



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in:

Biologia Molecolare e Applicata

**Impiego di lieviti non-convenzionali per la valorizzazione
di acque di lavaggio delle trebbie da processo brassicolo
artigianale**

**Non-conventional yeasts for the valorization of water
from brewers' spent grains washing from brewing
process**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Marica De Angelis

Relatore:

Dott.ssa Laura Canonico

Correlatore:

Prof. Maurizio Ciani

Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2020/2021

Ai miei genitori

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	5
1.1.MATERIE PRIME	7
1.1.1. ACQUA	7
1.1.2. ORZO	8
1.1.3. LUPPOLO	10
1.1.4. LIEVITO	12
1.2.PROCESSO PRODUTTIVO	13
1.2.1. MALTAZIONE	13
1.2.2. AMMOSTAMENTO	14
1.2.3. FERMENTAZIONE	17
1.2.4. DOWNSTREAM	19
1.3.BIRRA ARTIGIANALE	20
1.4. UTILIZZO DEI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES NELLA PRODUZIONE DI BIRRA ARTIGIANALE	22
1.5. PRINCIPALI COMPOSTI AROMATICI DELLA BIRRA	23
1.5.1. ALCOLI SUPERIORI	23
1.5.2. ESTERI	25
1.5.3. ACIDI ORGANICI	26
1.5.4. COMPOSTI FENOLICI	27
1.5.5. COMPOSTI SOLFORATI	28
1.5.6. COMPOSTI CARBONILICI	28
1.5.7. MONOTERPENI	29
1.6.VALORIZZAZIONE DEI SOTTOPRODOTTI IN AMBITO BRASSICOLO	29
CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI	32

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI	33
3.1. CEPPI DI LIEVITO	33
3.2. ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE	35
3.3. ANALISI ACQUE DI LAVAGGIO	36
3.4. ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI	37
3.5. RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA	38
3.6. ANALISI MICROBIOLOGICHE	38
3.6.1 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI	38
3.7. ANALISI CHIMICHE	40
3.7.1. DETERMINAZIONE ZUCCHERI RESIDUI	40
3.7.2. ANALISI COMPONENTE VOLATILE	42
3.7.3. DETERMINAZIONE ETANOLO	43
3.7.4. DETERMINAZIONE ALCOLI SUPERIORI	44
3.7.5. DETERMINAZIONE POLIFENOLI	44
3.7.6. DETERMINAZIONE ACIDO LATTICO	45
3.7.7 DETERMINAZIONE DEGLI AMINOACIDI PRONTAMENTE ASSIMILABILI	47
3.8. ANALISI SENSORIALE	48
CAPITOLO 4 – RISULTATI	49
4.1. VALUTAZIONE DELL’ATTITUDINE FERMENTATIVA	49
4.2. PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA	52
4.3. PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI	57
4.4. PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI	60
4.5. ANALISI SENSORIALE	63

CAPITOLO 5 – DISCUSSIONI	66
CAPITOLO 6- CONCLUSIONI	70
CAPITOLO 7– BIBLIOGRAFIA	72
7.1 SITOGRAFIA	78

CAPITOLO 1-INTRODUZIONE

La birra rappresenta una delle bevande fermentate alcoliche la cui storia ha radici molto antiche. Le prime testimonianze sulla produzione di una bevanda fermentata molto simile alla birra risalgono al periodo dei Sumeri e Assiro-Babilonesi. La scoperta della birra probabilmente fu favorita quando l'uomo, abbandonando lo stile di vita nomade, iniziò le coltivazioni di cereali e frumento. La più antica testimonianza che riguarda l'attività della produzione della birra può essere osservata su delle tavolette sumere risalenti al 1800 a.C. (Katz and Maytag, 1991) la quale non solo nomina la birra, ma addirittura il mestiere di birra. La birra si diffuse poi nel Medio Oriente come Egitto ed Israele. In Italia gli Etruschi furono i primi a produrre birra, fino a contagiare i Romani. Il Medioevo diede una svolta nella produzione della birra difatti la birra divenne la protagonista soprattutto per merito dei monasteri i quali aggiunsero anche alcuni nuovi ingredienti, tra i quali il luppolo, grazie al quale la birra poteva conservarsi meglio e più a lungo. Nel 1516 in Germania fu emanata in Baviera la prima legge "Reinheitsgebot" ovvero Editto della Purezza in merito alla produzione di birra. All'interno delle materie prime però non figuravano i lieviti, dato che il loro ruolo all'interno delle fermentazioni non era stato ancora scoperto (Hornsey, 2016). Oggi la birra è regolata dalla legge del 16 Agosto 1962 in cui nell' Art. 1 e 4 è dichiarato: "La denominazione "birra" è riservata al prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi delle specie *Saccharomyces carlsbergensis* o di *Saccharomyces cerevisiae* di un mosto preparato con malto, anche torrefatto, di orzo o di frumento o di loro miscele ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi. Nella produzione della birra è consentito l'impiego di estratti di malto torrefatto e degli additivi alimentari consentiti dal decreto del Ministro della sanità 27 febbraio 1996, n. 209. Il malto di orzo o di frumento

può essere sostituito con altri cereali, anche rotti o macinati o sotto forma di fiocchi, nonché con materie prime amidacee e zuccherine nella misura massima del 40% calcolato sull'estratto secco del mosto. È vietato aggiungere alla birra o, comunque, impiegare nella sua preparazione alcoli sostanze schiumogene”. Le materie prime per la produzione della birra quindi sono: malto, luppolo, acqua e lievito con la seguente composizione media: acqua (91-95%), alcol (3.5-5.0%), carboidrati (3.0-4.5%), proteine (0.2-0.65%) (De Stefano and Montanari, 1996) e meno dell'1% di minerali, vitamine (B1, B2, C, E), acidi organici, polifenoli e composti amari ed aromatici.

1.1 MATERIE PRIME

Le materie prime per la produzione della birra sono sostanzialmente malto (soprattutto orzo distico ma possono essere ammesse anche altre graminacee come grano e avena < del 40%); luppolo, acqua e il lievito.

1.1.1 ACQUA

L'acqua utilizzata per la produzione della birra rientra nelle acque destinate al consumo umano ovvero tutte quelle acque, qualunque ne sia l'origine, che, dopo eventuali trattamenti, sono fornite al consumo umano ovvero sono utilizzate, mediante incorporazione o contatto, nella manipolazione di prodotti o sostanze destinate al consumo umano (DPCM 8 febbraio 1985). L'acqua rappresenta circa il 90-95% della birra e in termini di sali minerali ed eventuali altre sostanze disciolte presenti al suo interno si può dire che influenza la birra sotto due aspetti: gusto e produzione. I sali minerali disciolti nell'acqua determinano la durezza di quest'ultima. La durezza dell'acqua viene espressa in gradi francesi (°f): un grado rappresenta 10 mg di carbonato di calcio (CaCO_3) per litro di acqua ($1^\circ\text{f} = 10 \text{ mg/L} = 10 \text{ ppm}$ – parti per milione). Nel 1953, Paul Kolbach determinò che l'aumento dell'alcalinità dell'acqua fa aumentare il pH del mosto il quale ha come optimum di pH 5.2-5.4. Quindi la presenza di acque dure ha ripercussioni negative a livello di degradazione di amido e proteine unitamente ad una vigorosa estrazione delle glumelle con impatto organolettico negativo nel prodotto finito (Buiatti, 2004). Il valore di pH se > 5.4 ha un effetto negativo sui vari enzimi, difatti provoca una lenta idrolisi di amido e proteine, una filtrazione e una resa in estratto meno efficiente e una minore concentrazione di FAN (Free Amino Nitrogen) e azoto solubile. Un pH troppo alto inoltre provoca l'estrazione di tannini e polifenoli dal malto; ciò lo si osserva durante la fase risciacquo

delle trebbie in cui si possono avere effetti negativi sulle caratteristiche organolettiche della birra (astringenza). Un valore di pH basso aumenta invece la stabilità aromatica del prodotto.

1.1.2 ORZO

Il cereale più utilizzato per la produzione della birra è, ed è sempre stato, l'orzo appartenente alla famiglia delle *Graminacee*. L'orzo coltivato appartiene alla specie *Hordeum vulgare*. L'orzo rappresenta dopo il frumento, riso e mais il quarto cereale in ordine di importanza (Giardini et al., 2002). La varietà più utilizzata soprattutto in Europa, è rappresentata dall'orzo distico (figura 1); la distinzione tra orzo distico e tetrastico si nota nel momento in cui due, o quattro fiori vengono resi fertili sviluppando così un numero pari di chicchi sulle rachidi.



Figura 1. Orzo distico

Inoltre, l'orzo distico apporta un adeguato contenuto proteico ed una e maggiore produzione di α e β – amilasi durante la germinazione (Sunier, 1988). Le caratteristiche più importanti dell'orzo sono l'umidità (che deve essere inferiore al 15%), la capacità germinativa (non inferiore al 95%), la resistenza alle fitopatie, il basso contenuto in proteine e il rapido assorbimento di acqua. Il principale macronutriente presente nell'orzo è

rappresentato dai carboidrati presenti in quantità pari al 70-85%. Il 55% è costituito dall'amido, formato da amilosio (16-24% dell'amido) ed amilopectine (76-84% dell'amido). L'amido una volta idrolizzato è la fonte principale di carboidrati in fase fermentativa. Inoltre, sono presenti zuccheri semplici rappresentati da saccarosio, glucosio e fruttosio e due polisaccaridi: emicellulose e cellulosa. L'emicellulosa è il costituente principale della parete delle cellule dell'endosperma. Sia la cellulosa (localizzata nelle glumelle) che l'emicellulosa conferiscono resistenza meccanica e rigidità al seme. Questi due polisaccaridi costituiscono le fibre alimentari, sostanze commestibili di origine vegetale che non vengono idrolizzate dagli enzimi secreti dall'apparato digerente umano. Le proteine presenti nell'orzo sono circa 10.5-11.5% e nella birra finita se ne possono ritrovare solo 1/3. Le proteine principali sono le gluteline (30%) e le prolamine (37%) le globuline e le albumine sono rispettivamente il 15 e 11%. Questo macronutriente conferisce alla birra sia note positive in quanto fondamentali poiché danno origine alla schiuma ma allo stesso tempo possono causare intorbidimenti dovuti soprattutto alle globuline che tendono a solubilizzarsi. Inoltre, in percentuali più basse 1.5-2% si possono ritrovare i lipidi, presenti sotto forma di trigliceridi i quali hanno un effetto negativo sulla qualità della birra, in particolare modo sulla schiuma. L'orzo contiene inoltre piccole quantità di vitamine (B1, B2, C, E) importanti nel metabolismo dei lieviti e sostanze polifenoliche, che se solubilizzate possono essere responsabili di un gusto aspro e di intorbidamenti (Cabras et al., 2004). Fra i composti bioattivi quindi si possono individuare polifenoli e acidi fenolici, soprattutto acido ferulico, composti con importanti attività antiossidanti, antimicrobiche ed immunomodulatorie (Hammed et al., 2014).

1.1.3 LUPPOLO

Il luppolo rappresenta la sostanza amaricante della birra (figura 2). L'uso del luppolo per la produzione di birra iniziò a diffondersi dal XII secolo, grazie agli studi di Santa Hildegard von Bingen (1098-1179). La pianta del luppolo (*Humulus lupulus*) si può identificare come pianta rampicante dioica appartenente alla famiglia delle *Cannabaceae*. Essendo una pianta dioica le piante del luppolo si dividono in piante maschili e femminili e solo quest'ultime producono i coni i quali sono usati per la produzione di birra. Le infiorescenze femminili si ritrovano riunite in coni disposti a grappolo e all'interno dei coni floreali femminili, si trova una sostanza polverosa gialla: la luppolina; quest'ultima contiene principalmente resine e oli essenziali e in quantità minori tannini e terpeni. La raccolta è fatta a mano o macchina; 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%. Le resine rappresentano circa il 15-20% del luppolo. Le sostanze nelle resine responsabili dell'azione amaricante sono gli α -acidi e β -acidi (Ono et al., 1986). Gli α -acidi chiamati umuloni sono: umulone, coumulone, adumulone. (De Keukeleire, 2000) i quali possiedono un potere amaricante nettamente superiore rispetto ai β -acidi. La reazione che porta all'isomerizzazione ha luogo durante l'ebollizione o con l'utilizzo di acque dure quindi a pH basici e ad alte temperature fa sì che gli α -acidi i quali risultano essere poco solubili e scarsamente amari, vengano trasformati nei molto più solubili iso- α -acidi (Cabras et al., 2004). Nelle resine, inoltre, si riscontra la presenza anche dei β - acidi (lupulone, colupulone, adlupulone). I β -acidi contribuiscono in misura minore come detto in precedenza ad amaricare la birra anche se isomerizzati; diventano amaricanti se ossidati, quindi quando invecchiano. Un altro aspetto

fondamentale dal punto di vista tecnologico è la presenza dei tannini i quali insieme alle resine sono responsabili del miglioramento della stabilità della schiuma. In ultima istanza anche gli oli essenziali (alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni) rappresentano una componente molto importante per l'aroma del prodotto finito. Nel 1819 Hanin fu il primo a utilizzare la distillazione in corrente di vapore per isolare gli oli essenziali del luppolo, ma solo alla fine del diciannovesimo secolo Alfred Chapman identificò i composti chiave mircene, umulene, linalolo, linalil-isonato, geraniolo e diterpeni (Hieronymus, 2016).



Figura 2. Luppolo

Il luppolo si può classificare in:

- Luppolo da amaro che viene aggiunto a inizio bollitura e caratterizzato dalla presenza del 6-10% α -acidi.
- Luppolo da aroma aggiunto a fine bollitura e con il 5% α -acidi.
- Luppoli ambivalenti con α -acidi > 6%.

1.1.4 LIEVITO

Il lievito è fondamentale per la birra, difatti la funzione del lievito non è importante solo nella conversione di zuccheri in alcol ma anche per il gusto e l'aroma (White and Zainasheff, 2016). Le specie di lievito però maggiormente utilizzate nel processo fermentativo sono *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* (Lodolo et al., 2008) (figura 3). Utilizzare una specie piuttosto che un'altra è necessaria per distinguere due metodi differenti di fermentazione del mosto di birra: “alta fermentazione” e “bassa fermentazione”. *S. pastorianus* (bottom yeast) viene utilizzato per la produzione della birra definita lager (7-15°C). *S. cerevisiae* è utilizzato per le birre ad alta fermentazione (18–22°C) e caratterizzato dalla capacità nei tradizionali fermentatori aperti di risalire sulla superficie del recipiente e ritrovarsi nella schiuma, a differenza di *S. pastorianus*, a fine processo produttivo. *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* si differenziano per vari aspetti: i lieviti lager differiscono dai lieviti ale nell'assimilazione del maltosio e del maltotriosio (Zheng et al., 1994; Stewart, 2010). La diversa capacità dei lieviti di metabolizzare il melibiosio (i ceppi lager possono farlo grazie alla presenza di una α -galattosidasi (Tubb and Liljestrom, 1986) e la tolleranza alla temperatura (Lawrence, 1983).

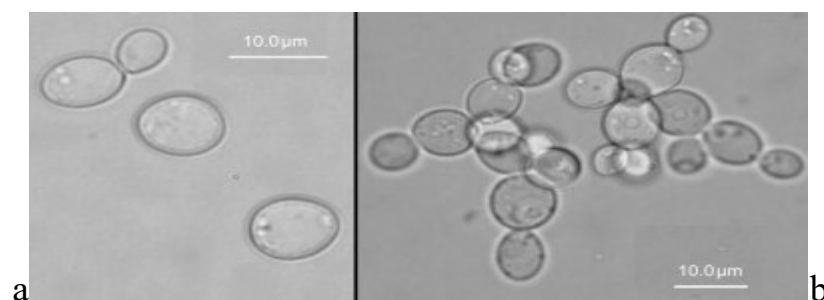


Figura 3. *S. pastorianus* (a) e *S. cerevisiae* (b)

1.2 PROCESSO PRODUTTIVO

Il processo produttivo può essere suddiviso in quattro fasi: la maltizzazione, ovvero la trasformazione dell'orzo in malto; l'ammostamento, che porta alla formazione di mosto di birra; la fermentazione, che trasforma gli zuccheri in etanolo, anidride carbonica e composti secondari e processi di downstream, i quali terminano con il prodotto finito e pronto per il consumo (Linko et al., 1998).

1.2.1 MALTAZIONE

La maltazione è una fase fondamentale dal momento che permette di trasformare l'orzo in malto e di ottenere un aumento del patrimonio enzimatico grazie alla presenza di diversi enzimi (destrinasi, xilanasi, eso/endo – β – glucanasi ed anche lipasi); quindi in questa fase gli enzimi, non presenti all'inizio nell'orzo, vengono resi disponibili per degradare amido, proteine e altri componenti ed ottenere zuccheri, amminoacidi e acidi grassi indispensabili per supportare la crescita dei lieviti (Harrison MA, 2009). Esistono vari tipi di malto che si differenziano in base alla diversa concentrazione proteica e alla colorazione: malto chiaro ottenuto a bassa temperatura di germinazione (15-18 °C) e per breve tempo, caratterizzato da una bassa concentrazione proteica. Il malto scuro al contrario si ottiene attraverso un'elevata temperatura di germinazione (23-25°C) e per un tempo più lungo e da ciò si ottengono malti ad alta concentrazione proteica e di conseguenza birre molto più scure. Il processo di maltazione inizia con l'idratazione del seme, la germinazione e per finire l'essiccazione. Nella prima fase si assiste all'idratazione dei semi di graminacee, selezionati e con l'umidità del 12-14% i quali vengono trasferiti in vasche di macerazione

fino al raggiungimento di un'umidità quantificabile in un range compreso tra il 42 – 47% (Sicheri, 1983) così da dare inizio alla germinazione. Durante la germinazione che avviene in germinatoi a griglie le gibbellerine ossia gli ormoni della crescita guidano la biosintesi degli enzimi amilasici, proteolitici ed endoglucanasi quindi rivestono un ruolo cruciale in ambito commerciale poiché guidano la produzione di malto da orzo. Dopo circa una settimana ovvero il tempo utile per la germinazione quest'ultima viene interrotta e attraverso un trattamento termico che può essere realizzato a diverse temperature (50-60°C, 71°C o 92°C) si ha la riduzione dell'umidità dei semi arrivando ad un'umidità rispettivamente del 23%, 12% e 5%. L'essiccamento è uno degli step conclusivi della maltazione in cui si assiste ad una perdita aggiuntiva dell'umidità, la produzione di composti che influiscono sul colore, aroma e gusto e il mantenimento degli enzimi formati durante la germinazione (Cabras et al., 2004).

1.2.2 AMMOSTAMENTO

L'ammostamento è un passaggio fondamentale nella produzione della birra ed è un processo che ha come scopo quello di riscaldare all'interno di un ammostatore il malto e l'acqua così da poter solubilizzare la maggior quantità possibile di sostanze mediante l'azione di enzimi con lo scopo di ottenere un composto zuccherino fermentabile dai lieviti (Boulton and Quain, 2006). Tutte le sostanze che passano in soluzione vengono indicate come estratto e prima di questa fase solo il 15-25% del malto è solubile (Montanari et al, 2005). Prima di procedere con l'ammostamento è necessario che le cariossidi vengono macinate così da migliorare sia l'efficacia della filtrazione del mosto e per questo che si evita una macinatura eccessivamente spinta poiché renderebbe difficoltoso il successivo

risciacquo delle trebbie, che per aumentare la superficie di contatto con l'acqua, facilitare l'estrazione delle sostanze contenute nel malto e favorire le reazioni enzimatiche (Pires et al., 2014). Il malto successivamente viene mescolato con acqua all'interno di appositi tini controllando i tempi e le temperature in modo tale che gli enzimi possano espletare la propria azione (tabella 1).

ENZIMA	OPTIMUM Temperatura	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 β -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)
α -amilasi	72-75°C	5.6-5.8	Degradazione amido(destrine)

Tabella 1. Funzione e valori ottimali di pH degli enzimi del mosto

Si inizia con una sosta di 10-20 minuti che avviene a temperatura 45-55°C necessaria per l'idrolisi delle proteine in sostanze azotate più semplici (peptidi e amminoacidi liberi) ad opera delle proteasi e peptidasi. Tale sosta è fondamentale per la successiva attività dei lieviti i quali potranno sfruttare gli amminoacidi per il loro metabolismo (Wolf and Hall, 2007). Successivamente ad una temperatura di 58-63°C e per 60-70 minuti avviene la

seconda sosta in cui le β – amilasi promuovono l'idrolisi dei legami α – 1,4 – D – glucosidici presenti nelle porzioni più esterne dell'amido (esoamilasi) liberando zuccheri fermentescibili come il maltosio. Le α -amilasi invece agiscono a 68-73 °C sui legami α – 1,4 – D – glucosidici presenti nelle porzioni più interne dell'amido (endoamilasi) liberando essenzialmente zuccheri non fermentescibili come le destrine non utilizzate da *S. cerevisiae* ma responsabili dell'aumento del corpo della birra. Al termine del processo di ammostamento la temperatura viene portata a 78°C per inattivare gli enzimi e per favorire il successivo processo di filtrazione. Inoltre, si può procedere con un'ulteriore fase alla temperatura di 36-45°C, per promuovere l'azione di fitasi e β -glucanasi. Le fitasi sono responsabili dell'acidificazione del mosto, agiscono a 30-52°C andando a degradare la fitina, sale insolubile di calcio e di magnesio dell'acido fitico, in fosfato di calcio o di magnesio ed acido citrico; le β -glucanasi invece degradano i β -glucani. Uno dei parametri fondamentali per il corretto svolgimento delle reazioni enzimatiche è il pH il quale inizialmente è 5.8 del mosto mentre il valore ottimale del pH degli enzimi è 5.2. L'ammostamento può essere svolto attraverso due metodi: per infusione e per decozione. L'ammostamento per infusione prevede un riscaldamento evitando di raggiungere l'ebollizione con opportune soste a valori di temperatura specifici con tempi prestabiliti. L'ammostamento per decozione invece è un metodo più antico e complesso in cui inizialmente si preleva una parte della miscela che viene trasferita in un bollitore e portata all'ebollizione e in un secondo momento ritrasferita nell'ammostatore fino a raggiungere la temperatura desiderata. Terminata la fase di ammostamento si passa alla filtrazione e quindi una volta ottenuto il mosto si separa la porzione solida ovvero le trebbie da quella liquida (il mosto). Il mosto dopo essere stato filtrato viene trasferito in caldaie di rame e portato all'ebollizione. La bollitura del mosto ha una durata circa di un'ora due ore e

mezza e serve per la chiarificazione, per rimuovere le sostanze indesiderate, inoltre è necessaria sia per la sterilizzazione del mosto che per inattivare gli enzimi, per migliorare l'estrazione, l'estrazione di oli essenziali e resine dal luppolo (Harrison, 2009). Gli anglosassoni utilizzano i termini *kettle hopping*, *late hopping* e *dry hopping* per descrivere i diversi momenti della fase del processo in cui il luppolo può essere aggiunto; il luppolo può essere aggiunto a fine bollitura (*dry hopping*) per enfatizzare il carattere luppolato della birra. La miscela risultante è chiamata *hot trub* (Boulton and Quain, 2006). I *trub* a caldo che si ottengono post bollitura vengono separati ed eliminati con l'aiuto di un contenitore specifico *whirlpool* per poi essere raffreddati con degli scambiatori di calore in cui si aspetta che la temperatura raggiunga circa 60°C momento in cui avviene una seconda precipitazione dei *trub* a freddo ottenuti dalla degradazione di proteine e polifenoli, i quali però non vengono eliminati poiché il loro allontanamento determinerebbe una perdita delle caratteristiche organolettiche del prodotto finito. Arrivati a questo punto la temperatura viene abbassata a 10–20 ° C, a seconda della birra desiderata: bassa o alta fermentazione (Cabras and Martelli, 2004; Manzoni, 2006).

1.2.3 FERMENTAZIONE

Appena ottenuto il mosto si procede con l'inoculo del lievito. I lieviti selezionati devono avere determinate caratteristiche ossia essere altamente vitali e con una buona resistenza all'alcool. Una volta avviata la fermentazione è necessario che il tasso di crescita del lievito venga controllato attraverso l'utilizzo di alcuni parametri, come l'apporto di nutrienti, un inoculo corretto, l'ossigeno disciolto e adeguata temperatura (Lodolo et al., 2008). È importante garantire un certo grado di ossigenazione per favorire la

moltiplicazione del lievito nelle prime ore del processo fermentativo e per la sintesi di steroli e acidi grassi insaturi a lunga catena. L'attività del lievito è responsabile della formazione di gran parte dei composti secondari aromatici indispensabili per l'aroma della birra, come alcoli superiori, esteri, acidi organici e composti carbonilici (aldeidi e chetoni). La fermentazione può essere suddivisa in: fermentazione primaria e fermentazione secondaria (o maturazione). La fermentazione primaria dura circa 7-10 giorni e viene condotta a differenti temperature; 12°C (birra Lager) e i 20-22°C (birra Ale). La fermentazione primaria in cui vengono assimilati la gran parte dei carboidrati del mosto e che porta all'ottenimento della birra immatura (birra verde) (Zara et al., 2014). Conclusa la prima fase segue la fase secondaria con una durata di circa 3-5 settimane in cui la temperatura raggiunge valori di 2-4 ° C per la bassa fermentazione e di 7-10 ° C per l'alta fermentazione. In questa fase la maggior parte del lievito viene separato dalla birra e quest'ultima viene trasferita nei serbatoi di maturazione in cui grazie all'azione di lieviti ancora presenti si assiste alla fermentazione degli zuccheri residui e all'eliminazione di composti indesiderati. La fermentazione nel momento in cui si assiste all'aumento della concentrazione alcolica e all'esaurimento di zuccheri e nutrienti inizia bloccarsi e i lieviti esausti si depositano. La birra verde (o immatura) per poter essere definita matura deve subir tre passaggi: la saturazione di anidride carbonica derivante dai lieviti non rimossi in seguito alla fermentazione primaria; la chiarificazione, causata dalla precipitazione di lieviti residui e flocculi tanno-proteici e l'affinamento di gusto e aroma, grazie all'attenuazione dell'amaro del luppolo e all'armonizzazione dei composti aromatici presenti (Cabras and Martelli, 2004; Manzoni, 2006). È importante nel corso della fermentazione controllare la temperatura, l'umidità e il pH il quale deve essere di circa 5.2-5.3 a inizio fermentazione e scendere fino ad un valore di 4.1-4.2 a fine fermentazione.

1.2.4 DOWNSTREAM

La birra matura a fine fermentazione subisce alcuni step a volte facoltativi adottati in base al prodotto finale desiderato. Alcuni di questi step prevedono l'aggiunta delle proteasi così da evitare la comparsa di torbidità che si manifesta durante la refrigerazione. Uno step importante prevede l'aggiunta di diossido di carbonio direttamente al prodotto oppure si può aggiungere lievito fresco in grado di condurre una naturale fermentazione secondaria. La birra sia in lattine che in bottiglia prima di essere confezionata deve essere chiarificata per filtrazione o centrifugazione per eliminare tutti i residui e così da poter ottenere una maggiore stabilità (inattivare gli enzimi e i microrganismi). Le bottiglie o le lattine di birra sono pastorizzate al calore (62°C per 20 minuti). Per evitare che la birra subisca una perdita delle sue caratteristiche organolettiche dovuta alle alte temperature si preferisce la pastorizzazione flash (71-75°C per 15-30 secondi) in cui la birra viene riscaldata in uno scambiatore di calore o la pastorizzazione "a freddo", HPP (High Pressure Processing) (figura 4) la quale sfrutta la combinazione di alte pressioni e tempo per distruggere e inattivare enzimi e microrganismi patogeni. Le birre pastorizzate avendo subito trattamenti termici al calore hanno una conservabilità superiore ai tre mesi, ma esistono anche birre non pastorizzate, aventi una shelf-life di circa 1 mese le quali devono essere mantenute refrigerate per preservarne la massima qualità (Harrison MA, 2009).



Figura 4. Impianto di pastorizzazione

1.3 BIRRA ARTIGIANALE

La produzione di birra artigianale ha avuto un ampliamento enorme del numero di birrifici grazie anche all'approvazione il 6 luglio 2016 della legge n°154/2016, andando ad integrare la legge 1354/1962, introducendo all'articolo 2 il comma 4 bis:

“Si definisce birra artigianale la birra prodotta da piccoli birrifici indipendenti e non sottoposta, durante la fase di produzione, a processi di pastorizzazione e microfiltrazione. Ai fini del presente comma si intende per piccolo birrificio indipendente un birrificio che sia legalmente ed economicamente indipendente da qualsiasi altro birrificio, che utilizzi impianti fisicamente distinti da quelli di qualsiasi altro birrificio, che non operi sotto licenza e la cui produzione annua non superi i 200.000 ettolitri, includendo in questo quantitativo le quantità di prodotto per conto terzi”.

La birra artigianale si è affermata soprattutto negli Stati Uniti, dove inizialmente rappresentava il 7,6% delle vendite di birra e oltre il 90% dei birrifici nel 2011. In Italia, è stato stimato che nel 2007 erano in funzione almeno 175 microbirrifici, mentre nel 2017 questo ha superato le 600 unità (www.assobirra.it), e rappresenta circa il 4-5% della produzione di birra (Canonico et al., 2014). Per quanto riguarda la commercializzazione, le birre Lager rappresentano la maggior parte del mercato della birra (90%), seguite dalle birre Ale (5%) e la restante parte è composta da birre prodotte con fermentazioni miste o spontanee di lieviti e batteri (Petrucci et al., 2016). Negli ultimi decenni grazie all'influenza esercitata dalle richieste dei consumatori sempre più orientati al gusto e alla qualità, il mercato è orientato verso il miglioramento della qualità, attraverso una differenziazione dei prodotti mirando sempre più alla produzione di birre "artigianali", ottenute con materie prime di qualità, nate dalla reinterpretazione di stili tradizionali. Si tratta della cosiddetta craft beer revolution (Fastigi et al., 2015). Le birre industriali filtrate e pastorizzate garantiscono sicuramente una stabilità chimico-fisica e biologica ma risultano caratterizzate da una maggiore standardizzazione sensoriale e di conseguenza una perdita nettamente superiore di aroma e sapore a differenza della birra artigianale la quale attraverso una fase di rifermentazione e all'aggiunta di zucchero e lievito starter risulta essere influenzata notevolmente a livello del profilo aromatico del prodotto finale, conferendo alla birra il suo bioflavour distintivo (Canonico et al., 2014).

1.4 UTILIZZO DEI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES NELLA PRODUZIONE DI BIRRA ARTIGIANALE

In ambito brassicolo la maggior parte delle birre si ottengono mediante l'utilizzo del lievito *S. cerevisiae*, per la birra Ale, e il *S. pastorianus* per la birra Lager anche se ultimamente sta crescendo molto l'interesse verso l'utilizzo di specie di lievito non-*Saccharomyces*. I lieviti non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste con *S. cerevisiae* vengono utilizzati per conferire al prodotto proprietà sensoriali peculiari ed uniche; quindi, per migliorare la qualità del prodotto finale possono essere un mezzo per aumentare la diversità dell'aroma e del sapore nelle bevande fermentate (Varela, 2016). L'uso di lieviti non-*Saccharomyces* risulta funzionale per la produzione di birre a basso contenuto alcolico, birre funzionali con un miglioramento del profilo aromatico (Basso et al., 2016). La scelta del lievito ha un grande impatto sui metaboliti che conferiscono alla birra il suo sapore caratteristico, tra cui acetati, etil esteri e alcoli superiori (Pires et al., 2014). Le principali specie di lievito non-*Saccharomyces* studiate e utilizzate per la produzione di birra artigianale sono: *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Lachancea fermentati*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Hanseniaspora vineae*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kazachstania unispora*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia kluyveri*, *Cyberlindnera saturnus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces subpelliculosus*, *Wickerhamomyces anomalus*. La specie *T. delbrueckii* è stata considerata per la produzione della birra grazie alla capacità di migliorare il sapore e consentire un prodotto a ridotto contenuto di etanolo (Canonica et al, 2016, Ciani et al, 2010, King et al, 2000). *L. thermotolerans* (ex *Kluyveromyces thermotolerans*) in particolare è stato studiato per la sua capacità di diminuire il pH con produzione di acido lattico. I ceppi

appartenenti alla specie *Pichia spp.* ad esempio, è caratterizzata dalla produzione di fenoli, con l'eccezione di *Pichia kluyveri*, con un forte e piacevole aroma di frutta e di banana (Gutiérrez et al., 2018).

1.5 PRINCIPALI COMPOSTI AROMATICI DELLA BIRRA

Le specie di lievito non convenzionali possiedono un potenziale promettente per il miglioramento dei sapori (aroma e gusto) desiderabili nella produzione della birra (Gutiérrez et al., 2018). In generale il lievito ha un ruolo tecnologico con importanti riflessi sul profilo sensoriale poiché non solo è in grado di convertire lo zucchero del mosto in etanolo, anidride carbonica ma coinvolge composti volatili attraverso attività metaboliche. I principali composti volatili ottenuti (alcoli superiori, esteri, acidi organici, idrocarburi, aldeidi, chetoni e sostanze terpeniche) derivano sia dalle materie prime che dalle tecnologie utilizzate durante il processo di fermentazione.

1.5.1 ALCOLI SUPERIORI

Gli alcoli superiori rappresentano il prodotto del metabolismo secondario dei lieviti e vengono sintetizzati nella via metabolica di Ehrlich (figura 5) in cui gli aminoacidi presenti nel mosto vengono assorbiti e deaminati a α -chetoacidi che vengono a loro volta decarbossilati ad aldeidi e successivamente ridotti ad alcoli. Nel momento in cui il mosto ha un basso tenore aminoacidico, gli α -chetoacidi possono essere biosintetizzati dal lievito

attraverso il metabolismo dei carboidrati e a loro volta convertiti in alcoli superiori (Zara et al., 2014).

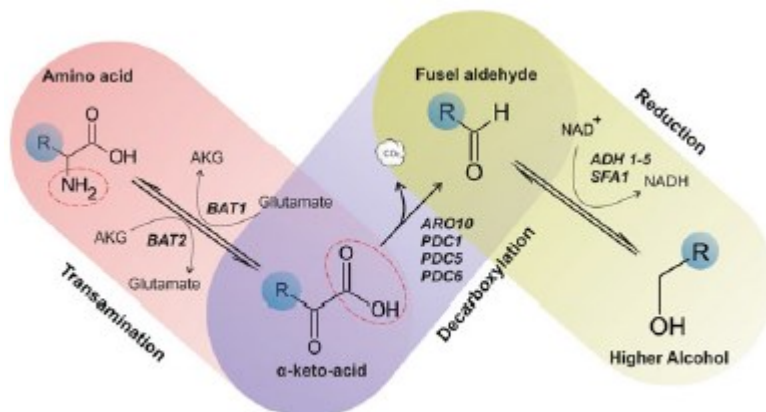


Figura 5. Via metabolica di Ehrlich (Pires et al., 2014)

Gli alcoli superiori più rappresentativi i quali influiscono sulla produzione di aromi nella birra sono: n-propanolo, l'isobutanolo, l'alcol isoamilico, l'alcol amilico e 2-feniletanolo. La concentrazione di tali alcoli superiori >300 mg/L nella birra può portare a un odore e un sapore forte e pungente, mentre livelli ottimali impartiscono caratteristiche desiderabili (Olaniran et al., 2016). N-propanolo con una concentrazione pari a 600 mg/L conferisce al prodotto un sapore alcolico dolce. L'isobutanolo ottenuto dal metabolismo valina ha un effetto indesiderato sulla qualità della birra se la sua concentrazione supera il 20% della quantità totale di n-propanolo, alcool isobutilico e alcool isoamilico (Olaniran et al., 2016). L'alcol isoamilico invece che deriva dal catabolismo della leucina, conferisce un aroma fruttato di banana mentre il 2-fenil etanolo (40mg/L), dona una nota dolce e fruttata alla birra (Michel et al., 2016). Le variabili di processo fermentativo ossia la densità del mosto (elevato grado plato > 13°P), la temperatura, la pressione, la quantità di ossigeno disciolto

(elevata ossigenazione del mosto e l'entità dell'inoculo), influiscono sulla concentrazione delle sostanze aromatiche.

1.5.2 ESTERI

Gli esteri comprendono forse il più importante insieme di componenti attivi della birra come conseguenza del metabolismo del lievito. Le concentrazioni nelle birre sono tipicamente meno di 1 ppm per i componenti minori e 10-20 ppm per l'acetato di etile (tabella 2) (Boulton and Quain, 2006).

ESTERI	CONCENTRAZIONE (ppm)
Etil acetato	8-12
Isobutilacetato	0.03-0.05
Etilbutirrato	0.04-0.06
Acetato di isoamile	1-1.5
Etilsanoato	0.12-0.18

Tabella 2. Concentrazioni degli esteri nelle birre

Gli esteri anche se presenti solo in tracce rispetto ad altri metaboliti sono uno dei composti volatili più importanti che hanno grande importanza poiché possono definire il suo aroma finale (Pires et al., 2014). Tuttavia, se prodotti sopra i valori soglia, possono influenzare negativamente la birra con un gusto amaro e troppo fruttato. Per il birraio difatti è fondamentale mantenere le condizioni ottimali per ottenere una birra equilibrata in termini del suo profilo di esteri. Ci sono due gruppi principali di esteri volatili nelle bevande fermentate. Il primo gruppo contiene gli esteri acetati in cui il gruppo acido è acetato e il gruppo alcolico è l'etanolo o un alcol complesso. Tra gli esteri più importanti si possono

ritrovare: l'acetato di etile (aroma di solvente), l'acetato di isoamile (aroma di banana) e l'acetato di fenile (rose, miele), esanoato di etile (aroma di mela dolce) ed etile ottanoato (aroma di mela acida). Di questi esteri, l'acetato di etile è tipicamente presente nella più alta concentrazione (Olaniran et al., 2016). L'etil acetato ha una concentrazione soglia nella birra pari a 30 mg/L, ma per le birre di tipo lager la concentrazione raccomandata è <5 mg/L (Olaniran et al., 2016). L'intenso aroma fruttato è dato sia dall'isoamil acetato (aroma di banana con una soglia di 1,6 mg / L) che dall'isobutil acetato (aroma fruttato e dolce con una soglia di 1,6 mg / L) e il feniletil acetato (aroma di rosa, mela e miele con una soglia di 3,8 mg / L). Gli esteri etilici i quali rappresentano il secondo gruppo in cui il gruppo alcolico è l'etanolo e il gruppo acido è un acido grasso a catena media, comprendono l'esanoato di etile (aroma di mela), etile ottanoato (aroma di mela acida) ed etile decanoato (Olaniran et al., 2016). Tra questi i più rappresentativi sono: l'esanoato di etile il quale ha una bassa concentrazione soglia di 0,005 mg/L, etile ottanoato a 0,5 mg/L ed etile decanoato a 1,5 mg/L (Olaniran et al., 2016). La concentrazione degli esteri nella birra come per gli alcoli superiori dipende dal grado Plato (> 13°P), dal tipo di fermentazione alta 40-60 mg/L, bassa 30-50 mg/L e dalla disponibilità di ossigeno.

1.5.3 ACIDI ORGANICI

Un altro gruppo di composti presenti nella birra sono gli acidi organici (oltre alla CO₂) i quali influiscono sull'acidità/pH e sul gusto della birra (acidità, asprezza, acidità) e hanno effetti fisiologici positivi (diuretico, riduzione dell'acido urico) (Montanari et al., 1999).

Gli acidi organici si possono differenziare in due gruppi ben precisi ossia acidi volatili e acidi non volatili. Gli acidi volatili che incidono maggiormente sul sapore sono acetici, caprilici, caprici e laurici (Micheal et al., 2016). Tra gli acidi volatili ritroviamo: acido acetico (con un valore soglia di 175 mg/L), acido propionico, acido butirrico ed isobutirrico, acido valerico e iso-valerico, acido esanoico (acido caproico), acido ottanoico (o acido caprilico) acido decanoico (o acido caprico), acido dodecanoico (acido laurico). Il livello di questi acidi devono essere controllati e principalmente dipendono dal ceppo di lievito e dalle condizioni di fermentazione le quali possono influenzare fortemente il livello. Una bassa aerazione può dare concentrazioni più alte di questi acidi (S. Engan 1973). I principali acidi non volatili nella birra prodotti dai lieviti che hanno un impatto sul sapore e l'aroma includono (soglia indicata): acido ossalico (500 mg/L, salato, ossidato), acido citrico (400 mg/L, aspro), acido malico (700 mg/L, mela), acido fumarico (400 mg/L, acido), acido succinico (220 mg/L, acido), acido lattico (400 mg/L, acido) e acido piruvico (300 mg/L, salato, da foraggio) (Micheal et al., 2016).

1.5.4 COMPOSTI FENOLICI

La sintesi dei fenoli avviene grazie a un enzima (Phenolic Acid Decarboxylase) che converte parte degli acidi fenolici in vinilfenoli. I più comuni composti fenolici sono: 4-vinilguaiacolo, 4-vinilfenolo, 4-etilguaiacolo, 4-etilfenolo, 4-vinilsiringolo, stirene, eugenolo e vanillina. La produzione di aromi fenolici è favorita dal livello di concentrazione dei loro precursori, gli acidi fenolici il ferulico, il cumarico e l'acido cinnamico, che provengono dal malto (Micheal et al., 2016) ma anche dalla specie di lievito. Le soglie per questi fenoli volatili sono basse: 4-etilfenolo, 0,9 mg/L (aroma

fenolico, astringente); 4-etilguaiacolo, 0,13 mg/L (aroma fenolico, dolce); 4-vinilguaiacolo, 0,3 mg/L (aroma fenolico, amaro, garofano); e 4-vinilfenolo 0,2 mg/L (aroma fenolico, affumicato) (Micheal et al., 2016).

1.5.5 COMPOSTI SOLFORATI

I composti solforici prodotti dal lievito in misura maggiore durante la fermentazione della birra fermentazione sono anidride solforosa e idrogeno solforato (Michel et al., 2016), si ritrovano inoltre dimetil solfuro (DMS) e mercaptani. L'anidride solforosa gioca un ruolo importante nella birra poiché agisce come antiossidante e di conseguenza aumenta considerevolmente la durata di conservazione della birra e conferisce stabilità del sapore. L'anidride solforosa ha una soglia di 2,5 mg/L, che è una caratteristica positiva desiderata in alcune birre a bassa fermentazione (Michel et al., 2016). Come descritto in Clarke et al. (1991), durante la prima parte della fermentazione H_2S si accumula e poi diminuisce durante le fasi successive (Boulton and Quain, 2006). In confronto, l'idrogeno solforato è un composto indesiderabile perché ha un alto potenziale di mascherare altri sapori positivi della birra e ha una soglia molto bassa di 0,005 mg/L.

1.5.6 COMPOSTI CARBONILICI

L'acetaldeide e il diacetile sono i principali composti carbonilici indesiderati da considerare all'interno della birra. La formazione di acetaldeide nella birra avviene all'inizio e a metà della fermentazione. Più tardi, nella fase stazionaria, i livelli di

acetaldeide di solito diminuiscono (Boulton and Quain, 2006). L'acetaldeide ha una soglia di 10-20 mg/L e la sua presenza nella birra al di sopra del valore di soglia provoca degli off-flavour "erbosi" (Olaniran et al., 2016). Tuttavia, molti degustatori possono rilevare questo composto a livelli molto più bassi (Olaniran et al., 2016). Il diacetile ha un valore soglia pari a 0,1-0,15mg/L, oltre il quale conferisce alla birra un sapore di burro (Michel et al., 2016).

1.5.7 MONOTERPENI

I monoterpeni derivano dalle piante e nel caso specifico della birra dal luppolo.

Nella birra i monoterpeni principali che incidono in modo significativo per sapore e aroma sono: linalolo (5 µg/L, lavanda), α -terpineolo (2 mg/L, lilla), β -citronellolo (8 µg/L, lime), geraniolo (6 µg/L, rosa) e nerolo (0,5mg/L, agrumi) (Michel et al., 2016).

1.6 VALORIZZAZIONE DEI SOTTOPRODOTTI IN AMBITO BRASSICOLO

I birrifici producono diversi sottoprodotti come acqua, trebbie, luppolo esausto e lievito e considerando la produzione industriale di birra, i sottoprodotti sono disponibili in grandi quantità durante tutto l'anno. La sostenibilità ambientale nel riutilizzo dei sottoprodotti provenienti dai processi di trasformazione alimentare rappresenta un'area di interesse sempre crescente. Le trebbie esauste o Brewers' spent grain (BSG) sono il sottoprodotto più abbondante del processo di produzione della birra (Kunze et al., 2004). Il residuo secco

delle trebbie è composto da circa l'80% di fibre (cellulosa, emicellulosa e lignina) e dal 20% di proteine (gluteline, globuline e albumine). Sono presenti inoltre vitamine, amminoacidi e composti fenolici legati alla matrice lignino-cellulosica. Per riuscire a conservare il prodotto, è necessario pressarlo o essiccarlo in modo da avere un contenuto d'acqua inferiore al 10% (Andrighetto et al., 2021). La produzione complessiva di birra ha raggiunto valori molto elevati; di conseguenza, anche i quantitativi di BSG prodotti sono notevoli. Da 100 kg di malto si ottengono 100-130 kg di trebbie pari a 20-22 kg/hl di birra. Le trebbie vengono utilizzate quasi esclusivamente come mangime per i bovini o come concime, ma grazie alla presenza di una serie di componenti fondamentali (fibre, proteine e composti fenolici) risultano essere idonee a molteplici applicazioni (ad esempio la dieta umana). La versatilità delle trebbie è stata confermata da molti studi come quello finanziato dall'Assessorato all'Agricoltura della Regione Piemonte, in cui hanno valutato quali potevano essere gli effetti tecnologici e sensoriali dell'utilizzo della birra e dei prodotti ad essa collegabili (sottoprodotti) nella produzione di formaggi. Le prove sono state sviluppate su formaggi freschi, formaggi a pasta molle di breve e media stagionatura, formaggi erborinati, formaggi caprini, yogurt e ricotta (Zeppa et al., 2013). Inoltre, presso i laboratori dell'Agenzia veneta per l'Innovazione nel settore primario (Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimenatri di Thiene, VI) hanno esaminato le trebbie come possibile integrazione nei prodotti da forno previa fermentazione da parte di ceppi selezionati di batteri lattici. I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che le trebbie possono rappresentare sia un substrato per la fermentazione da parte di batteri lattici che un'integrazione da utilizzare negli impasti acidi per la panificazione. Le trebbie inoltre sembrano essere un ingrediente funzionale dotato di attività antiossidante interessante non solo al livello tecnologico nel mantenere la qualità e shelf-life del prodotto alimentare

finito, ma anche con potenziali benefici per la salute umana (Andrighetto et al., 2021) grazie alla presenza di polifenoli disponibili post fermentazione. L'altro sottoprodotto principale è il lievito di birra esausto (BSY). I lieviti di birra esausti (BSY) sono materie prime ad alta energia e ricche di proteine utilizzati anche loro soprattutto come feed. Inoltre, la composizione nutrizionale, l'attività antiossidante e il profilo dei composti fenolici di estratti di lievito di birra esausti e la rimozione delle pareti cellulari (per la separazione dei β -glucani), hanno mostrato che questo estratto di lievito risulta essere un potenziale ingrediente da utilizzare nella formulazione di alimenti funzionali e nutraceutici (Vieira et al., 2016). Il luppolo/*trub* esaurito è probabilmente il meno abbondante difatti la produzione di 1 hL di birra si traduce in 0,3 kg di luppolo esaurito il quale viene utilizzato principalmente come fertilizzante o compost (Musatto et al., 2006). Il luppolo esaurito a causa del loro sapore amaro non trova un'applicazione nell'alimentazione animale a differenza dei lieviti e del grano esaurito.

CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI

Nella produzione di birra artigianale l'attenzione è sempre più rivolta alla scelta delle materie prime e al tipo di processo di produzione che si desidera utilizzare. Inoltre, negli ultimi anni, c'è un'attenzione crescente verso la sostenibilità ambientale ed economica in ambito brassicolo. A questo riguardo, c'è un forte interesse della ricerca a valorizzare i sottoprodotti (trebbie, lievito esausto e luppolo) derivanti dalla produzione della birra.

Le trebbie, uno dei maggiori sottoprodotti della lavorazione della birra, rappresentano non solo uno scarto della birrificazione nella produzione di mosto ma possono costituire un ingrediente molto versatile per il food. La loro composizione include alti livelli di fibre alimentari, proteine e aminoacidi essenziali, nonché livelli apprezzabili di minerali, polifenoli, vitamine e lipidi. La valorizzazione di questo sottoprodotto è particolarmente importante a livello dei birrifici artigianali. Infatti, mentre in un birrificio industriale, per ottimizzare al massimo i costi di produzione ad ogni ammostamento si cerca di estrarre il più alto contenuto zuccherino dalle trebbie, in un processo artigianale non è così. Questo è essenzialmente dovuto al fatto che nel mondo craft, vengono prodotti diversi stili brassicoli e di conseguenza si attuano ammostamenti diversi a seconda dello stile che si vuole produrre. Alla luce di questo, e tenendo in considerazione un uso alternativo delle trebbie, usate principalmente come substrato alimentare per allevamenti, si è ipotizzato di continuare ad estrarre attraverso dei lavaggi delle trebbie, un substrato che abbia un contenuto zuccherino e nutrienti da poter essere impiegato per produrre birre a basso contenuto alcolico ma con un profilo sensoriale che sia accettato dal consumatore. In questo modo, il birraio dal malto d'orzo impiegato per la produzione di una birra, potrebbe ricavare da un lato la birra appartenente ad un determinato stile, e dall'altro un altro

prodotto innovativo, a bassa gradazione alcolica valorizzando un residuo con un processo sostenibile a basso impatto ambientale ed energetico. Per questo motivo, in questo studio è stata utilizzata come materia prima l'acqua di lavaggio delle trebbie (4 lavaggi) proveniente dall'ammestramento di un mosto Pils, amaricato con luppolo varietà Cascade da utilizzare come substrato di fermentazione di lieviti appartenenti a diverse specie non-*Saccharomyces*. Lo scopo principale dello studio è quello di ottenere prodotti caratterizzati da un basso contenuto di etanolo, da complessità e caratteristiche sensoriali peculiari valutando le prestazioni di fermentazione, il profilo analitico e volatile dei prodotti.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 CEPPI DI LIEVITO

In questa prova sono stati impiegati diversi ceppi di lievito provenienti dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) (tabella 3) e conservati alla temperatura di -80°C in terreno contenente glicerolo (80%). Come ceppo di controllo nella fase di screening è stato utilizzato lo starter *S. cerevisiae* US05 (Fermentis, Lesaffre, Francia). I ceppi sono stati rinfrescati su terreno YPD agar (10 g/L di estratto di lievito, 20 g/L di peptone, 20g/L di glucosio e 18g/L agar) e conservati alla temperatura di 4°C.

Genere e specie	Codice	Provenienza
<i>P. kluyveri</i>	PR MB7 ½	Montepulciano bio a 7gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>P. kluyveri</i>	PR Abb ½	Verdicchio non trattato a 7gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>P. kluyveri</i>	PR VB2 FF	Verdicchio non trattato a 15gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>K. thermotolerans</i>	101	DBVPG 2700
<i>K. thermotolerans</i>	104	
<i>K. thermotolerans</i>	103	DBVPG 3394
<i>L. thermotolerans</i>	T07 SB3/B13	Muschio su tronco di quercia
<i>L. thermotolerans</i>	Td MC5 ½	Montepulciano convenzionale a 7gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>L. thermotolerans</i>	Sc punta MC5IN	Uve Montepulciano
<i>W. anomalus</i>	3003	
<i>T. delbrueckii</i>	33	Foglie papaya

<i>T. delbrueckii</i>	Td VC5FF	Verdicchio convenzionale a 15gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>T. delbrueckii</i>	T VB10 ½	Verdicchio bio a 7gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>H. osmophila</i>	32	Cantina 7
<i>H. vinalis</i>	24	DBVPG
<i>M. pulcherrima</i>	48	
<i>M. pulcherrima</i>	M MB1 ½	Montepulciano bio a 7gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>M. pulcherrima</i>	M VB11 ½	Verdicchio bio a 7gg fermentazione spontanea (Moncaro 2017)
<i>S.cerevisiae</i>	US-05	Safale fermentis

Tabella 3. ceppi di lievito utilizzati in questo studio

3.2 ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE

In questo studio non è stato utilizzato un substrato convenzionale per l'avvio delle fermentazioni ma è stata impiegata l'acqua di lavaggio delle trebbie proveniente da mosto PILS il quale è stato preparato presso Birra dell'Eremo (Assisi, Italia) in un batch da

1500L, utilizzando 100% malto Pils e luppolo Cascade. Il processo consiste in differenti fasi: 53°C per 10 minuti, 67°C per 70 minuti, 76°C per 10 minuti e bollitura per 60 minuti. Il mosto ottenuto (caratterizzato da pH 5.5, densità 12.3°P e 20 IBU). L'acqua di lavaggio delle trebbie si ottiene al termine della fase di ammostamento nel momento in cui la parte liquida ossia il mosto viene separata dalla parte solida (trebbie, le scorze del malto macinato) prima di essere trasferita alla caldaia di bollitura. Il processo consta di due fasi: durante la prima fase il mosto è reso limpido attraverso un letto filtrante formato dalle stesse trebbie. Quando il mosto nel tino di miscela è stato filtrato si procede alla seconda fase della filtrazione, il lavaggio delle trebbie. Dato che le trebbie separate sono sature di mosto ad alta gradazione zuccherina è necessario che quest'ultime vengano lavate con acqua calda (75-78°C) per estrarre lo zucchero residuo. Il lavaggio va interrotto quando la densità del mosto raggiunge 1-2°P, per evitare di estrarre dalle trebbie anche sostanze non desiderate, ad esempio i tannini che provocano astringenza.

3.3 ANALISI ACQUE DI LAVAGGIO

Le trebbie hanno subito 4 lavaggi; con il primo lavaggio si raggiunge una densità pari a 4.5 gradi Plato (°P), il secondo lavaggio 3.4°P con il terzo si ottengono 2.4 °P e con il lavaggio finale 1.4 °P. Al termine dei lavaggi le prove vengono unite così da procedere con la determinazione degli zuccheri (glucosio, saccarosio e maltosio) presenti all'interno del substrato di partenza, attraverso l'utilizzo del kit Megazyme (identico kit utilizzato per determinare gli zuccheri residui). Successivamente l'acqua di lavaggio delle trebbie subisce il processo della luppolatura (figura 6) avviata in laboratorio utilizzando luppolo Cascade aggiunto durante la bollitura.



Figura 6. Luppatura del mosto (in questo caso le acque di lavaggio unite)

3.4 ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI

Le micro-fermentazioni sono state guidate alla temperatura di 18-20°C utilizzando beute da 500 ml provviste di apposite valvole di Müller, quest'ultime contenenti metabisolfito così da permettere la fuoriuscita di CO₂ evitando la contaminazione del sistema (figura 7). Le pre-colture sono state allestite con estratto di malto al 10% ed incubate per 48 ore a 20°C. Dopo l'incubazione, le cellule sono state raccolte per centrifugazione (4000 rpm per 5 minuti), risospese in acqua sterile e si è proceduto all'inoculo del mosto con 10⁶ cell/mL effettuato attraverso la conta con la camera di Thoma. Le beute inoculate sono state fatte fermentare alla temperatura di 18-20°C per circa 17 giorni registrando giornalmente la diminuzione di peso dovuta alla perdita di CO₂ fino a che non si ottiene un valore costante.



Figura 7. Microfermentazioni

3.5 RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA

Al termine del periodo di sosta a 4°C le birre sono state sottoposte a rifermentazione in bottiglia ad opera dei lieviti residui ed ancora vitali. Ciò è stato possibile aggiungendo alla birra 1.5 g/L di saccarosio durante la fase di imbottigliamento della stessa, Le bottiglie sigillate con appositi tappi, sono state mantenute a 18-20°C per circa 7-10 giorni, infine stoccate a 4°C. La birra risultante è stata in seguito analizzata mediante analisi sensoriale.

3.6 ANALISI MICROBIOLOGICHE

3.6.1 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI

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

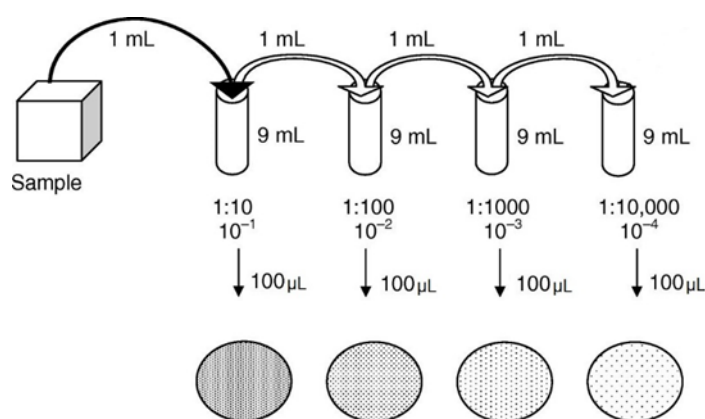


Figura 8. Diluizioni seriali

3.7 ANALISI CHIMICHE

3.7.1 DETERMINAZIONE ZUCCHERI RESIDUI

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

Il kit contiene:

Bottiglia 1: Buffer (25 ml, pH 7.6), sodio azide (0.02% w/v)

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

Bottiglia 3: Esochinasi + glucosio-6-fosfato deidrogenasi

Bottiglia 4: β -fruttosidasi in buffer di sodio citrato (pH 4.6) (disciogliere in 14 ml di acqua distillata)

Bottiglia 5: α -glucosidasi in buffer di sodio citrato (pH 6.6) (disciogliere in 14 ml di acqua distillata)

Bottiglia 6: Soluzione standard D-glucosio (5 ml, 0.4 mg/mL).

Preparate le soluzioni, si effettua l'analisi seguendo il protocollo sottostante (tabella 4)

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 aggiungi:				
Acqua distillata	2,10 ml	2,00 ml	2,30 ml	2,30 ml
Soluzione 1 (buffer)	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
Soluzione 2 (NADP/ATP)	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
Leggere l'assorbanza (A1) delle soluzioni a 340 nm dopo circa 3 minuti e aggiungere:				
Sospensione 3 (HK/G6P-DH)	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Leggere l'assorbanza (A2) delle soluzioni a 340 nm dopo 5 minuti				

Tabella 4. Protocollo determinazione zuccheri

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

3.7.2 ANALISI COMPONENTE VOLATILE

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

- porre 5ml di campione in una vial con tappo di teflon e ancoretta magnetica, aggiungere 1 g di NaCl per 10 minuti
- aggiungere 25 µl di 3-ottanolo come standard interno
- Inserire la siringa attraverso il tappo e spingere la fibra, nello specifico la fibra a tripla fase divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS)
- Riporre l'intero sistema in termostato per 40 minuti a 50°C

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

Le condizioni operative sono state le seguenti:

- temperatura dell'iniettore/rivelatore: 250 °C;
- colonna capillare Supelcowax 10 (30 m, 0.25 mm id);

- iniettore: splitless 60 sec.;
- temperatura del forno: T iniziale 50 °C per 5 minuti, poi un gradiente di 3 °C/min e isoterma di 220 °C per 20 minuti;
- gas vettore: Azoto.

3.7.3 DETERMINAZIONE ETANOLO

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

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

3.7.4 DETERMINAZIONE ALCOLI SUPERIORI

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

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

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

3.7.5 DETERMINAZIONE POLIFENOLI

-In un matraccio da 100 ml inserire 1ml di campione (o diluizioni), per il bianco al posto del campione inserire 1 ml di acqua deionizzata

-Aggiungere 50 ml di acqua deionizzata

-Aggiungere 5 ml Reattivo Folin-Ciocalteu

-Aggiungere 20 ml di soluzione carbonato di Na anidro al 20% (Na_2CO_3) --> per $V = 500$ ml unire 100 g Na_2CO_3 + 400 ml H_2O

-Portare a volume fino a 100 ml e attendere 30 minuti al buio

-Leggere l'Assorbanza a 760 nm e infine calcolare la concentrazione di polifenoli utilizzando la retta di taratura con acido gallico.

Per la costruzione della retta di taratura si utilizza il seguente protocollo:

-Preparazione della soluzione madre di acido gallico in una sterilin (10 mg di ac. gallico + 10 ml H_2O)

-Effettuare delle diluizioni in eppendorf; $V_f = 1$ ml

-Trattare il campione come da protocollo per la determinazione dei polifenoli e infine leggere le assorbanze e costruire la retta di taratura.

3.7.6 DETERMINAZIONE ACIDO LATTICO

Per determinare la quantità di acido lattico a fine fermentazione, nello specifico per valutare l'attività di alcuni ceppi come *L. thermotolerans* la quale è in grado di convertire gli zuccheri (in particolare glucosio) in acido L-lattico durante le prime fasi della fermentazione alcolica è stato utilizzato il kit Roche per la determinazione del L-Lactic acid.

Il kit contiene:

Bottiglia 1: con circa 30 ml di soluzione, composta da: buffer glicilglicina, pH circa 10.0; acido L-glutammico, circa 440 mg

Bottiglia 2: circa 210 mg di NAD, liofilizzato (disciogliere in 6 ml di acqua)

Bottiglia 3: circa 0,7 ml di sospensione di transaminasi glutammato-piruvato

Bottiglia 4: 0,7 ml di soluzione di L-lattato deidrogenasi

Bottiglia 5: con soluzione di controllo del dosaggio di L-lattato per il controllo del dosaggio (la misurazione della soluzione di controllo del dosaggio non è necessaria per il calcolo dei risultati). Di seguito il protocollo (tabella 5).

Pipettare nella cuvetta		Bianco	Campione
Soluzione 1		1,000 ml	1,000 ml
Soluzione 2		0,200 ml	0,200 ml
Sospensione 3		0,020 ml	0,020 ml
Campione		0	0,100 ml
Acqua distillata		1,000 ml	0,900 ml
Leggere l'assorbanza (A1) delle soluzioni a 340 nm dopo circa 5 minuti e aggiungere:			
Soluzione 4		0,020 ml	0,020 ml
Dopo il completamento della reazione circa 30 min leggere le assorbanze (A2)			

Tabella 5. Protocollo determinazione acido lattico

3.7.7 DETERMINAZIONE DEGLI AMINOACIDI PRONTAMENTE ASSIMILABILI

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

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

Soluzione **NOPA**:

0.336 g di **OPA** (orto-ftaldialdeide), sono stati sciolti in etanolo e portati a volume a 50 ml. A questa soluzione alcolica, è stata addizionata una soluzione acquosa contenente:

- 1.919 g di NaOH al 98 %
- 4.234 g di Acido Borico al 99 %
- 0.408 g di Nac (N-acetil-L-cisteina)

e portata a volume in pallone tarato da 500 ml con acqua deionizzata la soluzione aveva un pH approssimativo di 9.5.

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

Soluzione **NOPAW**:

Stessa soluzione senza OPA.

3.8 ANALISI SENSORIALE

Al termine del periodo di rifermentazione in bottiglia, le birre sono state sottoposte ad analisi sensoriale attraverso l'utilizzo di una scheda di degustazione nella quale sono presenti alcuni descrittori riguardanti l'aspetto visivo (colore, limpidezza, caratteristiche della schiuma), le note aromatiche (fruttate, floreali, tostate, ecc...) e le principali caratteristiche strutturali (acidità, dolcezza, astringenza, amaro, persistenza olfattiva). Il test è stato sottoposto ad un gruppo di sei assaggiatori ai quali è stato chiesto di esprimere un parere su ogni categoria sensoriale, utilizzando una scala da 1 a 10. I risultati sono stati mediati e sottoposti ad analisi statistica.

CAPITOLO 4 – RISULTATI

4.1 VALUTAZIONE DELL'ATTITUDINE FERMENTATIVA

L'attitudine fermentativa è stata valutata monitorando la perdita di peso giornaliero dei campioni in esame, quindi valutando la quantità di CO₂ svolta. I lieviti scelti per un loro potenziale impiego nella produzione di birra attraverso l'utilizzo di acque di lavaggio delle trebbie hanno riportato la seguente cinetica fermentativa (figura 8).

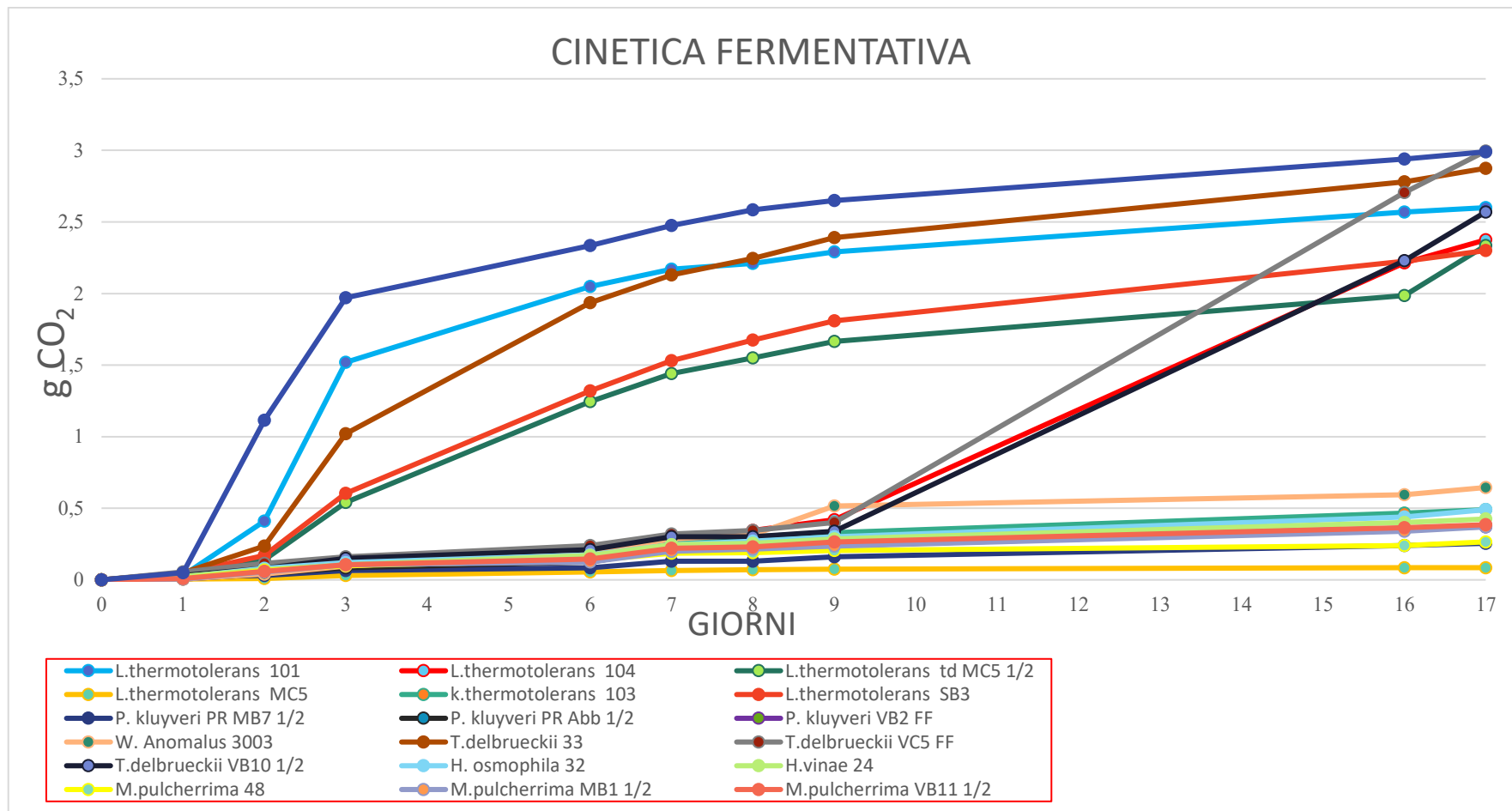


Figura 8. Cinetica fermentativa di colture pure con lieviti non-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* US-05 (controllo).

L'andamento fermentativo riportato in figura mostra una cinetica fermentativa più alta nella prova condotta con *S. cerevisiae* US-05 (starter commerciale) (2.94 g CO₂ svolta), seguita da *T. delbrueckii* 33 e *L. thermotolerans* 101, le quali con un andamento fermentativo più lento, rispetto allo starter US-05 soprattutto durante i primi 9 giorni di fermentazione ma svolgendo al diciassettesimo giorno rispettivamente 2.78 g e 2.57 g CO₂, di poco inferiore a quella di *S. cerevisiae* US05. Due ceppi della specie *L. thermotolerans* (SB3, MC51/2), nonostante un'attitudine fermentativa differente rispetto ai lieviti citati sopra, hanno mostrato la massima quantità di CO₂ intorno a 2g. Per quanto riguarda 2 ceppi di *T. delbrueckii* (VC5FF e VB10) e *L. thermotolerans* (104), hanno esibito un'attitudine fermentativa completamente differente (dovuto probabilmente ad un inquinamento della prova), rispetto agli altri lieviti saggiati. Infatti, a partire dal nono giorno di fermentazione si è avuto un incremento della CO₂ svolta, fino a registrare a fine fermentazione un quantitativo di CO₂ paragonabile a quello dello starter. Tutti gli altri ceppi testati hanno mostrato una cinetica fermentativa decisamente più lenta.

Dopo 17 giorni di fermentazione, il prodotto ottenuto è stato imbottigliato e lasciato rifermentare in bottiglia per 10 giorni a 20°C.

4.2 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

Il mosto utilizzato come substrato di partenza deriva dall'unione di quattro acque di lavaggio delle trebbie, le quali sono state saggiate per analizzare i principali zuccheri presenti e l'azoto α -aminico, i dati relativi a queste analisi sono riportati in tabella 6.

ACQUE DI LAVAGGIO	GLUCOSIO	SACCAROSIO	MALTOSIO	AZOTO α -aminico
Primo lavaggio 4.5 °P	2.73 g/L	4.02 g/L	12.55 g/L	60.80 mg/L
Secondo lavaggio 3.4 °P	1.12 g/L	4.63 g/L	10.66 g/L	34.22 mg/L
Terzo lavaggio 2.4 °P	0.42 g/L	1.42 g/L	4.03 g/L	24.51 mg/L
Quarto lavaggio 1.2 °P	0.00 g/L	1.50 g/L	0.02 g/L	9.90 mg/L

Tabella 6. Profilo analitico delle acque di lavaggio delle trebbie

I risultati relativi al profilo analitico delle birre ottenute sono riportati in tabella 7. La prima analisi effettuata riguarda la quantità di zuccheri residui delle fermentazioni, nello specifico dei principali zuccheri cioè maltosio, saccarosio e glucosio.

I dati riportati nella tabella mostrano come tutti i ceppi siano in grado di fermentare completamente sia glucosio (dati non mostrati) che saccarosio, con delle piccole differenze a livello di ceppo per quanto riguarda questo zucchero. La capacità di fermentare il maltosio risulta variabile tra i ceppi. I ceppi che hanno mostrato un più alto vigore fermentativo, sono quelli che hanno evidenziato un più basso contenuto di maltosio residuo come mostrato dallo starter US-05 e in modo peculiare di altri lieviti *L. thermotolerans* (101, SB3, MC51/2), *T. delbrueckii* (VB10, VC5FF, 33). In tutte le altre prove, le birre che

hanno mostrato un più alto contenuto residuo di maltosio, sono state quelle condotte con i lieviti: *P. kluyveri* PRABB (5.41 g/L), *L. thermotolerans* MC5IN (5.42 g/L), *H. vineae* 24 (5.25 g/L) e i lieviti appartenenti alla specie *M. pulcherrima* (MVB, MMB, 48), dove i valori riscontrati si aggirano intorno ai 5.50 g/L, in accordo con la bassa capacità fermentativa.

I valori dell'azoto assimilabile determinati nelle prove di fermentazione, hanno mostrato nelle tesi condotte con i lieviti appartenenti alla specie *M. pulcherrima* (MMB, MVB), *H. osmophila* 32, *P. kluyveri* (PRMB7, PRABB, VB2FF) e *W. anomalus* 3003, la concentrazione più alta di azoto (40-45 mg/L), rispetto alle fermentazioni con i ceppi della specie *L. thermotolerans* (MC51/2, 101, 104), e *T. delbrueckii* (VB10, VC5FF, 33), a conferma della loro alta capacità fermentativa, dove il quantitativo di azoto è paragonabile a quello dello starter commerciale US-05 (36.47 mg/L), con valori che vanno da 25 a 35 mg/L.

Per quanto riguarda l'acido lattico prodotto durante le fermentazioni, le prove condotte con *L. thermotolerans* (101, MC51/2, 104, SB3), ceppo che è in grado di convertire gli zuccheri (in particolare glucosio) in acido L-lattico durante le prime fasi della fermentazione alcolica, si sono contraddistinte per la produzione di acido lattico che si aggira attorno a 1g/L, a differenze delle prove condotte con i lieviti sempre della specie *L. thermotolerans* (MC5IN, 103), dove la concentrazione di acido lattico è inferiore a quella dei lieviti sopraccitati. Tutti gli altri lieviti testati, se paragonati allo starter commerciale US-05, il quale ha riportato una concentrazione di acido lattico pari a 0.33 g/L, hanno mostrato un quantitativo di acido lattico paragonabile al controllo, ad eccezione

della tesi condotta con il lievito *H. vineae* 24 il quale si è differenziato per la quantità più bassa di acido lattico prodotta (0.07 g/L).

L'analisi della componente fenolica totale, mediante saggio di Folin – Ciocalteau, ha mostrato nelle fermentazioni condotte con *L. thermotolerans* MC51/2 e *W. anomalus* 3003, la concentrazione di polifenoli più bassa intorno a 144.5 g/L, rispetto allo starter commerciale US-05, dove il quantitativo di polifenoli è pari a 214.16 g/L, e in modo particolare a *L. thermotolerans* MC5IN, in cui il contenuto polifenolico è pari a 259.16 g/L; situazione analoga si può riscontrare anche nei ceppi appartenenti alla specie *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* e *P. kluyveri*, i quali hanno esibito una concentrazione della componente fenolica totale intorno a 200 g/L.

In termini di etanolo prodotto durante le fermentazioni, le prove hanno mostrato un basso contenuto alcolico, in accordo con lo scopo principale dello studio, ossia quello di ottenere prodotti caratterizzati da un basso contenuto di etanolo. In questo contesto, il contenuto di etanolo che si differenzia maggiormente è quello che si riscontra nella prova condotta con *S.cerevisiae* US-05 (1.22 v/v%) , *T. delbrueckii* VB10 (1.02 v/v%) e VC5FF (0.93 v/v%), a conferma del loro potenziale fermentativo. Per quanto riguarda tutti gli altri lieviti testati, il contenuto di etanolo è variabile e inferiore, rispetto ai lieviti sopraccitati e lo si nota nelle fermentazioni con *H. osmophila*, *H. vineae*, *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* e *L. thermotolerans* dove la concentrazione di etanolo va da 0.02 v/v% a 0.70 v/v %.

CEPPI	SACCAROSIO (g/L)	MALTOSIO (g/L)	ACIDO LATTICO (g/L)	POLIFENOLI (g/L)	ETANOLO (v/v %)	AZOTO ASSIMILABILE (mg/L)
<i>L. thermotolerans</i> 101	0.21±0.00	0.34±1.78	0.89±0.00	150.83±0.00	0.46±0.1	26.47±1.27
<i>L. thermotolerans</i> 104	0.13±0.00	1.18±0.00	0.83±0.00	197.5±0.00	0.60±0.8	26.73±8.53
<i>L. thermotolerans</i> MC51-2	0.16±0.00	3.05±0.00	0.97±0.06	142.5±0.00	0.45±0.4	23.4±0.00
<i>L. thermotolerans</i> MC5IN	0.19±0.00	5.42±2.09	0.16±0.06	259.16±0.00	0.21±0.0	30.95±0.36
<i>K. thermotolerans</i> 103	0.49±0.00	3.77±0.00	0.54±0.00	187.5±0.00	0.43±3.1	37.43±3.53
<i>K. thermotolerans</i> SB3	0.18±0.00	2.15±0.00	0.70±0.62	159.16±0.00	0.69±0.0	41.02±36.90
<i>P. kluyveri</i> PRMB7	0.16±0.00	2.56±0.00	0.27±0.00	192.5±0.00	0.18±0.1	40.83±2.36
<i>P. kluyveri</i> PRABB	0.20±0.00	5.41±7.35	0.33±0.44	219.16±0.00	0.34±0.0	40.18±0.36
<i>P. kluyveri</i> VB2FF	0.02±0.00	2.88±0.00	0.61±0.00	214.16±0.00	0.43±0.8	43.2±6.43
<i>W. anomalus</i> 3003	0.19±0.00	4.92±0.52	0.26±0.00	144.16±0.00	0.36±0.0	42.17±16.60
<i>T. delbrueckii</i> 33	0.48±0,00	1.81±1.06	0.29±0.00	292.5±0.00	0.57±1.5	39.67±9.61

<i>T. delbrueckii</i> VC5FF	0.20±0.00	0.96±0.00	0.31±0.00	204.16±0.00	0.93±2.6	41.21±1.82
<i>T. delbrueckii</i> VB10	0.18±0.00	1.60±0.00	0.32±0.00	192.5±0.00	1.02±0.0	37.75±22.85
<i>H. osmophila</i> 32	0.14±0.00	4.73±0.00	0.62±0.24	245.83±0.00	0.02±0.4	44.74±46.33
<i>H. vinae</i> 24	0.69±0.00	5.25±2.29	0.07±0.00	175.83±0.00	0.20±0.0	36.79±0.45
<i>M. pulcherrima</i> 48	0.87±0.00	5.89±1.71	0.28±0.00	259.16±0.00	0.23±0.1	34.42±3.08
<i>M. pulcherrima</i> MMB	0.02±0.00	5.23±2.96	0.61±0.31	292.5±0.00	0.74±3.3	40.96±0.37
<i>M. pulcherrima</i> MVB	0.20±0.00	5.92±0.00	0.49±0.29	242.5±0.00	0.80±0.0	45.99±8.47
<i>S. cerevisiae</i> US05	0.46±0.00	0.39±0.00	0.33±0.00	214.16±0.00	1.22±0.0	36.47±2.18

Tabella 7. Profilo analitico delle birre ottenute mediante lieviti non-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* US-05 (controllo). I dati riportati in tabella sono i valori medi \pm deviazione standard.

Zuccheri iniziali, azoto α -aminico e polifenoli mosto luppolato: glucosio (0.67 g/L); saccarosio (1.7 g/L); maltosio (9.70 g/L); azoto α -aminico (47.11 mg/L); polifenoli (147.5 g/L).

4.3 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

I dati relativi ai principali composti secondari delle fermentazioni condotte sulle acque di lavaggio delle trebbie sono riportati nella tabella 8. Un primo aspetto che emerge è l'elevato livello di etilacetato nelle birre (odore di solvente), in particolare, i valori più alti sono stati riscontrati nelle birre con i lieviti della specie *W. anomalus* 3003 (100.39 mg/L), *L. thermotolerans* 104 (83.68 mg/L), rispetto ad esempio al ceppo della stessa specie *L. thermotolerans* MC5IN (0.03 mg/L) e al controllo US-05 (0 mg/L).

Inoltre, è significativo notare il basso contenuto di acetaldeide (aroma di mela verde), nella fermentazione con il lievito *L. thermotolerans* MC5IN (0.51 mg/L), paragonabile al ceppo *H. vineae* 24 (0 mg/L), rispetto al valore più alto riscontrato in particolar modo nella birra ottenuta con il lievito della specie *L. thermotolerans* MC51/2 (26.14 mg/L). Le concentrazioni di propanolo (nota di durezza), isobutanolo (odore di solvente) e amilico attivo (nota fruttata), non sono stati rilevati nella maggior parte dei lieviti testati. L'amilico attivo è stato riscontrato nelle prove con *S. cerevisiae* US-05 (1.48 mg/L), *M. pulcherrima* MMB ½ (1.01 mg/L) e *L. thermotolerans* 104 (1.80 mg/L). Per quanto riguarda il contenuto di isobutanolo e propanolo, le uniche due tesi che hanno esibito quest'ultimi composti, sono state quelle ottenute con i lieviti della specie *L. thermotolerans*, rispettivamente con i seguenti valori: 7.48 mg/L isobutanolo nella prova SB3 e 11.65 mg/L propanolo nella prova 104.

Una differenza sostanziale si può riscontrare nel contenuto di alcol isoamilico, in particolare queste birre hanno mostrato una concentrazione che va da 3.54 mg/L del ceppo

H. vineae 24 a 11.01 mg/L di *P. kluyveri* VB2FF, a differenza dell'assente contenuto di alcol isoamilico sempre tra i ceppi appartenenti alla specie *P. kluyveri* e nelle prove ottenute con i seguenti lieviti: *L. thermotolerans* MC5IN e SB3 e *W. anomalus* 3003.

CEPPI	ACETALDEIDE (mg/L)	ETIL ACETATO (mg/L)	PROPANOLO (mg/L)	ISOBUTANOLO (mg/L)	AMILICO ATTIVO (mg/L)	ISOAMILICO (mg/L)
<i>L. thermotolerans</i> 101	21.74±3.15	52.28±42.89	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	10.80±0.42
<i>L. thermotolerans</i> 104	12.06±3.7	83.68±6.84	11.65±1.46	0.00±0.00	1.80±0.55	10.21±2.13
<i>L. thermotolerans</i> MC51/2	26.14±3.69	2.06±2.92	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	7.8±0.014
<i>L. thermotolerans</i> MC5IN	0.51±0.48	0.03±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>K.thermotolerans</i> 103	5.83±5.95	73.78±30.36	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	6.25±0.82
<i>L. thermotolerans</i> SB3	7.00±7.47	2.02±3.49	0.00±0.00	7.48±1.34	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>P. kluyveri</i> PRMB7	2.51±0.93	1.56±0.34	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>P. kluyveri</i> PR Abb	3.03±4.29	34.44±3.62	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>P. kluyveri</i> VB2 FF	13.99±4.65	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	11.01±0.01
<i>W. anomalus</i> 3003	11.77±1.77	100.39±6.24	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>T. delbrueckii</i> 33	24.13±0.06	1.77±1.54	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	8.48±1.92
<i>T. delbrueckii</i> VC5FF	23.77±3.66	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	10.61±1.06
<i>T. delbrueckii</i> VB10 ½	7.92±7.08	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	8.34±0.97
<i>H. osmophila</i> 32	9.29±0.55	48.19±0.7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	8.58±0.33
<i>H. vinalae</i> 24	0.00 ±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	3.54±0.28
<i>M. pulcherrima</i> 48	0.86±1.21	0.01±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.84±2.35
<i>M. pulcherrima</i> MMB 1/2	17.11±1.83	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.01±1.43	10.84±1.15
<i>M. pulcherrima</i> MVB	14.48±3.11	4.53±0.78	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	10.385±0.59
<i>S. cerevisiae</i> US-05	17.49±1.73	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.48±0.00	9.09±0.41

Tabella 8. Profilo analitico delle birre ottenute mediante lieviti non-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* US-05 (controllo). I dati riportati in tabella

sono i valori medi ± deviazione standard.

4.4 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

Le concentrazioni dei principali composti volatili che sono stati analizzati nelle birre sono riportate in tabella 9. Tra tutte le colture pure, la prova condotta con *L. thermotolerans* 101 ha mostrato un valore più alto di etilbutirrato (aroma di mela), rispetto alle altre tesi. Interessante sono i dati relativi all' acetato di isoamile, responsabile dell'aroma fruttato (in particolare di banana), di gran lunga superiori soprattutto nelle birre fermentate con i ceppi appartenenti alla specie *P. kluyveri* (da 15.61 mg/L a 23.72 mg/L), rispetto alle altre prove. Le birre fermentate con il ceppo *T. delbrueckii* VB10 (1.149 mg/L) e *S. cerevisiae* US-05 (1.240 mg/L), sono le uniche nelle quali si è riscontrata la produzione di etilottanoato (aroma fruttato, mela), che si discosta dal valore soglia (0.9 mg/L), rispetto agli altri lieviti saggiati. Il linalolo e il dietilsuccinato sono presenti in concentrazioni minime in tutte le prove, generalmente con valori pari a 0.00 mg/L.

Il contenuto di citronellolo è stato rilevato solo nelle prove ottenute con i lieviti appartenenti alle specie *L. thermotolerans* (104, MC5IN) e *M. pulcherrima* (48, MMB) con concentrazioni pari a 0.02 mg/L. Tra tutte le colture pure, la prova condotta con *M. pulcherrima* MMB ha mostrato la produzione dei seguenti composti volatili: geraniolo, e 2- feniletanolo responsabili di aromi fruttati e floreali. In particolare, è interessante il dato relativo al 2-feniletanolo 15.46 mg/L, nettamente superiore al quantitativo dello stesso composto riscontrato nelle altre prove. Inoltre, le colture pure hanno mostrato tra loro valori piuttosto simili intorno a 0.00 mg/L di feniletilacetato (aromi fruttati e di miele), il quale solo nella fermentazione con lo starter US-05 (0.227 mg/L) è presente in concentrazione lievemente maggiore rispetto a tutte le altre prove.

CEPPI	Etibutirrato (mg/L)	Acetato di isoamile (mg/L)	Etilcanoato (mg/L)	Etilottanoato (mg/L)	Linalolo (mg/L)	Dietilsuccinato (mg/L)	Citronello (mg/L)	Feniletacetato (mg/L)	Geraniolo (mg/L)	2-feniletanolo (mg/L)	β-damascenone (mg/L)
<i>L. thermotolerans</i> 101	0.45±0.15	0.64±0.05	0.087±0.01	0.625±0.41	0.04±0.00	0.102±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.38±0.07	0.07±0.07
<i>L. thermotolerans</i> 104	0.27±0.21	0.90±0.05	0.054±0.00	0.783±0.12	0.03±0.01	0.130±0.01	0.02±0.03	0.056±0.06	0.29±0.42	1.60±0.92	0.05±0.01
<i>L. thermotolerans</i> MCS1/2	0.06±0.01	0.51±0.13	0.067±0.00	0.423±0.16	0.03±0.01	0.014±0.01	0.00±0.00	0.080±0.00	0.00±0.00	0.33±0.01	0.03±0.03
<i>L. thermotolerans</i> MCSIN	0.06±0.01	0.34±0.10	0.050±0.00	0.234±0.05	0.03±0.01	0.018±0.017	0.03±0.05	0.051±0.02	0.00±0.00	0.08±0.02	0.04±0.02
<i>K. thermotolerans</i> 103	0.09±0.03	3.95±1.75	0.086±0.02	0.258±0.05	0.02±0.00	0.088±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.17±0.09	0.04±0.00
<i>L. thermotolerans</i> SB3	0.03±0.00	0.31±0.02	0.041±0.01	0.249±0.01	0.03±0.00	0.091±0.00	0.00±0.00	0.074±0.02	0.00±0.00	0.20±0.02	0.06±0.02
<i>P. kluyveri</i> PRMB7	0.00±0.00	15.61±2.19	0.096±0.01	0.394±0.06	0.04±0.01	0.062±0.01	0.00±0.00	0.158±0.01	0.20±0.29	0.17±0.02	0.01±0.02
<i>P. kluyveri</i> PR ABB	0.16±0.012	21.99±1.04	0.087±0.08	0.402±0.05	0.04±0.03	0.240±0.19	0.00±0.00	0.065±0.05	0.00±0.00	9.05±1.92	0.09±0.03
<i>P. kluyveri</i> VB2 FF	0.41±0.12	23.72±4.56	0.153±0.08	0.356±0.06	0.04±0.01	0.082±0.01	0.00±0.00	0.017±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.24±0.05
<i>W.anomalous</i> 3003	0.27±0.017	0.45±0.016	0.058±0.03	0.232±0.07	0.04±0.02	0.126±0.03	0.00±0.00	0.014±0.00	0.00±0.00	0.12±0.10	0.00±0.00
<i>T. delbrueckii</i> 33	0.08±0.025	6.72±0.63	0.054±0.02	0.148±0.01	0.03±0.00	0.013±0.00	0.00±0.00	0.091±0.01	0.00±0.00	0.19±0.16	0.00±0.00

<i>T. delbrueckii</i> VC5FF	0.20±0.04	0.70±0.08	0.079±0.02	0.165±0.08	0.02±0.01	0.097±0.02	0.00±0.00	0.059±0.02	0.00±0.00	1.41±0.12	0.02±0.00
<i>T. delbrueckii</i> VB10 1/2	0.16±0.02	0.43±0.07	0.039±0.00	1.149±0.01	0.03±0.00	0.079±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.26±0.37	0.04±0.03
<i>H. osmophila</i> 32	0.19±0.06	0.46±0.06	0.069±0.41	0.322±0.08	0.02±0.00	0.036±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.03±0.05	0.11±0.07
<i>H. vanae</i> 24	0.16±0.12	0.18±0.01	0.085±0.06	0.212±0.02	0.03±0.01	0.016±0.00	0.00±0.00	0.149±0.04	0.00±0.00	0.08±0.05	0.07±0.02
<i>M. pulcherrima</i> 48	0.13±0.05	0.93±0.07	0.082±0.02	0.354±0.05	0.03±0.00	0.090±0.02	0.02±0.02	0.012±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.04±0.01
<i>M. pulcherrima</i> MMB ½	0.29±0.14	1.08±0.24	0.038±0.00	0.066±0.04	0.05±0.02	0.057±0.03	0.02±0.02	0.058±0.06	0.14±0.08	15.46±8.92	0.06±0.00
<i>M. pulcherrima</i> MVB	0.19±0.02	1.21±0.01	0.075±0.04	0.553±0.00	0.03±0.00	0.084±0.01	0.00±0.00	0.013±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.05±0.01
<i>S. cerevisiae</i> US-05	0.29±0.16	0.74±0.25	0.047±0.014	1.240±0.01	0.05±0.01	0.090±0.02	0.00±0.00	0.227±0.02	0.00±0.00	0.48±0.19	0.12±0.02

Tabella 9. Principali composti volatili nelle birre ottenute dalla fermentazione di ceppi di lieviti non-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* US-05

(controllo). I dati riportati in tabella sono i valori medi ± deviazione standard.

4.5 ANALISI SENSORIALE

Le birre così ottenute dopo un periodo di rifermentazione in bottiglia e di stoccaggio successivo a 4°C, sono state sottoposte ad analisi sensoriale per quanto riguarda i principali descrittori, per una descrizione gusto-olfattiva al fine di valutare eventuali difetti o aspetti positivi delle birre in esame, i risultati ottenuti sono stati riportati nelle tabelle 10-11. Quasi tutte le birre analizzate hanno mostrato un carattere distintivo, e si può evidenziare una tendenza comune tra tutte le fermentazioni condotte sulle acque di lavaggio delle trebbie, ossia una buona base fruttata che può essere migliorata andando a caratterizzare il prodotto. Queste caratteristiche sono state supportate da un gusto particolare, con spiccate note di esteri, luppolo e amaro. Le birre che si sono contraddistinte per un profilo sensoriale peculiare sia per odori e aromi caratteristici, sono state quelle ottenute con i lieviti *P. kluyveri* PRMB7 *T. delbrueckii* 33 e *M. pulcherrima* e *L. thermotolerans* (MC51/2, 104). Queste birre sono risultate interessanti ai degustatori per differenti aspetti, sono apparse con odore gradevole e aromatico (soprattutto note di luppolo e fruttato/citrico). Valutando l'apporto dei diversi lieviti appartenenti alla stessa specie, si evidenzia la caratteristica comune di *L. thermotolerans* di produrre acido lattico, il quale differenzia con lievi note di acidità, soprattutto le seguenti tesi (MC5IN, 104). Le tesi che non hanno seguito lo stesso trend delle birre sopracitate sono le fermentazioni condotte con *W. anomalus* e *H. viniae* e *osmophila*, dove tutti i ceppi utilizzati hanno dato origine ad un prodotto "scarico" in termini di odori e sapori fruttati e con caratteristico odore di solvente.

CEPPI	Fruttato/Esteri	Solvente	Citrico	Descrittori olfattiva		Cereale	Malto	Caramello	Tostato
				Luppolo	DMS				
<i>L.thermotolerans</i> 101	2.17±0.41	0.00±0.00	2.5±0.55	0.00±0.00	0.00±0.00	1.83±0.41	1.33±0.52	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>L.thermotolerans</i> 104	4.33±0.82	3.00±1.80	5.5±1.52	1.7±0.82	0.00±0.00	2.33±1.36	2.00±1.41	0.00±0.00	0.5±0.83
<i>L.thermotolerans</i> MC51/2	5.83±1.70	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.83±0.41	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>L.thermotolerans</i> MCSIN	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.7±1.03	1.17±1.70
<i>K.thermotolerans</i> 103	2.5±0.55	5.33±0.52	4.83±0.98	1.00±0.89	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>K.thermotolerans</i> SB3	4.00±2.60	5.17±2.56	0.00±0.00	1.17±2.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>P.kluyveri</i> PRMB7	4.7±0.82	3.17±0.98	2.00±0.26	0.5±0.55	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>P.kluyveri</i> PRABB	3.00±1.41	2.33±1.96	0.33±0.82	0.5±1.22	0.00±0.00	0.5±1.22	0.7±1.63	0.33±0.82	0.17±0.41
<i>P.kluyveri</i> VB2FF	3.7±0.52	2.7±0.82	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>W.anomalous</i> 3003	3.83±1.32	3.83±1.32	4.83±1.16	1.33±1.03	0.00±0.00	1.00±1.26	1.00±1.26	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>T.delbrueckii</i> 33	4.83±1.17	0.5±0.83	0.00±0.00	2.00±0.09	0.00±0.00	1.33±1.50	1.33±1.50	0.33±0.81	0.33±0.81
<i>T.delbrueckii</i> VC5FF	4.16±1.72	0.00±0.00	0.33±0.82	2.33±2.73	0.66±1.63	2.16±2.48	2.16±2.56	0.00±0.00	2.00±2.80
<i>T.delbrueckii</i> VB10	3.66±0.51	0.5±0.55	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.33±0.51	1.5±0.55	0.00±0.00	1.16±0.51
<i>H.osmophila</i> 32	0.5±1.22	5.5±1.04	0.83±2.04	2.3±1.96	0.5±1.22	2.5±2.17	1.00±2.44	0.00±0.00	0.33±0.82
<i>H.vinae</i> 24	5.00±1.26	1.5±0.55	4.00±0.63	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.33±0.82	0.83±0.98	0.00±0.00
<i>M.pulcherrima</i> 48	1.00±1.09	0.5±1.22	0.5±1.22	2.00±1.67	0.5±1.22	3.83±0.40	1.83±2.22	0.33±0.82	0.5±0.83
<i>M.pulcherrima</i> MMB	0.00±0.00	1.67±1.96	2.67±3.01	4.5±2.07	0.00±0.00	2.5±3.01	4.33±3.01	1.00±2.44	0.00±0.00
<i>M.pulcherrima</i> MVB	2.00±0.63	2.00±0.63	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.5±0.55	1.83±0.75	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>S. cerevisiae</i> US-05	1.33±2.42	0.33±0.82	1.33±1.03	1.83±1.72	0.5±0.83	3.33±1.21	2.16±2.71	0.67±1.63	1.33±0.41

Ceppi	Descrittori gusto-olfattiva													
	Fruttato/Esteri	Solvente	Fruttato/Citrico	Luppolo	Cereale	Malto	Tostato	Dolce	Amaro	Acido	astringente	Corpo	Persistenza	
<i>L.thermotolerans</i> 101	3.00±0.63	0.00±0.00	3.33±0.52	1.00±0.63	0.00±0.00	2.17±0.75	0.00±0.00	1.33±0.82	0.00±0.00	1.7±0.52	2.00±0.00	0.7±0.52	0.83±0.41	
<i>L.thermotolerans</i> 104	7.00±1.09	1.7±1.03	4.7±2.42	2.17±0.75	5.00±2.52	4.17±0.98	0.00±0.00	0.7±0.82	0.83±0.00	4.5±1.04	3.5±1.04	0.83±0.75	0.7±0.82	
<i>L.thermotolerans</i> MC51/2	7.00±0.89	6.00±0.63	5.17±0.75	0.00±0.00	2.83±0.75	2.17±0.75	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.17±0.75	2.00±0.63	1.17±0.41	0.83±0.75	
<i>L.thermotolerans</i> MC51N	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.7±0.52	0.00±0.00	0.00±0.00	1.33±1.21	0.00±0.00	4.7±0.52	0.00±0.00	1.17±0.98	0.00±0.00	0.00±0.00	
<i>K.thermotolerans</i> 103	5.5±0.55	5.00±0.63	5.17±0.75	0.33±0.52	2.00±0.00	1.5±0.55	0.00±0.00	0.00±0.00	2.5±0.55	4.17±2.13	4.33±0.81	1.17±0.98	1.17±0.41	
<i>K.thermotolerans</i> SB3	5.00±1.89	3.5±2.66	0.83±2.04	0.5±0.83	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.7±1.03	133±2.42	2.17±2.31	0.33±0.82	0.17±0.41	
<i>P.kluyveri</i> PRMB7	6.00±0.89	0.83±0.75	1.33±1.21	2.5±1.37	2.83±1.16	0.00±0.00	0.00±0.00	4.17±1.16	1.17±0.75	0.00±0.00	1.7±0.52	0.5±0.55	1.7±0.75	
<i>P.kluyveri</i> PRABB	4.17±1.47	2.33±1.86	1.00±1.55	0.00±0.00	1.00±1.55	0.00±0.00	0.00±0.00	1.17±0.98	1.00±1.55	0.5±1.22	2.33±2.58	1.5±1.98	0.33±0.82	
<i>P.kluyveri</i> VB2FF	3.00±0.90	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
<i>W.anomalus</i> 3003	0.00±0.00	2.83±1.17	0.00±0.00	1.5±1.04	1.17±0.98	1.17±0.75	0.00±0.00	1.5±0.55	1.33±0.82	2.33±0.82	1.83±0.75	0.83±0.75	0.00±0.00	
<i>T.delbrueckii</i> 33	1.83±1.17	0.33±0.81	0.66±1.63	0.00±0.00	4.33±1.36	1.83±2.99	0.00±0.00	1.16±1.47	0.00±0.00	0.83±2.04	1.33±1.96	0.16±0.40	0.33±0.82	
<i>T.delbrueckii</i> VC5FF	3.33±2.16	0.00±0.00	1.33±2.42	1.16±2.04	0.83±1.32	1.16±1.83	1.33±2.33	0.66±1.63	1.16±1.83	0.66±1.63	0.66±1.21	0.16±0.41	0.33±0.80	
<i>T.delbrueckii</i> VB10	3.5±0.55	0.00±0.00	3.5±0.55	1.16±0.41	0.83±0.41	1.00±0.90	0.00±0.00	1.00±0.63	0.00±	1.66±0.51	0.00±0.00	1.00±0.00	1.66±0.52	
<i>H.osmophila</i> 32	0.5±1.22	4.67±1.96	3.5±2.25	2.17±2.71	1.83±1.47	0.33±0.82	0.17±0.41	0.00±0.00	1.33±1.50	1.17±2.85	3.33±1.50	0.33±0.82	1.33±1.03	
<i>H.vinae</i> 24	5.3±0.82	1.16±0.75	0.66±0.82	1.5±1.37	0.5±0.55	0.6±0.52	0.00±0.00	0.00±0.00	5.5±1.04	0.83±0.75	0.00±0.00	0.66±0.52	1.00±0.00	
<i>M.pulcherrima</i> 48	0.5±1.22	0.67±1.63	1.00±1.67	0.67±1.03	2.67±1.63	0.5±1.22	0.67±1.63	0.00±0.00	1.17±1.32	0.67±1.63	0.67±1.21	0.17±0.41	0.5±1.22	
<i>M.pulcherrima</i> MMB 1/2	1.00±2.00	1.00±1.67	3.17±2.31	2.5±2.50	2.33±2.65	2.00±2.44	0.00±0.00	1.00±2.44	1.33±1.63	2.00±3.34	1.66±1.50	1.33±1.63	01.5±1.51	
<i>M.pulcherrima</i> MVB	3.00±1.26	0.00±0.00	2.66±1.50	1.00±0.89	1.5±1.22	2.16±0.41	0.00±0.00	1.83±0.75	1.16±0.75	0.83±0.75	2.00±0.00	0.83±0.75	1.00±0.00	
<i>S.cerevisiae</i> US-05	0.67±1.03	0.00±0.00	2.17±2.71	2.17±2.31	3.3±1.86	2.00±2.52	0.3±0.8	0.00±0.00	2.67±2.16	0.00±0.00	1.5±2.34	0.3±0.82	0.83±1.17	

Tabelle 10-11. Risultati del test sensoriale relativi all'odore e al sapore delle birre prodotte. Punteggi medi ottenuti per ogni descrittore ± deviazione standard.

CAPITOLO 5- DISCUSSIONI

L'Italia ha registrato negli ultimi anni un aumento dei birrifici artigianali, sicuramente uno dei fenomeni più significativi del settore agro-alimentare. Nei birrifici, si può assistere però alla produzione di residui in quantità elevate. In ambito brassicolo il riutilizzo delle risorse e delle materie prime risulta essere ancora carente, difatti sono state condotte azioni volte ad individuare e proporre soluzioni alternative, sostenibili per il recupero e la valorizzazione delle trebbie, il sottoprodotto principale nella produzione di birra, reimpiegabile nel processo brassicolo ed in altri settori, il cui utilizzo potrebbe costituire un valore economico aggiuntivo per i birrifici (Amoriello et al., 2016). Inoltre, nella produzione di birra artigianale vengono impiegate colture pure di un singolo lievito, perché in questo settore è fondamentale ottimizzare il processo di fermentazione e allo stesso tempo ottenere un prodotto di buona qualità (Saerens et al., 2010), caratterizzato da aromi e sapori caratteristici.

In questo studio, l'obiettivo è stato produrre birre artigianali a basso contenuto alcolico, utilizzando come materia prima non il solito mosto comune ma un substrato di partenza poco noto nel processo di produzione della birra ovvero l'acqua di lavaggio delle trebbie, proveniente dall'ammestamento di un mosto Pils. Le fermentazioni sono state condotte utilizzando i seguenti lieviti non convenzionali appartenenti alle specie: *L. thermotolerans*, *W. anomalus*, *P. kluyveri*, *H. vinalis*, *H. osmophila*, *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* ceppo commerciale (US05).

Da tale studio è emerso che i ceppi più promettenti per ottenere sia una significativa riduzione di etanolo nella birra, che per conferire al prodotto composti aromatici distintivi

sono state alcune delle fermentazioni ottenute con i lieviti: *L. thermotolerans* (101, 104, MC51/2), *P. kluyveri* e *T. delbrueckii*.

Tra le specie *L. thermotolerans*, è emersa una variabilità intraspecifica nell'attitudine fermentativa, difatti è una specie di lievito che include ceppi con capacità variabile di fermentare il maltosio (Ciani et al, 2019), nonostante la maggior parte delle tesi, ha mostrato una cinetica fermentativa più lenta ma paragonabile al ceppo *S. cerevisiae* US-05.

Relativamente al profilo analitico, le tesi condotte con *L. thermotolerans* sono quelle, tra i generi di lievito testati, che si è distinta per la sua capacità di produrre acido lattico e per le note di acidità riscontrate sia dall'analisi sensoriale che dal profilo analitico, come dimostrato nel lavoro condotto da Canonico et al., 2019, nel quale viene evidenziato come questo ceppo risulti essere interessante non solo per la produzione di birra acida a causa della sua produzione di acido lattico e la conseguente diminuzione del pH durante la fermentazione primaria, In realtà questa capacità si è dimostrata essere utile anche nell'industria brassicola, conferendo acidità alla birra ed esaltando altre componenti aromatiche. L'impiego di questa specie di lievito quindi consentirebbe di evitare tali complicazioni ed avere anche un buon risultato nella resa finale del prodotto. Inoltre, dalla valutazione dell'etanolo, si evince che i ceppi della specie *L. thermotolerans* in coltura pura, possano essere una strategia valida per la produzione di birra a bassa gradazione alcolica.

I ceppi della specie *T. delbrueckii* hanno esibito anche loro in coltura pura l'andamento fermentativo simile, ma più lento del ceppo commerciale di controllo *S. cerevisiae* e ciò ha determinato nel profilo analitico, un quantitativo piuttosto basso di zuccheri residui. In generale si può dire che la performance fermentativa di *T. delbrueckii* dipende fortemente

dal ceppo. La velocità complessiva di fermentazione sembra essere più lenta di quella dei soliti ceppi di *S. cerevisiae* come dimostrato da Micheal et al., 2016 e come riportato nello studio condotto da Canonico et al., 2016 in cui nessuno dei ceppi *T. delbrueckii* ha mostrato parametri di fermentazione paragonabili a quelli dello starter commerciale di *S. cerevisiae*. Inoltre, anche questo ceppo di lievito, ha dimostrato nello screening di produrre comunque quantità basse di etanolo, ma lievemente maggiori rispetto alle altre specie valutate.

Le birre ottenute con i lieviti della specie *P. kluyveri*, hanno mostrato un'attitudine fermentativa decisamente più bassa rispetto ai lieviti sopraccitati, determinando un quantitativo elevato di zuccheri residui, in particolar modo il maltosio. In accordo con Sarens et al., 2014, i quali hanno pubblicato un brevetto sull'applicazione di ceppi di *P. kluyveri*, è interessante notare, come i ceppi appartenenti a questa specie, possano risultare ideali per la produzione di birre senza alcol e birre a basso contenuto alcolico, indicando il potenziale di questa specie per la produzione di questa tipologia di birra.

Inoltre, dal profilo analitico si evince soprattutto tra i ceppi non-*Saccharomyces*, che hanno riportato un basso vigore fermentativo, l'utilizzo dell'azoto amminico libero ad un tasso più lento e hanno lasciato più azoto amminico libero soprattutto rispetto al ceppo *S. cerevisiae* come riportato da Drosou et al., 2018, che hanno valutato la produzione di birra attraverso l'uso di lieviti non-*Saccharomyces*.

Gli approcci microbiologici per la riduzione del contenuto alcolico, in questo contesto si basano quindi sull'impiego di lieviti non-convenzionali di tipo non-*Saccharomyces*, che risultano funzionali per la produzione di birre a basso contenuto alcolico (Basso et al.,

2016). Tutti i ceppi di lievito testati nello screening, hanno confermato tale comportamento.

I candidati migliori che si sono differenziati, hanno mostrato profili diversi nella composizione volatile e di composti secondari, responsabili di aromi e profumi caratteristici (fruttati/esteri/citrico), portando a profili sensoriali differenti e caratterizzando la birra con note "fruttate/citriche", mentre alcune colture hanno migliorato gli attributi "fruttato/estero" e "luppolo". È interessante notare sia dall'analisi dei principali composti secondari che dall'analisi sensoriale, nella maggior parte delle tesi il contenuto di etilacetato che conferisce alle birre un forte aroma di solvente.

I lieviti della specie *L.thermotolerans* hanno differenziato le birre con note di acidità tipiche e con spiccate note fruttate dovuto al contenuto variabile di esteri e alcoli superiori. Inoltre, anche le prove condotte con *T. delbrueckii*, hanno contribuito in modo variabile tra i ceppi una produzione di alcoli superiori come acetaldeide ed esteri, in accordo con Tataridis et al., 2013, i quali hanno osservato che gli effetti complessivi di ceppi di lievito *T. delbrueckii* selezionati, è altamente positivo, portando a prodotti con una pronunciata complessità sensoriale e un aroma floreale/fruttato nella vinificazione e nella birrificazione.

Per quanto riguarda i ceppi della specie *P. kluyveri*, si riscontra un profilo aromatico, pressoché simile tra i ceppi della stessa specie, caratterizzando le birre con note fruttate, dovuto dalla presenza di esteri, e in modo particolare, dall'acetato di isoamile, come riportato nello studio di Saerens et al., 2014, in cui principali composti aromatici prodotti da *P. kluyveri* nella fermentazione sono l'acetato di isoamile e l'ottanoato di etile, incrementando così la produzione di esteri e quindi il flavor della birra.

Per quanto riguarda invece i lieviti della specie *W. anomalus*, *H. vineae*, *H. osmophila*, *M. pulcherrima*, che non si sono dimostrati i candidati migliori, hanno esibito in coltura pura un'attitudine fermentativa bassa, mostrando un quantitativo elevato di zuccheri residui (maltosio), a differenza dello starter commerciale. Inoltre, i dati ottenuti sono in contrasto con Osburn et al., 2018, che ha mostrato che un ceppo di *W. anomalus* ha esibito una buona performance di fermentazione e ha portato birre con note di frutta come mela, pera e albicocca.

Interessante notare, come nonostante le birre condotte con i lieviti della specie *M. pulcherrima*, non abbiano avuto una performance notevole, nel ceppo MMB1/2 si riscontra un incremento di diversi composti aromatici, come acetaldeide, citronellolo, geraniolo, 2-feniletanolo, al palato dei degustatori hanno migliorato gli attributi "fruttato/estero" e "luppolo".

CAPITOLO 6-CONCLUSIONI

Con la ricerca prefissata, sono stati raggiunti gli obiettivi dello scopo della tesi, ossia quello di un uso alternativo per le trebbie, dalle quali ottenere un substrato che abbia un contenuto zuccherino e nutrienti da poter essere impiegato per produrre birre a bassa gradazione alcolica e con un buon profilo organolettico, attraverso l'utilizzo di lieviti non-convenzionali. In questo contesto, selezionare ceppi di lievito, sulla base della loro capacità di produrre composti aromatici specifici, è estremamente importante per ottenere birre dalle caratteristiche complesse che contraddistinguono il prodotto artigianale.

Nel presente studio è stato valutato il potenziale utilizzo di ceppi non-*Saccharomyces* in ambito brassicolo con lo scopo di migliorare la qualità della birra e anche per produrre birra con un ridotto contenuto alcolico ma appagante e con un buon profilo aromatico. L'attenzione è stata focalizzata su ceppi di *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* e *P. kluyveri*, i quali conferiscono note positive alla birra, favorendo la produzione di alcuni composti aromatici distintivi per il prodotto finito. Dalla ricerca è emerso che, le acque di lavaggio delle trebbie rappresentano quindi una strategia valida e un primo approccio poter ottenere un prodotto a bassa gradazione alcolica, con un buon profilo organolettico attraverso l'impiego di lieviti non-*Saccharomyces*. I dati risultanti dall'analisi delle birre hanno mostrato come l'impiego nel processo fermentativo di colture pure, opportunamente selezionate sulla base del loro caratteristico contributo al flavor della birra, potrebbe essere sfruttato per ottenere un prodotto dalle caratteristiche peculiari desiderate. Tuttavia, saranno necessarie ulteriori indagini per studiare al meglio la produzione di birra artigianale, valutando le capacità metaboliche di questi lieviti, per poter ottimizzare al meglio il processo di fermentazione, magari in fermentazioni sequenziali, le quali rappresentano un approccio interessante per la riduzione del contenuto di etanolo.

CAPITOLO 7- BIBLIOGRAFIA

- **C. Andrighetto, R. Dal Prà, P. De Dea, S. Gambetta, S. Masaro, M. Tapparo e C. Tutta**, (2021) Trebbie di birra, da scarto a ingrediente degli alimenti funzionali.
- **Tiziana Amoriello, Katya Carbone, Alessandro Monteleone, Mauro Pagano, Serena Tarangioli**. (2016). Criticità e opportunità per lo sviluppo sostenibile della filiera brassicola. Publisher: CREA Documento realizzato nell'ambito del Programma Rete Rurale Nazionale 2014-2020 Autorità di gestione: Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali Ufficio DISR2.
- **Basso RF, Alcarde AR, Portugal CB**. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?
- **Boulton C & Quain D** (2006). *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science, Oxford.
- **Buiatti, S.** (2004). "Birra". In Martelli A., Cabras P. (Ed.), *Chimica degli alimenti*, Padova: Piccin Nuova Libreria S.P.A.
- **Cabras P. & Martelli A.** (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin Editore pp. 557-598.
- **Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., and Ciani, M.** (2016). *Torulasporea delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content.
- **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.

- **Laura Canonico, Edoardo Galli, Enrico Ciani, Francesca Comitini, Maurizio Ciani.** (2019). Exploitation of Three Non-Conventional Yeast Species in the Brewing Process.
- **Chris White, Jamil Zainasheff.** (2016). Gli ingredienti della birra – Il lievito: Guida pratica alla fermentazione della birra. Edizioni LSWR; Prima edizione (22 luglio 2016).
- **Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P.** (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking, FEMS Yeast Res. 10, 123–133.
- **Ciani M, Canonico L, Comitini F.** (2019). Beer between tradition and innovation
- **Denise De Keukeleire** (2000). University of gent-Faculty of pharmaceutical Science. Fundamentals of beer and hop chemistry.
- **De Stefano A & Montanari L.** (1996). Minor components of beer: a review. Alcolologia, 8 (1): 43-45.
- **Fotini Drosou, Katerina Anastasakou, Panagiotis Tataridis, Vasso Oreopoulou, Vassilis Dourtoglou.** (2018). Brewing with different non-saccharomyces yeast strains.
- **S. Engan** (1973). A/S Hansa Bryggeri, Bergen, Norway Received 2th August 1973, Organoleptic threshold values of some organic acids in beer.
- **Fastigi, M., Esposti, R. & Viganò, E.** (2015). The irresistible rise of the craft brewing sector in Italy: can we explain it? Paper prepared for the 4th Aieaa Conference. Ancona.
- **Giardini L., Baldoni R.** (2002). Coltivazioni erbacee: cereali e proteaginose, Bologna, Ed. Patron, 2000.

- **Alicia Gutiérrez, Teun Boekhout, Zoran Gojkovic and Michael Katz.** (2018). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. DOI 10.1002/jib.512.
- **A.M. Hamed, S. Simsek** (2014). Hulled wheat: a review of nutritional properties and processing methods, in *Cereal Chem.* 91, pp. 97-104.
- **Harrison MA** (2009). “Beer/Brewing.” *Encyclopedia of Microbiology.* 3rd Edition. Elsevier Inc.
- **Stan Hieronymus** (2016). *Gli ingredienti della birra: il luppolo: La guida pratica all’aroma e alla cultura del luppolo.* Edizioni LSWR (17 ottobre 2016).
- **Hornsey, I. S.** (2016). *Alcohol and its role in the evolution of human society.* Royal Society of Chemistry.
- **Katz, S. H., & Maytag, F.** (1991). Brewing an ancient beer. *Archaeology.*
- **King, A., and Dickinson, R. J.** (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*, *Yeast* 16, 499–506.
- **Kunze W.** (2004). *Brewing Malting.* Vlb, Berlin.
- **Lawrence DR.** (1983). Yeast differentiation and identification, p 449–456. In *Proceedings of the 19th Congress of the European Brewery Convention*, London. European Brewery Convention, Brussels, Belgium.
- **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, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M.** (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. Federation of European Microbiological Societies Yeast Res 8, 1018-1036.
- **Manzoni M.** (2006). Microbiologia industriale. Editore: Casa Editrice Ambrosiana.
- **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.
- **Michel, M.; Meier-Dörnberg, T.; Zarnkow, M.; Jacob, F.; Hutzler, M.** (2016) Screening for the Brewing Ability of Non-*Saccharomyces* Yeast and Optimization of Fermentation Performance of One *Torulaspora Delbrueckii* Strain Found Suitable for Beer Production. In Proceedings of the World Brewing Congress, Denver, CO, USA, 13–17 August 2016.
- **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., and Fantozzi, P.** (1999). Organic and Phenolic Acids in Beer, LWT - Food Sci Technol. 32,535–539.43. Clapperton, J. F. (1978).
- **Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC.** (2006). Brewers' spent grain: generation characteristics and potential applications. J Cereal Sci

- **O. Olaniran, Lettisha Hiralal, Mduduzi P. Mokoena and Balakrishna Pillay.** (2016). Flavour-active volatile compounds in beer:production, regulation and control.
- **Ono M, Kakudo Y, Ueda S.** (1986). Automated analysis of hop bittering components with high performance liquid chromatography using precolumn switching. *Anal Sci* 2: 235-238.
- **Osburn, K.; Amaral, J.; Metcalf, S.R.; Nickens, D.M.; Rogers, C.M.; Sausen, C.; Caputo, R.; Miller, J.; Li, H.; Tennessen, J.M.; et al.** (2018) Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiol.*
- **Petruzzi, L., Rosaria Corbo, M., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A.** (2016). Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. *Food Reviews International*, 32(4), 341-363.
- **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.
- **Saerens SMG, Duong CT e Nevoigt E.** (2010). Genetic improvement of brewer's yeast:current state, perspective and limits. *Appl micorbiol Biotechnol* 86:1195-1212.
- **Saerens, S., and Swiegers, J. H.** (2014) Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *Pichia kluyveri* yeast strains, Patent WO2014135673 A2
- **Sicheri Giuseppe** (1983). *Industrie agrarie e agroalimentari enologica lattiero-casearia olearia conserviera volume in esaurimento.*

- **Stewart, G. G.** (2010). Wort Glucose, Maltose or Maltotriose—Do Brewer’s Yeast Strains Care Which One. In Proceedings of the 31st Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section), Gold Coast, Paper (No. 4)
- **Sunier, J.** (1988). La fabbricazione del malto e della birra. Unione italiana fabbricanti birra e malto, Roma.
- **Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S., and Nerancis, E.** (2013) Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing, Zb. Mat. Srp. Prir. Nauk. 124, 415–426.
- **Tubb RS and Liljestrom PL.** (1986). A colony color method which differentiates alpha-galactosidase-positive strains of yeast. J. Inst. Brew. 92:588–590.
- **Cristian Varela** (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages.
- **Elsa F. Vieiraa, Joana Carvalhoa, Edgar Pintoa, Sara Cunhaa, Agostinho A. Almeida, Isabel M.P.L.V.O. Ferreiraa.** (2016). Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer’s spent yeast extract.
- **Wolf – Hall, C.E.** (2007). Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. Inter. Journal of Food Microbiology, 119: 89 – 94.
- **G. Zara, M. Ciani, F. Comitini, I. Mannazzu e M. Budroni** (2014). Microbiologia della birra. Microbiologia enologica – Edagricole.
- **G. Zeppa, G. Tallone, M. Bertolino** (2013). Utilizzo di birra e di suoi derivati nella produzione di formaggi innovativi.
- **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.

7.1 SITOGRAFIA

- <https://terraevita.edagricole.it>
- <https://www.pintamedicea.com/birra/2015/luppolo-nel-medioevo/>
- https://www.assobirra.it/AssoBirra_AnnualReport_2020_giugno2021