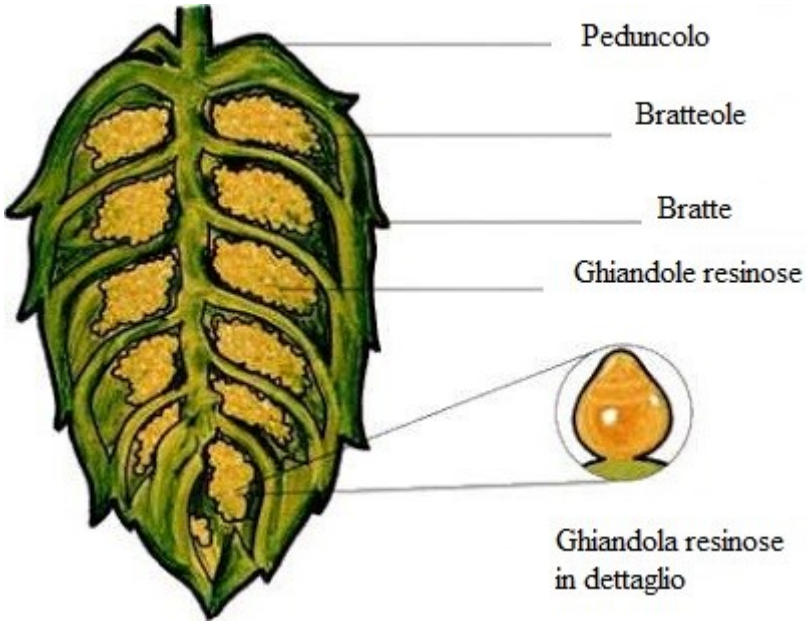


Fig1 Infiorescenza femminile di luppolo

Durante la fermentazione del mosto, i tannini provocano la precipitazione di proteine, soprattutto delle albumine: un contributo alla chiarificazione naturale della birra (*Zasio et al., 1997*). Importanti sono anche gli oli essenziali presenti nel luppolo: fondamentali nel determinare l'aroma del prodotto finito, oltre ad aiutare alla stabilizzazione della schiuma.

1.2.4 – LIEVITO

Il lievito è l'ingrediente principale della birra, in quanto utilizza gli zuccheri contenuti nel mosto come substrato fermentativo, convertendolo in alcol etilico, anidride carbonica e prodotti secondari.

I lieviti che comunemente vengono utilizzati nella produzione brassicola appartengono al genere *Saccharomyces* e le specie sono *S. cerevisiae, S. pastorianus, S. paradoxus* e *S.*

bayanus. *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* sono i lieviti che riescono a crescere a temperature alte (18-22°C) e sono dunque identificati come "top yeasts"; sono utilizzati per l'alta fermentazione, per le birre di produzione Ale. *S. pastorianus* e *S. bayanus*, definiti "bottom yeasts", lavorano efficientemente a basse temperature (10-18°C) e dunque sono utilizzati per le basse fermentazioni dove, grazie alla capacità di flocculare, il lievito si troverà, a fine fermentazione, si troveranno sul fondo della birra, dando origine alla birra Lager, la più prodotta al mondo.

S. cerevisiae, in generale, è quello che ha una produzione più pulita, in quanto non va a produrre molti composti secondari.

S. cerevisiae è un organismo osmofilo ed unicellulare appartenente alla famiglia dei *Saccharomycetacae*, scoperto nel 1883 dal micologo Hansen. Ha una forma ellittica con un diametro di 5-10 µm e si moltiplica per gemmazione. È stato il primo eucariote, nel 1996, il cui genoma è stato interamente sequenziato, una delle ragioni per cui è tra gli organismi più studiati e utilizzati in ambito scientifico insieme a *E. coli*. È responsabile di una delle fermentazioni più comuni, quella alcolica, utilizzando come substrato i carboidrati; i principali prodotti finali del metabolismo di questo lievito sono l'anidride carbonica e l'etanolo, a seconda della presenza, o meno, di ossigeno. *S. cerevisiae* è infatti un anaerobio facoltativo, capace di metabolizzare il glucosio in presenza e in assenza di ossigeno; a concentrazione di glucosio basse, intorno ai 200-500 mg/l, e presenza di ossigeno, produrrà poco etanolo; al contrario, ad alte concentrazioni di glucosio, 5-10 g/l presenta una respirazione limitata, metabolizzando dunque lo zucchero per via fermentativa producendo elevate quantità di etanolo; questo effetto è denominato come *Crabtree*.

S. pastorianus, precedentemente conosciuto come S. *carlsbergensis*, è il lievito più utilizzato nelle basse fermentazioni, dando come prodotto finale la birra più consumata al mondo, la Lager. Nell'ultimo ventennio, le sue caratteristiche e proprietà fermentative hanno suscitato molto interesse e curiosità principalmente per alcune analogie tra il vigore fermentativo simile al *S. cerevisiae* e la sua capacità di lavorare a basse temperature come il *S. bayanus*, utilizzato principalmente nella produzione di vini e spumanti (*Tamai Y., 1998*). La recente scoperta, in Patagonia, di *S. eubayanus* e il suo sequenziamento hanno permesso ai ricercatori di individuare il tassello mancante a livello genetico di questi due lieviti, permettendo loro di essere classificati ufficialmente e rispettivamente come ibridi di *S. eubayanus* e *S. cerevisiae* e come ibrido di *S. cerevisiae, S. eubayanus* e *S. uvarum* (*Libkind et al., 2011*;*Nguyen et al. 2011*).

1.3 – PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA

Il processo produttivo può essere suddiviso in quattro fasi principali: la maltizzazione, l'ammostamento, la fermentazione e i processi di downstream.

Dalle differenti condizioni stabilite in ognuna di queste fasi, possiamo ottenere una grande varietà di birra (*Vanderhaegen, 2007*).

La maltizzazione è quella fase in cui avviene la trasformazione dell'orzo, o altri cereali, in malto; l'ammostamento, la fase che riguarda la formazione della birra a partire dal mosto; la fermentazione, che trasforma gli zuccheri in etanolo, anidride carbonica e composti secondari e processi di dowstream, i quali terminano con il prodotto finito e pronto per il consumo (*Linko et al., 1998*).

1.3.1 – MALTAZIONE

La prima fase del processo della produzione della birra è la maltazione, che consiste nel sottoporre il seme d'orzo ad idratazione, germinazione e successiva essiccazione con trattamento termico (*Cabras et al., 2004*), rendendo disponibili enzimi (destrinasi, xilanasi, eso/endo – β – glucanasi ed anche lipasi), non altrimenti attivi nel seme d'orzo in condizioni normali, necessari a degradare amido, proteine e altri composti del cereale; questa fase è indispensabile per ottenere acidi grassi, zuccheri semplici e aminoacidi che fungeranno poi da substrati per la crescita dei lieviti (*Harrison , 2009*).

In generale, il processo di maltazione inizia con la selezione e l'idratazione dei semi di graminacee, con un'umidità del 12-14%, i quali vengono trasferiti in vasche di macerazione fino al raggiungimento di un'umidità in un range compreso tra il 30 – 47% (*Sicheri, 1983*), promuovendo la germinazione. Durante la germinazione, che si svolge all'interno di germinatoi a griglie, avviene la sintesi delle gibbellerine, gli ormoni della crescita che guidano la biosintesi degli enzimi amilasici, proteolitici ed endoglucanasi e dunque il processo di formazione del malto a partire dall'orzo.

Dopo circa una settimana, quando l'orzo ha raggiunto il giusto livello di germinazione con l'emissione di 3-4 radichette ed una plumula pari alla lunghezza del chicco, la germinazione viene interrotta con trattamento termico, sottoponendo l'orzo ad un processo di essiccazione, riducendo ancora di più la percentuale di umidità, al fine di evitare la prosecuzione dello sviluppo delle giovani piantine.

Questo processo assume un'importanza tecnologica in quanto il livello di temperatura, l'umidità ed i tempi a cui è condotto, portano ad ottenere dei malti con peculiarità differenti a livello di colore e aroma.

Difatti, possiamo classificare il malto in: chiaro, ottenuto essiccando l'orzo per circa quarantotto ore a temperature lentamente crescenti (dai 35 ai 42° C), ideale per le Ale chiare e per le Pilsner; malto ambrato e scuro: sono due tipi di malto che si ottengono sottoponendo l'orzo a un processo di essiccazione che prevede temperature molto più elevate di quelle descritte in precedenza, arrivando fino a 85° C; malto cristallino, realizzato alzando repentinamente la temperatura del forno da 40 a 100° C. In questo modo la buccia dell'orzo si secca, mentre al suo interno si forma un nucleo duro, zuccheroso e dall'aspetto di cristallo, che conferisce alla birra un gusto corposo e dolce. Le varietà più scure sono chiamate "malto caramello", quelle più chiare "malto carapils"; malto colorante, che si ottiene essiccando l'orzo a una temperatura costante di circa 200° C. Il suo impiego porta alla produzione di birre scure, che racchiudono una complessa combinazione di sapori affumicati; ed infine il malto nero: l'orzo è essiccato al limite della bruciatura. Le birre si presentano estremamente scure e con sapori tendenzialmente molto amari. (Fig. 2)

Fig.2 Malti a differente tostatura

1.3.2- AMMOSTAMENTO

L'ammostamento, è un passaggio fondamentale nella produzione della birra e consiste nel mettere il malto derivato da orzo, o i cereali, in acqua calda a determinate temperature, con lo scopo principale di rompere le proteine e gli amidi che non sono stati trasformati durante il processo di maltazione con attivazione enzimatica. L'ammostamento può essere svolto con metodologie differenti: per infusione e per decozione; per infusione prevede un riscaldamento senza raggiungere il grado d'ebollizione, effettuando soste opportune a valori di temperatura e tempi specifici, mentre quello per decozione è il metodo più complesso e antico. L'ammostamento per decozione prevede il prelievo di un'aliquota di miscela e fatta portare ad ebollizione reintroducendola successivamente alla miscela di partenza in modo da portarla alla temperatura stabilita.

La produzione della birra inizia con la macinazione del malto. Il malto, infatti, viene schiacciato su mulini a rulli, che però lasciano intatti gli acini, preservandone le glume (parti

esterne delle cariossidi) la cui elevata resistenza viene sfruttata per aiutare a separare il mosto (fase liquida) dalle trebbie (la parte solida, che viene scartata). Il malto, dopo la molitura, viene immesso in tini di rame e coperti d'acqua, aumentando man mano la temperatura; durante questo processo, a differenti temperature si attiveranno enzimi differenti (Tab. 1).

La prima sosta dura 10-20 minuti e avviene ì intorno ai 45-55°C, in cui ci sarà l'attivazione di proteasi e peptidasi che porteranno all'idrolisi delle proteine in peptidi e amminoacidi liberi, substrati per la successiva attività metabolica di lieviti (*Wolf - Hall, 2007*). La seconda sosta avviene ad una temperatura di 58-63°C per circa 60-70 minuti, in cui le β – amilasi promuovono l'idrolisi dell'amido liberando zuccheri adatti alla fermentazione, tra cui il maltosio; le α-amilasi, invece, agiscono a 68-73 °C sui legami delle porzioni più interne dell'amido liberando essenzialmente zuccheri non fermentescibili come le destrine; nella fase finale del processo di ammostamento si arriva ad una temperatura di 78°C per inattivare gli enzimi. In alcuni casi, si può effettuare un'ulteriore sosta a 36-45°, per promuovere l'azione di fitasi e β-glucanasi.

Le fitasi sono responsabili dell'acidificazione del mosto, agiscono a 30-52°C degradando la fitina, un sale insolubile di calcio e di magnesio dell'acido fitico, in fosfato di calcio o di magnesio ed acido citrico; le β-glucanasi degradano i β-glucani responsabili, insieme al pH, di alcune caratteristiche fisiche della birra: corposità, colore e chiarezza *(Rehberger and Luther 1995*).

Uno dei parametri fondamentali per il corretto svolgimento delle reazioni enzimatiche è il pH. Inizialmente, il pH del mosto è di 5.8, sebbene il valore ottimale del pH degli enzimi sia 5.2.

Una volta ultimata la fase di ammostamento, c'è la filtrazione ovvero la separazione della fase liquida, da quella solida.

Dopo essere stato filtrato, il mosto viene trasferito in contenitori di rame e fatto bollire per circa due ore e mezza con lo scopo di chiarificare e per rimuovere le sostanze indesiderate; questa fase è utile anche per la sterilizzazione del mosto, inattivare enzimi e per migliorare l'estrazione di oli essenziali e resine dal luppolo (*Harrison, 2009*).

Alla fine di questa fase c'è la separazione dei *trub,* che non sono altro che residui di luppolo e altri precipitati, (*Boulton and Quain, 2006*) ottenuti a temperature differenti, effettuando una decantazione dinamica. I *trub* a caldo si ottengono post-bollitura, a circa 95°C, e vengono separati con una centrifuga e della tecnica *whirlpool*, creando un vortice all'interno di un contenitore in modo da raccogliere i residui al centro del suddetto contenitore.

Dopo essere stati raffreddati con l'utilizzo di scambiatori di calore, abbassando la temperatura a 60°C, avviene una seconda precipitazione dei *trub* a freddo ottenuti dalla degradazione di proteine e polifenoli.

Sebbene entrambi i *trub* abbiano effetto negativo sull'attività metabolica dei lieviti, solo quelli a caldo vengono eliminati, mentre quelli a freddo no, in quanto la loro eliminazione andrebbe a determinare una perdita delle proprietà organolettiche della birra finita. Terminata anche questa fase, c'è un ulteriore abbassamento di temperatura in un range racchiuso tra i 10°C e i 20°C, a seconda della birra desiderata, se ad alta o bassa fermentazione. *(Cabras and Martelli, 2004; Manzoni, 2006*).

Enzyme	Optimum pH(°C)	Optimum Temperature (°C)	Inactivation Temperature (°C)	Hydrolysis Reaction	Product
			Starch Degradation		
β– Amylase	5.4–5.6	60–65	70	α-1,4 bond at the nonreducing end of starch	Maltose
α-Amylase	5.5–5.8	70–75	80	α-1,4 bond in starch	Dextrin
Limit extrinase	5.1–5.5	55–60	65–70	α-1,6 bond in starch	Dextrin (straight chain)
Maltase	6.0	35–40	40	Maltose	2 Glucose
Saccharase	5.5	50	55–67	Saccharose (sucrose)	Glucose + fructose
			Protein Degradation		
Endo-peptidase	5.0–5.5	40–60	60–80	Peptide bond inside chain	Short peptides
Carboxy-peptidase	4.8–5.6	50–60	70	Peptide bond at carboxy end	Amino acids
Amino peptidase	7.0–7.3	40–45	50–55	Peptide bond at amino end	Amino acids
Dipeptidase	8.0–8.8	40–45	50	Dipeptide	2 Amino acids
			Cell Wall Degradation		
Endo-β-1,4-glucanase	4.5–5.0	40–45	50–55	β-1,4-bond	β-Glucan with low MW
Endo-β-1,3-glucanase	4.6–5.5	60	70	β-1,3-bond	β-Glucane with low MW
β-Glucan solubilase	6.3–7.0	62–70	73	Bond between β-glucane and protein	β-Glucan with high MW
Endo-xylanase	5.0	45		Pentosan: xylan chain	Xylose
Exo-xylanase	5.0	45		Pentosan: xylan chain	Xylose
Arabinosidase	4.6–4.7	40–50	60	Pentosan: arabxylan chain	Arabinose
			Others		
Phosphatase	5.0	50–53	60	Organic phosphate	Phosphoric acid
Lipase	6.8	35–40	70	Lipids	Fatty acids

Source: Narziss 1992; Heyse 1994; O'Rourke 1996; Kunze 1999; Narziss 2005.

Tab.1 Enzimi attivi durante l'ammostamento. (Handook of food products and manifacturing, Y.H. Yui, 2007)

1.3.3- FERMENTAZIONE

Terminata la fase di ammostamento, si procede con la fermentazione. La buona riuscita di una fermentazione dipende da un adeguato livello di inoculo e dalle caratteristiche del lievito scelto ed impiegato nel processo produttivo. Il lievito, infatti, deve rispecchiare alcune caratteristiche tra cui: provenire da colture pure e selezionate, deve essere altamente vitale ed avere una buona resistenza all'alcool.

I parametri da tenere sotto controllo per mantenere la vitalità cellulare sono: l'apporto di nutrienti, l'inoculo corretto, l'ossigeno disciolto e la temperatura. Inoltre, per una birra di

alta qualità, è importante che ci sia una sorta di equilibrio tra i nutrienti assorbiti e i prodotti rilasciati (*Lodolo, et al., 2008*).

Il processo di fermentazione è suddiviso in due fasi quali fermentazione primaria, di breve durata e vigorosa, in cui tutti gli zuccheri del mosto vengono fermentati dai lieviti, formando la maggior parte dei composti secondari correlati al colore e all'aroma della birra; una volta terminata, si ha l'inizio della fermentazione secondaria, o di maturazione, e poco vigorosa, ad opera dei lieviti ancora presenti. La temperatura viene gradualmente abbassata fino a raggiungere valori 7-10°C per l'alta fermentazione e di 0-2°C per la bassa fermentazione.

Questi sono i responsabili della fermentazione degli zuccheri residui, rimuovono i composti indesiderati ed affinano il gusto della birra (*Sols et al., 1971*). Durante la maturazione avvengono tre fenomeni di trasformazione per permettere il passaggio da birra immatura, definita birra verde, a birra matura: la saturazione di anidride carbonica deriva dalla produzione di anidride carbonica da parte dell'attività metabolica dei lieviti; la chiarificazione, in seguito alla precipitazione del lievito residuo e dei flocculi tanno-proteici sul fondo del serbatoio e l'affinamento del gusto e dell'aroma, dovuto all'attenuazione dell'amaro del luppolo e all'armonizzazione dei composti aromatici presenti (*Cabras et al., 2004; Manzoni, 2006*).

Durante questo processo, è importante controllare pH, temperatura e umidità. Temperatura e umidità devono essere mantenuti costanti per garantire un adeguato tasso di crescita dei lieviti; la birra subisce un'acidificazione, passando da un valore di pH iniziale 5.2-5.4 del mosto ad un valore di circa 4.1-4.2 al termine della fermentazione, permettendo di preservare il prodotto finale e inibire la crescita batterica (*Harrison, 2009*).

1.3.4- DOWSTREAM

La birra matura subisce alcuni step in preparazione alla distribuzione al consumatore. Alcuni di questi step sono facoltativi e scelti sulla base del prodotto finale che si desidera ottenere.

Molte birre vengono addizionate con proteasi, così da evitare la comparsa di torbidità, fenomeno che si manifesta soprattutto quando vengono mantenute in ambiente refrigerato, dovuto alla presenza di proteine residue. Spesso vengono anche chiarificate e filtrate. Il livello finale di CO_2 viene aggiustato intorno al 0.45-0.52%, mediante aggiunta di diossido di carbonio oppure si può aggiungere lievito fresco in grado di condurre una naturale fermentazione secondaria. Per incrementare la stabilità della birra, generalmente essa viene pastorizzata con la tecnica della pastorizzazione flash con degli scambiatori di calore (15-30 secondi a 71-75°C), essendo che è stata effettuata una pastorizzazione a 62°C per 20 minuti, rischiando di influenzare negativamente il flavour del prodotto finale. Un altro tipo di pastorizzazione che viene utilizzata è quella "a freddo", in cui possono essere utilizzati agenti chimici preservanti o membrane filtranti, seguita da confezionamento asettico. Le birre pastorizzate hanno una shelf-life superiore ai tre mesi, ma esistono anche birre non pastorizzate, aventi una shelf-life di circa 1 mese le quali devono essere mantenute refrigerate per preservarne la massima qualità (*Harrison, 2009*).

1.4- CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA

Il profilo sensoriale di ogni birra è il risultato di una complessa combinazione di composti che conferiscono ad essa caratteristiche peculiari. Particolarmente importanti sono i composti volatili che possono derivare dalle materie prime utilizzate, dalle condizioni di fermentazione e da quelle di conservazione, nonché dal metabolismo dei lieviti (*Kobayashi et al., 2006; Rossi et al., 2014; Canonico et al., 2014*). Durante la fermentazione primaria i lieviti, dal metabolismo di zuccheri e aminoacidi, producono un'ampia gamma di composti volatili: alcoli superiori, esteri, aldeidi, chetoni, dichetoni vicinali, idrocarburi e acidi organici.

1.4.1- ALCOLI SUPERIORI

Gli alcoli superiori sono composti aromatici prodotti, con la via di Ehrlich, durante la fermentazione influenzando significativamente l'aroma della birra (Fig. 3).

Quelli più importanti e rappresentativi sono n-propanolo, l'isobutanolo, l'alcol isoamilico, l'alcol amilico e 2-feniletanolo che vengono prodotti maggiormente in coincidenza con l'arresto della crescita cellulare (*Rossi et al., 2014*).

Possono formarsi sia per via catabolica che per via anabolica; per via catabolica, dagli aminoacidi dei mosti, e per via anabolica a partire dagli aminoacidi sintetizzati dai lieviti stessi (*Kobayashi et al., 2006*).

Per una concentrazione superiore a 300 mg/L di questi alcoli, la birra potrebbe mostrare un odore e un sapore molto presente e pungente *(Olaniran et al., 2016*).

L' N-propanolo ad una concentrazione pari a 600 mg/L conferisce durezza al prodotto

(*Smogrovicova et al., 1999*).

L'isobutanolo (valina) ha un effetto indesiderato sulla qualità della birra se la sua concentrazione supera il 20% della quantità totale di n-propanolo, alcool isobutilico e alcool isoamilico (*Olaniran et al., 2016*). L'alcol isoamilico (catabolismo della leucina), conferisce un aroma fruttato di banana; il 2-fenil etanolo (40mg/L), dona una nota dolce e fruttata alla birra (*Humia et al., 2019*).

1.4.2 – ESTERI

La concentrazione degli esteri all'interno della birra è a concentrazione inferiore rispetto gli alcoli superiori. Si vengono a formare durate le prime fasi della fermentazione primaria, a partire dagli alcoli dal metabolismo degli aminoacidi e dagli acidi, dall'esterificazione degli acidi grassi e la loro quantità aumenta durante la fermentazione secondaria (*Humia et al., 2019*). Gli esteri assumono una grande importanza per il flavour della birra, donando un aroma fruttato-floreale caratteristico (Fig.3).

Gli esteri presenti nella birra possono essere suddivisi in tre gruppi principali: esteri acetici, esteri etilici ed esteri furanici.

Degli esteri acetici, i più importanti sono etil-acetato che conferisce l'aroma di solvente e rappresenta circa un terzo degli esteri presenti nella birra, e l'isoamil-acetato che dà un sentore di banana.

Gli esteri etilici (gruppo alcolico rappresentato dall'etanolo e l'acido è un acido grasso a media catena) sono: etil-esanoato, etil-ottanoato e l'acetato di fenile, che danno rispettivamente un aroma di mela dolce, mela acida e rosa/miele; questi ultimi hanno una

soglia di percezione inferiore rispetto agli acetici (*Olaniran et al., 2016*). L'etil-acetato ha una concentrazione soglia nella birra pari a 30 mg/L, ma per le birre di tipo Lager la concentrazione raccomandata è <5 mg/L (*Olaniran et al., 2016*). Tra questi i più rappresentativi sono: l'esanoato di etile, il quale ha una bassa concentrazione soglia di 0,005 mg/L, etile ottanoato a 0,5 mg/L ed etile decanoato a 1,5 mg/L (*Olaniran et al., 2016*).

Compound	Threshold (mg L^{-1})	Aroma Impression
Esters		
Ethyl acetate	20–30 [a]; 25–30 [b]; 30 [c,g],33 [f]	Fruity, solvent-like
Isoamyl acetate	0.6–1.2 [a]; 1.2–2 [b]; 1.2 [c,g],1.6 [f]	Banana, pear
Phenylethyl acetate	3.8 [a]; 0.2–3.8 [b,f,g]	Roses, honey, sweet
Ethyl hexanoate	0.2–0.23 [b,f]	Apple, fruity
Ethyl caproate	0.17–0.21 [a]; 0.21 [c,g]	Apple, aniseed
Ethyl caprylate	0.3–0.9 [a]; 0.9 [c,g]	Apple
Ethyl octanoate	0.9–1.0 [b], 0.9 [f]	Apple, aniseed
Higher Alcohols		
Propanol	600 [d], 700 [h], 800 [f,g]	Alcohol, solvent-like
Isobutanol	100 [d]; 80–100 [e], 200 [f,g]	Alcohol, solvent-like
Isoamyl alcohol	50–65 [b]; 50 [d]; 50–60 [e], 70 [f,g]	Alcohol, banana, vinous
Amyl alcohol	50–70 [b]; 50 [d]; 50–60 [e], 65 [f,g]	Alcohol, solvent-like
2-Phenylethanol	40 [b,d]; 45–50 [e], 125 [f,g]	Roses, sweet
Tyrosol	200 [c],100 [e]	Bitter, chemical

Source: [a] [33], [b] [34], [c] [35], [d] [36], [e] [37], [f] [38], [g] [39], [h] [40].

Fig.3 Valori soglia e aromi di esteri e alcoli superiori più importanti presenti nella birra. (Ferreira and Guido, 2018)

1.4.3- ACIDI ORGANICI

Il 50% degli acidi organici presenti nella birra derivano dal mosto, mentre la parte restante deriva dal metabolismo microbico; oltre alla CO2, influenzano acidità/pH e il gusto della birra accentuando o meno l'acidità e l'asprezza.

Gli acidi organici si possono differenziare in due gruppi ben precisi ossia acidi volatili e acidi non volatili. Gli acidi volatili che incidono maggiormente sul sapore sono acetici,

caprilici, caprici e laurici (Micheal et al., 2016), tra cui: acido acetico, acido propionico, acido butirrico ed isobutirrico, acido valerico e iso-valerico, acido esanoico (acido caproico), acido ottanoico (o acido caprilico) acido decanoico (o acido caprico), acido dodecanoico (acido laurico).

Il livello di questi acidi dipende dal ceppo di lievito e dalle condizioni di fermentazione. Ad esempio, una bassa aerazione può dare concentrazioni più alte di questi acidi (*S. Engan 1973*). I principali acidi non volatili, che hanno un impatto sul sapore e l'aroma, includono: acido ossalico (salato, ossidato), acido citrico (aspro), acido malico (mela), acido fumarico (acido), acido succinico (acido), acido lattico (acido) e acido piruvico (salato).

1.4.4- COMPOSTI CARBONILICI

Nella birra i composti carbonilici, quali aldeidi, chetoni e dichetoni vicinali, sono relativamente bassi, compresa l'acetaldeide che è quella più rappresentata; deriva dalla carbossilazione del piruvato e viene sintetizzata durante la fase di crescita dei lieviti.

Il suo livello varia durante la fermentazione e l'invecchiamento e generalmente durate la fase stazionaria tende a diminuire (*Boulton and Quain, 2006*).

L'acetaldeide e il diacetile rappresentano i composti carbonilici indesiderati in quanto, se presenti oltre il loro valore soglia, conferiscono alla birra un caratteristico sapore rispettivamente di erba e di burro.

1.4.5- COMPOSTI FENOLICI

I fenoli sono dei composti dall'aroma definito genericamente "speziato". In relazione alla loro concentrazione nel mosto e al ceppo di lievito utilizzato, il contributo aromatico può spaziare dal pepe, al chiodo di garofano, fino a un leggero affumicato, allo stallatico e addirittura al medicinale. La sintesi dei fenoli avviene grazie all' enzima Phenolic Acid Decarboxylase, che converte parte degli acidi fenolici in vinilfenoli. Solo alcuni ceppi di lievito (detti POF) sono dotati del corredo genetico per produrre questo enzima (ceppi weizen e i ceppi belgi sono degli esempi classici). I più comuni composti fenolici sono: 4-vinilguaiacolo (aroma fenolico, amaro, garofano), 4-vinilfenolo (aroma fenolico, affumicato), 4-etilguaiacolo (aroma fenolico, dolce), 4-etilfenolo (aroma fenolico, astringente), 4-vinilsiringolo, stirene, eugenolo e vanillina. (*Michel et al., 2016*).

1.4.6- COMPOSTI SOLFORATI

I composti dello zolfo più conosciuti sono l'acido solfidrico (H_2S) e l'anidride solforosa (SO_2). Possono originare dagli aminoacidi presenti nel malto oppure da composti sulfurei del luppolo o dell'acqua (famosa è l'acqua di Burton, ricca di solfati). Rilasciano aromi che ricordano l'aglio, il cerino appena acceso, le uova marce. Fortunatamente sono composti molto volatili che tendono a dissolversi nell'aria insieme all'anidride carbonica nel corso della fermentazione. L'acido solfidrico, in particolare, si forma per riduzione dei solfati. Il lievito inizia a utilizzare i solfati come elemento riducente nella sintesi degli amminoacidi quando l'ossigeno nel mosto è finito (*James et al. 2014*), questo avviene quando c'è carenza di nutrienti nel mosto. La maggior parte dell'acido solfidrico viene prodotto nelle prime fasi

della fermentazione, quando la divisione cellulare, che richiede sintesi di amminoacidi, è al picco. Un eccessivo aroma di uova marce può essere anche indice di infezione, poiché alcuni batteri sono dei grandi produttori di anidride solforosa. L'anidride solforosa, infatti, gioca un ruolo importante nella birra poiché agisce come antiossidante e di conseguenza aumenta considerevolmente la durata di conservazione della birra e conferisce stabilità del sapore.

CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI

Nella produzione di birra artigianale è importante la scelta delle materie prime poiché da esse dipendono non solo la riuscita della fermentazione, e dunque della produzione, ma anche la qualità e delle proprietà organolettiche del prodotto finito.

Gli starter che vengono utilizzati per produrre birra sono: *S. cerevisiae* per le birre Ale (alta fermentazione) e *S. pastorianus* per le Lager (bassa fermentazione).

Le Ale sono caratterizzate da un corpo pieno e rotondo, una tendenza dolce più o meno marcata e aromi fruttati/floreali derivanti dalla fermentazione. Le Lager sono birre leggere dal sapore tipicamente amaro/luppolato con aromi di malto, cereali, miele e pane dove l'impronta del lievito è meno marcata.

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare, tramite uno screening, se ceppi selezionati di *S. cerevisiae, S. pastorianus, S. bayanus e S. paradoxus* possono essere utilizzati per produrre birre a temperature differenti dal loro normale utilizzo, ottenendo

prodotti che siano accettabili dal punto di vista aromatico, gustativo e che non siano caratterizzate da off-flavours.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1- CEPPI

I ceppi di lieviti selezionati sono tutti appartenenti alla specie *Saccharomyces* e le specie sono *S. cerevisiae, S. pastorianus, S. bayanus e S. paradoxus*, isolati da matrici differenti. (tab.2)

Tutti provengono dall'archivio del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Perugia (DBVPG) e dalla collezione presente nel nostro Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA).

Essendo uno studio basato su uno screening a differenti temperature, si sono utilizzati due ceppi di controllo*: S. cerevisiae* US-05 (Safale Fermentis), per la fermentazione a 20°C, e *S. pastorianus* W-34 (Fermentis), per la fermentazione a 12°C.

I ceppi son stati crioconservati in terreno contenente glicerolo (80%) a -80°C, poi rinfrescati su terreno YPD agar (10 g/L di estratto di lievito, 20 g/L di peptone, 20g/L di glucosio e 18g/L agar) e conservati a 4°C.

Genere e Specie	Codice	Provenienza
S. cerevisiae	US-05	Safale Fermentis
S. pastorianus	W-34	Fermentis
S. bayanus	7v	Cantina Giulia, Mosto Verdicchio
S. bayanus	8c	Cantina Giulia, Mosto Verdicchio
S. cerevisiae	8	Cantina Giulia, Mosto Verdicchio
S. cerevisiae/ S. paradoxus	2	Cantina Giulia, Mosto Verdicchio
S. cerevisiae	MAF1.1	Madre Acida 1
S. cerevisiae	MAF1.2	Madre Acida 2
S. cerevisiae	MAF2.2	Madre Acida 2
S. cerevisiae/ S. bayanus	MAF1.7	Madre Acida 1
S. cerevisiae/ S. paradoxus	MAF1.8	Madre Acida 1
S. pastorianus	6253	DBVPG, CBS Netherland
S. pastorianus	6258	DBVPG, CBS Netherland
S. pastorianus	6261	DBVPG, Copenhagen (Denmark)
S. pastorianus	6282	DBVPG, Copenhagen (Denmark)
S. pastorianus	6283	DBVPG, Copenhagen (Denmark)
S. pastorianus	6284	DBVPG, Copenhagen (Denmark)
S. pastorianus	6285	DBVPG, Copenhagen (Denmark)
S. paradoxus	6489	DBVPG, tree Russia
S. paradoxus	6490	DBVPG, tree Russia
S. paradoxus	6491	DBVPG, tree Russia
S. paradoxus	6045	DBVPG, CBS oak tree (Netherland)
S. cerevisiae/ S. paradoxus/ S. bayanus	T07S1B6	Muschio su tronco di quercia, Saccaro

(Tab.2- Ceppi selezionati)

3.2- PRECOLTURA

Le fermentazioni sono state allestite da precolture su estratto di malto al 10% e lasciate incubare per 48h a 20°C. Dopo l'incubazione è stata effettuata una centrifugazione, a 4000 rpm per 5 minuti, per raccogliere le cellule e risospese

con acqua sterile procedendo con l'inoculo nel mosto con 10^6 cell/ml per la fermentazione a 20°C e $5x10^7$ cell/ml per la fermentazione a 12°C.

3.3- CONDIZIONI FERMENTATIVE

PRIMA FERMENTAZIONE

La prima fermentazione è stata allestita in condizione di sterilità su 12L di mosto Pils luppolato "Mr Malt", su cui poi sono state allestite microfiltrazioni su un volume di 250 ml (Fig. 4) con valvole di Müller in cui è presente il Metabisolfito di Sodio, sostanza che evita la contaminazione del sistema permettendo però la fuoriuscita di CO_2 e dunque il monitoraggio della fermentazione stessa. La fermentazione è durata 14 giorni a 20°C, registrando giornalmente la diminuzione di peso dovuto alla perdita di CO_2, fino ad ottenere un valore costante.

Fig.4 Fermentazioni a 20°C

SECONDA FERMENTAZIONE

La seconda fermentazione è stata allestita come la prima fermentazione, però ad una temperatura inferiore, a 12°C (Fig. 5). In questo caso, la fermentazione è durata 18 giorni ed è stata monitorata registrando la perdita di peso quotidianamente.

Fig. 5 Fermentazioni a 12°C

3.4- RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA

A fine fermentazione, dopo una sosta a 4°C per circa una settimana, si è proceduto poi con la rifermentazione in aggiungendo 5 g/L di saccarosio durante il processo di imbottigliamento. Una volta sigillate, sono state mantenute a 18-20°C per circa 7-10 giorni e stoccate poi a 4°C.

3.5- ANALISI MICROBIOLOGICHE

Al fine di monitorare la fermentazione, è stata effettuata un'analisi gravimetrica che prende in esame la perdita di peso giornaliera dovuta alla fermentazione degli zuccheri e dunque espressa in grammi di CO_2 svolta; la CO_2 formatasi, infatti, viene utilizzata per monitorare la cinetica fermentativa.

Nelle microfermentazioni gli inoculi sono nell'ordine di grandezza di 10^6 cell/ml per l'alta fermentazione e nell'ordine di $5x10^7$ cell/ml per la bassa, valori su cui poi sono stati calcolati gli effettivi inoculi partendo dalle conte con la camera di Thoma. Gli inoculi, inoltre, sono stati verificati prelevando 1ml di campione e posto in una provetta riempita con 9 ml acqua sterile, ottenendo così una diluizione di 10^{-1} (1:10); dopo aver vortexato, è stato prelevato 1 ml e inserito in un altro tubo sempre riempito con 9 ml d'acqua, continuando a diluire scalarmente fino ad ottenere una diluizione di 10^{-4} (Fig.6).

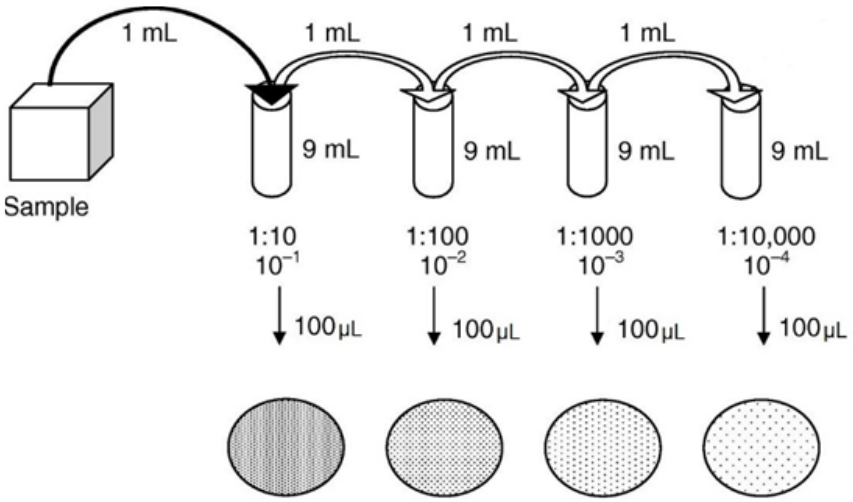


Fig.6- Diluizioni seriali

Successivamente sono stati posti su piastra Petri, con terreno YPD, 100 µl di ciascuna sospensione e spatolato con l'ausilio di una spatola di vetro in ambiente sterile. Il periodo di incubazione è stato di 48h-72h a 25°C verificando, poi, la crescita delle colonie.

3.6- ANALISI CHIMICHE

3.6.1- DETERMINAZIONE 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), sodio azide (0.02% w/v)

Bottiglia 2: NADP+ + ATP (disciogliere in 12 ml di acqua distillata)

Bottiglia 3: Esochinasi + 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 D-glucosio (5 ml, 0.4 mg/mL).

Preparate le soluzioni, si effettua l'analisi seguendo il protocollo sottostante (tab. 3)

Pipettare in cuvetta	**Bianco Saccarosio + D-Glucosio**	**Campione Saccarosio + D-Glucosio**	**Bianco D-Glucosio**	**Campione D-Glucosio**
Soluzione 4 (ß-fruttosidasi) **Campione**	0,20 ml -	0,20 ml 0,10 ml	- -	- 0,10 ml
Incubare per 20 minuti. Poi aggiungi:				
Acqua distillata	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				

Tab.3 Protocollo zuccheri residui

3.6.2 DETERMINAZIONE ALCOLI SUPERIORI

La preparazione del campione per la valutazione del contenuto di alcoli superiori prevede la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 ml) con filtro cut-off 0.2 µm, a cui va aggiunto in un secondo momento come standard interno l'1-pentanolo alla concentrazione di 2µl. Successivamente 1 µl di campione viene iniettato nel gascromatografo, utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus e secondo il seguente protocollo:

• 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 isotermia di 200°C per 1 minuto;

• gas vettore: Azoto.

Ogni segnale (picco), relativo allo specifico composto, ne permette l'identificazione in base al tempo impiegato per arrivare al rilevatore.

3.6.3- DETERMINAZIONE ETANOLO

La preparazione del campione per la valutazione del contenuto di etanolo prevede la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 ml) con filtro cut-off 0.2 µm, a cui si aggiunge come standard interno l'1-pentanolo alla concentrazione di 100 µl. A questo punto 1µl di campione viene iniettato direttamente nel gascromatografo serie GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan) con detector a ionizzazione di fiamma, utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus. Il protocollo seguito è il seguente:

• temperatura dell'iniettore: 150°C;

• colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25 μm);

• iniettore: split 10:2; iniettato 1 μl;

• temperatura: 40°C per 5 minuti, poi un gradiente di 5°C/min fino a 200°C e isotermia di 200°C per 1 minuto;

• gas vettore: Elio.

3.7- ANALISI SENSORIALE

Le birre, dopo la rifermentazione in bottiglia, sono state sottoposte ad un'analisi sensoriale, che prevede la valutazione di parametri visivi (colore, limpidezza, schiuma…), olfattivi (fruttato, alcolico, luppolo…) e gustativi (astringente, corpo, persistenza, amaro, dolce…).

3.8- ANALISI STATISTICA

I dati sperimentali per le principali caratteristiche analitiche della birra sono soggetti all'analisi della varianza (ANOVA) usando un software statistico JMP® 11. Il test di Duncan è stato utilizzato per determinare le differenze significative ($p < 0,05$) e, in aggiunta, i valori principali dei sottoprodotii della fermentazione sono stati analizzati con la Principal Component Analysis (PCA), utilizzando il software statistic JMP 11® (Statistical discovery from SAS, New York, NY, USA). I dati medi sono stati normalizzati per eliminare l'influenza dei dati nascosti.

CAPITOLO 4 – RISULTATI

4.1- VALUTAZIONE DELL'ATTITUDINE FERMENTATIVA

La cinetica fermentativa è stata valutata monitorando quotidianamente la perdita di peso, correlata al valore della CO_2 svolta; i lieviti che sono stati selezionati sono tutti facenti parte della specie *Saccharomyces*; la cinetica e la durata della fermentazione sono risultati differenti in relazione alla temperatura. Difatti, la fermentazione a 20°C (fig. 8) è durata 14 giorni, mentre quella a 12°C (fig. 9), 18 giorni.

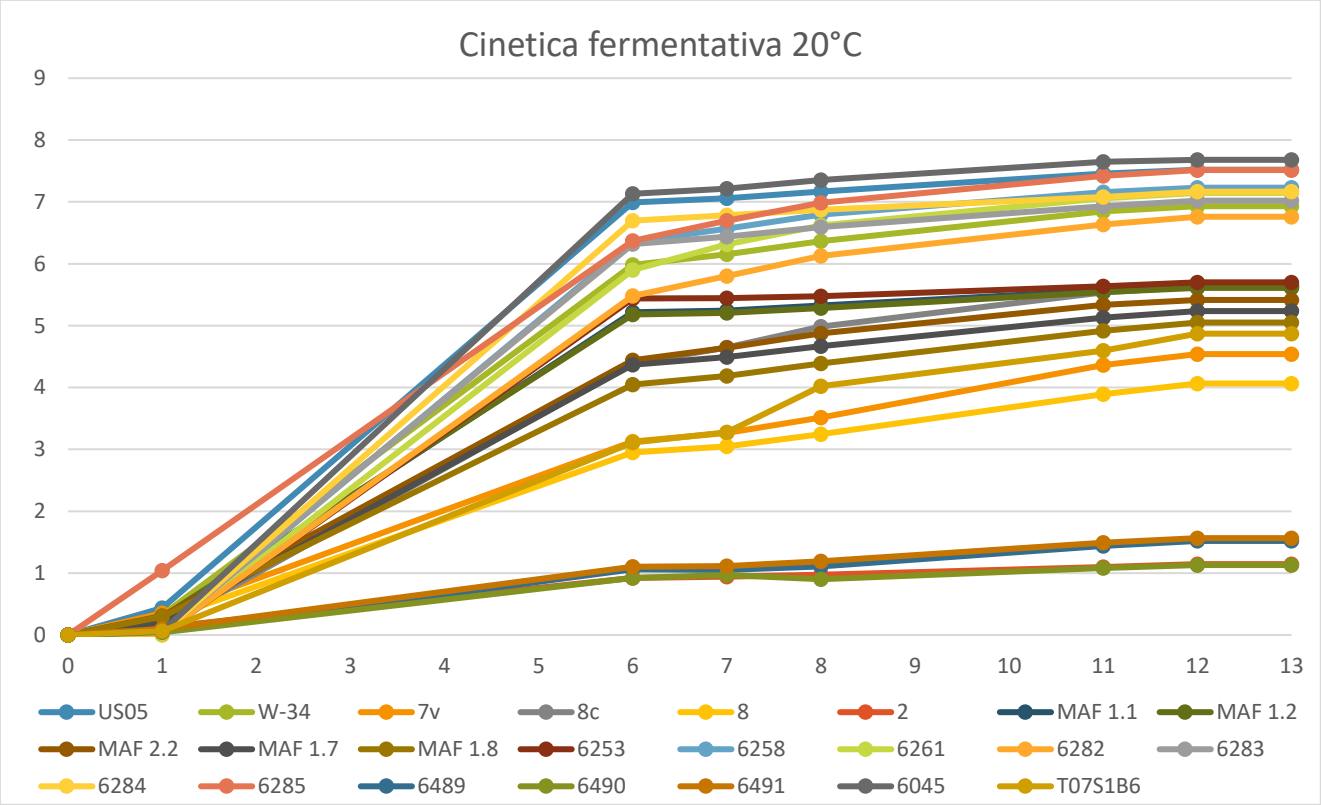


Fig.8 Cinetica fermentativa a 20°C; ceppi di controllo US05 (S. cerevisiae) e W-34 (S. pastorianus)

Analizzando la cinetica fermentativa a 20°C possiamo notare che i ceppi si siano divisi in tre gruppi principali; nel gruppo con la più alta cinetica possiamo evidenziare US05 (Starter

commerciale*, S. cerevisiae*), W-34 (Starter commerciale, *S. pastorianus*), 6045 (*S. paradoxus*, DBVPG, Netherland), i ceppi 6261 (*S. pastorianus*, DBVPG, Netherland) e 6282, 6283, 6284, 6285 (*S. pastorianus*, DBVPG, Denmark). Nel gruppo centrale possiamo distinguere i ceppi del gruppo MAF, isolati da madre acida, di cui MAF 1.1 (*S. cerevisiae*), MAF 1.2 (*S. cerevisiae*), MAF 2.2 (*S. cerevisiae*), MAF 1.7 (*S. cerevisiae/S. bayanus*) e MAF 1.8 (*S.cerevisiae/S. paradoxus*) e i codici 7v (*S. bayanus,* fermentazione spontanea in cantina) e 8 (*S. cerevisiae,* fermentazione spontanea in cantina), mentre nell'ultimo gruppo possiamo trovare 6489, 6490, 6491 (*S. paradoxus*, DBVPG, Russia).

Interessante notare come alcuni ceppi di *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, come il ceppo 7v e 8, si trovino nel gruppo centrale benché la temperatura sia ottimale per la loro fermentazione; questi ceppi hanno in comune la matrice d'origine: sono stati prelevati, difatti, dal mosto del vino Verdicchio, facendoci dedurre che sia la provenienza che la matrice siano determinanti per la loro capacità fermentativa.

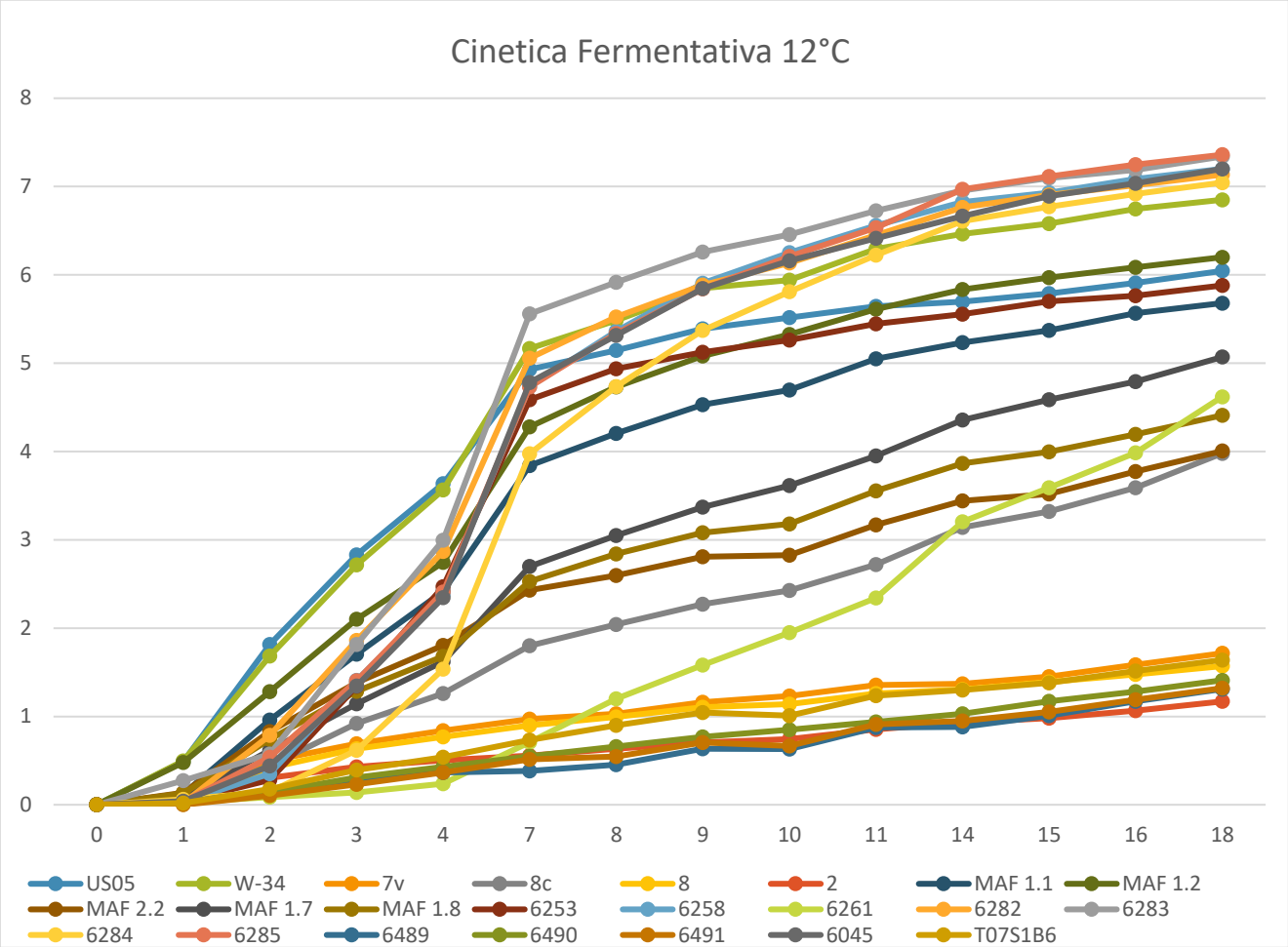


Fig.9 Cinetica fermentativa a 12°C; Ceppi di controllo: US05 (S. cerevisiae) e W34 (S. pastorianus)

Osservando, invece, il grafico della cinetica fermentativa a 12°C possiamo raggruppare i ceppi in quattro gruppi; nel primo gruppo troviamo W-34 (starter commerciale, *S. pastorianus*), 6045 (*S. paradoxus*, DBVPG, Netherland), 6284 e 6285(*S. pastorianus*, DBVPG, Denmark); nel secondo gruppo US05 (starter commerciale, *S. cerevisiae*), MAF 1.1 e MAF 1.2 (*S. cerevisiae,* Madre Acida), 6253 (*S. pastorianus*, DBVPG, Netherland); terzo gruppo, invece, 8c (*S. bayanus/* fermentazione spontanea in cantina), MAF 1.7 (*S. cerevisiae/bayanus,* Madre Acida), MAF 1.8 (*S.cerevisiae/paradoxus,* Madre Acida) e 6261 (*S. pastorianus*, DBVPG, Netherland); mentre nell'ultimo gruppo osserviamo 6489, 6490,

6491 (*S. paradoxus*, DBVPG, Russia), T07S1B6 (*S.cerevisiae/paradoxus/bayanus,* muschio tronco di quercia).

Paragonandole possiamo notare come alcuni ceppi abbiano avuto un comportamento simile in entrambe le fermentazioni, come per esempio i due starter commerciali che hanno lavorato bene ad entrambe le temperature; ceppi come 6489, 6490, 6491 (*S. paradoxus*, DBVPG, Russia), invece, hanno avuto una piccola perdita di CO_2, rispettivamente di 1,47 g, 1,30 g e 1,74 g a 20°C e 1,30 g, 0,88 g, 1,14 g a 12°C.

I risultati ottenuti sono stati confermati col metodo statistico di Duncan, come riportato in tabella (Tab.5)

4.2- PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

Le fermentazioni sono state allestite su 12L di mosto Pils luppolato di "Mr Malt", saggiato con kit commerciale per l'analisi degli zuccheri residui come riportato in tabella 4.

	Saccarosio g/L	Glucosio g/L	Maltosio g/L
Mosto 20°C	9,98±0,028	12,05±0,07	71,01 ±0,035
Mosto 12°C	12,15±0,21	8,43±0,04	71,58 ±0,35

Tab.4- zuccheri iniziali mosto

Le analisi effettuate per il profilo analitico delle birre comprendono: l'analisi della quantità di zuccheri residui, in particolare del maltosio, in quanto glucosio e saccarosio (non riportati in tabella) risultano essere completamente esauriti o con un valore massimo prossimo allo zero, l'etanolo e la CO_2 svolta (tabella5, per la fermentazione a 20°C e tabella 6, per la fermentazione a 12°C).

Fermentazioni 20°C	CO2 g	Maltosio g/L	Etanolo %v/v
US05 *(S. cerevisiae)*	7,50±0,42^{b}	0,00±0,00^{h}	4,56±7,22^{ab}
W-34 *(S. pastorianus)*	6,95±0,11^{b}	1,40±0,04^{e}	3,68±0,06^{cd}
7v *(S.bayanus)*	4,72±0,78^{bcd}	0,05±0,07^{gh}	4,31±0,79^{abc}
8c *(S. bayanus)*	5,62±0,25^{bcd}	0,06±0,08^{gh}	4,85±9,34^{a}
8 *(S. cerevisiae)*	4,16±0,05^{bcd}	0,00±0,00^{h}	4,56±6,58^{ab}
2 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus)*	1,10±0,01^{d}	5,74±0,09^{a}	3,89±2,30^{bcd}
MAF 1.1 *(S. cerevisiae)*	5,60±0,15^{bcd}	0,00±0,00^{h}	2,56±0,40^{e}
MAF 1.2 *(S. cerevisiae)*	5,63±0,18^{bcd}	0,00±0,00^{h}	2,43±2,84^{e}
MAF 2.2 *(S. cerevisiae)*	5,41±0,11^{bcd}	0,00±0,00^{h}	2,73±0,54^{e}
MAF 1.7 (S. cerevisiae/ S. bayanus)	5,26±0,41^{bcd}	0,31±0,02^{f}	2,68±0,35^{e}
MAF 1.8 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus)*	5,09±0,24^{bcd}	0,00±0,00^{h}	2,45±0,29^{e}
6253 *(S. pastorianus)*	5,65±0,16^{bcd}	0,06±0,08^{gh}	3,96±1,37^{bcd}
6258 *(S. pastorianus)*	7,22±0,06^{b}	0,07±0,09^{gh}	3,87±2,6^{bcd}
6261 *(S. pastorianus)*	7,14±0,01^{b}	0,06±0,08^{gh}	3,42±1,56^{d}
6282 *(S. pastorianus)*	6,78±0,18^{bc}	0,06±0,08^{gh}	3,47±1,09^{d}
6283 *(S. pastorianus)*	7,01±0,01^{b}	0,00±0,00^{h}	3,71±1,02^{cd}
6284 *(S. pastorianus)*	7,14±0,14^{b}	0,10±0,14^{gh}	3,52±0,09^{d}
6285 *(S. pastorianus)*	7,50±0,07^{b}	0,16±0,01^{gh}	3,73±0,46^{cd}
6489 *(S. paradoxus)*	1,52±0,06^{cd}	3,00±0,01^{d}	1,03±0,00^{f}
6490 *(S. paradoxus)*	1,19±0,16^{d}	3,48±0,01^{c}	4,7±1,12^{a}
6491 *(S. paradoxus)*	1,54±0,28^{cd}	4,03±0,01^{b}	0,8±0,82^{f}
6045 (*S. paradoxus)*	15,22±10,55^{a}	0,11±0,00^{gh}	3,91±1,52^{bcd}
T07S1B6 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus/ S. bayanus)*	5,10±0,04^{bcd}	0,41±0,00^{f}	3,61±1,25^{cd}

Tab.5 CO_2, maltosio ed etanolo (fermentazione a 20°C; I dati riportati nella tabella sono I valori medi ± la deviazione standard *con lettere all'apice (a-h)* significative per ogni colonna (Duncan test; $p < 0.05$).

Fermentazioni 12°C	CO2 g	Maltosio g/L	Etanolo %v/v
US05 *(S. cerevisiae)*	6,04±0,16^{b}	0,46±0,00^{c}	2,83±0,06^{cdef}
w34 (*S. pastorianus*)	6,85±0,81^{a}	0,05±0,07^{c}	2,99±0,06^{cde}
7v (*S.bayanus*)	1,72±0,16^{f}	1,5±0,01^{bc}	0,90±0,04^{i}
8c *(S. bayanus)*	3,98±0,64^{e}	6,16±0,00^{abc}	2,02±0,02^{h}
8 *(S. cerevisiae)*	1,57±0,20^{f}	4,68±0,00^{abc}	0,83±0,17^{i}
2 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus)*	1,17±0,21^{f}	14,55±0,00^{a}	0,39±0,01^{i}
MAF 1.1 *(S. cerevisiae)*	5,68±0,2^{bc}	2,56±0,00^{ab}	2,30±0,30^{fgh}
MAF 1.2 *(S. cerevisiae)*	5,78±0,11^{bc}	3,47±0,00^{abc}	2,79±0,70^{def}
MAF 2.2 *(S. cerevisiae)*	4,01±0,76^{e}	7,55±0,00^{abc}	2,12±0,13^{gh}
MAF 1.7 *(S. cerevisiae/ S. bayanus)*	5,07±0,31^{cd}	4,09±0,01^{abc}	2,56±0,08^{efg}
MAF 1.8 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus)*	4,41±0,48^{de}	3,45±0,00^{abc}	1,88±0,01^{h}
6253 *(S. pastorianus)*	5,84±0,25^{b}	2,94±0,00^{abc}	3,28±0,11^{bcd}
6258 *(S. pastorianus)*	7,17±0,16^{a}	1,83±0,00^{abc}	4,15±0,06^{a}
6261 (*S. pastorianus)*	4,60±0,29^{de}	1,01±0,00^{bc}	3,33±0,48^{bcd}
6282 *(S. pastorianus)*	7,13±0,18^{a}	0,90±0,01^{bc}	4,34±0,56^{a}
6283 *(S. pastorianus)*	7,34±0,06^{a}	0,00±0,00^{c}	4,32±0,14^{a}
6284 (*S. pastorianus)*	6,93±0,14^{a}	0,00±0,00^{c}	4,10±0,06^{a}
6285 (*S. pastorianus)*	7,36±0,03^{a}	0,57±0,00^{c}	3,37±0,13^{bc}
6489 *(S. paradoxus)*	1,31±0,01^{f}	8,50±0,00^{abc}	0,45±0,03^{i}
6490 (*S. paradoxus)*	1,15±0,37^{f}	8,66±0,00^{ab}	0,38±0,01^{i}
6491 (*S. paradoxus)*	1,32±0,25^{f}	0,83±0,00^{abc}	0,67±0,02^{i}
6045 *(S. paradoxus)*	7,20±0,17^{a}	0,00±0,00^{c}	3,55±0,24^{b}
T07S1B6 (*S. cerevisiae/ S. paradoxus/ S. bayanus)*	1,64±0,14^{f}	1,64±0,00^{bc}	0,90±0,25^{i}

Tab.6 CO_2, maltosio ed etanolo (fermentazione a 12°C; I dati riportati nella tabella sono I valori medi ± la deviazione standard con lettere all'apice (a-h) significative per ogni colonna (Duncan test; $p < 0.05$).

Dai dati riportati in tabella 5, si può notare come il valore della CO_2 svolta sia strettamente correlabile al quantitativo di maltosio residuo. Infatti, nella fermentazione a 20°C si possono prendere in esame i ceppi che vanno dal codice 6253 al 6258 (*S. pastorianus*, CBS Netherland) e dal 6282 al 6285 *(S. pastorianus,* Copenhagen Denmark) che, nonostante siano lieviti che potrebbero essere utilizzati nelle basse fermentazioni, abbiano comunque utilizzato quasi completamente il maltosio, abbiamo un valore di anidride carbonica svolta

elevata e ciò è confermato anche dal valore dell'etanolo che si aggira per tutti intorno circa al 3%. Lo stesso discorso non è valido per alcuni ceppi, provenienti dalla Russia, 6489, 6490 e 6491 *(S. paradoxus,* DBVPG, Russia*)* che risultano non avere un elevato valore di etanolo, in proporzione anche allo scarso andamento fermentativo.

Nella fermentazione condotta a 12°C (tabella 6) i ceppi MAF1.1, MAF1.2, MAF2.2 *(S. cerevisiae*, Madre Acida), MAF1.7 (*S.cerevisiae/S.bayanus*, Madre Acida) e MAF1.8 (*S.cerevisiae/paradoxus*) hanno avuto un andamento fermentativo buono, riscontrabile con contenuto di etanolo che si aggira al valore del 2%. Al contrario, invece ceppi come 7v (*S. bayanus*, fermentazione spontanea in cantina) e 8c (*S. bayanus*, fermentazione spontanea in cantina) che essendo *S. bayanus* e dunque avrebbero il potenziale per poter lavorare efficacemente anche a basse temperature, hanno avuto una resa inferiore probabilmente dovuto al fatto che sono stati isolati dal mosto del vino Verdicchio, poiché usati nella fermentazione vinaria, e dunque probabilmente non adatti alla lavorazione brassicola.

4.3- PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

I principali composti secondari analizzati sono riportati in tabella 7 (fermentazione a 20°C) ed 8 (fermentazione a 12°C).

Nei vari composti analizzati a 20°C (tabella 7), US05 (*S. cerevisiae*) mostra un incremento significativo nel contenuto di acetaldeide (aroma di mela verde), rispetto a tutti le altre fermentazioni valutate, mentre MAF1.2 (*S. cerevisiae*, Madre Acida) è il ceppo che ha mostrato un contenuto significativamente più basso. Entrambi i ceppi appartengono alla

specie *S. cerevisiae*, ma provenienti da matrici differenti, rispettivamente starter commerciale e l'altro isolato da Madre Acida.

Nel caso dell'etilacetato, responsabile dell'odore di solvente, il ceppo che presenta un incremento significativo è W34 (*S. pastorianus,* starter commerciale) rispetto a ceppi come 2 (S. cerevisiae/ S. paradoxus, fermentazione spontanea in cantina), MAF1.1 (*S. cerevisiae,* Madre Acida) 6258 (*S. pastorianus,* DBVPG, CBS Netherland), 6261 (*S. pastorianus,* DBVPG, CBS Netherland) e il 6491(*S. paradoxus,* DBVPG, Russia), che mostrano invece un contenuto di questo composto nettamente inferiore.; il propanolo, nota di durezza, presenta invece una grande differenza tra lo starter commerciale W34 (*S. pastorianus*), 17,24 mg/l, e MAF1.7 (*S. cerevisiae/bayanus*, Madre Acida) che presenta un contenuto significativamente inferiore che si aggira intorno 7,01 mg/l; il composto amilicoattivo presenta una netta differenza solo tra W34 (*S. pastorianus,* starter commerciale) e 2 (*S. cerevisiae/ S. bayanus,* fermentazione spontanea in cantina), come anche per l'isoamilico che la presenta sempre per W34 (*S. pastorianus*) e 6489 (*S. paradoxus,* Russia). In tutti i composti, ad eccezione dell'isobutanolo che è responsabile dell'odore di solvente, lo starter commerciale W34 (*S. pastorianus*) si distingue per l'alto contenuto di acetaldeide, etilacetato, propanolo, amilicoattivo e isoamilico.

Fermentazioni 20°C	ACETALDEIDE	ETILACETATO	PROPANOLO	ISOBUTANOLO	AMILICOATTIVO	ISOAMILICO
US05 *(S. cerevisiae)*	56,69±18,43^{a}	9,87±0,69^{b}	13,49±0,15^{bcd}	9,64±1,85^{cd}	7,04±1,08^{cdefgh}	59,07±1,05^{d}
W-34 (*S. pastorianus)*	56,3±7,63^{a}	17,11±0,22^{a}	17,25±1,99^{a}	20,54±2,29^{ab}	15,7±3,35^{a}	87,59±1,56^{a}
7v (S.*bayanus)*	8,66±0,35^{de}	8,21±2,29^{bc}	14,07±1,16^{bc}	25,02±0,76^{a}	9,56±2,60^{bcd}	66,23±0,27^{c}
8c *(S. bayanus)*	11,6±0,09^{d}	2,02±0,34^{efg}	15,10±0,79^{ab}	12,99±1,81^{bcd}	6,58±0,54^{defghil}	40,95±1,93^{fg}
8 *(S. cerevisiae)*	5,41±0,72^{de}	3,43±0,80^{defg}	12,6±1,1^{bcdefg}	27,64±1,93^{a}	7,91±1,24^{cdefg}	65,96±1,81^{c}
2 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus)*	8,22±1,05^{de}	0,07±0,10^{g}	11,36±1,06^{defg}	5,27±1,26^{cd}	2,12±0,41^{m}	24,45±0,79^{il}
MAF 1.1 *(S. cerevisiae)*	41,56±2,97^{b}	0,58±0,49^{g}	11,37±1,34^{defg}	7,1±4,74^{cd}	8,94±1,25^{cdef}	65,62±0,01^{c}
MAF 1.2 *(S. cerevisiae)*	25,96±3,75^{c}	1,09±0,01^{fg}	10,53±0,12^{efg}	5,75±1,15^{cd}	3,17±4,49^{hilm}	55,71±2,43^{de}
MAF 2.2 (*S. cerevisiae)*	0,44±0,62^{e}	2,22±1,29^{efg}	12,24±1,97^{cdefg}	12,02±8,4^{bcd}	10,23±3,04^{bcd}	56,08±2,3^{de}
MAF 1.7 *(S. cerevisiae/ S. bayanus)*	9,05±1,18^{de}	1,49±1,07^{fg}	10,18±0,18^{g}	7,01±0,53^{cd}	4,33±0,99^{ghilm}	38,67±0,39^{g}
MAF 1.8 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus)*	3,58±1,05^{de}	8,21±0,37^{bc}	12,45±1,00^{cdefg}	11,37±7,04^{cd}	11,05±0,94^{bc}	68,76±1,54^{c}
6253 *(S. pastorianus)*	33,68±1,59^{bc}	1,43±0,37^{fg}	11,69±1,13^{cdefg}	8,16±6,39^{cd}	4,64±0,68^{fghilm}	30,6±0,66^{h}
6258 *(S. pastorianus)*	1,46±0,07^{de}	0,23±0,04^{g}	10,32±0,42^{fg}	27,76±5,98^{a}	2,4±2,16^{lm}	77,09±2,36^{b}
6261 *(S. pastorianus)*	11,31±3,09^{de}	0,51±0,06^{g}	12,98±1,68^{bcde}	8,12±5,48^{cd}	13,46±3,10^{ab}	38,36±2,70^{g}
6282 *(S. pastorianus)*	2,63±0,78^{de}	7,32±1,76^{bcd}	12,84±0,56^{bcdef}	8,21±3,36^{cd}	8,37±1,50^{cdefg}	40,21±1,21^{fg}
6283 *(S. pastorianus)*	11,53±3,26^{d}	8,22±2,25^{bc}	12,92±0,16^{bcdef}	6,6±3,12^{cd}	7,34±0,10^{cdefgh}	40,55±1,17^{fg}
6284 *(S. pastorianus)*	4,43±1,47^{de}	1,38±0,68^{fg}	12,31±0,31^{cdefg}	14,75±4,35^{bc}	9,03±0,99^{cde}	42,88±0,01^{f}
6285 *(S. pastorianus)*	2,34±0,64^{de}	3,17±1,13^{efg}	10,54±0,06^{efg}	7,79±0,56^{cd}	4,14±0,07^{ghilm}	25,19±0,54^{il}
6489 *(S. paradoxus)*	5,7±2,37^{de}	3,76±4,06^{defg}	10,38±0,09^{efg}	4,8±0,53^{d}	2,62±0,02^{ilm}	21,73±2,30^{il}
6490 *(S. paradoxus)*	25,81±1,99^{c}	1,93±1,27^{efg}	10,42±0,48^{efg}	8,17±1,92^{cd}	3,53±0,42^{hilm}	26,6±30^{i}
6491 (*S. paradoxus)*	9,93±1,10^{de}	-0,34±0,64^{g}	12,09±1,33^{cdefg}	8,44±3,37^{cd}	4,87±0,86^{efghilm}	25,21±0,29^{il}
6045 (*S. paradoxus)*	6,15±0,47^{de}	5,2±5,43^{cdef}	12,1±1,34^{cdefg}	10,93±5,31^{cd}	5,11±1,74^{efghilm}	56,79±0,61^{d}
T07S1B6 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus/ S. bayanus)*	2,16±0,64^{de}	5,93±0,71^{bcde}	13,67±1,7^{bcd}	20,43±0,57^{ab}	6,84±0,11^{cdefghi}	52,74±2,13^{e}

Tab.7 Principali prodotti di fermentazione (mg/l), fermentazione a 20°C

Per la fermentazione a 12°C possiamo fare simili osservazioni: gli starter commerciali, US05 (*S. cerevisiae*) e W-34 (*S.pastorianus*), presentano un contenuto significativo di acetaldeide, rispetto a MAF2.2 (*S. cerevisiae,* Madre Acida), con contenuto nettamente inferiore; gli

unici ceppi che hanno mostrato dati significativi nell'etilacetato sono US05 (*S. cerevisiae*, starter commerciale), 8c (*S. bayanus,* Cantina Giulia) e MAF2.2 (*S. cerevisiae,* Madre Acida) con valor, rispettivamente di 6,68 mg/l, 5,01 mg/l e 4,48 mg/l); per il propanolo il ceppo 8c (*S. bayanus*, fermentazione spontanea in cantina), seguito dai due starter commerciale, US05 e W34, mostrano dei valori statisticamente alti rispetto a 6258 (*S. pastorianus*, DBVPG, CBS Netherkand). 6261 (*S. pastorianus*, DBVPG, CBS Netherland) si distacca dagli altri campioni, fino al ceppo 2 (*S. cerevisiae/ S. bayanus*, fermentazione spontanea in cantina), per un valore alto di amilicoattivo (18,56 mg/l) e per l'isoamilico tra lo starter commerciale W34 (*S. pastorians*) e 2 *(S. cerevisiae/ S. bayanus*, fermentazione spontanea in cantina) e 6490 (*S. paradoxus,* Russia). In questa fermentazione possiamo notare che, a presentare valori alti di composti secondari non è solo lo starter commerciale W34 *(S. pastorianus),* ma anche US05 *(S. cerevisiae)* e 8c (*S. bayanus*, fermentazione spontanea in cantina), suggerendo dunque che a differenti temperature, a prescindere dalla temperatura ottimale di ciascun lievito, si potrebbero ottenere dei prodotti che siano apprezzati dai consumatori.

CEPPI 12°C	ACETALDEIDE	ETILACETATO	PROPANOLO	ISOBUTANOLO	AMILICOATTIVO	ISOAMILICO
US05 (*S. cerevisiae*)	84,23±5,11^{a}	6,68±0,24^{a}	14,42±0,08^{b}	13,5±0,22^{b}	9,48±0,15^{d}	59,76±0,07^{b}
W-34 *(S. pastorianus)*	83,25±1,56^{a}	2,1±0,14^{a}	14,15±0,18^{b}	13,65±0,08^{b}	12,31±0,09^{b}	62,24±1,24^{a}
7v (*S.bayanus*)	2,77±0,19^{hi}	1,04±1,47^{b}	11,41±0,05^{ghil}	9,92±0,38^{cd}	3,63±0,05^{m}	23,98±0,04^{n}
8c (*S. bayanus*)	25,69±1,42^{b}	5,01±2,86^{a}	15,54±0,31^{a}	12,58±0,47^{b}	6,78±0,24^{g}	34,97±0,16^{h}
8 (*S. cerevisiae*)	5,19±0,16^{gh}	1,7±0,66^{b}	11,19±0,01^{hilm}	8,43±0,47^{defg}	3,11±0,18^{n}	21±0,33^{o}
2 (*S. cerevisiae/ S. paradoxus*)	4,05±0,39^{gh}	0,04±0,05^{b}	10,67±0,21^{m}	5,04±0,56^{h}	1,3±0,16^{q}	11,24±0,79^{q}
MAF 1.1 *(S. cerevisiae*)	4,87±0,05^{gh}	1,09±1,16^{b}	11,12±0,32^{hilm}	9,03±0,39^{cdef}	7,28±0,44^{f}	43,18±0,33^{e}
MAF 1.2 (*S. cerevisiae*)	6,65±1,61^{fg}	1,5±0,33^{b}	10,75±0,14^{lm}	8,19±0,41^{efg}	5,73±0,11^{i}	37,24±0,75^{g}
MAF 2.2 (*S. cerevisiae*)	0,00±0,00^{i}	4,82±0,65^{b}	12,29±0,06^{def}	12,92±0,36^{b}	7,72±0,06^{f}	39,36±0,08^{f}
MAF 1.7 *(S. cerevisiae/ S. bayanus*)	17,47±2,61^{c}	0,36±0,4^{b}	11,02±0,01^{ilm}	7,52±0,23^{fg}	5,64±0,09^{i}	32,57±0,65^{i}
MAF 1.8 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus*)	9,02±0,29^{ef}	1,36±0,28^{b}	11,99±0,59^{efg}	9,35±0,00^{cde}	7,39±0,21^{f}	40,83±0,34^{f}
6253 (*S. pastorianus*)	12,09±0,99^{de}	2,42±3,13^{b}	11,73±0,03^{fgh}	10,31±0,04^{c}	7,24±0,29^{f}	37,07±1,13^{g}
6258 (*S. pastorianus*)	2,92±0,99^{ghi}	0,36±0,51^{b}	0,01±0,01^{n}	12,54±0,42^{b}	2,68±0,21^{no}	33,8±0,19^{hi}
6261 *(S. pastorianus*)	13,67±2,68^{d}	1,24±0,35^{b}	13,22±0,64^{c}	15,46±1,35^{a}	18,56±0,24^{a}	50,28±1,39^{d}
6282 *(S. pastorianus*)	9,47±0,72^{ef}	1,12±0,22^{b}	10,96±0,22^{lm}	7,52±0,16^{fg}	6,29±0,06^{h}	28,27±0,14^{l}
6283 (*S. pastorianus*)	12,26±0,3^{de}	2,43±0,37^{b}	12,67±0,68^{cde}	8,76±0,48^{def}	8,9±0,37^{e}	39,86±0,91^{f}
6284 *(S. pastorianus*)	9,81±1,19^{ef}	0,97±0,07^{b}	12,21±0,47^{def}	14,04±0,11^{b}	10,44±0,05^{c}	44,36±0,85^{e}
6285 (*S. pastorianus)*	14,22±0,59^{cd}	0,29±0,08^{b}	11,42±0,09^{ghil}	8,96±2,20^{cdef}	5,36±0,49^{i}	26,11±2,24^{m}
6489 (*S. paradoxus*)	8,77±0,58^{ef}	1,48±0,48^{b}	11,7±0,3^{fghi}	7,76±0,29^{fg}	4,47±0,18^{l}	24,76±1,11^{mn}
6490 (*S. paradoxus*)	4,51±0,80^{gh}	1,33±0,44^{b}	0,01±0,00^{n}	4,78±0,11^{h}	1,78±0,1^{p}	11,52±0,04^{q}
6491 (*S. paradoxus*)	17,17±2,18^{c}	1,26±0,82^{b}	12,64±0,08^{cde}	7,53±0,65^{fg}	4,49±0,1^{l}	25,49±0,81^{mn}
6045 (*S. paradoxus*)	3,69±0,39^{gh}	2,46±0,55^{b}	12,49±0,19^{de}	13,55±0,8^{b}	7,65±0,08^{f}	57,46±0,39^{c}
T07S1B6 *(S. cerevisiae/ S. paradoxus/ S. bayanus*)	6,37±0,01^{fgh}	0,46±0,21^{b}	12,73±0,26^{cd}	6,91±0,37^{g}	2,57±0,19^{o}	17,58±0,54^{p}

Tab.8 Principali prodotti di fermentazione (mg/l), fermentazione a 12°C

I principali caratteri fermentativi, sono stati poi elaborati attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA) per vedere se il comportamento fermentativo mostrato dai ceppi analizzati avesse una corrispondenza, oltre che tra genere e specie, anche con la loro origine geografica e dalla matrice d'origine (Fig.10).

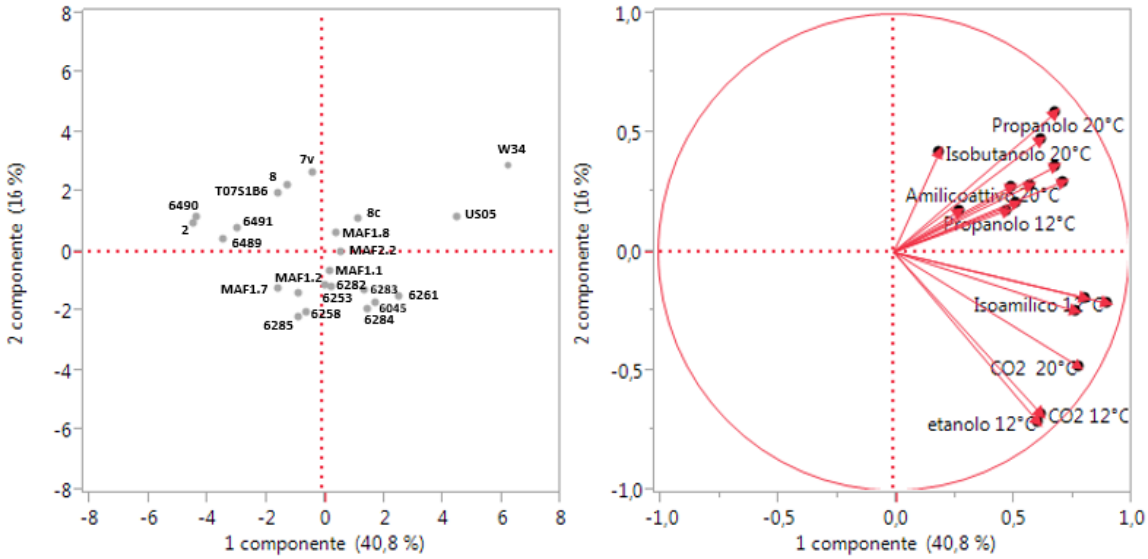


Fig.10 Grafico PCA

Dal grafico si nota che i ceppi MAF1.1, MAF2.2 (*S. cerevisiae*, Madre Acida), MAF1.8 (*S. cerevisiae/S.paradoxus*, Madre Acida), a destra del grafico, mentre MAF1.2 (*S. cerevisiae*, Madre Acida) e MAF1.7 (*S. cerevisiae/ S. bayanus*, Madre acida) li possiamo trovare nel quadrante in basso a sinistra, ma tutti collocabili nella parte centrale del grafico. Gli starter sono entrambi nel quadrante in alto a destra mentre nel quadrante in alto a

sinistra troviamo i ceppi che non hanno avuto un'elevata attività fermentativa in almeno una delle due fermentazioni come nel caso dei ceppi 6489, 6490, 6491 (*S. paradoxus*, DBVPG, Russia) che, in entrambe, non hanno prodotto alti contenuti di anidride carbonica; 7v (*S. bayanus*), 8c (*S. bayanus*), 8 (*S. cerevisiae*), 2 (*S. cerevisiae/S. paradoxus*) isolati da cantina, sono invece stati individuati e raggruppati nei quadranti superiori e tutti nella parte sinistra, ad eccezione di 8.

4.4- ANALISI SENSORIALE

L'analisi sensoriale di tipo descrittivo è stata effettuata degustando le varie birre andando a paragonare i prodotti finiti ottenuti da ciascun ceppo alle due differenti temperature di fermentazione, ovvero 20°C con le corrispettive ottenute a 12°C.

I prodotti finiti hanno avuto dei risultati interessanti, a prescindere dalla temperatura ottimale di fermentazione dei ceppi utilizzati, dimostrando che, in alcuni casi, è possibile ottenere prodotti accettabili.

Lo starter commerciale US05 a 20°C presenta un aroma fruttato con un accenno di citrico, accompagnato da una nota maltata e di caramello, caratteristiche diverse da quelle riscontrate nella bassa fermentazione, in cui la nota citrica è molto più presente e si percepisce un sapore alcolico.

W-34, invece, nell'alta fermentazione presenta un odore di DMS (dimetilsolfuro) un'alta nota citrica, solforata e ossidata, con un retrogusto ferroso rendendo questo prodotto non gradevole al palato; la controparte a

12°C ha presentato il gusto tipico di una Kellerbier Pils, dal sapore fresco, fruttato con leggero accenno floreale.

Saccharomyces bayanus ,7v, ha mostrato, come nel caso dello starter della bassa fermentazione, delle importanti differenze tra le fermentazioni a 20°C e 12°C; a 20°C ha presentato DMS nella descrizione olfattiva come anche un odore fruttato citrico e fruttato dato dagli esteri che va a ricordare il kiwi, rendendola a naso un prodotto gradevole, il quale però non è riscontabile a livello gustativo, risultando poco corposa, con sapore dolce, maltato e di solvente.

A bassa temperatura, invece, ha avuto un risultato migliore: sia a naso che a sapore ha ricordato una Kellerbier Pils senza note aromatiche particolari, ma solo di luppolo e cereale.

Saccharomyces bayanus 8c, ha avuto un riscontro molto simile sia a bassa che ad alta temperatura, presentando nell'alta fermentazione note fruttate, citriche e leggermente solforate rendendola più piacevole all'olfatto che al gusto, presentando un sapore di bruciato e poco aromatico; a bassa fermentazione ha ricordato una Kellerbier Pils che però non ha presentato un sapore deciso come il profumo.

Saccharomyces cerevisiae 8, ha presentato nell'alta fermentazione un odore ossidato causato dall'errata chiusura della bottiglia, e DMS rendendo il prodotto poco gradevole al palato così come quello ottenuto dalla bassa fermentazione che ha presentato odore e sapore di solvente, note dolci all'inizio tendendo poi al citrico e astringente verso la fine.

Saccharomyces cerevisiae/ Saccharomyces paradoxus 2, mantiene la nota maltata in entrambe le fermentazioni conferendo un sapore dolce ad entrambe le birre, come fossero poco fermentate, dato confermato dall'andamento fermentativo.

Il gruppo *Saccharomyces cerevisiae* MAF1.1, MAF1.2, MAF2.2, e *Saccharomyces cerevisiae/ Saccharomyces paradoxus* MAF1.8, isolati da Madre Acida, hanno avuto dei risultati gradevoli in entrambe le fermentazioni sebbene siano presenti delle piccole sfumature e difetti nel gusto come, per esempio, un retrogusto ferroso nella MAF1.1. Più in generale presentano tutte delle note di caramello, d'agrume, cereale e miele, riscontrati anche a livelli gustativo sebbene presentino una corposità media; il prodotto ottenuto da MAF2.2 a 12°C risulta essere il migliore di questo gruppo.

Dei ceppi provenienti dalla collezione di DVBPG sono state riscontrate delle somiglianze tra i prodotti ottenuti da ceppi che hanno in comune il luogo d'origine. I ceppi di *Saccharmyces pastorianus* provenienti dall'Olanda, che sono 6253, 6258 e 6261, hanno presentato un prodotto migliore a bassa temperatura con note agrumate e amare piacevoli al palato, risultando, invece, insapori ad alte temperature.

I *Saccharomyces pastorianus* 6282, 6283, 6284, 6285 e 6045 provenienti dalla Danimarca, invece, hanno presentato dei risultati non molto soddisfacenti, sebbene i prodotti non risultino essere sgradevoli al palato; in particolare a 20°C hanno avuto in comune il sapore aspro, astringenza e poca corposità, mentre a 12°C era molto presente l'odore di DMS e poco sapore.

Saccharomyces paradoxus provenienti dalla Russia, 6489, 6490,6491, hanno dato risultati sgradevoli in entrambe le fermentazioni con note molto presenti di dimetilsolfito, agrumi e con caratteristico sapore dolce/maltato dato dalla scarsa attività fermentativa sia a 20°C che 12°C.

Saccharomyces cerevisiae/ Saccharmyces paradoxus/ Saccharomyces bayanus T07S1B6, ha dato dei risultati gradevoli sia a bassa che alta fermentazione; a 20°C presenta note agrumate e tostate con gusto leggermene dolce all'inizio e seguito da un sapore aspro con un leggero accenno di solvente, mentre a 12°C presenta una nota fruttata e leggermente citrica sia a livello olfattivo che gustativo.

CAPITOLO 5- DISCUSSIONI

L'Italia si è distinta a livello Europeo, ma anche Mondiale per la produzione, esportazione e importazioni di birra superando, nell'ultimo decennio, paesi con un'importante tradizione brassicola alle spalle. I sapori e gli aromi delle birre artigianali dipendono dalle materie prime che, come visto, possono influenzare la produzione e anche il gusto, ma dipende soprattutto dalla scelta del lievito; questo, infatti, viene utilizzato generalmente in coltura pura al fine di dare al prodotto finito proprietà organolettiche caratteristiche e riconducibili sia al tipo di fermentazione (alta o bassa) che al ceppo. *(Meier-Dörnberg, et al. 2017; Lasanta et al., 2021)*

In questo studio l'obbiettivo è stato quello di valutare se ceppi di *S. cerevisiae, S. pastorianus, S. bayanus* e *S. paradoxus* riescano a dare prodotti finiti accettabili e gradevoli al consumatore, lavorando a temperature differenti da quelle ottimali. Inoltre, vista la diversa origine di isolamento e geografica dei ceppi, si è valutato anche una possibile correlazione tra il comportamento fermentativo esibito dai ceppi e la loro origine.

Ciò che è emerso da questo studio è che ad influire sul risultato finale non sono solo la specie e il genere, ma anche la matrice da cui sono stati isolati e il paese di origine. Analizzando la cinetica fermentativa di questi ceppi, possiamo notare come, in entrambe le fermentazioni, i due starter commerciali abbiano avuto un'attività fermentativa elevata: nella fermentazione ad alta temperatura, US05 e W34 si sono distinti insieme ai ceppi di *S. pastorianus* (6282, 6283, 6284, 6285) provenienti dalla Danimarca, a differenza dei ceppi di *S. cerevisiae* e *S. bayanus* isolati da cantina che non hanno mostrato un'alta attività fermentativa; ceppi di *S. paradoxus*, invece, provenienti dalla Russia (6489, 6490, 6491) in entrambe le fermentazioni si sono discostati dall'andamento degli starter. Alcuni esempi il cui risultato ha avuto esito positivo, sono i ceppi del gruppo MAF isolati a Madre Acida che hanno dato risultati gradevoli in entrambe le fermentazioni, in particolare MAF2.2, *S. cerevisiae*, i cui prodotti sono risultati poco alcolici, con note agrumate, di cereale e miele, coerentemente con la concentrazione di etanolo e composti secondari; un altro esempio è il ceppo T07S1B6, *S. cerevisiae/S.bayanus/S.paradoxus*, che ha dato risultati piacevoli sia nella bassa che nell'alta fermentazione dando però caratteristiche differenti ai due prodotti finiti: in quella ad alta temperatura, le note agrumate sono molto più presenti rispetto a quella a bassa temperatura, dove si distinguono di più le note fruttate che quelle citriche, comunque presenti.

Altri ceppi, invece, hanno dato scarsi risultati in entrambe le fermentazioni e queste sono raggruppabili in due macrogruppi: *S. pastorianus* provenienti dall'Olanda (6253, 6258, 6261, 6045), dalla collezione DBVPG, che invece hanno dato risultati poco gradevoli, ma non negativi e *S. paradoxus* (6489, 8490, 6491), della collezione di DBVPG, provenienti dalla Russia, i cui prodotti sono risultati sgradevoli, rispecchiando la loro scarsa attività fermentativa. Un altro esempio in cui la matrice d'origine è determinante nel risultato, sono i ceppi 7v, 8c, 8 e 2 isolati in cantina che hanno dato alcuni risultati positivi nel caso di 7v e 8c, entrambi *S. bayanus*, risultati nettamente migliori a bassa temperatura, altri più gradevoli all'olfatto che al gusto.

CAPITOLO 6- CONCLUSIONI

Nella produzione di birra artigianale è importante la scelta delle materie prime poiché da esse dipendono non solo la riuscita della fermentazione, e dunque della produzione, ma anche la qualità e delle proprietà organolettiche del prodotto finito.

Gli starter che vengono utilizzati per produrre birra sono: *S. cerevisiae* per le birre Ale (alta fermentazione) e *S. pastorianus* per le Lager (bassa fermentazione). La differenza tra una birra Ale e una birra Lager, oltre alle condizioni fermentative, è il gusto: le Ale, infatti, si contraddistinguono per un corpo pieno e rotondo, con un sapore tendente al dolce e aromi fruttati e floreali, mentre per le Lager, invece, le note che vengono risaltate sono l'amaro/luppolato con aromi di malto, cereali, miele e pane.

Lo scopo di questo studio è stato quello di andare ad analizzare gli effetti di determinate condizioni fermentative, insolite per alcuni ceppi, variandone la temperatura ottimale. I risultati ottenuti hanno mostrato come alcuni lieviti possano dare come risultato prodotti simili in entrambe le condizioni fermentazioni o addirittura in certi casi prodotti differenti, conferendo caratteristiche peculiari come, per esempio, nel caso di T07S1B6 che ha dato prodotti finiti gradevoli al palato, ma differenti, confermando in questo caso come la temperatura abbia definito la valorizzazione di un determinato flavour.

Con i giusti accorgimenti, selezionando ceppi con adeguate cinetiche fermentative e che diano determinate caratteristiche organolettiche è possibile ottenere prodotti nuovi e gradevoli a differenti condizioni di fermentazione sfruttando uno stesso ceppo, dando così la possibilità al mondo brassicolo di ampliare e diversificare i propri prodotti.

CAPITOLO 7- BIBLIOGRAFIA

- **Assobirra** report annuale 2013. Roma
- **Boulton C & Quain D** (2006). Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science, Oxford.
- **Cabras P. & Martelli A**. (2004). Chimica degli alimenti. Piccin Editore pp. 557-598.
- **Canonico L, Comitini F, Ciani M** (2014). Dominance and influence of selected Saccharomyces cerevisiae strains on the analytical profile of craft beer refermentation. Institute of Brewing & Distilling. DOI 10.1002/jib.133
- **Tim Meier-Dörnberg, Mathias Hutzler, Maximilian Michel, Frank-Jürgen Methner, Fritz Jacob** (2017), The Importance of a Comparative Characterization of Saccharomyces Cerevisiae and Saccharomyces Pastorianus Strains for Brewing, Fermentation 3 (3), 41
- **S. Engan** (1973), 2-phenyl ethyl acetate in beer, Journal of the Institute of brewing 79 (1), 15-16,
- **Harrison MA** (2009). "Beer/Brewing." Encyclopedia of Microbiology. 3rd Edition. Elsevier Inc.
- **Michael M. Homan**, Near Archeology, vol 67, n°2, june, 2004 pp.84-95
- **Bruno Vieira Humia, Klebson Silva Santos, Andriele Mendonça Barbosa, Monize Sawata, Marcelo da Costa Mendonça, Francine Ferreira Padilha** (2019), Beer molecules and its sensory and biological properties: A review Molecules 24 (8), 1568,

- **N James, U Stahl** (2014), Amino acid permeases and their influence on flavour compounds in beer, Brew. Sci 67, 120-127
- **Michiko Kobayashi, Keisuke Nagahisa, Hiroshi Shimizu, Suteaki Shioya** (2006), Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in low-malt beer fermentation, Applied microbiology and biotechnology 73 (3), 549-558
- **Martin Krottenthaler** (2009), Hops Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 85-104
- **Cristina Lasanta, Enrique Durán-Guerrero, Ana Belén Díaz, Remedios Castro** (2021), Influence of fermentation temperature and yeast type on the chemical and sensory profile of handcrafted beers, Journal of the Science of Food and Agriculture 101 (3), 1174-1181
- **Diego Libkind, Chris Todd Hittinger, Elisabete Valério, Carla Gonçalves, Jim Dover, Mark Johnston, Paula Gonçalves, José Paulo Sampaio** (2011), Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast, Proceedings of the National Academy of Sciences 108 (35), 14539-14544,
- **Linko M, Haikara A, Ritala A, Penttilä M.** (1998). Recent advances in the malting and brewing industry. J of Biotechnology 65: 85-98.
- **Elizabeth J Lodolo, Johan LF Kock, Barry C Axcell, Martin Brooks (**2008), The yeast Saccharomyces cerevisiae– the main character in beer brewing, FEMS yeast research 8 (7), 1018-1036
- **Manzoni M.** (2006). Microbiologia industriale. Editore: Casa Editrice Ambrosiana

- **HV Nguyen, JL Legras, C Neuvéglise, C Gaillardin** (2011), Deciphering the Hybridisation History Leading to the Lager Lineage Based on the Mosaic Genomes of Saccharomyces bayanus Strains NBRC1948 and CBS380T- plos One - journals.plos.org
- **M Ocvirk, IJ Košir** (2020), Dynamics of isomerization of hop alpha-acids and transition of hop essential oil components in beer- Acta Chimica Slovenica, - journals.matheo.si
- **O. Olaniran, Lettisha Hiralal, Mduduzi P. Mokoena and Balakrishna Pillay**. (2016). Flavour-active volatile compounds in beer:production, regulation and control.
- **Petruzzi, L., Rosaria Corbo, M., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A**. (2016). Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. Food Reviews International, 32(4), 341
- **AJ Rehberger, GE Luther, Brewing** (1995), FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-, 247-247
- **Serena Rossi, Valeria Sileoni, Giuseppe Perretti, Ombretta Marconi** (2014), Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, Journal of the Science of Food and Agriculture 94 (5), 919-928
- **D Šmogrovičová, Z Döméný** (1999), Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts, Process Biochemistry 34 (8), 785-794

- **Sols A, Gancedo C, Delafuente G** (1971). Energy-yielding metabolism in yeasts. In: The yeasts. ed. Da Rose AH, Harrison JS, Vol. 2, Pag. 271, Acad. Press, Londra - New York.
- **Y Tamai, T Momma, H Yoshimoto, Y Kaneko**, Co-existence of two types of chromosomes in the bottom fermenting yeast, Saccharomyces pastorianus- Yeast, 1998 - Wiley Online Library
- **B Vanderhaegen, F Delvaux, L Daenen, H Verachtert**, Aging characteristics of different beer types, - Food chemistry, 2007 - Elsevier
- **CE Wolf-Hall**, Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing- International journal of food microbiology, 2007 – Elsevier
- **Zasio G., Cardone, C. & Maturano, G.** (1997). Sapere di birra. Storia, produzione, qualità, legislazione e spillatura. Ed. Birra Peroni, Roma.

7.1- SITOGRAFIA

- https://www.assobirra.it/ AssoBirra_AnnualReport_2020_giugno2021

Ai miei nonni.