UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in:

Biologia Molecolare e Applicata

Uso di amaranto e miglio per la produzione di birra artigianale fortificata mediante lieviti non-convenzionali

Use of amaranth and millet for fortified craft beer production with non-conventional yeasts

Tesi di Laurea Magistrale di:
Valentina Lo Conte

Relatore:
Prof.ssa Francesca Comitini

Correlatore:
Dott.ssa Laura Canonico

Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2019/2020

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE……4

1.1. *BIRRA INDUSTRIALE: MATERIE PRIME*……6

***1.1.1. Acqua*……6**

***1.1.2. Malto*……...7**

***1.1.3. Lievito*……9**

***1.1.4. Luppolo*……11**

***1.2. IL PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA INDUSTRIALE*……..12**

***1.2.1. Maltazione*……...12**

***1.2.2. Ammostamento*……13**

***1.2.3. Fermentazione*……17**

***1.2.4. Downstream*……18**

1.3. BIRRA ARTIGIANALE……19

1.4. LIEVITI NON-*SACCHAROMYCES* NELLA PRODUZIONE DELLA BIRRA ARTIGIANALE…….…….20

***1.4.1. Lachancea thermotolerans*……..…..21**

***1.4.2. Kazachstania unispora*……21**

1.5. CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA ARTIGIANALE……22

***1.5.1. Alcoli superiori*……24**

***1.5.2. Esteri*……... 25**

***1.5.3. Acidi organici*……...26**

***1.5.4. Composti fenolici*……27**

***1.5.5. Composti solforici*……....27**

***1.5.6. Composti carbonilici*……....28**

***1.5.7. Monoterpeni*……28**

1.6. ALIMENTI FUNZIONALI……..28

***1.6.1 Probiotici*……30**

***1.6.2 Alimenti fortificati con proteine*……31**

CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI……..……..…33

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

3.1 CEPPI DI LIEVITO UTILIZZATI……..34

3.2 MOSTO PILS…….34

3.3 IDROLIZZATI DI LEGUMI E CEREALI…….34

3.4 SCREENING DI SUBSTRATI E LIEVITI SELEZIONATI PER LE FERMENTAZIONI……36

3.5 ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI……37

3.6 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI……..38

3.7 DETERMINAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE……..38

3.8 ANALISI CHIMICHE

***3.8.1 Determinazione degli zuccheri*……...…39**

***3.8.2 Determinazione delle proteine*……41**

***3.8.3 Etanolo*……42**

***3.8.4 Alcoli superiori*……....42**

***3.8.5 Componente volatile*……....43**

3.9 ANALISI SENSORIALE……..45

CAPITOLO 4 – RISULTATI

4.1 SCREENING SUBSTRATI FERMENTATIVI…….46

4.2 FERMENTAZIONI MISTE: VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA SU AMARANTO E MIGLIO…….54

4.3 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA……...…58

4.4 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA……..59

4.5 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI…….63

4.6 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI…….66

CAPITOLO 5 - CONCLUSIONI E DISCUSSIONI……...71

CAPITOLO 6 – BIBLIOGRAFIA……...……75

CAPITOLO 1- INTRODUZIONE

La birra è una bevanda fermentata la cui origine esatta è sconosciuta ma che testimonianze archeologiche permettono di collocare intorno ai 6.000-7.000 anni fa al tempo dei Sumeri, rappresentando così una delle biotecnologie più antiche dell'umanità. Ben presto questa bevanda si diffuse in molte regioni del Medio Oriente, come Egitto ed Israele, per poi giungere ai Romani ed avere una rapida diffusione in tutta Europa. Tra le tappe storiche fondamentali per lo sviluppo del processo brassicolo vi sono indubbiamente il Medioevo, grazie all'introduzione da parte di un abate carolingio del luppolo, fondamentale sia per l'aromaticità che l'azione antimicrobica, e la Rivoluzione Industriale. Quest'ultima favorì l'industrializzazione della birra e notevoli miglioramenti nella sua produzione grazie all'introduzione del termometro e del densimetro. Nel corso degli anni tale bevanda ha subito quindi numerosi cambiamenti, dagli ingredienti impiegati al processo tecnologico utilizzato, ottenendo così il prodotto attualmente conosciuto, che continua però ad innovarsi.

Secondo la legislazione italiana, in particolar modo per il D.P.R. n 272 del 30/06/1998, si definisce birra il prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica condotta con ceppi di *Saccharomyces carlsbergensis* o *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. Il malto di orzo può essere sostituito con altri cereali, nella misura massima del 40%. La fermentazione alcolica del mosto può essere integrata con una fermentazione lattica ed è consentito l'impiego di estratti di malto torrefatto e degli additivi alimentari consentiti dal Decreto del Ministro della Sanità n 209 del 27/02/1996.
La birra è una delle bevande alcoliche più consumate del mondo e le materie prime utilizzate per la sua produzione sono: malto, luppolo, acqua e lievito. Questa grande popolarità è legata

al fatto che questa bevanda è versatile, tanto da poter soddisfare gusti differenti, moderatamente alcolica, poco calorica ed economicamente accessibile. La composizione media è costituita da: acqua (91-95%), alcol (3.5-5.0%), carboidrati (3.0-4.5%), proteine (0.2-0.65%) (De Stefano e Montanari, 1996) e meno dell'1% di elementi in tracce, minerali, vitamine (B1, B2, C, E), acidi organici, polifenoli e composti amari ed aromatici.

Nella 9° edizione del "Beer and Health symposium" (24 settembre 2019, Bruxelles), vennero presentati diversi studi a sostegno di un moderato consumo di birra come parte integrante di uno stile di vita sano. Anni di ricerche scientifiche hanno infatti dimostrato come un consumo regolare e moderato di birra (due bicchieri per gli uomini ed uno per le donne al giorno), possa avere effetti benefici sulla salute come ridurre il rischio di diabete di tipo II, trombosi, malattie cardiovascolari, regolarizzare la pressione sanguigna, migliorare il sistema di difesa immunitario, avere effetti antinfiammatori, migliorare la densità minerale nelle ossa ed aiutare a combattere alcuni tipi di cancro.

1.1 BIRRA INDUSTRIALE: MATERIE PRIME

Le materie prime utilizzate per la produzione della birra sono: acqua, malto, lievito e luppolo.

1.1.1 Acqua

L'acqua costituisce il 90-95% della birra ed essendo la materia prima quantitativamente dominante, influenza notevolmente la qualità del prodotto finale in base alle proprie caratteristiche chimico-fisiche. Tre sono gli aspetti fondamentali da valutare nell'acqua impiegata per la produzione della birra: la durezza, cioè il contenuto di sali di calcio e magnesio presenti sotto forma di bicarbonati; la presenza di altre molecole organiche e inorganiche che potrebbero essere dannose per il consumatore e/o influire sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finale; la presenza di microrganismi alterativi e/o patogeni.

Relativamente alla durezza dell'acqua, è stato dimostrato come l'utilizzo di acque dolci, cioè povere di sali minerali, permettano di produrre birre chiare poco amare, come nel caso della birra Lager nella città Ceca di Pilsen, e al contrario acque con durezza elevata permettano di produrre birre forti e amare come nella cittadina di Burton Upon Trent, nello Staffordshire, le cui acque sono caratterizzate dall'elevato contenuto di solfato di calcio.

D'altra parte, le molecole presenti nell'acqua, in particolar modo gli ioni, possono influenzare notevolmente la performance degli altri ingredienti utilizzati nella produzione della birra, come lievito, malto e luppolo. Per quanto riguarda il lievito, gli ioni inorganici, come ad esempio Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} e Ca^{2+}, svolgono un ruolo enzimatico e strutturale indispensabile, tanto che un'adeguata concentrazione di tali molecole comportano una crescita e una fermentazione ottimali (Stewart, 2009), oltre che una buona flocculazione, in particolar modo quest'ultima grazie alla presenza di ioni Ca^{2+}. Al contrario

ovviamente, un'eventuale scarsità di ioni può causare alterazioni del metabolismo e della crescita del lievito stesso. Ulteriori funzioni degli ioni inorganici sono: stimolare l'attività degli enzimi amilolitici e proteolitici durante la fase di ammostamento; migliorare la chiarificazione grazie all'influenza sull'interazione tra proteine, polifenoli e iso-α-acidi del luppolo; favorire la precipitazione delle proteine durante l'ebollizione; determinare il pH del mosto. In merito a quest'ultimo aspetto, è importante sottolineare quanto il pH possa influenzare significativamente il processo produttivo della birra: un aumento infatti comporta una lenta idrolizzazione di amido e proteine, una filtrazione e una resa in estratto meno efficiente, una minore concentrazione di FAN (Free Amino Nitrogen) e azoto solubile ed estrazione di tannini e polifenoli dal malto con effetti negativi sulle caratteristiche organolettiche della birra, al contrario una diminuzione del pH aumenta la stabilità aromatica del prodotto e la resistenza alle contaminazioni microbiche.

1.1.2 Malto

Figura 1- Malto d'orzo germinato

Il malto (Figura 1) è un prodotto di origine vegetale, ottenuto dalla germinazione di cereali (orzo, frumento, segale, avena, sorgo, miglio, riso, mais) o pseudo-cereali (grano saraceno e quinoa). Tra questi, l'orzo (*Hordeum vulgare*, famiglia delle *Graminaceae*) è il maggiormente utilizzato per la produzione della birra, essendo uno dei cereali più coltivati e diffusi al mondo. Relativamente alla composizione, questo cereale è costituito da: carboidrati (70-85%), di cui il 55-56% di amido, utilizzato dai lieviti durante la fermentazione, cellulosa ed emicellulosa, fondamentali per la resistenza e rigidità del seme, e zuccheri semplici (glucosio, fruttosio e saccarosio); proteine (10,5-11,5%), quali gluteline, prolamine, globuline e albumine, essenziali per la produzione di schiuma ma causa di intorbidimenti se in eccesso; lipidi (1,5-2%), come trigliceridi, i quali esercitano un effetto negativo sulla schiuma; in piccola quantità vitamine (B1, B2, C, E) necessarie per il metabolismo dei lieviti, e sostanze polifenoliche, causa di intorbidimenti e gusto aspro alla birra se solubilizzate (Cabras et al., 2004). Le fasi che precedono la maltazione, quali essiccazione, stoccaggio e manipolazione dell'orzo, sono essenziali e devono essere svolte adeguatamente per non danneggiare in alcun modo i tessuti della cariosside del grano, né permettere lo sviluppo di muffe e batteri alterativi e/o patogeni. Per tale motivo, è fondamentale che l'umidità del seme non superi il 12%, garantendone così una lunga conservabilità.

In commercio esistono varie tipologie di malto, distinguibili tra loro per le differenti caratteristiche. Tra queste vi è il colore, risultato della reazione tra zuccheri riducenti e aminoacidi (reazione di Maillard) (Briggs et al., 2009;) durante il processo di tostatura. Quest'ultima, infatti, può essere effettuata a diverse temperature, ottenendo così differenti colorazioni. Il Malto Vienna, per esempio, tostato ad una temperatura di 60°C, è

caratterizzato da un colore più chiaro rispetto al Malto Chocolate e Black Patent, tostati a 215-220°C. Poiché la qualità di malto impiegato influenza notevolmente la produzione (in tutte le sue fasi) e le caratteristiche del prodotto finale (quali schiuma, aroma, colore, stabilità), è fondamentale quindi che la scelta della materia prima impiegata sia consapevole al fine di ottenere un prodotto finale con le caratteristiche desiderate.

1.1.3 Lievito

Figura 2- Lievito secco utilizzato in birrificazione

Durante il processo di birrificazione, la scelta del lievito (Figura 2) riveste un ruolo fondamentale poiché influisce notevolmente sulle caratteristiche e qualità del prodotto finale. Nello specifico, i parametri da tener in considerazione sono: il tasso di fermentazione, la modalità di sviluppo, la resa in etanolo, il metabolismo degli zuccheri, la capacità di tollerare lo stress, l'influenza sull'aroma finale per la produzione di alcoli superiori ed esteri (Vanderhaegen et al., 2003; Cabras et al., 2004; Comi et al., 2008; Steensels e Verstrepen, 2014;).

Le specie di lievito maggiormente utilizzate nel processo fermentativo sono *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* (Lodolo et al., 2008), che si distinguono fra loro per la temperatura di fermentazione e le caratteristiche metaboliche.

S. cerevisiae è impiegato per la produzione di birra Ale (temperatura di fermentazione di 18-22 °C). Questa specie è inoltre definita top yeast poiché, a fine processo fermentativo, i lieviti tendono a risalire e trovarsi nella schiuma.

S. pastorianus è utilizzato per la produzione della birra Lager (temperatura di fermentazione di 7-15°C). Questa specie è definita, al contrario, bottom yeast poiché a fine processo i lieviti tendono a flocculare e precipitare sul fondo (Speers et al., 1992; Iserentant, 1994; Verstrepen et al., 2003 a; Lodolo et al., 2008).

Dal punto di vista metabolico queste due specie differiscono per vari aspetti. Innanzitutto, il lievito Lager si contraddistingue dal lievito Ale per l'assimilazione di maltosio e maltotriosio (Zheng et al., 1994; Stewart, 2010). In secondo luogo, il lievito Lager produce una maggior quantità di anidride solforosa, dovuta ad una più bassa temperatura di fermentazione, al metabolismo e a diversi tipi di zolfo (Stewart, 1981; Crumplen et al., 1993) e una maggior quantità di diacetile e vicinale, metaboliti del dichetone (VDK) come l'α-acetolattato e il diacetile (Gibson, 2003). Pur essendo queste specie di lievito maggiormente utilizzate nel processo di birrificazione, l'aumento della richiesta da parte dei consumatori di una birra dalle caratteristiche organolettiche peculiari ha contribuito alla selezione ed utilizzo di ceppi di lievito diversi dai comuni starter principalmente usati.

1.1.4 Luppolo

Figura 3 - Luppolo

Il luppolo (Humulus lupulus L.) è una pianta dioica a fiore appartenente alla famiglia delle Cannabaceae (Figura 3). Per la produzione della birra, vengono utilizzate solo le infiorescenze femminili, dette coni o strobili, ricche di ghiandole resinose, che durante la maturazione secernono una sostanza giallognola e resinosa chiamata luppolina. Tale sostanza, composta da resine amare, oli essenziali, tannini e terpeni, è indispensabile per conferire alla birra il suo gusto caratteristico grazie alle proprietà amaricanti e aromatizzanti. Dal punto di vista chimico, i due composti più importanti sono: gli α-acidi e i β-acidi (Ono et al., 1986). Gli α-acidi hanno un potere amaricante dieci volte superiore ai β-acidi, grazie anche alla loro isomerizzazione in iso- α-acidi, composti molto più amari e solubili (Cabras et al., 2004). L'isomerizzazione è facilitata in particolar modo da tre fattori: l'elevato pH del mosto, l'elevata durezza dell'acqua e l'elevata temperatura di ebollizione. Successivamente, affinché gli iso- α-acidi formati non vengano persi, è importante che vi sia un basso livello di luppolazione, una bassa durezza dell'acqua e un elevato valore di pH del mosto. I β-acidi al contrario, pur contribuendo ad amaricare la birra, sono molto meno solubili e la loro isomerizzazione molto più complessa (Cabras et al., 2004). Funzioni importanti sono svolte

anche dai tannini, che causano la coagulazione delle proteine durante la bollitura provocando così la chiarificazione naturale della birra (Zasio et al., 1997), e gli olii essenziali, indispensabili per l'aroma del prodotto finale.

I luppoli possono essere distinti in 3 tipologie: da amaro, aggiunti ad inizio bollitura e con una percentuale di α-acidi del 6-10%, da aroma, aggiunti a fine bollitura e con il 5% di α-acidi, e luppoli ambivalenti, con una percentuale di α-acidi maggiore del 6% e al tempo stesso un buon aroma. In alternativa, può essere utilizzato un processo definito luppolatura a freddo, o *dry hopping*, nel quale il luppolo viene aggiunto successivamente alla bollitura, cioè nelle fasi di fermentazione o condizionamento.

1.2 IL PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA INDUSTRIALE

Il processo di birrificazione può essere distinto in quattro fasi: la maltazione, ovvero la trasformazione dell'orzo, o eventualmente altri cereali, in malto; l'ammostamento, cioè la formazione di mosto di birra; la fermentazione, in cui gli zuccheri vengono trasformati in etanolo, anidride carbonica e composti secondari grazie all'azione dei lieviti; i processi di downstream, che si concludono con il prodotto pronto per il consumo (Linko et al., 1998).

1.2.1 Maltazione

La maltazione è un processo che consiste nell'idratazione del seme a pH alcalino, germinazione e successiva essiccazione tramite trattamento termico (Cabras et al., 2004), al fine di rendere disponibili differenti enzimi, non presenti nell'orzo quiescente, per degradare amido, proteine e altri componenti ed ottenere zuccheri, amminoacidi e acidi grassi, indispensabili per supportare la crescita dei lieviti (Harrison MA, 2009).

La componente proteica del malto gioca un ruolo essenziale per una scelta adeguata della temperatura e del tempo di germinazione. Generalmente, infatti, una bassa temperatura di germinazione (15-18 °C) per breve tempo permette di ottenere un malto chiaro a bassa concentrazione proteica e di conseguenza una birra chiara. Al contrario, un'elevata temperatura di germinazione (23-25°C) per un tempo più lungo, viene utilizzata per ottenere malti più scuri ad alta concentrazione proteica e di conseguenza birre più scure.

Nella prima fase della maltazione, i semi di graminacee, selezionati e con l'umidità del 12-14%, vengono posti in acqua in vasche di macerazione affinché l'umidità raggiunga il 30% e dia inizio alla germinazione. In questa fase gli ormoni di crescita, le gibbellerine, favoriscono la biosintesi degli enzimi amilasici, proteolitici ed endoglucanasi per la degradazione rispettivamente dell'amido, proteine e dei β-glucani. A questo punto la germinazione viene interrotta grazie ad un trattamento termico che può essere realizzato a temperature differenti (50-60°C, 71°C o 92°C) al fine di ridurre l'umidità dei semi portandola rispettivamente al 23%, 12% e 5%. Successivamente avviene la fase di essicazione per ridurre ulteriormente l'umidità, produrre composti che influiscono sul colore, aroma e gusto, e preservare gli enzimi formati durante la germinazione (Cabras et al., 2004).

1.2.2 Ammostamento

L'ammostamento è un processo che consiste nel riscaldare una miscela di malto e acqua così che gli enzimi presenti possano idrolizzare le differenti sostanze (Montanari et al., 2005), con lo scopo di ottenere un composto zuccherino fermentabile dai lieviti (Boulton et al., 2006). Affinché ciò avvenga, è necessario raggiungere temperature ottimali ed eseguire delle soste di durata variabile così che gli enzimi possano svolgere la propria azione. Prima di tale fase è necessario però che il malto venga macinato per aumentarne la superficie di contatto

con l'acqua, facilitare l'estrazione delle sostanze presenti e favorire l'attività enzimatica (Pires et al., 2015).

Figura 4 - Tino di ammostamento del Birrificio "Birra dell'Eremo" (Assisi, Italia)

Generalmente il processo, realizzato in appositi tini (Figura 4), inizia con una sosta di 10-20 minuti alla temperatura di 45-55°C, ottimale per l'attività delle proteasi che scindono le proteine in polipeptidi, a loro volta scissi in peptidi ed amminoacidi liberi dagli enzimi peptidici. Ciò permette di diminuire l'intorbidimento e favorire il processo fermentativo. D'altra parte, un'eccessiva degradazione proteica può influire negativamente sulla qualità del prodotto finale a causa dell'instabilità della schiuma. La seconda sosta (60-70 minuti) viene effettuata ad una temperatura di 58-63°C, ideale per le β-amilasi che staccano due unità di glucosio alla volta dall'estremità non riducente dell'amido producendo il maltosio, lo zucchero più abbondante nel mosto. La terza sosta avviene a 68-73°C, ottima per le α-amilasi che producono, a partire dall'amido, le destrine, non utilizzate da *S. cerevisiae* ma importanti per il corpo finale della birra.

Per concludere, gli enzimi presenti vengono inattivati portando la miscela ad una temperatura di 78°C.

Eventualmente può essere effettuata un'ulteriore fase caratterizzata da una temperatura di 36-45°C, per favorire l'azione di fitasi e β-glucanasi. Le prime scindono la fitina (sale di calcio e di magnesio dell'acido fitico) in fosfato di calcio o di magnesio ed acido citrico, contribuendo all'acidificazione del mosto; le seconde invece degradano i β-glucani, polisaccaridi che causano intorbidimenti e problemi di filtrazione dovuti alla viscosità che conferiscono al mosto (Home, 1993; Narziß, 1993; Bamforth, 1994) (Tabella 1).

Enzima	**Temperatura ottimale**	**pH ottimale**	**Funzione**
Fitasi	30-52°C	4.4-5.5	Acidificazione del mosto
β-glucanasi	36-45°C	4.5-5.0	Degradazione β-glucani
Peptidasi	46-57°C	4.6-5.2	Produzione FAN
Proteasi	46-57°C	4.5-5.2	Degradazione proteine
β-amilasi	62-65°C	5.4-5.6	Degradazione amido (maltosio)
α-amilasi	72-75°C	5.6-5.8	Degradazione amido (destrine)

Tabella 1 – Fasi di mashing con le varie soste di temperatura e rispettive funzioni

Affinché le reazioni enzimatiche avvengano efficientemente, è importante che vi sia un adeguato valore di pH. Poiché il valore ottimale per gli enzimi presenti è pari a 5.2 ma normalmente il pH del mosto è pari a 5.8, è necessario acidificare la miscela mediante l'utilizzo di acido lattico o batteri acidificanti come *Lactobacillus delbruekii.* Tuttavia, l'utilizzo di microrganismi richiede un controllo maggiore affinché non diventino alterativi. L'ammostamento può essere effettuato in due modi: per infusione, nel quale l'intera miscela viene riscaldata senza raggiungere mai l'ebollizione, e per decozione, dove una porzione di

miscela viene prelevata, fatta bollire e reintrodotta poi nella miscela di partenza per riscaldarla fino alla dovuta temperatura.

Una volta ottenuto il mosto si procede con il processo di filtrazione per separare la porzione solida (le trebbie) da quella liquida (il mosto). Le trebbie vengono poi essiccate ed utilizzate ad esempio per la produzione di mangime per animali. Il mosto filtrato viene quindi posto in caldaie di rame e portato all'ebollizione, per un tempo che varia da un'ora a due ore e mezza in base alla birra che si vuole ottenere (Manzoni, 2006). Questa fase di ebollizione del mosto comporta: la completa inattivazione degli enzimi; la sterilizzazione del mosto, fondamentale per la fase successiva di fermentazione; l'evaporazione di composti volatili indesiderati; la concentrazione del mosto grazie all'evaporazione dell'acqua in eccesso; la precipitazione di complessi insolubili (hot trubs) favorendo la chiarificazione del mosto; il miglioramento dell'estrazione di oli essenziali e resine dal luppolo (Harrison, 2009).

Il luppolo, fondamentale per le sue attività aromatizzanti, amaricanti e batteriostatiche, viene aggiunto in una o più gittate ed in diversi momenti dell'ebollizione (Simpson, 1993). In alternativa, il luppolo può essere aggiunto a fine bollitura (*dry hopping*) per enfatizzare il carattere luppolato della birra.

Terminata la cottura, i *trub* a caldo, sostanze indesiderate, vengono separati mediante l'uso di *whirpool* (Figura 5); segue poi il raffreddamento del mosto mediante l'utilizzo di scambiatori di calore. Quando la temperatura giunge ai circa 60°C avviene la precipitazione dei cosiddetti *trub* a freddo, derivanti dalla degradazione di proteine e polifenoli. A differenza dei primi però questi non vengono rimossi poiché determinerebbero un'alterazione delle caratteristiche organolettiche del prodotto finale. A questo punto la temperatura viene abbassata a 10–20 ° C, a seconda della birra desiderata: bassa o alta fermentazione (Cabras e Martelli, 2004; Manzoni, 2006).

Figura 5 - Whirpool. Birrificio "Birra dell'Eremo" (Assisi, Italia)

1.2.3 Fermentazione

Per avere una buona fermentazione, il lievito utilizzato deve provenire da colture pure e selezionate, essere altamente vitale e con una buona resistenza all'alcool. Inoltre, devono essere monitorati determinati parametri per avere un tasso di crescita ottimale: apporto di nutrienti, adeguata temperatura, ossigeno disciolto e un corretto inoculo (Lodolo, et al., 2008).

Questo processo può essere suddiviso in: fermentazione primaria e fermentazione secondaria (o maturazione). La fermentazione primaria dura circa 7 giorni, con una temperatura variabile tra i 15°C (birra Lager) e i 22°C (birra Ale). In questa fase vengono fermentati quasi tutti gli zuccheri presenti e formati gran parte dei composti secondari indispensabili per l'aroma della birra. Terminata questa prima fase, la maggior parte del lievito viene separato dalla birra, la quale successivamente passa nei serbatoi di maturazione per la fermentazione secondaria, nella quale vengono fermentati gli zuccheri residui, eliminati i

composti indesiderati e migliorato il gusto della birra grazie all'attività dei lieviti ancora presenti (Willaert, 2007). Questa seconda fase è di maggior durata (circa 3-5 settimane) e la temperatura viene gradualmente ridotta per raggiungere valori di 0–2 ° C per la bassa fermentazione e di 7-10 ° C per l'alta fermentazione.

Affinché la birra verde (o immatura) diventi matura sono necessari tre passaggi: la saturazione di anidride carbonica, prodotta dai lieviti non rimossi dopo la fermentazione primaria; chiarificazione, dovuta alla precipitazione di lieviti residui e flocculi tanno-proteici; affinamento di gusto e aroma, grazie all'attenuazione dell'amaro del luppolo e all'armonizzazione dei composti aromatici presenti (Cabras e Martelli, 2004; Manzoni, 2006).

Affinché il processo di fermentazione venga svolto in maniera ottimale, la temperatura e l'umidità devono rimanere costanti, il pH invece deve essere di circa 5,2-5,3 nel mosto e scendere fino ad un valore di circa 4,1–4,2 a fine fermentazione. Questi valori sono fondamentali per l'inibizione della crescita batterica e preservare il prodotto finale (Harrison, 2009).

1.2.4 Downstream

La birra matura può essere sottoposta ad ulteriori processi: possono essere aggiunte proteasi, per evitare eventuale torbidità causata da proteine residue; può essere aggiunto diossido di carbonio al prodotto affinché sia in concentrazioni pari al 0.45-0.52%; può essere aggiunto del lievito fresco per svolgere una fermentazione secondaria. Inoltre, spesso le birre mature vengono sottoposte a filtrazione (per eliminare le sostanze solide in sospensione) e a pastorizzazione (per stabilizzare il prodotto). In passato la pastorizzazione veniva svolta utilizzando acqua calda a pioggia sulle bottiglie ad una temperatura di 60°C per 20 minuti. Tuttavia, incidendo negativamente sulle proprietà organolettiche del prodotto finale, questo

procedimento è stato sostituito dalla pastorizzazione *flash* o a freddo. La prima consiste nel riscaldare la birra a 71-75°C per 15-30 secondi utilizzando uno scambiatore di calore, la seconda mediante l'utilizzo di agenti chimici o membrane filtranti, seguita da confezionamento asettico.

La *shelf-life* di birre pastorizzate si aggira intorno ai 3 mesi, al contrario le birre non pastorizzate devono essere refrigerate per preservarne la qualità e presentano una *shelf-life* di circa 1 mese (Harrison MA, 2009).

1.3 BIRRA ARTIGIANALE

Il 6 luglio 2016, dopo anni di storia di birra artigianale, venne definitivamente 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».

Negli ultimi anni la birra artigianale ha riscontrato un enorme successo tanto che in Italia il numero di microbirrifici è aumentato notevolmente, da 175 unità nel 2007 a 1842 attuali (www.microbirrifici.org), rappresentando il 4-5% della produzione di birra italiana (Canonico et al., 2014). Questo crescente interesse da parte del consumatore è dovuto al fatto

che la birra artigianale, non filtrata e non pastorizzata, è caratterizzata da qualità, sapore unici e caratteristiche organolettiche nettamente diverse da un prodotto industriale

Le birre industriali, infatti, pur garantendo una stabilità chimico-fisica e biologica dovute alla filtrazione e pastorizzazione, sono penalizzate sul piano del gusto e dell'aroma, caratterizzate quindi da una maggiore standardizzazione sensoriale Al contrario la birra artigianale, caratterizzata dalla rifermentazione in bottiglia (grazie all'aggiunta di zucchero e lievito starter) è un prodotto che evolve ed è proprio il ceppo di lievito utilizzato ad influenzare notevolmente il profilo aromatico del prodotto finale, conferendo alla birra il suo bioflavour distintivo (Canonico et al., 2014).

1.4 LIEVITI NON-SACCHAROMYCES NELLA PRODUZIONE DELLA BIRRA ARTIGIANALE

Negli ultimi anni sta crescendo notevolmente l'interesse verso l'utilizzo di specie di lievito non-*Saccharomyces* sia per la produzione di prodotti specifici come birre a bassa gradazione alcolica e/o no alcol, birre senza glutine, birre funzionali e birre a basso contenuto calorico (De Francesco et al., 2015; Michel et al., 2016; Marco et al. al., 2017), sia per ottenere stili di birra caratteristici caratterizzati da particolari note aromatiche.

Le principali specie di lievito non-*Saccharomyces* maggiormente studiate per la produzione di birra sono: *Torulaspora delbrueckii, Lachancea thermotolerans, Lachancea fermentati, Schizosaccharomyces japonicus, Hanseniaspora vineae, Candida shehatae, Candida tropicalis, Saccharomyces ludwigii, Kazachstania unispora, Zygosaccharomyces rouxii,*

Pichia kluyveri, Cyberlindnera saturnus, Hanseniaspora uvarum, Wickerhamomyces subpelliculosus, Wickerhamomyces anomalus.

Nel presente lavoro di tesi sono state prese in considerazione due specie di lievito non-*Saccharomyces, L. thermotolerans* e *K. unispora,* per le loro caratteristiche fermentative ed aromatiche.

1.4.1 Lachancea thermotolerans

L. thermotolerans (in passato conosciuta come *Kluyveromyces thermotolerans*) è una specie di lievito del genere *Lachancea*, che include ceppi con capacità variabile di fermentare il maltosio (Ciani et al, 2019). Nel corso degli ultimi anni, differenti studi hanno dimostrato come questa specie possa essere utilizzata nella produzione del vino, grazie alla capacità di diminuire il pH producendo acido lattico (Gobbi et al, 2013). In realtà questa capacità si è dimostrata essere utile anche nell'industria brassicola, conferendo acidità alla birra ed esaltando gli altri sapori. Inoltre, l'impiego di *L. thermotolerans* permetterebbe anche di semplificare la produzione di birra acida (*sour beer*), che generalmente avviene mediante l'utilizzo di batteri lattici (Tonsmeire et al, 2014). Questi ultimi, infatti, implicano sia un utilizzo ridotto del luppolo (poiché sensibili agli iso-α-acidi) che, soprattutto, una complessa procedura di sanificazione per evitare eventuali contaminazioni crociate (Domizio et al, 2016). Al contrario, l'impiego di questa specie di lievito consentirebbe di evitare tali complicazioni ed avere anche un buon risultato nella resa finale del prodotto.

1.4.2 Kazachstania unispora

K. unispora è una specie di lievito appartenente al genere *Kazachstania*, noto anche come *Saccharomyces unisporus* (Lu et al, 2004). Dal punto di vista metabolico, non fermenta il

lattosio, produce ridotte quantità di etanolo dalla fermentazione degli zuccheri e presenta una crescita ottimale in presenza di glucosio, saccarosio, maltosio, cicloesimide e acido sorbico (Rodriques et al, 2001). Questa specie risulta essere dominante nei prodotti lattiero-caseari (quali kumis, kefir, formaggi), in alcuni frutti come arance e uva e in diversi alimenti fermentati (come la pasta madre acida). D'altra parte, questa specie ha la capacità di produrre differenti composti volatili, tra cui il levodione, con attività antiossidante e fondamentale per la sintesi dei carotenoidi (Indrani et al, 2013), e tossine contro i patogeni degli alimenti, tra cui *Listeria monocytogenes* (Goerges et al, 2006). Inoltre, si è dimostrato essere anche un potenziale lievito probiotico poiché capace di sopravvivere a condizioni simili a quelle presenti nel tratto gastrointestinale, ed avere attività antimicrobica contro differenti patogeni per l'uomo, quali *Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Salmonella enterica* (Agarbati et al,2020).

1.5 CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA ARTIGIANALE

La rapida affermazione nel mercato globale delle birre artigianali è dovuta in particolar modo alla peculiarità di questi prodotti rispetto alla controparte industriale, specialmente dal punto di vista organolettico. L'aroma della birra, infatti, è dovuta a componenti volatili e non volatili che in parte derivano dalle materie prime (malto, luppolo, metabolismo dei lieviti durante il processo fermentativo e l'invecchiamento della birra) ed in parte dalle tecnologie utilizzate. I composti volatili che influenzano il profilo organolettico della birra sono: alcoli superiori, esteri, acidi organici, idrocarburi, aldeidi, chetoni e sostanze terpeniche (Tabella 1).

Gruppi chimici	**Composti volatili**	**Concentrazione (mg/L)**	**Aroma o sapore**
Alcoli superiori	n-propanolo	600mg/L	Alcolico/dolce
	Isobutanolo	100 mg/L	Alcolico solvente
	Alcol amilico	50-70mg/L	Alcolico solvente
	Alcol isoamilico	50-65mg/L	Banana
	2-feniletanolo	40 mg/L	Fruttato/Dolce
Esteri	Etil acetato	33mg/L	Solvente
	Isoamil acetato	1,6mg/L	Banana
	Isobutil acetato	1,6mg/L	Dolce/Fruttato
	Feniletil acetato	3,8mg/L	Rosa/Mele/Miele
	Etil esanoato	0,23mg/L	Mele/Anice
	Etil ottanoato	0,9mg/L	Mele
Acidi organici	Acido acetico	175mg/L	Aceto
	Acido laurico	6,1mg/L	Detergente
	Acido ossalico	500mg/L	Salato/Ossidato
	Acido citrico	400mg/L	Acido/Aspro
	Acido lattico	400mg/L	Acido/Aspro
	Acido piruvico	300mg/L	Foraggio
Composti fenolici	4-vinil guaiacolo	0,3mg/L	Amaro/Garofano
	4-vinil fenolo	0,2mg/L	Affumicato

	4- etil fenolo 4- etil guaiacolo	0,9mg/L 0,13mgL	Astringente Dolce
Composti solforici	Anidride solforosa Acido solfidrico	2,5 mg/L 0,005mg/L	Odore solforoso Uovo marcio
Aldeidi e chetoni	Acetaldeide Diacetile	10mg/L 0,1/0,15mg/L	Mela verde/Burro Burro
Alcoli monoterpeni	Linalolo α-terpineolo β-citronellolo geraniolo nerolo	5µg/L 2mg/L 8µg/L 6 µg/L 0,5 mg/L	Lavanda Lillà Limone/Lime Rosa Rosa/agrumi

Tabella 1- Principali composti volatili e loro valori soglia *(Michel et al., 2016)*

1.5.1 Alcoli superiori

Gli alcoli superiori influenzano notevolmente il gusto della birra. Tra questi i più rappresentativi sono: n-propanolo, l'isobutanolo, l'alcol isoamilico, l'alcol amilico e 2-feniletanolo. La loro produzione può avvenire mediante due vie metaboliche: dal catabolismo degli amminoacidi del mosto e dagli amminoacidi sintetizzati dai lieviti per via anabolica (Kobayashi et al., 2006). Il valore più alto è rappresentato dall'n-propanolo, pari a 600 mg/L, che conferisce al prodotto un sapore alcolico dolce. L'isobutanolo e l'alcol amilico, derivanti rispettivamente dalla valina e dall'isoleucina, sono presenti in quantità pari a 100mg/L e 50-70mg/L e sono caratterizzati da aroma simile a solventi. Entrambi se in eccesso influiscono negativamente sulla qualità della birra rendendola pesante (Kobayashi

et al., 2006). L'alcol isoamilico, dal catabolismo della leucina e in quantità pari a 50-65mg/L, conferisce un aroma fruttato di banana e per finire il 2-fenil etanolo, 40mg/L e derivante dal catabolismo della fenilalanina, dona una nota dolce e fruttata alla birra (Michel et al., 2016). Ci sono vari fattori che influenzano la concentrazione di alcoli superiori: la temperatura, l'aerazione, il grado Plato del mosto, la quantità di lieviti inoculati e la composizione amminoacidica del mosto.

1.5.2 Esteri

Gli esteri, pur essendo presenti in basse concentrazioni rispetto gli altri componenti aromatici della birra, rappresentano i metaboliti più importanti prodotti dal lievito. Essi, infatti, influenzano notevolmente l'aroma del prodotto finale conferendo un carattere fruttato e piacevole. Tuttavia, se in eccesso, questo gusto eccessivamente fruttato viene considerato indefinibile dalla maggior parte dei consumatori (Gee D et al, 1994). Gli esteri volatili possono essere distinti in due gruppi: gli esteri dell'acetato e gli esteri etilici di acidi grassi a catena media (MCFA). Il primo gruppo è composto da esteri formati da acido acetico (acetato) con etanolo o un alcol superiore. Tra questi di notevole importanza ci sono: l'etil acetato (con una soglia di 33 mg / L e aroma di solvente), l'isoamil acetato (aroma di banana con una soglia di 1,6 mg / L), l'isobutil acetato (aroma fruttato e dolce con una soglia di 1,6 mg / L) e il feniletil acetato (aroma di rosa, mela e miele con una soglia di 3,8 mg / L). Il secondo gruppo invece è composto da esteri formati da un acido grasso a catena media e l'etanolo. Tra questi i due esteri più rappresentativi sono: l'etil esanoato (con una soglia di 0,23 mg / L e aroma di mela e anice) e l'etile ottanoato (con una soglia di 0,9 mg / L e aroma di mela) (Michel et al., 2016). Tra gli esteri quindi, circa un terzo è rappresentato dall'etil acetato che, pur avendo una soglia di 33mg/L, per le birre lager è raccomandata una quantità

non superiore a 5mg/l (Šmogrovičovà D et al, 1999). Superati i valori soglia, gli esteri influenzano negativamente l'aroma della birra, ragione per cui è fondamentale per i birrai mantenere le condizioni ottimali al fine di ottenere una birra equilibrata secondo il profilo estere (Pires et al, 2014). I ricercatori hanno suggerito differenti ipotesi in merito al ruolo della produzione di esteri da parte del lievito. Questi potrebbero essere infatti semplicemente prodotti del metabolismo durante la fermentazione, senza apportare alcun vantaggio (Peddie H.A.B, 1990, Koch C et al, 2015), o al contrario prodotti per rimuovere acidi grassi tossici (Nordström K et al, 1964).

1.5.3 Acidi organici

Gli acidi organici rappresentano un ampio gruppo di composti che, insieme agli inorganici, contribuiscono al sapore e all'acidità (pH) del prodotto finale (Michel et al., 2016). Possono essere distinti in due gruppi: acidi non volatili e volatili. Tra questi ultimi, di notevole importanza per la birra sono: acido acetico (con un valore soglia di 175mg/L), acido propionico, acido butirrico ed isobutirrico (in concentrazione pari a 6mg/L, oltre il quale conferisce un sapore rancido), acido valerico e iso-valerico (i quali, in eccesso, causano un sapore di vecchio e di formaggio), acido esanoico (acido caproico), acido ottanoico (o acido caprilico, con una concentrazione che non deve sperare il 15mg/L), acido decanoico (o acido caprico, non superiore a 10mg/L), acido dodecanoico (acido laurico, con un valore soglia di 6,1mg/L) (Smogrovicova et al., 1999; Michel et al., 2016).

I principali acidi non volatili prodotti dai lieviti e presenti nella birra sono invece: l'acido ossalico (500 mg/L, che conferisce un gusto salato), l'acido malico (700 mg/L, con aroma fruttato e di mela), l'acido piruvico (300 mg/L, salato, foraggio), l'acido citrico, fumarico,

lattico e succinico (con valore soglia pari a 400 mg/L per i primi tre e di 220mg/L per l'ultimo e conferiscono un aroma acido) (Michel et al., 2016).

1.5.4 Composti fenolici

Una gran parte dei composti fenolici prodotti dai lieviti vengono definiti "phenolic off-flavours", quindi generalmente non graditi nel prodotto finito. Al contrario, in specifiche tipologie di birre come la Lambic Belga, questi composti sono in realtà desiderati. La loro produzione dipende da lieviti utilizzati e la presenza di precursori nel mosto (come acido ferulico, cumarinico e cinnamico). Birre fermentate con *S. cerevisiae,* ad esempio, contengono 4-vinilguaiacolo (con valore soglia di 0,3mg/L e un aroma amaro e di garofano) e 4-vinilfenolo (0,2mg/L che conferisce alla birra una nota affumicata); specie come *Brettanomyces sp.* invece hanno la capacità di produrre 4-etilguaiacolo (0,13mg/L e aroma dolce) e 4-etilfenolo (0,9mg/L che conferisce astringenza).

1.5.5 Composti solforici

Durante la fermentazione della birra, il lievito ha la capacità di produrre dei composti solforici tra cui l'anidride solforosa e l'acido solfidrico. La prima riveste una notevole importanza per la stabilità che conferisce alla birra, agendo da antiossidante, aumentando il tempo di conservazione. Il valore soglia è pari a 2,5mg/L. L' acido solfidrico invece è un composto indesiderato con un valore tollerato molto basso (0,005mg/L) poiché conferisce un odore di uova marce (Vanderhaegen et al., 2003).

1.5.6 Composti carbonilici

I principali composti carbonilici indesiderati presenti nella birra sono l'acetaldeide e il diacetile.

L'acetaldeide viene prodotta durante il metabolismo degli zuccheri nella fase di crescita del lievito per poi venire convertita gran parte in etanolo nella fermentazione successiva. Il valore soglia è generalmente pari a 10mg/L e dona un aroma di mela verde alla birra; al contrario, a concentrazione di 20-25mg/L, conferisce un sapore erbaceo (Lodolo et al, 2008).

Il diacetile è un prodotto dell'anabolismo della valina ed ha un valore soglia pari a 0,1-0,15mg/L, oltre il quale conferisce alla birra un sapore di burro (Michel et al., 2016).

1.5.7 Monoterpeni

I monoterpeni sono presenti nella birra in concentrazioni notevoli e conferiscono un deciso aroma floreale. Le sostanze più rappresentative (con relativo valore soglia e aroma) sono: linalolo (5 μg / L, lavanda), α-terpineolo (2 mg / L, lilla), β-citronellolo (8 μg / L, limone), geraniolo (6 μg / L, rosa) e nerolo (0,5 mg / L, rosa, agrumi) (Michel et al., 2016).

1.6 *ALIMENTI FUNZIONALI*

Negli ultimi decenni le richieste dei consumatori nel settore alimentare sono cambiate notevolmente, dirigendosi in particolar modo verso alimenti e bevande con effetti benefici per la salute. Il cibo, infatti, non è più semplicemente considerato come un modo per soddisfare la fame e fornire i nutrienti necessari all'essere umano ma anche un modo per prevenire malattie e migliorare il benessere fisico e mentale (Nothlings, Murphy, Wilkens,

Henderson, & Kolonel, 2007; Takachi et al., 2008). In quest'ottica gli alimenti funzionali, termine utilizzato per la prima volta in Giappone nel 1984 (Hardy, 2000), rivestono un ruolo predominante, permettendone una rapida diffusione ed affermazione nel mercato globale. Nonostante ciò, non esistono ancora né una legislazione specifica né una definizione univoca per questa categoria di prodotti. Secondo la Commissione Europea del FUFOSE (The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe) un alimento può essere definito funzionale "solo se, insieme all'impatto nutrizionale di base, ha effetti benefici su una o più funzioni dell'organismo umano migliorando così le condizioni generali e fisiche e/o diminuendo il rischio di evoluzione delle malattie". Questo effetto benefico è dovuto alla presenza di componenti che possono essere o naturalmente presenti nell'alimento o aggiunti successivamente. In quest'ultimo caso si parla di alimenti trasformati, che possono essere distinti a loro volta in: alimenti fortificati con nutrienti aggiuntivi (definiti prodotti fortificati) come ad esempio succhi di frutta fortificati con vitamina C; alimenti con nutrienti o componenti aggiuntivi non presenti normalmente nello specifico alimento (definiti prodotti arricchiti) come con probiotici o prebiotici; alimenti a cui è stato sostituito, ridotto e eliminato un componente deleterio (definiti prodotti alterati); alimenti in cui uno dei componenti è stato potenziato in modo naturale (definiti prodotti potenziati) come le uova con un aumentato contenuto di omega-3 (Spence, 2006; Bigliardi et al, 2013). Tra le varie categorie di alimenti funzionali, sono i probiotici a dominare recentemente il mercato in Giappone e in Europa, con più di 370 prodotti lanciati nel 2005 (Ouwehand, 2007).

1.6.1 Probiotici

I probiotici, secondo la definizione ufficiale di FAO e OMS, sono microrganismi che, una volta ingeriti in adeguate quantità, esercitano funzioni benefiche per l'organismo. Di conseguenza, un alimento con probiotici ha la capacità di esercitare effetti positivi sulla salute del consumatore come regolare l'equilibrio microbico intestinale, modulare il sistema immunitario e ridurre l'infiammazione delle malattie intestinali (Kaur, I.P. et al, 2002, van Baarlen, P. et al, 2013). Il primo lievito ad essere stato studiato per le proprie proprietà probiotiche fu il *S. cerevisiae* var. *boulardii* (van der Aa Kühle, A. et al, 2005, Rima, H. et al, 2012), isolato da Henri Boulard nel 1923 dal frutto della litchi, che vantava tra le proprie qualità, la sopravvivenza alla temperatura corporea di 37°C, la resistenza agli acidi biliari e dello stomaco e l'inibizione di numerosi patogeni microbici (Czerucka et al., 2007; Kelesidis e Pothoulakis, 2012; McFarland, 2010). Inoltre, il lievito rappresenta un'ottima alternativa ai batteri probiotici grazie all'immunità all'effetto antibiotico, così da poter evitare malattie dell'intestino associate all'uso degli antibiotici (Rima, H. et al, 2012) e limitare lo sviluppo dell'antibiotico resistenza. Al fine di individuare nuovi lieviti probiotici da collocare sul mercato, i ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione sullo studio di microrganismi appartenenti a generi differenti tra cui: *Torulaspora, Debaryomyces, Kluyveromyces, Candida, Kazachstania, Metschnikowia, Pichia, Hanseniaspora, Saccharomyces, Rhodotorula, Brettanomyces,* e *Lachancea* (Agarbati et al, 2020).

Al giorno d'oggi, questa maggior attenzione del consumatore verso alimenti e bevande con effetti benefici per la salute, ha spinto anche l'industria brassicola alla produzione di birre funzionali (utilizzando ad esempio lieviti non convenzionali per produrre sostanze benefiche) e probiotiche (incorporando microrganismi probiotici).

1.6.2 Alimenti fortificati con proteine

Gli alimenti fortificati sono tutti quei prodotti a cui sono stati aggiunti sostanze e nutrienti al fine di ottenere un miglior profilo nutrizionale e tra questi vi sono gli alimenti arricchiti in proteine. Molto spesso per la fortificazione vengono utilizzati i legumi, di particolare interesse per la dieta in quanto ricchi di fibre (Yadav, D.N. et al 2014) e proteine (Tharanathan, R.N. et al 2003). Tuttavia, a tale scopo, possono essere anche utilizzati cereali e piante come il miglio e l'amaranto, la cui coltivazione e richiesta è in rapido aumento.

Figura 6 - Miglio

Il miglio (*Panicum miliaceum*) (Figura 6) è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Graminacee e rientra nel gruppo dei cereali minori. La sua importanza nell'alimentazione umana è dovuta all'elevato valore nutritivo poiché ricco di calcio, ferro, potassio, magnesio, fosforo, zinco, fibra alimentare, polifenoli e proteine (Hulse et al., 1980; Devi et al., 2014). È ricco, inoltre, di micronutrienti tra cui niacina, vitamine del complesso B, vitamina B6 e acido folico (Hulse et al., 1980). Dal punto di vista proteico, il miglio contiene generalmente quantità significative di aminoacidi essenziali, in particolare quelli contenenti zolfo (metionina e cisteina) e la concentrazione proteica su peso totale è in media dell'11% (Kalinova e Moudry, 2006). Per queste sue proprietà, esso è considerato un alimento funzionale (Pathak, 2013) e possiede numerose funzioni mediche tra cui: prevenire

malattie cardiovascolari e cancro (Coulibaly et al., 2011) poiché ricco di fibre, antiossidanti e carboidrati complessi; ridurre il rischio di diabete mellito di tipo 2 grazie all'alto contenuto di magnesio; mantenere la struttura cellulare grazie all'elevata concentrazione di fosforo (Kumari e Sumathi, 2002); supportare il sistema nervoso per l'elevata quantità di lecitina.

Figura 7 - Amaranto

L'amaranto (Figura 7) è una pianta originaria del Messico, composta da circa 70 specie distribuite in luoghi differenti per clima e posizione geografica. Le uniche tre specie coltivate per il consumo umano sono *Amaranthus caudatus, A. cruentus e A. hypochondriacus*, ma tra le specie selvatiche di notevole importanza sono *A. powellii* e *A. hybridus*, note per la loro resistenza alle condizioni avverse. Negli ultimi decenni, grazie a diversi studi in merito alle caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche dell'amaranto, vi è stato un rapido aumento della coltivazione di questa pianta (Huerta-Ocampo et al, 2011). Nello specifico, l'amaranto deve la sua importanza nell'alimentazione umana alla sua elevata concentrazione di proteine (alti livelli di lisina e metionina), con valori prossimi al fabbisogno nutritivo (Bressani et al,1990). Inoltre, può essere utilizzato anche da chi affetto da celiachia, grazie al contenuto quasi nullo di prolamina (Janssen et al, 2017).

CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI

Nel corso degli anni, l'interesse dei consumatori per alimenti e bevande salutari e funzionali è aumentato notevolmente. Ciò ha spinto i produttori dei vari settori della produzione alimentare, ad immettere nel mercato prodotti di qualità ma anche innovativi e con proprietà nutrizionali tali da apportare benefici per la salute del consumatore. Questo nuovo scenario economico che interessa l'intero mercato alimentare, ha ovviamente anche influenzato il settore delle bevande fermentate e con esso quello brassicolo, tanto da portare i microbirrifici e le loro produzioni di birra artigianale verso prodotti che associno non solo caratteristiche organolettiche peculiari, ma anche effetti benefici sulla salute del consumatore. D'altra parte, però, la ricerca e l'innovazione verso tali prodotti è ancora in fase embrionale e attualmente solo pochi prodotti con tali caratteristiche sono sul mercato. Tra questi vi sono ad esempio le birre senza glutine, a basso contenuto calorico, a basso contenuto alcolico e le birre funzionali.

In tale contesto, lo scopo di questo studio è stato quello di produrre su scala di laboratorio birre artigianali, fortificate con farine di due piante erbacee ad alto contenuto proteico come miglio ed amaranto, e utilizzando lieviti non convenzionali con potenziali proprietà funzionale e/o probiotiche al fine di immettere nel mercato un prodotto innovativo e funzionale.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 CEPPI DI LIEVITO UTILIZZATI

I ceppi di lievito utilizzati in questo studio provengono dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) e appartengono alla specie *S. cerevisiae, L. thermotolerans* e *K. unispora.,* tutti precedentemente valutati per le proprietà probiotiche (Agarbati et al., 2020). Come ceppo di controllo nella fase di screening è stato utilizzato lo starter *S. cerevisiae* US05 (Fermentis, Lesaffre, Francia). I ceppi sono stati rinfrescati su terreno YPD agar (10 g/l di estratto di lievito, 20 g/l di peptone, 20g/l di glucosio e 18g/l agar) e conservati alla temperatura di 4°C. Per la conservazione a lungo termine, invece, i ceppi sono stati crioconservati alla temperatura di -80°C in terreno contenente glicerolo (80%)

3.2 MOSTO PILS

Il mosto PILS usato in questa prova è stato preparato presso Birra dell'Eremo (Assisi, Italia) in un batch da 1500L, utilizzando 100% malto Pils e luppolo Cascade. Il processo consiste in differenti fasi: 53°C per 10 minuti, 67°C per 70 minuti, 76°C per 10 minuti e bollitura per 60 minuti. Il mosto ottenuto (caratterizzato da pH 5.5, densità 12.3°P e 20 IBU) è stato utilizzato sia per lo screening iniziale che per le prove successive.

3.3 IDROLIZZATI DI LEGUMI E CEREALI

Per lo screening iniziale sono stati preparati gli idrolizzati di cinque differenti substrati: cicerchia (Figura 8), lenticchia nera (Figura 9), fagiolo (Figura 10), miglio e amaranto (Figura 11). Questi ultimi due sono stati poi preparati nuovamente per le prove successive di questo studio.

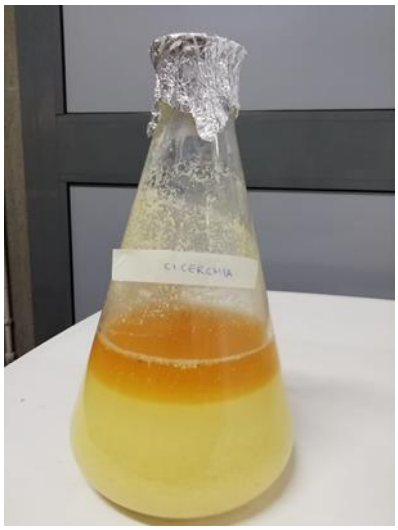

Figura 9 – Idrolizzato di cicerchia

Figura 10- Idrolizzato di lenticchia

Figura 10- Idrolizzato di fagiolo

Figura 11 – Idrolizzati di amaranto e miglio

Per l'ammostamento delle varie farine, è stato utilizzato lo stesso procedimento e gli enzimi impiegati sono i seguenti:

-Hitempase (Kerry Group, Tralee, Irlanda), un'α-amilasi stabile al calore (*Bacillus lichenformis*) che permette di produrre destrine idrolizzando i legami α-1,4-glicosidici nell'amilosio e nell'amilopectina.

- Ondea Pro (Novozymes, Danimarca), una miscela multi-enzimatica formulata per la degradazione proteica, la riduzione della torbidità ed assicurare una corretta viscosità.

- Bioferm (Kerry Group, Tralee, Irlanda), un'α-amilasi che produce destrine e maltosio.

La miscela (composta da 700ml di acqua per 300gr di farina) è stata riscaldata fino alla temperatura di 45°C, poi sono stati aggiunti 1,3g/L di cloruro di calcio, 0,5g/L di Hitempase e 0,5g/L di OndeaPro e messa ad incubare a 75°C per un'ora. Successivamente è stato aggiunto l'enzima Bioferm (0,5g/L) alla miscela, poi nuovamente incubata ad una temperatura più bassa (62°C) per 3 ore. Per finire, la sospensione è stata autoclavata e centrifugata, ottenendo così il mosto.

3.4 SCREENING DI SUBSTRATI E LIEVITI SELEZIONATI PER LE FERMENTAZIONI

Lo screening iniziale è stato effettuato utilizzando cinque differenti substrati: piante erbacee (amaranto, miglio) e legumi (lenticchia, fagiolo e cicerchia) e quattro differenti ceppi di lievito: due appartenenti alla specie *S. cerevisiae* (US05 come controllo brassicolo e 2PV isolato dal vino Verdicchio) e gli altri due alle specie *L. thermotolerans* (ceppo B13 isolato dal muschio di quercia) e *K. unispora* (ceppo M3-B3 isolato da lievito madre fatto in casa). Sono stati valutati i seguenti parametri: cinetica fermentativa, consumo degli zuccheri, proteine, etanolo ed analisi sensoriale.

3.5 ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI

Le micro-fermentazioni sono state condotte alla temperatura di 18-20°C utilizzando beute da 500ml provviste di valvole di Müller, quest'ultime contenti acido solforico così da permettere la fuoriuscita di CO2 evitando la contaminazione del sistema. Le pre-colture sono state allestite con estratto di malto al 10% ed incubate per 48 ore a 20°C. Dopo l'incubazione, le cellule sono state raccolte per centrifugazione (4000 rpm per 5 minuti), risospese in acqua sterile e si è proceduto all'inoculo del mosto con 10^6 cell/ml. Le beute inoculate sono state fatte fermentare alla temperatura di 18-20°C.

A differenza dello screening iniziale in cui sono state allestite unicamente colture pure per ogni ceppo di lievito, nelle prove successive sono state preparate anche colture miste *S. cerevisiae*/ non-*Saccharomyces* a differenti rapporti: 1:20 per *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans*; 1:50 per *S. cerevisiae e K. unispora* (Figura 12).

Figura 12 – Microfermentazioni

Per monitorare la cinetica fermentativa, le beute sono state pesate giornalmente per misurare la diminuzione di peso dovuta alla perdita di CO_2 fino al termine della fermentazione (peso costante per 3 giorni consecutivi).

RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA

Al termine del periodo di sosta a 4°C le birre sono state sottoposte a rifermentazione in bottiglia ad opera dei lieviti residui ed ancora vitali. Ciò è stato possibile semplicemente aggiungendo alla birra 5 g/L di saccarosio durante la fase di imbottigliamento della stessa, Le bottiglie, opportunamente sigillate con appositi tappi, sono state mantenute a 18-20°C per circa 7-10 giorni, infine stoccate a 4°C. La birra risultante è stata successivamente analizzata mediante analisi sensoriale.

3.6 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI

Il monitoraggio della fermentazione è stato eseguito per via gravimetrica valutando giorno per giorno la perdita di peso, espressa come grammi di CO_2 svolta, fino al termine della fermentazione. La quantità di CO_2 prodotta è stata utilizzata per valutare l'attività fermentativa.

3.7 DETERMINAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE

A fine fermentazione per tutte le prove è stata valutata la vitalità cellulare mediante semina per spatolamento su terreno YPD (estratto di lievito 1%, peptone 2%, glucosio 2%, agar 1,8%). Le piastre sono state messe quindi ad incubare per 3-4 giorni a 25°C.

3.8 ANALISI CHIMICHE

3.8.1 Determinazione degli zuccheri

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 (Tabella 1).

Pipettare in cuvetta	**Bianco Saccarosio + D-Glucosio**	**Campione Saccarosio + D-Glucosio**	**Bianco D-Glucosio**	**Campione D-Glucosio**
Soluzione 4 (ß-fruttosidasi)	0,20 ml	0,20 ml	-	-
Campione	-	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				

Tabella 1 – Protocollo determinazione zuccheri

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

3.8.2 Determinazione delle proteine

Per determinare la concentrazione proteica presente nei campioni di birra, è stato utilizzato un saggio colorimetrico, il metodo di Lowry, mediante l'utilizzo di due soluzioni: Lowry A e Lowry B.

Lowry A:

- 13,5 ml di acqua distillata
- 100 µl $CuSO_4$ 10%
- 2,5 ml Na_2CO_3 20%
- 250 µl Na_2K tartrato 8%
- 1 ml NaOH 4N
- 2,5 ml SDS 20 %

Lowry B:

- 10 ml di acqua distillata
- 2ml di reattivo di Folin-Ciocâlteu (miscela di sodio tungstato, molibdato e fosfato)

Preparate le miscele, in una cuvetta vengono posti 500µl di campione e 500µl della soluzione Lowry A. Dopo 10 minuti, vengono aggiunti 250µl della soluzione Lowry B e si attendono altri 30 minuti. Quest'ultima permette lo sviluppo di una colorazione blu/porpora, la cui intensità è proporzionale all'aumentare del contenuto proteico. A seguire si effettua una misurazione dell'assorbanza allo spettrofotometro Shimadzu UV-1800 ad una lunghezza d'onda di 750nm.

3.8.3 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 il 3-metil-2-butanolo alla concentrazione di 10 mg/l. 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: Azoto.

3.8.4 Alcoli superiori

Per la determinazione degli alcoli superiori, i campioni devono essere preparati secondo la stessa procedura per l'analisi dell'etanolo, sostituendo però al 3-metil-2-butanolo l'1-pentanolo ad una concentrazione di 162 mg/l come standard interno. Anche in questo caso, 1 μl di campione viene iniettato nello stesso 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.

3.8.5 Componente volatile

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

- degassare 5 ml di campione con un agitatore meccanico
- porre il campione in una vial con tappo di teflon, aggiungere 1,5 g di NaCl e porre in termostato a 50°C per 10 minuti
- aggiungere il 3-ottanolo come standard interno
- Inserire la siringa attraverso il tappo e spingere la fibra, nello specifico la fibra a tripla fase *divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS)* (Figura 13)
- Riporre l'intero sistema in termostato per 30 minuti a 50°C

Figura 13 – Fibra a tripla fase divinilbenzene (DVB)/carbone (CAR)/polidimetilsilossano (PDMS)

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 isotermia di 220 °C per 20 minuti;
- gas vettore: Azoto.

3.9 ANALISI SENSORIALE

L’analisi sensoriale è stata fondamentale al termine dello screening iniziale al fine di selezionare substrati e lieviti su cui poter successivamente continuare lo studio. Questa analisi prevede differenti fasi: l’esame visivo, l’esame olfattivo e l’esame gustativo. L’esame visivo permette di valutare differenti aspetti della birra, quali la colorazione (in base al malto utilizzato nel processo produttivo), la schiuma (se presente o assente, più o meno densa) e la limpidezza (per la presenza o meno di lieviti). L’esame olfattivo consente di valutare i differenti aromi della birra, che possono essere ad esempio fruttati, floreali, agrumati, con note dolci o affumicate. Inoltre, quest’analisi permette anche di riconoscere eventuali difetti del prodotto come nel caso di aromi solforosi, burrosi o acetici. Per concludere vi è l’esame gustativo al fine di determinare la dolcezza, l’acidità, l’amaro, l’astringenza e la corposità del prodotto finale.

CAPITOLO 4 – RISULTATI

4.1 SCREENING SUBSTRATI FERMENTATIVI

I risultati relativi al profilo analitico delle prove condotte nello screening iniziale sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Relativamente alle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto (Tabella 1), i ceppi hanno dimostrato un differente comportamento fermentativo. Come atteso, *S. cerevisiae* US05 (starter commerciale utilizzato come controllo positivo) ha mostrato una cinetica fermentativa più alta con una produzione finale di CO_2 di 9.35gr, seguito da *S. cerevisiae* 2PV con 8.79gr di CO_2 svolta. Al contrario, *L. thermotolerans* e *K. unispora* hanno mostrato una cinetica nettamente più lenta, producendo meno della metà della CO_2 rispetto ai ceppi precedenti. Per quanto riguarda gli zuccheri residui, tutti i ceppi hanno consumato il glucosio e il saccarosio mentre lo zucchero residuo più alto è stato per ogni tesi il maltosio, residuo maggiore per i due ceppi non- *Saccharomyces* (rispettivamente 14.55 g/L e 15.7 g/L).

Stesso trend per il contenuto di proteine residue, dove i valori più alti sono stati registrati da *L. thermotolerans* (23.01g/L) *e K. unispora* (22.57g/L), a differenza delle fermentazioni con i ceppi *S. cerevisiae* 2PV e *S. cerevisiae* US05 che mostrano valori nel contenuto proteico di circa la metà rispetto a quelle sopracitate.

In termini di etanolo le prove mostrano valori intorno a 3% v/v, quindi a basso contenuto alcolico.

Ceppo	*CO_2 finale svolta*	*Zuccheri residui g/L*			*Proteine residue g/L*	*Etanolo v/v%*
		Glucosio g/L	*Saccarosio g/L*	*Maltosio g/L*		
***S. cerevisiae* 2PV**	8.79 ± 0.13	0.02 ± 0.002	0.06 ± 0.008	10.5 ±1.15	12.41 ± 1.47	3.92 ± 0.00
L. thermotolerans	2.87 ± 0.77	0.49 ± 0.009	0.00 ± 0.00	14.55 ± 1.50	23.01 ± 1.64	1.56 ± 0.00
K. unispora	2.58 ± 0.05	0.25 ± 0.02	0.85 ± 0.16	15.7 ± 0.6	22.57 ± 1.32	2.79 ± 0.00
***S. cerevisiae* US05**	9.35 ± 0.03	0.07 ± 0.009	0.00 ± 0.00	6 ± 0.75	11.98 ± 1.98	4.06 ± 0.001

Tabella 1- Principali caratteri analitici di fermentazioni su mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto

Relativamente alle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio (Tabella 2), i ceppi hanno dimostrato un comportamento fermentativo, simile a quello esibito in presenza di amaranto, con l'unica eccezione di una maggiore quantità di CO_2 svolta per il ceppo *L. thermotolerans* (circa 4 volte superiore alla prova precedente), con una quantità di CO_2 finale di circa 9gr. Anche in questo caso le fermentazioni hanno consumato tutto il glucosio e il saccarosio, mentre il maltosio rimane lo zucchero residuo più alto. Tuttavia, *L. thermotolerans* ha esibito una quantità di maltosio residuo molto bassa pari a 0.66 g/L rispetto alla prova svolta con miglio (14.55 g/L). Anche il contenuto residuo di proteine ha visto il ceppo *L. thermotolerans* mostrare discrepanze con la prova precedente, infatti in presenza di miglio è stato il ceppo che ha lasciato la minore concentrazione di proteine (7.88 g/L) se confrontato con gli altri ceppi. In presenza di idrolizzato di miglio la fermentazione con la concentrazione proteica residua più alta è stata quella condotta con il ceppo *S.*

cerevisiae 2PV (15.69 g/L). Per quanto riguarda l'etanolo prodotto durante le fermentazioni, i valori sono lievemente più alti rispetto alla prova precedente, e ancora una volta la prova condotta con *L. thermotolerans* mostra una quantità di etanolo pari a 6.09 % in presenza di miglio, ossia oltre tre volte superiore a quello prodotto in presenza di amaranto (1.56%).

Ceppo	***CO_2 finale svolta***	***Zuccheri residui g/L***			***Proteine residue g/L***	***Etanolo v/v%***
		Glucosio g/L	***Saccarosio g/L***	***Maltosio g/L***		
S. cerevisiae 2PV	8.94 ± 0.02	0.04 ± 0.009	0.00 ± 0.00	10.02 ± 1.23	15.69 ± 1.67	4.16 ± 0.001
L. thermotolerans	9.53 ± 2.03	0.09 ± 0.008	0.1 ± 0.001	0.66 ± 0.009	7.88 ± 1.58	6.09 ± 0.00
K. unispora	2.14 ± 0.51	0.00 ± 0.00	1.9 ± 0.009	11.7 ± 0.65	10.89 ± 1.13	1.41 ± 0.007
S. cerevisiae US05	8.99 ± 0.3	0.01 ± 0.008	0.02 ± 0.00	11.4 ± 1.61	14.98 ± 1.32	3.44 ± 0.00

Tabella 2- Principali caratteri analitici di fermentazioni su miglio

I risultati relativi al profilo analitico delle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di lenticchia nera (Tabella 3) mostrano come i ceppi abbiano avuto tra loro una simile cinetica fermentativa, ad eccezione del ceppo *K. unispora* caratterizzato da una cinetica nettamente più lenta (CO_2 finale pari a 1.72gr), come nel caso delle prove precedenti condotte sul miglio e su mosto Pils. Relativamente agli zuccheri, anche in questo caso glucosio e saccarosio sono stati completamente consumati a differenza del maltosio, residuo più alto per il ceppo *K. unispora* (14.1 g/L), situazione analoga agli altri substrati. Il contenuto di proteine residue in queste prove condotte sulla lenticchia nera è più alto rispetto alle prove eseguite sul miglio e il mosto Pils. In particolar modo la coltura pura *K. unispora*

mostra un notevole incremento della concentrazione proteica rispetto alla prova condotta sul miglio (di circa 2 volte, da 10.89g/L a 26.41g/L). In termini di etanolo le prove mostrano valori intorno a 3% v/v, quindi a basso contenuto alcolico, ad eccezione del ceppo *K. unispora*, con un valore pari a 0.00%, a fronte di una minor produzione di CO_2.

Ceppo	***CO_2 finale svolta***	***Zuccheri residui g/L***			***Proteine residue g/L***	***Etanolo v/v%***
		Glucosio g/L	***Saccarosio g/L***	***Maltosio g/L***		
S. cerevisiae 2PV	7.66 ± 0,45	0.00 ± 0,00	0.05 ± 0.008	9.1 ± 1.15	27.08 ± 1.65	3.35 ± 0.001
L. thermotolerans	6.97 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.009	13.76 ± 1.62	28.48 ± 1.13	2.75 ± 0.001
K. unispora	1.72 ± 0.35	0.00 ± 0.00	6.7 ± 0.006	14.1 ± 1.53	26.41 ± 1.25	0.00 ± 0.00
S. cerevisiae US05	7.94 ± 0.31	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.001	5.9 ± 0.65	26.93 ± 1.31	4.02 ± 0.00

Tabella 3- Principali caratteri analitici di fermentazioni su lenticchia nera

Come per le prove precedenti, anche in quelle condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di fagiolo (Tabella 4), *K. unispora* ha dimostrato una cinetica fermentativa più lenta rispetto agli altri ceppi producendo circa la metà di CO_2 finale. Inoltre, il maltosio è anche in questo caso lo zucchero residuo più alto, in particolar modo nella prova condotta con *L. thermotolerans* (14.75gr). Diversamente dalle prove sui substrati analizzati precedentemente, in presenza di fagiolo, tutte le prove hanno mostrato un quantitativo di proteine simile di circa 23 g/L, senza evidenti variazioni dovute all'impiego di ceppi diversi di lievito. Anche in queste prove l'etanolo prodotto è mediamente 3% v/v con l'eccezione della tesi condotta col ceppo *K. unispora* che a fronte di una minore produzione di CO_2 ha prodotto meno etanolo. In ogni caso ogni birra mostrava una bassa gradazione alcolica.

Ceppo	*CO_2 finale svolta*	*Zuccheri residui g/L*			*Proteine residue g/L*	*Etanolo v/v%*
		Glucosio g/L	*Saccarosio g/L*	*Maltosio g/L*		
S. cerevisiae 2PV	9.32 ± 0.06	0.04 ± 0.008	0.00 ± 0.00	8.7 ± 1.05	25.59 ± 1.19	3.97 ± 0.00
L. thermotolerans	8.45 ± 1.2	0.02 ± 0.001	0.04 ± 0.002	14.75 ± 1.53	22.45 ± 1.66	4.37 ± 0.02
K. unispora	4.73 ± 1.05	0.00 ± 0.00	1.05 ± 0.065	13.65 ± 0.65	22.14 ± 1.31	2.04 ± 0.00
S. cerevisiae US05	9.99 ± 0.07	0.05 ± 0.002	0.00 ± 0.00	7.12 ± 1.02	24.65 ± 1.28	4.08 ± 0.00

Tabella 4- Principali caratteri analitici di fermentazioni su fagiolo

I risultati relativi alle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di cicerchia (Tabella 5) mostrano una cinetica fermentativa simile alle prove svolte sulla lenticchia nera ma in questo caso la cinetica fermentativa più bassa è relativa alla coltura pura *L. thermotolerans* (dovuto probabilmente al fatto che non si hanno a disposizione i dati relativi alla prova condotta con *K. unispora* perché inquinata). Anche in questo caso lo zucchero residuo più alto è il maltosio e il quantitativo maggiore è stato trovato nelle prove condotte con *L. thermotolerans* (11.99g/L). In queste prove, la quantità di proteine è leggermente più alta rispetto alle precedenti condotte sul fagiolo, in media infatti è pari a 25.5 g/L. L'etanolo prodotto è di circa 3%, ad eccezione della prova con *L.thermotolerans* dove la quantità è decisamente più bassa (1.75%), dovuta ad una più lenta cinetica fermentativa.

Ceppo	*CO_2 finale svolta*	*Zuccheri residui g/L*			*Proteine residue g/L*	*Etanolo v/v%*
		Glucosio g/L	*Saccarosio g/L*	*Maltosio g/L*		
S. cerevisiae 2PV	7.90 ± 0.12	0.02 ± 0.001	0.01 ± 0.009	11.1 ± 1.61	26.05 ± 1.13	3.44 ± 0.001
L. thermotolerans	6.50 ± 0.57	0.03 ± 0.001	0.00 ± 0.00	11.99 ± 1.55	25.57 ± 1.26	1.75 ± 0.00
K. unispora	Prova inquinata					
S. cerevisiae US05	8.01 ± 0.51	0.01 ± 0.008	0.05 ± 0.004	7.5 ± 1.05	26.78 ± 1.27	3.54 ± 0.001

Tabella 5- Principali caratteri analitici di fermentazioni su cicerchia

Le fermentazioni sono state sottoposte ad analisi sensoriale per valutare eventuali difetti o aspetti positivi dei singoli substrati sulla base della quale sono stati poi selezionati per allestire le prove successive. Tutti hanno dimostrato un carattere distintivo ad eccezione delle fermentazioni condotte sulla cicerchia dove tutti i ceppi testati hanno dato origine ad un prodotto con caratteristiche sgradevoli come aroma vegetale dominante e sapore acetico. Valutando l'apporto dello stesso ceppo fatto fermentare sui differenti substrati, si evidenzia la caratteristica comune di *L. thermotolerans* che, grazie alla sua produzione di acido lattico, ha contraddistinto con una lieve nota di acidità, ogni tesi. Questa caratteristica è in linea con i tratti tipici delle birre sour. I risultati dell'analisi sensoriale sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Ceppo	Analisi sensoriale
***S. cerevisiae* 2PV**	Presenza di schiuma, aroma affumicato, gusto morbido
L. thermotolerans	Colore ambrato, aroma fruttato (pera cotta) al naso, al palato gusto acidulo e molto fruttato
K. unispora	Presenza di schiuma, nota affumicata, non buona al palato
***S. cerevisiae* US05**	Nota affumicata al palato e al gusto, molto amaro

Tabella 6 – Risultati dell'analisi sensoriale delle prove condotte su amaranto

Ceppo	Analisi sensoriale
***S. cerevisiae* 2PV**	Aroma citrico, agrumato, leggermente amaro
L. thermotolerans	Nota acidula, citrica, al gusto molto fruttata, nota di malto
K. unispora	Molta schiuma, odore di acetone
***S. cerevisiae* US05**	Odore debole, nota maltosa e di cereale, al gusto molto dolce

Tabella 7 – Risultati dell'analisi sensoriale delle prove condotte su miglio

Ceppo	Analisi sensoriale
***S. cerevisiae* 2PV**	Aromi deboli al naso e al palato
L. thermotolerans	Aroma delicato, leggermente citrico e fruttato (frutta a polpa gialla)
K. unispora	Colore ambrato, sapore molto dolce e di mosto
***S. cerevisiae* US05**	Sapore debole

Tabella 8 – Risultati dell'analisi sensoriale delle prove condotte su lenticchia nera

Ceppo	Analisi sensoriale
***S. cerevisiae* 2PV**	Presenza di schiuma, all'olfatto aroma affumicato che non viene percepito al palato, nota luppolata
L. thermotolerans	Colore ambrato, aroma fruttato (pesca gialla, mela cotogna) sapore marcato e molto acidulo
K. unispora	Colore dorato, aroma di mosto, sapore acidulo e nota di solvente
***S. cerevisiae* US05**	Nota affumicata e dolce, sentore di malto

Tabella 9 – Risultati dell'analisi sensoriale delle prove condotte su fagiolo

Ceppo	Analisi sensoriale
***S. cerevisiae* 2PV**	Presenza di schiuma, colore giallo dorato, aroma vegetale dominante
L. thermotolerans	Aroma fruttato e floreale (mela gialla, mela cotta, fiori bianchi)
K. unispora	Prova inquinata
***S. cerevisiae* US05**	Colore giallo dorato, aroma fruttato (pesca gialla, mela, nespola), nota acerba e sapore acetico

Tabella 10 – Risultati dell'analisi sensoriale delle prove condotte su cicerchia

Al termine dello screening, alla luce dei dati ottenuti dalle diverse analisi, sono stati eliminati come substrato la cicerchia e come ceppo *S. cerevisiae* US05. Al contrario, tutti gli altri ceppi e substrati sono stati selezionati per continuare lo studio, non solo come colture pure (come nello screening) ma anche come colture miste nei seguenti rapporti: *S. cerevisiae/L. thermotolerans* (1:20) e *S. cerevisiae/K. unispora* (1:50). Lo studio quindi, dopo uno screening iniziale unico, è stato suddiviso in due parti in funzione del substrato: piante

erbacee (amaranto e miglio) e leguminose (fagiolo e lenticchia). In questo lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata sull'applicazione dei substrati amaranto e miglio nell'allestimento di fermentazioni per la produzione di birra artigianale fortificata.

4.2 FERMENTAZIONI MISTE: VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA SU AMARANTO E MIGLIO

La cinetica fermentativa è stata valutata osservando la perdita di peso giornaliero dei campioni, quindi attraverso la quantità di anidride carbonica liberata. Nella figura 14 sottostante è riportato l'andamento fermentativo delle prove condotte su mosto Pils. Le fermentazioni pure mostrano una cinetica fermentativa attesa, più alta nella prova condotta con *S. cerevisiae,* seguita da *L. thermotolerans* e *K. unispora*, quest'ultima con un andamento più lento ed una produzione di CO_2 finale pari a 1.91gr. Interessante notare invece come la presenza del ceppo *S. cerevisiae* 2PV, nelle colture miste *S. cerevisiae/ L. thermotolerans* e *S. cerevisiae/ K. unispora*, abbia contribuito ad aumentare la cinetica fermentativa rispetto alle fermentazioni pure condotte con i ceppi non- *Saccharomyces*.

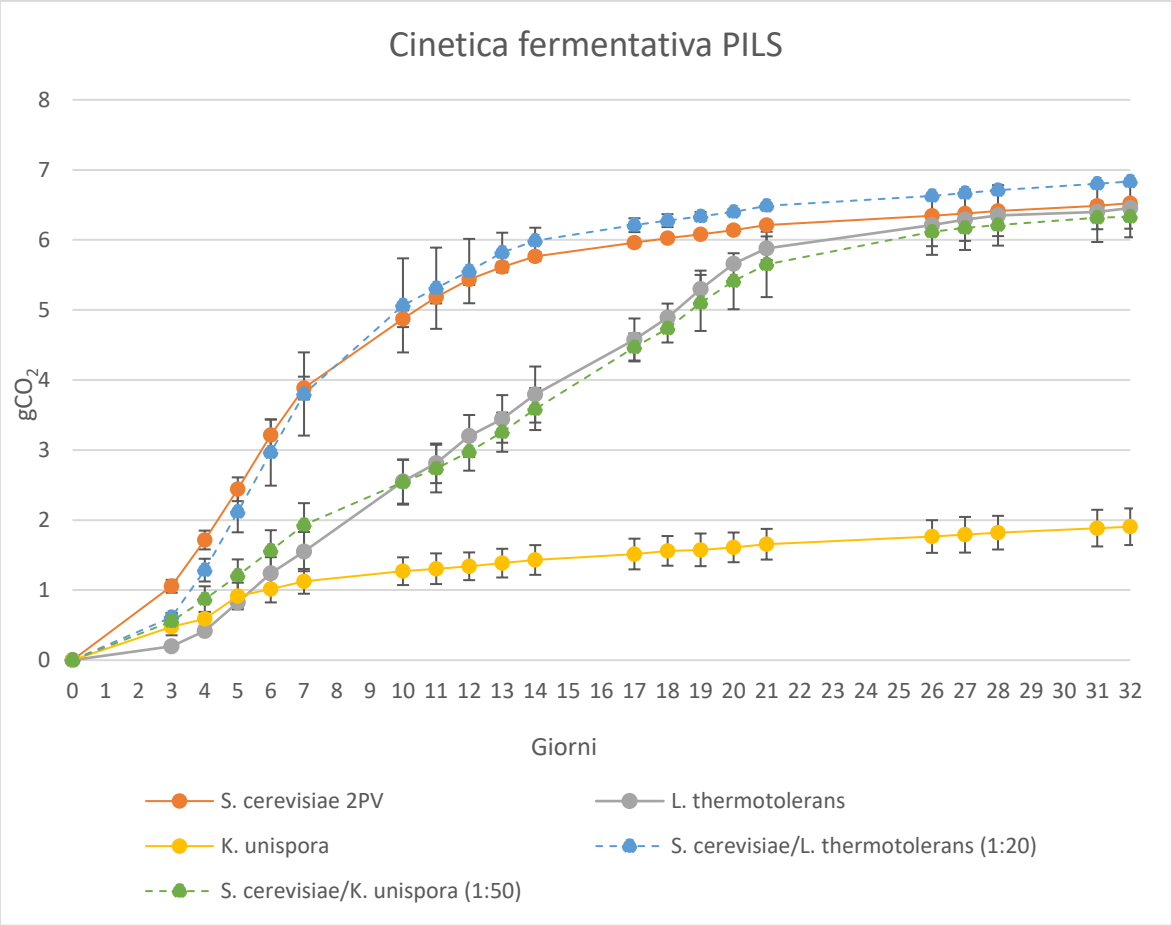

Figura 14 - Cinetica fermentativa su mosto Pils

Nella figura 15 sottostante è riportato l'andamento fermentativo su mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio. Anche in questo caso, le fermentazioni pure mostrano un andamento atteso, dove il ceppo *K. unispora* è caratterizzato dalla cinetica fermentativa più bassa tra tutte le prove di questo substrato, pur producendo un quantitativo di CO_2 finale maggiore rispetto alla prova precedente condotta su mosto Pils. Relativamente alle colture miste, anche in queste prove condotte sul miglio, la presenza del ceppo *S. cerevisiae* 2PV ha innalzato le cinetiche fermentative dei due ceppi non- *Saccharomyces*.

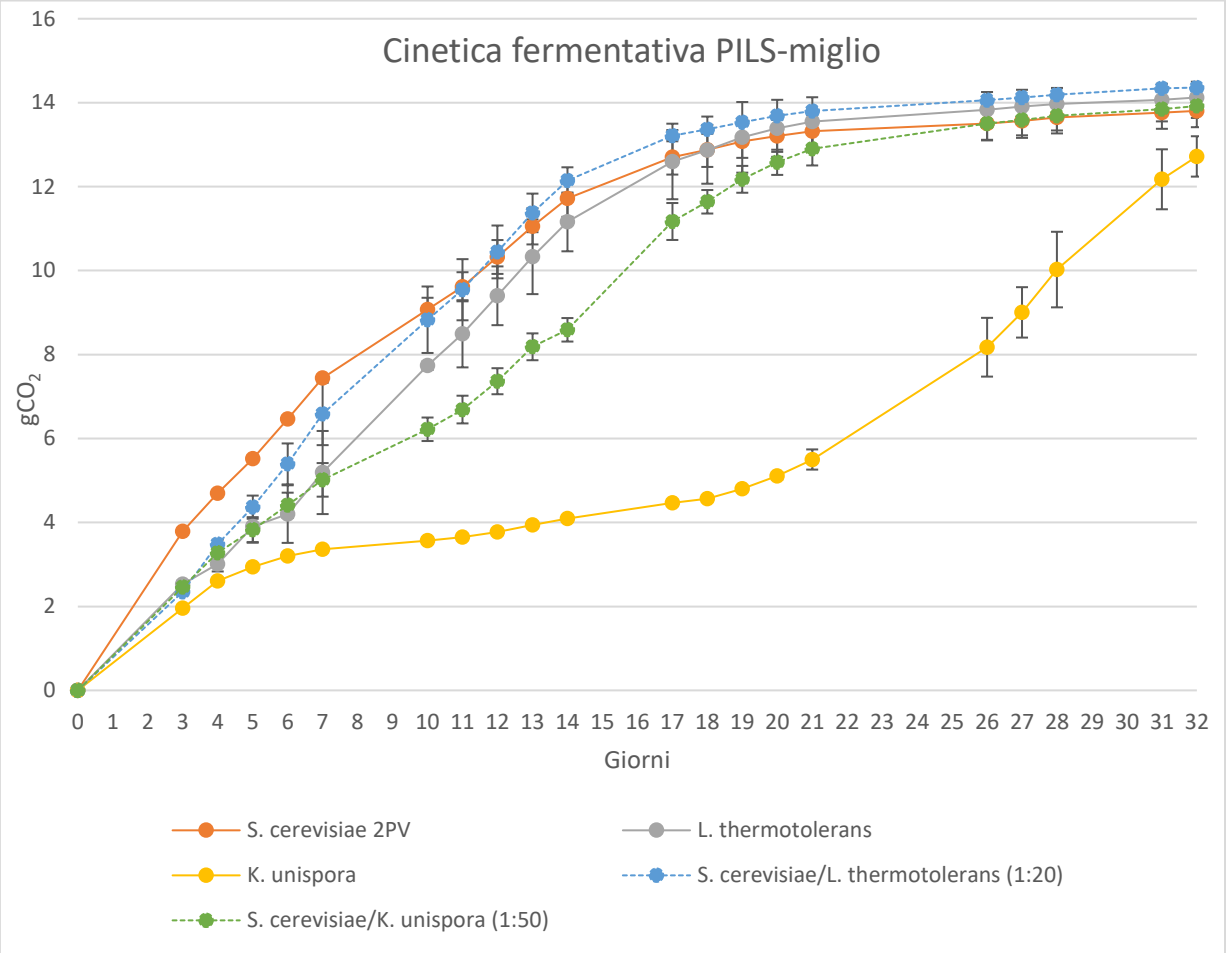

Figura 15 - Cinetica fermentativa su mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio

Situazione differente è mostrata dalla cinetica fermentativa delle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto (Figura 16). Relativamente alle colture pure, è il ceppo *L. thermotolerans* a mostrare un andamento fermentativo più lento, a differenza delle prove condotte sul mosto Pils e sul miglio. Tuttavia, il ceppo ad aver prodotto la quantità minore di CO_2 finale è stato *K. unispora*, come per gli altri substrati. Per quanto riguarda le colture miste, anche in questo caso il ceppo *S. cerevisiae* 2PV ha influenzato la cinetica fermentativa dei ceppi non- *Saccharomyces*, aumentandola.

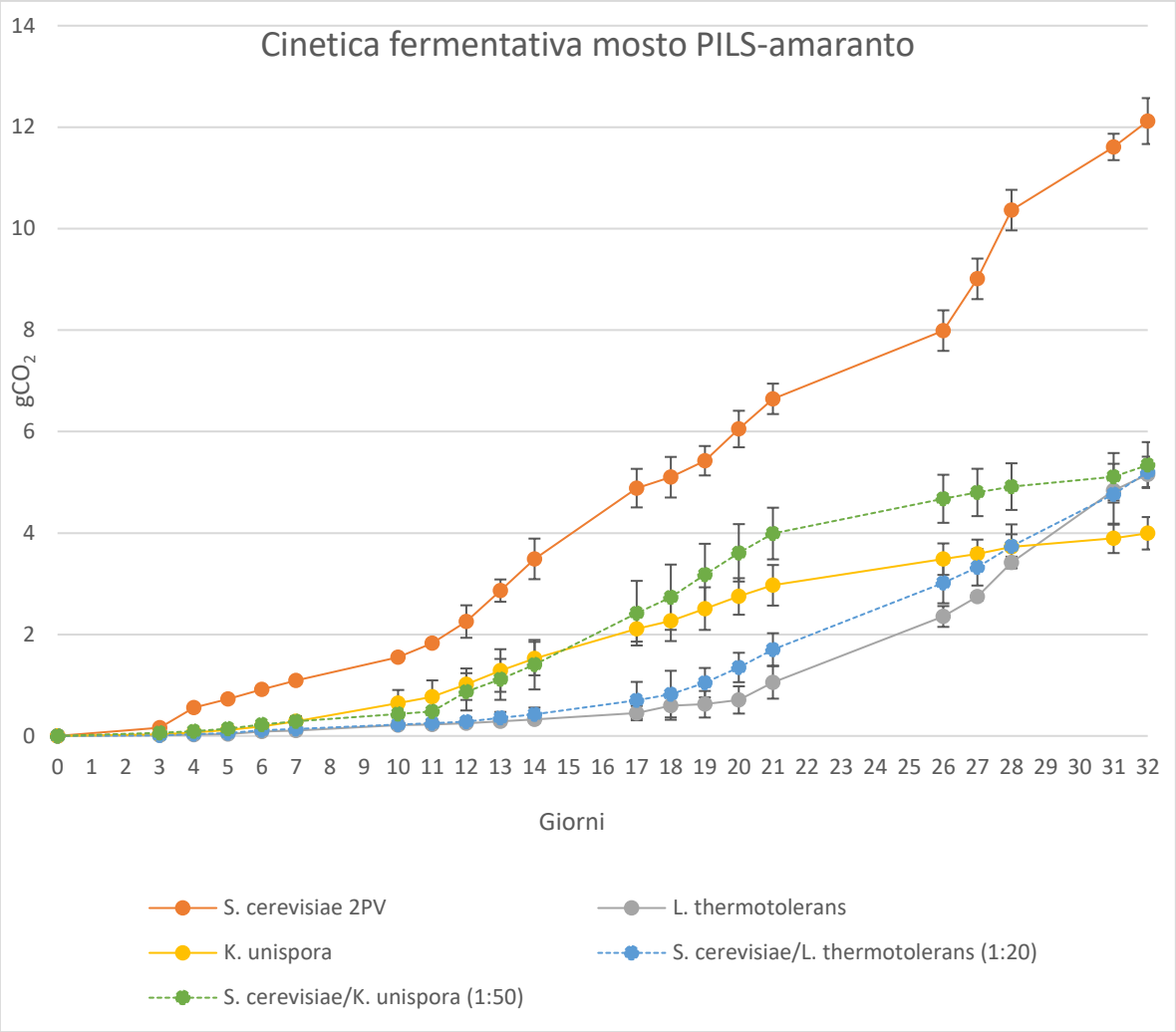

Figura 16 - Cinetica fermentativa su mosto pils addizionato di idrolizzato di amaranto

Nella figura 17 sottostante è riportato l'andamento fermentativo delle fermentazioni miste nei differenti substrati. Le colture miste *S. cerevisiae/ L. thermotolerans* e *S. cerevisiae/ K. unispora* mostrano una cinetica fermentativa più alta nelle prove condotte sul miglio, seguita dalle prove effettuate sul mosto Pils ed infine sull'amaranto.

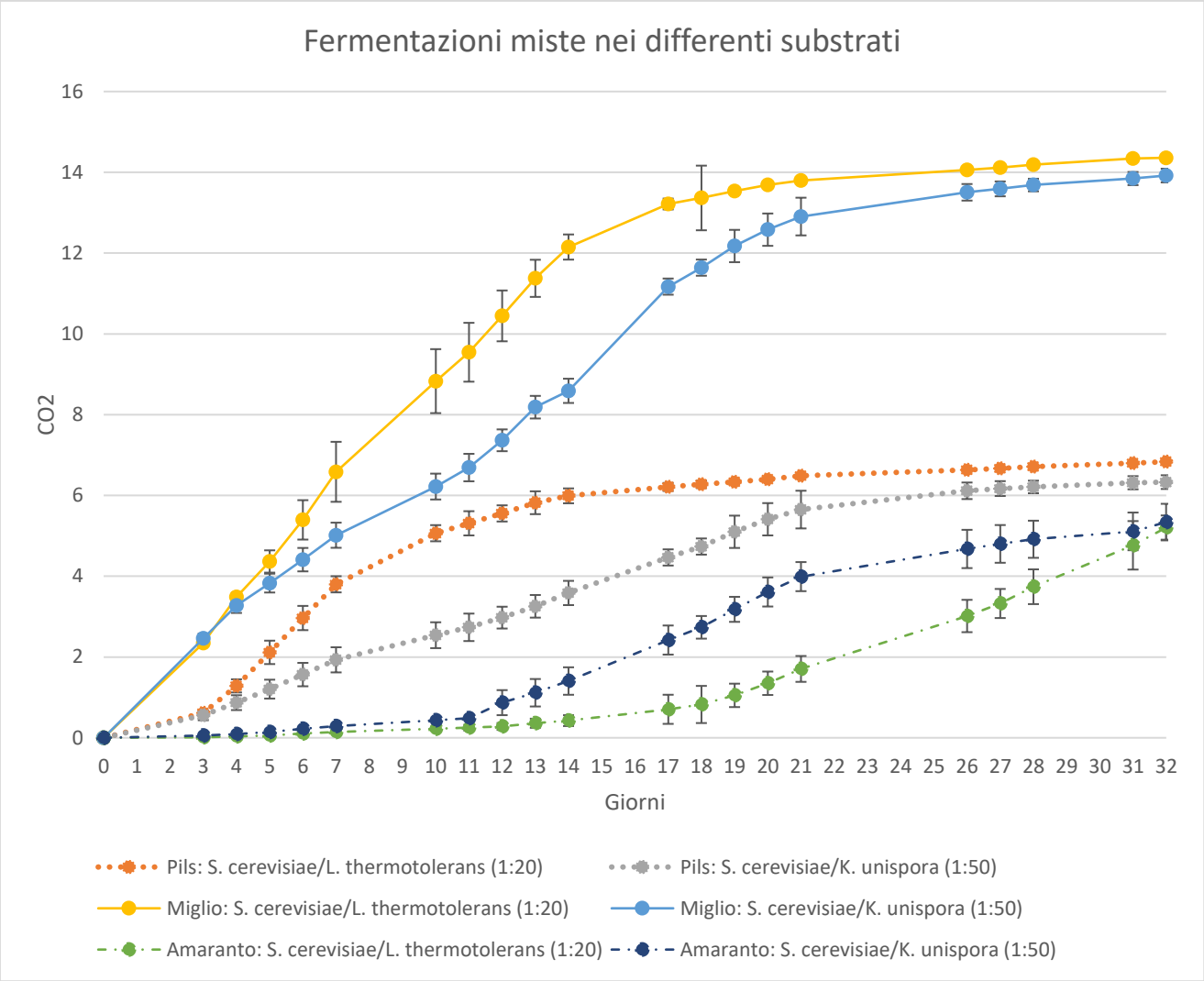

Figura 17 – Cinetica fermentativa delle fermentazioni miste nei differenti substrati

4.3 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA

Al termine del processo di rifermentazione, le birre sono state sottoposte a conta vitale su piastra per valutare l'effettiva vitalità dei ceppi utilizzati. Dopo un mese dall'imbottigliamento, tutti i ceppi hanno mostrato una vitalità alta che oscillava da 10^5 a 10^6 cellule su ml (dati non mostrati).

4.4 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

I risultati relativi al profilo analitico delle prove ottenute su mosto Pils (Tabella 11) mostrano come tutte le fermentazioni hanno consumato il glucosio e saccarosio, al contrario del maltosio. Relativamente alle colture pure, come atteso, la prova condotta con il ceppo *K. unispora* ha evidenziato il più alto contenuto residuo di maltosio (30.96g/L) rispetto a tutte le altre prove, concorde con il basso potere fermentativo. Per quanto riguarda le fermentazioni miste, i valori di maltosio sono piuttosto simili tra loro (circa 8.8g/L). Per il contenuto di proteine residue, tra le colture pure, il valore più alto è stato registrato dal ceppo *S. cerevisiae* 2PV (31.47g/L) mentre, relativamente alle colture miste, la quantità di proteine residue è simile tra le due prove e di circa 18.05gr.

CEPPI	ZUCCHERI RESIDUI g/L			PROTEINE RESIDUE g/L
	Glucosio	Saccarosio	Maltosio	
S.cerevisiae	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.008	10.6 ± 1.15	31.47 ± 1.62
L. thermotolerans	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.001	10.5 ± 1.50	23.4 ± 1.16
K. unispora	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.006	30.96 ± 1.61	13.02 ± 1.12
S.cerevisiae/L. thermotolerans	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	9.8 ± 0.65	19.07 ± 1.33
S. cerevisiae/K. unispora	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	7.8 ± 1.05	17.05 ± 1.17

Tabella 11 - Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto Pils.

Zuccheri iniziali e proteine mosto Pils addizionato: glucosio (0g/l); saccarosio (0g/l); maltosio (32g/l); proteine (10.71g/l)

I risultati relativi al profilo analitico delle prove ottenute su mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio sono riportati nella tabella 12. Anche in questo caso, il glucosio e il

saccarosio sono stati completamente consumati al contrario del maltosio. Tuttavia, rispetto alle prove condotte sul mosto Pils, le quantità di maltosio residuo sono inferiori. I valori più alti si riscontrano nelle fermentazioni miste *S. cerevisiae/L. thermotolerans* e *S. cerevisiae/K. unispora*, rispettivamente di 14.7 g/L e 8.6 g/L. Tra le colture pure, a differenza delle prove condotte su mosto Pils, in questo caso è il ceppo *L. thermotolerans* ad avere un maggior quantitativo di maltosio residuo (8.5gr). Relativamente al contenuto proteico, le prove condotte sul miglio mostrano dei valori leggermente inferiori rispetto alle altre prove. Tra le colture pure, *S. cerevisiae* 2PV possiede una quantità di proteine maggiore (16.19g/L) rispetto alle prove condotte sullo stesso substrato. Relativamente alle colture miste invece, anche in questo caso le due prove mostrano risultati simili tra loro, anche se in quantità minori se paragonate ai valori delle fermentazioni miste effettuate sugli altri substrati.

CEPPI	ZUCCHERI RESIDUI g/L			PROTEINE RESIDUE g/L
	Glucosio	Saccarosio	Maltosio	
S.cerevisiae	0.08 ± 0.045	0.03 ± 0.013	4.3 ± 0.1	16.19 ± 1.12
L. thermotolerans	0.03 ± 0.009	0.03 ± 0.023	8.5 ± 0.65	7.25 ± 1.62
K. unispora	0.02 ± 0.001	0.00 ± 0.00	6.4 ± 1.15	10.71 ± 1.89
S.cerevisiae/L. thermotolerans	0.01 ± 0.009	0.01 ± 0.008	14.7 ± 2.16	12.5 ± 1.18
S. cerevisiae/K. unispora	0.02 ± 0.001	0.00 ± 0.00	8.6 ± 1.05	14.75 ± 1.30

Tabella 12- Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio

Zuccheri iniziali e proteine mosto pils addizionato con idrolizzato di miglio: glucosio (1g/l); saccarosio (16g/l); maltosio (26g/l); proteine (6.97g/l)

Relativamente alle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto (Tabella 13), tutte le fermentazioni hanno consumato il glucosio ma ci sono delle differenze relative al saccarosio e al maltosio. In particolar modo, relativamente alle colture pure, le fermentazioni condotte con *L. thermotolerans* e *K. unispora* hanno evidenziato il contenuto più alto di questi zuccheri rispetto a tutte le prove effettuate su questo substrato. Inoltre, queste prove sono caratterizzate da un maggior contenuto di proteine rispetto alle altre effettuate sull'amaranto, rispettivamente pari a 25.41g/L e 22.24g/L. Questi sono tra i valori più alti ottenuti in tutte le prove sui differenti substrati, dovuto probabilmente al fatto che l'amaranto, essendo un cereale ricco di proteine, ha portato ad un incremento della quota proteica totale. Per quanto riguarda le colture miste, il glucosio e il saccarosio sono stati completamente consumati ma ci sono delle differenze relative al maltosio. Infatti, *S. cerevisiae/ L. thermotolerans* presenta una quantità di maltosio residuo superiore rispetto a *S. cerevisiae/ K. unispora* dove questo zucchero è stato anch'esso completamente consumato. Al contrario, la quantità di proteine residue è superiore nella prova condotta con *S. cerevisiae/K unispora*.

CEPPI	ZUCCHERI RESIDUI g/L			PROTEINE RESIDUE g/L
	Glucosio	Saccarosio	Maltosio	
S.cerevisiae	0.04 ± 0.002	0.03 ± 0.001	11.6 ± 1.107	13.31 ± 1.31
L. thermotolerans	0.00 ± 0.00	1.05 ± 0.039	37.5 ± 2.14	25.41 ± 1.89
K. unispora	0.8 ± 0.009	2.15 ± 0.024	24.5 ± 0.75	22.24 ± 1.17
S.cerevisiae/L. thermotolerans	0.11 ± 0.006	0.14 ± 0.006	18.7 ± 1.53	14.46 ± 1.43
S. cerevisiae/K. unispora	0.03 ± 0.008	0.16 ± 0.008	0.00 ± 0.00	21.95 ± 1.02

Tabella 13 - Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto

Zuccheri iniziali e proteine mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto: glucosio (8g/l); maltosio (32g/l); saccarosio (37g/l); proteine (13.02g/l)

Le differenze tra i risultati delle prove analitiche relative alle fermentazioni miste effettuate sui differenti substrati sono riportati nella tabella 14. I dati mostrano come il glucosio e il saccarosio siano stati completamente consumati a differenza del maltosio, che è presente in concentrazioni maggiori nella coltura mista *S. cerevisiae/ L. thermotolerans* rispetto a *S. cerevisiae/ K. unispora* per tutti i differenti substrati. Per quanto riguarda le proteine, i valori più bassi sono relativi alle prove condotte sul miglio mentre la quantità proteica maggiore nella prova con *S. cerevisiae/K unispora* effettuata sull'amaranto (21.95gr).

CEPPI	SUBSTRATO	ZUCCHERI RESIDUI g/L			PROTEINE RESIDUE g/L
		Glucosio	Saccarosio	Maltosio	
S.cerevisiae/L. thermotolerans	Pils	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	9.8 ± 0.65	19.07 ± 1.33
S. cerevisiae/K. unispora	Pils	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	7.8 ± 1.05	17.05 ± 1.17
S.cerevisiae/L. thermotolerans	Miglio	0.01 ± 0.009	0.01 ± 0.008	14.7 ± 2.16	12.5 ± 1.18
S. cerevisiae/K. unispora	Miglio	0.02 ± 0.001	0.00 ± 0.00	8.6 ± 1.05	14.75 ± 1.30
S.cerevisiae/L. thermotolerans	Amaranto	0.11 ± 0.006	0.14 ± 0.006	18.7 ± 1.53	14.46 ± 1.43
S. cerevisiae/K. unispora	Amaranto	0.03 ± 0.008	0.16 ± 0.008	0.00 ± 0.00	21.95 ± 1.02

Tabella 14 - Risultati delle prove analitiche relative alle fermentazioni miste per i differenti substrati

4.5 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

I principali composti secondari delle birre ottenute dalla fermentazione su mosto Pils sono riportati nella tabella 15. Relativamente alle colture pure, i ceppi *L. thermotolerans* e *K. unispora* mostrano valori più bassi rispetto al ceppo S. *cerevisiae* 2PV per tutti i composti secondari, ad eccezione dell'etilacetato (aroma di ananas), il cui valore più alto è stato riscontrato nella prova condotta con *L. thermotolerans* (7.00mg/L). Per quanto riguarda le colture miste, non ci sono evidenti differenze tra i valori dei singoli composti secondari e tutti rientrano nei limiti del threshold.

CEPPI	Acetaldeide (mg/L)	Etilacetato (mg/L)	Propanolo (mg/L)	Isobutanolo (mg/L)	Amilicoattivo (mg/L)	Isoamilico (mg/L)
S. cerevisiae	20.25	4.17	15.17	16.73	10.75	72.85
L. thermotolerans	3.98	7.00	11.86	8.22	4.75	36.23
K. unispora	3.23	2.16	13.51	6.70	2.25	26.03
S. cerevisiae/ L. thermotolerans	10.60	6.70	13.85	15.97	8.05	47.23
S. cerevisiae/ K. unispora	15.92	3.79	16.90	15.44	8.08	48.01

Tabella 15 – Principali composti secondari birre prodotte dal mosto Pils

I composti secondari delle birre prodotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio sono riportati nella tabella 16. In questo caso, tra le colture pure, *K. unispora* presenta i valori più bassi dei differenti composti secondari ad eccezione dell'etilacetato, che al contrario è presente in quantità maggiore (11.15mg/L) tra tutte le colture pure condotte su questo substrato. Relativamente alle fermentazioni miste invece, *S. cerevisiae/ K. unispora* mostra quantità di acetaldeide (aroma di mela verde, erba tagliata) ed etilacetato maggiori rispetto

a *S. cerevisiae/ L. thermotolerans*, dove al contrario sono presenti in quantità superiori tutti gli altri composti.

CEPPI	Acetaldeide (mg/L)	Etilacetato (mg/L)	Propanolo (mg/L)	Isobutanolo (mg/L)	Amilicoattivo (mg/L)	Isoamilico (mg/L)
S. cerevisiae	18.69	7.31	14.41	11.87	8.02	68.33
L. thermotolerans	18.98	6.31	13.33	10.60	6.85	42.72
K. unispora	14.38	11.15	11.25	8.97	6.07	43.09
S. cerevisiae/ L. thermotolerans	6.45	13.81	18.72	22.09	12.02	64.29
S. cerevisiae/ K. unispora	25.70	20.19	15.43	11.51	8.44	62.13

Tabella 16 – Principali composti secondari birre prodotte dal mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio

I composti secondari delle birre prodotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto sono riportati nella tabella 17. Per quanto riguarda le colture pure, i valori più bassi dei differenti composti sono relativi a *K. unispora*, ad eccezione dell'acetaldeide, che è pari a 48.22mg/L, valore più alto riscontrato per questo composto tra tutte le prove effettuate. Relativamente alle colture miste, le quantità dei vari composti sono simili tra le due prove, con valori di poco superiori nella fermentazione mista *S. cerevisiae/ L. thermotolerans*, ad eccezione dell'acetaldeide, più alta nella coltura mista *S. cerevisiae/ K. unispora*. Inoltre, in queste fermentazioni miste condotte su amaranto, è stata riscontrata una quantità di acido isoamilico nettamente più bassa rispetto agli altri substrati.

CEPPI	Acetaldeide (mg/L)	Etilacetato (mg/L)	Propanolo (mg/L)	Isobutanolo (mg/L)	Amilicoattivo (mg/L)	Isoamilico (mg/L)
S. cerevisiae	32.66	1.77	14.41	14.65	8.39	47.00
L. thermotolerans	6.28	0.31	20.23	19.48	13.29	44.56
K. unispora	48.22	0.00	13.00	8.63	4.53	25.25
S. cerevisiae/ L. thermotolerans	7.98	3.08	11.14	8.47	5.74	27.16
S. cerevisiae/ K. unispora	12.41	0.00	10.77	3.54	3.99	25.49

Tabella 17 – Principali composti secondari birre prodotte dal mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto

Nella tabella 18 sono riportate le differenze relative ai composti secondari delle fermentazioni miste tra i vari substrati. I valori più alti di acetaldeide ed etilacetato sono relativi alla prova condotta sul miglio con *S. cerevisiae/ K unispora*. Il propanolo (nota di durezza), l'isobutanolo (nota alcolica, solvente), l'amilico attivo (alcol e nota fruttata) e l'acido isoamilico (alcol e nota fruttata) sono presenti invece in quantità maggiori nella prova condotta con *S. cerevisiae/ L. thermotolerans*, sempre utilizzando come substrato il miglio.

CEPPI	Substrati	Acetaldeide (mg/L)	Etilacetato (mg/L)	Propanolo (mg/L)	Isobutanolo (mg/L)	Amilicoattivo (mg/L)	Isoamilico (mg/L)
S. cerevisiae/ L. thermotolerans	Pils	10.60	6.70	13.85	15.97	8.05	47.23
S. cerevisiae/ K. unispora	Pils	15.92	3.79	16.90	15.44	8.08	48.01
S. cerevisiae/ L. thermotolerans	Miglio	6.45	13.81	18.72	22.09	12.02	64.29
S. cerevisiae/ K. unispora	Miglio	25.70	20.19	15.43	11.51	8.44	62.13
S. cerevisiae/ L. thermotolerans	Amaranto	7.98	3.08	11.14	8.47	5.74	27.16
S. cerevisiae/ K. unispora	Amaranto	12.41	0.00	10.77	3.54	3.99	25.49

Tabella 18 – Principali composti secondari delle fermentazioni miste tra i diversi substrati

4.6 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

I principali composti volatili riscontrati nelle birre ottenute sul mosto Pils sono riportati nella tabella 19. Relativamente alle colture pure per questo specifico substrato, i differenti composti sono presenti in simili concentrazioni ad eccezione dell'acetato di isoamile e il 2-feniletanolo. Il primo, infatti, che conferisce al prodotto un aroma di banana, è presente nella coltura pura condotta con *S. cerevisiae* in concentrazioni pari a 4.66mg/L, la più alta non solo relativamente a questo substrato ma tra tutte le prove condotte. Inoltre, anche il 2-feniletanolo (aroma di rosa) è stato riscontrato in concentrazioni più alte nella coltura pura *S. cerevisiae* rispetto alle altre fermentazioni pure svolte sul mosto Pils. Per quanto riguarda invece le colture miste, non sono presenti evidenti differenze tra le quantità dei vari composti.

CEPPI	Etilbutirrato (mg/L)	Acetato di isoamile (mg/L)	Etilottanoato (mg/L)	Linalolo (mg/L)	Dietilsuccinato (mg/L)	Acido butirrico (mg/L)	Feniletilacetato (mg/L)	Nerolo (mg/L)	2-Feniletanolo (mg/L)	Acido decanoico (mg/L)
S. cerevisiae	0.01	4.66	0.04	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	16.70	0.04
L. thermotolerans	0.04	0.16	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.00	0.01
K. unispora	0.01	1.37	0.00	0.06	0.00	0.00	0.07	0.01	2.50	0.01
S. cerevisiae/L. thermotolerans	0.02	0.76	0.00	0.18	0.00	0.00	0.07	0.00	17.00	0.00
S. cerevisiae/K. unispora	0.05	1.02	0.00	0.04	0.00	0.07	0.00	0.00	14.40	0.00

Tabella 19 - Principali composti volatili della birra ottenuta su mosto Pils

I principali composti volatili riscontrati nelle birre ottenute sul mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio sono riportati nella tabella 20. Tra tutte le colture pure, la prova condotta con *L. thermotolerans* ha mostrato valori più bassi di etilbutirrato (aroma di anans, mela), acetato di isoamile (aroma di banana), feniletilacetato (aroma di miele, mela), 2-feniletanolo e acido decanoico. Interessante è il dato relativo all'acetato di isoamile nella prova condotta con *K. unispora*, pari a 4.18mg/L, di gran lunga superiore al quantitativo dello stesso composto riscontrato nelle prove svolte con lo stesso ceppo ma sugli altri substrati. Relativamente alle fermentazioni miste invece, le differenze maggiori sono state riscontrate per l'acetato di isoamile, in quantità doppia nella coltura mista *S. cerevisiae/L. thermotolerans* rispetto alla prova condotta con *S. cerevisiae/K. unispora*, e per i composti feniletilacetato e acido decanoico, anche in questo caso presenti in quantità maggiori nella prima coltura mista. Rispetto alle prove precedenti svolte sul mosto Pils, con l'aggiunta

dell'idrolizzato di miglio, è stato riscontrato per tutte le prove un incremento delle concentrazioni dell'acetato di isoamile e del 2- feniletanolo.

CEPPI	Etilbutirrato (mg/L)	Acetato di isoamile (mg/L)	Etilottanoato (mg/L)	Linalolo (mg/L)	Dietilsuccinato (mg/L)	Acido butirrico (mg/L)	Feniletilacetato (mg/L)	Nerolo (mg/L)	2-Feniletanolo (mg/L)	Acido decanoico (mg/L)
S. cerevisiae	0.18	4.14	0.00	0.00	0.54	0.00	0.08	0.00	26.60	0.17
L. thermotolerans	0.01	2.52	0.00	0.04	0.00	0.04	0.00	0.08	12.40	0.10
K. unispora	0.06	4.18	0.04	0.00	0.00	0.04	0.11	0.13	18.60	1.14
S. cerevisiae/L. thermotolerans	0.10	2.56	0.00	0.00	0.00	0.01	1.15	0.11	25.50	0.13
S. cerevisiae/K. unispora	0.10	1.18	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.08	21.10	0.05

Tabella 20 - Principali composti volatili della birra ottenuta su mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio

I principali composti volatili riscontrati nelle birre ottenute sul mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto sono riportati nella tabella 21. Le colture pure hanno mostrato tra loro valori piuttosto simili ad eccezione dell'acetato di isoamile, il feniletilacetato e il 2-feniletanolo. Tutti questi composti sono infatti presenti in quantità maggiori nella coltura pura condotta con *S. cerevisiae*. Relativamente alle colture miste invece, le uniche differenze riguardano l'acetato di isoamile e il 2-feniletanolo, entrambi presenti in quantità maggiori nella coltura mista *S. cerevisiae/K.unispora.* Al contrario, gli altri composti sono presenti in basse concentrazioni e con valori simili tra le due fermentazioni miste.

CEPPI	Etilbutirrato (mg/L)	Acetato di isoamile (mg/L)	Etilottanoato (mg/L)	Linalolo (mg/L)	Dietilsuccinato (mg/L)	Acido butirrico (mg/L)	Feniletilacetato (mg/L)	Nerolo (mg/L)	2-Feniletanolo (mg/L)	Acido decanoico (mg/L)
S. cerevisiae	0.00	2.54	0.00	0.00	0.00	0.01	0.70	0.00	26.96	0.00
L. thermotolerans	0.01	1.92	0.00	0.00	0.15	0.00	0.04	0.00	9.90	0.00
K. unispora	0.03	0.45	0.00	0.15	0.00	0.00	0.03	0.06	19.30	0.05
S. cerevisiae/L. thermotolerans	0.04	1.25	0.00	0.05	0.00	0.02	0.00	0.14	15.20	0.00
S. cerevisiae/K. unispora	0.01	1.59	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.10	21.20	0.01

Tabella 21 - Principali composti volatili della birra ottenuta su mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto

Nella tabella 22 sottostante sono riportati i principali composti volatili delle fermentazioni miste tra i differenti substrati. L'etilottanoato, il linalolo e il dietilsuccinato sono presenti in concentrazioni minime in tutte le prove miste, generalmente con valori pari a 0.00mg/L. Il nerolo è presente in concentrazioni molto basse in tutte le prove miste ma i valori maggiori sono relativi alle prove condotte sull'amaranto. Per tutti gli altri composti invece è stato riscontrato un incremento delle quantità nelle prove condotte sul mosto Pils addizionato con idrolizzato di miglio.

CEPPI	Substrato	Etilbutirrato (mg/L)	Acetato di isoamile (mg/L)	Etilottanoato (mg/L)	Linalolo (mg/L)	Dietilsuccinato (mg/L)	Acido butirrico (mg/L)	Feniletilacetato (mg/L)	Nerolo (mg/L)	2-Feniletanolo (mg/L)	Acido decanoico (mg/L)
S. cerevisiae/L. thermotolerans	Pils	0.02	0.76	0.00	0.18	0.00	0.00	0.07	0.00	17.0	0.00
S. cerevisiae/K. unispora	Pils	0.05	1.02	0.00	0.04	0.00	0.07	0.00	0.00	14.4	0.00
S. cerevisiae/L. thermotolerans	Miglio	0.10	2.56	0.00	0.00	0.00	0.01	1.15	0.11	25.5	0.13
S. cerevisiae/K. unispora	Miglio	0.10	1.18	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.08	21.1	0.05
S. cerevisiae/L. thermotolerans	Amaranto	0.04	1.25	0.00	0.05	0.00	0.02	0.00	0.14	15.2	0.00
S. cerevisiae/K. unispora	Amaranto	0.01	1.59	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.10	21.2	0.01

Tabella 22 - Principali composti volatili delle fermentazioni miste tra i differenti substrati

CAPITOLO 5- DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Il mercato degli alimenti funzionali è cresciuto rapidamente negli ultimi anni, grazie all'aumento della richiesta da parte dei consumatori, sempre più interessati al proprio benessere e al miglioramento della propria salute (Carrillo et al, 2013). Ciò ha rivoluzionato il mercato alimentare promuovendo la commercializzazione di prodotti innovativi e che apportino benefici nutrizionali specifici. Tra questi vi sono ad esempio le bevande fortificate, cioè arricchite di micro e macro nutrienti al fine di colmare lacune nutrizionali ed apportare benefici per la salute del consumatore. Ma recentemente sono i probiotici a dominare il mercato tra le varie categorie di alimenti funzionali. L'arricchimento dei prodotti con i probiotici, infatti, se aggiunti in adeguate quantità, forniscono numerosi effetti positivi per l'ospite tra cui regolare l'equilibrio microbico intestinale, la modulazione immunitaria e ridurre l'infiammazione di malattie intestinali (Kaur et al, 2002). Per questa ragione la ricerca si sta sempre più focalizzando sulla selezione di microrganismi da applicare nel campo alimentare.

In tale contesto, l'obiettivo del presente progetto di tesi è stato sviluppare birre artigianali fortificate in scala da laboratorio, utilizzando lieviti non convenzionali precedentemente testati e selezionati per le proprie attività funzionali (Agarbati et al, 2020). Al fine di fortificare tali prodotti, sono state utilizzate delle piante erbacee, quali miglio e amaranto come ulteriore fonte proteica. Nello specifico, le fermentazioni sono state eseguite sui seguenti substrati: mosto Pils, mosto Pils addizionato con il 20% di idrolizzato di amaranto e mosto Pils idrolizzato con il 20% di idrolizzato di miglio. I lieviti non convenzionali utilizzati sono stati *L. thermotolerans* e *K. unispora*, testati sia in fermentazioni pure che in

colture miste con il ceppo *S. cerevisiae* 2PV nei seguenti rapporti: *S. cerevisiae/ L. thermotolerans* 1:20 e *S. cerevisiae/ K. unispora* 1:50.

Il ceppo di *L. thermotolerans*, isolato dal muschio di legno di quercia, ha contraddistinto ogni prova con una lieve nota di acidità, tipica caratteristica delle birre *sour*, e un aroma fruttato. Nelle fermentazioni pure, la cinetica fermentativa di *L. thermotolerans* è stata di poco inferiore se paragonata al ceppo *S. cerevisiae* 2PV. Relativamente al profilo analitico, è stato evidenziato un elevato contenuto di proteine, in particolar modo presenti in quantità maggiore nelle prove effettuate sul mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto rispetto agli altri substrati. Inoltre, dai risultati ottenuti dalla valutazione dell'etanolo durante lo screening, si evince che il ceppo *L. thermotolerans* in coltura pura, in determinati substrati (tra cui l'amaranto) possa essere una strategia valida per la produzione di birra a bassa gradazione alcolica.

Il ceppo di *K. unispora*, isolato da una madre acida, ha esibito in coltura pura l'andamento fermentativo più basso tra tutte le prove svolte sui differenti substrati e ciò ha determinato, dal punto di vista analitico, un quantitativo piuttosto elevato di zuccheri residui, in particolar modo il maltosio. Relativamente alle proteine, sono state riscontrate buone concentrazioni soprattutto nelle prove condotte sul mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto. Indipendentemente dalla cinetica fermentativa, questo ceppo ha determinato un incremento di alcuni composti volatili, in particolar modo nella prova svolta su miglio in cui è stato riscontrato un elevato livello di acetato di isoamile. Inoltre, anche questo ceppo di lievito non convenzionale ha dimostrato nello screening di produrre basse quantità di etanolo. Di conseguenza l'utilizzo di *K. unispora* può essere considerato un'ottima alternativa per produrre birre a bassa gradazione alcolica e con una buona quota proteica ma anche

eventualmente, grazie all'elevato valore energetico, per produrre bevande da impiegare nelle diete ipercaloriche.

Il ceppo *S. cerevisiae* 2PV, isolato da una cantina vinicola, ha mostrato una performance fermentativa paragonabile agli starter commerciali (testati in altre prove sperimentai), sia in termini di cinetica fermentativa che di profilo analitico. Inoltre, questo ceppo ha conferito alle varie prove condotte sui differenti substrati un profilo aromatico distintivo e senza difetti olfattivi e gustativi.

Relativamente ai substrati utilizzati come ulteriore fonte proteica, il miglio si è dimostrato essere un ottimo candidato, conferendo alle birre composti aromatici distintivi. Infatti, è stato riscontrato un incremento di tutti i principali composti volatili rispetto alle prove effettuate sul mosto Pils e sul mosto Pils addizionato con idrolizzato di amaranto. Stesso andamento per quanto riguarda gli alcoli superiori, facendo in particolar modo riferimento alle fermentazioni miste, dove le prove condotte sul miglio hanno mostrato valori più alti rispetto agli altri substrati. L'amaranto invece ha contribuito all'incremento della quota proteica totale delle differenti prove rispetto a quelle condotte sul mosto Pils e su miglio. Questo lavoro, quindi, rappresenta un primo passo per un progetto di ricerca più ampio. Sono necessarie, infatti, ulteriori indagini per poter investigare maggiormente sulle tecniche, i differenti substrati e i ceppi di lievito da poter utilizzare al fine di poter ottenere un prodotto che abbia sia una buona concentrazione proteica che un buon profilo aromatico.

L'utilizzo di specie di lievito non convenzionali e piante erbacee come fonti proteiche si sono dimostrati quindi una valida strategia per la produzione di una bevanda innovativa, a basso contenuto alcolico, con buone proprietà nutrizionali e un buon profilo organolettico. La birra, in questo modo, non viene più considerata come una semplice bevanda da

compagnia ma anche come un prodotto arricchito con specifiche proprietà benefiche e varietà aromatica.

CAPITOLO 6 - BIBLIOGRAFIA

- Agarbati A., Canonico L., Marini, E., Zannini, E., Ciani, M., Comitini F., 2020. Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. Foods 9-287.
- Bamforth CW (1994). β-Glucan and β-glucanases in malting and brewing: Pratical aspects. Brew, Digest 69 (5), 12-16.
- Bigliardi B, Galati F (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. Trends in Food Science & Technology, 2013 - Elsevier
- Bressani R, García-Vela LA (1990). Protein fractions in Amaranth grain and their chemical characterization. J Agric Food Chem. 38:1205–1209.
- Briggs DE, Sole SM, Latham P. (2009). Tetrazolium Staining, Mitochondria, and Barley Quality. Journal of the Institute of Brewing 115, 41-48.
- 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
- Carrillo E., Prado-Gascó V., Fiszman S. and Varela P. (2013). Why buying functional foods? Understanding spending behaviour through structural equation modelling. Food Research International
- Ciani M, Canonico L, Comitini F (2019). Beer between tradition and innovation
- Comi G & Manzano M (2008). Beer production. Molecular techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods, Cocolin L. and Ercolini D., eds. pp. 193-207.

- Coulibaly A., Kouakou B., Chen J. (2011). Phytic acid in cereal grains: structure, healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effects on nutritional quality. Am. J. Plant Nutr. Fertil. Technol. 1 1–22.
- Crumplen, R. M., Slaughter, J. C., & Stewart, G. G. (1996). Characteristics of Maltose Transporter Activity in an Ale and Larger Strain of the Yeast Saccharomyces Cerevisiae. Letters in Applied Microbiology, 23(6), 448–452.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P., (2007). Yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. Aliment. Pharm. Ther. 26, 767-778.
- De Francesco, G., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O., & Perretti, G. (2015). Screening of New Strains of *Saccharomycodes Ludwigii* and *Zygosaccharomyces Rouxii* to Produce Low-alcohol Beer. Journal of the Institute of Brewing, 121(1), 113–121
- De Stefano A & Montanari L (1996). Minor components of beer: a review. Alcologia, 8 (1): 43-45.
- Devi P. B., Vijayabharathi R., Sathyabama S., Malleshi N. G., Priyadarisini V. B. (2014). Health benefits of finger millet (Eleusine coracana L.) polyphenols and dietary fiber: a review. J. Food Sci. Technol. 51 1021–1040.
- 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. Jorunal of Institute of Brewing, 380, 122(4), 599–604.
- Gee, D. A., and Ramirez, W. F. (1994) A flavour model for beer fermentation, J. Inst. Brew. 100, 321–329
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2013) *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and

sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine, Food Microbiol. 33, 271– 281.

- Goerges S, Aigner U, Silakowski B, Scherer S. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. Appl Environ Microbiol **72**(1): 313– 8.
- Hardy G. (2000). Nutraceutical and functional foods: introduction and meaning. Nutrition, 16, pp. 688-698
- Harrison MA (2009). "Beer/Brewing." Encyclopedia of Microbiology. 3rd Edition. Elsevier Inc.
- Home S (1993). β-Glucans in malting and brewing. VTT Publications 142. Espoo. Finland, 48 pp. + approx. 46 pp. innovative brewing fermentations. Food Res Int 2016, 86:112-120.
- Huerta-Ocampo JÁ. Barba de la Rosa AP. (2011). Amaranth: a pseudo-cereal with nutraceutical properties. Curr Nutr Food Sci. 7:1–9.
- Hulse J. H., Laing E. M., Pearson O. E. (1980). Sorghum and the Millets: Their Composition and Nutritive Value. London: Academic Press, 187–193.
- Indrani Bhattacharya, Song Yan, Jay Shankar Singh Yadav, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli (2013). *Saccharomyces unisporus*: Biotechnological Potential and Present Status.
- Iserentant D (1994). Beers: recent technological innovations in brewing. Fermented Beverage Production. A. G. H. Lea and J. R. Piggot, eds., pp. 45-79
- Janssen F, Pauly A, Rombouts I, Jansens KJA, Deleu LJ, Delcour JA. (2017). Proteins of Amaranth (Amaranthus spp.), buckwheat (Fagopyrum spp.), and quinoa (Chenopodium spp.): a food science and technology perspective. Compr Rev Food Sci Food Saf. 16:39–58.

- Kalinova J., Moudry J. (2006). Content and quality of protein in proso millet (Panicum miliaceum L.) varieties. Plant Foods Hum. Nutr. 61 45–49.
- Kaur, I.P.; Chopra, K.; Saini, A. (2002). Probiotics: Potential pharmaceutical applications. Eur. J. Pharm. Sci.15, 1–9. [CrossRef]
- Kelesidis, T., Pothoulakis, C., (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. Therap. Adv. Gastroenterol. 5, 111-125.
- Kobayashi M, Nagahisa K, Shimizu H, Shioya S (2006). Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in low-malt beer fermentation. Appl Microbiol Biotechnol, 73: 549-558
- Koch, C., Brandsteter, M., Welchselberger, P., Lorantfy, B., Plata, M. R., Radel, S., Herwig, C., and Lendl, B. (2015) Ultrasound-enhanced attenuated total reflection mid-infrared spectroscopy in-line probe: Acquisition of cell spectra in a bioreactor, Anal. Chem. 87, 2314–2320
- Kumari P. L., Sumathi S. (2002). Effect of consumption of finger millet on hyperglycemia in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) subjects. Plant Foods Hum. Nutr. 57 205–213
- Linko M, Haikara A, Ritala A, Penttilä M (1998). Recent advances in the malting and brewing industry. J of Biotechnology 65: 85-98.
- Lodolo, E.J., Kock, J.L., Axcell, B.C., Brooks, M., (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. FEMS Yeast. Res. 8, 1018-1036.
- Lu HZ, Cai Y, Wu ZW, Jia JH, Bai FY. (2004). Kazachstania aerobia spp. nov., an ascomycetous yeast species from aerobically deteriorating corn silage. Intl J Syst Evol Microbiol 54: 2431– 5.

- Manzoni M (2006). Microbiologia industriale. Editore: Casa Editrice Ambrosiana.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Smid, E. J. (2017). Health Benefits of Fermented Foods: Microbiota and Beyond. Current Opinion in Biotechnology, 44, 94–102.
- McFarland, L.V., (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. World J. Gastroenterol. 16, 2202.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Pure non-*Saccharomyce*s Starter Cultures for Beer Fermentation with a Focus on Secondary Metabolites and Practical Applications. Journal of the Institute of Brewing, 122(4), 569–587
- Montanari L, Floridi S, Marconi O, Tironzelli M, Fanozzi P (2005). Effect of mashing procedures on brewing. European Food Research and Technology. 1-2 (221), 175-179 (2005).
- Narziβ L (1993). β-Glucan and filterability. Brauwelt Int. 5. 435-442.
- Nilla Turri (2008), Tecnologia della birra fatta in casa, Editore Mulino Don Chisciotte, p. 8.
- Nordström, K. (1964) Formation of esters from acids by brewer's yeast IV. Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids, J. Inst.Brew.70,233-242 Brew. 70, 233–242
- Nothlings, U., Murphy, S. P., Wilkens, L. R., Henderson, B. E., & Kolonel, L. N. (2007). Flavonols and pancreatic cancer riske the multiethnic cohort study. American Journal of Epidemiology,166(8), 924e931

- Ono M, Kakudo Y, Ueda S (1986). Automated analysis of hop bittering components with high performance liquid chromatography using precolumn switching. Anal Sci 2: 235-238.
- Ouwehand A. (2007). Success in applying pro- and prebiotics in dairy products. Proceedings of the fourth international FFNet meeting on functional foods (2007)
- Pathak H. C. (2013). Role of Millets in Nutritional Security of India. New Delhi: National Academy of Agricultural Sciences, 1–16.
- Peddie, H. A. B. (1990) Ester formation in brewery fermentations, J. Inst.Brew. 96, 327-331
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., and 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, Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 1937–1949.
- Rima, H.; Steve, L.; Ismail, F. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. Front. Microbiol. 3, 421.
- Rodriques N, Goncalves G, Pereira-da-Silva S, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. J Appl Microbiol 90(4): 1– 12.
- Simpson WJ (1993). Studies on the sensitive of lactic acid bacteria on hop bitter acids. J Inst Brew pp: 405-411.
- Šmogrovičovà, D., and Dömény, Z. (1999) Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts, Process Biochem. 34, 785–794
- Speers RA & Ritcey LL (1995). Towards an ideal flocculation assay. J Am Soc Brew Chem 53: 174-177.

- Spence J.T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. Journal of Food Composition and Analysis, 19 (2006), pp. S4-S6
- Stewart, G. G. (1981). The Genetic Manipulation of Industrial Yeast Strains. Canadian Journal of Microbiology, 27(10), 973–990
- Stewart GGaR. I. (2009). Brewer's Yeast: An Introduction to Brewing Science and Technology, 2 ed. The Institute of Brewing, London.
- Stewart, G. G. (2010). Wort Glucose, Maltose or Maltotriose–Do Brewer's Yeast Strains Care Which One. In Proceedings of the 31st Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section), Gold Coast, Paper (No. 4)
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. Annual Review of Microbiology, 68, 61–80.
- Takachi, R., Manami, I., Junko, I., Norie, K., Motoki, I., Shizuka, S., et al. (2008). Fruit and vegetable intake and risk of total cancer and cardiovascular diseasee Japan public health center-based prospective study. American Journal of Epidemiology,167(1), 59e70.
- Tharanathan, R.N.; Mahadevamma, S. Grain legumes—A boon to human nutrition. Trends Food Sci. Technol. 2003, 14, 507–518.
- Tonsmeire, M. (2014) American Sour Beers: Innovative Techniques for Mixed Fermentations, Brewers, Boulder, CO.
- Van Baarlen, P.; Wells, J.M.; Kleerebezem, M. (2013). Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. Trends Immunol. 34, 208–215. [CrossRef]

- Van der Aa Kühle, A.; Skovgaard, K.; Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int. J. Food Microbiol.101, 29–39. [CrossRef] [PubMed]
- Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H (2003). "Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer". Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 51, p. 678-679.
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR (2003). Yeast flocculation, what brewers should know. Appl Microbiol Biotechnol 61: 197- 206.
- Yadav, D.N.; Anand, T.; Navnidhi; Singh, A.K. (2014) Co-extrusion of pearl millet-whey protein concentrate for expanded snacks. Int. J. Food Sci. Technol. 49, 840–846.Yeast Res. 8, 1018–1036
- Willaert R. (2007). The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. In: Handbook of Food Products Manufacturing. John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- Zasio G, Cardone C, Maturano G (1997). Sapere di birra. Storia, produzione, qualità, legislazione e spillatura. Ed. Birra Peroni. Roma.
- Zheng, X., D'Amore, T., Russell, I., & Stewart, G. G. (1994). Factors Influencing Maltotriose Utilization during Brewery Wort Fermentations. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 52(2), 41–47.