



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 produzione di birra artigianale fortificata con farina di legumi**

**Use of non-conventional yeasts to produce craft beer fortified with legume flour**

Tesi di Laurea Magistrale di:  
**La Torre Angelo**

Relatore:  
**Prof.ssa Francesca Comitini**

Correlatore:  
**Dott.ssa Laura Canonico**

Sessione Invernale  
**Anno Accademico 2019/2020**

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1.1. LA BIRRA: MATERIE PRIME</b>  | <b>9</b>  |
| <i>1.1.1. Acqua</i>  | <i>9</i>  |
| <i>1.1.2. Orzo</i>   | <i>10</i> |
| <i>1.1.3. Luppolo</i>  | <i>11</i> |
| <i>1.1.4. Lievito</i>  | <i>13</i> |
| <b>1.2. IL PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA</b>                                     | <b>15</b> |
| <i>1.2.1. Maltazione</i>   | <i>15</i> |
| <i>1.2.2. Ammostamento</i>   | <i>18</i> |
| <i>1.2.3. Fermentazione</i>  | <i>21</i> |
| <i>1.2.4. Downstream</i>   | <i>23</i> |
| <b>1.3. BIRRA ARTIGIANALE</b>  | <b>24</b> |
| <b>1.4. UTILIZZO DI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES IN<br/>        AMBITO BRASSICOLO</b> | <b>26</b> |
| <b>1.5. CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE<br/>        DELLA BIRRA</b>                 | <b>27</b> |
| <i>1.5.1. Alcoli superiori</i>   |           |
| <i>1.5.2. Esteri</i>   |           |
| <i>1.5.3. Composti carbonilici</i>   |           |
| <i>1.5.4. Acidi organici</i>   |           |
| <i>1.5.5. Composti sulfurei</i>  |           |
| <b>1.6. PROBIOTICI</b>   | <b>35</b> |
| <b>1.7. ALIMENTI FORTIFICATI CON PROTEINE</b>                                      | <b>37</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI</b>   | <b>42</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI</b>   | <b>43</b> |
| <b>3.1 CEPI UTILIZZATI</b>   | <b>43</b> |
| <b>3.2 MOSTO PILS</b>  | <b>43</b> |
| <b>3.3 IDROLIZZATI DI LEGUMI</b>   | <b>44</b> |
| <b>3.4 ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.5 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI</b>  | <b>46</b> |
| <b>3.6 ANALISI CHIMICHE</b>  | <b>47</b> |
| <i>3.6.1 Determinazione degli zuccheri</i>   | <i>47</i> |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>3.6.2 Determinazione delle proteine</i>  | 50        |
| <i>3.6.3 Etanolo</i>  | 51        |
| <i>3.6.4 Alcoli superiori</i>   | 51        |
| <i>3.6.5 Componente volatile</i>  | 52        |
| <b>CAPITOLO 4 – RISULTATI</b>   | <b>55</b> |
| <b>4.1 FERMENTAZIONI MISTE: VALUTAZIONE DELLA<br/>CINETICA FERMENTATIVA SU LENTICCHIA E FAGIOLO</b> | <b>55</b> |
| <b>4.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA</b>   | <b>59</b> |
| <b>4.3 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA</b>  | <b>59</b> |
| <b>4.4 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI</b>  | <b>64</b> |
| <b>4.5 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI</b>   | <b>68</b> |
| <b>CAPITOLO 5 - CONCLUSIONI E DISCUSSIONI</b>   | <b>77</b> |
| <b>CAPITOLO 6 – BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>82</b> |



## CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

Con il termine birra ci si riferisce a una bevanda fermentata, a base di cereali maltati e aromatizzata con svariate combinazioni di ingredienti a seconda degli stili e delle culture in cui si sono sviluppate le varie ricette. Anche se le birre a noi più note sono prodotte a base di orzo, nei secoli in cui questa bevanda ha preso piede nella società umana, si sono susseguite anche una serie di varianti a base di radici, grano, riso o altre piante ricche di amido. Questo però, è stato possibile solo dopo che il processo di maltazione è stato ottimizzato nel corso degli anni. L'amido presente nei cereali non è fermentabile come tale, ma è necessario trasformare il cereale in malto per poter liberare gli zuccheri semplici, più facilmente accessibili dai lieviti.

Uno dei primi documenti ufficiali in cui compare la birra è il codice di Hammurabi, nel 1772 A.C. in Mesopotamia. Il codice riporta tutta una serie di leggi e normative cui doveva sottostare la popolazione, comprese appunto le linee guida a cui dovevano attenersi produttori e venditori di birra se non avessero voluto scontare pene anche piuttosto severe. Ad esempio, nel codice era prevista la pena di morte tramite annegamento, per tutti quei produttori di birra i quali avessero fatto pagare più del dovuto i loro prodotti. Tra i tanti punti del codice, compare anche la distinzione tra uso religioso della birra e uso profano. Infatti, mentre alle sacerdotesse era concesso consumare birra durante i rituali religiosi, non potevano invece farlo all'interno di locali comuni, pena la morte al rogo. Il fatto che all'interno del codice di Hammurabi la legislazione sulla birra prevedesse così tanti punti, fa ipotizzare che la data della sua comparsa fosse ben antecedente al 1700 A.C. Sempre nella stessa area geografica, è stata ritrovata una tavola scritta con caratteri cuneiformi in cui è riportata una preghiera alla Dea sumera Ninkasi, anche conosciuta come la Dea della birra. Tale inno, probabilmente in origine cantato, custodiva al suo interno una ricetta per la produzione

di birra. Questo escamotage è stato sicuramente molto utile ai Sumeri, per far in modo che la maggior parte della popolazione potesse ricordare e tramandare un'informazione tanto preziosa. Tuttavia, la birra descritta nell'inno a Ninkasi era ben diversa da quella a cui siamo abituati. Si trattava di un prodotto sicuramente alcolico ma ottenuto mettendo a mollo del pane a base di grano maltato. Benché la consistenza non dovesse essere delle migliori, il potere inebriante dovuto all'alcol, la rendevano perfetta da integrare in rituali religiosi o per uso ricreativo. (AA.VV. Brewing scienze, 2017.) Ulteriori testimonianze quali rudimentali fatture scolpite su pietra o ritrovamenti all'interno di vecchie tombe, documentano l'uso di un primitivo surrogato di birra sin dal 6000 A.C. Verosimilmente si potrebbe ipotizzare che la scoperta della birra e dei processi di birrificazione sia andata di pari passo con l'esplosione della rivoluzione agricola. La stanzialità dei gruppi di Sapiens e la maggiore disponibilità di grano erano, infatti, fattori fondamentali perché ciò avvenisse. Per quanto riguarda invece, come i primi villaggi agricoli siano venuti in possesso delle informazioni necessarie alla produzione di birra, ci si addentra nella pura speculazione. Probabilmente conservando il grano in ambienti un po' più umidi ci si rese conto che questo subiva modifiche organolettiche e in seguito, il susseguirsi di una serie di altre coincidenze hanno via via delineato le prime ricette.

Le antiche civiltà Greche e Romane non documentano quasi alcuna tradizione brassicola, prediligendo di gran lunga il consumo di vino, la cui scoperta sarà presumibilmente avvenuta in modo altrettanto casuale. Tuttavia, procedendo in avanti nel tempo fino al medioevo, notiamo che la birrificazione costituisce un impiego comune, generalmente portato avanti da gruppi di donne. Tale ruolo in seguito venne assunto dai monaci trappisti nel momento in cui fu necessario avere una produzione più organizzata e più su larga scala per soddisfare comunità più ampie come quelle religiose. Col tempo, i monaci trappisti divennero tra i migliori esperti al mondo di

birra, perfezionando via via stili diversi di birrificazione e regalando prestigio alle località in cui sorgevano i monasteri. Fortunatamente alcune di queste abbazie sono scampate alla morsa del tempo, sopravvivendo fino ai giorni nostri e continuando a regalarci della birra di ottima qualità. Il processo di produzione della birra e gli ingredienti hanno continuato ad innovarsi fino a portare questa bevanda come è al giorno d'oggi. (AA.VV. Brewing Yeast and Fermentation. 2001.)

Oggigiorno con il termine "Birra" in Italia si può indicare solamente un tipo di bevanda alcolica che rispetti ben precisi vincoli legislativi. Per quanto riguarda la legge italiana, la normativa è la seguente:

*"Art. 1. - 1. La denominazione "birra" e' riservata al prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi di Saccharomyces cerevisiae o Saccharomyces carlsbergensis 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.*

*2. La fermentazione alcolica del mosto puo' essere integrata con una fermentazione lattica.*

*3. Nella produzione della birra e' consentito l'impiego di estratti di malto torrefatto e degli additivi alimentari consentiti dal decreto del Ministro della sanita' 27 febbraio 1996, n. 209.*

*4. Il malto di orzo o di frumento puo' essere sostituito con altri cereali, anche rotti o macinati o sotto forma di fiocchi, nonche' con materie prime amidacee e zuccherine nella misura massima del 40% calcolato sull'estratto secco del mosto."*

(gazzettaufficiale)

Le birre attualmente presenti sul mercato sono piuttosto simili nelle ricette, ma bastano piccolissime variazioni nella composizione per renderle visivamente e organoletticamente differenti. La birra non è solamente una delle bevande alcoliche

più antiche, ma anche tra le più vendute e redditizie a livello mondiale. Nel 2006 si è registrata una vendita di birra in tutto il mondo pari a 1700 000 000 di hl, mentre il vino, pur essendo una bevanda altrettanto antica, il cui consumo è ben consolidato nelle varie culture di tutto il mondo, ha registrato vendite 6 volte inferiori.

La birra è una bevanda piuttosto complessa che può contenere al suo interno fino a 800 diversi composti organici e inorganici. Ovviamente non tutti questi composti sono presenti a una concentrazione sufficientemente alta, tale da influenzarne le proprietà organolettiche. Tali molecole possono sia essere già presenti all'interno delle materie prime utilizzate nella birrificazione, sia essere invece frutto di prodotti secondari del metabolismo dei lieviti impiegati. Tra i composti maggiormente rappresentati nella birra, troviamo: acqua (tra il 90-95%), sicuramente il composto più abbondante e le quali caratteristiche chimiche e microbiologiche vanno tenute sotto stretto controllo; etanolo (tra 3-5%); carboidrati (tra 1-6%); CO<sub>2</sub> (3.5-4.5gl); sali inorganici (500-4000 mg/l); azoto totale (500-1000 mg/l) al quale contribuiscono in buona parte le proteine; acidi organici (50-100 mg/l); alcoli superiori (100-300 mg/l). All'interno dei sali inorganici, un rapporto potassio/sodio di 4/1, molto favorevole per chi soffre di ipertensione e segue una dieta povera di sodio. Ancora, il contenuto di chromium-containing complex (anche detto fattore di tolleranza al glucosio) potrebbe giocare un ruolo nella regolazione dei livelli ematici di glucosio. inoltre si possono trovare vitamine del gruppo B e C e polifenoli che hanno certamente un impatto positivo nella dieta. (AA.VV. Beer In Health And Disease Prevention. 2009.)



## 1.1 LA BIRRA: MATERIE PRIME

### 1.1.1 ACQUA

L'acqua può arrivare a costituire fino al 95% del prodotto finito. Da ciò si può dedurre l'importanza di uno stretto controllo chimico e microbiologico sulle risorse idriche adoperate nella fase di ammostamento. La composizione ionica dell'acqua utilizzata inoltre influenza il processo di ammostamento del processo di birrificazione. Diversi stili di diverse aree geografiche hanno fondato la loro unicità proprio sulla composizione chimica delle loro acque. Ad esempio: la località Pilsen, nella Repubblica Ceca è caratterizzata da acqua dolce, con meno di 10 ppm di calcio, magnesio e solfati e tra 10-20 ppm di bicarbonati; Burton-upon-Trent in Inghilterra al contrario possiede un'acqua molto dura, con valori tra 250-300 ppm sia di calcio che di bicarbonato, più di 600 ppm di solfati e tra 60-70 ppm di magnesio. Oggi giorno, la qualità dell'acqua rappresenta ancora un punto cruciale per la grande maggioranza dei birrifici. Tuttavia, nei moderni birrifici l'acqua viene processata affinché abbia un profilo ionico adatto allo stile desiderato. Inizialmente viene deionizzata completamente e successivamente si aggiungono le quantità di sali desiderati. Conoscere la concentrazione dei sali disciolti è soprattutto importante per mantenere il pH all'interno del range desiderato. Un pH basso, consente una corretta scomposizione delle catene amilacee e una completa proteolisi. (AA.VV. *Brewing Yeast and Fermentation*. 2001.) I vari step per la produzione della birra hanno infatti, ognuno un diverso pH ottimale. Durante l'ammostamento, dal malto vengono rilasciati numerosi ioni che vanno a reagire con quelli precedentemente presenti nell'acqua determinando oscillazioni del pH. Normalmente gli ioni  $Ca_2$  e  $Mg$  sono responsabili dell'abbassamento del pH, mentre gli ioni idrogeno carbonato tendono a farlo

innalzare. (AA.VV. Beer In Health And Disease Prevention. 2009.) In generale, durante la birrificazione il pH del mosto finale oscilla tra 5.4-5.5 per poi abbassarsi durante la fermentazione. (AA.VV. Brewing Yeast and Fermentation. 2001.)

### 1.1.2 ORZO



**Fig 1:** malto d'orzo germinato.

L'orzo (*Hordeum vulgare*), è dopo l'acqua, l'ingrediente più abbondante. È una pianta molto resistente, in grado di crescere anche in condizioni non estremamente favorevoli. Morfologicamente si possono distinguere due tipologie di orzo: quello con la spiga con solo due file parallele di semi (spiga distica) e quella con più linee parallele di semi (spiga polistica). Generalmente viene preferita la prima varietà. La spiga polistica generalmente presenta un chicco più piccolo ma con un più alto contenuto proteico.

Il 63% del peso asciutto del chicco è rappresentato dall'amido. Questo viene prodotto durante la fotosintesi e viene accumulato sotto forma di grani all'interno della cariosside. Tale amido è costituito per il 20-25% da amilosio e il 75-80% da amilopectina. L'amilopectina, essendo una struttura più complessa e ramificata, è una molecola più igroscopica e l'intrusione di H<sub>2</sub>O tra le sue ramificazioni, consente un migliore efficienza delle amilasi che andranno ad agire su di esso. La cellulosa, che

ammonta al 6% del peso secco totale, è composta da catene di glucosio con legame  $\beta$  1-4 glicosidico e risiede principalmente nella crusca e nel pericarpo del chicco. Nella crusca è rafforzata con la lignina. Le emicellulose, in piccola concentrazione, sono presenti principalmente nelle membrane dei granuli di amido all'interno dell'endosperma. La concentrazione proteica nell'orzo può variare tra l'8 e il 13%, ma solamente un terzo si ritrova nel prodotto finito. Tra le proteine troviamo 4 gruppi: globuline, albumine, prolamine, glutenine. Albumine e globuline sono importanti per le caratteristiche della schiuma. I minerali costituiscono fino al 3% del peso secco del chicco. Tra questi i più rilevanti sono: silicio, potassio e fosforo. I grassi costituiscono anch'essi il 3% del peso secco del chicco. In particolari gli steroli sembrano essere importanti per le fasi iniziali della fermentazione. È presente anche la vitamina C, E e vitamine del gruppo B. I polifenoli presenti tra 0,1-0,3% del peso secco, hanno anch'essi influenza nei processi brassicoli, influenzando la torbidità della birra, colore, schiuma e gusto. (AA.VV. Beer In Health And Disease Prevention. 2009.)

### 1.1.3 LUPPOLO

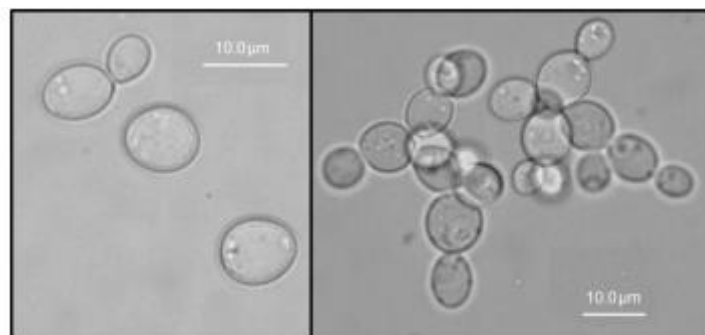


**Fig 2:** Luppolo

Il luppolo (*Humulus lupulus* L. appartenente alla famiglia delle cannabacee) addizionato durante la birrificazione, è in grado di svolgere un duplice effetto: da un lato dona alla birra il suo aroma amarognolo e dall'altro possiede anche proprietà conservanti. Le zone in cui viene maggiormente portata avanti la cultura del luppolo si trovano principalmente in Germania e negli Stati Uniti. Vengono coltivate solamente piante femmine non fecondate poiché ad interessare è solamente il fiore femminile di forma conica. Ai fini della birrificazione, tre sono le sostanze fundamentalmente utili: le resine, i polifenoli e le sostanze aromatiche. Le resine costituiscono tra il 10 e il 20% del peso secco del luppolo e sono responsabili del suo sapore amaro. Si suddividono in  $\alpha$  e  $\beta$ -acidi le cui capacità amaricanti sono piuttosto differenti. Gli  $\alpha$ -acidi durante la bollitura subiscono isomerizzazione, trasformandosi in iso- $\alpha$ -acidi i quali hanno un più alto potere amaricante. I  $\beta$ -acidi sono invece meno solubili e possiedono un potere amaricante di molto inferiore. Le resine però, non contribuiscono solamente a modellare il sapore finale della birra, esse posseggono anche proprietà antibatteriche, garantendo una maggiore stabilità e sicurezza microbiologica del prodotto finito. I polifenoli nel luppolo ammontano al 4- 14% del peso secco. La loro quantità è legata alla varietà coltivata. Oltre al potere antiossidante intrinseco dei polifenoli, un tipo in particolare, il xanthohumol ha suscitato interesse per le sue proprietà antitumorali. In fine, un'altra componente del luppolo è rappresentata dalle sostanze aromatiche. Sono oli essenziali che costituiscono tra lo 0,4-2,0% del peso secco. In questi oli sono state individuate ben 300 diverse molecole capaci di donare al luppolo note speziate, agrumate e floreali. Le varietà di luppolo che contengono maggiori quantità di questi oli essenziali, vengono chiamate luppoli aromatici. Data l'estrema volatilità di tali molecole, quando si decide di utilizzare queste varietà, il luppolo viene addizionato solo verso la fine della bollitura o a volte alla fine della fermentazione. Oggi, l'uso di luppolo intero ed essiccato nell'industria brassicola è diventato sempre più raro. Si

preferisce invece utilizzare pellet di luppolo, essiccato e in atmosfera controllata per rendere il prodotto più stabile nel tempo. A volte questo pellet viene trattato termicamente per trasformare direttamente gli  $\alpha$ -acidi in iso- $\alpha$ -acidi. In commercio sono anche presenti delle resine di luppolo estratte. Inizialmente queste resine venivano estratte con dei solventi chimici, mentre attualmente viene utilizzata dell'anidride carbonica liquida che consente di avere un prodotto finale chimicamente più sicuro. Queste nuove tecniche consentono di avere una maggiore riproducibilità nel processo di birrificazione e di avere a disposizione solamente le molecole del luppolo a noi utili, eliminando, a monte, le componenti indesiderate. (AA.VV. Beer In Health And Disease Prevention. 2009.) (AA.VV. Brewing Yeast and Fermentation. 2001.)

#### 1.1.4 LIEVITO



**Fig 3:** Immagine al microscopio di *S. pastorianus* ssp. *Carlsbergensis* TUM 34/70 e *S. cerevisiae* TUM 127.

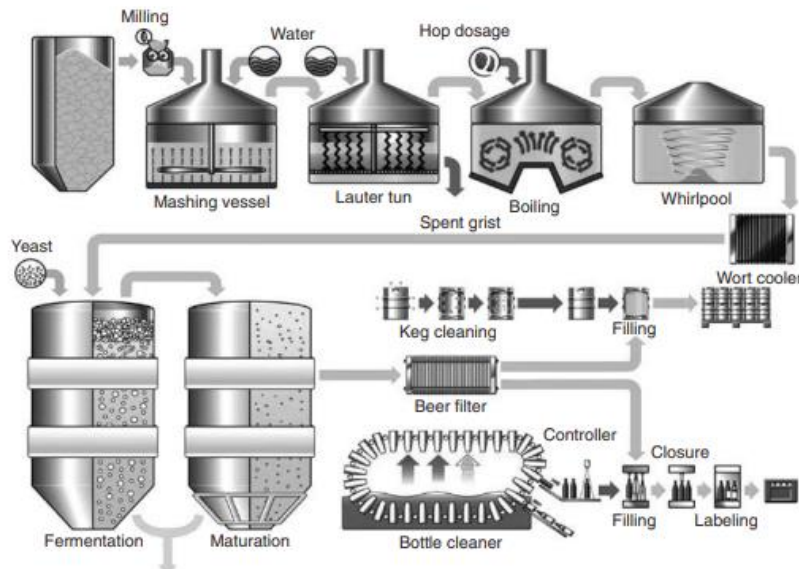
Il lievito è un organismo eucariotico e unicellulare. Il suo ruolo nel processo di birrificazione è di fondamentale importanza, poiché grazie a questo microrganismo gli zuccheri vengono convertiti in etanolo e in altri composti secondari che contribuiscono

al sapore del prodotto finito. Alcune delle specie di lievito si riproducono asessualmente tramite mitosi, ma la maggior parte dei lieviti utilizzati nell'industria brassicola, si riproducono per divisione asimmetrica, definita gemmazione. (AA.VV. Brewing scienze, 2017.) Oltre alla riproduzione asessuata, possono anche dare luogo a una riproduzione sessuata, con la generazione di spore aploidi che unendosi formeranno lo zigote diploide. Questo particolare ciclo vitale li fa classificare come funghi. (Knop, M. 2011). le specie di lievito impiegate in ambito braasicolo sono due: *S. cerevisiae* che viene impiegato per la produzione di birre Ale (alta fermentazione) e *S. pastorianus* per la produzione di birre Lager (bassa fermentazione). Il primo viene definito anche top-fermenting poiché durante la fermentazione rimane in sospensione e si accumula principalmente nella parte superiore della birra, in prossimità della schiuma. Il secondo viene denominato bottom-fermenting perché dopo la fermentazione lo ritroviamo sul fondo del fermentatore a causa della sua tendenza a flocculare. Inoltre, *S. cerevisiae* ha una temperatura di fermentazione ottimale di 20-22°C. Al contrario *S. pastorianus* ha una fermentazione più lenta e una temperatura ottimale tra gli 8-13 °C. (AA.VV. Brewing scienze, 2017).

I prodotti principali del metabolismo dei lieviti sono: etanolo, CO<sub>2</sub>, e una serie di prodotti secondari, responsabili del profilo aromatico. Tra gli alcoli superiori più rappresentati troviamo: 2-metil butanolo e 3-metil butanolo e 2-fenil etanolo. Questi donano aromi che vanno dal floreale ai solvent-like flavor (aromi che ricordano solventi chimici, odore di vernice o di acetone). Gli esteri sono i responsabili degli aromi fruttati. Sono molto rappresentati soprattutto nelle birre ad alta fermentazione e tra i più abbondanti troviamo: etil-acetato e isoamil-acetato.

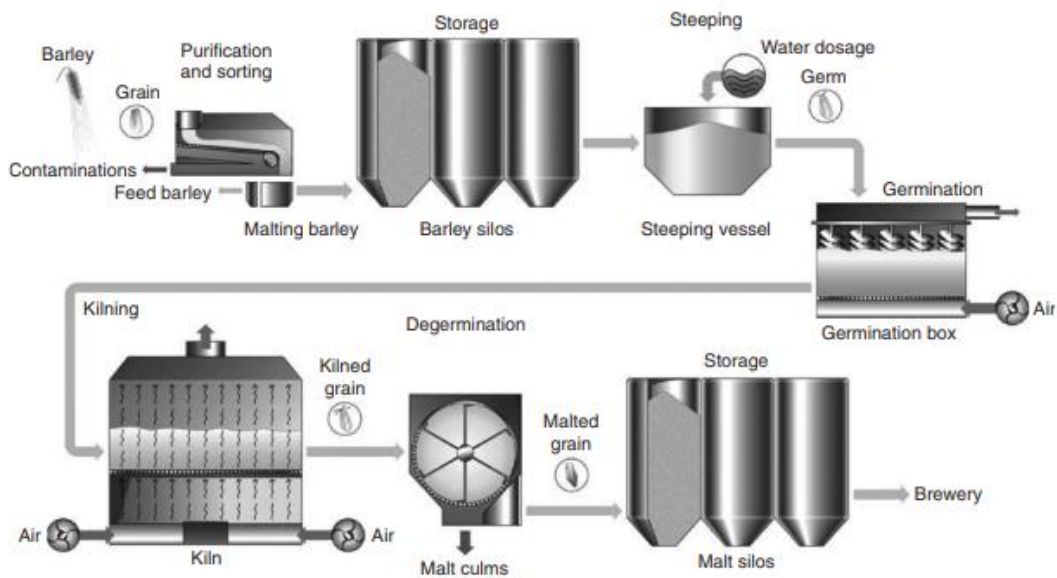
## 1.2 IL PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA

Le varie fasi nel processo produttivo della birra sono: maltazione ammostamento, fermentazione, maturazione, filtrazione e/o stabilizzazione.



**Fig 4:** processo produttivo della birra suddiviso nelle sue fasi.

### 1.2.1 MALTAZIONE



**Fig 5:** fasi della maltazione

La maltazione è un processo necessario per rendere fermentabili gli zuccheri contenuti nell'orzo. Infatti gli zuccheri dell'orzo sono impacchettati all'interno dell'endosperma del chicco sotto forma di amido. Questa fonte energetica serve al seme per consentire lo sviluppo del germoglio. Una volta giunti al maltificio, i grani di orzo subiscono un'ispezione visiva. Viene valutata la grandezza dei chicchi, la presenza di malattie della pianta, brillantezza, odore, colore e l'eventuale presenza di inizi di germogliazione che possono presentarsi a seguito di particolari condizioni climatiche. Viene inoltre controllata l'idratazione, il contenuto proteico e la capacità germinativa. Quest'ultimo parametro rappresenta il rapporto grani vivi/grani morti che non dovrebbe essere al di sotto del 95%. Prima di essere utilizzato, l'orzo viene stoccato in silos areati e freddi per un periodo compreso tra le 4 e le 8 settimane. L'obiettivo della maltazione è quello di mettere i chicchi in condizioni ottimali a far partire la germinazione. In questo modo, l'orzo comincerà a produrre tutta una serie di enzimi necessari all'idrolisi delle proteine e alla scissione delle lunghe catene di amidi. Uno dei primi segni, visibile in questa fase è la comparsa delle radichette, indice che la germinazione ha avuto inizio. Prima che sia troppo tardi e che il germoglio utilizzi tutti gli zuccheri e le proteine per sostenere la sua crescita, questo processo viene interrotto surriscaldando e asciugando i semi. All'arrivo nel maltificio, per essere acquistati, i grani devono avere un'umidità inferiore al 13%. Per consentire la germinazione tuttavia, il contenuto idrico deve essere di molto superiore, con percentuali che si aggirano tra il 42 e il 48%. La prima tappa del processo di maltazione sarà dunque l'immersione dei grani in acqua. Oltre all'idratazione sono anche importanti: la temperatura, che deve trovarsi tra l'intervallo di 14 e i 18 °C, il contenuto di ossigeno, essenziale per la crescita e la concentrazione di anidrite carbonica la quale deve essere mantenuta sotto controllo ed eventualmente rimossa. Durante la germinazione, molti enzimi saranno attivati, altri prodotti de novo e contribuiranno sinergicamente alla



liberazione di tutte le sostanze nutritive. È fondamentale una buona citolisi affinché tutte le molecole di amido vengano scomposte e non ci sia una perdita inutile di nutrienti. Come conseguenza di tali avvenimenti, il chicco risulterà sempre più indebolito nella struttura.

Alla fase di germinazione seguiranno asciugamento-essiccamento e tostatura dei chicchi. Questi passaggi sono fondamentali sia per bloccare la crescita del germoglio e sia per conferire al malto la tipica tostatura che lo contraddistingue. Durante la fase di essiccamento il contenuto idrico passa da 45 al 10%. Per la tostatura, le temperature richieste sono molto più alte e si aggirano intorno ai 90-105°C. Queste temperature consentono alla reazione di Maillard di avvenire. Questa reazione coinvolge molecole a basso peso molecolare come zuccheri e amminoacidi e produce tutta una serie di molecole aromatiche dal sentore caratteristico. Con queste temperature, l'umidità continua a scendere ulteriormente, stabilizzandosi attorno al 3,4-4% nei malti chiari e 1,5-2% nei malti scuri. Le radichette che si erano generate durante la fase di germogliatura, vengono rimosse proprio dopo la tostatura. La loro rimozione è necessaria sia perché sono molto igroscopiche e sia perché se presenti nei processi di lavorazione successivi, donano un sapore amaro alla birra, oltre ad alterarne la colorazione. (AA.VV. Beer In Health And Disease Prevention. 2009; AA.VV. Brewing scienze, 2017).

A questo punto, i grani maltati devono essere moliti. La molitura non deve essere estremamente sottile e la crusca non va eliminata per facilitare la filtrazione nelle fasi successive. Questo passaggio è di cruciale importanza per favorire una maggiore superficie di contatto tra acqua-enzimi e substrato.

## 1.2.2 AMMOSTAMENTO.

L'orzo molito viene dunque miscelato con l'acqua. In questa fase, le diverse temperature a cui viene sottoposta la miscela di orzo e acqua, il tempo di permanenza a quelle date temperature e le oscillazioni di pH, favoriscono l'attivazione dell'attività catalitica di particolari enzimi. La prima tappa è tra i 37-45°C e serve per la degradazione delle gomme e delle emicellulose. La seconda sosta permette l'attivazione degli enzimi proteolitici e avviene a una temperatura compresa tra i 45-52°C. Le proteine presenti nel mosto hanno una massa molto eterogenea. Si ritrovano proteine con elevatissimo peso molecolare così come è possibile trovare aminoacidi liberi. Le proteasi si dividono in due grandi gruppi: endopeptidasi ed esopeptidasi. Le prime vanno a scindere le catene proteiche nel mezzo, rilasciando in soluzione polipeptidi più o meno lunghi. Le esopeptidasi invece agiscono alle estremità delle catene proteiche, rilasciando singoli aminoacidi in soluzione. La concentrazione proteica è molto importante. La giusta concentrazione di azoto assimilabile è necessaria per la corretta crescita dei lieviti. Inoltre, le proteine nella birra sono responsabili della stabilità della schiuma e della torbidità finale. La terza sosta riguarda la digestione degli amidi. L'amido può assumere due differenti strutture, una più lineare che può impacchettarsi in modo più compatto (amilosio) e una struttura più ramificata e meno compattabile (amilopectina). Durante l'ammestamento l'amido attraversa tre fasi principali: 1- gelatinizzazione, 2-solubilizzazione, 3-saccarificazione. Più sarà alto il rapporto amilosio/amilopectina e più lentamente e con difficoltà avverrà la gelatinizzazione e viceversa. Spesso per aumentare la resa della saccarificazione vengono addizionati degli enzimi in modo artificiale oppure vengono miscelate al mosto di orzo, altre farine di diversa origine. Durante la digestione enzimatica, le  $\beta$ -amilasi iniziano a scindere ramificazioni date dai legami  $\beta$ -1-4

glicosidici sia di amilosio che di amilopectina e vengono attivate alla temperatura di 58-63°C. Tale digestione fa diminuire la viscosità del mosto e fornisce una maggiore superficie di contatto con l'acqua. Le  $\alpha$ -amilasi invece si attivano a 68-73°C andranno a digerire i legami  $\alpha$ -1-4 glicosidici. Le destrine che verranno create da questi processi, saranno poi scisse in zuccheri semplici grazie al processo di saccharificazione. In fine si porta la temperatura a 78°C per disattivare l'attività enzimatica di tutti gli enzimi ad eccezione delle  $\alpha$  amilasi

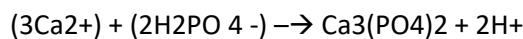
Dopo l'ammestamento, il mosto viene filtrato per separare le parti solide (le trebbie) dalla parte liquida (il mosto). La parte solida rappresentata dai frammenti della macinazione dell'orzo, fungerà da filtro. Dopo la prima filtrazione, ne vengono fatte altre di seguito, sempre facendo passare l'acqua calda attraverso le trebbie. Il prodotto della prima filtrazione, più quelle che seguono rappresenteranno il mosto da inviare alla fase di fermentazione. Anche la temperatura è importante durante questa fase. Sebbene temperature elevate garantiscano una minore viscosità e quindi una più rapida filtrazione, andando al di sopra degli 80 °C vanno a inattivare le  $\alpha$  amilasi che in questa fase sono ancora attive, riducendo l'efficacia della saccharificazione. Le trebbie saranno recuperate e riutilizzate per usi secondari in ambito agricolo.

Dopo la filtrazione si passa alla bollitura. Questa fase ha diversi obiettivi, tra cui:

- Evaporazione dell'acqua così da rendere più concentrati gli estratti di malto nel mosto,
- Evaporazione delle componenti aromatiche non desiderate come DMS. Questa sostanza conferisce un sapore simile a quello del cavolo e la sua concentrazione deve essere tenuta sotto 100g/l.
- Modellazione del colore e formazione di sostanze aromatiche.

- Isomerizzazione delle sostanze aromatiche del luppolo.
- Precipitazione di proteine coagulate per flocculazione. Troppe proteine generano torbidità ma troppe poche non danno stabilità alla schiuma.
- Sterilizzazione del mosto.
- Inattivazione enzimatica anche delle  $\alpha$ -amilasi.
- Abbassamento del pH

All'innalzarsi delle temperature, aumenta la frequenza della reazione tra lo ione calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) proveniente dall'acqua e lo ione difosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) proveniente dal malto. Come risultato avremo la formazione di calcio fosfato e di ioni idrogeno i quali contribuiranno ad abbassare il pH fino al valore ottimale di 5.2 -5.3.



Con l'abbassamento del pH, le proteine ottenute durante la fase di , ora sono ancora ulteriormente scomposte in amminoacidi, utili al metabolismo del lievito. I corpi proteici più grandi eventualmente presenti precipiteranno assieme ai polifenoli formando quello che viene chiamato trup che sarà in seguito rimosso. Esistono due tipi di trup. Quelli che vengono chiamati trup a caldo la cui rimozione è di fondamentale importanza per il benessere dei lieviti, per migliorare la filtrazione e per avere una birra più chiarificata e i trup a freddo. Questi ultimi si formano durante il raffreddamento del mosto e solitamente sono lasciati in soluzione. Benché come i trup a caldo, anche quelli a freddo vanno a incidere negativamente sulla fermentazione, aderendo alla parete dei lieviti e rallentandone l'attività, sono anche importanti per le caratteristiche organolettiche della birra.

In questa fase avviene anche l'aggiunta del luppolo. Il mastro birraio ha varie opzioni a seconda di quale vuole sia il risultato finale. Infatti, lo si può aggiungere a più riprese

durante il periodo della bollitura che va da 30 a 90 minuti. Il luppolo aggiunto all'inizio conferisce il sapore amaro tipico. Aggiungendolo invece nelle fasi finali della bollitura si riescono a conservare i composti aromatici più volatili che invece sarebbero evaporati a temperature troppo alte.

Il mosto viene poi raffreddato molto rapidamente per impedire contaminazioni batteriche. Il raffreddamento viene incentivato grazie a delle bobine in acciaio inox presenti all'interno dei silos in cui viene raccolto. All'interno di queste serpentine di acciaio viene fatta scorrere acqua fredda per far precipitare più velocemente le temperature del mosto. Quando le temperature scendono al di sotto dei 60°C cominciano a formarsi anche i trup a freddo, che come anticipato prima verranno lasciati in soluzione.

(AA.VV. Beer In Health And Disease Prevention. 2009; AA.VV. Brewing scienze, 2017).

### 1.2.3 FERMENTAZIONE.

Il mosto, amaricato grazie al luppolo e raffreddato dopo la fase di ebollizione, viene trasferito all'interno di un fermentatore. Spesso, nel travaso all'interno del fermentatore, il birrifico potrebbe anche prevederne l'ossigenazione. A questo punto, il mosto viene inoculato con il lievito. Grazie ai lieviti, gli zuccheri estratti dal malto durante l'ammestamento saranno utilizzati per la produzione di alcol e le proteine verranno invece utilizzate dal lievito per il suo sostentamento.

Generalmente un inoculo corretto ha una concentrazione di lievito che oscilla tra  $10^7$  cellule/ml con una vitalità ottimale. Dopo l'inoculo, il mosto viene areato nelle prime ore di fermentazione, il che favorisce una distribuzione uniforme del lievito in tutto il serbatoio e la corretta moltiplicazione.

La fermentazione si divide in due fasi distinte: fermentazione primaria e fermentazione secondaria. I tempi necessari per concludere la fermentazione primaria dipendono dal tipo di lievito. Avviandosi verso la fine del primo ciclo di fermentazione, i lieviti cominciano ad aggregarsi tra di loro, diventando troppo pesanti per rimanere in soluzione e di conseguenza precipitando. Questo fenomeno viene chiamato flocculazione. Gli ioni calcio disciolti nella birra sono essenziali affinché tutto ciò avvenga, inoltre lieviti diversi flocculano con una velocità e un'efficienza diversa. I lieviti che flocculano troppo rapidamente, potrebbero necessitare di essere risospesi dopo un determinato intervallo di tempo per garantire che tutti gli zuccheri presenti vengano fermentati. Viceversa, lieviti che faticano a flocculare potrebbero dare problemi di torbidità nel prodotto finito. I lieviti che flocculano con una velocità intermedia, spesso rappresentano la scelta migliore poiché hanno il tempo per fermentare tutti gli zuccheri, riescono a riassorbire efficientemente prodotti secondari come il diacetile e infine flocculando correttamente facilitandone la rimozione. Alla fine della fermentazione primaria, si sarà formata quella che viene chiamata birra verde che non presenta ancora un aroma ben stabilizzato e i composti secondari prodotti dai lieviti potrebbero essere responsabili di aromi sgradevoli. Una volta finita la fermentazione primaria, i lieviti che si saranno aggregati tra loro verranno rimossi, mentre la birra verde sarà inviata alla fermentazione secondaria, la quale potrà avvenire in altri container oppure, nel caso di birre non filtrate, questa fase può essere portata avanti direttamente nelle bottiglie destinate al consumatore. Anche se la maggior parte dei lieviti sono stati rimossi a seguito della fermentazione primaria, una parte è comunque rimasta in soluzione e saranno loro a determinare la fermentazione secondaria. Questa si svolgerà a temperature più basse, intorno ai 0-2°C per la birra a bassa fermentazione e 7-10°C per quella ad alta fermentazione. Inoltre, verrà portata avanti per un periodo di tempo più lungo che si aggira tra le 3 e le 5 settimane. In

questo intervallo di tempo, la birra continuerà la sua maturazione, i lieviti riassorbiranno la maggior parte dei composti secondari non desiderati, il sapore amaro del luppolo verrà attenuato, la produzione di CO<sub>2</sub> andrà a saturare la birra e infine avverrà la chiarificazione a seguito della precipitazione degli ultimi lieviti rimasti. In caso di birre non filtrate, come anticipato precedentemente, il lievito flocculato viene lasciato a contatto con la birra, viceversa verrà rimosso per filtrazione e solo in seguito si procederà con l'imbottigliamento.

Per quanto riguarda il pH che nel mosto è intorno ai 5.2 - 5.3, durante la fermentazione andrà scendendo fino a raggiungere un picco minimo di 4.1 - 4.2. Questa acidificazione è importante anche per garantire una maggiore sicurezza microbiologica al prodotto finito, non permettendo la proliferazione di microorganismi indesiderati. (Cabras et al., 2004; - Manzoni, 2006) (AA.VV. Beer In Health And Disease Prevention. 2009; AA.VV. Brewing scienze, 2017).

#### 1.2.4 DOWNSTREAM

Una volta matura, la birra può passare attraverso un'ulteriore fase fatta di step facoltativi, ovvero il downstream. Ad esempio, se nelle fasi precedenti la saturazione della CO<sub>2</sub> non ha raggiunto i livelli ottimali (0,45 – 0,52%) si può aggiungere manualmente diossido di carbonio per avere la concentrazione finale desiderata. In alcune situazioni potrebbe essere richiesta l'aggiunta ulteriore di proteasi per evitare l'insorgenza di torbidità nel prodotto finito. Ciò è particolarmente vero quando una birra che presenta troppe proteine residue viene conservata in ambiente refrigerato. Per raggiungere una maggiore stabilità microbiologica la birra potrebbe subire processi di pastorizzazione. Dopo il raffreddamento del mosto infatti, questo risulta un terreno fertile sia per i lieviti da noi inoculati, ma anche per eventuali batteri e muffe presenti nell'ambiente o sull'attrezzatura di lavoro. Inizialmente per la pastorizzazione si

utilizzava una temperatura per 62 °C protratta per 20 minuti. Successivamente ci si è resi conto che tali temperature protratte per così tanto tempo potevano influenzare il sapore finale della birra. Le moderne tecniche di pastorizzazione invece, utilizzano temperature di 71-75°C per 15- 30 secondi. In questo modo vengono maggiormente preservate le caratteristiche organolettiche del prodotto. Sempre per il conseguimento di tale fine, negli anni sono anche comparse tecniche di pastorizzazione a freddo che prevedono l'impiego di sostanze chimiche artificialmente addizionate. Ovviamente una birra pastorizzata possiede una shelf life di molto superiore a alle birre non pastorizzate, che per impedire il proliferare di contaminazioni, devono essere conservate in ambiente refrigerato ed essere consumate in poco più di un mese. (Harrison MA, 2009).

La crescente richiesta da parte del consumatore di una birra dal sapore ricercato e non standardizzato come invece avviene nella produzione di massa, ha favorito negli ultimi anni, una crescita quasi esponenziale dei micro birrifici in tutta la penisola.

### **1.3 BIRRA ARTIGIANALE**

Legalmente, la definizione di birra artigianale in Italia è delineata dall'articolo 2 della legge 16 agosto 1962, n. 1354, dopo il 4 con la seguente aggiunta:

*«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 di 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 di utilizzo dei diritti di proprietà immateriale altrui e la cui produzione annua non superi 200.000 ettolitri, includendo in questo quantitativo le quantità di birra prodotte per conto di terzi».* (gazzettaufficiale.it)

La crescente richiesta da parte del consumatore di una birra dal sapore ricercato e non standardizzato come invece avviene nella produzione di birra industriale, ha favorito



negli ultimi anni, una crescita quasi esponenziale dei micro-birrifici in tutta la penisola. Si è passati da 175 strutture nel 2007 (Unionbirrai, 2011) a circa 1371 attivi. Il picco più alto di aperture di strutture si è verificato fino al 2015, successivamente si nota un decremento della curva. ([www.microirrifici.org](http://www.microirrifici.org)).

Come si legge nell'articolo legislativo, la birra artigianale è un prodotto non pastorizzato, né microfiltrato tanto da denominarla "cruda". Sebbene ciò la rende più instabile microbiologicamente, garantendole una shelf-life inferiore rispetto alle sue concorrenti di produzione industriale, l'assenza di queste due fasi, sotto certi punti di vista potrebbe risultare un vantaggio agli occhi del consumatore. Non essendo filtrata, al suo interno si sono ancora delle cellule di lievito, e il fatto che non sia pastorizzata, garantisce che tali cellule rimangano vive. In questo modo, durante i mesi, le proprietà organolettiche della bevanda andranno mutando nel tempo, arricchendosi di complessità. Questo nelle birre pastorizzate non potrebbe mai accadere. Solitamente le birre artigianali prevedono una rifermentazione in bottiglia, con l'aggiunta di zuccheri dall'esterno (5 g/L) e talvolta anche un ulteriore inoculo di lievito ( $10^5$ - $10^6$  cellule/ml). Grazie all'attività di tali lieviti, verranno prodotte maggiori quantità di etanolo e di CO<sub>2</sub>. La maggiore presenza di CO<sub>2</sub> rende la birra più rinfrescante al sapore e aumenta un po' la produzione di schiuma. (Vanderhaegen et al., 2003)

In fine, un lungo periodo di contatto tra lievito e birra rifermentata, può nel tempo portare l'autolisi delle cellule di lievito, determinando il rilascio delle componenti intracellulari di quest'ultimo, tra cui: acidi nucleici, amminoacidi, acidi grassi e peptidi, tra cui enzimi come le esterasi che possono determinare modifiche nel gusto della birra. (Ernest et al., 1980; Leroy et al., 1990; Masschelein, 1986; Ormrod et al., 1991)

## 1.4 UTILIZZO DI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES IN AMBITO BRASSICOLO

Nel corso dei millenni, le fasi di birrificazione sono cambiate notevolmente. In antichità non si conoscevano i processi che portavano al prodotto finito, e la poca sterilità adoperata faceva sì che le birre prodotte provenissero da fermentazioni spontanee a cui partecipavano sia lieviti che batteri presenti negli ambienti di lavoro. Dopo che Pasteur attribuì il fenomeno della fermentazione al lievito nel 1860, Hansen e Jorgensen, scoprirono i vantaggi nell'utilizzo di colture pure di *Saccharomyces*.

Oggi giorno l'interesse per i lieviti non-*Saccharomyces* è cresciuto notevolmente sia a seguito della necessità di immettere sul mercato prodotti nutrizionalmente innovativi come birre prive di glutine, povere in contenuto alcolico e funzionali, sia perché questi lieviti contribuiscono ad arricchire il profilo organolettico del prodotto finito.

I principali lieviti non-*Saccharomyces* attualmente studiati 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*.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i seguenti ceppi non-*Saccharomyces*, *L. thermotolerans* e *K. unispora*, per la capacità di fermentare determinati substrati, per le potenziali proprietà probiotiche e per il profilo aromatico donato alla birra.

(Vanderhaegen et al., 2003) (AA.VV. Non-conventional Yeasts. 2019) (Prandi, 2014)

## 1.5 CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA

L'aroma finale della birra è determinato dalla sommatoria di centinaia di molecole diverse. Tali molecole si sviluppano durante tutto il processo di birrificazione fin anche durante l'invecchiamento della birra. Alcuni di questi composti provengono dalle materie prime utilizzate come substrato, mentre altre vengono prodotte dalle attività del lievito, come intermedi di fermentazione o come by-products del metabolismo delle cellule. Le sostanze che hanno un maggior peso nel delineare il profilo aromatico della birra, sono quelle prodotte dal lievito e tra le più importanti troviamo: alcoli superiori, esteri, VDKs, composti carbonilici, acidi organici, composti sulfurei e aldeidi. Le concentrazioni di tali elementi devono essere tenute sotto controllo e bisogna prestare attenzione affinché non superino il loro valore soglia. Superato tale valore, risulterebbero predominanti nel bouquet aromatico, compromettendone l'integrità. I dati riguardanti gli esteri però potrebbero trarre in inganno, poiché tali molecole, lavorando in sinergie con le altre, potrebbero amplificare l'impatto del loro aroma sul bouquet finale pur restando al di sotto del loro valore soglia. Sono molti i fattori che possono influenzare il bilanciamento tra questi elementi, alcuni di questi sono: il ceppo dei lieviti adoperati, il tipo e la specie di malto, la variazione della temperatura durante la fermentazione, il pH del mosto, la tipologia di molitura e tanti altri.

Nella tabella sottostante sono riportati i valori soglia di alcune di queste molecole. (AA.VV. Breawing And Distilling Yeast. 2017)

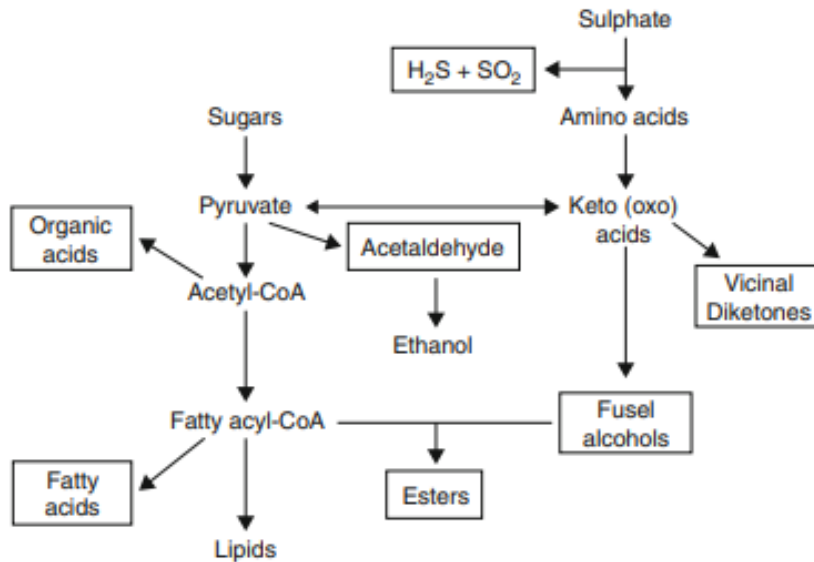
| ESTERI                                 | Soglia organolettica (mg/L) |
|--|-----------------------------|
| Ethyl acetate (fruity, solvent-like)   | 3.0                         |
| Isoamyl acetate (fruity, banana aroma) | 1.2                         |
| Isobutyl acetate (pineapple)           | 0.7                         |
| Ethyl carbonate (sour apple)           | 0.22                        |
| Ethyl caprylate (sour fruit)           | 0.9                         |
| Phenyl acetate (roses, honey, fruity)  | 0.4                         |

| ALCOLI SUPERIORI                       | Soglia organolettica (mg/L) |
|--|-----------------------------|
| Amyl alcohols (alcohol)                | 65                          |
| Isobutanol (solvent)                   | 70                          |
| Propanol (solvent)                     | 200                         |
| Methyl butanol (banana, medicinal)     | 65                          |
| Phenyl alcohol (roses, sweet, perfume) | 125                         |

**Tabella 1:** principali esteri e alcoli superiori nella birra.

**Alcoli superiori.** Gli alcoli superiori che maggiormente influenzano l'aroma della birra sono: n-propanolo, isobutanolo, 2-metil-1-butanolo e 3-metil-1-butanolo anche se ne sono stati identificati tanti altri. La loro sintesi è particolarmente complessa, perché può derivare sia dal metabolismo delle proteine e sia dal metabolismo dei carboidrati passando dal piruvato.



**Fig.6:** principali vie metaboliche con cui il lievito sintetizza esteri, alcoli superiori composti sulfurei, VDKs, acetaldeide ed etanolo.

Durante la fermentazione, i lieviti assorbono gli aminoacidi disciolti nel mosto al fine di incorporarli nelle loro strutture interne. Quello che rimane dal metabolismo degli aminoacidi sono gli  $\alpha$ -keto acidi i quali entrano in una catena di reazioni irreversibili che portano alla formazione degli alcoli superiori (detti anche fusel alcohols). Oltre che nella fase catabolica, questi composti sono anche prodotti durante la fase anabolica delle proteine all'interno dei lieviti, in particolare quelli che coinvolgono gli aminoacidi ramificati BCAA. (AA.VV. Breawing And Distilling Yeast. 2017) L'n-propanolo e il 2-metil- propanolo e l'isobutanolo derivano dall'amminoacido valina. I primi due forniscono una nota di durezza alla birra (Smogrovicova et al., 1999). L'isobutanolo invece deve essere mantenuto al di sotto del 20% della somma di n-propanolo e alcoli isoamilici, ha un effetto negativo sul sapore della birra. (kobayashi et al., 2006) Il 2-metil-butanolo deriva dal catabolismo dell'isoleucina mentre il 3-metil-butanolo dal catabolismo della leucina. Entrambi conferiscono note fruttate alla birra. Il 2-fenil- etanolo, derivante dal metabolismo della fenilalanina dona un sapore dolce e di rosa alla birra. Ovviamente per ogni

composto, superato il valore soglia si va a rovinare l'equilibrio aromatico finale.  
(Smogrovicova et al., 1999)

Data la loro stretta connessione con il metabolismo amminoacidico, la concentrazione e la varietà degli alcoli superiori che andremo a ritrovare nella birra, sarà dipeso anche molto dalla tipologia e dalla quantità di amminoacidi inizialmente presenti nel mosto.  
(Rossi et al., 2014)

**Esteri.** Gli esteri sono principalmente formati durante la fase la fase più vigorosa della prima fermentazione e si originano grazie alla condensazione di acidi organici con alcoli. Gli esteri volatili si dividono in due grossi gruppi: gli esteri acetati e gli esteri etil-esteri. I primi si originano attraverso la reazione tra acido acetico ed etanolo o alcoli superiori. Nei secondi invece, il radicale alcolico è fornito dall'etanolo, mentre la parte acida è data da un MCFA (medium chain fatt acids) acidi grassi a catena intermedia. I sei esteri maggiormente importanti per formare l'aroma della birra sono: etil-acetato (donano il solvent-like flavor), isoamil – acetato (richiama il sapore della banana), isobutil – acetato (dona un aroma fruttato) fenil-etil acetato (dona un'essenza di miele e rose), etil-esanoato (aroma di mele dolci) ed etil-ottanoato (sapore di mela aspra). (AA.VV. Breawing And Distilling Yeast. 2017) La concentrazione degli esteri nella birra può variare grazie a diversi fattori, tra cui la composizione del mosto, il grado plato (produzione maggiore se  $>13^{\circ}\text{p}$ ), le temperature durante la fermentazione, tempo e pH, la concentrazione di ossigeno poiché da questa è condizionata la sintesi di acidi grassi e questi a sua volta influenzano i processi di esterificazione. (Vanderhaegen et al., 2003 b). Anche il ceppo di lievito influenza la quantità e la qualità degli esteri prodotti. Nel grafico sottostante è raffigurata la produzione di esteri

confrontando due ceppi diversi di lievito (*S. cerevisiae* e *S.pastorianus*) in un mosto di solo orzo con grado plato 16°P, a una temperatura di 20°C.

|            | Ethyl acetate | Isoamyl acetate |
|------------|---------------|-----------------|
| Distillers | 46.2          | 1.3             |
| Distillers | 36.2          | 0.9             |
| Ale        | 20.6          | 0.6             |
| Ale        | 36.2          | 0.8             |
| Ale        | 25.6          | 3.5             |
| Lager      | 60.2          | 4.6             |
| Lager      | 32.6          | 1.6             |

**Tabella 2:** produzione di etil acetato e isomalil acetato da parte dei vari ceppi di lievito.

Durante la maturazione e l'invecchiamento della birra, questa continua a mutare il suo aroma. Questo, come già detto, può essere dovuto a fenomeni legati alla fermentazione secondaria, ma anche alla condensazione di acidi grassi con etanolo dando vita a esterificazione. Alcuni esteri invece come l'isoamil-acetato sono conosciuti per dare luogo ad idrolisi durante l'invecchiamento della birra. Per concludere, anche il rilascio di esteri a seguito dell'autolisi dei lieviti potrebbe incidere sul bouquet finale.

(AA.VV. Breawing And Distilling Yeast. 2017)

**Composti carbonilici.** Sono oltre 200 i composti carbonilici che influenzano il sapore della birra. questi vengono prodotti durante la fermentazione a causa dell'attività metabolica del lievito. Tra questi troviamo: aldeidi, chetoni, e dichetoni vicinali. Un eccesso di questi composti potrebbe dare un sapore stantio alla birra.

L'acetaldeide è il composto carbonilico quantitativamente più presente nella birra. La sua concentrazione si aggira tra 10-15 mg/L. Viene prodotto dal metabolismo del

lievito a seguito della reazione di decarbossilazione del piruvato, risultando così un prodotto intermedio nella formazione di etanolo (Come si può notare nella figura sotto alcoli superiori). Potrebbe essere presente al di sopra del suo valore soglia che si aggira attorno ai 10 mg/L e in tal caso è causa di un sapore di erba o di mela aspra. La sua concentrazione dipende sicuramente dal ceppo di lievito utilizzato ma anche dalla temperatura di fermentazione e dal tasso di ossigeno presente. In *S. cerevisiae*, il metabolismo dell'acetaldeide risulta particolarmente complesso a causa dei numerosi enzimi coinvolti, tuttavia i due enzimi che sono coinvolti alla fine di tutti i pathways metabolici sono ADH (alcol deidrogenasi) e ALDH (aldeide deidrogenasi). Il primo enzima si fa carico della conversione dell'etanolo in acetaldeide, mentre il secondo, ossida l'acetaldeide per dare vita all'acetato. La presenza di acetaldeide viene percepito dalla cellula come una condizione di stress e vengono attivate per tale motivo una serie di geni dello shock termico denominati HSP.

Le VDKs (dichetoni vicinali) vengono prodotti durante la fermentazione come prodotto secondario della sintesi proteica. In particolare, il diacetile deriva dal metabolismo della valina e il 2-3 pentanedione dal metabolismo dell'isoleucina. Il diacetile è tra i due, quello con un impatto maggiore sull'aroma della birra. Il suo valore soglia si aggira tra 0.1-0.2mg/L per le Lager e 0.1-0.4 mg/L per le Ale. Il sapore che impartisce alla birra richiama quello del latte rancido o del burro. Il 2-3-pentadiene ha invece un valore soglia molto più alto del diacetile e si aggira intorno a 1mg/L. Il suo aroma è simile a quello del diacetile anche se richiama più delle note accostate al toffee, la tipica preparazione dolciaria inglese conosciuta anche come mu. La soglia di percezione dei due composti potrebbe variare di molto a seconda dell'etnia del beer tester e della sua dieta. Ad ogni modo la presenza di questo sentore non è ricercata sia perché non si accosta bene alla maggior parte degli stili di birra e sia perché la sua

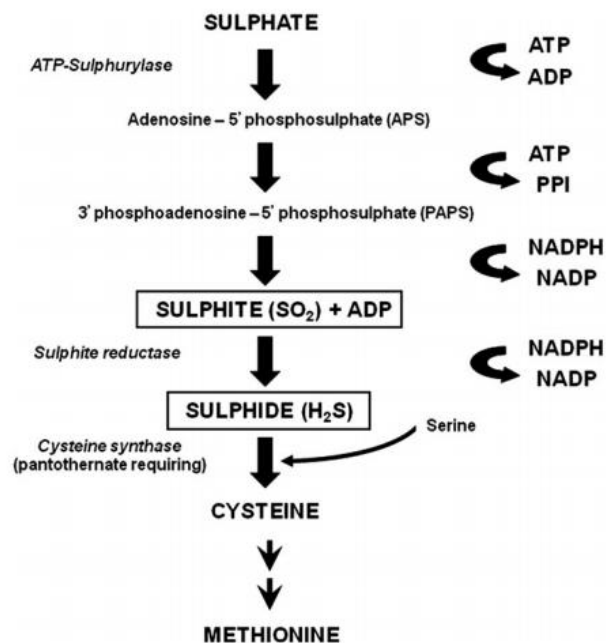


presenza potrebbe essere un indice di contaminazione microbica. (AA.VV. Breawing And Distilling Yeast. 2017)

**Acidi organici.** Gli acidi organici presenti nella birra derivano per il 50% dal mosto e per l'altro 50% dal metabolismo dei lieviti. Si dividono in acidi a corta, media e lunga catena. I primi, fino a 6 atomi di carbonio, si sviluppano durante la crescita anaerobica del lievito sia a seguito del catabolismo degli amminoacidi, sia dal ciclo incompleto degli acidi tricarbossilici. Di questa categoria fanno parte piruvato, acetato, lattato, citrato, succinato, malato, oxo-acidi. Oltre a contribuire all'abbassamento del pH durante la fermentazione, sono in grado anche di conferire alla birra un sapore acido. Poi abbiamo gli acidi organici a media catena che posseggono dai 6 ai 12 atomi di carbonio. Questi si originano durante i processi anabolici degli acidi grassi a lunga catena, vengono liberati dalla lisi cellulare e sono tossici per i lieviti. In fine abbiamo gli acidi organici a lunga catena. In gran parte originano dal mosto e non sono particolarmente desiderati poiché rendono instabile il sapore della birra oltre che la schiuma. (Smogrovicova et al., 1999)

**Composti sulfurei.** I composti sulfurei hanno un certo peso sulla determinazione del flavour finale. Sebbene la loro presenza sia tollerabile e in alcuni casi desiderabile, come ogni altro composto, un loro eccesso può compromettere il prodotto finale. Nel caso in cui siano presenti in eccesso, vengono utilizzate tecniche come lo spurgo con la CO<sub>2</sub>, elettrodi di rame o una maturazione prolungata per cercare di rimuoverli. I composti sulfurei possono derivare tanto dalle materie prime (malto, luppolo etc.) quanto dall'attività dei lieviti. Composti come idrogeno solforato (odore di uovo

marcio) o anidride solforosa (odore di fiammifero bruciato) sono infatti direttamente legati al metabolismo dei lieviti. La cattiva gestione della fermentazione potrebbe determinare un eccessivo accumulo delle suddette molecole. Molte delle differenze nella produzione dei composti sulfurei dipendono dal ceppo di lievito utilizzato, ma anche dalla composizione amminoacidica del mosto. Sia l'idrogeno solfato che l'anidride solforosa infatti, si originano durante la sintesi degli amminoacidi contenenti zolfo (cisteina e metionina) partendo dal solfato. Se nel mosto sono presenti tanti amminoacidi contenenti zolfo, il lievito tenderà ad incorporare questi prima di iniziare la sintesi ex-novo, per cui questi composti non saranno sintetizzati fin tanto che nel mosto ci saranno amminoacidi solforati a sufficienza. L'anidride solforosa, oltre a essere responsabile delle variazioni del sapore della birra, può svolgere anche un'attività antimicrobica e antiossidante. La quantità necessaria per svolgere un'azione antimicrobica tuttavia è di almeno 50mg/L, molto al di sopra della soglia consentita per legge da molti paesi (si aggira tra i 10 e i 25 mg/L).



**Fig.7:** pathway della sintesi di amminoacidi contenenti zolfo

## 1.6 PROBIOTICI

Il microbiota dell'intestino umano è formato da una varietà vastissima di microorganismi, tra cui batteri, funghi e protozoi. Un corretto equilibrio di questi microorganismi svolge un ruolo essenziale nel mantenimento della salute del tratto gastro intestinale e dell'uomo nel complesso. Questi effetti includono: il rafforzamento del sistema immunitario, prevengono e rendono più difficile la colonizzazione intestinale da parte di microorganismi dannosi, contribuiscono a mantenere l'integrità strutturale della mucosa intestinale, concorrono nel metabolismo dei farmaci e aiutano la digestione. La flora intestinale può essere minacciata dall'utilizzo di antibiotici in modo sconsiderato, da una cattiva alimentazione ma anche dallo stato di stress psicofisico individuale. Uno squilibrio e un indebolimento nel pool di questi preziosi alleati possono portare a una serie di problematiche mediche dalle più lievi fino a patologie più gravi, tra queste ricordiamo: costipazione, infiammazione del tratto gastrointestinale, sindrome del colon irritabile fino anche a predisporre allo sviluppo del tumore al colon. Inoltre, dato il crescente problema della resistenza agli antibiotici da parte dei microorganismi patogeni, sta diventando sempre più difficoltoso contrastare tali infezioni, ragion per cui va intensificandosi la ricerca sul ruolo protettivo della microflora intestinale.

Un organismo probiotico è per definizione un organismo vivo che se introdotto con la dieta apporta beneficio al suo ospite. Per essere venduto e pubblicizzato come tale, un microorganismo probiotico deve rispettare i seguenti parametri: deve essere sicuro per l'uomo, resistente alle condizioni acide dello stomaco, resistente all'azione delle secrezioni pancreatiche, capace di aderire alle cellule dell'intestino, competere contro i microorganismi patogeni, in grado di resistere agli additivi alimentari ed in grado di permanere vitale all'interno del tratto intestinale.

La maggior parte dei probiotici oggi in commercio sono ancora per lo più batteri, in particolare dominano i Lattobacilli e i Bifidobatteri. Tuttavia, recentemente dato anche l'interesse crescente per questo settore, altre specie sono state introdotte in commercio, tra cui anche alcuni lieviti (AA.VV. Yeast diversity in human welfare. 2017). Il lievito principalmente commercializzato come probiotico è il *S. cerevisiae* var. *bouardii*. Questo venne scoperto Henri Boulard nel 1920 durante una spedizione in IndoCina il cui scopo era ricerca di nuovi ceppi di lieviti utilizzabili nelle fermentazioni. Durante la sua visita, si imbatté in un'epidemia di colera e ebbe modo di fare una constatazione curiosa, gli abitanti che non si ammalavano di colera, nella maggior parte dei casi erano soliti consumare un particolare tipo di tè. Tale tè era preparato partendo dai frutti lichi e mangostano. Incuriosito da tale coincidenza, Henri riuscì ad isolare il ceppo responsabile di questa protezione dal colera, era un ceppo di lievito e lo chiamò *Saccharomyces Boulardii*. L'interesse per questo microorganismo crebbe gradualmente nel corso dei decenni, con un numero sempre più cospicuo di pubblicazioni al riguardo, fino ad arrivare ai giorni nostri ad essere il lievito maggiormente utilizzato a scopo probiotico. Fisiologicamente differisce molto dal *S. cerevisiae* in quanto ha una temperatura di crescita ottimale intorno ai 37°C (vicino alla temperatura corporea umana media), è in grado di resistere a pH bassi e all'azione degli acidi biliari oltre ad avere un effetto anti-patogenico. (McFarland, 2010). Anche se sono ancora pochi i lieviti probiotici sul mercato, sempre più ceppi sono indagati alla ricerca di queste caratteristiche e potrebbero un giorno far parte di integratori alimentari o essere impiegati per la produzione di prodotti fermentati come la birra. Alcuni dei microorganismi più studiati a tal proposito sono: *Candida humilis*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces lodderae*, *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae*, and *Yarrowia lipolytica*. (Kumura, H. et al, 2004)

## **1.7 ALIMENTI FORIFICATI CON PROTEINE**

Ogni organismo necessita di proteine sia per bilanciare le perdite ossidative degli aminoacidi e sia per soddisfare le esigenze di specifici momenti della vita come crescita gravidanza e allattamento. Il catabolismo degli aminoacidi in un individuo si può definire come le perdite di azoto dovuta ai processi fisiologici a cui va aggiunta la quantità di amminoacidi ossidati, processo normalmente presente in diete che prevedono un'assunzione di proteine diverso da zero. Con fabbisogno proteico di un individuo si intende: il più basso apporto di proteine con gli alimenti in grado di mantenere costante la massa proteica e di garantire al meglio le funzioni dell'organismo in presenza di un adeguato apporto energetico, di una normale composizione corporea e di un appropriato livello di attività fisica. La qualità di una proteina o di un gruppo di proteine si definisce attraverso due parametri: digeribilità e composizione in amminoacidi. La digeribilità indica la quantità di amminoacidi che vengono assorbiti dall'organismo rispetto a quelli che vengono ingeriti. Solitamente le proteine vegetali risultano meno digeribili rispetto a quelle di fonti animali, sia a causa di fattori anti-nutrizionali come inibitori delle proteasi eventualmente presenti (anche se questi ultimi vengono inattivati durante la cottura o durante altri processamenti del cibo) sia perché la digestione e l'assorbimento può essere ostacolata in modo più o meno marcato da cellule vegetali arrivate integre all'intestino. La composizione in amminoacidi della proteina invece si riferisce principalmente alla quantità di amminoacidi essenziali rispetto a quelli totali. Per la sintesi proteica, è necessaria la presenza contemporanea di tutti e 20 gli amminoacidi. Di questi 20, 9 sono definiti essenziali, proprio perché il nostro organismo non è in grado di sintetizzarli. Questi vengono confrontati con i loro rispettivi valori soglia presenti nel profilo di riferimento del documento WHO/FAO del 2007. L'amminoacido essenziale che sarà presente in minore quantità rispetto al suo valore soglia, sarà definito aminoacido limitante e sarà

questo a influenzare sul valore della qualità proteica. Anche per questo secondo parametro, le proteine vegetali prese singolarmente risultano meno complete.

La carenza proteica cronica rientra sotto il termine PEM (Malnutrizione Proteica Energetica) ed indica una carenza proteica e/o energetica nella dieta ed è di solito associata anche a carenza di altri nutrienti. I suoi effetti sono ben documentati e trascinano con sé alterazioni metaboliche e ormonali, infiammazione cronica e presenza di più co-morbidità. Nei paesi industrializzati, lo sviluppo di PEM non è più così ricorrente, se non in caso di patologie croniche dell'organo (broncopneumopatia cronico-ostruttiva, insufficienza renale, scompenso cardiaco) nei pazienti affetti da tumore, in stress metabolico acuto e in caso di anoressia nervosa. Tuttavia, alcune categorie non legate a malattie dell'organo sarebbero da prendere in considerazione, tra cui i migranti, le fasce di popolazione con forte disagio socio-economico e la popolazione anziana, che incorre in un inesorabile sarcopenia più o meno marcata che può sfociare nei casi più gravi in cachessia, con la riduzione eccessiva del peso corporeo, riduzione della massa muscolare tanto da dare problemi di deambulazione e una serie di altri disturbi.

Sarebbe dunque più sano e funzionale, assumere un pull di alimenti che consenta di avere in circolo il corretto apporto di aminoacidi essenziali ai fini di preservare la massa muscolare e non incorrere in patologie legate alla PEM. Data anche la crescente classe di consumatori vegani che per ragioni etiche eliminano i prodotti animali dalla loro dieta, il giusto bilanciamento tra l'assunzione di graminacee e leguminose risulta di fondamentale importanza. I legumi rappresentano un'ottima fonte proteica oltre un buon contenuto di fibra e di microelementi. La concentrazione di proteine nei legumi è pari al doppio di quella contenuta nei cereali, arrivando in alcuni casi a superare il 20% del peso secco. Contengono amminoacidi essenziali come Lisina, Treonina,

Isoleucina, Leucina, Fenilalanina e Valina ma presentano uno scarso contenuto degli amminoacidi solforilati Metionina e Cisteina. I cereali invece sono carenti di Lisina ma ricchi di Metionina, ecco perché una giusta combinazione di cereali e legumi risulta fondamentale per l'alimentazione di popolazioni a rischio di malnutrizione proteica o che non abbia accesso a fonti diverse e più complete di proteine. (AA.VV. Alimentazione e nutrizione umana. 2016)

Bevande contenenti al loro interno estratti provenienti da cereali e legumi nelle giuste proporzioni, possono fornire una composizione amminoacidica bilanciata e potenziare il valore nutritivo di entrambi gli alimenti. (Boye, J.I. et al 2010). L'arricchimento del mosto di birra con fagioli o lenticchie potrebbe contribuire a renderla una bevanda funzionale.



**Fig.8** fagioli neri.

I fagioli neri, sono una varietà di fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris*), membri delle leguminose, famiglia delle *Phaseoleae*. La pianta del fagiolo è stata addomesticata dall'uomo in America e oggi rappresenta una preziosa risorsa alimentare specialmente nelle regioni più povere del mondo. La composizione in macronutrienti non è molto dissimile tra le diverse varietà di fagioli. Nello specifico, il fagiolo nero ha una concentrazione di carboidrati leggermente superiore alla media, tra il 67- 68% , le proteine si assestano tra il 25-26%, i lipidi tra 1.5-1.6% . I carboidrati sono per lo più rappresentati dall'amido, presente sia sotto forma di amilosio che di amilopectina. La

percentuale proteica è equiparabile a quella della carne. Tra le proteine più abbondanti si trovano albumine e globuline. Tuttavia anche se il profilo amminoacidico è discreto, sono carenti Metionina e Cisteina. I micronutrienti sono anche molto presenti. Tra i legumi, i fagioli sono quelli con il più alto contenuto di minerali e tra questi spiccano: ferro, zinco, rame, fosforo e alluminio. Nel profilo vitaminico troviamo folati, tocoferoli, tiamina, riboflavina, niacina, biotina e piridossamina. Infine, numerosi sono i composti fenolici con potere antiossidante e anticarcinogenico tra cui le Antocianine presenti esclusivamente nei fagioli neri e viola. L'alto contenuto di fibre e la bassa digeribilità dell'amido, rende i fagioli un prezioso alleato per combattere e prevenire l'obesità, la sindrome metabolica e il diabete mellito di tipo 2. (Halyat et al. 2013)



**Fig9.** Lentichie nere

La lenticchia (*Lens culinaris*) è un piccolo legume appartenente alla famiglia delle *Fabaceae*. È una delle prime piante ad essere stata addomesticata dall'uomo nel 8000 A.C. e come tutti i legumi, rappresenta un'ottima fonte di macro, micronutrienti e fibre. L'interesse per le sue proprietà nutrizionali nell'uomo è andato crescendo col tempo. In Europa è stata spesso rinominata “la carne dei poveri” proprio per sottolineare il grande apporto in termini di proteine e micronutrienti che è in grado di fornire. Recentemente, oltre che la composizione in macronutrienti, ad attirare l'attenzione dei ricercatori sono state le sostanze fitochimiche che esercitano un'azione antiossidante e antinfiammatoria sia in vitro che in vivo. Sempre più indagini epidemiologiche



associano un maggiore consumo di lenticchie, a un ridotto sviluppo di malattie croniche come cancro, diabete mellito tipo 2, problemi cardio vascolari e patologie legate all'invecchiamento. (Takeoka, G. R., et al. 2005) (Zhang, B., et al. 2018)

## **CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI**

Oggi giorno, la crescente attenzione con cui il consumatore medio si avvicina alla propria dieta, lo porta alla continua ricerca di prodotti funzionali, con un alto rapporto sostanze nutritive, e che allo stesso tempo combinino un buon profilo sensoriale ed organolettico. Ciò ha portato i produttori di vari settori alimentari, verso la frenetica ricerca di alimenti che siano contemporaneamente arricchiti dal punto di vista nutrizionale ma che mantengano intatte le proprietà organolettiche così da mantenere vivo l'interesse del consumatore. La versatilità dei processi di birrificazione ha contribuito a far sì che anche il settore brassicolo si interessasse alla produzione di prodotti fortificati, con la comparsa negli ultimi anni di una serie di microbirrifici atti a sperimentare nuove ricette che consentano di avere un prodotto nutrizionalmente migliore ma ugualmente appagante per il consumatore. Nonostante la ricerca in questo settore stia ancora muovendo i primi passi, sul mercato si possono già trovare birre speciali, tra cui: birre senza glutine, a basso tenore alcolico, poco caloriche e funzionali.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quindi incentrato sulla produzione di birra artigianale addizionata con mosto di legumi ai fini di migliorarne il profilo amminoacidico e con l'utilizzo in combinazione di lieviti non convenzionali allo scopo di immettere sul mercato un prodotto con proprietà benefiche per il consumatore ma che non ne deluda le aspettative organolettiche. Dopo uno screening preliminare condotto utilizzando vari tipi di idrolizzato di legumi, questo studio si è incentrato su lenticchie Beluga e fagioli neri.

## **CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI**

### **3.1 CEPPI UTILIZZATI**

In questo studio sono stati utilizzati ceppi di lievito identificati e isolati dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) e conservati alla temperatura di -80°C in un terreno di coltura liquido contenente glicerolo all'80%. I lieviti in questione appartengono alle seguenti specie: *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans* e *K. unispora* e le loro proprietà probiotiche sono state appropriatamente indagate in precedenti studi del medesimo dipartimento (Agarbati et al., 2020). Nella prima fase di screening preliminare, lo starter *S. cerevisiae* US0-5 (Fermentis, Lesaffre, Francia) di lievito secco è stato adoperato come controllo. Durante l'esperienza i ceppi sono stati rinfrescati su capsule Petri contenenti terreno di coltura YPD così composto: 10 g/l di estratto di lievito, 20 g/l di peptone, 20g/l di glucosio e 18g/l agar e conservati in cella frigorifera alla temperatura di 4 °C.

### **3.2 MOSTO PILS**

Sia per lo screening iniziale che per le prove successive, è stato utilizzato come substrato di fermentazione un mosto Pils prodotto dal Birrificio dell'Eremo con sede ad Assisi (Italia). Il mosto in questione è stato prelevato da un batch di 1500L realizzato con solo malto Pils e luppolo Cascade attraverso un processo che prevede le seguenti tappe: 53°C per 10 minuti, 67°C per 70 minuti, 76°C per 10 minuti e bollitura per 60 minuti. Terminata l'ultima fase si avrà una miscela caratterizzata da pH 5.5, densità 12.3°P e 20 IBU.

### 3.3 IDROLIZZATI DI LEGUMI

Per i mosti di legumi sono stati preparati gli idrolizzati di lenticchie Beluga e fagioli neri. Inizialmente i semi sono stati ridotti a farina utilizzando un macinino elettrico da banco. Le lenticchie Beluga sono state molite direttamente, mentre per i fagioli neri si è prevista una bollitura iniziale. I fagioli sono stati successivamente asciugati dall'acqua di cottura e macinati. Le farine ottenute sono state miscelate con dell'acqua secondo la seguente proporzione: 300g di farina/ 700 ml di H<sub>2</sub>O.

Secondariamente si è proceduto all'idrolisi enzimatica di amidi e proteine ai fini di renderli disponibili ai lieviti durante la fermentazione. Gli enzimi, i quali sono stati addizionati manualmente, sono i seguenti:

1. Hitempase (Kerry Group, Tralee, Irlanda), un' $\alpha$ -amilasi che libera destrine dall'amido (sia in forma di amilosio che di amilopectina) andando ad idrolizzare i legami  $\alpha$ -1-4 glicosidici.
2. Ondea Pro (Novozymes, Danimarca). Un mix di enzimi tra cui, pullulanasi,  $\alpha$ -amilasi, cellulasi, xylanasi, proteasi e lipasi con la loro attività garantiscono la giusta torbidità e viscosità alla birra.
3. Bioferm (Kerry Group, Tralee, Irlanda) un'ulteriore  $\alpha$ -amilasi che libera destrine e maltosio.

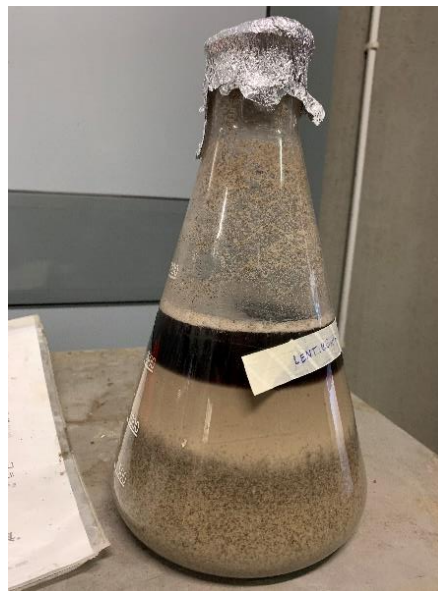
La procedura di idrolisi era standardizzata e prevedeva diverse tappe.

Come primo step, le soluzioni di acqua e farina (nelle proporzioni prima riportate) sono state riscaldate su piastra elettrica all'interno di beute da 2 litri, fino al raggiungimento di 45°C e avendo cura di mescolarle manualmente ad intervalli regolari di tempo per impedire che la parte solida si compattasse sul fondo. L'eccessiva viscosità della miscela non ha consentito un efficace utilizzo di ancorette magnetiche.

Raggiunta tale temperatura si è proseguito aggiungendo cloruro di calcio nella quantità di 1.3g/L, 0.5ml/L di Hitempase e 0.5ml/L di Ondeapro. Dopo aver agitato con cautela le beute per consentire un'omogenea distribuzione degli enzimi, si è incubato il tutto alla temperatura di 75°C per un'ora. Inseguito si sono aggiunti 0.5 g/L di Ondeapro e le beute sono state nuovamente incubate a una temperatura di 65°C per 3 ore. Scaduto tale tempo, le miscele di enzimi, farine e acqua che risultavano stratificate (segno dell'avvenuta idrolizzazione), sono state condotte in autoclave per garantire la sterilità dei substrati. Infine, si è centrifugato il contenuto delle beute per eliminare le componenti solide ed è stato conservato solamente il mosto surnatante.



**Fig.10:** Idrolizzato di fagioli



**Fig.11:** I drolizzato

Lenticchia

### 3.4 ALLESTIMENTO FERMENTAZIONI

Le micro-fermentazioni sono state condotte alla temperatura di 18-20°C utilizzando beute da 500ml provviste di valvole di Müller, quest'ultime contenenti acido solforico così da permettere la fuoriuscita di CO<sub>2</sub> evitando la contaminazione del sistema. Le pre-colture sono state allestite con estratto di malto al 10% ed incubate per 48 ore a

20°C. Dopo l'incubazione, le cellule sono state raccolte per centrifugazione (4000 rpm per 5 minuti), risospese in acqua sterile e si è proceduto all'inoculo del mosto con  $10^6$  cell/ml. Le beute inoculate sono state fatte fermentare alla temperatura di 18-20°C.



**Fig.12:** Micro fermentazioni.

## RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA

Al termine della prima fermentazione, le birre sono state sottoposte a una seconda rifermentazione in bottiglia resa possibile grazie alla presenza di lieviti ancora vivi e vitali e all'aggiunta di 5g/L di saccarosio durante il travaso in bottiglia prima della chiusura del tappo. Le bottiglie sono state tenute a una temperatura di 18-20 gradi centigradi per 7-10 giorni, al termine dei quali sono state stoccate alla temperatura di 4 °C.

### **3.5 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI**

L'andamento delle fermentazioni è stato valutato calcolando giorno per giorno la perdita di peso delle beute. Il calo ponderale corrisponde ai g di CO<sub>2</sub> persi, dato in seguito utilizzato per valutare l'attività fermentativa dei ceppi. Si è proceduto in questo

modo fino al raggiungimento dello stallo nel calo di peso, segno che la prima fermentazione era conclusa.

## **3.6 ANALISI CHIMICHE**

### **3.6.1 DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI**

A fine fermentazione sono stati analizzate le quantità dei principali zuccheri presenti nella birra, ovvero maltosio, saccarosio e glucosio, e per farlo 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 →  $\beta$ -fruttosidasi in buffer di sodio citrato (pH 4.6) (Disciogliere in 14 ml di acqua distillata)

Bottiglia 5 →  $\alpha$ -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).

Una volta preparate le soluzioni, si è proceduto secondo il seguente protocollo:

| <b>Pipettare in cuvetta</b>  | <b>Bianco</b>     | <b>Campione</b>   | <b>Bianco</b>   | <b>Campione</b>   |
|--|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|  | <b>Saccarosio</b> | <b>Saccarosio</b> | <b>D-</b>       | <b>D-Glucosio</b> |
|  | +                 | +                 | <b>Glucosio</b> |                   |
|  | <b>D-Glucosio</b> | <b>D-Glucosio</b> |                 |                   |
| <b>Soluzione 4 (β-fruttosidasi)</b>  | 0,20 ml           | 0,20 ml           | -               | -                 |
| <b>Campione</b>  | -                 | 0,10 ml           | -               | 0,10 ml           |
| Incubare per 20 minuti. Poi aggiungi:  |                   |                   |                 |                   |
| <b>Acqua distillata</b>  | 2,10 ml           | 2,00 ml           | 2,30 ml         | 2,30 ml           |
| <b>Soluzione 1 (buffer)</b>  | 0,20 ml           | 0,20 ml           | 0,20 ml         | 0,20 ml           |
| <b>Soluzione 2 (NADP/ATP)</b>  | 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: |                   |                   |                 |                   |
| <b>Sospensione 3 (HK/G6P-DH)</b>   | 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 3:** Protocollo determinazione zuccheri.



Con il protocollo indicato in tabella si è in grado di calcolare la concentrazione di saccarosio + D-glucosio. Andando invece a sostituire alla soluzione 4 la soluzione 5, si potrà calcolare anche le concentrazioni di maltosio + saccarosio + D- glucosio. Gli enzimi funzionano nel seguente modo:

- a) La  $\beta$ -fruttosidasi della bottiglia 4 è in grado di scindere il saccarosio in D-glucosio + D-fruttosio.
- b) L'esochinasi presente nella bottiglia 3, in presenza di ATP è in grado di fosforilare il D-glucosio in glucosio-6-fosfato.
- c) Il glucosio-6-fosfato-deidrogenasi presente sempre nella bottiglia 3, trasforma il glucosio-6-fosfato in gluconato-6-fosfato.
- d) L' $\alpha$ -glucosidasi presente nella bottiglia 5 idrolizza il maltosio in due molecole di D-glucosio e contemporaneamente scinde anche il saccarosio in D-glucosio e D-fruttosio.

Con le seguenti formule, si possono dunque calcolare gli zuccheri partendo dalle assorbanze misurate.

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

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

#### **Determinazione del saccarosio:**

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

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

#### **Determinazione del maltosio:**

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

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

### 3.6.2 DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE

La determinazione delle proteine nei campioni di birra è stata effettuata utilizzando il metodo di Lowry, un saggio colorimetrico che prevede l'utilizzo di due soluzioni: Lowry A e Lowry B.

#### Lowry A:

- 13,5 ml di acqua distillata
- 100  $\mu$ l  $\text{CuSO}_4$  10%
- 2,5 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%
- 250  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{K}$  tartrato 8%
- 1 ml NaOH 4N
- 2,5 ml SDS 20 %

#### Lowry B:

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

Preparate le due soluzioni, si procede con il seguente protocollo:

- Inserire in una cuvetta 500 $\mu$ l di campione assieme a 500 $\mu$ l di Lowry A.
- Attendere 10 minuti.
- Aggiungere nella cuvetta 250 $\mu$ l della soluzione Lowry B.
- Attendere 30 minuti.
- Effettuare misurazione allo spettrofotometro Shimadzu UV-1800 ad una lunghezza d'onda di 750nm.

La soluzione Lowry B indurrà la produzione di un colore blu/violetto rilevabile a 750nm. Tale colorazione avrà un'intensità proporzionale al contenuto proteico del campione.

### 3.6.3 ETANOLO

L'allestimento della prova per la determinazione dell'Etanolo prevede una fase preliminare di filtrazione del campione di birra da analizzare (10ml), mediante l'utilizzo di un filtro cut-off 0.2  $\mu\text{m}$ . Al campione filtrato va successivamente aggiunto il 3-metil-2-butanolo come standard interno alla concentrazione di 10 mg/l.

1 $\mu\text{l}$  della soluzione ottenuta, viene a questo punto iniettata all'interno del gascromatografo serie GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan) con detector a ionizzazione di fiamma, utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus.

In fine i cicli del gas cromatografo, saranno impostati 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  $\mu\text{m}$ );
- iniettore: split 10:2; iniettato 1  $\mu\text{l}$ ;
- 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.

### 3.6.4 ALCOLI SUPERIORI

Anche per questa analisi, come per l'Etanolo, 10 ml di campione da analizzare devono essere precedentemente filtrati e in seguito però addizionati con l'1-pentanololo ad una concentrazione di 162 mg/l come standard interno. Anche in questo caso si preleverà 1 $\mu\text{l}$  della soluzione risultante e la si analizzerà al gas cromatografo con detector a ionizzazione di fiamma utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus. Il protocollo per gli alcoli superiori è il seguente:

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

Ogni composto viene segnalato come un picco dall'interfaccia del gas cromatografo (GC). Il tempo impiegato per raggiungere il detector del GC è diverso per ognuno degli alcoli superiori, a cui la macchina potrà pertanto associare picchi distinti.

### 3.6.5 COMPONENTE VOLATILE

Per determinare la componente volatile, è stata utilizzata la tecnologia SPME (Solid Phase Microextraction). Questa tecnica presenta due varianti: DI-SPME (Direct-SPME, sistema a due fasi) e HS-SPME (Head Space -SPME, sistema a tre fasi). In questo studio è stato adottato il metodo HS-SPME. "Head Space" fa riferimento al fatto che il campione viene catturato in fase gassosa grazie all'ausilio di una fibra a tripla fase (DVB = divinilbenzene, CAR = carboxene, PDMS = polidimetilsilossano) in sospensione sopra il liquido (e non in contatto con esso).

Il protocollo prevedeva le seguenti fasi:

- degassare 5 ml di campione con un agitatore magnetico.
- porre il campione in una vial con tappo di teflon, aggiungere 1,5 g di NaCl e porre in termostato a 50°C per 10 minuti

- aggiungere il 3-ottanolo come standard interno
- Inserire la siringa attraverso il tappo in teflon e spingere la fibra, all'interno.
- Riporre l'intero sistema in termostato per 30 minuti a 50°C



**Fig.13:** Fibra a tripla fase divinilbenzene (DVB)/carbone (CAR)/polidimetilsilossano (PDMS)

Una volta che la fibra è intrisa delle componenti volatili, è pronta per l'analisi con il GC. L'ago va inserito nell'iniettore del gas cromatografo con la fibra retratta per evitare che si rompa, e solo successivamente, facendo pressione sullo stantuffo posteriore, si esporrà la fibra per far sì che le componenti volatili possano passare nella colonna del GC. La fibra deve essere mantenuta estroflessa nell'apposita locazione per 5 minuti, dopodiché, delicatamente si farà arretrare lo stantuffo fino a fine corsa e solo a questo punto si potrà estrarre la fibra.

Le impostazioni sul gas cromatografo sono state le seguenti:

- temperatura dell'iniettore/rivelatore: 250 °C;
- colonna capillare Supelcowax 10 (30 m, 0.25 mm id);
- iniettore: splitless 60 sec.;

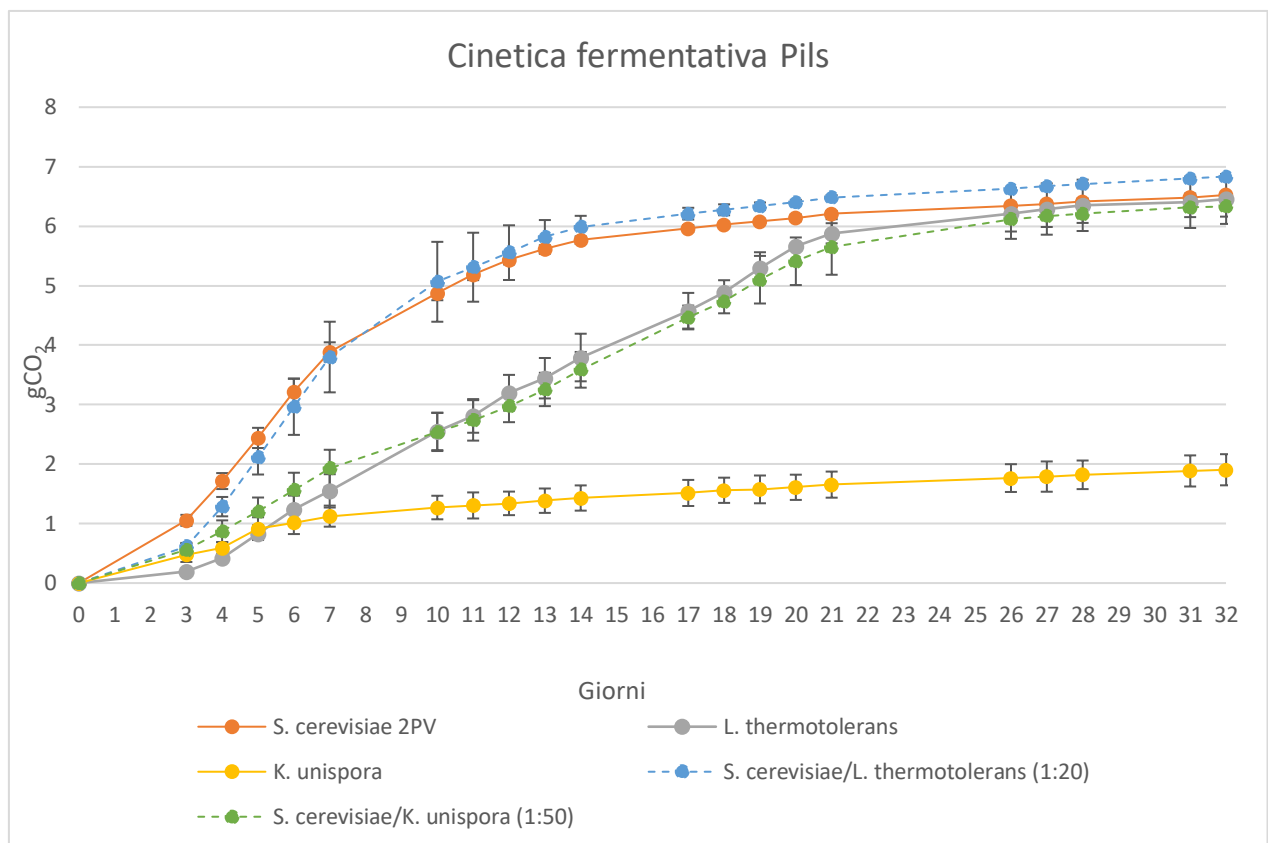
- temperatura del forno: T iniziale 50 °C per 5 minuti, poi un gradiente di 3 °C/min e isoterma di 220 °C per 20 minuti;
- gas vettore: Azoto.

## CAPITOLO 4 – RISULTATI

### 4.1 FERMENTAZIONI MISTE: VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA SU LENTICCHIA E FAGIOLO

I tre ceppi di lievito selezionati *S. cerevisiae*; *L. thermotolerans*; *K. unispora* sono stati valutati per le loro caratteristiche fermentative e funzionali in coltura pura e mista (*S. cerevisiae*-*L. thermotolerans*; *S. cerevisiae*-*K. unispora*) su mosto di birra Pils e mosto Pils addizionato con il 20% di idrolizzato di lenticchia e fagiolo.

La cinetica fermentativa è stata osservata valutando la perdita in peso giornaliera data dalla CO<sub>2</sub> svolta. La figura 14 riporta l'andamento fermentativo nelle prove condotte utilizzando come substrato il mosto Pils. Per quanto riguarda le fermentazioni pure, si osserva una cinetica fermentativa più alta in *S. cerevisiae* (2PV) seguita da *L. thermotolerans* e *K. unispora*. Anche nelle colture miste, la presenza di *S. cerevisiae* (2PV) ha contribuito ad aumentare la cinetica fermentativa rispetto alle fermentazioni pure condotte con i ceppi non-*Saccharomyces*.

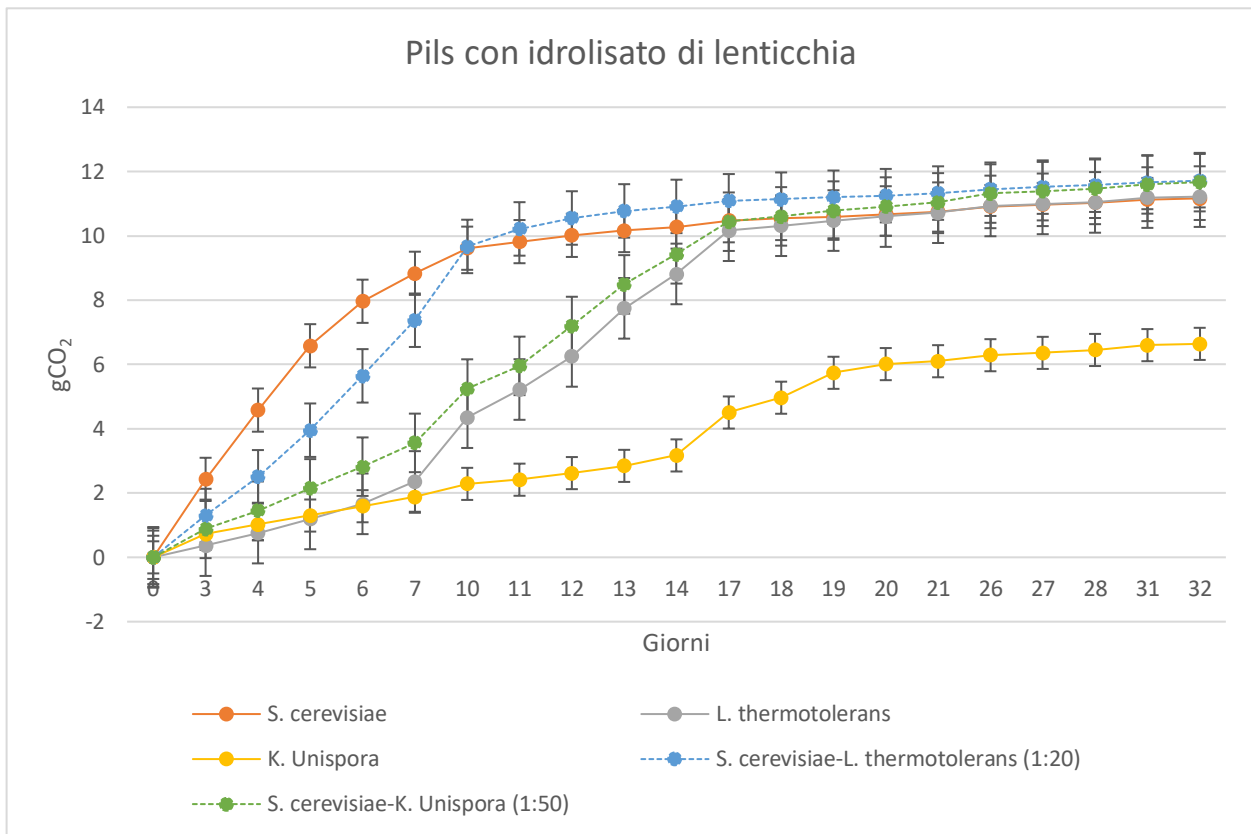


**Fig. 14:** Cinetica fermentativa su mosto Pils

L'andamento fermentativo delle prove condotte su mosto Pils addizionato con idrolizzato di lenticchia Beluga è riportato in figura 15. Si può notare come a fine fermentazione la quantità di CO<sub>2</sub> svolta è molto simile tra i vari ceppi utilizzati. L'unica fermentazione che ha mostrato una cinetica inferiore, è quella condotta con *K. unispora* in coltura pura, la quale ha registrato una perdita in g di CO<sub>2</sub> totale pari ha 6,64g.

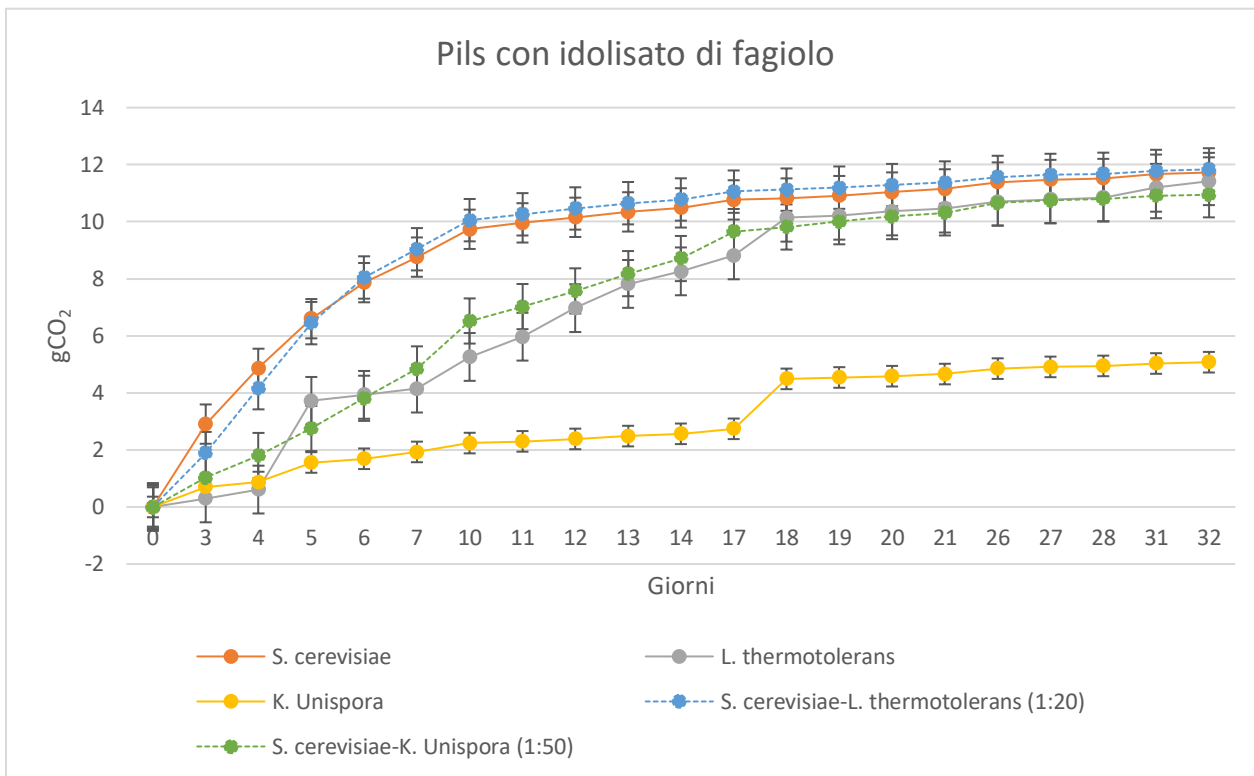
Anche in questo caso, le fermentazioni miste *S. cerevisiae*-non-*Saccharomyces* hanno permesso di ottenere una cinetica fermentativa più alta e paragonabile al *S. cerevisiae* in colture pure, segno evidente che l'aggiunta di una specie con una forte attitudine alla fermentazione, spinge il processo verso il termine.





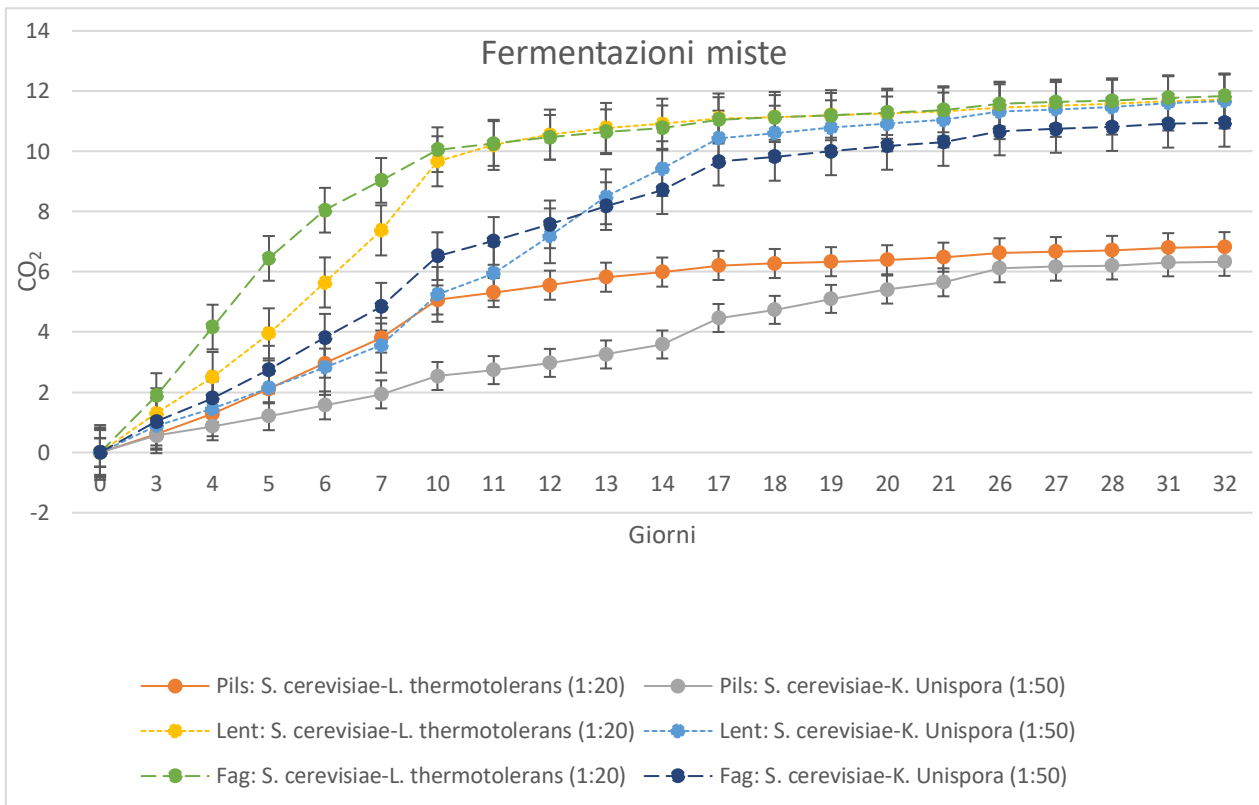
**Fig. 15:** Cinetica fermentativa mosto Pils addizionato di idrolisato di lenticchia

Nella figura 16 è riportato l'andamento fermentativo delle prove condotte su mosto Pils addizionato a idrolizzato di fagiolo. *K. unispora* continua ad essere il ceppo con la cinetica meno efficiente se paragonato alle altre due colture pure, ed anche alla prova condotta con aggiunta di lenticchia. Le colture miste *S.cerevisiae-non-Saccharomyces* anche in questo caso hanno permesso di ottenere una fermentazione completa e con un andamento fermentativo paragonabile a quella di *S. cerevisiae* 2PV.



**Fig.16:** cinetica fermentativa mosto Pils addizionato con idrolisato di fagiolo

Nella figura 17 sono riportati i risultati delle fermentazioni miste condotte sui vari substrati. Le più performanti sono le mix *S.cerevisiae* - *L.thermotolerans* condotte su mosto Pils con idrolizzato di fagiolo e Pils con idrolizzato di lenticchia. La cinetica fermentativa più lenta si registra invece nella mix *S.cerevisiae* - *K. unispora* condotta su mosto Pils.



**Fig. 17:** cinetica fermentativa delle culture miste nei vari substrati.

## 4.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA

A distanza di un mese dall'imbottigliamento, si è indagata la vitalità dei lieviti alla fine del processo di rifermentazione. A tale scopo è stata effettuata una conta su piastra che ha evidenziato una vitalità discretamente alta, compresa tra  $10^5$  e  $10^6$  cellule/ml.

## 4.3 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

A fine fermentazione le birre ottenute sono state analizzate relativamente al contenuto zuccherino residuo (glucosio, saccarosio e maltosio), e proteico e sono state osservate le variazioni rispetto alle concentrazioni iniziali (tabella 4,5,6).

| SUBSTRATO | ZUCCHERI RESIDUI g/L |            |          | PROTEINE<br>RESIDUE |
|-----------|----------------------|------------|----------|---------------------|
|           | Glucosio             | Saccarosio | Maltosio | g/L                 |
| Pils      | 0                    | 0          | 32       | 10,71               |

**Tabella 4:** concentrazione iniziale di zuccheri e proteine in substrato di solo Pils

Nella tabella 4.1 è riportato il profilo analitico di tutte le prove condotte su mosto Pils. Come si può notare, tutte le fermentazioni i valori di glucosio e saccarosio sono rimasti intorno allo zero, mentre il contenuto di maltosio residuo si è mantenuto relativamente elevato. In particolare, la fermentazione condotta in coltura pura con *K. unispora* ha evidenziato una concentrazione di maltosio residuo più alta (30.96 g/L). Tale dato è in relazione alla bassa cinetica fermentativa mostrata in precedenza, sottolineando una scarsa capacità di fermentazione.

Le fermentazioni in coltura pura hanno mostrato un più alto contenuto proteico nella birra prodotta da *S. cerevisiae* (2PV), mentre quella ottenuta da *L. thermotolerans* possiede una concentrazione di proteine inferiore di circa 8g/L. Le colture miste presentano un residuo proteico simile tra loro, con valori compresi tra 17-19 g/L.

| CEPPI                                  | ZUCCHERI RESIDUI g/L |             |              | PROTEINE<br>RESIDUE |
|--|----------------------|-------------|--------------|---------------------|
|  | Glucosio             | Saccarosio  | Maltosio     | g/L                 |
| <i>S. cerevisiae</i>                   | 0,00 ± 0,00          | 0,06 ± 0,01 | 10,6 ± 1,15  | 31,47 ± 1,645       |
| <i>L. thermotolerans</i>               | 0,00 ± 0,00          | 0,01 ± 0,00 | 10,5 ± 1,50  | 23,4 ± 1,158        |
| <i>K. unispora</i>                     | 0,00 ± 0,00          | 0,03 ± 0,01 | 30,96 ± 1,61 | 13,02 ± 1,132       |
| <i>S. cerevisiae-L. thermotolerans</i> | 0,00 ± 0,00          | 0,00 ± 0,00 | 9,8 ± 0,65   | 19,07 ± 1,318       |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>       | 0,00 ± 0,00          | 0,01 ± 0,00 | 7,8 ± 1,05   | 17,05 ± 1,168       |

**Tabella 4.1:** Zuccheri residui, proteine ed etanolo delle prove condotte su mosto Pils.

| SUBSTRATO         | ZUCCHERI RESIDUI g/L |            |          | PROTEINE RESIDUE |
|-------------------|----------------------|------------|----------|------------------|
|                   | Glucosio             | Saccarosio | Maltosio | g/L              |
| Pils + lenticchia | 0                    | 24         | 47       | 13,6             |

**Tabella 5:** concentrazione iniziale di zuccheri e proteine in substrato di solo Pils più idrolizzato di lenticchia Beluga

Nella tabella 5.1 è riportato il profilo analitico delle birre ottenute con mosto Pils addizionato con idrolizzato di lenticchia Beluga. In questo substrato, soltanto la coltura pura di *S.cerevisiae* e la fermentazione mista *S. cerevisiae-K. unispora* esauriscono completamente il glucosio, mentre in tutte le altre prove è presente con una concentrazione media inferiore al saccarosio. Il maltosio resta lo zucchero più abbondante e il valore massimo viene raggiunto nella coltura pura *K.unispora* (20,96g/L). Le proteine residue assumono valori simili tra le colture pure, mentre maggiori differenze sono riscontrabili tra *S. cerevisiae-L. thermotolerans* (14,17g/L) e *S. cerevisiae-K. unispora* (20,51 g/L).

| CEPPI                                 | ZUCCHERI RESIDUI g/L |             |              | PROTEINE RESIDUE |
|---------------------------------------|----------------------|-------------|--------------|------------------|
|                                       | Glucosio             | Saccarosio  | Maltosio     | g/L              |
| <i>S.cerevisiae</i>                   | 0,00 ± 0,00          | 0,04 ± 0,02 | 5,8 ± 1,10   | 27,14 ± 1,297    |
| <i>L. thermotolerans</i>              | 0,01 ± 0,01          | 0,00 ± 0,00 | 16,8 ± 0,3   | 28,58 ± 3,86     |
| <i>K. unispora</i>                    | 0,13 ± 0,02          | 0,00 ± 0,00 | 20,96 ± 1,61 | 27,14 ± 11,69    |
| <i>S.cerevisiae-L. thermotolerans</i> | 0,01 ± 0,01          | 0,00 ± 0,00 | 7,6 ± 0,70   | 14,17 ± 8,40     |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>      | 0,00 ± 0,00          | 0,36 ± 0,04 | 6,30 ± 0,2   | 20,51 ± 4        |

**Tabella 5.1:** mosto Pils addizionato con farina di lenticchie Beluga.

| SUBSTRATO      | ZUCCHERI RESIDUI g/L |            |          | PROTEINE RESIDUE |
|----------------|----------------------|------------|----------|------------------|
|                | Glucosio             | Saccarosio | Maltosio | g/L              |
| Pils + fagiolo | 0                    | 11         | 53       | 9,85             |

**Tabella 6:** concentrazione iniziale di zuccheri e proteine in substrato di solo Pils più idrolizzato di fagiolo

Il profilo analitico delle birre ottenute con substrato Pils con idrolizzato di fagiolo è riportato nella tabella 6.1. Un valore di glucosio più alto della media si riscontra nella coltura pura *K. unispora* (3,2 g/L), mentre gli altri campioni registrano concentrazioni molto più basse, fino a toccare il minimo nella mix *S.cerevisiae-L. thermotolerans*, dove viene esaurito completamente. Anche i valori di saccarosio registrati sono piuttosto bassi mentre rimangono mediamente più alti quelli del maltosio. La concentrazione proteica nei vari ceppi è più uniformata, ad eccezione della mix *S. cerevisiae-K. unispora* che con i suoi 10,14 g/L si distacca maggiormente dall'andamento medio.

| CEPPI                                 | ZUCCHERI RESIDUI g/L |             |             | PROTEINE RESIDUE |
|---------------------------------------|----------------------|-------------|-------------|------------------|
|                                       | Glucosio             | Saccarosio  | Maltosio    | g/L              |
| <i>S.cerevisiae</i>                   | 0,00 ± 0,00          | 0,01 ± 0,00 | 6,3 ± 1,10  | 26,28 ± 1,97     |
| <i>L. thermotolerans</i>              | 0,07 ± 0,01          | 0,00 ± 0,00 | 0,9 ± 0,01  | 22,53 ± 3,85     |
| <i>K. unispora</i>                    | 3,2 ± 0,02           | 0,00 ± 0,00 | 9,25 ± 0,73 | 20,8 ± 11,70     |
| <i>S.cerevisiae-L. thermotolerans</i> | 0,00 ± 0,00          | 0,01 ± 0,00 | 8,6 ± 1,50  | 23,97 ± 4,00     |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>      | 0,01 ± 0,01          | 0,11 ± 0,01 | 2,6 ± 0,02  | 10,14 ± 8,40     |

**Tabella 6.1:** mosto Pils addizionato con idrolizzato di farina di fagiolo.

I profili analitici delle colture miste nei vari substrati sono riassunti nella tabella 8. La concentrazione di glucosio è quasi ridotta a zero in tutti i campioni, fenomeno dovuto principalmente all'attività fermentativa del *S.cerevisiae*. Per il saccarosio si ha una situazione simile ad eccezione della mix *S. cerevisiae-K. unispora* su Pils con idrolizzato di lenticchia (0,36 g/L). Il maltosio è sempre molto presente, tranne nella fermentazione mista *S. cerevisiae-K. unispora* su substrato Pils con idrolizzato di lenticchia, dove viene esaurito completamente. Concentrazioni di maltosio al disotto della media vengono comunque registrate nella mix *S. cerevisiae-K. unispora* su substrato Pils con idrolizzato di fagiolo (2,6 g/L). Le proteine residue sono sempre piuttosto alte. Agli estremi ci sono *S.cerevisiae-L. thermotolerans* Pils con idrolizzato di fagiolo con la concentrazione più elevata (23,97 g/L) e *S. cerevisiae-K. unispora* Pils con idrolizzato di fagiolo che registra il contenuto proteico più basso (10,14g/L).

| CEPPI                                 | SUBSTRATO  | ZUCCHERI RESIDUI g/L |             |             | PROTEINE RESIDUE g/L |
|---------------------------------------|------------|----------------------|-------------|-------------|----------------------|
|                                       |            | Glucosio             | Saccarosio  | Maltosio    |                      |
| <i>S.cerevisiae-L. thermotolerans</i> | Pils       | 0,00 ± 0,00          | 0,00 ± 0,00 | 9,8 ± 0,65  | 19,07 ± 13,18        |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>      | Pils       | 0,00 ± 0,00          | 0,01 ± 0,00 | 7,8 ± 1,05  | 17,05 ± 11,68        |
| <i>S.cerevisiae-L. thermotolerans</i> | Lenticchia | 0,01 ± 0,01          | 0,00 ± 0,00 | 7,6 ± 0,70  | 14,17 ± 8,40         |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>      | Lenticchia | 0,00 ± 0,00          | 0,36 ± 0,04 | 0,00 ± 0,00 | 20,51 ± 4            |
| <i>S.cerevisiae-L. thermotolerans</i> | Fagiolo    | 0,00 ± 0,00          | 0,01 ± 0,01 | 8,6 ± 1,50  | 23,97 ± 4,00         |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>      | Fagiolo    | 0,01 ± 0,01          | 0,11 ± 0,01 | 2,6 ± 0,02  | 10,14 ± 8,40         |

**Tabella 7:** prove analitiche relative alle fermentazioni miste per i differenti substrati

#### 4.4 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

I principali composti secondari della birra su mosto Pils sono riportati nella tabella 9.

Tra le fermentazioni condotte in coltura pura, la birra prodotta con *S. cerevisiae* ha mostrato il più alto contenuto di tutti i composti secondari, fatta eccezione per l'etilacetato, il quale risulta maggiormente concentrato nella coltura pura *L. thermotolerans* (7.00 mg/L). L'impiego di lieviti non-convenzionali in fermentazione mista ha invece evidenziato un contenuto di composti secondari, intermedio rispetto a quello mostrato dalle rispettive colture pure. Acetaldeide, propanolo, amilico attivo e isoamilico sono più rappresentati nella mix *S.cerevisiae-K.unispora*. Etilacetato e isobutanolo hanno invece concentrazioni più alte nella coltura mista *S. cerevisiae-L. thermotolerans*.

| CEPPI                                  | Acetaldeide (mg/L) | Etilacetato (mg/L) | Propanolo (mg/L) | Isobutanolo (mg/L) | Amilicoattivo (mg/L) | Isoamilico (mg/L) |
|--|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| <i>S. cerevisiae</i>                   | 20,25              | 4,17               | 15,17            | 16,73              | 10,75                | 72,85             |
| <i>L. thermotolerans</i>               | 3,98               | 7,00               | 11,86            | 8,22               | 4,75                 | 36,23             |
| <i>K. unispora</i>                     | 3,23               | 2,16               | 13,51            | 6,70               | 2,25                 | 26,03             |
| <i>S. cerevisiae-L. thermotolerans</i> | 10,60              | 6,70               | 13,85            | 15,97              | 8,05                 | 47,23             |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>       | 15,92              | 3,79               | 16,90            | 15,44              | 8,08                 | 48,01             |

**Tabella 8**– Principali composti secondari birre prodotte dal mosto Pils



Le birre ottenute dalla fermentazione di mosto Pils con idrolizzato di lenticchie (Tabella 10), mostrano un contenuto di acetaldeide più alto in quelle ottenute dai ceppi *L. thermotolerans* e *K. unispora* rispetto a quelle con *S. cerevisiae*. Le fermentazioni miste hanno invece un valore nettamente più basso, andando ad indicare un effetto del ceppo *S. cerevisiae* sul lievito non-Convvenzionale. Per quanto riguarda l’etilacetato solo in *L. thermotolerans* in coltura pura non è stato rilevato, mentre in *K. unispora*, sia in fermentazione pura che mista, sono state riscontrate le concentrazioni più elevate riguardo a questo composto. Contenuti paragonabili di amilico attivo ed isoamilico sono evidenziati in tutte le prove. Propanolo ed isobutanolo sono inoltre a concentrazione più alte nelle birre ottenute con *K. unispora* e *S. cerevisiae* rispettivamente.

| CEPPI                                  | Acetaldeide (mg/L) | Etilacetato (mg/L) | Propanolo (mg/L) | Isobutanolo (mg/L) | Amilicoattivo (mg/L) | Isoamilico (mg/L) |
|--|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| <i>S. cerevisiae</i>                   | 24,92              | 2,16               | 19,74            | 12,50              | 7,49                 | 59,35             |
| <i>L. thermotolerans</i>               | 55,99              | 0,00               | 13,55            | 4,71               | 5,25                 | 33,30             |
| <i>K. unispora</i>                     | 38,89              | 4,79               | 24,39            | 10,41              | 5,61                 | 45,57             |
| <i>S. cerevisiae-L. thermotolerans</i> | 8,27               | 1,95               | 14,32            | 6,79               | 4,99                 | 41,77             |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>       | 16,90              | 5,89               | 11,43            | 7,97               | 5,10                 | 45,40             |

**Tabella 9**– Principali composti secondari birre prodotte dal mosto Pils addizionato con idrolizzato di lenticchie

Nella tabella 11 sono riportati i dati relativi ai composti secondari ottenuti da fermentazioni condotte su mosto Pils con idrolizzato di fagiolo. I composti risultano tutti nei limiti tranne l'acetaldeide, il quale supera il valore soglia (10 mg/L) in quasi tutti i campioni. I valori estremi sono equamente distribuiti tra colture pure e colture miste. Il più grande scarto tra valore massimo e valore minimo registrato, si riscontra per l'etilacetato (solvent-like), dove il valore più basso si ha con la coltura pura di *K. unispora* (1,47 mg/L), quasi 1/30 del valore registrato nella coltura pura di *S. cerevisiae* (29,65 mg/L). *K. unispora* in monocultura, registra il più alto contenuto di propanolo, mentre isobutanolo, amilico attivo e isoamilico sono maggiormente rappresentati nella monocultura di *S. cerevisiae*.

| <b>CEPPI</b>                           | <b>Acetaldeide (mg/L)</b> | <b>Etilacetato (mg/L)</b> | <b>Propanolo (mg/L)</b> | <b>Isobutanolo (mg/L)</b> | <b>Amilicoattivo (mg/L)</b> | <b>Isoamilico (mg/L)</b> |
|--|---------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i>                   | 19,10                     | 29,65                     | 15,60                   | 16,01                     | 10,26                       | 60,29                    |
| <i>L. thermotolerans</i>               | 11,86                     | 10,03                     | 14,00                   | 7,48                      | 4,64                        | 27,87                    |
| <i>K. unispora</i>                     | 27,12                     | 1,47                      | 56,45                   | 4,70                      | 2,12                        | 18,83                    |
| <i>S. cerevisiae-L. thermotolerans</i> | 20,77                     | 10,19                     | 16,28                   | 4,10                      | 7,25                        | 49,01                    |
| <i>S. cerevisiae-K. unispora</i>       | 21,16                     | 5,33                      | 15,05                   | 3,82                      | 8,03                        | 52,35                    |

**Tabella 10**– Principali composti secondari birre prodotte dal mosto Pils addizionato con idrolizzato di fagiolo

I principali composti secondari nelle colture miste di tutti i substrati sono riportati nella tabella 12. I campioni analizzati registrano valori di acetaldeide superiori alla soglia (10 mg/L), tranne che nella mix *S. cerevisiae-L. thermotolerans* condotta su mosto Pils con idrolizzato di lenticchia. Concentrazioni di acetaldeide poco più alte della soglia, producono un sapore simile a quello della mela verde. più tale valore aumenta più il sapore si fa intenso e sgradevole, arrivando a ricordare l'alcol denaturato. Tutti gli altri composti invece rientrano nei limiti desiderabili.

Le fermentazioni condotte su substrato Pils con idrolizzato di fagiolo, indipendentemente dal ceppo utilizzato, presentano mediamente concentrazioni di composti secondari più elevate, fatta eccezione per isobutanolo e amilico attivo, per i quali vengono raggiunte le concentrazioni massime rispettivamente nelle colture miste *S. cerevisiae-L. thermotolerans* e *S. cerevisiae-K. unispora*. L'isoamilico rimane il composto secondario maggiormente presente in tutte le prove.

| CEPPI                                  | Substrati  | Acetaldeide (mg/L) | Etilacetato (mg/L) | Propanolo (mg/L) | Isobutanolo (mg/L) | Amilicoattivo (mg/L) | Isoamilico (mg/L) |
|--|------------|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| <i>S. cerevisiae-L. thermotolerans</i> | Pils       | 10,60              | 6,70               | 13,85            | 15,97              | 8,05                 | 47,23             |
| <i>S. cerevisiae-K. Unispora</i>       | Pils       | 15,92              | 3,79               | 16,90            | 15,44              | 8,08                 | 48,01             |
| <i>S. cerevisiae-L. thermotolerans</i> | Lenticchia | 8,27               | 1,95               | 14,32            | 6,79               | 4,99                 | 41,77             |
| <i>S. cerevisiae-K. Unispora</i>       | Lenticchia | 16,90              | 5,89               | 11,43            | 7,97               | 5,10                 | 45,39             |
| <i>S. cerevisiae-L. thermotolerans</i> | Fagiolo    | 20,77              | 10,19              | 16,28            | 4,11               | 7,24                 | 49,01             |
| <i>S. cerevisiae-K. Unispora</i>       | Fagiolo    | 21,16              | 5,33               | 15,05            | 3,82               | 8,03                 | 52,34             |

**Tabella 11**– Principali composti secondari delle fermentazioni miste tra i diversi substrati

## 4.5 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

I principali composti volatili indagati a fine fermentazione, nelle prove condotte su mosto Pils, sono riportati nella tabella 12.

L'etilbutirrato (aroma di ananas, mela) è presente in una concentrazione simile nelle varie prove. L'acetato di isoamile (aroma di banana) risulta maggiormente presente nelle prove in monocultura di *S. cerevisiae*, dove registra una concentrazione di 4,66 mg/L, distaccando di molto il valore registrato per la prova *L. thermotolerans* di 0,16 mg/L (valore più basso). L'etilottanoato (nota fruttata, agrumata) è assente in tutte le prove ad eccezione della monocultura di *L. thermotolerans* dove è presente a una concentrazione di 0,07 mg/L. Il linalolo (aroma floreale) è assente nelle monoculture di *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* mentre nelle altre prove viene ritrovato a una concentrazione che oscilla tra 0,04 – 1,8 mg/L. Il dietilsuccinato (fruttato) è assente in tutte le prove. L'acido butirrico viene ritrovato solamente nella monocultura di *S. cerevisiae* e nella coltura mista *S. cerevisiae* – *K. unispora*, rispettivamente alla concentrazione di 0,01mg/L e 0,07 mg/L. La monocultura di *K. unispora* e la mix *S. cerevisiae* – *L. thermotolerans* mostrano la stessa concentrazione di feniletile acetato (aroma di miele, mele) 0,07 mg/L mentre tale composto è assente in tutte le altre prove. Il nerolo (odore di rosa) compare solamente nella monocultura di *K. unispora* con una concentrazione piuttosto bassa (0,01 mg/L). Il 2- fenil etanolo (aroma floreale) è più presente nelle colture miste ed il valore più alto viene registrato nella birra ottenuta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* (1,7 mg/L). L'acido decanoico è assente nelle colture miste, mentre è presente in tutte le monoculture seppur con concentrazioni basse che oscillano tra lo 0,01 e lo 0,04 mg/L.

| <b>CEPPI</b>                          | <b>Etilbutirrato (mg/L)</b> | <b>Acetato di isoamile (mg/L)</b> | <b>Etilottanoato (mg/L)</b> | <b>Linalolo (mg/L)</b> | <b>Dietilsuccinato (mg/L)</b> | <b>Acido butirrico (mg/L)</b> | <b>Feniletilacetato (mg/L)</b> | <b>Nerolo (mg/L)</b> | <b>2-Feniletanolo (mg/L)</b> | <b>Acido decanoico (mg/L)</b> |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>S. Cerevisiae</i>                  | 0,01                        | 4,66                              | 0,00                        | 0,00                   | 0,00                          | 0,01                          | 0,00                           | 0,00                 | 1,67                         | 0,04                          |
| <i>L. thermotolerans</i>              | 0,04                        | 0,16                              | 0,07                        | 0,00                   | 0,00                          | 0,00                          | 0,00                           | 0,00                 | 0,90                         | 0,01                          |
| <i>K. unispora</i>                    | 0,01                        | 1,37                              | 0,00                        | 0,06                   | 0,00                          | 0,00                          | 0,07                           | 0,01                 | 0,25                         | 0,01                          |
|                                       |                             |                                   |                             |                        |                               |                               |                                |                      |                              |                               |
| <i>S. cerevisiae/L.thermotolerans</i> | 0,01                        | 0,76                              | 0,00                        | 0,18                   | 0,00                          | 0,00                          | 0,07                           | 0,00                 | 1,7                          | 0,00                          |
| <i>S. cerevisiae/K. unispora</i>      | 0,05                        | 1,02                              | 0,00                        | 0,04                   | 0,00                          | 0,07                          | 0,00                           | 0,00                 | 1,44                         | 0,00                          |

**Tabella 12** - Principali composti volatili delle prove ottenute con mosto Pils.

I principali composti volatili saggiati a fine fermentazione nella birra prodotta con mosto Pils e idrolizzato di lenticchia Beluga, sono riportati nella tabella 13.

L'etil butirrato è meno presente rispetto alle prove effettuate con solo mosto Pils e viene rilevato solamente nelle monoculture di *L. thermotolerans* e *K. unispora* nelle rispettive concentrazioni di 0,04 e 0,01 mg/L. L'acetato di isoamile è il composto volatile maggiormente rappresentato e la sua concentrazione massima si trova nella coltura mista *S. cerevisiae* (4,41 mg/L). L'etil ottanoato viene rilevato solamente nella monocultura di *L. thermotolerans*, con una concentrazione di 0,39 mg/L. In questo substrato il linalolo risulta assente. Il dietilsuccinato è presente solamente nella monocultura di *S. cerevisiae* e nella mix *S. cerevisiae-L. thermotolerans* nelle rispettive concentrazioni di 0,5 e 0,48 mg/L. L'acido butirrico è assente in tutte le prove, tranne che nella coltura mista *S. cerevisiae-K. unispora* (0,37 mg/L). Il feniletil acetato, il nerolo e l'acido decanoico sono mediamente più abbondanti nelle colture miste piuttosto che nelle monoculture e il loro valore massimo viene sempre toccato nelle fermentazioni condotte con *S. cerevisiae-K. unispora* (rispettivamente 2,10 mg/L, 0,93mg/L, 0,36mg/L).

| CEPPI                                 | Etilbutirato (mg/L) | Acetato di isoamile (mg/L) | Etilottanoato (mg/L) | Linalolo (mg/L) | Dietsuccinato (mg/L) | Acido butirrico (mg/L) | Feniletilacetato (mg/L) | Nerolo (mg/L) | 2-Feniletanolo (mg/L) | Acido decanoico (mg/L) |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------|-----------------|----------------------|------------------------|-------------------------|---------------|-----------------------|------------------------|
| <i>S. Cerevisiae</i>                  | 0,00                | 4,41                       | 0,00                 | 0,00            | 0,5                  | 0,00                   | 0,00                    | 0,11          | 2,77                  | 0,13                   |
| <i>L. thermotolerans</i>              | 0,04                | 0,64                       | 0,39                 | 0,00            | 0,00                 | 0,00                   | 0,64                    | 0,08          | 0,46                  | 0,1                    |
| <i>K. unispora</i>                    | 0,01                | 3,09                       | 0,00                 | 0,00            | 0,00                 | 0,00                   | 0,05                    | 0,05          | 0,97                  | 0,02                   |
| <i>S. cerevisiae/L.thermotolerans</i> | 0,00                | 0,11                       | 0,00                 | 0,00            | 0,48                 | 0,00                   | 0,79                    | 0,12          | 1,8                   | 0,15                   |
| <i>S. cerevisiae/K. unispora</i>      | 0,00                | 1,90                       | 0,00                 | 0,00            | 0,00                 | 0,37                   | 2,10                    | 0,93          | 1,45                  | 0,36                   |

**Tabella 13** - Principali composti volatili delle prove ottenute con mosto Pils più idrolizzato di lenticchia Beluga.

I principali composti volatili analizzati nelle birre ottenute mediante la fermentazione di mosto Pils con aggiunta di idrolizzato di fagiolo, sono riportati nella tabella 14.

Tra tutti e tre i substrati, questo è quello con la maggior concentrazione di etil butirato e il valore più alto viene raggiunto con la monocultura *S. cerevisiae* (1,00 mg/L), tuttavia non è presente in tutte le prove e non viene rilevato né nella monocultura *K. unispora*, né nella mix *S. cerevisiae-K. unispora*. L'acetato di isoamile è presente in tutte le prove con valori intorno a 1 mg/L ad eccezione della coltura mista *S. cerevisiae-L.thermotolerans* dove raggiunge il valore di 2,72 mg/L e la monocultura di *K. unispora* con 0,20 mg/L. L'etilottanoato è presente in concentrazioni simili nella monocultura *S. cerevisiae*, in *K. unispora* e nella mix *S. cerevisiae-L.thermotolerans*, mentre è assente nelle restanti due prove. Si rilevano tracce di linalolo solamente nella monocultura *L. thermotolerans* e nella mix *S. cerevisiae - L. thermotolerans* con le rispettive concentrazioni di 0,06 e 0,01 mg/L. Dietil succinato, acido butirrico e nerolo sono completamente assenti su tale substrato, a prescindere dai ceppi utilizzati. Il feniletil acetato viene rilevato solamente nella coltura mista *S. cerevisiae - L. thermotolerans*, mentre è assente nelle altre prove. Il 2-fenil etanolo è il composto volatile maggiormente presente nelle birre ottenute su questo substrato. I valori massimi si ritrovano nella monocultura di *S. cerevisiae* e nella coltura mista *S. cerevisiae - L.thermotolerans* i quali registrano lo stesso valore, pari a 1,64 mg/L. L'acido decanoico è presente solamente nelle due monoculture *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* con le rispettive concentrazioni di 0,02 e 0,01mg/L.



| CEPPI                                 | Etilbutirrato (mg/L) | Acetato di isoamile (mg/L) | Etilottanoato (mg/L) | Linalolo (mg/L) | Dietilsuccinato (mg/L) | Acido butirrico (mg/L) | Feniletilacetato (mg/L) | Nerolo (mg/L) | 2-Feniletanolo (mg/L) | Acido decanoico (mg/L) |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|-----------------|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------|-----------------------|------------------------|
| <i>S. Cerevisiae</i>                  | 1,00                 | 1,09                       | 0,07                 | 0,00            | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                    | 0,00          | 1,64                  | 0,02                   |
| <i>L. thermotolerans</i>              | 0,06                 | 1,30                       | 0,00                 | 0,06            | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                    | 0,00          | 1,18                  | 0,01                   |
| <i>K. unispora</i>                    | 0,00                 | 0,20                       | 0,08                 | 0,00            | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                    | 0,00          | 0,34                  | 0,00                   |
|                                       |                      |                            |                      |                 |                        |                        |                         |               |                       |                        |
| <i>S. cerevisiae/L.thermotolerans</i> | 0,05                 | 2,72                       | 0,07                 | 0,01            | 0,00                   | 0,00                   | 0,38                    | 0,00          | 1,64                  | 0,00                   |
| <i>S. cerevisiae/K. unispora</i>      | 0,00                 | 0,89                       | 0,00                 | 0,00            | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                    | 0,00          | 1,59                  | 0,00                   |

**Tabella 14** - Principali composti volatili delle birre ottenute con mosto Pils più idrolizzato di fagiolo.

La tabella 15 riporta una visione complessiva delle concentrazioni dei composti secondari nelle birre ottenute da fermentazioni miste sui vari substrati presi in considerazione. L'acetaldeide è completamente assente nelle prove condotte su idrolizzato di lenticchia e nella birra ottenuta con l'aggiunta di idrolizzato di fagiolo e fermentata con *S.cerevisiae-K.unispora*. Si ritrova invece negli altri campioni con una concentrazione che va da 0,1 a 0,5mg/L. Tra quelli analizzati, l'acetato di isoamile è tra i composti volatili maggiormente rappresentati e il valore più alto lo troviamo nel substrato Pils con aggiunta di idrolizzato di fagiolo e fermentato con la coltura mista *S. cerevisiae L. thermotolerans* (2,72mg/L). L'unico campione in cui ritroviamo l'etilottanoato è quello con l'aggiunta di idrolizzato di fagiolo e fermentato con *S. cerevisiae – L. thermotolerans*, in tutti gli altri campioni è assente. Il linalolo non viene rilevato in *S. cereveisiae – K. unispora* (fagiolo e lenticchia) e in *S.cerevisiae – L. thermotolerans* (lenticchia) mentre nelle restanti prove è presente a una concentrazione che oscilla tra 0,01 e 0,18mg/L. Il dietilsuccinato è tra i composti volatili meno rappresentati e viene rilevato solamente nel campione *S. cerevisiae – L.thermotolerans* (lenticchia) con un valore di 0,48mg/L. Le uniche prove a possedere tracce di acido butirrico sono state *S.cerevisiae – K.unispora* Pils e lenticchia, con valori rispettivamente di 0,07 e 0,37mg/L. Il feniletil acetato è assente in *S. cerevisiae – K. unispora* sia su substrato di solo Pils che addizionato all'idrolizzato di fagiolo. Il valore più alto viene invece registrato in *S.cerevisiae – K. unispora* con mosto pils addizionato a idrolizzato di lenticchia (2,10mg/L). Il nerolo è rilevato solamente nelle birre con mosto Pils più idrolizzato di lenticchia e la concentrazione più alta si raggiunge nelle fermentazioni condotte con ceppi *S. cerevisiae – k. unispora* (0,98mg/L). Il 2-feniletanolo è il composto volatile maggiormente rappresentato con la concentrazione massima registrata di 1,8mg/L nel mosto addizionato di idrolizzato di lenticchia e fermentato con *S. cerevisiae –*

*L. thermotolerans*. I valori delle altre prove rimangono inferiori ai 2 mg/L. L'acido decanoico è rilevato solamente nelle prove Pils con aggiunta di idrolizzato di lenticchia, con 0,15mg/L per *S.cerevisiae* – *L. thermotolerans* e 0,36mg/L per *S. cerevisiae* – *K. unispora*. In tutti gli altri campioni è assente.

| CEPPI                                 | Substrati  | Etilbutirrato (mg/L) | Acetato di isoamile (mg/L) | Etilottanoato (mg/L) | Linalolo (mg/L) | Diethylsuccinato (mg/L) | Acido butirrico (mg/L) | Fenilettilacetato (mg/L) | Nerolo (mg/L) | 2-Feniletanolo (mg/L) | Acido decanoico (mg/L) |
|---------------------------------------|------------|----------------------|----------------------------|----------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|---------------|-----------------------|------------------------|
| <i>S. cerevisiae/L.thermotolerans</i> | Pils       | 0,01                 | 0,76                       | 0,00                 | 0,18            | 0,00                    | 0,00                   | 0,07                     | 0,00          | 1,7                   | 0,00                   |
| <i>S. cerevisiae/K. Unispora</i>      | Pils       | 0,05                 | 1,02                       | 0,00                 | 0,04            | 0,00                    | 0,07                   | 0,00                     | 0,00          | 1,44                  | 0,00                   |
| <i>S. cerevisiae/L.thermotolerans</i> | Lenticchia | 0,00                 | 0,11                       | 0,00                 | 0,00            | 0,48                    | 0,00                   | 0,79                     | 0,12          | 1,8                   | 0,15                   |
| <i>S. cerevisiae/K. Unispora</i>      | Lenticchia | 0,00                 | 1,90                       | 0,00                 | 0,00            | 0,00                    | 0,37                   | 2,10                     | 0,93          | 1,45                  | 0,36                   |
| <i>S. cerevisiae/L.thermotolerans</i> | Fagiolo    | 0,05                 | 2,72                       | 0,07                 | 0,01            | 0,00                    | 0,00                   | 0,38                     | 0,00          | 1,64                  | 0,00                   |
| <i>S. cerevisiae/K. Unispora</i>      | Fagiolo    | 0,00                 | 0,89                       | 0,00                 | 0,00            | 0,00                    | 0,00                   | 0,00                     | 0,00          | 1,59                  | 0,00                   |

**Tabella 15** - Principali composti volatili delle birre ottenute con mosto Pils più idrolizzato di fagiolo e lenticchia Beluga messi a confronto.

## CAPITOLO 5 - DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Il mercato dei cibi funzionali sta oggi riscuotendo notevole interesse tra i consumatori ed i professionisti del settore sono in crescente competizione per l'immissione in commercio di nuovi prodotti. La richiesta da parte del consumatore è così fortemente in crescita da raggiungere nel 2020 un valore di mercato pari a 100 miliardi di dollari. La definizione di cibo funzionale è abbastanza sfumata e presenta piccole variazioni a seconda dell'area geografica. In Europa, per cibo funzionale si intende un cibo che sia in grado di influenzare in modo positivo una o più funzioni target del corpo e che siano scientificamente dimostrate le sue potenzialità nel migliorare lo stato di salute e nel ridurre il rischio di incorrere in malattie. In questo contesto non ci si riferisce solo a prodotti formulati ma anche ad alimenti veri e propri, la cui sicurezza deve essere indagata sufficientemente a fondo da garantire l'assenza di rischi per la salute anche a seguito di un'assunzione quotidiana e reiterata nel tempo. I punti in cui il settore della nutrizione pone la sua enfasi sono cambiati nel corso degli anni. A partire dal 1800 fino agli anni 60 del secolo scorso, la ricerca nutrizionale si preoccupava principalmente di individuare la totalità dei micronutrienti idrosolubili, liposolubili e dei minerali essenziali e di stabilire quale fossero i livelli di assunzione minima ai fini di prevenire patologie legate alla malnutrizione. In seguito, le evidenti correlazioni tra nutrizione e tutta una serie di patologie legate ad essa come obesità, cancro, diabete e problemi cardiovascolari, hanno spostato l'attenzione della ricerca verso l'azione sinergica che alcuni alimenti possono avere ai fini di protezione nei confronti di tali problematiche. I primi nutraceutici ad essere indagati furono la fibra alimentare, il  $\beta$ -carotene e gli acidi grassi polinsaturi  $\omega$ 3 (PUFA). Oggigiorno la lista è ben più lunga e conta oltre a centinaia di altre molecole, anche microorganismi tra cui lieviti e batteri, il cui ruolo nel mantenimento della nostra salute è attualmente uno dei temi più indagati dalle scienze della nutrizione (Denis M. Medeiros, Robert E. C. Wildman, 2019).

In virtù di quanto premesso, lo scopo di questa tesi è stato quello di indagare le caratteristiche tecnologiche di lieviti *S.cerevisiae* e non-*saccharomyces* (già testati per le loro proprietà probiotiche in un precedente studio [Agarbati et al., 2020]), nella produzione di birra artigianale fortificata con idrolizzato di lenticchia Beluga e fagiolo nero. Le specie di lievito attualmente riconosciute e utilizzate come probiotici sono poche, ma la ricerca in questo settore si sta intensificando. Durante il lavoro di tesi sono stati utilizzati lieviti *L. thermotollerans* (isolato da muschio di legno di quercia) e *K. unispora* (isolato da madre acida), sia in coltura pura che in coltura mista con *S. cerevisiae* alle concentrazioni rispettivamente di 1:20 e 1:50. Le fermentazioni sono state portate avanti su 3 substrati diversi: solo mosto Pils, mosto Pils con aggiunta di un 20% di idrolizzato di farina di fagiolo nero, Mosto Pils con aggiunta di un 20 % di idrolizzato di farina di lenticchia Beluga. Abbiamo ottenuto un primo prodotto con potenzialità probiotiche e con un apprezzato profilo sensoriale, derivanti dai ceppi utilizzati e con un profilo amminoacidico più ricco dovuto all'aggiunta degli idrolizzati di legumi.

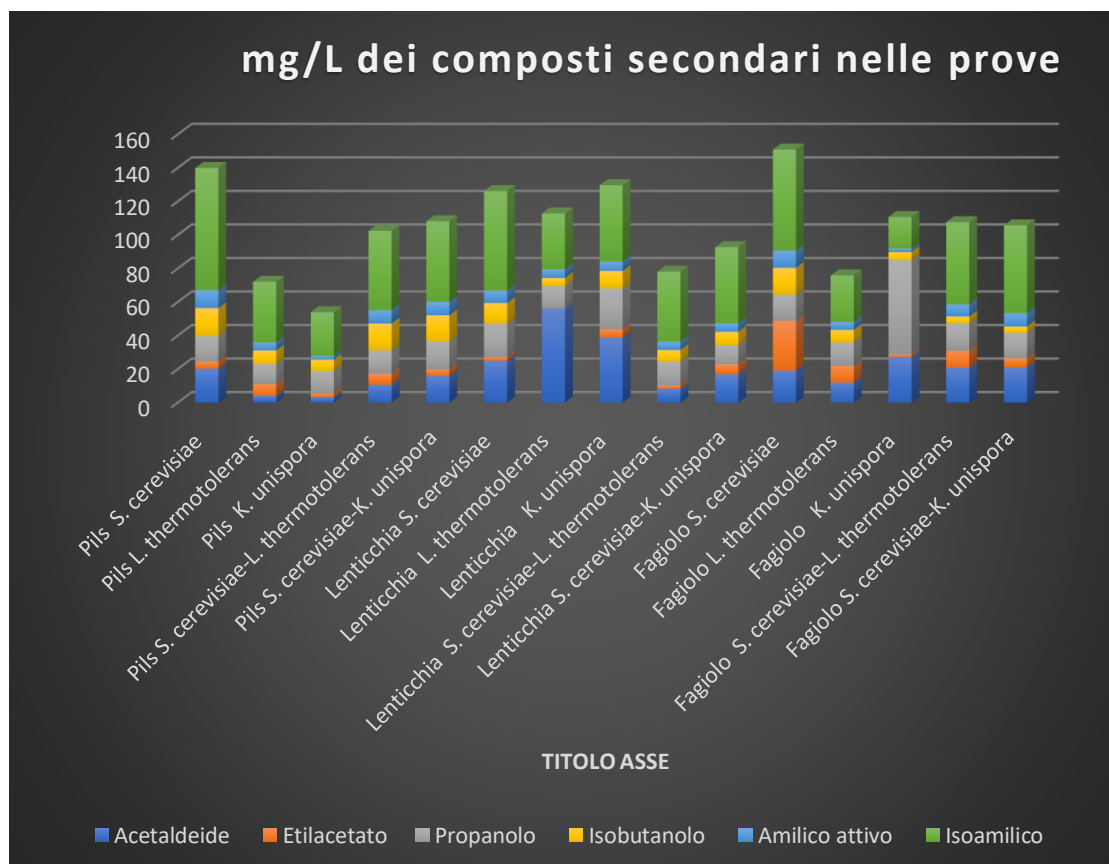
Il lievito *k. unispora*, indipendentemente dal substrato utilizzato, ha mostrato la cinetica fermentativa meno performante. Tale trend cambia però nelle colture miste in cui viene associato al ceppo di *S.cerevisiae*, dove la quantità di CO<sub>2</sub> svolta è nettamente maggiore. In generale, la presenza di una parte di *S.cerevisiae* nelle mix, ha contribuito ad aumentarne le performance fermentative se paragonate alle monoculture di lieviti non-*Saccharomyces*. Per quanto riguarda l'influenza dei substrati, l'aggiunta degli idrolizzati di legumi ha garantito una più alta cinetica fermentativa, in particolar modo nelle colture miste di *S.cerevisiae* e *L. thermotolerans*.

Il glucosio e il saccarosio sono esauriti quasi del tutto nelle varie prove, tranne che per la monocultura di *K. unispora* su substrato di Pils con idrolizzato di fagiolo, dove il glucosio residuo registrato è insolitamente più alto (3,2 g/L). Tra gli zuccheri

analizzati, il maltosio è quello maggiormente concentrato e indipendentemente dal substrato, risulta maggiormente presente nelle monoculture di *K. unispora*, segno ulteriore della bassa cinetica fermentativa di questo ceppo.

Le proteine residue oscillano in un range di valori che va da 10,14 - 31,47 g/L e mediamente rimangono più alte nelle monoculture di *S. cerevisiae*.

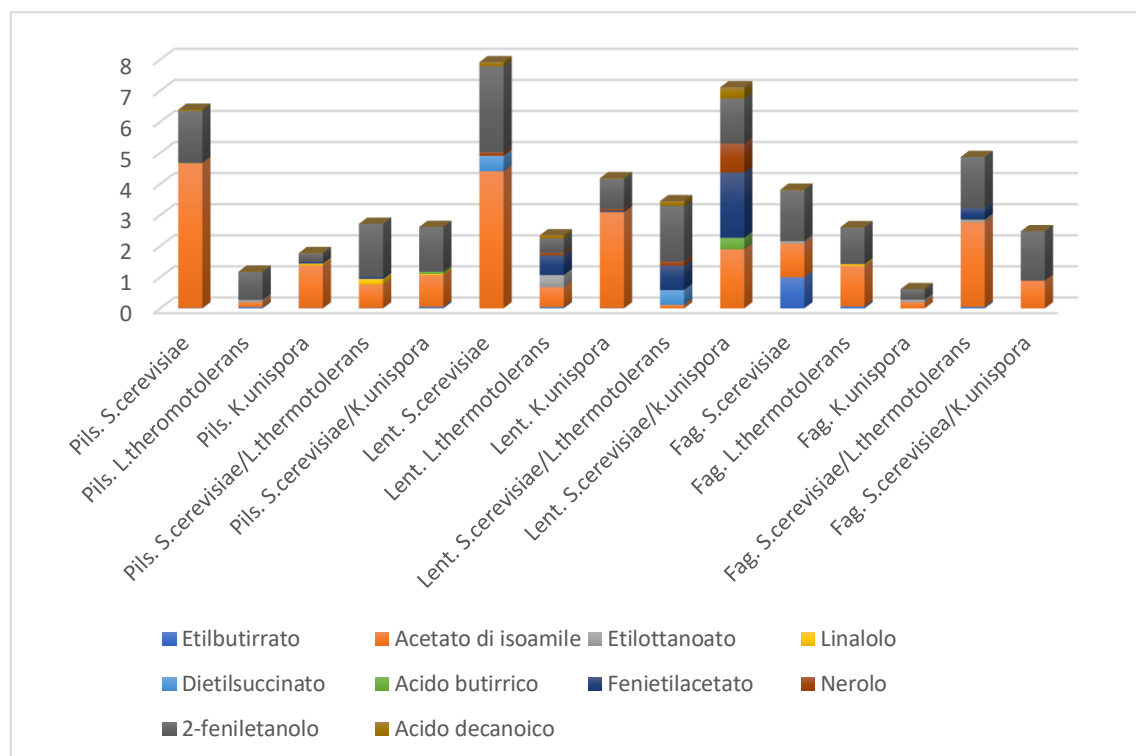
Per quanto riguarda i composti secondari, sono state indagate le concentrazioni di acetaldeide (sapore di mela verde, burro), etilacetato (aroma di ananas), propanolo (nota di durezza), isobutanolo (nota alcolica, solvente), amilico attivo (alcol e nota di frutta) e isoamilico (aroma di banana). Sebbene questi composti siano importanti per il profilo aromatico della birra, se presenti al disopra del loro valore soglia potrebbero risultare fastidiosi.



**Fig.18:** Panoramica sulle variazioni dei composti secondari in tutti le prove analizzate.

Come si può notare nella figura 18, l'acetaldeide, tranne poche eccezioni presenta valori superiori alla sua soglia (10 mg/L), mentre tutti gli altri composti rientrano nei limiti desiderabili. Il substrato caratterizzato da una concentrazione mediamente più alta di composti secondari è stato il mosto Pils con idrolizzato di fagiolo, anche se questa tendenza non è molto marcata.

Di tutti i composti volatili ricercati, quelli mediamente più presenti sono stati l'acetato di isoamile e il 2-feniletanolo. Non si riescono ad individuare particolari pattern che permettano una distinzione netta tra i vari substrati o tra le colture utilizzate (fig.19).



**Fig.19:** panoramica sulla concentrazione dei composti volatili in tutte le prove.

Lo studio condotto rappresenta un lavoro preliminare che muove i primi passi verso la realizzazione di una bevanda probiotica e con un profilo amminoacidico completo, che si inserisca nel mezzo di due mercati in forte crescita: quello del settore brassicolo e quello degli alimenti fortificati.



Ulteriori indagini sono necessarie ai fini di stabilire le proprietà probiotiche del prodotto finito e di investigare più substrati con cui abbinare il mosto base in modo da avere una birra che non deluda le aspettative dell'amatore più esigente.

## CAPITOLO 6 – BIBLIOGRAFIA

- **AA.VV.** (2017) *Brewing Scienze: A Multidisciplinary Approach*. Michael Mosher, Kenneth Trantham. Springer International Publishing Switzerland 2017. 1-21; 95-98; 107; 118-119; 272; 314
- **AA.VV.** (2001) *Brewing Yeast and Fermentation*. Chris Boulton and David Quain. Blackwell Science Ltd United Kingdom, 2001. 5-15. 34-36. 416-417.
- **AA.VV.** (2009) *Beer in Health and Disease Prevention*. Victor R. Preedy Department of Nutrition and Dietetics King's College London London, UK. Elsevier Inc. 2009. 1-15. 211-227.
- **AA.VV.** (2015) *Brewing Microbiology Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Annie E. Hill. Elsevier Ltd UK. 2015. 71.
- **Knop, M.** (2011). *Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations*. *Comptes Rendus Biologies*, 334(8-9), 599–606. doi:10.1016/j.crv.2011.05.007
- **Manzoni M** (2006). *Microbiologia industriale*. Editore: Casa Editrice Ambrosiana.
- **Cabras P. & Martelli A.** (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin Editore pp. 557-598.
- **Harrison MA** (2009). “Beer/Brewing.” *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd Edition. Elsevier Inc., 2009.
- **Vanderhaegen B**, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H (2003). “Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, p. 678-679.
- **Ernest CH, Chen A, Jamieson AM, Van Gheluwe G** (1980). The release of fatty acids as a consequence of yeast autolysis. *J Am Soc Brew Chem* 38: 13-17.
- **Leroy MJ, Charpentier M, Duteurtre B, Feuillat M, Charpentier C** (1990). Yeast autolysis during champagne aging. *Am J Enol Vitic* 41: 21-28.
- **Masschelein CA** (1986). **Centenary review: the biochemistry of maturation**. *J Inst Brew* 92: 213-219

- **Ormrod IHL, Lalor EF, Sharpe FR (1991).** The release of yeast proteolytic enzymes into beer. *J Inst Brew* 97: 441-443.
- **AA.VV. (2019)** Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. Andriy Sibirny Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Cell Biology. Springer Nature Switzerland AG 2019. 361-389.
- **AA.VV. (2017)** Brewing and Distilling Yeasts. Graham G. Stewart International Centre for Brewing and Distilling Heriot Watt University Edinburgh, Scotland. Springer International Publishing AG 2017. 325-349.
- **Šmogrovičová, D., and Dömény, Z. (1999)** Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts, *Process Biochem.* 34, 785–794
- **Kobayashi M, Nagahisa K, Shimizu H, Shioya S (2006).** Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in lowmalt beer fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 549-558
- **Rossi S, Sileoni V, Perretti G, Marconi O (2014).** Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 94 (2014) 919-928.
- **Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H (2003 b).** “Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, p. 678-679.
- **AA.VV. (2017)** Yeast Diversity in Human Welfare. Tulasi Satyanarayana Gotthard Kunze Editors. Springer Science+Business Media Singapore 2017. 115-137.
- **McFarland, L.V., 2010.** Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* 16, 2202.
- **Kumura, H.;** Tanoue, Y.; Tsukahara, M.; Tanaka, T.; Shimazaki, K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 4050–4056. [CrossRef]
- **AA.VV.** Alimentazione e Nutrizione Umana. Mariani Costantini, Cannella, Tommasi. Terza edizione riveduta e aggiornata di fondamenti di nutrizione umana a cura di Lorenzo M. Donini, Anna Maria Giusti, Alessandro Pinto, Valeria Del Balzo. Il Pensiero Scientifico Editore 2016.

- **Boye, J.; Zare, F.; Pletch, A.** Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 2010, 43, 414–431.
- **Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S.** (2013). Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris*L.): An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 580–592. doi:10.1080/10408398.2011.596639
- **Takeoka, G. R., Dao, L. T., Tamura, H., & Harden, L. A.** (2005). Delphinidin 3-O-(2-O-β-d-Glucopyranosyl-α-l-arabinopyranoside): A Novel Anthocyanin Identified in Beluga Black Lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4932–4937.
- **Zhang, B., Peng, H., Deng, Z., & Tsao, R.** (2018). Phytochemicals of lentil (*Lens culinaris*) and their antioxidant and anti-inflammatory effects. *Journal of Food Bioactives*, 1(1), 93–103
- **Agarbati A., Canonico L., Marini, E., Zannini, E., Ciani, M., Comitini F.,** 2020. Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. *Foods* 9-287.
- **Denis M. Medeiros, Robert E. C. Wildman, (2019).** *Advanced Human Nutrition*, forth edition. Editor: Jones & Bartlett Learning.

### **Fonti bibliografici elettroniche:**

- **Prandi M (2014).** Il *Brettanomyces* alleato dei birrai. Ma nemico del vino!
- [gazzettaufficiale.it](http://gazzettaufficiale.it)
- [www.microirrifici.org](http://www.microirrifici.org)

