



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

Corso di Laurea Magistrale in:

Biologia Molecolare e Applicata

**Selezione di lieviti, con caratteristiche funzionali, come
starter per la produzione di birra artigianale**

**Selection of functional yeasts, as starter for craft beer
production**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Valeria Zullo

Relatore
Prof. Maurizio Ciani

Correlatore:
Dott.ssa Laura Canonico

Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2019/2020

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	6
1.1 LE MATERIE PRIME	10
1.1.1 ACQUA.....	10
1.1.2 ORZO.....	12
1.1.3 LUPPOLO	14
1.1.4 LIEVITO	17
1.2 PROCESSO PRODUTTIVO	19
1.2.1 MALTIZZAZIONE	20
1.2.2 AMMOSTAMENTO	22
1.2.3 FERMENTAZIONE	25
1.2.4 DOWNSTREAM	27
1.3 BIRRA ARTIGIANALE	28
1.4 LIEVITI NON-SACCHAROMYCES	30
1.5 PROBIOTICI	31
1.6 CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA	32
1.6.1 ALCOLI SUPERIORI	34
1.6.2 ESTERI	35
1.6.3 COMPOSTI CARBONILICI	36
1.6.4 ACIDI ORGANICI	37
1.6.5 FENOLI	38
1.6.6 ALCOLI MONOTERPENI	39

1.6.7 COMPOSTI SOLFORICI	39
1.7 ALIMENTI PROTEICI SOSTITUTIVI	40
CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI.....	42
CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI	43
3.1 CEPPI DI LIEVITO UTILIZZATI	43
3.2 MOSTO PILS	44
3.3 IDROLIZZATI DI LEGUMI	44
3.4 ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI	46
3.4.1 FERMENTAZIONE MOSTO PILS E MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI CECE E LENTICCHIA ROSSA	46
3.4.2 FERMENTAZIONE MOSTO PILS E MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI LENTICCHIA ROSSA	47
3.5 ANALISI MICROBIOLICHE.....	49
3.5.1 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI	49
3.5.2 TERRENI DI COLTURA	50
3.6 ANALISI CHIMICHE.....	50
3.6.1 DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI	50
3.6.2 DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE	53
3.6.3 ALCOLI SUPERIORI	54
3.6.4 ETANOLO	55
3.6.5 COMPONENTE VOLATILE	55

3.7 ANALISI SENSORIALE	57
CAPITOLO 4 – RISULTATI	59
4.1 FERMENTAZIONE MOSTO PILS E MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI CECE E LENTICCHIA ROSSA.....	59
4.1.1 MOSTO PILS.....	59
4.1.2 MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI CECE E LENTICCHIA ROSSA.....	63
4.1.3 ANALISI SENSORIALE.....	68
4.2 FERMENTAZIONE MOSTO PILS E MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI LENTICCHIA ROSSA.....	69
4.2.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA.....	69
4.2.2 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA.....	71
4.2.3 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI.....	74
4.2.4 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI.....	79
4.2.5 ANALISI SENSORIALE.....	83
CAPITOLO 5 – DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	90
CAPITOLO 6 – BIBLIOGRAFIA	94

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

La birra è una bevanda alcolica fermentata dalle origini remote, la sua scoperta risale all'incirca intorno al 4000 a.C. Il primo documento storico in cui viene menzionata risale ai tempi dei Sumeri: si tratta di una serie di tavolette d'argilla ritrovate in Mesopotamia ad Uruk e datate 3500 a.C. In queste tavolette, oltre ad essere narrata l'epopea di Gilgamesh, un epico eroe babilonese che divenne il re dei Sumeri, e di Enkidnu, il più noto bevitore di birra del mondo antico, vengono illustrate in maniera dettagliata i procedimenti per fare la birra, le differenti varietà prodotte e le cifre relative alla sua vendita (Maureen Gallery Kovacs, 1990). Inoltre, ricordiamo che la Mesopotamia, cioè la terra tra i due fiumi, era una zona estremamente fertile e fu abitata dai Sumeri, popolazione che conosceva la coltivazione dei cereali e la trasformazione successiva di questi in farine e, infine, in pane. La trasformazione dei cereali in farine avveniva usando delle pietre d'appoggio. Con l'usura queste pietre si incavavano e quando pioveva l'acqua che ristagnava si arricchiva dei rimasugli della macinazione dei cereali. Quell'acqua giallastra possiamo considerarla la prima birra, che fu chiamata *se-ber-bi-sang*, cioè "acqua che fa vedere chiaro". Ai Sumeri succedettero gli Assiro – Babilonesi ed in particolar modo all'interno del Codice di Hammurabi (promulgato dal sovrano babilonese omonimo vissuto tra il XIX ed il XVIII secolo A.C.) troviamo, tra le altre, una legge (la più antica in tema di birra) che va a disciplinare la produzione ed il commercio della bevanda con pene, per i trasgressori, che potevano arrivare fino alla condanna a morte (Nilla Turri, 2008, p.8). Tra gli Egiziani, invece, la birra si diffuse intorno al 3100 a.C. e veniva chiamata *henqet*. L'importanza che rivestiva questa bevanda nella cultura egiziana è

testimoniata dalla vastissima raccolta di reperti archeologici che raccontano di birra e dei costumi birrari egiziani. La birra, quindi, era onnipresente nella vita degli egiziani, la utilizzavano addirittura come cura, per guarire le malattie e curare le ferite. È proprio nel periodo medioevale che si verificò da un lato, una forte fase di espansione e dall'altro, un'evoluzione tecnologica del processo di produzione. Il punto centrale intorno al quale ruotava la produzione della birra medioevale era rappresentato dal monastero. Un luogo di culto e spirituale, nel quale i monaci sperimentavano le ricette più svariate allo scopo di ottenere una bevanda sempre più buona e apprezzata. Inoltre, si pensava che contribuisse anche ad essere meno predisposti a contrarre le malattie dell'epoca, grazie ad una fase di bollitura con la quale si andavano ad eliminare tutti i microrganismi patogeni eventualmente presenti nell'acqua. Per produrre la birra si utilizzava come cereale maggiormente l'orzo, poiché contiene una sufficiente quantità di zucchero che agevola la gradazione alcolica della bevanda, oltre al fatto che l'orzo con una semplice lavorazione si tramuta in malto, necessario appunto per la produzione della birra (Aa.Vv, 2007). Come già detto in precedenza, è durante il Medioevo che assistiamo ad una svolta epocale in ambito brassicolo dal momento che è proprio in questa fase storica che avviene l'introduzione del luppolo nel processo tecnologico; quest'ultimo venne introdotto in un primo momento come ingrediente aromatizzante in grado di conferire al prodotto un sapore gradevole (Bottero et al., 2009) ed in seguito, si riuscì a dimostrare che grazie al luppolo la birra si conservava più a lungo e meglio (Nilla Turri, 2008). Dal Medioevo fino all'inizio dell'età moderna in Italia la produzione di birra avveniva quasi esclusivamente con metodi artigianali. Le prime fabbriche sorsero a partire dalla seconda metà dell'800. In Italia con la legge n. 1354 del 16/08/1962 e sue successive modifiche (leggi 329/74 e 141/89, D.L. 109/92, D.P.R. 272/98) si stabilisce la denominazione "birra" riservata a quel prodotto

ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi di *Saccharomyces carlsbergensis* o di *Saccharomyces cerevisiae* di un mosto preparato con malto, anche torrefatto, di orzo o di frumento o di loro miscele ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi. Il malto di orzo o di frumento può essere sostituito con altri cereali, come ad esempio riso, mais, segale, avena ma in misura non superiore al 40%; l'orzo deve, infatti, sempre predominare. La fermentazione alcolica del mosto può essere integrata con una fermentazione lattica, ed è permesso l'impiego di estratti di malto torrefatto e di additivi alimentari consentiti dal Decreto del Ministro della Sanità n 209 del 27/02/1996.

La birra è una bevanda molto complessa, con un moderato grado alcolico, che oscilla tra i 4-6% vol. nelle birre più comuni. Per produrla occorrono ingredienti come acqua, cereali, lievito e luppolo. Il contenuto nutritivo di una birra normale è: carboidrati (40 g/l), alcool (\approx 38g/l), proteine (\approx 5g/l); contiene anche vitamine del gruppo B (B1, B6 e B9) e del gruppo C, alcuni sali minerali (ad esempio: Silicio, Calcio, Potassio, Fosforo e un basso contenuto di Sodio) e fitonutrienti (polifenoli, fitoestrogeni), che ne esaltano il valore salutistico (Devreux, 1986; De Stefano et al., 1996). Molti studi scientifici hanno dimostrato diverse proprietà salutistiche connesse con un moderato consumo di birra, in un regime alimentare equilibrato. Ad esempio, composti fenolici di orzo e luppolo, presenti solamente nella birra, come pro-antocianidine e flavonoidi (xanthohumol, isoxanthohumol e 8-prenylnaringenin) hanno un effetto antiossidante e possiedono anche proprietà fitoestrogene in grado di contribuire alla chemio-prevenzione dei tumori e all'osteo-protezione. Secondo le ultime evidenze scientifiche, la birra, se assunta in quantità moderate, può fare bene al cuore e principalmente ai vasi sanguigni. Infatti, lo studio indica che il consumo di 15-30 g di

alcol al giorno è associato a un rischio relativo di mortalità per malattie cardiovascolari inferiore del 25% rispetto agli astenuti. Dall'altra parte, il consumo di circa 24 g di alcol al giorno può abbassare il rischio relativo di diabete di tipo II fino al 30% e migliorare il controllo glicemico nelle persone con diabete. Altri benefici connessi ad un consumo moderato, ma costante, di birra possono essere: migliorare il sistema immunitario, la salute delle ossa, delle articolazioni, aiutare a combattere alcuni tipi di cancro, diminuire il rischio di demenza e avere effetti antinfiammatori. C'è una convinzione diffusa che le bevande alcoliche, e la birra in particolare, portino ad un aumento di peso, soprattutto intorno all'addome. Le bevande alcoliche contengono certamente calorie, ma sembra che l'aumento di peso sia principalmente associato a livelli di assunzione più elevati. Il consumo moderato di alcol, in particolare nelle donne, non sembra essere associato all'aumento di peso (siti web: beerandhealth.eu; Barth-Haas Group, 2006).

Infine, un altro composto che rende la birra un alimento salutistico è sicuramente l'acido folico, una vitamina del gruppo B idrosolubile, molto importante per l'organismo umano. Partecipa al metabolismo dell'acido ribonucleico (RNA) ed acido desossiribonucleico (DNA), in particolar modo per la sintesi delle proteine, la formazione del sangue e la trasmissione delle caratteristiche ereditarie; è essenziale per il mantenimento della vita cellulare, per la crescita e la formazione di nuovi tessuti. La quantità di acido folico nella birra può variare da 1 a 10 µg/100 ml, a seconda della tipologia. L'assunzione giornaliera raccomandata varia tra i 180 e i 200 µg al giorno, pertanto un consumo moderato di birra copre tra il 10-15% il fabbisogno giornaliero di questa vitamina. Inoltre, le vitamine B6 e B12, insieme all'acido folico, intervengono in reazioni biochimiche dell'organismo che portano alla formazione di

cisteina. La carenza di queste vitamine non permette il completamento di tali reazioni, rilasciando nel sangue un intermedio, l'omocisteina. Un eccesso di omocisteina nel sangue risulta essere uno dei fattori di rischio cardiovascolare (Mayer et al., 2001).

1.1 LE MATERIE PRIME

La birra è una bevanda alcolica che si ottiene mediante un processo di fermentazione, grazie all'azione di lieviti responsabili della trasformazione degli zuccheri presenti nel mosto di birra in etanolo, anidride carbonica e altri composti secondari, importanti nella caratterizzazione del prodotto (Cabras et al., 2004).

Le materie prime utilizzate per la produzione di birra sono principalmente quattro:

- Acqua
- Orzo
- Luppolo
- Lievito

1.1.1 ACQUA

L'acqua in termini quantitativi rappresenta l'ingrediente predominante (costituisce circa il 90-95% del prodotto finito) e svolge un ruolo fondamentale nella caratterizzazione della birra. La tipologia di acqua da utilizzare per la produzione di birra dipende dalla natura della stessa, in relazione principalmente a quello che è il parametro più importante nel processo tecnologico, ovvero la durezza. La durezza dell'acqua è in grado di influenzare fortemente le caratteristiche sensoriali del prodotto

finito in quanto gli ioni in essa presenti andranno ad agire sul pH del mosto: gli ioni calcio (Ca^{2+}) e magnesio (Mg^{2+}) provocano un decremento del pH mentre lo ione bicarbonato (HCO_3^-) ne va a determinare un aumento. Il pH a sua volta interferisce sull'attività degli enzimi del malto (Buiatti, S. 2004). Se è troppo basico è necessaria la filtrazione del mosto, con resa in estratto meno efficiente, più lenta idrolisi di amido e proteine, minore concentrazione di FAN (Free Amino Nitrogen) e azoto solubile. Mentre, valori di pH elevati favoriscono l'estrazione dei polifenoli dal malto, nello specifico i tannini, con effetti negativi a livello organolettico. Il valore di pH ottimale del mosto, consigliato durante l'ammontamento, è di circa 5.2-5.4, in quanto un pH basso fa aumentare la stabilità del prodotto e la sua resistenza a contaminazioni microbiche. Durante la fermentazione tale valore tende a diminuire raggiungendo valori intorno a 4.2-4.5. Se da un'analisi della durezza l'acqua dovesse risultare non idonea per il processo tecnologico, è possibile sottoporre la stessa ad una serie di trattamenti volti a modificarne la composizione (Briggs et al., 2004; Daniels, 2000; Krottenthaler & Glas, 2009; Fajner, 2010; Gresser, 2010).

1.1.2 ORZO



Figura 1 - Orzo distico per malto da birra

I cereali sono piante erbacee, appartenenti alla famiglia delle *Graminacee*, che, partendo dall'acqua e dall'anidride carbonica presente nell'atmosfera, sono in grado di sintetizzare amido, il quale viene stoccato all'interno delle cariossidi. I cereali sono uno degli alimenti più importanti, dal momento che forniscono il 50% del fabbisogno giornaliero di carboidrati, il 30% delle proteine e il 50% della vitamina B, oltre a Sali minerali e oligoelementi. Al giorno d'oggi, quelli più comunemente coltivati sono frumento, orzo, riso, mais, segale e sorgo. La composizione e le proprietà nutrizionali dei cereali sono simili; sono composti principalmente da carboidrati (amido, zuccheri semplici), fibre grezze (cellulosa ed emicellulosa), proteine (5-15%) e quantità minori di grassi e polisaccaridi non amidacei. La fonte principale di carboidrati è ovviamente l'amido, a sua volta presente come amilosio (ca. 25% dell'amido totale) e amilopectina (ca. 75%), che i lieviti utilizzano durante la fermentazione. Il cereale più utilizzato per la produzione della birra è l'orzo, in quanto molto ricco di amido, di enzimi e poiché

dotato di glumella (scorza) che lo protegge durante la lavorazione. In ambito brassicolo vengono utilizzate tre varietà di orzo: orzo distico, orzo tetrastico ed orzo esastico. La scelta della tipologia da impiegare nella produzione della birra è influenzata dal contenuto proteico; più proteine significa più enzimi, migliore schiuma, miglior corpo, migliore capacità di attacco dell'amido, aumentata efficienza del lievito. Parallelamente a questi aspetti positivi bisogna dire, però, che un eccessivo contenuto di proteine potrebbe portare a problemi quali eccessiva torbidità, fenomeni di imbrunimento ed instabilità del prodotto finale. Le proteine dell'orzo si suddividono in 4 gruppi: prolamine (37%), gluteline (30%), globuline (15%) e albumine (11%). Le prolamine sono degradate dagli enzimi durante la maltizzazione e l'ammestamento, trasformandosi in polipeptidi e amminoacidi liberi, utilizzati dai lieviti; le globuline qualora solubilizzino sono responsabili di intorbidimenti, mentre le albumine, le più solubili, sono soggette anch'esse a degradazione enzimatica. Altri parametri qualitativi che devono essere considerati per la scelta dell'orzo sono: calibro, omogeneità delle cariossidi, resistenza alle fitopatie e rapido assorbimento dell'acqua. Molto importante è l'umidità del seme, che può variare dal 12% al 20% durante la raccolta, ma nello stoccaggio non deve superare il 15% (Cabras et al., 2004). La varietà maggiormente utilizzata è rappresentata dall'orzo distico perché, oltre che un adeguato contenuto proteico ed una maggiore produzione di α - e β -amilasi durante la germinazione (Sunier, 1988), possedendo dimensioni maggiori garantiscono un maggior apporto di amido e una minore probabilità di estrarre sostanze tanniche indesiderate con minor astringenza e minor intorbidimento a livello del prodotto finito.

1.1.3 LUPPOLO



Figura 2 - Humulus lupulus

Il luppolo (*Humulus lupulus*) è una pianta rampicante dioica appartenente alla famiglia delle *Cannabaceae*. Nella maggior parte dei casi il luppolo viene coltivato in forma di pianta femminile non fecondata dal momento che è solo quest'ultima ad avere le caratteristiche ideali per il processo di produzione della birra. Fiorisce tra giugno e settembre e i coni di luppolo sono pronti ad essere raccolti quando iniziano ad assumere un colore giallastro, consistenza cartacea, odore caratteristico e presentano tracce di polvere gialla, la cosiddetta luppolina; quest'ultima contiene principalmente resine, oli essenziali, tannini e terpeni, che fanno ottenere alla birra le sue proprietà amaricanti ed aromatizzanti (Zavatti M. & Zanolì P., 2006). Al momento della raccolta il luppolo si caratterizza per una elevata umidità (75-80% p/p) e per questo motivo è necessario essiccarlo fino al raggiungimento di un valore di umidità di circa il 10%; solo allora potrà essere considerato idoneo per il processo brassicolo. Le resine rappresentano la porzione più importante dal momento che circa il 90% dell'amaro

presente nella birra finita deriva proprio da questa componente ed in particolar modo dagli α -acidi i quali, durante la bollitura del mosto, vanno incontro ad una reazione di isomerizzazione con conseguente aumento del grado di solubilizzazione. Infatti, è importante sottolineare come gli α -acidi che si trovano all'interno della luppolina siano poco solubili nel mosto mentre i loro isomeri (iso α -acidi) lo sono molto di più. Oltre a questa componente abbiamo anche i β -acidi, per i quali può essere fatto lo stesso discorso dei primi; questi, tuttavia, contribuiscono in maniera molto limitata al processo di conferimento della sensazione di amaro in quanto isomerizzano regolarmente durante la bollitura ma, nonostante ciò, si solubilizzano male nel mosto. Le resine risultano essere importanti anche da un punto di vista tecnologico in quanto, insieme ai tannini, sono responsabili della stabilità della schiuma (Blanco et al., 2006). Se la birra viene esposta alla luce questa può assumere un sapore sgradevole, detto "gusto di luce" in quanto sono proprio gli iso α -acidi ad aggregarsi per fotosintesi ai composti solforati che si formano durante la fermentazione causando questo inconveniente. I tannini sono responsabili, durante la fermentazione del mosto, della precipitazione delle proteine, in particolare delle albumine e questo provoca la chiarificazione naturale della birra (Zasio et al., 1997). Anche gli oli essenziali rappresentano, nel luppolo, una componente molto importante: influenzano il gusto e l'aroma; nello specifico ne sono stati individuati più di trecento, la maggior parte dei quali di natura volatile. Da un'analisi qualitativa è emerso come questi composti possono essere utilizzati per l'identificazione delle differenti varietà di luppolo (Kovacevic & Kac, 2002). È possibile distinguere le varie tipologie di luppolo in tre principali varietà:

- luppoli “da amaro”: caratterizzati da un elevato contenuto in α -acidi (superiore al 8% del totale), vengono generalmente aggiunti durante le prime fasi della bollitura per ottimizzare la resa della reazione di isomerizzazione;
- luppoli “da aroma”: il contenuto di α -acidi è inferiore al 6% e vengono utilizzati nelle ultime fasi della bollitura del mosto in maniera tale da preservare la parte aromatica e volatile evitando perdite dovute ad un'eccessiva esposizione a temperature di ebollizione;
- luppoli ambivalenti: il contenuto di α -acidi varia tra il 6-8%, per cui abbiamo un buon compromesso in termini di potere amaricante e contenuto di oli essenziali.

1.1.4 LIEVITO

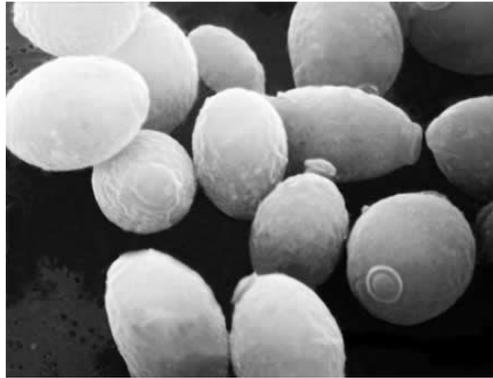


Figura 3 - Cellule di *Saccharomyces cerevisiae* osservate al microscopio elettronico.

Il lievito è un microrganismo eucariote unicellulare appartenente al regno dei funghi, il quale è in grado di respirare e/o fermentare a seconda delle proprie caratteristiche e delle condizioni ambientali entro le quali si ritrova riproducendosi essenzialmente per gemmazione. Il compito principale del lievito è quello di attivare il processo fermentativo, ovvero una serie di reazioni chimiche che, partendo dal glucosio, permettono di ottenere etanolo e anidride carbonica con il rilascio di una determinata aliquota di energia (fermentazione alcolica). Naturalmente il substrato in cui avviene questo processo è rappresentato dal mosto di birra nel quale etanolo e anidride carbonica sono i principali prodotti finali presenti; l'attività metabolica del lievito, inoltre, permette di ottenere una serie di metaboliti secondari, come ad esempio chetoni, alcoli superiori, esteri e aldeidi, che andranno ad arricchire e a caratterizzare

il profilo sensoriale della birra. Le specie di lievito impiegate nell'industria brassicola sono *S. cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, per la produzione rispettivamente di birra "Ale" e "Lager" (Tenge, 2009). *S. cerevisiae* (top yeast) ha uno sviluppo ottimale tra i 15-25 °C ed è impiegato per la produzione di birre definite ad alta fermentazione. Dopo aver esaurito la propria attività metabolica tenderà a finire sulla superficie grazie alla capacità che questi lieviti hanno di dar luogo a strutture più o meno complesse (costituite da più cellule di lievito legate tra loro) che risalgono sotto l'impulso dell'anidride carbonica formata. La bassa fermentazione si caratterizza invece per l'impiego di *S. pastorianus* (bottom yeast) il cui optimum d'azione è compreso tra i 6-10 °C. A differenza dei primi, questi lieviti al termine della fermentazione tendono a flocculare sul fondo una volta esauritasi l'attività metabolica, ma anche durante tutte le fasi del processo fermentativo stesso (Speers et al., 1992; Verstrepen et al., 2003). Le differenze riguardanti questi due lieviti non sono solo legate alla temperatura di fermentazione, ma anche al loro diverso comportamento metabolico. I lieviti lager, ad esempio, possiedono delle permeasi che permettono l'assimilazione del maltotriosio, che viene scisso poi in glucosio e metabolizzato. Alcuni lieviti ale, invece, possiedono delle α -glucosidasi extracellulari che degradano il maltotriosio, permettendone il metabolismo senza produrre etanolo, il che può dar vita a delle caratteristiche non desiderabili (Zheng, X. et al., 1994). Un'altra differenza è correlata alla produzione di composti metabolici rilasciati nella birra. I lieviti lager producono come metabolita di scarto il diacetile, un composto che conferisce alla birra un sapore sgradevole, tendente al rancido. Per questo motivo, al termine della fermentazione si effettua il cosiddetto diacetyl rest, un passaggio in cui la birra viene tenuta per alcune ore a temperature poco più alte (14-18°C) per permettere al lievito di riassorbire il diacetile (Eliodoro KP, et al. 2019). Circa il 90% delle birre prodotte al mondo sono a bassa

fermentazione, la restante parte sono ad alta fermentazione e, in maniera quasi trascurabile, a fermentazione spontanea, ottenute con lieviti naturalmente presenti nelle materie prime e nei luoghi di produzione (Lambic beer). Nella scelta della coltura starter da utilizzare bisogna considerare una serie di parametri come: la modalità di sviluppo (non flocculanti per *S. cerevisiae* o flocculanti per *S. pastorianus*), il potere fermentativo (capacità di fermentare gli zuccheri), stabilità genetica, osmotolleranza, tolleranza all'etanolo e produzione di alcoli superiori ed esteri (come abbiamo già detto importanti per le caratteristiche organolettiche del prodotto) (Comi G. & Manzano M., 2008).

1.2 PROCESSO PRODUTTIVO

Il processo produttivo della birra è rimasto sostanzialmente immutato nel corso dei secoli ma, ovviamente, alcuni aspetti sono mutati in relazione soprattutto alla natura delle attrezzature disponibili (in passato in legno ed oggi in acciaio), alla migliore termoregolazione di tini cottura/cantine ed a una maggiore attenzione alla sanitizzazione. L'intera procedura di produzione consiste in quattro fasi: la *maltizzazione*, basato sulla trasformazione dell'orzo, o di altri cereali eventualmente utilizzati, in malto; l' *ammontamento*, cioè estrazione e idrolisi dei componenti del malto ed eventualmente di altri cereali, seguita da separazione dei componenti non solubili e bollitura con luppolo o estratti di luppolo; la *fermentazione*, responsabile della trasformazione degli zuccheri in etanolo, anidride carbonica e composti

secondari; processi di *downstream*, (filtrazione, stabilizzazione, imbottigliamento, ecc.) che terminano con il prodotto pronto per il consumo (Linko et al., 1998).

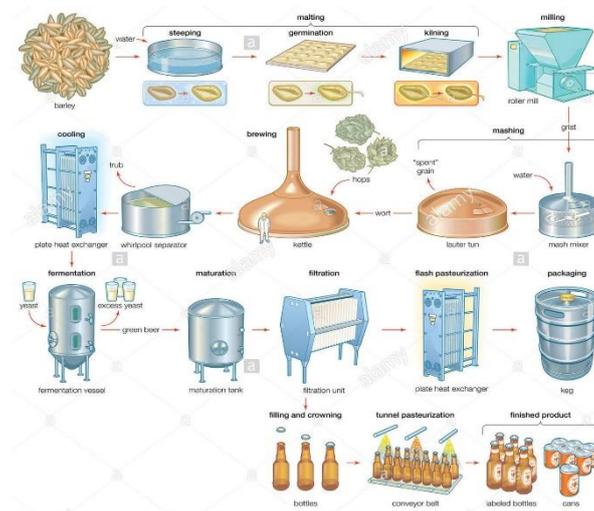


Figura 4- Fasi processo di produzione della birra.

1.2.1 MALTIZZAZIONE

Il processo di maltizzazione comprende in linea generale tre fasi principali: macerazione, germinazione ed essiccazione, grazie ai quali l'orzo viene trasformato in malto. Lo scopo principale di tale processo è essenzialmente di natura tecnologica: in primo luogo abbiamo un arricchimento del patrimonio enzimatico della cariosside soprattutto grazie alla produzione, nella stessa, di enzimi amilolitici (α – amilasi e β – amilasi) necessari per la saccarificazione dell'amido e di enzimi proteolitici (peptidasi e proteasi) grazie ai quali verranno poi processate le strutture proteiche. Inoltre, il corredo enzimatico del cereale può essere arricchito anche dalla presenza di enzimi come destrinasi, xilanasi, eso/endo – β – glucanasi e, infine, lipasi (Pepe, 2010).

Questo processo libera dall'amido gli zuccheri fermentescibili e altre sostanze, come amminoacidi e acidi grassi, indispensabili per la crescita del lievito (Harrison MA, 2009). Innanzitutto, l'orzo viene sottoposto a pulitura e vagliatura per eliminare gli eventuali corpi estranei. Segue la fase di macerazione: l'orzo viene messo a bagno in vasche cilindriche contenenti acqua a pH alcalino mantenuta ad una temperatura di circa 12 °C per due/tre giorni e poi lasciato germinare per sei/dieci giorni a 20 °C (Sicheri, 1983). Durante questo intervallo di tempo prende avvio il vero processo di germinazione, grazie al quale si assiste alla sintesi di ormoni di crescita, le gibberelline, responsabili della biosintesi di enzimi idrolitici quali amilasi, endoglucanasi e proteasi. Inizia quindi la degradazione enzimatica dell'amido, delle proteine e dei β -glucani. Il tutto dura circa una settimana, tempo necessario affinché il germoglio raggiunga i $\frac{3}{4}$ della lunghezza del seme. (Cantoni, 1990). Alla fine della germinazione si esegue un trattamento termico (essiccazione) per arrestare la germinazione e ridurre l'umidità del seme. Una volta terminato questo step, le cariossidi vengono poi tostate e cioè sottoposte ad un trattamento termico ad elevata temperatura, grazie al quale si possono ottenere differenti profili in termini di colore e aroma. Tempo e temperatura sono fondamentali per la tipologia di malto che si vuole preparare. In generale, per i malti chiari e/o base si utilizzano range di temperatura compresi tra 60 – 80 °C, mentre per i malti scuri e/o caratterizzanti si utilizzano temperature che possono arrivare anche a sfiorare i 200 °C, in maniera tale da stimolare l'imbrunimento non enzimatico delle cariossidi, le quali acquisiscono un colore più scuro e profili aromatici più decisivi (Pirova, M. 1973). Inoltre, il contenuto proteico delle cariossidi, e nello specifico il contenuto di albumina, influenza il colore del malto durante la torrefazione. Infatti, per birre chiare si usano cereali con il 9-12% di albumine, mentre per le birre scure, cereali con l'11-13% di albumine. Al termine dell'essiccazione, le cariossidi vengono liberate

dalle radichette, che altrimenti impartirebbero sapori anomali e causerebbero l'intorbidimento della birra. Il prodotto ottenuto costituisce il malto e contiene: 1,5-3% di umidità, 50-60% di amido, 10-12% di cellulosa e pectine e 8-9% di proteine.

1.2.2 AMMOSTAMENTO

L'ammostamento è un passaggio chiave nel processo di produzione della birra. Durante l'ammostamento avviene la degradazione enzimatica dei polisaccaridi presenti nel malto. I carboidrati fermentescibili sono prodotti dalla degradazione dell'amido polisaccaridico. Tali carboidrati vengono convertiti in alcol nella fase di fermentazione. Anche i polisaccaridi non amidacei, β -glucani e arabinossilani si degradano durante l'ammostamento in carboidrati a catena più piccola (GA Durand, 2009). Nella prima fase del processo di ammostamento si ha la macinazione del malto per ottenere la frammentazione dell'orzo maltato ed eventualmente di altri cereali. In tal modo si aumenta la superficie di contatto tra malto e acqua, favorendo la reidratazione e facilitando l'attacco da parte degli enzimi durante le fasi di ammostamento che seguono (Pires et al., 2015). La procedura consiste nel riscaldare la miscela fino a raggiungere temperature e pH ottimali per l'azione degli enzimi, raggiunte le quali si eseguono delle soste in momenti opportuni in modo tale che queste sostanze vengano idrolizzate (Montanari et al, 2005). Le classi di enzimi più importanti durante l'ammostamento sono essenzialmente due: enzimi proteolitici (peptidasi e proteasi) ed enzimi diastatici (α – amilasi e β – amilasi). Ma, oltre agli enzimi sopra citati, è possibile individuarne ulteriori; esempi sono rappresentati da fitasi e β -

glucanasi. Di seguito viene mostrata una tabella riassuntiva (Tabella 1) contenente le caratteristiche fondamentali dei principali enzimi attivi durante il processo di ammostamento.

Enzima	Optimum T	Optimum pH	Funzione
Fitasi	30-52 °C	4.4-5.5	Abbassa il pH del mosto
B-glucanasi	36-45 °C	4.5-5.0	Degradazione beta-glucani
Peptidasi	46-57 °C	4.6-5.2	Produzione FAN
Proteasi	46-57 °C	4.6-5.2	Degradazione proteine
b-amilasi	62-65 °C	5.4-5.6	Degradazione amido (zuccheri)
a-amilasi	72-75 °C	5.6-5.8	Degradazione amido (destrine)

Tabella 1- Valori di pH e temperatura ottimali per la massima attività enzimatica.

La prima sosta viene effettuata ad una temperatura di 37-45 °C. Tale temperatura sarà necessaria per degradare emicellulose e gomme. Nella seconda sosta la temperatura è di 45-52 °C. In questo range gli enzimi proteolitici lavorano al massimo per idrolizzare le proteine in peptidi a basso peso molecolare con successiva liberazione di amminoacidi in singola forma, andando così ad influenzare da un lato la formazione della schiuma e dall'altro l'attività dei lieviti, i quali potranno sfruttare gli amminoacidi per il loro metabolismo. La terza sosta (di circa 60-70 minuti) viene effettuata ad una temperatura di 58-63 °C, ideale per l'azione delle β -amilasi, che degradano l'amido a partire dall'estremità non riducente, staccando due unità di

glucosio alla volta e dando origine al maltosio, lo zucchero più abbondante nel mosto di birra. Una quarta sosta avviene ad una temperatura di 68-73 °C, in cui si registra una massima attività delle α -amilasi che degradano l'amido producendo soprattutto destrine, carboidrati a medio/basso peso molecolare non fermentescibili dal lievito *S. cerevisiae*, ma molto importanti per la corposità della birra. In conclusione, la temperatura viene portata a 78 °C per inattivare l'attività di tutti gli enzimi presenti. In aggiunta, però, possono essere effettuate delle soste a 36-45 °C per favorire l'azione delle fitasi e β -glucanasi. Le fitasi rompono la fitina (sale insolubile formato da fosfati del malto legati all'acido fitico) in fosfato di calcio o di magnesio ed acido citrico, favorendo l'acidificazione del mosto; le β -glucanasi degradano i β -glucani, responsabili di intorbidimenti e possono causare problemi di filtrazione per l'elevata viscosità che conferiscono al mosto (Home, 1993; Narziß, 1993; Bamforth, 1994).

In seguito, si effettua una filtrazione, per separare la parte solida (le trebbie) da quella liquida (il mosto). Le trebbie vengono essiccate e destinate ad altri usi (mangimi per animali). Il mosto filtrato è sottoposto a cottura in apposite caldaie, in rame, dove la temperatura viene gradualmente innalzata fino al raggiungimento dell'ebollizione. Il tempo di cottura varia da un'ora a due ore e mezza, a seconda del tipo di birra che si vuole produrre (Manzoni, 2006). L'operazione fondamentale che viene condotta durante la bollitura del mosto consiste nell'aggiunta del luppolo, un ingrediente dalle capacità aromatizzanti, amaricanti e batteriostatiche. Il luppolo può essere aggiunto a dosaggi ed in momenti differenti, in funzione delle caratteristiche che si vogliono ottenere nella birra finita. La quantità utilizzata può variare dai 2 ai 5 g/L, mentre le aggiunte vengono generalmente effettuate ad inizio bollitura, per conferire al prodotto l'amaro e nelle fasi finali per imprimere alla birra un determinato sapore e/o aroma in

funzione del tipo di luppolo utilizzato. Terminata la fase di cottura, si ha la separazione dei cosiddetti “trub a caldo” (complessi insolubili dovuti alla reazione tra polifenoli del malto e del luppolo e le proteine del malto) attraverso l’uso di centrifughe e di whirlpool; a questo punto il mosto (ad una temperatura di 95 °C) viene inviato ad uno scambiatore di calore per il raffreddamento. Quando la temperatura scende sotto i 60 °C si verifica un’ulteriore precipitazione, cioè il “trub a freddo”, derivante dalla degradazione di proteine e polifenoli. Tra i due tipi di trub vengono eliminati solo quelli a caldo in quanto l’allontanamento dei trub a freddo provocherebbe una attenuazione delle caratteristiche organolettiche della birra. A seconda del tipo di birra da produrre, a bassa o ad alta fermentazione, la temperatura viene fatta scendere fino a 10-20 °C (Cabras et al., 2004; Manzoni, 2006).

1.2.3 FERMENTAZIONE

Non appena il mosto viene trasferito all’interno del fermentatore, si procede con l’inoculo del lievito; prima di ciò, tuttavia, è necessario garantire un certo grado di ossigenazione del mosto in quanto, sebbene la fermentazione alcolica avvenga in anaerobiosi, il lievito necessita di una determinata quantità di ossigeno per sintetizzare componenti della propria membrana cellulare, come steroli e acidi grassi insaturi fondamentali per la loro crescita. La crescita ottimale dei lieviti richiede: apporto di nutrienti, inoculo corretto, ossigeno disciolto e temperatura adeguata. Il lievito utilizzato deve provenire da colture pure e selezionate, essere altamente vitale ed avere

una buona resistenza all'alcool (Lodolo, et al., 2008). Il lievito viene aggiunto direttamente nel fermentatore dopo essere stato opportunamente propagato (se in forma liquida) o reidratato (se si utilizzano lieviti secchi attivi) con un tasso di inoculo che può raggiungere $10^6 - 10^7$ cellule/ml.

La fermentazione del mosto di birra può essere suddivisa in due fasi, quali fermentazione primaria e fermentazione secondaria o maturazione. Nella fermentazione primaria, dalla durata di circa due settimane, si assiste principalmente alla metabolizzazione degli zuccheri con produzione di etanolo ed anidride carbonica; parallelamente, grazie all'attività del lievito, si avrà la produzione di composti secondari come alcoli superiori, esteri, acidi organici, aldeidi e chetoni. La fermentazione secondaria ha come obiettivo quello di completare la fermentazione degli zuccheri residui, rimuovere i composti indesiderati e affinare il gusto della birra (Willaert, 2007). In questa fase si assiste ad un graduale abbattimento della temperatura (fino a 0-2 °C per la bassa fermentazione e 7-10 °C per l'alta fermentazione), in maniera tale da migliorare la qualità del prodotto. Con la maturazione a freddo, infatti, si ottengono la saturazione dell'anidride carbonica (dovuta al metabolismo dei lieviti non allontanati al termine della fermentazione primaria), la chiarificazione naturale della birra grazie alla precipitazione dei complessi tanno-proteici e del lievito e il miglioramento del gusto dovuto all'attenuazione dell'amaro del luppolo e all'armonizzazione dei composti aromatici presenti (Cabras et al., 2004; Manzoni, 2006). I parametri che devono essere mantenuti costanti durante la fase di fermentazione, affinché ci sia una adeguata crescita dei lieviti, sono sicuramente la temperatura, l'umidità e il pH. Il pH deve passare da un valore di 5.2-5.3 del mosto ad un valore di circa 4.1-4.2 a fermentazione

ultimata. Tale acidificazione serve a preservare il prodotto finale e inibire la crescita batterica (Harrison MA, 2009).

1.2.4 DOWNSTREAM

La birra, una volta maturata, può essere sottoposta ad ulteriori step. In molte birre vengono aggiunte, ad esempio, delle proteasi per evitare la comparsa di torbidità, soprattutto se mantenuta in ambienti refrigerati. Inoltre, le birre possono subire anche step di chiarificazione e filtrazione. Si può aggiungere diossido di carbonio direttamente al prodotto in modo tale che l'anidride carbonica risulti intorno allo 0,45-0,52%, oppure si può aggiungere un lievito fresco in grado di condurre una naturale fermentazione secondaria. Un'ulteriore processo a cui viene sottoposta la birra è la pastorizzazione, utile per inattivare gli enzimi e i microrganismi eventualmente presenti, incrementando la sua stabilità. La pastorizzazione può avvenire o per "flash" (a 71-75°C per 15-30 secondi) attraverso l'utilizzo di uno scambiatore di calore, o a "freddo per non perdere il caratteristico flavour dovuto al calore stesso. In passato la pastorizzazione veniva condotta "in tunnel" o al calore, dove l'acqua calda a pioggia riscaldava le bottiglie e/o le lattine fino a raggiungere i 62°C per 20 minuti. Tuttavia, il surriscaldamento generato incideva negativamente sul flavour della birra.

Le birre pastorizzate hanno una shelf-life superiore ai tre mesi, mentre le birre non pastorizzate hanno una shelf-life di circa un mese e devono essere mantenute refrigerate per preservarne la massima qualità (Harrison MA, 2009).

1.3 BIRRA ARTIGIANALE

In Italia lo sviluppo della birra artigianale ha avuto luogo a partire dalla metà degli anni '90, grazie a diversi fattori quali le migliori tecnologie produttive, una maggiore semplificazione normativa, ma in particolar modo anche un diverso approccio dei consumatori, i quali richiedono un prodotto sempre più differenziato. La nascita dei micro-birrifici in Italia si fa risalire al 1996. Nel luglio 2016, dopo vent'anni di storia di birra artigianale, quest'ultima viene definita dalla legge.

L.n°154/2016 articolo 35 modifica della legge 1354/192 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».

La produzione di birra artigianale è contraddistinta da una serie di caratteristiche, quali assenza di pastorizzazione e di filtrazione, nessun utilizzo di anidride carbonica esogena, lieve carbonatazione in bottiglia, assenza di coloranti e conservanti. Sebbene la filtrazione garantisca una migliore stabilità chimico-fisica del prodotto e la

pastorizzazione, invece, una stabilità biologica, garantendo una lunga conservazione, questo va a scapito del sapore e dell'aroma della birra. Infatti, una birra artigianale non pastorizzata (definita cruda) contiene lieviti al suo interno e, pertanto, è un prodotto in continua evoluzione, a differenza della birra industriale, il cui gusto non evolverà mai. Le birre artigianali sono, inoltre, caratterizzate da una fase di rifermentazione in bottiglia, che avviene dopo l'aggiunta di zucchero (5.5 g/L) e il re-inoculo del lievito starter. È stato dimostrato che utilizzando specifici ceppi di *S. cerevisiae* il profilo aromatico della birra viene considerevolmente influenzato. Infatti, in seguito al processo di rifermentazione in bottiglia, si è ottenuto un incremento dei composti volativi responsabili del bioflavour distintivo delle birre artigianali (isoamil acetato, etil ottanoato, etil dodecanoato, fenil etil acetato, beta-feniletanolo) (Vanderhaegen et al., 2003; Canonico et al., 2014).

Il settore della birra artigianale in Italia è costantemente in ascesa, tanto che si è passati da circa 175 strutture nel 2007 (Unionbirrai, 2011) a 1857 attuali. Di queste ci risultano con cessata produzione 317 imprese, quindi le aziende attive sarebbero 1540. Gli impianti operativi (birrifici + brewpub) sarebbero 1006. Quindi, nonostante il difficile anno 2020, il numero di aziende attive è stato superiore a quello degli anni precedenti (sito web: www.microbirrifici.org).

1.4 LIEVITI NON-SACCHAROMYCES

La qualità della birra, come abbiamo detto in precedenza, dipende dall'attività dei lieviti in fermentazione, non solo per la loro efficienza/resa di fermentazione, ma anche per la loro influenza sull'aroma della birra stessa. Infatti, la maggior parte dei composti aromatici sono metaboliti intermedi e sottoprodotti del metabolismo del lievito.

Grazie ai molti progressi ottenuti nell'ambito della produzione di birra, più sfide sorgono ogni anno nella ricerca di nuovi approcci per lo sviluppo di bevande distinte. I tentativi di ottenere prodotti con caratteristiche sensoriali più complesse hanno portato esperti e birrai alla ricerca di lieviti non-convenzionali, cioè non-*Saccharomyces*, capaci di offrire una nuova prospettiva in termini di tecniche e approcci (Basso et al., 2016). I lieviti non convenzionali hanno generalmente prestazioni inferiori per la produzione di etanolo e sono associati a problemi di torbidità, filtrabilità, viscosità, aromi fenolici (POF) e ad altri cambiamenti del profilo aromatico della birra. Per tali ragioni vengono usati raramente come starter, ma più frequentemente in co-fermentazione con *S. cerevisiae* (Angela Capece et al., 2018) Le principali specie di lieviti non-*Saccharomyces* studiate per una loro applicazione a processi brassicoli sono: *Torulaspora delbrueckii*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia kluyveri*, *Cyberlindnera saturnus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces subpelliculosus*, *Wickerhamomyces anomalus*. Tali specie si sono rivelate interessanti non solo per una particolare impronta aromatica data al prodotto finito, ma anche per la produzione di birre speciali, come birre a basso contenuto alcolico e/o nullo, a basso contenuto calorico, gluten free e birre funzionali (Basso et al., 2016).

1.5 PROBIOTICI

Negli ultimi anni un numero crescente di consumatori ha adottato il concetto di “health/functional food” (Kim, J.Y et al, 2019), cioè utilizzare il cibo per gestire e controllare la propria salute. Infatti, diverse industrie si stanno concentrando sulla produzione di alimenti funzionali, tra cui quelli arricchiti con microrganismi probiotici. Secondo FAO e OMS, i probiotici sono definiti come microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute dell’ospite (FAO/ WHO, 2002; Hill et al., 2014). Tra i vantaggi riguardanti i microrganismi probiotici, la modulazione del microbiota intestinale si è rilevata fondamentale, poiché la disbiosi intestinale è un fattore scatenante per numerose malattie associate al microbioma e disordini metabolici. La maggior parte dei microrganismi probiotici sono batteri, mentre *S. cerevisiae* var *boulardii* (sinonimo di *S. boulardii*) è l’unico lievito ampiamente utilizzato come probiotico e spesso commercializzato come integratore alimentare (McFarland, 2010). *S. cerevisiae* var *boulardii* possiede molte proprietà che lo rendono un potenziale agente probiotico, ovvero la sopravvivenza alla temperatura corporea (37 °C), la resistenza agli acidi dello stomaco e agli acidi biliari e la sopravvivenza all’ambiente competitivo del tratto intestinale (Czerucka et al., 2007; McFarland, 2010; Kelesidis e Pothoulakis, 2012). Il lievito rappresenta una buona alternativa ai batteri probiotici poiché è immune all’effetto antibiotico, riducendo così l’uso di antibiotici e lo sviluppo di antibiotico-resistenze. Queste ragioni hanno portato gli esperti a concentrare la loro attenzione sulla ricerca di altri generi di lievito con tali caratteristiche probiotiche, come: *Torulaspora*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Kazachstania*,

Metschnikowia, Pichia, Hanseniaspora, Saccharomyces, Rhodotorula, Brettanomyces, e Lachancea.

Una novità assoluta in ambito brassicolo è rappresentata dalla birra probiotica, un esempio di health/functional food, ottenuta incorporando lieviti dalle caratteristiche probiotiche. È stato dimostrato che alimenti e bevande con conteggi vivi di probiotici siano più efficienti nel fornire effetti benefici sulla salute rispetto ad altri con probiotici inattivi. A tal fine, la birra artigianale costituisce un elemento innovativo, poiché non essendo soggetta a pastorizzazione e filtrazione, permette la sopravvivenza degli agenti probiotici (McFarland, 2010).

1.6 CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA

La birra è un prodotto estremamente complesso e il suo sapore è una miscela di componenti volatili e non volatili. Alcune di queste provengono dalle materie prime (come orzo, luppolo, tostatura del malto e del mosto bollente), mentre altre componenti aromatiche si formano durante il processo di fermentazione, come sottoprodotti del metabolismo del lievito, dalle contaminazione microbiche e dagli effetti dell'ossigeno e della luce solare durante la conservazione del prodotto (Kobayashi M. et al., 2008). I composti volatili che sono stati identificati nelle birre appartengono a diversi gruppi chimici quali: alcoli superiori, esteri, aldeidi, terpeni, monoterpeni, chetoni, idrocarburi e acidi organici (Rossi et al., 2013). Di seguito un elenco dei gusti di birra associati a vari composti (Tabella 2).

Gruppi chimici	Composti volatili	Aroma/sapore	Concentrazione (mg/L)
Alcoli superiori	Propanolo	Alcolico/solvente	600 mg/L
	Alcol amilico	Alcolico/solvente	50-70 mg/L
	Alcol isoamilico	Banana, dolciastro	50-65 mg/L
	2-feniletanolo	Fruttato, dolce	50-65 mg/L
	Isobutanolo	Solvente	100 mg/L
Esteri	Etil acetato	Solvente, fruttato	33mg/L
	Isoamil acetato	Banana	1,6mg/L
	Fenietil acetato	Rosa, mele, miele	3,8 mg/L
	Etil esanoato	Mele, anice	0,23mg/L
	Etil ottanoato	Mele	0,9mg/L
Aldeidi e chetoni	Acetaldeide	Mela verde, burro	10 mg/L
	Diacetile	Burro	0,1-0,15mg/L
Acidi organici	Acido acetico	Aceto	175mg/L
	Acido laurico	Detergente	6,1 mg/L
	Acido ossalico	Ossidato, salato	500mg/L
	Acido citrico	Acido, aspro	400mg/L
	Acido lattico	Acido, aspro	400mg/L
	Acido piruvico	Foraggio	300mg/L
Composti fenolici	4-vinil guaiacolo	Garofano, amaro	0,3mg/L
	4-vinil fenolo	Affumicato	0,2mg/L
Alcoli monoterpenici	Linalolo	Lavanda	5 µg/L
	α-terpineolo	Lillà	2 µg/L
	β-citronellolo	Limone, lime	8 µg/L

Tabella 2- Principali composti volatili e loro valori soglia (Michel et al., 2016).

1.6.1 ALCOLI SUPERIORI

Oltre al principale componente alcolico, l'etanolo, attraverso il metabolismo dei lieviti, si producono anche alcoli superiori che contribuiscono in modo significativo al sapore della birra. Gli alcoli superiori possono apportare aromi floreali, fruttati o erbacei a seconda dei loro effetti sinergici con altri composti aromatici attivi. Gli alcoli superiori più importanti nella birra includono n-propanolo, isobutanolo, alcoli isoamilici (2-metil butanolo e 3-metil butanolo) e 2-feniletanolo (Pires, E. et al., 2014). Questi vengono prodotti in coincidenza con l'arresto della crescita cellulare. La loro formazione può avvenire per via catabolica degli aminoacidi dei mosti e/o per via anabolica a partire dagli aminoacidi sintetizzati dai lieviti stessi. L' n-propanolo, derivante dal catabolismo della valina, ha un valore soglia di percezione di circa 600 mg/L e conferisce alla birra una nota di durezza. Anche l'isobutanolo deriva dal metabolismo della valina e se presente in quantità superiore al 20% rispetto alla somma di n-propanolo, alcoli isoamilici e isobutanolo, ha un effetto negativo sulla qualità della birra (Kobayashi et al., 2006). Gli alcoli isoamilici e il 2-feniletanolo sono importanti nel dare una nota fruttata alla birra; rispettivamente una nota di banana con una soglia di percezione di 50-65 mg/L e una nota dolce e di rosa con una soglia di 40 mg/L (Meilgaard, MC, 1975). Circa l'80% di alcoli superiori si forma durante la fermentazione primaria. La loro concentrazione è ceppo specifica in quanto fortemente influenzata dall'attività delle permeasi, enzimi coinvolti nel regolare l'assorbimento degli aminoacidi. Di conseguenza anche la composizione aminoacidica del mosto in fase di fermentazione influenza la sintesi di tali composti (Rossi et al., 2013). Inoltre, altri fattori possono contribuire alla concentrazione finale di alcoli superiori e sono: la

temperatura, il grado Plato del mosto (>13 °P), l'aerazione del sistema e la quantità di lieviti inoculati.

1.6.2 ESTERI

Durante la fermentazione alcolica, una notevole quantità di esteri può essere prodotta a seguito del metabolismo dei lieviti. Gli esteri sono uno dei composti più volatili nella birra, per cui hanno un grande impatto sul suo aroma. In quantità moderate, possono aggiungere un carattere piacevole e corposo alla birra, riconducibili genericamente alla frutta. Tuttavia, quando sono presenti in eccesso, conferiscono un aroma alla birra eccessivamente fruttato, considerata indefinibile dalla maggior parte dei consumatori. La produzione di esteri viene stimolata dalle alte temperature di fermentazione, in particolare durante i primi giorni di crescita esponenziale delle cellule di lievito, quando l'attività metabolica è al picco. Esistono due gruppi principali di esteri volatili nelle bevande fermentate: esteri acetati ed esteri etilici di acidi grassi a catena media. Gli esteri dell'acetato sono sintetizzati da alcoli superiori (o etanolo) con acido acetico e hanno la più alta concentrazione di esteri attivi nella birra. I più importanti di questi esteri sono l'acetato di etile (aroma di solvente con una soglia di 33 mg/L), l'acetato di isoamile (aroma di banana con una soglia di 1.6 mg/L), l'acetato di isobutile (aroma fruttato e dolce con una soglia di 1.6 mg/L) e, infine, feniletil acetato (aroma di rosa, mela e miele con una soglia di 3.8 mg/L). Si ritiene che gli esteri dell'acetato siano sintetizzati da un enzima chiamato alcol acetil trasferasi (AAT) che utilizza come substrati un alcol e il coenzima A. Tuttavia, gli esteri possono essere sintetizzati anche dagli enzimi esterasi, che lavorano in senso inverso (Peddie, H. A. B., 1990). Il secondo gruppo è rappresentato, come abbiamo detto in precedenza, da esteri etilici

(in cui il gruppo alcolico è l'etanolo e il gruppo acido è un acido grasso a catena media) e comprende etil esanoato, che produce un aroma di semi di anice e mela con una soglia di 0.23 mg/L ed etil ottanoato che produce, invece, un aroma di mela acida con una soglia di 0.9 mg/L (Michel et al., 2016; Pires et al., 2014). Quando queste concentrazioni superano il loro valore soglia, conferiscono alla birra un sapore indesiderato. Pertanto, è importante mantenere la concentrazione di esteri volatili nel prodotto finale al di sotto della loro soglia di gusto.

Il ruolo della produzione di esteri nel metabolismo del lievito non è chiaro, ma sono state suggerite diverse ipotesi. Alcuni ricercatori hanno suggerito che gli esteri potrebbero essere formati per rimuovere gli acidi grassi tossici dalla cellula del lievito (Nordsstrom K. Et al., 1964), mentre altri sostengono che gli esteri potrebbero essere semplicemente prodotti di fuoriuscita dal metabolismo dello zucchero del lievito durante la fermentazione e non essere di alcun vantaggio per il lievito stesso (Peddie, H. A. B., 1990).

1.6.3 COMPOSTI CARBONILICI

Le categorie di composti carbonilici presenti nella birra sono aldeidi e chetoni. L'acetaldeide è la principale aldeide della birra, a causa della sua importanza come intermedio nella formazione di etanolo e acetato (Kobayashi, 2008). Le aldeidi si formano durante la preparazione del mosto (ebollizione), da processi come le reazione di Maillard, l'ossidazione dei lipidi e in funzione delle vie anaboliche e cataboliche per una maggiore formazione di alcol durante il processo di fermentazione.

L'acetaldeide conferisce alla birra un sapore erbaceo o di mela verde per lo più indesiderabile, con una soglia di concentrazione di 10 mg/L (Meilgaard, MC, 1975).

I chetoni svolgono un ruolo molto importante nel sapore della birra. Tra i chetoni, particolare attenzione va posta al dichetone vicinale 2,3 butanedione o diacetile. È un sottoprodotto dell'anabolismo degli aminoacidi della valina, formato durante una reazione in quattro fasi dal glucosio. Il diacetile aggiunge un sapore burroso alla birra se si trova al di sopra della sua soglia di 0.1-0.15 mg/L. Il diacetile viene in seguito ripreso dal lievito durante la maturazione e ridotto a 2,3-butandiolo, che non ha un sapore indesiderato (Krogerus, K. 2013).

1.6.4 ACIDI ORGANICI

Gli acidi organici sono composti che possono influenzare notevolmente il sapore della birra e l'acidità totale finale (cioè il pH); derivano dal mosto e dal metabolismo microbico. Gli acidi organici possono essere suddivisi in due classi principali, che includono acidi volatili e non volatili (Rodrigues et al., 2010). Gli acidi organici a corta catena di carbonio derivano sia dall'incompleto ciclo degli acidi tricarbossilici sia dal catabolismo degli aminoacidi. Tali acidi (piruvato, acetato, lattico, succinato, citrato, malato) sono coinvolti nella riduzione del pH durante la fermentazione e conferiscono un sapore acido alla birra. Gli acidi grassi a catena media, liberati dall'anabolismo degli acidi grassi a lunga catena e dalla lisi cellulare, risultano tossici per i lieviti. Infine, gli acidi a lunga catena provengono essenzialmente dal mosto e sono considerati indesiderati per il sapore della birra e per la stabilità della schiuma. I principali acidi organici volatili presenti nella birra sono l'acido acetico, propionico,

isobutirrico, butirrico, isovalerico, valerico, caproico, caprilico, caprico e laurico. Se sono presenti in concentrazioni elevate contribuiscono ad un sapore amaro e salato alla birra, con un preoccupante off-flavour di formaggio e sudore. Quantitativamente, gli acidi volatili che influiscono maggiormente sul sapore sono acetico, caproico, laurico e caprico (Montanari et al., 1999). L'acido acetico, la molecola predominante nell'aceto, ha una soglia di 175 mg/L, mentre l'acido caprilico ha una soglia molto più bassa (<15 mg/L) ed è descritto come caprino. L'acido caprico è descritto come ceroso ad una soglia di 6,1 mg/L. Tali acidi se presenti in concentrazioni superiori a 6 mg/L possono conferire alla birra sapori di formaggio o di vecchio (Smogrovicova et al., 1999).

1.6.5 FENOLI

La maggior parte degli aromi che derivano dai fenoli prodotti dal lievito sono indicati come "aromi fenolici". Tuttavia, in alcune tipologie di birre questi sapori sono molto desiderati. Gli odori più comuni provenienti da queste sostanze includono aromi di chiodi di garofano, di affumicati, speziati e di bruciato (Thurston, P. 1986). La sintesi di tali composti dipende dalla specie di lievito e dalla presenza di precursori nel mosto. I precursori includono acidi fenolici con un'elevata soglia aromatica, come l'acido ferulico, cumarico e cinnamico, che provengono dal malto (Vanbeneden et al., 2008). I più comuni fenoli prodotti nelle birre fermentate con *S. cerevisiae* sono il 4-vinil guaiacolo e il 4-vinil fenolo, poiché possono eseguire solo la decarbossilazione degli acidi fenolici.

1.6.6 ALCOLI MONOTERPENI

Queste sostanze, che derivano dalle piante, contribuiscono al sapore della birra, vino e succhi con aromi altamente floreali. Nello specifico caso della birra questi composti derivano dal luppolo e cinque di queste sostanze sono presenti in concentrazioni notevoli. Gli alcoli monoterpenei fondamentali per il sapore della birra sono: linalolo (lavanda), α -terpineolo (lillà), β -citronellolo (limone, lime) geraniolo (rosa) e nerolo (agrumi e rosa) (Takoi, et al., 2010; Meilgaard, MC. 1975).

1.6.7 COMPOSTI SOLFORICI

I principali composti solforici prodotti dal lievito durante la fermentazione della birra includono anidride solforosa e acido solfidrico (Nagami et al., 1980). L'anidride solforosa svolge un ruolo molto importante nella stabilità del sapore, principalmente agendo come antiossidante nella birra finita per aumentare notevolmente la durata di conservazione. In confronto, l'acido solfidrico è un composto indesiderato perché riesce a mascherare molti altri aromi positivi della birra e può essere responsabile di un caratteristico odore di uova marce (Anderson, et al., 1974).

1.7 ALIMENTI PROTEICI SOSTITUTIVI

I legumi, come ceci, lenticchie e soia, rivestono un particolare interesse per la dieta mediterranea in quanto sono una fonte significativa di energia, proteine, fibre alimentari, vitamine, minerali e sostanze fitochimiche (isoflavoni) (Morteza, 2016). Il contenuto proteico nei chicchi di legumi varia dal 17 al 40%, in contrasto con il 7-13% dei cereali (Genovese e Lajolo, 2001). Le proteine dominanti presenti sono l'albumina e le globuline; circa il 70% delle proteine dei legumi è rappresentato dalle globuline (Tosh, S.M. et al., 2010).

Utilizzare fonti di amido (mais, orzo, grano e avena) in combinazione con fonti di proteine (ad esempio legumi, con una percentuale non superiore al 40%) si pensa che possa aumentare la qualità nutrizionale ed organolettica di prodotti quali dolci, bevande, condimenti e prodotti a base di carne. Le bevande ibride, contenenti proteine di cereali e di legumi, promettono una composizione amminoacidica bilanciata e un valore nutritivo potenziato di entrambe le fonti proteiche.

Il cece (*Cicerum arietinum*) è la terza leguminosa per produzione mondiale, dopo la soia e il fagiolo. I suoi semi sono usati nell'alimentazione umana come ottima fonte proteica. La coltivazione avviene principalmente in India e Australia. In Italia, invece, la coltivazione non è molto diffusa a causa delle basse rese e della scarsa richiesta. Questa pianta trova le sue condizioni ottimali di crescita in ambienti semiaridi. Anche la lenticchia (*Lens culinaris medik*) rappresenta un'importante fonte di proteine (25-30%). Viene coltivata principalmente in India, Canada e Turchia ed è relativamente tollerante alla siccità. L'Italia non è uno dei maggior paesi produttori in termini di

quantità, ma, nonostante ciò, vanta di una varietà di lenticchie eccellenti, come la lenticchia di Castelluccio di Norcia, di Colfiorito e di Altamura (Micioni Di Bonaventura et al., 2017).

CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni il mercato è sempre più orientato al consumo di prodotti orientati al benessere della salute. Anche il mercato delle birre artigianali sta ponendo grande attenzione alla richiesta dei consumatori, orientandosi verso lo sviluppo di prodotti innovativi e salutari come birre a basso contenuto calorico, a basso contenuto alcolico o analcoliche, gluten free e birre con proprietà benefiche per la salute umana (birre funzionali e/o probiotiche). La produzione di tali birre permetterebbe il consumo anche ad una fetta di popolazione che, per motivi sociali, etici o religiosi, non potrebbe o vorrebbe assumere alcolici. L'utilizzo di ceppi di lievito non-*Saccharomyces* risulta essere uno dei metodi più promettenti per la produzione di birre funzionali artigianali. Infatti, la birra artigianale non essendo pastorizzata né filtrata, permette di avere al suo interno lieviti vitali fino al tempo medio di conservazione (TMC), garantendo, da un lato, un prodotto finale di qualità e conferendo, dall'altro, la possibilità di usare lieviti con proprietà funzionali e/o probiotiche al consumatore. Il seguente lavoro di tesi, quindi, ha l'obiettivo di selezionare diversi ceppi di lievito non-convenzionali, con potenziali proprietà funzionali e/o probiotiche, al fine di produrre una birra artigianale con basso contenuto alcolico e nutriente. Inoltre, come ulteriore fonte di proteine sono stati aggiunti al mosto l'idrolizzato di lenticchia rossa e l'idrolizzato di cece.

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

3.1 CEPPI DI LIEVITO UTILIZZATI

I ceppi di lievito impiegati in questo studio sono stati precedentemente valutati per le loro caratteristiche probiotiche e funzionali, a seguito di tale valutazione sono stati utilizzati i ceppi con le migliori caratteristiche in ambito fermentativo (Tabella 3) (Agarbati et al., 2020).

Identificazione	Provenienza	Ceppi
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>var. boulardii</i>	Commerciale	Codex
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Commerciale	US05
<i>Kazachstania unispora</i>	Cantina Verdicchio	M3-B3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Saccharomyces paradoxus</i> o <i>Saccharomyces Bayanus</i>	Muschio su tronco di quercia	B6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cantina Verdicchio	10C
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Muschio su tronco di quercia	B13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Foglie di papaya (Cameroon)	2PV
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Succo di canna da zucchero (Cameroon)	C 7.4
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Cantina Verdicchio	1.1 t2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cantina Verdicchio	M1-3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Saccharomyces Bayanus</i>	Cantina Verdicchio	M1-7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cantina Verdicchio	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cantina Verdicchio	M2-3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cantina Verdicchio	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cantina Verdicchio	1PV

Tabella 3- Elenco ceppi di lievito impiegati nello studio.

I ceppi sono stati rinfrescati su terreno YPD agar, composto da estratto di lievito (10 g/L), agar (18 g/L), glucosio (20 g/L) e peptone (20 g/L). I ceppi sono stati, poi, conservati alla temperatura di 4 °C. Per la conservazione a lungo termine, invece, i ceppi sono stati crioconservati in terreno contenente glicerolo (80%) ad una temperatura di -80 °C.

3.2 MOSTO PILS

Il mosto PILS utilizzato in questo studio è stato prodotto presso Birra Dell'Eremo (Assisi, Italia) in un batch da 1500L. Il mosto è stato preparato con 100% malto PILS, luppolo Cascade, secondo il seguente schema: 53°C per 10 minuti, 67°C per 70 minuti, 76°C per 10 minuti e bollitura per 60 minuti. I caratteri analitici del mosto sono: pH 5.5, densità 12.3 °P e 20 IBU.

3.3 IDROLIZZATI DI LEGUMI

Sono stati preparati, per la prima prova, gli idrolizzati di due differenti substrati: cece e lenticchia rossa. In seguito, per la seconda prova, è stato preparato solo l'idrolizzato di lenticchia rossa.

Per l'ammestamento delle due farine è stato utilizzato lo stesso procedimento e gli enzimi impiegati sono i seguenti:

- Hitempase STXL, un' α -amilasi stabile al calore (*Bacillus licheniformis*) (Kerry Group, Tealee, Irlanda) che idrolizza in modo casuale i legami α -1,4-glicosidici nell'amilosio e nell'amilopectina determinando la produzione di destrine.

- 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.

Il tutto rappresenta un sistema enzimatico complesso, derivato da ceppi microbici selezionati e da specie vegetali. La miscela (composta da 700 ml di acqua per 300gr di farina) è stata riscaldata fino ad una temperatura di 45 °C, poi sono stati aggiunti 1,3 g/L di cloruro di calcio, 0,5 g/L di Hitempase e 0,5 g/L di Ondea Pro e messa ad incubare a 75 °C per un'ora. Successivamente è stato aggiunto l'enzima Bioferm (0,5 g/L) alla miscela, poi nuovamente incubata ad una temperatura più bassa (62 °C) per circa 3 ore. Infine, la sospensione è stata autoclavata e centrifugata, ottenendo così il mosto.

Figura 5- Idrolizzato di lenticchia rossa



3.4 ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI

3.4.1 FERMENTAZIONE MOSTO PILS E MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI CECE E LENTICCHIA ROSSA

Al fine di selezionare il substrato migliore, sono state allestite micro-fermentazioni a 18-20°C in beute da 250 ml con mosto pils e 100 ml di mosto pils addizionato con 20% idrolizzati di cece e lenticchia, provviste di valvole Müller contenenti acido solforico, così da permettere la fuoriuscita di CO₂ evitando la contaminazione del sistema. Le pre-culture sono state allestite in estratto di malto al 10% e lasciate incubare a 20°C per 48 ore. Le cellule, poi, sono state raccolte per centrifugazione (4000 rpm per 5 minuti), risospese in acqua sterile (1 ml) e si è proceduto all'inoculo del mosto con 10⁶ cell/ml (Figura 6 e 7).



Figura 6- *Micro-fermentazioni mosto pils*



Figura 7- *Micro-fermentazioni mosto pils addizionato di idrolizzato di cece e idrolizzato di lenticchia rossa.*

La cinetica di fermentazione è stata monitorata misurando la perdita di peso delle beute dovuta all'evoluzione di CO₂, che è stata seguita fino alla fine della fermentazione (peso costante per almeno 3 giorni consecutivi).

3.4.2 FERMENTAZIONE MOSTO PILS E MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI LENTICCHIA ROSSA

Il substrato migliore ed i ceppi che hanno mostrato le migliori performance fermentative sono stati selezionati per allestire fermentazioni a 18-20 °C in beute da 500 ml (Figura 8). Le pre-culture e il monitoraggio delle fermentazioni sono stati eseguiti come riportato nel paragrafo precedente.



Figura 8- Micro-fermentazioni su mosto pils e su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa

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 aggiungendo alla birra 5g/L di saccarosio durante la fase di imbottigliamento della stessa. Le bottiglie, opportunamente sigillate con tappi a corona, sono state mantenute a 18-20°C per 7-10 giorni e infine stoccate a 4°C. La birra risultante è stata successivamente analizzata mediante analisi sensoriale.



Figura 9- Fase di imbottigliamento della birra

3.5 ANALISI MICROBIOLOGICHE

3.5.1 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI

Il monitoraggio delle fermentazioni è stato eseguito per via gravimetrica, valutando giorno per giorno la perdita di peso, espressa come grammi di CO₂ svolta, fino al termine della fermentazione. La quantità di CO₂ prodotta è stata utilizzata per valutare l'attività fermentativa.

3.5.2 TERRENI DI COLTURA

Terreno di coltura utilizzato per il mantenimento e la conservazione dei lieviti è:

- YPD agar (Yeast extract- Peptone- Dextrose), costituito da:
 - Estratto di lievito (1%)
 - Peptone (2%)
 - Glucosio (2%)
 - Agar (1,8%)

3.6 ANALISI CHIMICHE

3.6.1 DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI

Per determinare la quantità degli zuccheri residui presenti nella birra a fine fermentazione, 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-fostato 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 (5ml, 0.4 mg/ml).

Una volta preparate le soluzioni, si effettua l'analisi seguendo il protocollo sottostante (Tabella 4).

Tabella 4 – Protocollo determinazione zuccheri residui

Pipettare in cuvetta	Bianco	Campione	Bianco	Campione
	Saccarosio + D-Glucosio	Saccarosio + D-Glucosio	D-Glucosio	D-glucosio
Soluzione 4 (β-fruttosidasi)	0,20 ml	0,20 ml	-	-
Campione	-	0,10 ml	-	0,10 ml
Incubare per 20 minuti.				
Poi aggiungere:				
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/G6PDH)	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Leggere l'assorbanza (A2) delle soluzioni a 340 nm dopo 5 minuti				

Per la determinazione del maltosio + saccarosio + D-glucosio si segue lo stesso protocollo riportato sopra in tabella, occorre però far uso della soluzione 5 contenente l'enzima α -glucosidasi.

Il maltosio viene idrolizzato dall' α -glucosidasi a pH 6.6 in due molecole di D-glucosio. Lo stesso enzima così come l'enzima β -fruttosidasi può idrolizzare il saccarosio in D-glucosio e D-fruttosio.

Lo D-glucosio viene, invece, fosforilato, a pH 7.6, dall'enzima esochinasi, in presenza di ATP, in glucosio-6-fosfato che, a sua volta, viene deidrogenato dall'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi in gluconato-6-fosfato.

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

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{campione}} - (A_2 - A_1)_{\text{bianco}}$$

Determinazione del saccarosio:

$$\Delta A_{\text{saccarosio}} = (\Delta A_{\text{saccarosio}} + \Delta A_{\text{D-glucosio}}) - (\Delta A_{\text{D-glucosio}})$$

Determinazione del maltosio:

$$\Delta A_{\text{maltosio}} = ((\Delta A_{\text{maltosio}} + \text{saccarosio} + \text{D-glucosio}) - \Delta A_{\text{D-glucosio}}) - \Delta A_{\text{saccarosio}}$$

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

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

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

3.6.2 DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE

Per la determinazione della concentrazione proteica presente nei campioni di birra, è stato utilizzato un saggio colorimetrico, il metodo di Lowry, il quale prevede l'utilizzo di due soluzioni: Lowry A e Lowry B. Si usa BSA come standard, costruendo un grafico della concentrazione in funzione dell'assorbanza e per mezzo del grafico si risale alla concentrazione dell'estratto proteico di interesse.

LOWRY A

- 13,5 ml di acqua distillata
- 100 μ l CuSO₄ 10%
- 2,5 ml Na₂CO₃ 20%
- 250 μ l Na₂K tartrato 8%
- 1 ml NaOH 4N
- 2,5 ml SDS 20%

LOWRY B – REATTIVO DI FOLING-CIOCÂLTEU

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

Una volta preparare le due miscele, 500 μ l di campione vengono poste in una cuvetta di metil acrilato in cui si aggiungono 500 μ l della soluzione di Lowry A e si attende 10 minuti. Dopodiché, vengono addizionati 250 μ l di reattivo di Folin-Ciocâlteu e si resta in attesa per altri 30 minuti. Si svilupperà una colorazione blu/porpora, l'intensità

del colore salirà all'aumentare del contenuto proteico. A seguire si effettua una misurazione dell'assorbanza allo spettrofotometro Shimadzu UV-1800 ad una lunghezza d'onda di 750 nm.

3.6.3 ALCOLI SUPERIORI

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

- Temperatura dell'iniettore a 150 °C;
- Colonna Zebron ZB-WAX Plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25 μm);
- Iniettore: split 10:2; iniettato 1 μl ;
- Temperatura: T iniziale 35°C per 4 minuti, poi un gradiente di 5°C/min fino a 200°C e isoterma di 200°C per 1 minuto;
- Gas vettore: Azoto.

Ogni composto contenuto nel campione fornisce un segnale (picco) che permette la sua identificazione sulla base del tempo impiegato per arrivare al rilevatore.

3.6.4 ETANOLO

Per la valutazione del contenuto di etanolo, i campioni devono essere preparati secondo la stessa procedura per l'analisi degli alcoli superiori, sostituendo però all'1-pentano il 3-metil-2-butanolo alla concentrazione di 10 mg/L. All'interno dello stesso gascromatografo utilizzato in precedenza, viene iniettato 1 µl di campione utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus, 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 µl);
- Iniettore: split 10:2; iniettato 1µl;
- Temperatura 40°C per 5 minuti, poi un gradiente di 5°C/min fino a 200°C e isoterma a 200°C per 1 minuto;
- Gas vettore: Azoto.

3.6.5 COMPONENTE VOLATILE

Per la valutazione della componente volatile, è stata utilizzata la tecnica di micro-estrazione in fase solida (SPME). La SPME è una tecnica che può essere eseguita secondo due tipologie: ad immersione diretta SPME (DI-SPME) o in spazio di testa SPME (HS-SPME). In questo studio l'analisi è stata eseguita secondo la tipologia della

tecnica SPME in spazio di testa (HS-SPME) utilizzando la fibra a tripla fase *divinilbenzene(DVB)/carboxen (CAR)/polidimetilsilossano (PDMS)* (Figura 10).



Figura 10 - Fibra a tripla fase *divinilbenzene (DVB)/carboxen (CAR)/polimetilsilossano (PDMS)*

Una piccola aliquota di fermentato (5 ml) viene degassato per mezzo di un agitatore meccanico, successivamente il campione viene posto in una vial con tappo di teflon, dove viene aggiunto 1,5 g di NaCl e posta in termostato a 50°C per 10 minuti. In seguito si aggiunge lo standard interno, che per la rilevazione della componente

volatile è il 3-ottanolo. Poi viene inserita la siringa attraverso il tappo e spinta la fibra. L'intero sistema viene posto il termostato a 50°C per 30 minuti.

Una volta preparata la fibra, è stata eseguita l'analisi mediante gascromatografia (GC). L'ago è stato inserito nella porta dell'iniettore del gascromatografo sempre con la fibra retratta; è stato premuto lo stantuffo, esponendo la fibra nella zona riscaldata dell'iniettore per desorbire gli analiti sulla colonna. Il tempo di esposizione della fibra nell'iniettore è di circa 5 minuti, per far in modo che tutti gli analiti avessero il tempo di essere desorbiti. Infine, la fibra è stata retratta in ago e l'ago rimosso. Le operazioni operative sono state le seguenti:

- Temperatura dell'iniettore/rilevatore: 250°C;
- Colonna capillare Superlcowax 10 (30 m, 0,25 mm id);
- Iniettore: spitless 60 sec.;
- Temperatura del forno: T iniziale 50°C per 5 minuti, poi un gradiente di 3°C/min e isoterma di 220°C per 20 minuti;
- Gas vettore: Azoto.

3.7 ANALISI SENSORIALE

Concluso il periodo di rifermentazione in bottiglia, le birre sono state sottoposte ad un'analisi sensoriale (metodo ANALYTICA-EBC 13.10/1997). Questa analisi prevede differenti fasi: l'esame visivo, che permette di valutare differenti aspetti della birra, quali il colore, la limpidezza e la schiuma. L'esame olfattivo consente di valutare i differenti aromi della birra, che possono essere aromi fruttati, floreali, tostati, agrumati, con note dolci o affumicate. Inoltre, questa analisi permette anche di

riconoscere eventuali difetti del prodotto, come aromi solforosi, burrosi o acetici. Infine, l'esame gustativo al fine di determinare l'acidità, la dolcezza, l'amaro, l'astringenza, la corposità e la resistenza olfattiva.

Ad un gruppo di sei assaggiatori è stato chiesto di esprimere un giudizio su ogni categoria sensoriale, utilizzando una scala da 1 a 10. I risultati sono stati poi sottoposti ad analisi statistica. I dati così elaborati sono stati utilizzati per costruire dei grafici che forniscono informazioni sia sul contributo di ciascun descrittore sulla qualità organolettica complessiva delle birre, sia sulle differenze significative tra le birre in relazione ad ogni descrittore.

CAPITOLO 4 - RISULTATI

4.1 FERMENTAZIONE MOSTO PILS E MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI CECE E LENTICCHIA ROSSA

I ceppi di lievito selezionati per questo studio sono stati valutati per le loro caratteristiche fermentative, funzionali e/o probiotiche (Agarbati et al., 2020) in fermentazione pura su mosto di birra pils e mosto pils addizionato con il 20% di idrolizzato di lenticchia rossa e cece.

4.1.1 MOSTO PILS

-VALUTAZIONE CINETICA FERMENTATIVA

La cinetica fermentativa delle prove testate su mosto pils, espressa come anidride carbonica liberata, è riportata in figura 11.

L'andamento fermentativo dei ceppi testati ha mostrato delle variazioni all'interno delle specie. Tra i ceppi non-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii* (C7.4 e 1.1t2) e *K. unispora* (M3B3) sono gli unici ceppi che hanno mostrato un andamento fermentativo più lento rispetto a tutte le altre prove, raggiungendo un quantitativo di CO₂ finale svolta molto basso, rispettivamente di 1.53 g, 1.68 g e 0.65 g. D'altra parte, tutti i ceppi *S. cerevisiae* testati hanno evidenziato un aumento significativo della velocità della cinetica di fermentazione su mosto pils. Infatti, la fermentazione che ha svolto il più alto quantitativo di CO₂ finale è quella condotta con *S. cerevisiae* 10C, con un valore pari a 6.025g, paragonabile all'andamento dello starter commerciale *S. cerevisiae*

US05. Il massimo valore di CO₂ svolta, in tutte le prove di fermentazione, è stata raggiunta intorno all'undicesimo giorno di fermentazione.

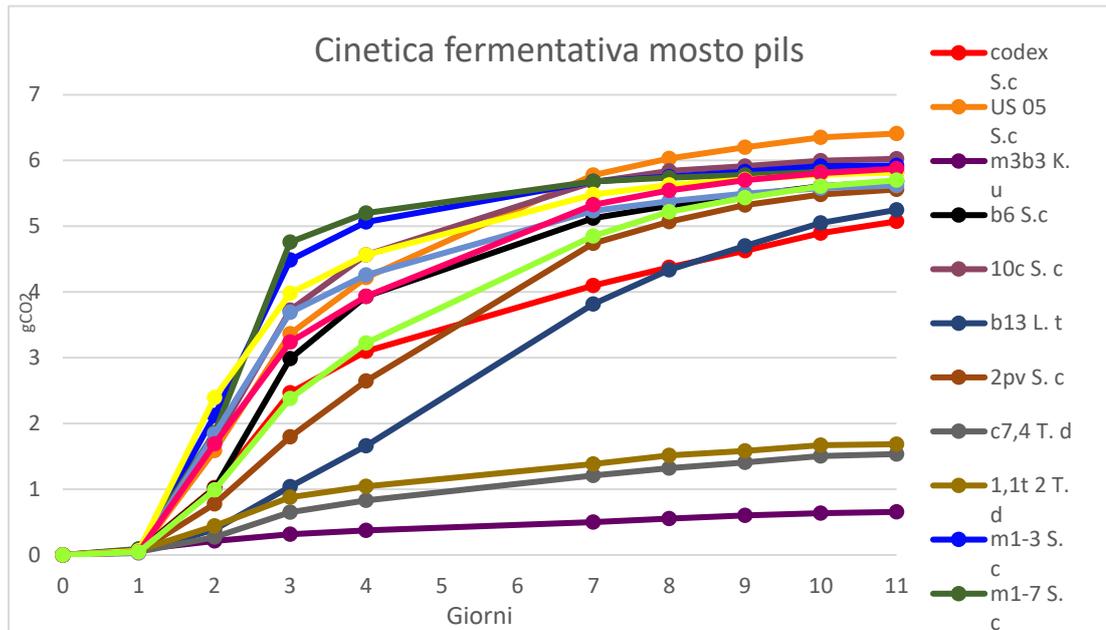


Figura 11- Cinetica fermentativa su mosto pils

- PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

I risultati relativi al contenuto di zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove ottenute su mosto pils sono riportati in tabella 5.

Dai risultati ottenuti emerge che tutte le fermentazioni hanno consumato tutto il glucosio e il saccarosio presente nel mosto, l'unica differenza riguarda il maltosio residuo. Infatti, tra i ceppi non-*Saccharomyces*, *K. unispora* (M3B3) è stato l'unico ceppo che ha mostrato una limitata capacità di metabolizzare il substrato, come

dimostrato dall'alto residuo di maltosio (44.7 g/L), ascrivibile al basso potere fermentativo esibito.

Come atteso, tutti i ceppi *S. cerevisiae* su mosto pils hanno mostrato un residuo di maltosio residuo inferiore.

Per il contenuto di proteine, il valore più alto è stato registrato dal ceppo *S. cerevisiae* 1PV (44.7 g/L), mentre nelle altre prove i valori risultano essere variabili tra 8-25 g/L, come mostrato in tabella 1.

Per quanto riguarda l'etanolo, tutte le fermentazioni mostrano valori inferiori 4% v/v, quindi a basso contenuto alcolico. Le tre fermentazioni che mostrano valori inferiori sono i ceppi di lievito che hanno esibito un basso potere fermentativo (*T. delbrueckii*: C7.4 e 1.1t2 e *K. unispora*).

CEPPI	ZUCCHERI residui (g/L)			PROTEINE (g/L)	ETANOLO % v/v
	Saccarosio	Glucosio	Maltosio		
<i>S. bouldarii</i> (CODEX)	0.001±0.00	0.011±0.005	3.63±0.077	22.8±2.02	3.30±0.33
<i>S. cerevisiae</i> (US05)	0.022±0.016	0.010±0.005	6.97±0.16	11.29±1.24	3.97±0.02
<i>K. unispora</i> (M3B3)	3.59±0.09	0.092±0.065	44.77±1.09	25.99±2.21	0.33 ±0.36
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S. paradoxus</i> o <i>S. bayanus</i> (B6)	0.009±0.001	0.011±0.008	3.84±0.07	21.37±1.26	3.36±0.15
<i>S. cerevisiae</i> (10C)	0.001±0.00	0.012±0.008	1.56±0.22	18.46±0.99	3.37±0.66
<i>L. thermotolerans</i> (B13)	0.017±0.009	0.005±0.002	11.67±0.50	19.7±0.25	3.14±0.58
<i>S. cerevisiae</i> (2PV)	0.001±0.00	0.104±0.008	4.98±0.64	8.69±0.98	3.10±0.09
<i>T. delbrueckii</i> (C7.4)	0.00±0.00	0.011±0.004	16.30±0.74	19.07±0.23	2.83±0.02
<i>T. delbrueckii</i> (1.1t2)	0.00±0.00	0.020±0.016	9.03±0.84	17.05±1.43	0.94±0.00
<i>S. cerevisiae</i> (M1-3)	0.041±0.010	0.010±0.008	0.14±0.16	25.99±2.14	3.25±0.03
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S.</i> <i>bayanus</i> (M1-7)	0.015±0.009	0.014±0.009	2.34±1.01	16.76±1.24	3.34±0.32
<i>S. cerevisiae</i> (7)	0.028±0.008	0.007±0.004	0±0	17.34±0.21	3.27±0.13
<i>S. cerevisiae</i> (M2-3)	0.005±0.002	0.005±0.002	6.61±0.87	21.09±0.85	3.32±0.09
<i>S. cerevisiae</i> (6)	0.004±0.003	0.010±0.008	3.98±0.20	15.61±b	3.08±0.09
<i>S. cerevisiae</i> (1PV)	0.018±0.009	0.011±0.008	11.31±0.73	44.72±0.96	3.71±0.12

Tabella 5- Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto pils.

Zuccheri iniziali e proteine mosto pils: saccarosio (6.4 g/L); glucosio (7.5 g/L); maltosio (55.73 g/L); proteine (10.42 g/L).

4.1.2 MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI CECE E LENTICCHIA ROSSA

-VALUTAZIONE CINETICA FERMENTATIVA

L'andamento fermentativo su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa è riportato in figura 12; quello su mosto pils addizionato di idrolizzato di cece è riportato in figura 13.

L. thermotolerans (B13) e *T. delbrueckii* (C7.4 e 1.1t2) hanno mostrato un aumento significativo delle prestazioni fermentative su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa, rispetto al mosto addizionato di idrolizzato di cece. Tutti i ceppi *S. cerevisiae*, invece, hanno esibito una ridotta performance fermentativa nei mosti addizionati di idrolizzato di legumi, rispetto al solo mosto pils.

K. unispora (M3B3) è l'unica prova fermentativa ad aver mostrato, in tutti i mosti, una cinetica molto bassa, con un quantitativo di CO₂ svolta inferiore a 1g.

In generale, tra i mosti arricchiti di legumi, il mosto addizionato di idrolizzato di cece mostra un tasso di fermentazione e una capacità di fermentazione inferiori.

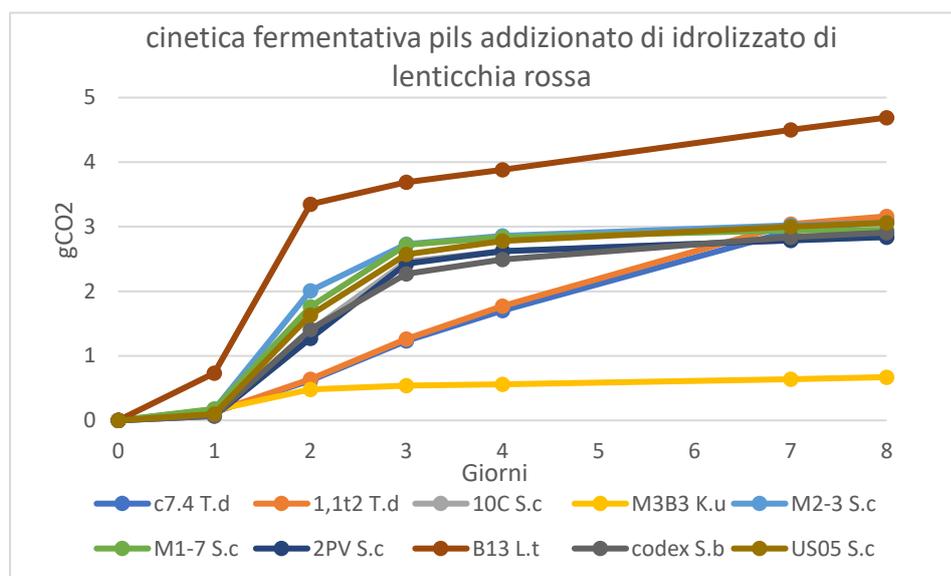


Figura 12- Cinetica fermentativa su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa.

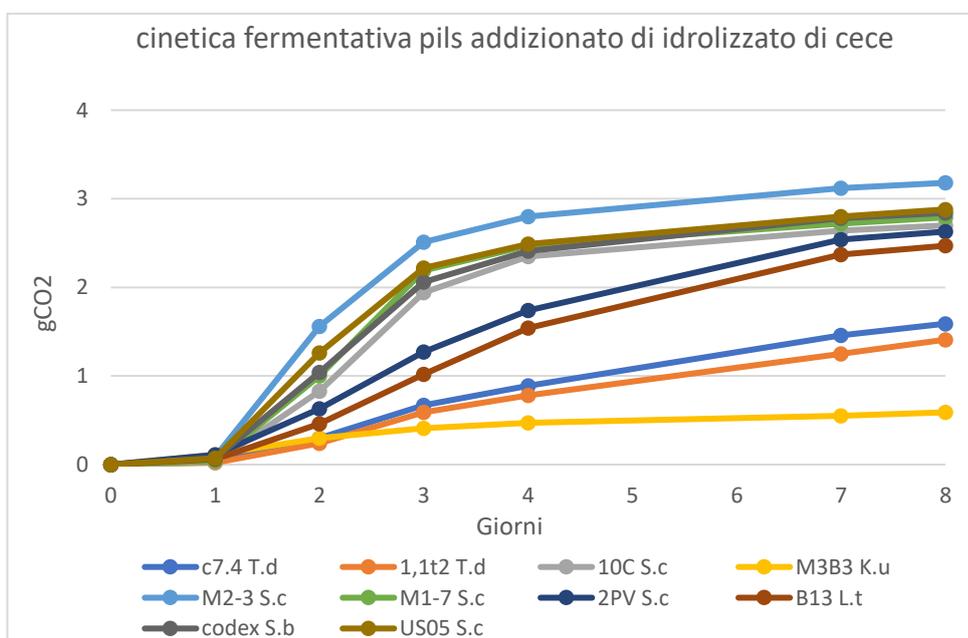


Figura 13- Cinetica fermentativa su mosto pils addizionato di idrolizzato di cece

-PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

I risultati relativi al contenuto di zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove ottenute su mosto pils addizionato di idrolizzato di cece e di lenticchia rossa sono riportati in tabella 6 e 7.

K. unispora (M3B3) ha mostrato, come atteso, una limitata capacità di metabolizzare il substrato, registrando il più alto contenuto di maltosio residuo: 58.6g/L su mosto pils addizionato di lenticchia rossa e 60g/L su mosto pils addizionato di cece. D'altra parte, tutti i ceppi di *S. cerevisiae* hanno mostrato un maltosio residuo inferiore in tutti i substrati rispetto alle specie non-*Saccharomyces*.

I risultati relativi al contenuto di proteine condotto su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa e di cece mostrano valori leggermente più alti rispetto alle birre ottenute dal solo mosto pils. Questo risultato è ascrivibile all'incremento della quota proteica totale, dovuto al fatto che sia la lenticchia sia il cece apportano di per sé un quantitativo di proteine che si è addizionato a quello del mosto e a quello liberato dal lievito durante la fermentazione.

L. thermotolerans (B13) ha mostrato un aumento significativo del contenuto proteico su mosto pils addizionato di lenticchia rossa rispetto agli altri due substrati testati.

I due ceppi *T. delbrueckii* (C7.4 e 1.1t2) hanno mostrato tassi di fermentazione simili, tuttavia la birra ottenuta da *T. delbrueckii* C7.4 ha esibito un maggiore contenuto proteico con il mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa rispetto a *T. delbrueckii* 1.1t2.

Per quanto riguarda l'etanolo, in tutte le prove sono stati registrati valori tra il 3-4.5% v/v, di poco superiore rispetto alle birre ottenute con il solo mosto pils.

CEPPI	ZUCCHERI residui (g/L)			PROTEINE (g/L)	ETANOLO % v/v
	Saccarosio	Glucosio	Maltosio		
<i>T. delbrueckii</i> C7.4	0.00±0.00	0.073±0.044	33.02±3.25	51.93±0.87	3.02±0.32
<i>T. delbrueckii</i> 1.1t2	0.001±0.00	0.064±0.04	21.03±1.58	34.35±1.25	2.06±0.11
<i>S. cerevisiae</i> 10C	0.002±0.001	0.035±0.022	14.30±2.36	49.33±1.25	3.44±0.14
<i>K. unispora</i> M3B3	4.29±1.59	0.086±0.050	63.21±2.14	29.73±2.36	0.52±0.06
<i>S. cerevisiae</i> M2-3	0.008±0.004	0.042±0.022	10.67±2.01	19.93±1.28	4.44±0.19
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S. bayanus</i> M1-7	0.00±0.00	0.044±0.019	5.19±1.06	27.72±2.33	3.9±0.36
<i>S. cerevisiae</i> 2PV	0.002±0.001	0.003±0.001	4.48±1.00	40.4±1.98	3.6±0.14
<i>L. thermotolerans</i> B13	0.028±0.012	0.030±0.015	13.02±2.01	38.38±0.30	3.72±0.14
<i>S. boulardii</i> CODEX	0.017±0.009	0.038±0.021	10.24±0.99	28.58±1.25	0.5±0.09
<i>S. cerevisiae</i> US05	0.005±0.002	0.038±0.016	5.97±1.36	25.73±1.52	3.59±0.21

Tabella 6 – Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto pils addizionato di idrolizzato di cece. Zuccheri iniziali e proteine mosto pils addizionato di idrolizzato di cece: Saccarosio (24.19 g/L); Glucosio (1.49 g/L); Maltosio (71.18 g/L); Proteine (22.24 g/L).

CEPPI	ZUCCHERI residui (g/L)			PROTEINE (g/L)	ETANOLO % v/v
	Saccarosio	Glucosio	Maltosio		
<i>T. delbrueckii</i> C7.4	0.00±0.00	0.086±0.04	24.23±2.4	54.81±0.59	3.89±0.26
<i>T. delbrueckii</i> I.1t2	0.012±0.008	0.077±0.04	23.06±1.58	41.84±1.98	2.61±0.21
<i>S. cerevisiae</i> 10C	0.00±0.00	0,095±0.060	3.77±0.69	46.16±1.78	4.22±0.36
<i>K. unispora</i> M3B3	4.83±0.59	0.004±0.002	58.65±1.75	39.53±2.25	0.7±0.02
<i>S. cerevisiae</i> M2-3	0.00±0.00	0.051±0.025	7.04±1.03	67.49±2.01	4.12±0.17
<i>S. cerevisiae/</i> <i>S. bayanus</i> M1-7	0.022±0.011	0.059±0.026	6.69±1.22	42.13±1.39	3.4±0.14
<i>S. cerevisiae</i> 2PV	0.00±0.00	0.070±0.035	10.46±1.98	41.84±2.04	3.84±0.32
<i>L. thermotolerans</i> B13	0.007±0.003	0.045±0.022	9.89±1.89	41.50±0.51	3.05±0.23
<i>S. boulardii</i> CODEX	0.014±0.007	0.061±0.028	4.62±0.87	42.42±3.24	4.05±0.28
<i>S. cerevisiae</i> US05	0.039±0.023	0.068±0.051	11.17±1.25	67.78±2.36	3.9±0.31

Tabella 7 – Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa. Zuccheri iniziali e proteine mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa: Saccarosio (34.82 g/L); Glucosio (11.24 g/L); Maltosio (88.26 g/L); Proteine (37.23 g/L).

4.1.3 ANALISI SENSORIALE

Le birre ottenute dai ceppi in coltura pura sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di idrolizzato di cece e idrolizzato di lenticchia rossa sono state sottoposte ad analisi sensoriale gusto-olfattiva, per quanto riguarda i principali descrittori.

In seguito all'analisi sensoriale è stato possibile selezionare come substrato migliore l'idrolizzato di lenticchia rossa, poiché il mosto di ceci ha influenzato negativamente le prestazioni di fermentazione dei ceppi testati e il profilo sensoriale dei prodotti finali.

La birra prodotta in coltura pura con *K. unispora* (M3B3) su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa mostra una nota solforata, mentre con il solo mosto pils sono presenti note di mosto e cereale. *S. cerevisiae* (10C) su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa ha prodotto una birra con una nota dolce, d'altra parte su mosto pils una nota citrica. *S. cerevisiae* (2PV), invece, ha prodotto delle birre con una forte presenza di schiuma e con un aroma più acido con entrambi i mosti. La birra ottenuta da *T. delbrueckii* (C7.4) su mosto pils addizionato presenta una nota fruttata/floreale. Infine, la birra prodotta con *L. tehrmotolerans* (B13) mostra un profilo gusto-olfattivo su mosto pils più caratterizzato. Infatti, la birra ottenuta ha una forte nota dolce, di miele all'olfatto e un gusto più aspro.

Al termine di questa prova sono stati selezionati i ceppi di lievito che hanno mostrato le migliori performance fermentative, considerando anche i loro tratti funzionali e probiotici precedentemente valutati (Agarbati et al., 2020).

4.2 FERMENTAZIONE MOSTO PILS E MOSTO PILS ADDIZIONATO DI IDROLIZZATO DI LENTICCHIA ROSSA

I ceppi di lievito selezionati sono stati valutati come in precedenza, sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa.

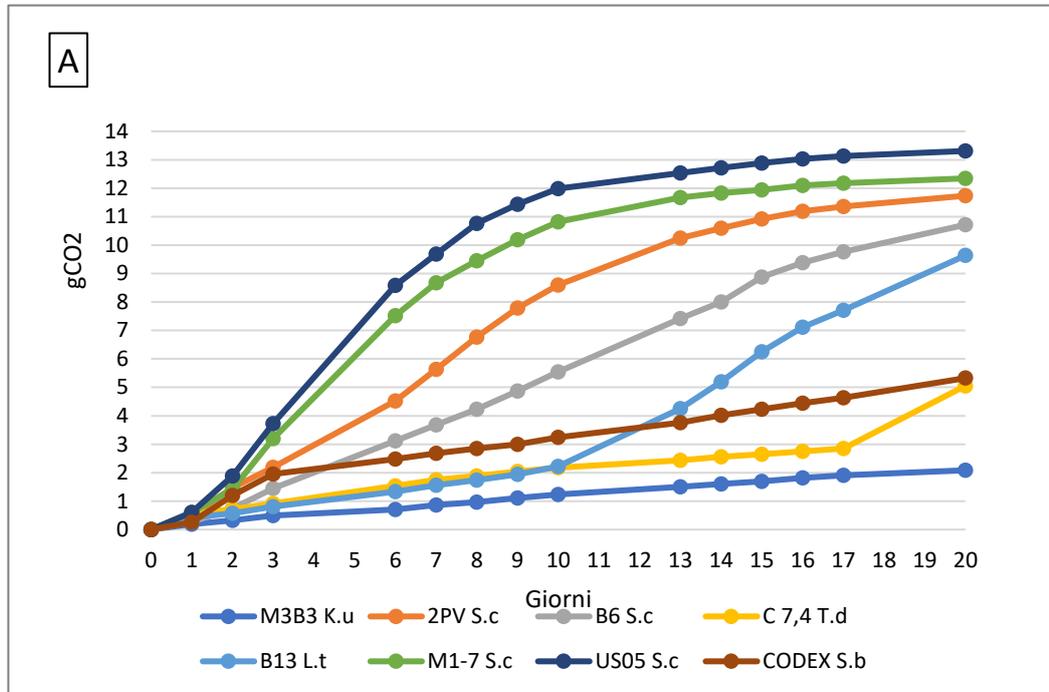
4.2.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA

I dati della cinetica fermentativa sono stati riportati in figura 14.

I risultati hanno mostrato un diverso comportamento fermentativo tra i ceppi di lievito testati, significativamente influenzato dai substrati. Su mosto pils *S. cerevisiae* (M1-7) e *S. cerevisiae* 2PV (Figura 14-A) hanno mostrato una produzione di CO₂ comparabile al ceppo starter *S. cerevisiae* US05, ma una cinetica fermentativa più lenta (i valori sono rispettivamente: 12.34g, 11.73g e 13.31g). Su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa tutti i ceppi *S. cerevisiae* hanno mostrato un aumento della velocità di fermentazione.

I ceppi non-*Saccharomyces*, *L. thermotolerans* (B13), *T. delbrueckii* (C7.4) e *K. unispora* (M3B3), invece, hanno mostrato una performance di fermentazione inferiore rispetto agli altri ceppi, indicando che non hanno raggiunto la completa attenuazione del mosto. La stessa tendenza è stata mostrata anche su mosto di pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa (Figura 14-B) con un totale di CO₂

rilasciato più alto rispetto al mosto pils, principalmente a causa di un maggiore contenuto di zucchero iniziale fornito dall'aggiunta del mosto di lenticchia.



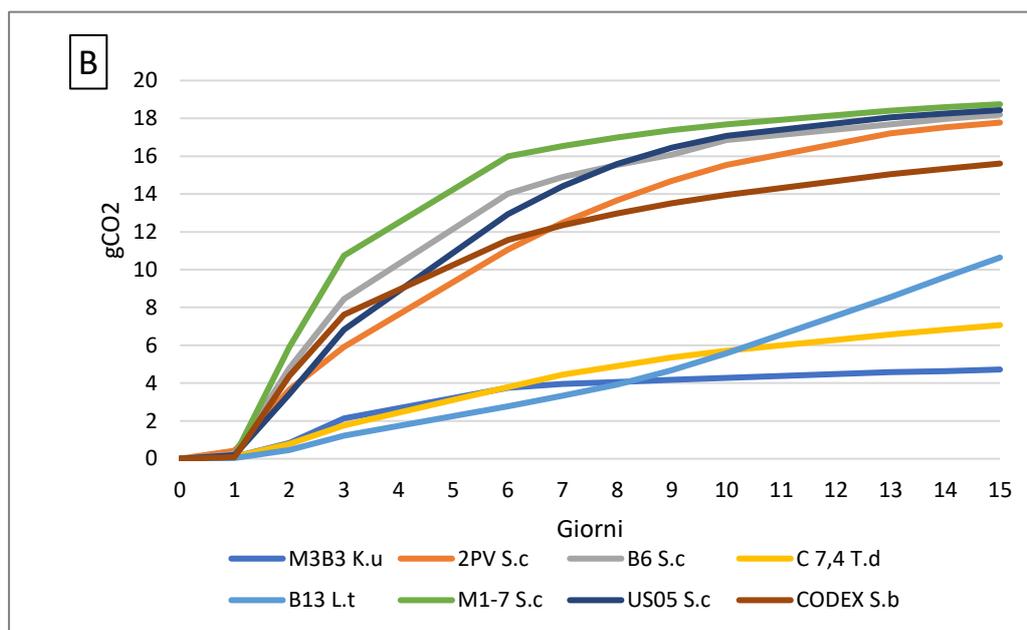


Figura 14- Cinetica fermentativa su mosto pils (A) e su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa (B).

4.2.2 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

Il riassunto dei risultati relativi al profilo analitico delle prove ottenute su mosto pils sono riportati nella tabella 8.

Dai risultati delle prove condotte su mosto pils emerge che tutte le fermentazioni hanno consumato tutto il glucosio e il saccarosio presente nel mosto, l'unica differenza, come già detto in precedenza, è associata al maltosio residuo. Come atteso, *K. unispورا* (M3B3), *T. delbrueckii* (C7.4) e *L. thermotolerans* (B13) su mosto pils rappresentano le prove con il più alto contenuto di maltosio residuo, ascrivibile al basso potere fermentativo esibito.

Per quanto riguarda il contenuto di proteine, i ceppi di lievito che hanno mostrato i valori più alti sono *S. cerevisiae* B6 e *S. cerevisiae* M1-7, rispettivamente di 63.04g/L e 64.04 g/L.

Tutte le prove di fermentazione effettuate su mosto pils associate a un livello di zuccheri residui più elevato hanno mostrato un contenuto di etanolo significativamente inferiore. In generale, il valore medio di etanolo su mosto pils è al di sotto di 3% v/v.

CEPPI	ZUCCHERI residui (g/L)			PROTEINE (g/L)	ETANOLO % v/v
	Saccarosio	Glucosio	Maltosio		
<i>T. delbrueckii</i> C7.4	0.00±0.00	0.013±0.008	38.04±0.74	32.33±0.81	0.84±0.00
<i>K. unispora</i> M3B3	0.011±0.008	0.008±0.004	43.66±0.55	46.16±14.67	0.10±0.00
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S. paradoxus</i> o <i>S. bayanus</i> B6	0.00±0.00	0.011±0.008	25.18±3.08	63.04±4.07	2.93±0.00
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S. bayanus</i> M1-7	0.007±0.005	0.0020.00	28.29±3.27	64.04±4.07	2.87±0.00
<i>S. cerevisiae</i> 2PV	0.00±0.00	0.013±0.008	14.93±20.85	33.19±3.26	2.86±0.00
<i>L. thermotolerans</i> B13	0.00±0.00	0.011±0.006	57.05±4.12	46.04±4.67	2.80±0.00
<i>S. boulardii</i> CODEX	0.014±0.01	0.008±0.004	36.26±0.55	28.72±2.64	1.42±0.00
<i>S. cerevisiae</i> US05	0.00±0.00	0.012±0.008	14.05±1.45	22.67±5.50	2.99±0.00

Tabella 8- Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto pils. Zuccheri iniziali e proteine mosto pils: saccarosio (5.34 g/L); glucosio (6.5 g/L); maltosio (56.96 g/L); proteine (9.56 g/L).

Il riassunto dei risultati relativi al profilo analitico delle prove ottenute su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa sono riportati nella tabella 9.

T. delbrueckii (C7.4) e *K. unispora* (M3B3), come atteso dal basso potere fermentativo esibito, hanno mostrato una limitata capacità di metabolizzare il substrato, registrando il più alto contenuto di maltosio residuo, rispettivamente 97.83 g/L e 84.27 g/L.

Per quanto riguarda il contenuto di proteine, le fermentazioni *L. thermotolerans* (B13), *K.unispora* (M3B3) e *S. cerevisiae* (2PV) hanno mostrato un aumento significativo e pari circa al 50% del contenuto proteico finale su mosto pils, probabilmente dovuto ai peptidi o aminoacidi liberi ottenuti dopo il trattamento enzimatico.

Il contenuto di etanolo è risultato basso in tutte le fermentazioni, ma ha mostrato un aumento significativo rispetto alle birre ottenute dal solo mosto pils.

CEPPI	ZUCCHERI residui (g/L)			PROTEINE (g/L)	ETANOLO % v/v
	Saccarosio	Glucosio	Maltosio		
<i>T. delbrueckii</i> C7.4	0.00±0.00	0,016±0.08	97.83±8.10	77.29±9.37	1.63±0.00
<i>K. unispora</i> M3B3	0.001±0.00	0.00±0.00	84.27±8.10	97.18±1.22	0.53±0.00
<i>S. cerevisiae/</i> <i>S. paradoxus</i> o <i>S. bayanus</i> B6	0.00±0.00	0.002±0.00	2.06±1.71	82.37±3.46	5.11±0.02
<i>S. cerevisiae/S.</i> <i>bayanus</i> M1-7	0.00±0.00	0.002±0.00	4.05±1.40	86.37±3.46	4.75±0.00
<i>S. cerevisiae</i> 2PV	0.00±0.00	0.002±0.00	6.02±4.47	83.92±3.66	4.71±0.00
<i>L.</i> <i>thermotolerans</i> B13	0.021±0.15	0.008±0.004	31.10±1.23	71.23±0.40	3.51±0.00
<i>S. boulardii</i> CODEX	0.00±0.00	0.104±0.08	7.29±0.05	73.84±6.93	4.26±0.00
<i>S. cerevisiae</i> US05	0.00±0.00	0.00±0.00	1.31±0.45	54.09±7.94	4.64±0.00

Tabella 9- Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchie rosse. Zuccheri iniziali e proteine mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa: saccarosio (29.63 g/L); glucosio (10.28 g/L); maltosio (82.16 g/L); proteine (35.29 g/L).

4.2.3 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

I principali composti secondari delle birre ottenute dalla fermentazione su mosto pils sono riportati in tabella 10. I risultati hanno evidenziato una differenza significativa quando i ceppi di lievito sono stati testati sui due substrati.

Riguardo al contenuto di acetaldeide (aroma di mela verde, erba tagliata), la prova che ha raggiunto il valore più alto è *T. delbrueckii* (C7.4), con 44.37mg/L. D'altra parte, il valore più basso è stato prodotto da *K. unispora* (M3B3) (5.79 mg/L).

Per quanto riguarda l'etilacetato, responsabile delle note di frutta, il suo contenuto è paragonabile in tutte le prove, fatta eccezione per *S. cerevisiae* (2PV) che ha registrato un valore molto basso, intorno allo 0.38 mg/L.

La prova che ha prodotto più propanolo (alcol, nota di durezza) è la fermentazione *S. cerevisiae* (2PV) (circa 19 mg/L).

Per il contenuto di isobutanolo (nota alcolica, solvente), lo starter commerciale *S. bouldarii* (CODEX) ha mostrato un valore pari a zero e *K. unispora* (M3B3), invece, non ha registrato alcun valore (ND).

Per quanto riguarda l'alcol amilico attivo (alcol, nota fruttata), la fermentazione che ha esibito il valore più alto è il ceppo *S. cerevisiae* (2PV), mentre ancora una volta *K. unispora* (M3B3) ha mostrato il quantitativo più basso (1.33 mg/L).

Per il contenuto di alcol isoamilico (responsabile di una nota fruttata, alcolica), tutti i ceppi di lievito hanno evidenziato valori simili, ad eccezione di *S. cerevisiae* (2PV), che ha mostrato il valore più alto, di circa 41.52 mg/L, e *K. unispora* (M3B3), che ha mostrato quello più basso, di 9.36 mg/L.

Infine, un altro importante alcol superiore è il β -fenil etanolo (responsabile di un aroma di rosa) che ha mostrato valori più alti su mosto pils fermentato con *T. delbrueckii* (C7.4) e *S. cerevisiae* (B6).

I composti secondari delle birre prodotte su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa (Tabella 11) hanno mostrato in generale valori più alti rispetto a quelli delle birre prodotte con il solo mosto pils. Il contenuto di acetaldeide, ad esempio, ha mostrato un aumento significativo in tutte le prove di fermentazione su mosto pils addizionato di lenticchia rossa, anche se il suo contenuto era sotto il valore soglia. Il ceppo *T. delbrueckii* (C7.4), invece, ha mostrato una tendenza opposta, cioè è l'unico su mosto pils addizionato di lenticchia rossa a decrescere significativamente.

Il contenuto di etilacetato su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa è aumentato notevolmente solo in *S. cerevisiae* B6, 2PV e M1-7 e *L. thermotolerans* B13. *K. unispora* (M3B3) e *T. delbrueckii* (C7.4) non hanno mostrato differenze significative nei due substrati testati.

Per quanto riguarda gli alcoli superiori n-propanolo, isobutanolo, alcol isoamilico e alcol amilico è stato osservato un aumento generale per tutti i ceppi, con una tendenza diversa per ogni ceppo testato su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa, con la sola eccezione di *T. delbrueckii* C7.4, che non ha mostrato differenze significative.

Infine, il β -fenil etanolo ha mostrato un aumento significativo in *S. cerevisiae* M1-7, 2PV e *K. unispora* (M3B3). Una tendenza opposta, invece, è stata esibita da *T. delbrueckii* (C7.4) e *S. cerevisiae* (B6).

CEPPI	ACETALDEIDE (mg/L)	ETILACETATO (mg/L)	PROPANOLO (mg/L)	ISOBUTANOLO (mg/L)	AMILICO ATTIVO (mg/L)	ALCOL ISOAMILICO (mg/L)	β-FENIL- ETANOLO (mg/L)
<i>K. unispora</i> M3B3	5.79±0.35	2.83±1.32	10.88±0.12	ND	1.33±0.62	9.36±1.12	0.78±0.4
<i>S. cerevisiae</i> 2PV	26.33±1.48	0.38±0.54	18.90±1.01	9.70±0.55	7.16±0.93	41.52±4.27	39.02±5.98
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S.</i> <i>paradoxus</i> o <i>S.</i> <i>bayanus</i> B6	11.24±0.73	3.11±1.16	16.16±1.62	8.61±0.89	6.65±0.91	28.27±4.52	15.61±1.13
<i>T. delbrueckii</i> C7.4	44.37±17.14	3.05±0.58	11.41±0.25	5.45±1.32	3.74±1.17	22.49±7.29	6.21±3.42
<i>L.</i> <i>thermotolerans</i> B13	7.37±1.22	1.47±0.90	12.62±0.49	5.35±0.08	2.92±0.66	23.27±0.85	17.97±1.74
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S.</i> <i>bayanus</i> MI-7	22.61±0.01	1.98±0.03	13.40±0.66	7.08±0.35	5.58±0.31	29.44±0.00	3.79±0.35
<i>S. cerevisiae</i> US05	13.49±0.59	2.43±0.41	14.93±1.25	6.81±0.09	6.13±0.73	26.50±1.27	10.40±1.62
<i>S. boulardii</i> CODEX	14.09±1.91	2.68±0.088	11.90±0.29	0.00±0.00	2.47±0.89	12.86±2.34	2.41±1.20

Tabella 10 – Principali composti secondari birre prodotte dal mosto pils

CEPPI	ACETALDEIDE (mg/L)	ETILACETATO (mg/L)	PROPANOLO (mg/L)	ISOBUTANOLO (mg/L)	AMILICO ATTIVO (mg/L)	ALCOL ISOAMILICO (mg/L)	β- FENIL ETANOLO (mg/L)
<i>K. unispora</i> M3B3	12.93±1.40	2.80±1.65	21.28±0.41	4.90±0.27	2.66±0.27	16.85±1.87	5.44±0.4
<i>S. cerevisiae</i> 2PV	59.63±2.54	10.94±1.02	26.29±0.46	11.68±0.50	9.40±0.17	53.26±0.17	10.30±1.90
<i>S. cerevisiae/ S.</i> <i>paradoxus o S.</i> <i>bayanus</i> B6	60.48±3.08	14.74±1.41	34.30±2.33	16.51±0.84	6.52±0.64	45.50±6.55	0.10±0.05
<i>T. delbrueckii</i> C 7,4	26.59±12.94	3.19±0.06	11.80±0.07	5.81±0.07	1.15±0.98	18.91±1.10	0.16±0.06
<i>L.</i> <i>thermotolerans</i> B13	27.87±1.2	8.55±0.02	14.48±0.87	9.82±0.12	6.32±0.87	37.8±2.36	2.53±0.15
<i>S. cerevisiae</i> MI-7	113.20±6.58	17.94±0.68	16.41±2.09	15.11±0.56	14.64±0.67	51.54±1.80	11.16±1.53
<i>S. cerevisiae</i> US05	76.63±16.86	9.93±2.61	19.91±2.64	13.71±1.16	12.73±1.87	43.32±9.41	10.06±1.32
<i>S. bouldarii</i> CODEX	55.43±4.35	11.18±0.98	31.11±0.74	14.09±0.28	10.78±2.33	41.95±2.60	4.00±0.36

Tabella 11 – Principali composti secondari birre prodotte dal mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa.

4.2.4 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

I principali composti volatili saggiati a fine fermentazione nelle birre ottenute sul mosto pils dai ceppi selezionati sono riportati in tabella 12.

La fermentazione che ha evidenziato una concentrazione più alta di etilbutirrato (aroma di ananas, mela) è *T. delbrueckii* (C7.4), con un valore di 0,21 mg/L, simile al valore registrato dallo starter commerciale *S. cerevisiae* US05.

Il contenuto di acetato di isoamile (aroma di banana) ha mostrato nella fermentazione *S. cerevisiae* (M1-7) il valore più alto, circa 2,79 mg/L.

Per quanto riguarda il contenuto dell'etilesanoato (esteri fruttati associati al sapore di mela), il valore più basso è stato evidenziato dalla prova *S. cerevisiae* M1-7 (0.03 mg/L).

Il contenuto di linalolo (aroma floreale, lavanda) ha un andamento costante in tutte le prove, con valori intorno a 0,1 mg/L.

Composti volatili (mg/L)	<i>S. bouldarii</i> CODEX	<i>L. thermotolerans</i> B13	<i>S. cerevisiae</i> US05	<i>S. cerevisiae</i> 2PV	<i>T. delbrueckii</i> C7.4	<i>S. cerevisiae/</i> <i>S. bayanus</i> M1-7	<i>K. unispora</i> M3B3	<i>S. cerevisiae/</i> <i>S. paradoxus</i> o <i>S. bayanus</i> B6
Etilbutirrato	0.00±0.00	0.01±0.01	0.20±0.11	0.04±0.01	0.21±0.07	0.08±0.04	0.15±0.03	0.03±0.01
Acetato di isoamile	0.38±b	1.04±0.01	0.88±0.36	0.71±0.01	0.30±0.08	2.79±0.83	0.41±0.06	1.05±0.14
Etilsanoato	0.27±0.10	0.32±0.01	0.012±0.01	0.21±0.01	0.17±0.01	0.03±0.04	0.13±0.02	0.10±0.11
Linalolo	0.08±0.01	0.09±0.03	0.19±0.15	0.12±0.02	0.11±0.013	0.06±0.02	0.07±0.09	0.07±0.01
Dietilsuccinato	ND	0.037±0.05	0.024±0.00	ND	ND	ND	0.002±0.00	ND

Tabella 12- Principali composti volatili della birra ottenuta su mosto pils

I volatili saggiati a fine fermentazione nelle birre ottenute su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa dai ceppi selezionati sono riportati in tabella 13.

Per quanto riguarda la concentrazione di etil butirato, non ha mostrato significative differenze rispetto ai valori mostrati su mosto pils, fatta eccezione per *S. cerevisiae* B6.

Il contenuto di acetato di isoamile ha registrato un aumento significativo su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa nelle fermentazioni *S. cerevisiae* 2PV, M1-7 e *K. unispora* M3B3.

Il contenuto di etilesanoato ha mostrato una diminuzione in *S. cerevisiae* 2PV, *T. delbrueckii* C7.4 e *K. unispora* M3B3 su mosto pils arricchito di lenticchia rossa.

I contenuti di linalolo e dietilsuccinato, nei ceppi di lievito testati su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa, non hanno mostrato differenze importanti tra i due substrati di fermentazione.

Composti volatili (mg/L)	<i>S. bouldarii</i> (CODEX)	<i>L. thermotolerans</i> (B13)	<i>S. cerevisiae</i> (US05)	<i>S. cerevisiae</i> (2PV)	<i>T. delbrueckii</i> (C7.4)	<i>S. cerevisiae/S. bayanus</i> (M1-7)	<i>K. unispora</i> (M3B3)	<i>S. cerevisiae/S. paradoxus</i> o <i>S. bayanus</i> (B6)
Etilbutirrato	0.02±0.01	0.25±0.21	0.10±0.00	0.14±0.05	0.17±0.11	0.00±0.00	0.07±0.03	0.15±0.02
Acetato di isoamile	1.24±a	0.52±0.03	3.20±0.14	3.50±1.13	0.81±0.24	6.97±0.11	1.54±0.22	1.84±0.0
Etilsanoato	0.16±0.03	0.25±0.07	0.02±0.00	0.05±0.00	0.03±0.02	0.08±0.02	0.04±0.01	0.034±0.01
Linalolo	0.07±0.01	0.099±0.02	0.10±0.01	0.05±0.06	0.10±0.03	0.11±0.01	0.21±0.01	0.08±0.00
Dietilsuccinato	0.57±0.01	0.003±0.00	ND	0.016±0.00	0.004±0.00	ND	ND	0.05±0.01

Tabella 13- Principali composti volatili della birra ottenuta su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa.

4.2.5 ANALISI SENSORIALE

Le birre prodotte su mosto pils e su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa sono state sottoposte ad analisi sensoriale gusto/olfattiva per quanto riguarda i principali descrittori. I dati hanno mostrato che all'interno di ogni ceppo le birre su mosto pils erano significativamente diverse da quelle prodotte su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa.

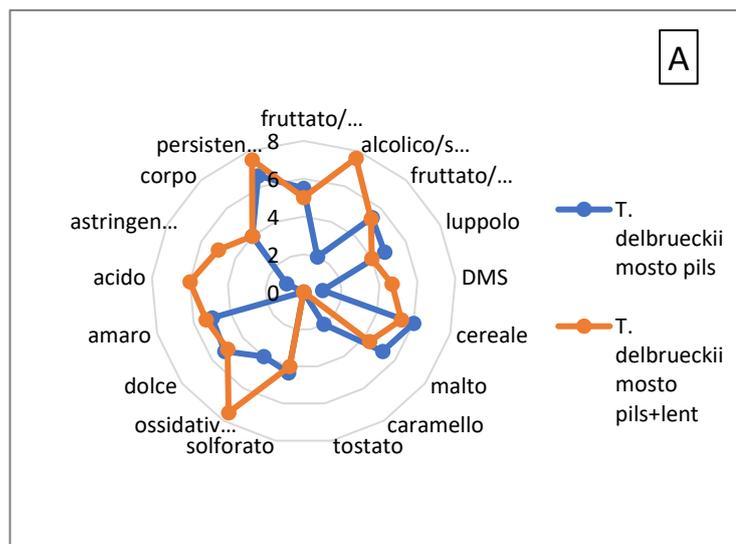


Figura 15 A- Profilo gusto-olfattivo birra ottenuta in fermentazione pura con *T. delbrueckii* sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di lenticchia rossa

La birra prodotta in coltura pura di *T. delbrueckii* (C7.4) (Figura 15A) su mosto pils mostra differenze tra quella prodotta con mosto pils addizionato di idrolizzato di

lenticchia rossa, soprattutto per quanto riguarda un lieve aroma di malto e cereale. La birra prodotta da mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa è caratterizzata, invece, da una maggiore persistenza e astringenza, da una forte nota acida e mostra anche una nota di alcolico/solvente e di ossidativo. Questa birra inoltre ha evidenziato come carattere negativo una elevata percezione di DMS (dimetil solfuro), che richiama l'odore di vegetale cotto.

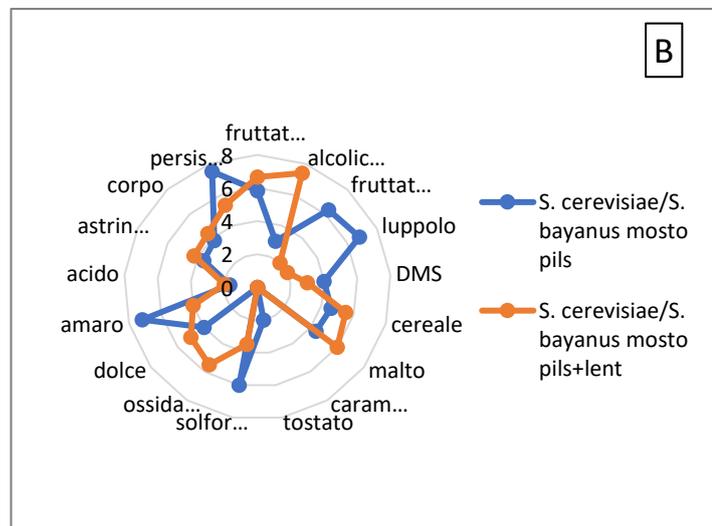


Figura 15 B- Profilo gusto-olfattivo birra ottenuta in fermentazione pura di *S. cerevisiae/S. bayanus* sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di lenticchia rossa.

S. cerevisiae (M1-7) (Figura 15B) su mosto pils ha prodotto una birra con alta persistenza, con una forte nota di amaro, luppolata e anche con una nota di solforato e di fruttato/citrico. Su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa, invece, il *S. cerevisiae* ha prodotto una birra caratterizzata da un forte aroma di malto e cereale, da note di fruttato/esteri, ma con forte note di alcolico/solvente.

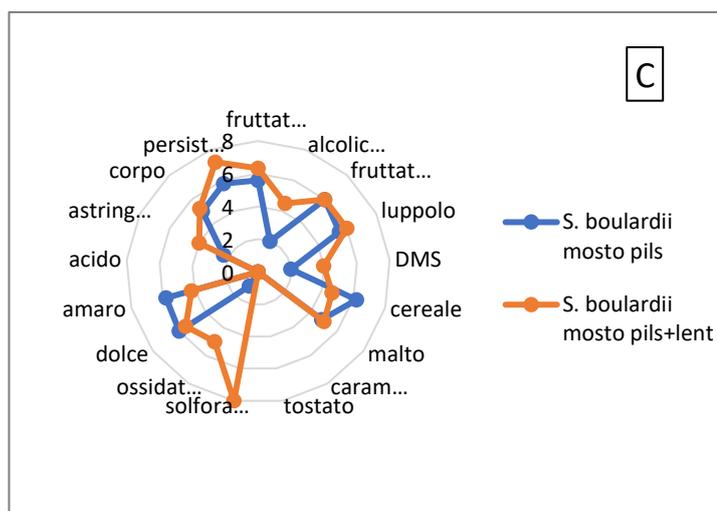


Figura 15 C- Profilo gusto-olfattivo birra prodotta da *S. bouldardii* sia su msoto pils sia su mosto pils addizionato di lenticchia rossa.

S. bouldardii (CODEX) (Figura 15C) su mosto pils mostra un profilo gusto-olfattivo caratterizzato da note di amaro, di dolce e un aroma di cereale, mentre su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa mostra una nota di solforato, più persistenza e leggermente luppolata. In questa birra però è presente una nota negativa di DMS.

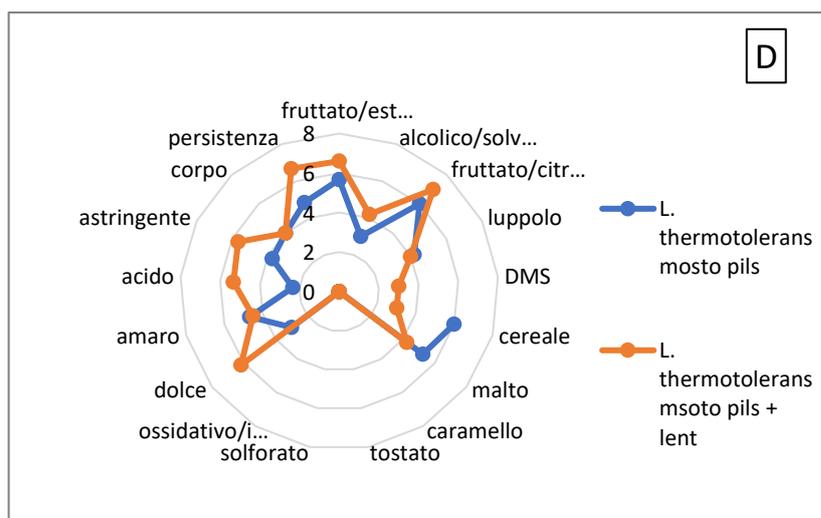


Figura 15 D - Profilo gusto-olfatto birra ottenuta con *L. thermotolerans* sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di lenticchia rossa.

L. thermotolerans (B13) (Figura 15D) su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa ha prodotto una birra con una nota di fruttato/estere, più persistente, dolce, con un carattere di acidità e astringenza, enfatizzato probabilmente dall'acido lattico che è un prodotto caratteristico di questo ceppo di lievito.

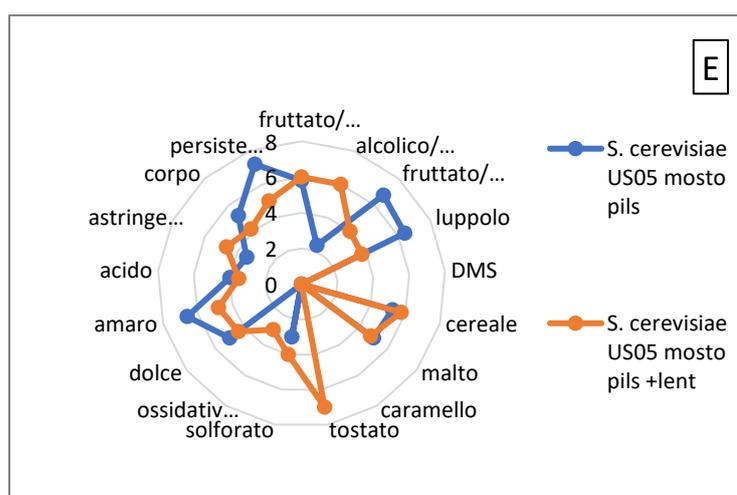


Figura 15 E - Profilo gusto-olfattivo birra prodotta con *S. cerevisiae* sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di lenticchia rossa.

La birra prodotta con *S. cerevisiae* (US05) (Figura 15E) su mosto pils è caratterizzata da una maggiore persistenza, una nota amara, luppolata e mostra una nota di fruttato/citrico. Mentre, su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa *S. cerevisiae* ha prodotto una birra da un aroma tostato, con una nota di alcolico/solvente e con maggiore astringenza.

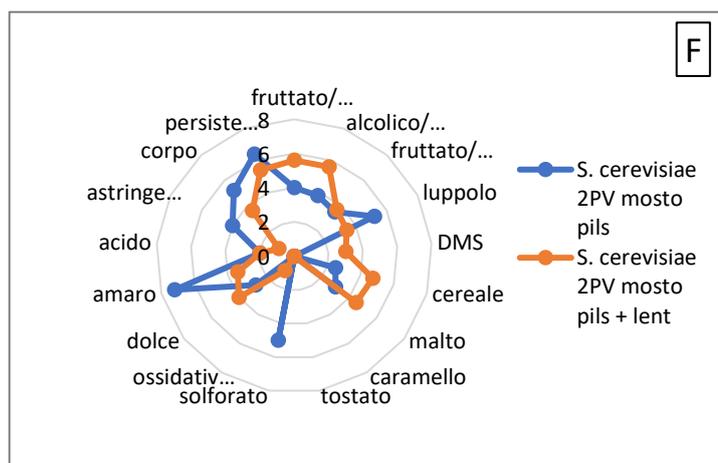


Figura 15 F - Profilo gusto-olfattivo birra prodotta da *S. cerevisiae* sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di lenticchia rossa.

La birra prodotta in coltura pura di *S. cerevisiae* (2PV) (Figura 15F) su mosto pils mostra differenze soprattutto per quanto riguarda la persistenza, la forte nota amara, luppolata e con una nota di ossidativo/solforato. Su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa, invece, le birre sono caratterizzate da note di fruttato/esteri, di alcolico/solvente e di malto e cereali. Il DMS è presente e conferisce un carattere negativo alla birra.

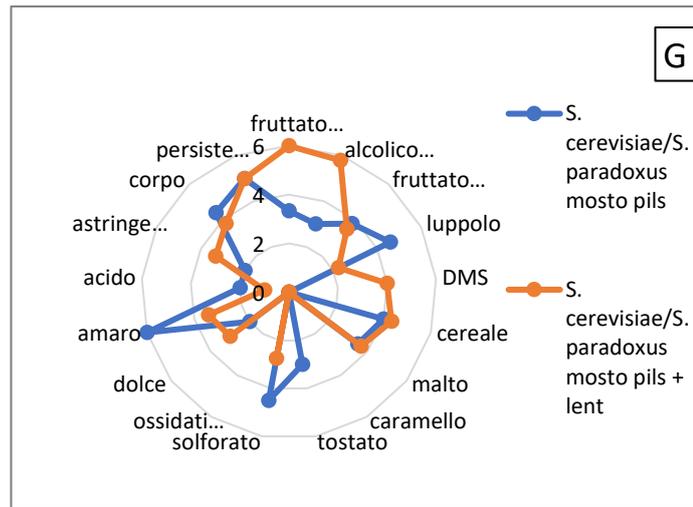


Figura 15 G - Profilo gusto-olfattivo birra prodotta da *S. cerevisiae*/*S. paradoxus* sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di lenticchia rossa.

La birra prodotta in coltura pura di *S. cerevisiae*/*S. paradoxus* o *S. bayanus* (B6) (Figura 15G) su mosto pils mostra una forte nota di amaro, di solforato e aroma di luppolo. Su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa, invece, mostra una nota di fruttato/esteri, di alcolico/solvente e di cereale. È evidente come carattere negativo una elevata percezione di DMS.

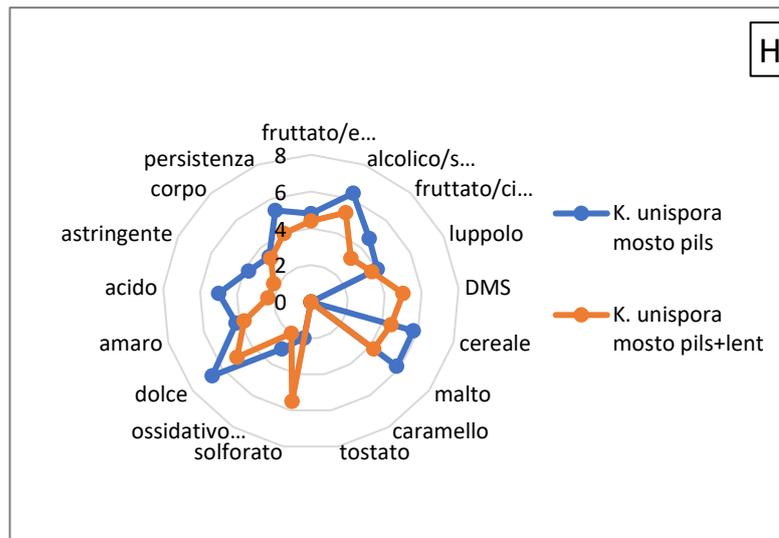


Figura 15 H - Profilo gusto-olfattivo birra prodotta da *K. unispora* sia su mosto pils sia su mosto pils addizionato di lenticchia rossa.

K. unispora (M3B3) (Figura 15H) mostra un profilo gusto-olfattivo su mosto pils più caratterizzato. Su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa, invece, ha prodotto birre caratterizzate da note aromatiche allegate al mosto (DMS e solfuro), associate ad una bassa attitudine fermentativa di tale ceppo.

In generale, attraverso l'analisi sensoriale è stato possibile evidenziare come ogni birra testata abbia mostrato un profilo aromatico differente rispetto ai prodotti ottenuti con il ceppo starter *S. cerevisiae* US05.

CAPITOLO 5 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, il consumo di cibi o bevande fermentate è aumentato sostanzialmente in tutto il mondo, in quanto giocano un ruolo centrale nella dieta quotidiana di diverse culture grazie ai loro molteplici benefici per la salute, come le attività antimicrobiche, antidiabetiche, antiaterosclerotiche, antiossidanti e antinfiammatorie (Sanlier et al., 2019). Per tali ragioni, i microrganismi fermentanti, il processo fermentativo stesso e i loro prodotti hanno attirato l'interesse della comunità scientifica nel campo della microbiologia applicata. Al giorno d'oggi, diversi ingredienti, come mais, riso e frutta, sono stati testati nella produzione di birra, per migliorare i profili fenolici di diversi prodotti commercializzati, con lo scopo finale di ottenere una bevanda funzionale (Ambra et al., 2021).

D'altra parte, l'uso di legumi per alimenti fortificati sono stati già ampiamente testati su prodotti di panificazione, ma non sono mai stati proposti per la combinazione per la produzione di birra funzionale. In questo contesto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le prestazioni di lieviti non-convenzionali con potenziale attitudine probiotica, precedentemente caratterizzati da Agarbati et al., 2020, per la produzione di birra artigianale con proprietà nutrizionali aggiuntive e un profilo sensoriale rafforzato.

Sebbene la maggior parte delle ricerche pubblicate sui probiotici si siano concentrate sui batteri, in particolar modo sui batteri lattici utilizzati negli alimenti e nelle bevande a base di latte, negli ultimi anni i potenziali lieviti probiotici e i loro prodotti fermentati hanno raccolto un elevato interesse scientifico e commerciale (Shakibazadeh, S.,

2011). In parallelo, con l'aumento del vegetarianismo e del veganismo, c'è anche un aumento della domanda di prodotti probiotici fermentati non caseari. A questo proposito, stanno emergendo studi scientifici incentrati sui lieviti come potenziali probiotici, grazie alle loro eccellenti prestazioni fermentative sia negli alimenti che nelle bevande. Infatti, i trattamenti benefici dei lieviti sono legati al miglioramento della biodisponibilità dei minerali attraverso l'idrolisi dei fitati, l'effetto antinfiammatorio e la capacità di produrre antiossidanti naturali come carotenoidi, acido citrico, acido ascorbico, glutazione che migliorano la salute dell'ospite, ritardando la degenerazione ossidativa dei lipidi.

Mentre l'aggiunta di idrolizzato di cece compromette i tratti aromatici, l'aggiunta del 20% di idrolizzato di lenticchia rossa ha mostrato una promettente composizione analitica e sensoriale delle birre finali. La lenticchia (*Lens culinaris*), un legume coltivato principalmente in Turchia e in Canada, rappresenta un'importante fonte di proteine (25-30%). Anche se l'Italia non è uno dei maggiori paesi produttori in termini di quantità, alcune varietà di lenticchie sono un prodotto eccellente come la lenticchia di Colfiorito e Castelluccio di Norcia, una piccola area del Centro Italia con un microclima ideale (Micioni Di Bonaventura et al. 2017).

Anche se in passato la birra era considerata una bevanda formulata per sostituire altre bevande alcoliche più costose, al giorno d'oggi la birra artigianale non filtrata e non pastorizzata ha dimostrato una qualità superiore alle analoghe industriali e l'uso di lieviti non-*Saccharomyces* nel processo di produzione della birra è stato ampiamente studiato per il loro contributo a migliorare il gusto aromatico (Canonica et al., 2016; Canonica et al., 2020; Canonica et al., 2019) e le proprietà funzionali.

Nella presente ricerca, *L. thermotolerans*, precedentemente isolata in un ambiente naturale non antropizzato (muschio su tronco di quercia), ha mostrato un'efficace nota acida e un carattere fruttato/estere e un aumento delle note aromatiche. Inoltre, il basso contenuto di etanolo esibito dalle colture pure di *L. thermotolerans* era anche rilevante per produrre birra a basso contenuto alcolico.

Il ceppo *S. cerevisiae* 2PV con caratteristiche probiotiche dimostrate (isolato da una cantina dove non vengono utilizzate colture starter commerciali) ha mostrato un comportamento fermentativo comparabile a quello esibito dal ceppo starter di *S. cerevisiae* US05, conferendo alle birre un profilo aromatico favorevole.

K. unispora, già *Saccharomyces unisporus*, isolato dal lievito madre artigianale, ha esibito un valido e peculiare potenziale aromatico, sebbene la sua velocità di fermentazione sia molto bassa. Questa tendenza potrebbe essere utile per ottenere una birra artigianale caratterizzata da un basso contenuto di etanolo e allo stesso tempo con note aromatiche distintive.

Un altro aspetto rilevante è l'aumento delle prestazioni fermentative dei lieviti su mosto pils addizionato di idrolizzato di lenticchia rossa, dove la lenticchia agisce come un "supplemento nutrizionale" determinando da un lato un incremento di alcuni composti volatili come gli alcoli superiori e permettendo, dall'altro lato, l'aumento dell'attività enzimatica nel mosto.

La promettente capacità di fermentazione di un piccolo numero di ceppi di lievito selezionati, con attitudine probiotica precedentemente definita, e l'uso del mosto di lenticchie, ricco di proteine, potrebbe essere un valido approccio biotecnologico per

produrre una birra innovativa a basso contenuto alcolico con maggiore valore nutrizionale.

In conclusione, in questo studio i ceppi di lievito selezionati hanno mostrato una migliore capacità di fermentazione rispetto ai ceppi commerciali convenzionali di *S. cerevisiae*. Questi ceppi potrebbero essere un'alternativa efficace all'unico lievito probiotico commercialmente disponibile, *S. cerevisiae var. boulardii*, durante la produzione di birra artigianale fortificata. Inoltre, i lieviti non-*Saccharomyces* qui selezionati potrebbero essere una strategia adatta a gestire una fermentazione di birra artigianale premium con un promettente profilo sensoriale con la prospettiva futura di introdurre nel mercato un prodotto migliorato. Le sostanze fitochimiche (isoflavoni, saponine, alcaloidi) nei legumi sono state segnalate per avere un potenziale benefico nella salute umana. È stato riportato che gli isoflavoni sono in gran parte isolati dalla famiglia delle *Fabaceae (Leguminosae)*. Gli isoflavoni hanno dimostrato di avere diverse attività biologiche tra cui la riduzione dell'osteoporosi, la prevenzione di alcuni tipi di cancro e delle malattie cardiovascolari.

Anche se questi risultati sono promettenti, ulteriori indagini sono necessarie per testare l'efficacia della bevanda durante la produzione su scala pilota e per condurre un'indagine tra i consumatori in cui il prodotto finale deve essere esaminato per verificare il grado di accettabilità.

CAPITOLO 6 - BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. (1994). The Hop Atlas. The history and geography of the cultivated plants. Joh Barth & Sohn Publication. Nuremberg, Germany. 237-242.
Assobirra (2013). Annual report 2013. Roma.
- Aa.Vv. a cura di Studio Booksystem Novara, Il libro completo della birra. Storia, lavorazione, degustazione, varietà di tutto il mondo, Istituto Geografico De Agostini S.p.a., Novara 2007, pp. 13-15.
- 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.
- Ambra, R., Pastore, G., & Lucchetti, S. (2021). The role of bioactive phenolic compounds on the impact of beer on health. Molecules, 26(2), 486.
- Anderson, R. J., and Howard, G. A. (1974) The origin and occurrence of volatile sulphur compounds in British ales and lagers, J. Inst. Brew. 80, 357–370.
- Angela Capece , Rossana Romaniello, Gabriella Siesto and Patrizia Romano- Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production- A Review. 2018.

- Bamforth CW (1994). β -Glucan and β -glucanases in malting and brewing: Practical aspects. *Brew, Digest* 69 (5), 12-16.
- Bhattacharya, I., Yan, S., & Shankar, J. (2013). *Saccharomyces unisporus*: Biotechnological potential and present status. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 353–363.
- Blanco, C.A., Rojas, A., Caballero, P.A., Ronda, F., Gomez, M. & Cabellero, I. (2006). A better control of beer properties by predicting acidity of hop iso – α – acids. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 373 – 377.
- Bokulich NA, Bamforth CW (2013). The Microbiology of Malting and Brewing *Microbiol Mol Biol Rev.* 77(2): 157–172
- Bottero, L., Dabove, L. & Billia, M. (2009). *Manuale della birra*. Ed. Gribaudo, pp. 34 – 40.
- Briggs, D., Boulton, C. A., Brookes, P. A. & Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and Practice*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Buiatti, S. (2004). “Birra”. In Martelli A., Cabras P. (Ed.), *Chimica degli alimenti*, Padova: Piccin Nuova Libreria S.P.A.
- C. Hill, F. Guarner, G. Reid, G.R. Gibson, D.J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, R.B. Canani, H.J. Flint, S. Salminen, P.C. Calder, M.E. Sanders. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 11 (2014), pp. 506-514
- Cabras P. & Martelli A. (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin Editore

- 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
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process, a new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. Food Microbiology, 56, 45–51.
- Canonico, L., Ciani, E., Galli, E., Comitini, F., & Ciani, M. (2020). Evolution of aromatic profile of *Torulaspora delbrueckii* mixed fermentation at microbrewery plant. Fermentatio, 6, 7.
- Canonico, L., Galli, E., Ciani, E., Comitini, F., & Ciani, M. (2019). Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. Microorganisms, 7, 11.
- Cantoni, C. (1990). Alimenti microbiologici e igiene. Johannes Krämer, Milano.
- 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.
- D. Czerucka, T. Piche, P. Rampal- Review article: yeast as probiotics- *Saccharomyces boulardii*. Aliment. Pharmacol. Ther., 26 (2007), pp. 767-778
- Daniels, R. (2000) Designing great beers. Brewers publications, Boulder, Colorado.
- De Stefano A & Montanari L (1996). Minor components of beer: a review. Alcologia, 8(1): 43-45.

- Devreux A. 1986, “Il valore alimentare della birra”, Edizioni Birra e Malto, n.29, pp. 4-21.
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of Institute of Brewing*, 122, 599–604.
- Eliodorio KP, et al. (2019) Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. *Advances in Applied Microbiology* 109: 61-119
- Fajner, D. (2010). La birra ed i suoi ingredienti: l'acqua. *Movimento birra*, pp. 3, 14 – 15.
- FAO/WHO- Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2002)
- GA Durand, ML Corazza, AM Blanco, FC Corazza- Dynamic optimization of the mashing process- *Food Control*, 2009 – Elsevier
- Gresser, A. (2010). *Il manuale del birraio pratico*. Fachverlag Hans Carl, Nurnberg, Germania.
- Harrison MA (2009). “Beer/Brewing.” *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd Edition. Elsevier Inc., 2009.
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, 72, 55–66.
- Kim, J.Y.; Kim, S.J.; Jeong, S. Regulations on health/functional foods in Korea. In *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and*

around the World, 3rd ed.; Debasis, B., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 497–507.

- Kovacevic, M. & Kac, M. (2002). Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. *Food Chemistry*, 77: 489–494.
- Krogerus, K., and Gibson, B. R. (2013) 125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation, *J. Inst. Brew.* 119, 86–97.
- Krottenthaler, M. & Glas, K. (2009). "Brew Water", in Eßlinger H. M.. *Handbook of brewing*. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germania.
- 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.
- LV McFarland- Revisione sistematica e meta-analisi di *Saccharomyces boulardii* in pazienti adulti. *World J. Gastroenterol.* , 16 (2010) , pagg. 2202 – 2222
- M.I. Genovese, F.M. Lajolo - Atividade inibitória de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): avaliação crítica dos métodos de determinação - *Archivos Latinoamericanos de Nutrição*, 51 (4) (2001), pp. 386-39
- Manzoni M (2006). *Microbiologia industriale*. Editore: Casa Editrice Ambrosiana.

- Maureen Gallery Kovacs, *The Epic of Gilgamesh*, Stanford University Press, Stanford 1990, pp. XVII – XXV.
- Mayer Jr. O., Simon J., Rosolova H. (2001), “A population study of the influence of beer consumption on folate and homocysteine concentrations”, *European Journal of Clinical Nutrition*, n. 55, pp.605-609.
- Meilgaard, MC (1975) *Flavor chemistry of beer: Part 1: Flavor and thresholds of 239 aroma volatiles* , *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 12 , 107 – 117
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Pure non-*Saccharomyces* Starter Cultures for Beer Fermentation with a Focus on Secondary Metabolites and Practical Applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569–587
- Michiko Kobayashi, Hiroshi Shimizu, Suteaki Shioya -REVIEW- Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation- *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 106, Issue 4, October 2008, Pages 317-323
- Micioni Di Bonaventura, M. V., Cecchini, C., Vila-Donat, P., Caprioli, G., Cifani, C., Coman, M. M., & Vittori, S. (2017). Evaluation of the hypocholesterolemic effect and prebiotic activity of a lentil (*Lens culinaris* Medik) extract. *Molecular Nutr. Food Res.* 61, 1700403. *Microbiol.* 74, 454–461. *Saccharomyces cerevisiae* the main character in beer brewing, *FEMS Yeast Res.* 8, 1018–1036.

- 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).
- Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A. e Fanozzi, P. (1999) Organic and Phenolic Acids in Beer, *LWT - Food Sci Technol*. 32, 535 - 539.
- Morteza Oghbaei e Jamuna Prakash | Fatih Yildiz (Reviewing Editor) (2016) Effetto della lavorazione primaria di cereali e legumi sulla sua qualità nutrizionale: una revisione completa, *Cogent Food & Agriculture*,
- Nagami, K., Takahashi, T., Nakatani, K., and Kumada, J. (1980) Hydrogen sulphide in brewing, *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **17**, 64–68.
- Narziß L (1993). β -Glucan and filterability. *Brauwelt Int.* 5. 435-442.
- Nilla Turri, *Tecnologia della birra fatta in casa*, Editore Mulino Don Chisciotte, 2008, 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
- Peddie, H. A. B. (1990) Ester formation in brewery fermentations, *J. Inst. Brew.* 96, 327–331.
- Pepe, C. (2010). Caratterizzazione della componente polipeptidica della birra e identificazione di epitopi potenzialmente immunogenici per i pazienti celiaci.

Dottorato di ricerca in scienze e tecnologie delle produzioni agro-alimentari.
Università degli studi di Napoli Federico II.

- 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.
- Pires, E., & Brányik, T. (2015). *Biochemistry of beer fermentation*. AG Switzerland: Springer International Publishing.
- Pirova, M. (1973). *Industrie agrarie alimentari*. Vol. I. Del Bianco, Udine.
- R.F. Basso, A.R. Alcarde, C.B. Portugal - Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?- *Food Res. Int.*, 86 (2016), pp. 112-120.
- Rodrigues, JEA , Erny, GL , Barros, AS , Esteves, VI , Brandão, T. , Ferreira, AA , Cabrita, E. , and Gil, AM (2010) Quantification of Organic Acid in Beer by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Basati su metodi , *Anal. Chim. Acta* 674 , 166 – 175
- Rossi S, Sileoni V, Perretti, Marconi O (2013). Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J Sci Food Agric*, 94: 919–928. Wiley Online Library.
- S. Home, K. Pietila, K. Sjöholm Control of glucanolytic activity in mashing- *ASBC Journal*, 51 (3) (1993), pp. 108-113.

- Sanlier, N., Gökçen, B. B., & Sezgin, A. C. (2019). Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 506–527.
- Shakibazadeh, S., Saad, C. R., Christianus, A., Kamarudin, M. S., Sijam, K., & Sinaian, P. (2011). Assessment of possible human risk of probiotic application in shrimp farming. *International Food Research Journal*, 18, 125–135.
- Sicheri, G. (1983). *Industria agraria*. Hoepli, Milano.
- siti web: Barth-Haas Group, 2006; Beer and Health symposium, 2006
- Sito web: Mondobirra.org
- Šmogrovičová, 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.
- Sunier, J. (1988). *La fabbricazione del malto e della birra*. Unione italiana fabbricanti birra e malto, Roma
- T. Kelesidis, C. Pothoulakis- Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Ther. Adv. Gastroenterol.*, 5 (2012), pp. 111-12
- T. P. Coultate: *La chimica degli alimenti*, Zanichelli, Bologna, 2004.

- Takoi, K., Itoga, Y., Koie, K., Kosugi, T., Shimase, M., Katayama, Y., Nakayama, Y., and Watari, J. (2010) The contribution of geraniol metabolism to the citrus flavour of beer: Synergy of geraniol and β -citronellol under coexistence with excess linalool, *J. Inst. Brew.* 116, 251–260.
- Tenge, C. (2009). Yeast. In: H.M. Eßlinger (ed.). *Handbook of Brewing: Processes, technology, markets.* Wiley – Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 978 – 3 – 527 – 31674 – 8.
- Thurston, P. (1986) The phenolic off-flavor test – A method for confirming the presence of wild yeasts, *J. Inst. Brew.* 92, 9–10.
- Tosh, S.M.; Yada, S. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Res. Int.* 2010, 43, 450–460.
- Vanbeneden, N., van Roey, T., Willems, F., Delvaux, F., and Delvaux, F. R. (2008) Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing, *Food Chem.* 111, 83–9.
- Vanderhaegen, B. , Neven, H. , Coghe, S. , Verstrepen, KJ , Derdelinckx, G. e Verachtert, H. (2003) Bioflavoring and beer refermentation , *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 , 140 - 150 .
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR (2003 a). Yeast flocculation, what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 197-206.

- 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.
- Zavatti M & Zanolì P (2006). Scheda Tecnica - Humulus lupulus L. Rivista scientifica Natural1, anno 6, num. 58, dicembre 2006, pag. 26-35.
- 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.

