



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in:

Biologia Molecolare e Applicata

**APPLICAZIONE DI LIEVITI NON CONVENZIONALI PER LA  
VALORIZZAZIONE DELLE TREBBIE DA BIRRA ARTIGIANALE**

**APPLICATION OF NON-CONVENTIONAL YEASTS FOR VALORIZATION OF  
BREWER'S SPENT GRAINS (BSG)**

Tesi di Laurea Magistrale di:

*Ilenia D'Aulerio*

Relatore:

*Prof.ssa Comitini Francesca*

Correlatore:

*Dott.ssa Canonico Laura*

ANNO ACCADEMICO 2022-2023



## *Indice*

1.INTRODUZIONE .....	5
1.1. MATERIE PRIME .....	7
1.1.1. MALTO D'ORZO .....	7
1.1.2 L'ACQUA.....	9
1.1.3 IL LUPPOLO .....	11
1.1.4 IL LIEVITO .....	13
1.2. PROCESSO PRODUTTIVO .....	16
1.2.1 LA MALTAZIONE .....	16
1.2.2 L'AMMOSTAMENTO.....	18
1.2.3 LA FERMENTAZIONE .....	20
1.2.4 IL DOWNSTREAM .....	22
1.3. UTILIZZO DI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES IN AMBITO BRASSICOLO .....	23
1.4 LE CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA .....	26
1.4.1 ALCOLI SUPERIORI.....	27
1.4.2 ESTERI .....	28
1.4.3. COMPOSTI SOLFORATI .....	29
1.4.4 ACIDI ORGANICI .....	30
1.4.5 MONOTERPENI .....	31
1.4.6 COMPOSTI CARBONILICI.....	31
1.4.7 I SOTTOPRODOTTI INAMBITO BRASSICOLO .....	32
1.5 BIRRE INNOVATIVE .....	35

1.5.1. BIRRE A BASSO CONTENUTO CALORICO .....	35
1.5.3. BIRRA SENZA GLUTINE .....	37
CAPITOLO 2-SCOPO DELLA TESI.....	38
CAPITOLO 3-MATERIALI E METODI.....	39
3.1. CEPPI DI LIEVITO .....	39
3.2 ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE .....	40
3.3. ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI .....	41
3.4. RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA.....	42
3.5. ANALISI MICROBIOLOGICHE .....	42
3.5.1. MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI .....	42
3.5.2. TERRENO YPD AGAR.....	43
3.6. ANALISI CHIMICHE.....	45
3.6.1. ANALISI COMPONENTE VOLATILE .....	45
3.6.2. DETERMINAZIONE DELL'ETANOLO.....	46
3.6.4.DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RESIDUI ....	48
3.6.5. ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE .....	49
CAPITOLO 4 -RISULTATI.....	51
4.1. VALUTAZIONE DELL'ATTITUDINE FERMENTATIVA ....	51
4.2. PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA .....	54
4.3. CONTE VITALI.....	57
4.4. PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI .....	58
4.5. PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI.....	60
4.6.ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE DELLA MATRICE .....	63
CAPITOLO 5-DISCUSSIONI E CONCLUSIONI .....	65
CAPITOLO 7-BIBLIOGRAFIA.....	68
SITOGRAFIA.....	74

## ***1.INTRODUZIONE***

La birra è una delle bevande fermentate più consumate al mondo, definita dalla legislazione italiana, con il D.P.R. n° 272 del 30/06/1998, come il prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica condotta con ceppi di *Saccharomyces carlsbergensis* o *Saccharomyces cerevisiae* di un mosto preparato con malto di orzo, di frumento o di loro miscele ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi. La birra artigianale fonda le sue radici in un'epoca lontana, il fenomeno si è originato negli Stati Uniti verso la fine degli anni '70, evolvendosi fortemente nel corso del tempo e approdando in Europa in anni più recenti (*Tremblay e Tremblay, 2011; Benvenuto e Bianchi, 2014*). In Italia, nel 2016, la legge riguardante la regolazione igienica sulla produzione e commercio di birra (legge n° 1352) è stata integrata con la seguente definizione di birra artigianale:

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

Una birra artigianale, contrariamente a quella industriale non subisce processi di pastorizzazione e microfiltrazione, questo permette quindi, l'ottenimento di un profilo aromatico sicuramente più intricato e complesso. Inoltre, le birre artigianali sono spesso soggette ad un processo di rifermentazione in bottiglia durante il quale

vengono aggiunti gli zuccheri e il lievito starter. È proprio il ceppo di lievito utilizzato ad influenzare in maniera notevole il profilo aromatico del prodotto finale, conferendo alla birra il suo bioflavour distintivo (Canonico et al., 2014). La rifermentazione in bottiglia consentirà la produzione di CO<sub>2</sub> che non potendo essere liberata nell'atmosfera, si conserverà all'interno della bottiglia stessa. È proprio questa CO<sub>2</sub> ad essere responsabile della frizzantezza della birra, perché non riesce a disperdersi nell'ambiente. Inoltre, questa CO<sub>2</sub> risulta essere anche responsabile di una maggiore produzione di schiuma e di una maggiore aromaticità. Nei microbirrifici la produzione di birra è soprattutto di tipo Ale, ad opera di ceppi di *S.cerevisiae* ed è stato dimostrato che questo porta ad un incremento di composti fruttati e floreali come l' isoamil acetato, l' etil ottanoato e β-feniletanolo che conferiscono alla birra artigianale il bioflavor caratteristico (Canonico et al.2014). Rispetto ai prodotti delle grandi aziende multinazionali, l'interesse dei consumatori verso le birre artigianali è aumentato in maniera piuttosto consistente. Questa preferenza da parte dei consumatori è dovuta ad una molteplicità di fattori, ma senza dubbio alla grande complessità di sapori che queste birre riesco ad apportare e ad offrire al consumatore. Sotto il profilo dei consumi e del comportamento dei consumatori, il report segnala sulla base di un'indagine di mercato su 1700 contatti, che il 41% è consumatore abituale di birra, il 12% della sola birra industriale e il 29% di birra industriale e artigianale (<https://www.unionbirrai.it>). Il mercato brassicolo risulta essere, quindi, sempre più orientato al miglioramento della qualità, attraverso una differenziazione dei prodotti mirando sempre più alla produzione di birre “artigianali”, ottenute con materie prime di qualità, nate dalla reinterpretazione di stili tradizionali. Si tratta della cosiddetta “Craft beer

*revolution” (Fastigi et al., 2015). Le birre artigianali, quindi, risultano essere contrapposte in termini di aroma, gusto e produzione a quelle industriali. La preferenza dei consumatori per la birra artigianale è dovuta al desiderio di vivere nuove esperienze di gusto e ad un atteggiamento contrario al consumo di birra tradizionale. (Pokrivčák et al., 2019).*

## **1.1. MATERIE PRIME**

Le materie prime indispensabili per la produzione della birra sono rappresentate da malto d’orzo, acqua, luppolo e lievito.

### **1.1.1. MALTO D’ORZO**



*Figura 1-Orzo*

Per definizione la birra è una bevanda alcolica ottenuta tipicamente dalla fermentazione di zuccheri derivanti da fonti amidacee. Il cereale più utilizzato per tale processo è rappresentato dal malto d’orzo (*Hordeum vulgare, vulgare L.*). L’orzo rappresenta dopo il frumento, riso e mais il quarto cereale in ordine di importanza (Giardini et al., 2002). Questo cereale è costituito da: carboidrati (70-85%), di cui il 55-56% di amido, utilizzato dai lieviti durante la fermentazione, da

cellulosa ed emicellulosa, di fondamentale importanza per la resistenza e rigidità del seme, e zuccheri semplici (glucosio, fruttosio e saccarosio); proteine (10,5-11,5%), quali glutine, prolamine, globuline e albumine, essenziali per la produzione di schiuma, ma causa di intorbidimenti se presenti in eccesso; lipidi (1,5-2%), come trigliceridi, i quali esercitano un effetto negativo sulla schiuma; in piccola quantità vitamine (B1, B2, C, E) necessarie per il metabolismo dei lieviti, e sostanze polifenoliche, causa di intorbidimenti e gusto aspro alla birra se solubilizzate (Cabras *et al.*, 2004). L'amido, che costituisce il 56% dell'orzo totale, risulta essere la fonte principale di carbonio utilizzata dai lieviti durante il processo fermentativo. La maggior parte delle caratteristiche della birra provengono proprio dal malto utilizzato durante la sua produzione. È da questo, infatti che dipendono sapore, aromi, corpo e colore della birra. Se si preferisce usare dei malti per birra di tipo semplice, poco raffinato, si otterranno birre chiare e leggere, dal sapore più delicato e leggero. Se invece nella lavorazione si impiegano dei malti per birra torrefatti o caramellati, la bevanda alcolica si manifesta con un colore più scuro e un gusto decisamente più intenso. All'interno della stessa specie di *Hordeum vulgare* la varietà che si è dimostrata essere più adatta nell'utilizzo in ambito brassicolo è rappresentata dall'orzo distico. Questo è caratterizzato da cariossidi più grandi, uniformi, resistenti alle fitopatie dell'area di coltivazione, in grado di mantenere un comportamento regolare durante il processo di maltazione. Inoltre, l'orzo distico apporta un adeguato contenuto proteico ed una e maggiore produzione di  $\alpha$  e  $\beta$  -amilasi durante la germinazione (Sunier, 1988). Posso essere impiegati anche cereali non maltati per la produzione della birra, però hanno lo svantaggio di non presentare sufficiente attività enzimatica.



### 1.1.2 L'ACQUA

Tra gli ingredienti per produrre la birra, l'acqua è senza dubbio quello presente in maniera prevalente (95%). Un peso così preponderante permette di capire come l'acqua influenzi non solo il gusto, ma anche le diverse percezioni tattili e sensoriali. Oltre a caratterizzare il profilo organolettico del prodotto finito, è essenziale per la buona riuscita delle diverse fasi produttive. L'acqua, infatti, solubilizza gli amidi, le proteine e gli altri costituenti dei cereali durante la fase di ammostamento, creando un ambiente idoneo per il lavoro degli enzimi nelle diverse fasi di produzione. Le principali caratteristiche dell'acqua risultano fondamentali per l'ottenimento di una birra di qualità. Ad esempio, la durezza dell'acqua sta ad indicare il contenuto di sali di calcio e magnesio presenti all'interno dell'acqua e, la loro quantità è data dalla presenza di sali solubili nell'acqua, che sono in grado di sviluppare interazioni con gli altri ingredienti presenti nella birra, andando a valorizzare alcune percezioni. Contrariamente, se non bilanciati opportunamente, possono influire negativamente creando composti che potrebbero rendere la birra poco piacevole. Un'elevata concentrazione in carbonati caratterizza le acque dette "dolci", con pH più alto, adatte a produrre le birre scure, ad esempio le birre Pils. Un'elevata durezza permanente, invece, comporta una maggiore acidità dell'acqua, rendendola adatta alla produzione di birre chiare. La presenza di acque dure, quindi, ha ripercussioni negative a livello di degradazione di amido e proteine unitamente ad una vigorosa estrazione delle glumelle con impatto organolettico negativo nel prodotto finito (*Buiatti, 2004*). Un'altra caratteristica di cui tener conto durante il processo produttivo della birra è il pH che sta ad indicare il livello di acidità o basicità dell'acqua, essenziale nella fase di ammostamento poiché influenza la

velocità di azione degli enzimi attivi, ma anche in fase di filtrazione, in seguito al risciacquo delle trebbie. È assolutamente necessario monitorare costantemente il pH dell'acqua, anche per non estrarre quantità eccessive di tannini (sostanze contenute nei luppoli e nelle bucce del malto) e polifenoli che si rendono responsabili di astringenza nella birra finita: più il pH è alto, più l'amaro appare sgradevole. Per quanto riguarda, invece, i sali minerali che maggiormente vanno ad influire sul gusto abbiamo:

- **CALCIO:** svolge un ruolo attivo in quasi tutte le fasi della produzione, protegge gli enzimi dagli sbalzi termici, favorisce la coagulazione delle proteine e la flocculazione del lievito;
- **MAGNESIO:** rappresenta una sostanza nutritiva per il lievito. In piccole quantità non va ad influenzare il sapore della birra, al contrario, concentrazioni maggiori possono apportare un gusto acido piuttosto spiacevole (*Hammond et al, 2007*).
- **SODIO:** dona corposità alla birra e va ad accentuarne il sapore. Tuttavia, un suo eccesso apporta un retrogusto acido alla birra e diventa velenoso per i lieviti. La normale concentrazione di Sodio nell'acqua si aggira tra i 20 ed i 70 ppm, ma un range tra i 90 e 130 ppm è da considerarsi ottimale se si desidera ottenere una birra corposa, ma è comunque raccomandabile rimanere nei 150 ppm. (*Hammond et al, 2007*).
- **SOLFATI:** contribuiscono ad aumentare l'alcalinità dell'acqua, e la loro presenza nel mosto enfatizza l'aroma fornito dai luppoli aumentando esponenzialmente l'amarezza. Una concentrazione di Solfati tra i 30 ed i 70 ppm è da considerarsi adeguata nella maggior parte delle Ales, ma possiamo

spingerci fino a 200 ppm se desideriamo un amaro più deciso. È comunque raccomandabile non superare mai i 350 ppm. Molto importante è il rapporto solfato-cloruro, il quale influenza l'equilibrio luppolato-maltato o secchezza- pienezza della birra (*Palmer and Kaminski, 2013*).

### 1.1.3 IL LUPPOLO

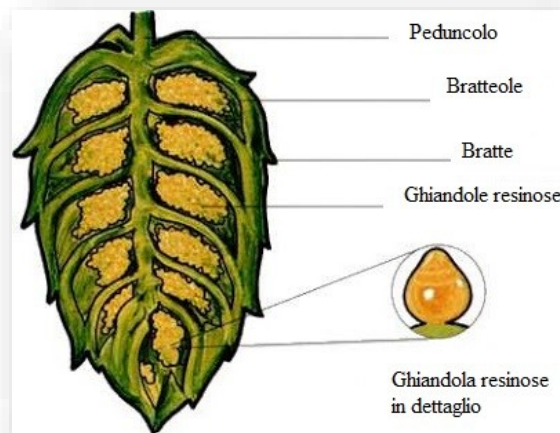


*Figura 2-Humulus Lupulus*

*Fonte: (<https://www.greenme.it/>).*

Il luppolo rappresenta un altro ingrediente fondamentale del processo produttivo in quanto conferisce un sapore amaro, possiede attività antimicrobica e contribuisce alla precipitazione delle proteine rendendo torbido il mosto. La pianta del luppolo (*Humulus lupulus*) si può identificare come pianta rampicante dioica appartenente alla famiglia delle *Cannabaceae*. Trattandosi di una pianta dioica, esistono piante maschili (pistilliferi) e femminili (staminiferi), la cui fioritura avviene prevalentemente durante la stagione estiva. L'unica parte della pianta impiegata nella produzione della birra sono le infiorescenze femminili, denominate coni.

Questi coni sono ricchi di ghiandole resinose secernenti una resina giallastra ed amara, la luppolina, composta da acidi organici, polifenoli e numerosi oli essenziali (Fig.2). Sono proprio queste le sostanze responsabili dell'attività funzionale del luppolo nella birra. Per le sue proprietà antibatteriche, il luppolo funge anche da conservante naturale.



*Fig.3- Sezione del cono di Humulus lupulus L. e principali composti.*

*Fonte: (<https://www.hopsfarmer.it/luppolo-un-po-di-chimica/>).*

Le sostanze del luppolo che risultano essere maggiormente rilevanti nella produzione della birra sono gli  $\alpha$  acidi, i  $\beta$ -acidi e gli oli essenziali. Gli  $\alpha$ -acidi sono presenti in quantità diverse a seconda delle varietà e del luogo di coltivazione. I principali sono il co-umulone, l'ad-umulone e l'umulone (De Keukeleire, 2000). I  $\beta$ -acidi rappresentati da upulone, co-lupolone e ad-lupulone, invece, sono meno importanti per la produzione di birra poiché non isomerizzano durante la bollitura e il loro contributo all'amaro risulta essere meno significativo. Gli oli essenziali,

invece, rappresentano una piccola percentuale (0,5-2%) del luppolo, ma hanno una importanza rilevante per le loro proprietà aromatiche. Essi sono rappresentati dal mircene, l'umulene, il linalolo, il linalilisonato, il geraniolo e i diterpeni e si possono suddividere in idrocarburi e idrocarburi ossidati (*Hieronymus, 2016*). Infine, l'uso del luppolo aiuta a coagulare le proteine in sospensione nella birra più limpida e incrementa la persistenza della schiuma grazie a forze di natura ionica tra le cariche negative degli iso  $\alpha$ -acidi e quelle positive degli ioni ammonio dei polipeptidi che costituiscono la schiuma (*Blanco et al., 2006*).

In base al contenuto di  $\alpha$ -acidi, i luppoli si differenziano in:

-LUPPOLI DA AMARO: aggiunti all'inizio della bollitura e caratterizzati dalla presenza di circa 6-10 %  $\alpha$ -acidi;

-LUPPOLI DA AROMA: aggiunti a fine bollitura e con il 5%  $\alpha$ -acidi;

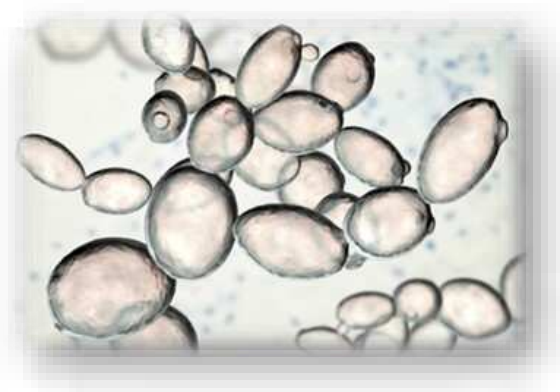
-LUPPOLI AMBIVALENTI: con una quantità di  $\alpha$ -acidi maggiori al 6%.

#### **1.1.4 IL LIEVITO**

Il lievito rappresenta l'ingrediente fondamentale per la produzione della birra, in quanto risulta essere coinvolto nella conversione degli zuccheri in alcol etilico, anidride carbonica e altri prodotti secondari. Nel 1680 Leuwenhoeck identifica il lievito di birra, senza comprendere però, nè la natura nè la sua azione, cosa che riesce nel 1739 a Cagniard-Latour che attribuì la fermentazione ad una cellula di lievito. La sua teoria, basata su una cellula invisibile, venne duramente contestata dagli scienziati dell'epoca ma già l'anno dopo, Anton Dreher e Gabriel Sedlmayr identificarono il lievito come l'ingrediente segreto che fa la gloria delle birre

bavaresi. Questo lievito, esportato in Boemia, fornì l'occasione a Plzen nel 1842 di lanciare uno stile che sconvolge il mondo della birra (<https://beerinba.com/>).

Nel dettaglio, i lieviti quando vengono inoculati nel mosto, dopo alcune ore, iniziano a nutrirsi degli zuccheri estratti dal malto durante l'ammontamento. Le specie di lievito impiegate maggiormente sono rappresentate da: *S.cerevisiae*; *Saccharomyces pastorianus* (Lodolo et al.;2008) che si differenziano tra loro per le caratteristiche metaboliche e le temperature di fermentazione.



*Figura 4-Lievito S. cerevisiae*

Il lievito *S.cerevisiae* (fig.3) è un organismo unicellulare, appartenente al regno dei Funghi, ha una classica forma sferica e si divide per gemmazione. Rappresenta il lievito principe nella produzione della birra grazie al suo elevato vigore fermentativo, alcoligeno e alla sua elevata resistenza agli antisettici. Inoltre riesce a sopravvivere in condizioni anaerobiche di fermentazione. È impiegato per l'ottenimento di birre ad alta fermentazione chiamate Ale (18-22 °C). (Boulton and Quain, 2008). In generale, i lieviti appartenenti a questa specie producono una certa quantità di esteri, che conferiscono alla birra aromi fruttati o speziati.

Invece, il lievito *S. pastorianus*, chiamato anche bottom yeast, viene impiegato per la produzione di birre a bassa fermentazione. I lieviti al termine del processo fermentativo tendono a depositarsi sul fondo del fermentatore, il cui fenomeno prende il nome di flocculazione. La flocculazione è dovuta alla produzione di lectine sulla superficie cellulare che permettono al lievito di aggregarsi. Questo si verifica solamente quando la concentrazione di zucchero nella soluzione acquosa è sufficientemente bassa, ovvero al termine della fermentazione. Il *S. pastorianus* invece si distingue dal *S. cerevisiae* per la sua capacità di metabolizzare il melibiosio grazie ad una  $\alpha$ -galattosidasi (Tubb, 1986). Questo lievito viene impiegato per le birre Lager e anche per le Pilsner. Anch'esso si moltiplica per gemmazione e si presenta con una morfologia ovale allungata. Durante il processo di fermentazione, temperatura e umidità devono essere mantenute costantemente sotto controllo al fine di garantire al lievito un adeguato tasso di crescita. Il pH passa da un valore di 5,2 del mosto a un valore di 4,1-4,2 al termine della fermentazione (diminuzione leggermente più marcata nella birra Ale) e ciò è determinante per preservare il prodotto finale e inibire la crescita batterica (Harrison, 2009). Il lievito non rappresenta l'unico microrganismo che può essere utilizzato nel processo brassicolo, infatti, come regolamento al D.M. 2 maggio 1996, n° 325 la legislazione italiana permette l'impiego di batteri lattici del genere *Lactobacillus* come stabilizzanti; in particolar modo è utilizzato *Lactobacillus delbruecki* aggiunto, ad esempio, prima della luppolatura del mosto (Lowe and Arendt, 2004).

## 1.2. PROCESSO PRODUTTIVO

Il processo produttivo della birra è composto da varie fasi:

- maltazione;
- ammostamento;
- fermentazione;
- downstream.

### 1.2.1 LA MALTAZIONE

Il processo di maltazione risulta essere di notevole importanza, in quanto permette l'arricchimento enzimatico del seme. Lo scopo principale di tale processo è quello di produrre enzimi amilolitici e proteolitici, che sono invece assenti nell'orzo non germinato, facilitare la fase di lavorazione e migliorare il profilo aromatico del prodotto. È un processo rimasto invariato fin dalle sue origini, solo alcune attrezzature e alcuni aspetti sono cambiati. Grazie alle maggiori conoscenze tecnico-scientifiche acquisite nel corso degli anni, oggi è possibile, inoltre, effettuare un controllo e gestire le temperature durante il processo produttivo. Questo processo di maltazione avviene nelle malterie e permette di ottenere come risultato finale il malto d'orzo attraverso la germinazione controllata del seme. Le principali trasformazioni alle quali è soggetto l'orzo avvengono a carico delle proteine e dell'amido. Gli enzimi con maggiore importanza sono quelli che degradano l'amido ( $\alpha$ - e  $\beta$ -amilasi e destrinasi); enzimi citolitici (endo ed eso- $\beta$ -glucanasi e xilanasi); enzimi che degradano le proteine (proteasi e peptidasi) e infine enzimi che degradano i grassi (lipasi) (Pepe, 2010). La maltazione permette quindi di trasformare il cereale principe, ovvero l'orzo in malto. Il malto,



contrariamente al cereale grezzo da cui deriva, può essere fermentato dai lieviti e trasformato in alcol, ecco perché la maltazione risulta essere uno dei processi maggiormente rilevanti. Le fasi della maltazione consistono nella pulitura e calibratura dell'orzo, macerazione, germinazione, essiccamento. Tra i vari passaggi che consentono questa trasformazione, la germinazione del seme è sicuramente uno dei passaggi cruciali. La germinazione, infatti, è indispensabile per poter attivare il profilo enzimatico del seme e affinché questo avvenga, occorre idratare i semi delle graminacee. Durante la germinazione l'orzo subisce la disgregazione dell'endosperma del seme, la formazione di zuccheri e subisce la solubilizzazione di sostanze azotate. L'umidità interna del seme raggiunge una percentuale compresa tra il 42 e il 47% a seconda del tipo di malto (*Sicheri, 1983*). Una volta raggiunto il valore di umidità desiderato i chicchi vengono stesi in un ambiente controllato a 16 °C per circa due settimane. L'essiccamento e la tostatura rappresentano gli step conclusivi in cui si assiste ad una ulteriore diminuzione di umidità, il livello infatti crolla a 5°C. Durante questi step conclusivi, si ha anche produzione di composti che influiscono sul colore, aroma e gusto e il mantenimento degli enzimi formati durante la germinazione (*Cabras et al., 2004*). Avvenuta l'essiccazione, quindi, una macchina degerminatrice provvede a rimuovere le germe e le radichette, il cereale maltato viene macinato, ottenendo così una farina, che favorisce l'azione degli enzimi in ammostamento. A seconda delle tecniche utilizzate è possibile ottenere malti molto diversi. Per definizione tutti i malti differenti dal malto chiaro tipo Pilsner sono definiti malti speciali, classificati in tre categorie: malti scuri, malti caramello e malti torrefatti (*Manzano, Buiatti, 2007*).

## 1.2.2 L'AMMOSTAMENTO

L'ammestamento (in inglese *mashing*, che significa miscelare, impastare) rappresenta una delle fasi chiave per la produzione della birra. L'obiettivo di tale processo è quello di andare a risaldare il malto e l'acqua all'interno di un ammostatore, con lo scopo di disgregare le eventuali proteine presenti nel malto e produrre zuccheri (*Boulton and Quain, 2006*). È necessario, primariamente, macinare il malto e poi unirlo ad acqua tiepida monitorando le temperature e consentendo agli enzimi di svolgere la propria funzione. La miscela che si ottiene è quindi riscaldata, effettuando una prima sosta a 45-55 °C per circa 20 minuti dove si attivano le proteasi, che scindono le proteine in polipeptidi, convertiti successivamente in peptidi e aminoacidi liberi grazie all'azione delle peptidasi attive nello stesso range di temperatura. Il risultato di tali reazioni enzimatiche sarà l'aumento di forme azotate facilmente assimilabili dai lieviti. Una seconda sosta è effettuata ad una temperatura di 58- 63°C per circa 20-40 minuti: sono così attivate le  $\beta$ -amilasi, le quali degradano gli amidi in maltosio, uno zucchero altamente fermentabile dal lievito. Una loro azione più intensa porta a mosti maggiormente fermentabili e quindi a birre più alcoliche, secche e con minor corpo (*Montanari et al, 2005*). Un'ultima sosta è effettuata a 68-73 °C, così da attivare le  $\alpha$ -amilasi, le quali agiscono sui legami  $\alpha$  -1,4 - D-glucosidici, degradando l'amido e producendo soprattutto zuccheri non fermentescibili come le destrine, responsabili dell'aumento del corpo della birra. Il mosto risultante contiene mediamente circa il 90-92% di carboidrati e circa il 6-7% di altri composti responsabili del colore, degli aromi e della tenuta della schiuma (*Briggs et al, 2004*). Il prodotto principale è il maltosio, un disaccaride costituito da una coppia di molecole di

glucosio che costituisce il 42% degli zuccheri finali del mosto. Segue un 15% di maltotriosio. Altre tipologie di zucchero ottenute dall'ammestamento sono rappresentate da glucosio e fruttosio (9%), maltotetraosio (6%); saccarosio (5%). La percentuale rimanente degli zuccheri del mosto è costituita invece, da destrine.

L'ammestamento nella pratica può essere svolto in due diversi modi:

**1.INFUSIONE:** risulta essere il metodo maggiormente utilizzato sia a livello industriale che artigianale in quanto molto semplice e può essere condotto in un unico ammostatore. In linea generale, la miscela acqua/cereale viene portata progressivamente a determinate temperature mediante un riscaldamento diretto, senza mai raggiungere l'ebollizione.

**2.DECOZIONE:** è un metodo più antico e complesso utilizzato solo in determinati birrifici. Viene portata ad ebollizione solo una parte dell'impasto, che verrà successivamente aggiunta alla miscela principale, consentendo l'aumento di temperatura voluto. Il metodo per decozione assicura una completa gelatinizzazione dell'amido con una maggiore degradazione enzimatica e un aumento della resa.

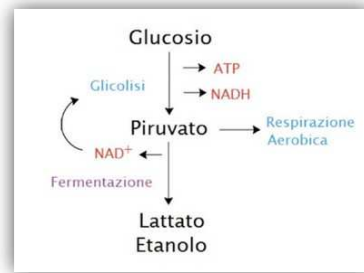
Qualsiasi sia la modalità utilizzata, la temperatura della miscela non dovrà essere superiore ai 78 °C, temperatura che consente l'inattivazione degli enzimi e la stabilizzazione della saccarificazione.

Arrivati a questo punto il mosto deve essere separato dalla parte solida, ovvero dalle trebbie esauste tramite la filtrazione. Il sistema più comune, chiamato "lauter tun" consiste nel trasferire la miscela di mosto di birra e fecce in un tino con un falso fondo provvisto di fenditure (*Zambonelli et al., 1999*). Nel dettaglio, viene fatto

defluire il primo mosto e successivamente le trebbie esauste vengono lavate ripetutamente con acqua calda per poter estrarre quanti più nutrienti possibili e per poter recuperare nuovo mosto. In seguito al processo di filtrazione, il mosto viene portato ad ebollizione per poter inattivare gli enzimi che hanno agito durante l'ammontamento, ma anche per poter eliminare alcuni composti volatili che potrebbero portare a caratteristiche spiacevoli al gusto e all'aroma.

### **1.2.3 LA FERMENTAZIONE**

Una volta ottenuto il mosto si procede all'inoculo del lievito che provvederà ad innescare la fermentazione alcolica, il più noto dei processi fermentativi. Lo svolgimento della fermentazione dipende molto dalle caratteristiche della coltura starter, essa deve essere selezionata per la sua vitalità, resistenza all'alcol e capacità di produrre composti secondari gradevoli, dall'inoculo, dall'apporto di nutrienti presenti nel mosto, dalla presenza di ossigeno e della temperatura a cui viene fatta avvenire (Lodolo, et al., 2008). Quindi, i lieviti selezionati devono essere in possesso di una serie di caratteristiche ottimali, ovvero, essere altamente vitali e con una buona resistenza all'alcol. Nel dettaglio, le cellule di lievito utilizzano le sostanze presenti all'interno del mosto per preparare la parete cellulare, si verifica la respirazione aerobica che si protrae fino all'esaurimento dell'ossigeno, per passare poi alla fermentazione alcolica. A questo punto lo zucchero viene convertito in acido piruvico, il quale è successivamente ridotto ad acetaldeide, con il contemporaneo rilascio di CO<sub>2</sub>. Infine, grazie al consumo di NADH l'acetaldeide viene ridotta ad etanolo (Fig.4).



*Figura 4: Schema del processo fermentativo.*

*Fonte: Fonte: (<https://www.chimica-online.it/>)*

La fermentazione può essere suddivisa in:

- fermentazione primaria;
- fermentazione secondaria.

La fermentazione primaria dalla durata di 7-10 giorni, viene condotta a differenti temperature; a 12°C per la birra Lager e a 20-22°C per la birra Ale. In questa prima fermentazione vengono assimilati la gran parte dei carboidrati del mosto e che porta all'ottenimento della birra immatura. Conclusa la prima fase segue la fase secondaria con una durata di circa 3-5 settimane in cui la temperatura raggiunge valori di 2-4 ° C per la bassa fermentazione e di 7-10 ° C per l'alta fermentazione. In questa fase la maggior parte del lievito viene separato dalla birra e quest'ultima viene trasferita nei serbatoi di maturazione in cui grazie all'azione di lieviti ancora presenti, si assiste alla fermentazione degli zuccheri residui e all'eliminazione di composti indesiderati (Willaert et al.,2007). L'aumento della concentrazione dell'etanolo e l'esaurimento di zuccheri e nutrienti indicano che la fermentazione

inizia a comporta bloccarsi, questo anche il deposito dei lieviti esausti. La birra verde , definita anche immatura, per poter definita matura deve subire tre passaggi:

- **la saturazione di anidride carbonica** derivante dai lieviti non rimossi in seguito alla fermentazione primaria;
- **la chiarificazione**, causata dalla precipitazione di lieviti residui e flocculi tanno-proteici;
- **l'affinamento di gusto e aroma**, grazie all'attenuazione dell'amaro del luppolo e all'armonizzazione dei composti aromatici presenti (*Cabras and Martelli, 2004; Manzoni, 2006*). È indispensabile, nel corso della fermentazione, monitorare la temperatura, l'umidità e il pH il quale deve essere di circa 5.2-5.3 a inizio fermentazione e scendere fino ad un valore di 4.1–4.2 al suo termine. Questo controllo è importante per poter garantire al lievito un adeguato tasso di crescita. Al fine di garantire un processo di fermentazione in maniera ottimale, la temperatura e l'umidità devono rimanere costanti, Il pH invece deve essere di circa 5,2-5,3 nel mosto e scendere fino ad un valore di circa 4,1–4,2 a fine fermentazione. Questi valori sono risultano essere fondamentali per l'inibizione della crescita batterica e per preservare il prodotto finale (*Harrison,2009*).

#### **1.2.4 IL DOWNSTREAM**

Il downstream consta di una serie di step facoltativi che possono essere effettuati una volta terminata la maturazione della birra. Ad esempio, se la concentrazione di CO<sub>2</sub> non ha raggiunto la concentrazione ideale, si può procedere all'aggiunta diretta di diossido di carbonio, fino all'ottenimento della concentrazione desiderata. Un altro step che potrebbe essere effettuato è rappresentato dall'aggiunta delle

proteasi allo scopo di prevenire l'insorgenza della torbidità nel prodotto finito. Inoltre, per aumentare la shelf-life, le birre vengono sottoposte a pastorizzazione, il cui scopo è l'inattivazione dei microrganismi e degli enzimi prodotti. La shelf-life delle birre sottoposte a pastorizzazione risulta essere intorno ai 3 mesi, contrariamente, le birre non pastorizzate devono essere refrigerate per preservarne la qualità e presentano una shelf-life di circa 1 mese (*Harrison MA, 2009*).Le pastorizzazioni attualmente impiegate sono: la pastorizzazione a Flash, svolta a 71-75 °C per 15-30 secondi, e la pastorizzazione a freddo, condotta grazie ad agenti chimici o membrane filtranti, in cui la breve durata e le basse temperature permettono di pastorizzare il prodotto senza surriscaldarlo, evitando l'alterazione del profilo aromatico ottenuto (*Harrison MA, 2009*). Alla fine del processo, le birre vengono confezionate in bottiglie, fusti e lattine. Nel corso del riempimento è fondamentale che la birra non venga a contatto con l'aria poiché comporterebbe effetti negativi sulla qualità della birra (comparsa di off-flavour): i valori inferiori a 0,1 mg di O<sub>2</sub>/l indicano che il processo è stato svolto in maniera ottimale (*Manzano, Buiatti 2007*).

### **1.3. UTILIZZO DI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES IN AMBITO BRASSICOLO**

La produzione di birra avviene nella maggior parte dei casi mediante l'utilizzo del lievito per eccellenza: *S. cerevisiae*. Questo lievito infatti rappresenta lo starter per eccellenza per le sue caratteristiche di:

- resistere all'etanolo;
- avviare velocemente le fermentazioni;

- replicarsi in tempi brevi.

Il crescente interesse per la birra analcolica o a basso contenuto alcolico sta conseguentemente intensificando l'interesse verso l'utilizzo di specie non-*Saccharomyces* con lo scopo di sfruttare le loro caratteristiche metaboliche. La scelta del lievito ha un grande impatto sui metaboliti che conferiscono alla birra il suo sapore caratteristico, tra cui acetati, etil esteri e alcoli superiori (Pires et al., 2014). L'uso di lieviti non-*Saccharomyces* (anche detti non-convenzionali) risulta funzionale per la produzione di birre a basso contenuto alcolico con un miglioramento del profilo aromatico (Basso et al., 2016). Le principali specie di lievito non-*Saccharomyces* utilizzate per la produzione di birra artigianale sono:

**-*Torulaspota delbrueckii***: si tratta di un lievito piuttosto utilizzato nella produzione di birre a bassa gradazione alcolica. Ha il vantaggio di resistere a vari fattori di stress incontrati durante il processo di fermentazione. Inoltre, producono 2-feniletacetato, un estere floreale. Le birre ottenute con questo lievito, quindi, sono caratterizzate da un profilo aromatico e da una più bassa gradazione alcolica (Canonica et al., 2016).

**-*Lachancea thermotolerans***: è una specie di lievito del genere *Lachancea*, che include ceppi con capacità variabile di fermentare il maltosio (Ciani et al, 2019). Questo ceppo di lievito è stato utilizzato in tale studio, in quanto costituisce un lievito che può essere utilizzato con successo nella produzione di birre artigianali grazie alla sua capacità di fermentare fino al 4–9% v/v producendo elevate quantità di acido lattico dagli zuccheri e interessanti effetti sull'aroma della birra (Callejo et al., 2019). Presenta cellule globose



e ellisoidali, sul terreno WL appare verde con striature chiare. L'impiego di questo lievito consentirebbe di evitare complicazioni e di ottenere come un buon risultato in termini di resa del prodotto; infatti, è un lievito che potrebbe ridurre l'acidità volatile e liberare monoterpenoli.

**-Lachancea fermentati:** possiede la capacità di produrre quantità significative di acido lattico durante la fermentazione alcolica, con conseguente accumulo di acido lattico e mostra una ridotta produzione di etanolo.

**-Zygosaccharomyces rouxii** è il lievito più xerotollerante: questa elevata tolleranza osmotica potrebbe essere utilizzata nella produzione di birra ad alta gravità poiché alcuni ceppi hanno dimostrato di fermentare gli zuccheri del mosto. Questo ceppo di lievito è anche considerato adatto alla produzione di bevande fermentate a basso contenuto alcolico a causa della sua incapacità totale o parziale di fermentare il maltosio. Dopo un processo di fermentazione con *Z. rouxii*, gli esteri e gli alcoli superiori sono i principali composti aromatici attivi identificati nella birra (Capece et al, 2018; Bellut et al, 2018).

**-Brettanomyces:** il nome deriva dal suo stretto legame con l'industria della birra britannica, poiché fu isolato per la prima volta nella fermentazione secondaria delle birre inglesi (Smith et al., 2008). È un lievito importante non solo per la birrificazione, ma anche per la vinificazione. Producono degli esteri etilici in grado di conferire un aroma fruttato alla birra.

**-Kazachstania unispora:** *K. unispora* è un lievito appartenente al genere *Kazachstania*, noto anche come *Saccharomyces unisporus* (Lu et al, 2004). Questa specie risulta essere dominante nei prodotti lattiero-caseari, in alcuni frutti come arance e uva e in diversi alimenti fermentati. D'altra parte, questa specie ha la capacità di produrre differenti composti volatili, tra cui il levodione, con attività antiossidante e fondamentale per la sintesi dei carotenoidi (Indrani et al, 2013), e tossine contro i patogeni degli alimenti, tra cui *Listeria monocytogenes* (Goerges et al, 2006).

**Meyerozyma guillermondi:** è una specie di lievito del genere *Meyerozyma*. Si presenta con cellule sferiche o allungate. Dopo la semina su un terreno WL, la colonia appare bianco latte con consistenza cremosa. Questa specie di lievito può provocare concentrazioni deleterie di acetato di etile.

Queste specie di lievito appena citate, sono tutte potenzialmente utili per la produzione di birre a basso contenuto alcolico, ma dal gusto decisamente intenso e deciso, tutte caratteristiche che risultano essere sempre più ricercate.

## **1.4 LE CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA**

Questo notevole incremento delle birre artigianali è dovuto prevalentemente alle caratteristiche singolari che offrono, soprattutto da un punto di vista organolettico. Tra i principali composti che contribuiscono all'aroma di una birra troviamo gli esteri, alcoli superiori, composti che contengono zolfo e composti carbonilici come aldeidi e chetoni.

### 1.4.1 ALCOLI SUPERIORI

Nelle birre sono stati identificati più di 40 alcoli superiori. Questi sono direttamente coinvolti nella formazione di aromi e nella qualità della birra (*Hammond et al., 2007*). Tra questi, i più rappresentativi sono: n-propanolo, l'isobutanolo, l'alcol isoamilico, l'alcol amilico e 2-feniletanolo. La concentrazione di tali alcoli superiori >300 mg/L nella birra può portare a un odore e un sapore forte e pungente, mentre livelli ottimali impartiscono caratteristiche desiderabili (*Olaniran et al., 2016*). La loro produzione può avvenire mediante due vie metaboliche: dal catabolismo degli amminoacidi del mosto e dagli amminoacidi sintetizzati dai lieviti per via anabolica (*Kobayashi et al., 2006*). Il valore più alto è rappresentato dall'n-propanolo, pari a 600 mg/L, che va a conferire al prodotto un sapore alcolico piuttosto dolce. L'isobutanolo e l'alcol amilico, derivanti rispettivamente dalla valina e dall'isoleucina, sono presenti in quantità pari a 100mg/L e 50-70mg/L. L'isobutanolo ottenuto dal metabolismo valina ha un effetto indesiderato sulla qualità della birra se la sua concentrazione supera il 20% della quantità totale di n-propanolo, alcool isobutilico e alcool isoamilico (*Olaniran et al., 2016*). L'alcol isoamilico invece che deriva dal catabolismo della leucina, conferisce un aroma fruttato di banana mentre il 2-fenil etanolo (40mg/L), dona una nota dolce e fruttata alla birra (*Michel et al., 2016*). La produzione degli alcoli superiori è direttamente proporzionale alla crescita cellulare. Aumenta nei mosti con densità di partenza molto alta o con temperature di fermentazione elevate. Con il tempo tendono a ossidarsi riformando le aldeidi, composti volatili che hanno aromi di vini fortificati. Per tale ragione le birre molto alcoliche, si lasciano maturare per un periodo di tempo più lungo: la significativa densità di partenza porta alla formazione di una

quantità significativa di alcoli superiori durante la fermentazione; la maturazione li riconverte lentamente nei loro precursori, le aldeidi, aggiungendo complessità all'aroma e rendendo la birra meno pungente al palato. Il controllo della fermentazione degli alcoli superiori durante la fermentazione può essere raggiunto mediante: la scelta di un adeguato ceppo di lievito, la modificazione della composizione del mosto e la variazione delle condizioni di fermentazione (*Manzano, Buiatti, 2007*). Tra i vari fattori che influenzano la concentrazione degli alcoli superiori troviamo: la temperatura, l'aerazione, il grado Plato del mosto e la composizione amminoacidica del mosto.

### **1.4.2 ESTERI**

Gli esteri rappresentano il più importante gruppo di componenti attivi nei confronti dell'aroma della birra e tendono a conferire un aroma floreale e fruttato alla birra. I differenti tipi di esteri sono generati dalla combinazione di diversi alcoli con varie tipologie di acidi. Di questi esteri, l'acetato di etile è tipicamente presente nella più alta concentrazione (*Olaniran et al., 2016*). Gli esteri hanno aromi riconducibili alla frutta; alcuni di essi, in concentrazioni elevate, possono produrre aromi poco gradevoli. Ad esempio, l'acetato di etile, ad elevate concentrazioni rilascia un aroma che ricorda il solvente. La produzione di esteri viene stimolata dalle alte temperature di fermentazione, in particolare durante i primi giorni di crescita esponenziale delle cellule di lievito, ovvero quando l'attività metabolica risulta essere al picco. La reazione di "esterificazione" è catalizzata da specifici enzimi prodotti dal lievito noti complessivamente come esterasi e può avvenire solo nel corso della fermentazione (*www.fermentobirra.com*). Le concentrazioni di esteri

nelle birre sono meno di 1 ppm per i componenti minori e 10-20 ppm per l'acetato di etile (*Boulton and Quain, 2006*).

<b>ESTERI</b>	<b>CONCENTRAZIONE (ppm)</b>
Etil acetato	8-12
Isobutilacetato	0.03-0.05
Etilbutirrato	0.04-0.06
Acetato di isoamile	1.0-1.5
Etilsesanoato	0.12-0.18

*Tabella 1-Concentrazioni in ppm degli esteri nella birra*

### **1.4.3. COMPOSTI SOLFORATI**

I composti solfurei hanno un peso determinante nel flavour finale. Quelli prodotti dal lievito in misura maggiore durante la fermentazione della birra sono rappresentati dall'anidride solforosa e idrogeno solforato (*Michel et al., 2016*). Come per ogni altro composto, un loro eccesso può compromettere il prodotto finale. I composti solfurei possono derivare dalle materie prime (malto, luppolo etc.), ma anche dall'attività dei lieviti. I composti come l'idrogeno solforato o l'anidride solforosa sono infatti direttamente legati al metabolismo dei lieviti. Sia l'idrogeno solforato che l'anidride solforosa, infatti si originano durante la sintesi degli amminoacidi contenenti zolfo (cisteina e metionina) partendo dal solfato. L'anidride solforosa svolge un ruolo importante nella stabilità degli aromi, principalmente agendo come antiossidante nella birra finita per aumentare considerevolmente la sua conservazione, ma ad alte concentrazioni può impartire odori sgradevoli (*Vanderhaegen et al., 2003*). Il ceppo di lievito e le condizioni di fermentazione producono quantità diverse di composti solforati. Normalmente, la maggior parte dell' $H_2S$  formato durante la fermentazione viene eliminato dalla birra attraverso lo sviluppo di anidride carbonica. Tuttavia, un lievito di scarsa

qualità può portare a fermentazioni meno vigorose e dunque ad una birra contenente H<sub>2</sub>S residuo (*Ferreira and Guido, 2018*). Un altro composto responsabile dell'aroma della birra è il DMS (dimetilsofuro), considerato un composto essenziale nelle birre lager, ma a concentrazioni elevate, va ad apportare un aroma sgradevole. Le due vie principali che portano alla formazione del DMS nella birra sono:

-la degradazione termica della S-metilmetionina (SMM) durante l'essiccazione in forno del malto e le fasi calde del processo di birrificazione;

-in secondo luogo, la riduzione del dimetilsolfossido (DMSO) da parte dei lieviti durante la fermentazione. Il DMS è volatile e in parte viene perso durante l'ammestamento e l'ebollizione del mosto. Tuttavia, il DMSO è stabile al calore e rimane invariato durante queste fasi (*Briggs et al, 2004*).

#### **1.4.4 ACIDI ORGANICI**

Un altro gruppo di composti riscontrati all'interno della birra è rappresentato dagli acidi organici. Tali composti vengono rilasciati nel mosto, in particolar modo durante la fase di ammostamento. Questi composti influiscono sull'acidità/pH e sul gusto della birra (acidità, asprezza, acidità) e hanno effetti fisiologici positivi (diuretico, riduzione dell'acido urico) (*Montanari et al., 1999*). Esistono molte classi di acidi organici, ma quelli prevalentemente riscontrati nella birra si suddividono in acidi lipidici, detti più comunemente acidi grassi (acido butirrico, caprilico etc.), acidi carbossilici o insaturi (acido acetico, acido citrico etc.) e acidi idrossiacidi (acido lattico). La maggior parte di questi acidi sono essenziali per la salute delle cellule di lievito. L'apporto di acidi grassi nella birra è dovuto, principalmente, alla presenza dell'orzo, poi ai lieviti e, in quantità minori, ai luppoli.

Uno degli acidi organici maggiormente presente nel mosto, è l'acido linoleico. La sua ossidazione genera un composto precursore che, una volta sintetizzato dai lieviti, darà vita ad una aldeide, la cui soglia percettiva è tra le più basse in assoluto. Apporta il caratteristico odore di cartone bagnato che, risulta essere indubbiamente percettibile.

### **1.4.5 MONOTERPENI**

Per i produttori di birra che desiderano conferire alla loro birra degli aromi fruttati, i monoterpeni risultano essere fondamentali, inoltre, risultano essere anche molto resistenti al processo di birrificazione. Sono sostanze altamente solubili che derivano dalle piante e contribuiscono notevolmente agli aromi della birra. I più noti sono il linalolo e il geraniolo. Il geraniolo sembra aumentare significativamente il profilo aromatico della birra, ha un profilo molto floreale con note di agrumi. Sebbene il geraniolo possa sopravvivere all'intero processo di fermentazione, è stato dimostrato che durante la fermentazione si converte in  $\beta$ -citronello, accentuando note di lime. Il lievito è capace di trasformare questi composti portando alla formazione di altri alcoli monoterpenici, i quali a fine fermentazione possono determinare una variazione del sapore del luppolo (*Michel et al., 2016*).

### **1.4.6 COMPOSTI CARBONILICI**

I principali composti carbonilici indesiderati nella birra sono rappresentati dall'acetaldeide e dall'acetile. La formazione di acetaldeide nella birra avviene all'inizio e a metà della fermentazione. Più tardi, nella fase stazionaria, i livelli di acetaldeide di solito diminuiscono (*Boulton and Quain, 2006*). L'acetaldeide ha una soglia di 10-20 mg/L e la sua presenza nella birra al di sopra del valore di soglia

provoca degli off-flavour "erbosi" (*Olaniran et al., 2016*). Tuttavia, molti degustatori possono rilevare questo composto a livelli molto più bassi (*Olaniran et al., 2016*). Il diacetile ha un valore soglia pari a 0,1-0,15mg/L, oltre il quale conferisce alla birra un sapore di burro (*Michel et al., 2016*).

#### **1.4.7 I SOTTOPRODOTTI INAMBITO BRASSICOLO**

I birrifici producono svariati sottoprodotti come acqua, trebbie, luppolo esausto e lievito. Considerando la produzione industriale di birra, questi sottoprodotti durante l'anno vengono prodotti in quantità piuttosto rilevanti. Ogni anno, infatti, nel mondo sono prodotti circa 2 miliardi di ettolitri di birra e per ogni ettolitro di birra prodotta, sono generati 20 kg di trebbie, per un totale di 39 milioni di tonnellate annui. In virtù delle loro composizioni chimiche, tali prodotti rappresentano una grande risorsa. Infatti, sempre più frequentemente ormai, si cerca di rendere sostenibili tutti gli sprechi e gli scarti alimentari e la ricerca mostra un interesse e un'attenzione particolare nella valorizzazione di questi sottoprodotti. Le trebbie esauste o Brewers' spent grain (BSG) rappresentano il sottoprodotto più abbondante del processo di produzione della birra (*Kunze et al., 2004*) e sono costituite dagli strati esterni della cariosside di malto d'orzo separati dal mosto durante le fasi di produzione della birra. La loro composizione è piuttosto eterogenea, sono composte prevalentemente da fibre, proteine e composti fenolici.





*Fig. 5-Trebbie di birre essicata*

*Fonte:( <https://terraevita.edagricole.it>)*

Grazie alla ricchezza delle componenti di cui sono costituite, nell'ultimo decennio sono stati effettuati una serie di tentativi allo scopo di incorporare le trebbie come alimento funzionale. L'attività di ricerca svolta nei laboratori dell'Agenzia Veneta per l'Innovazione nel settore primario (*Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari di Thiene, VI*) è stata inserita nel contesto di valorizzare le trebbie come integrazione nei prodotti da forno, chiaramente previa fermentazione da parte di ceppi selezionati di batteri lattici. Grazie all'alto contenuto proteico (circa il 20% della sostanza secca), i grani esausti sono una buona fonte di proteine vegetali da usare nell'industria alimentare e rappresentano una fonte di fibre a basso costo, che può fornire una serie di vantaggi se incorporata nella dieta umana, come ad esempio la prevenzione di alcune malattie, tra cui: disturbi gastrointestinali, diabete e malattie coronariche (*Gupta et al, 2010, Jackowski et al, 2020*).

Sono stati condotti anche diversi studi con l'obiettivo di utilizzare i grani esausti, molto umidi, come substrato per la coltivazione di microrganismi, tra cui le specie

di funghi *Pleurotus*, *Agrocybe*, *Lentinus*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, i quali possono utilizzare gli zuccheri fermentabili ancora presenti (Mussatto, 2009). Infine, un'altra applicazione su cui si sta concentrando la ricerca è l'utilizzo dei grani esausti come materiale da costruzione, di riempimento e come materiale di rinforzo (Jackowski et al, 2020).

Un altro sottoprodotto del mondo brassicolo è rappresentato dalle cellule di lievito esausto. Diverse ricerche hanno evidenziato come gli estratti di luppolo esausto possono apportare effetti positivi per quanto concerne la salute umana, in particolare sembrano aver migliorato l'attività anticoagulante delle cellule endoteliali umane, riducendo in maniera significativa la reattività piastrinica (Mussatto, 2009; Karlovic et al, 2020). Inoltre, la composizione nutrizionale, l'attività antiossidante e il profilo dei composti fenolici di estratti di lievito di birra esausti e la rimozione delle pareti cellulari hanno dimostrato che questo estratto di lievito risulta essere un potenziale ingrediente da utilizzare nella formulazione di alimenti funzionali e nutraceutici (Vieira et al., 2016). Il lievito essiccato trova applicazione anche nella produzione di integratori alimentari e di alimenti nutraceutici, grazie alle sue proprietà antiossidanti, dovute alla presenza di un alto livello di composti polifenolici; è anche una buona fonte di glutatone, un composto antiossidante, che, come la cisteina, può essere usato come agente riducente nella produzione di pasta per il pane (Jaeger et al, 2020).

Il luppolo esausto è un altro materiale di scarto, la cui fibra grezza è costituita da numerosi zuccheri, con una particolare abbondanza in glucosio e xilosio. Gli acidi carbossilici alifatici nel luppolo esausto includono invece acido ossalico, gluconico, treonico, lattico e acetico (Fischer and Bipp 2005). Se ottenuto separatamente dai

grani esausti, un'alternativa per lo smaltimento del luppolo esausto è come pacciamme o come fertilizzante, a causa dell'alto contenuto di azoto (*Huige, 2006*). Dal luppolo esausto si possono recuperare anche diversi composti di interesse industriale come aromi, resine e pectine. Esso è inoltre una ricca fonte di oli essenziali, che, isolati con distillazione a vapore, possono essere adoperati come insetticidi biologici (*Mussatto,2009; Karlovic et al, 2020*).

## ***1.5 BIRRE INNOVATIVE***

Il mercato brassicolo è costantemente alla ricerca di nuovi prodotti che soddisfino le esigenze dei consumatori. Per tale ragione, sul mercato si stanno affacciando le cosiddette “birre innovative” o “birre speciali”, rappresentate da:

- birre a basso contenuto calorico;
- birre a bassa gradazione alcolica e analcoliche;
- birre senza glutine.

### **1.5.1. BIRRE A BASSO CONTENUTO CALORICO**

L'evoluzione della produzione di birre a basso contenuto calorico da parte dell'industria brassicola, è nata da un'esigenza da parte dei consumatori, che sembrano dirigersi prevalentemente verso alimenti e bevande con effetti benefici sulla salute, ovvero, verso cibi e bevande caratterizzati da un basso indice calorico. Nel mosto sono contenuti zuccheri fermentabili come glucosio, maltosio e maltotriosio e zuccheri non fermentabili, come le destrine. Per tale ragione durante la fase di ammostamento, si potrebbero aggiungere enzimi come gluco-amilasi e

destrinasi al mosto, che cooperano con gli enzimi  $\alpha$ -amilasi e  $\beta$ -amilasi formando zuccheri liberi che possono essere fermentati nel corso della fermentazione primaria. Un'ulteriore utilità di queste birre a basso contenuto di carboidrati e zuccheri è quella di soddisfare le esigenze delle persone affette da diabete. In questo modo anche loro potranno godere del gusto e dell'aroma della birra, evitando i possibili inconvenienti. Una birra tradizionale presenta un contenuto energetico totale di circa 50 calorie, al contrario, una birra chiara senza zuccheri presenta meno di 40 calorie per 100 ml. Tuttavia, la produzione di birre a basso contenuto alcolico comporta anche delle variazioni sfavorevoli per quanto riguarda il sapore e il colore della birra, ovvero, queste birre comportano una riduzione dell'amarezza.

### **1.5.2. BIRRE A BASSO CONTENUTO DI ALCOL E ANALCOLICHE**

I consumatori di birra abituali, ma anche quelli occasionali, mostrano una crescente attenzione e preoccupazione per la propria salute. Questa scrupolosa attenzione sta spingendo l'industria birraia verso la produzione di birre a basso contenuto alcolico o analcoliche che gli ha portati ad una notevole evoluzione nel corso degli anni. Infatti, l'accoglienza positiva dei consumatori e del settore birraio ha spinto ulteriormente l'evoluzione delle birre analcoliche. Queste birre stanno diventando una scelta consapevole per i consumatori che vogliono mantenere uno stile di vita sano, senza necessariamente rinunciare ad una birra di qualità. Per l'ottenimento di tali birre si può ricorrere sia a metodi fisici che biologici. I metodi fisici prevedono l'eliminazione dell'alcol nelle birre finite mediante processi termici o mediante

membrane, mentre i processi biologici consistono nell'aggiunta di lieviti non-convenzionali o geneticamente modificati.

### **1.5.3. BIRRA SENZA GLUTINE**

La richiesta di produzione delle birre senza glutine ha mostrato una grande crescita. Il motivo, quasi sicuramente, è dovuto agli aumenti di casi di celiachia, ossia alla sensibilità al glutine contenuto nell'orzo, nella segale e nel frumento e agli incrementi delle intolleranze da parte dei consumatori. Questi cereali appena citati rappresentano i costituenti principali nella realizzazione della birra, ma per tale ragione, diversi birrai utilizzano cereali privi o a basso contenuto di glutine. Le birre classiche presentano all'interno una quantità di glutine superiore al limite tollerato dai celiaci, circa 20 mg /L. Oltre ad utilizzare cereali alternativi (avena, mais e sorgo), le concentrazioni di glutine potrebbero essere ridotte mediante precipitazioni durante la fermentazione. Le principali varianti senza glutine che possiamo trovare sul mercato sono: le golden ale, Blanche e le birre al riso.

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

L'obiettivo dei produttori di birra è quello di poter offrire al consumatore un prodotto artigianale realizzato per lo più con metodi sostenibili, quindi, caratterizzato da un basso impatto ambientale. Nel mondo brassicolo, l'impegno crescente verso la sostenibilità ambientale ha permesso una maggiore valorizzazione dei prodotti di scarto, quindi, tende a valorizzare il recupero dei sottoprodotti della lavorazione della birra ovvero, trebbie, luppolo e lievito esausto. Il principale sottoprodotto di scarto dell'industria birraia è rappresentato dalle trebbie, le quali grazie alla loro composizione diversificata di fibre, proteine, aminoacidi essenziali e vitamine, risultano avere un valore decisamente importante a livello artigianale. Da anni ormai, si sta cercando di sfruttare questo sottoprodotto anche come alimento funzionale. Le trebbie sono caratterizzate da un tasso di umidità elevato e dalla presenza di zuccheri residui, che riducono la conservabilità del prodotto finito.

Effettuando dei lavaggi su queste trebbie, si ha la possibilità di ottenere trebbie esauste con un minor contenuto di zuccheri residui. In questo studio è stata utilizzata come materia prima l'acqua di lavaggio delle trebbie, proveniente dall'ammestamento di un mosto Pils , da impiegare come substrato di fermentazione di lieviti appartenenti a diverse specie non-*Saccharomyces*. Lo scopo di tale studio sperimentale è quello di valorizzare un sottoprodotto derivante da produzione di birra artigianale, ottenendo dei prodotti a bassa gradazione alcolica e con un profilo sensoriale complesso e particolare, valutando le loro prestazioni di fermentazione, il profilo analitico e volatile.

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

### **3.1. CEPPI DI LIEVITO**

I ceppi di lievito utilizzati durante la prova provengono dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DISVA) e sono riportati all'interno della tabella (tab.2).

<b>GENERE E SPECIE</b>	<b>PROVENIENZA</b>	<b>CODICE</b>
<i>L. thermotollerans</i>	DVBVPG	101
<i>k. unispora</i>	Madri Acide	M3B3
<i>M.carribbica</i>	Intestino delle api	18
<i>M.carribbica</i>	Intestino delle api	26
<i>M.carribbica</i>	Intestino delle api	58
<i>M.carribbica</i>	Intestino delle api	95
<i>M. guillermondi</i>	Intestino delle api	51
<i>M.guillermondi</i>	Intestino delle api	85
<i>M.guillermondi</i>	Intestino delle api	112
<i>S. cerevisiae</i>	Cantina Giulia	2PV
<i>S. cerevisiae</i>	Fermentis, Lesaffre, France.	US-05

*Tabella 2- Ceppi utilizzati nello studio*

Il ceppo di controllo utilizzato è *S. cerevisiae* US-05. I ceppi sono stati poi rinfrescati su terreno YPD agar (10 g/l di estratto di lievito, 20 g/l di peptone, 20g/l di glucosio e 18g/l agar) e conservati alla temperatura di 4°C.

### **3.2 ACQUA DI LAVAGGIO DELLE TREBBIE**

In questo studio, per l'avvio delle fermentazioni è stata impiegata l'acqua di lavaggio delle trebbie provenienti da mosto PILS, preparato presso Birra dell'Eremo (Assisi, Italia).

L'acqua di lavaggio delle trebbie è stata ottenuta al termine della fase di ammostamento, quando il mosto è stato allontanato dalla parte solida ovvero dalle scorze di malto macinato, per poter essere convogliato nella caldaia di bollitura. Il processo di trasferimento ha previsto due fasi: durante la prima fase il mosto è stato reso limpido attraverso un letto filtrante costituito dalle trebbie stesse, mentre successivamente è stata eseguita la seconda fase, ossia il lavaggio delle trebbie, utilizzando acqua calda (75-78 °C). Questa seconda fase ha lo scopo di promuovere l'estrazione dello zucchero residuo presente sui grani. Il lavaggio deve essere interrotto quando la densità del mosto raggiunge 1-2°P, per evitare di estrarre dalle trebbie anche sostanze non desiderate, ad esempio i tannini, la cui presenza provoca astringenza.

In particolare, le trebbie utilizzate hanno subito 3 lavaggi; con il primo lavaggio si è raggiunta una densità di gradi Plato 4,3 °P, con il secondo lavaggio 4 °P e con il lavaggio finale 1.6 °P. Al termine di questi lavaggi si procede all'unione delle trebeute per poter procedere alla determinazione degli zuccheri (glucosio, saccarosio e maltosio) presenti all'interno del substrato di partenza attraverso l'uso di un Kit Magazyme.



### 3.3. ALLESTIMENTO DELLE FERMENTAZIONI

Le micro-fermentazioni sono state condotte alla temperatura di 18-20 °C all'interno di beute da 500 ml (Fig.6) provviste di valvole di Muller, al cui interno è stato inserito metabisolfito in modo tale da consentire la fuoriuscita di CO<sub>2</sub>, evitando la contaminazione del sistema. Le pre-culture sono state allestite con estratto di malto al 10% ed incubate per 48 ore a 20 °C. Subito 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<sup>6</sup> cellule/mL. Le beute così inoculate sono state fatte fermentare alla temperatura di 18-20 °C per 22 giorni, registrando quotidianamente la diminuzione di peso dovuta alla perdita di CO<sub>2</sub>, fino all'ottenimento di un valore costante per 3 giorni consecutivi, indice che la fermentazione sia giunta al termine.



*Fig.6- Allestimento delle microfermentazioni.*

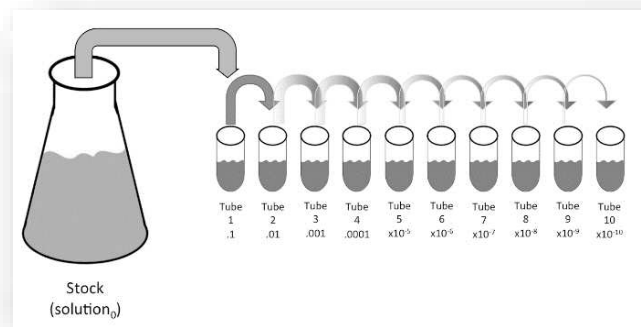
### **3.4. RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA**

Al termine del periodo di sosta a 4°C le birre sono state sottoposte a rifermentazione in bottiglia ad opera dei lieviti residui ed ancora vitali. Questo viene reso possibile aggiungendo alla birra 1.5 g/L di saccarosio durante la fase di imbottigliamento della stessa, Le bottiglie sigillate con appositi tappi, sono state mantenute a 18-20°C per circa 7-10 giorni, infine stoccate a 4°C. Gli effetti della rifermentazione in bottiglia si ripercuotono su molti aspetti della birra. Se eseguita in maniera corretta, comporta dei vantaggi: favorisce la formazione e persistenza della schiuma; lo sviluppo di un profilo aromatico più complesso e una shelf- life maggiore.

### **3.5. ANALISI MICROBIOLOGICHE**

#### **3.5.1. MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI**

Il monitoraggio della fermentazione è stato eseguito per via gravimetrica valutando giornalmente la perdita di peso, espressa come grammi di CO<sub>2</sub> svolta, fino al suo termine. La quantità di CO<sub>2</sub> prodotta è stata usata per valutare l'attività fermentativa. Nella prova di microfermentazione l'inoculo effettuato, corrispondente a 10<sup>6</sup> cell/mL, è stato accertato mediante conte alla camera di Thoma. L'inoculo effettuato, corrispondente a 10<sup>6</sup> cell/mL, è stato verificato in attraverso le conte vitali su piastra. Per poter effettuare le conte vitali sono state eseguite delle diluizioni seriali (figura 7).



*Fig.7- Diluizioni seriali*

È stato prelevato 1 ml dal campione originario ed è stato posto in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile, ottenendo una diluizione 1/10 ( $10^{-1}$ ). Dopo aver agitato mediante ausilio di un vortex, è stato prelevato da questa 1 ml e posto in un'altra provetta sempre contenente 9 ml di acqua sterile. Si è proceduto così fino alla diluizione  $10^{-5}$ . Successivamente sono stati trasferiti 100  $\mu$ l di ogni sospensione sulle piastre Petri, precedentemente preparate con il terreno adeguato e piastrati su YPD Agar. Quindi, con una bacchetta di vetro ad "L", dopo essere stata immersa in alcool, fatta passare alla fiamma, raffreddata sul bordo della piastra, è stato effettuato lo spatolamento di 100  $\mu$ l di sospensione. Le piastre sono state messe ad incubare a 25°C per due o tre giorni. Terminato il periodo di incubazione sono state contate le colonie cresciute.

### **3.5.2. TERRENO YPD AGAR**

Il terreno YPD AGAR (Yeast Extract–Peptone–Dextrose Broth) è un terreno liquido non selettivo impiegato frequentemente nei laboratori di microbiologia per la crescita e la propagazione di vari tipi diversi di lievito quando si vuole realizzare una coltura in sospensione.

Il terreno presenta la composizione seguente:

- estratto di lievito;
- peptone;
- D-glucosio;
- Estratto di malto;
- Acqua deionizzata.

Rappresenta quindi un terreno ideale che consente di allestire, in tempi brevi, una coltura di lieviti che abbia condizioni di crescita idonee.

Questo terreno di coltura una volta preparato, viene sterilizzato in autoclave. La soluzione che si ottiene deve risultare all'occhio limpida ed omogenea, come quella riportata nella fig.8. Non devono essere presenti degli aggregati particellari.



*Figura 8- Esempio di colorazione assunta dal terreno YPD al termine della sua preparazione.*

*Fonte: Microbiologiaitalia.it*

## **3.6. ANALISI CHIMICHE**

### **3.6.1. ANALISI COMPONENTE VOLATILE**

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

L'analisi è stata svolta come riportato di seguito:

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

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

Le condizioni operative sono state le seguenti:

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

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

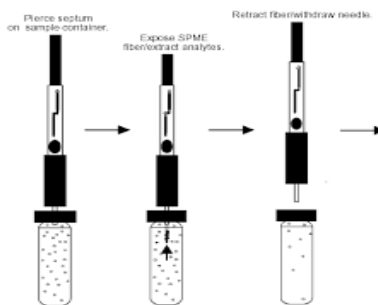


Fig.8

*Fonte: [www.puccini.chimica.it](http://www.puccini.chimica.it)*

### 3.6.2. DETERMINAZIONE DELL'ETANOLO

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

Il protocollo seguito è il seguente:

- temperatura dell'iniettore: 150°C;
- colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25µm);
- iniettore: split 10:2; iniettato 1 µl;

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

- gas vettore: Azoto.

### **3.6.3. DETERMINAZIONE ALCOLI SUPERIORI**

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

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

Ogni picco, relativo allo specifico composto, ne permette l'identificazione sulla base del tempo impiegato per arrivare al rilevatore.

### **3.6.4.DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RESIDUI**

Per la determinazione degli zuccheri residui (maltosio, saccarosio e glucosio) a fine fermentazione, è stato impiegato il kit Magazyme che nello specifico contiene:

- Bottiglia 1: Buffer (25 ml, pH 7.6), azoturo di sodio (0.02% w/v);
- Bottiglia 2: NADP<sup>+</sup> + 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 effettua l'analisi seguendo il protocollo riportato nella tabella sottostante.



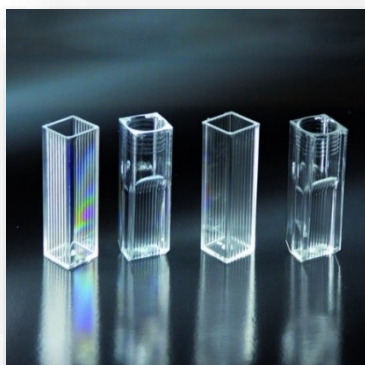
<b>Pipettare in cuvetta</b>	<b>Bianco Saccarosio + D-Glucosio</b>	<b>Campione Saccarosio + D-Glucosio</b>	<b>Bianco D-Glucosio</b>	<b>Campione D-Glucosio</b>
<b>Soluzione 4 (<math>\beta</math>-fruttosidasi)</b>	0,20 ml	0.20 ml		
<b>Campione</b>		0.10 ml		0.10 ml
Incubare per 20 minuti, poi aggiungere:				
<b>Acqua distillata</b>	2.10ml	2.00ml	2.30ml	2.30ml
<b>Soluzione1 (Buffer)</b>	0.20ml	0.20ml	0.20ml	0.20ml
<b>Soluzione2 (NADP/ATP)</b>	0.10ml	0.10ml	0.10ml	0.10ml
Leggere l'assorbanza A1 delle soluzioni a 340 nm dopo circa 3 minuti e aggiungere:				
<b>Sospensione 3 (HK/G6P-DH)</b>	0.02ml	0.02ml	0.02ml	0.02ml
Leggere l'assorbanza (A2) delle soluzioni a 340 nm dopo 5 minuti.				

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

### **3.6.5. ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE**

Per la valutazione dell'attività antiossidante si è utilizzato il protocollo con il DPPH, radicale 1,1-difenile-2-picrididrazyl (SIGMA). La prova permette di determinare il potere antiossidante facendo reagire il campione da analizzare con una soluzione di DPPH ed analizzando all'UV la diminuzione del picco a 517 del radicale. Nel dettaglio, per ogni campione si allestisce un doppio prelevando 800  $\mu$ l di matrice e 1 ml di DPPH. Si procede con il bianco costituito da 1ml di DPPH

e 800  $\mu$ l di acqua deionizzata. I campioni successivamente vengono introdotti nel vortex per ottenere una miscelazione omogenea, poi vengono incubati per 30 minuti. Si centrifugano i campioni a 12000 rpm per 5 minuti e poi si misura l'assorbanza a 517 nm prelevando 1 ml di surnatante, inserendolo in apposite cuvette (fig.9). I composti antiossidanti (AOH) che sono capaci di trasferire un atomo di idrogeno al radicale, causano una decolorazione della soluzione. Si analizza quindi all'UV-Vis la diminuzione del picco a 517 nm del radicale (DPPH) dopo un tempo di incubazione prestabilito. Questa diminuzione è proporzionale alla carica antiossidante presente all'interno del campione analizzato.



*Figura 9-Esempi di cuvette utilizzate per la misura dell'assorbanza.*

## ***CAPITOLO 4 -RISULTATI***

### **4.1. VALUTAZIONE DELL'ATTITUDINE FERMENTATIVA**

L'attitudine fermentativa dei campioni sottoposti in esame è stata valutata attraverso il monitoraggio della perdita di peso giornaliera, ovvero della quantità di CO<sub>2</sub> svolta. I lieviti scelti per un potenziale impiego nella produzione di bevande a bassa gradazione alcolica, mediante l'utilizzo di acque di lavaggio delle trebbie, hanno mostrato la seguente cinetica fermentativa, riportata in figura 9.

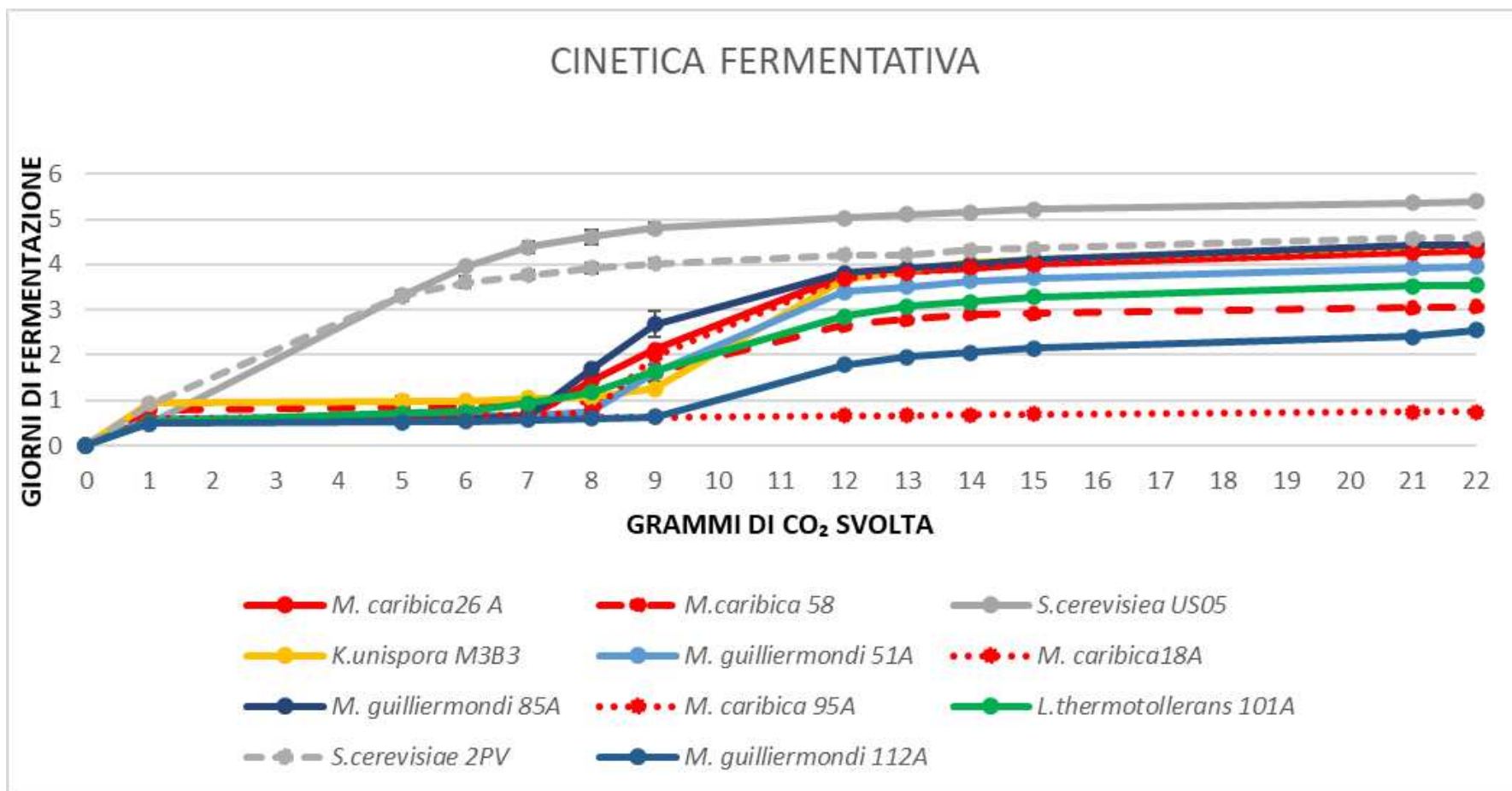


Fig.9-Cinetica fermentativa di colture pure di non-Saccharomyces e del ceppo di controllo *S. cerevisiae* US-05 in acque di lavaggio delle trebbie tal quali.

Dai risultati riportati in figura 9 emerge che l'andamento fermentativo più alto e rapido è stato ottenuto nella prova condotta con lo starter commerciale *S.cerevisiae* US-05 con 5.47 g di CO<sub>2</sub> svolta, seguita da *S.cerevisiae* 2PV con un andamento molto simile allo starter, riportando 4.71g di CO<sub>2</sub> svolta.

Come atteso, gli altri ceppi non-*Saccharomyces* hanno mostrato un andamento fermentativo più lento durante i primi 7 giorni, mentre a partire dall'ottavo giorno si è manifestato un incremento della velocità di fermentazione. Per quanto riguarda la specie *M. caribica* si evince che i ceppi mostrano una variabilità intraspecifica, in quanto la CO<sub>2</sub> è molto variabile, con il ceppo *M.caribbica* 18 che ha mostrato un andamento fermentativo più basso con 0.85 g di CO<sub>2</sub> finale svolta. Lo stesso vale anche per la specie *M.guillermonti*.

Dopo 22 giorni di fermentazione, le prove sono state interrotte ed il prodotto ottenuto è stato imbottigliato e lasciato rifermentare in bottiglia a 20 °C per 7-10 giorni.

## 4.2. PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

Il mosto utilizzato come substrato di partenza deriva dall'unione di tre acque di lavaggio delle trebbie, le quali sono state saggiate con lo scopo di analizzare i principali zuccheri presenti. Nella tabella sottostante, sono riportati i dati relativi alle analisi.

ACQUE DI LAVAGGIO	GLUCOSIO	SACCAROSIO	MALTOSIO
Primo lavaggio 4.3 °P	2.73 g/L	1.63 g/L	14.76 g/L
Secondo lavaggio 4 °P	1.12 g/L	4.62 g/L	11.49 g/L
Terzo lavaggio 1.6 °P	0.41 g/L	1.42 g/L	6.94 g/L
Acque unite	0.67 g/L	3.84 g/L	4.66 g/L

*Tabella n.4-Profilo analitico delle acque di lavaggio delle trebbie.*

I risultati relativi al profilo analitico delle birre ottenute sono riportati nella *Tabella n.5*. L'analisi svolta riguarda la quantità di zuccheri residui nelle fermentazioni, in particolare dei principali zuccheri, cioè, glucosio, maltosio e saccarosio. La capacità di fermentare il maltosio è risultata variabile tra i diversi ceppi di lievito. I ceppi che ha evidenziato un più alto vigore fermentativo sono quelli che hanno evidenziato un più basso contenuto di maltosio residuo come mostrato dallo starter *S.cerevisiae* US-05. Invece, la birra che ha mostrato un contenuto residuo di maltosio più alto e significativo è stata quella condotta con il lievito *M. caribbica* 18 dove si è riscontrato un valore di 4.00 g/L, in accordo con la bassa capacità fermentativa. Questi risultati appena descritti sono coerenti con l'analisi statistica.

<b>CEPPI</b>	<b>GLUCOSIO g/L</b>	<b>SACCAROSIO g/L</b>	<b>MALTOSIO g/L</b>
<i>M.caribbica</i> <b>26</b>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,54 ± 0,43 <sup>b</sup>
<i>M.caribbica</i> <b>58</b>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,45 ± 0,18 <sup>bc</sup>
<i>M.caribbica</i> <b>18</b>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	3.03 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.02 <sup>a</sup>
<i>M.caribbica</i> <b>95</b>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	1,34± 0.30 <sup>bc</sup>
<i>M.guillermondi</i> <b>51</b>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.17 <sup>bc</sup>
<i>M.guillermondi</i> <b>85</b>	0.04 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.08 <sup>b</sup>
<i>M.guillermondi</i> <b>112</b>	0.00± 0.00 <sup>d</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.19 <sup>c</sup>
<i>L.thermotollerans</i> <b>101</b>	0.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.06 <sup>bc</sup>
<i>S.cerevisiae</i> <b>2PV</b>	0.06 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.07 <sup>bc</sup>
<i>S.cerevisiae</i> <b>US-05</b>	0.00± 0.00 <sup>d</sup>	0.00± 0.00 <sup>b</sup>	0.33± 0.32 <sup>b</sup>
<i>K.unispora</i> <b>M3B3</b>	0.00± 0.00 <sup>d</sup>	0.00± 0.00 <sup>b</sup>	1.28±0.06 <sup>bc</sup>

Tabella 5-Profilo analitico delle birre ottenute con lieviti non-Saccharomyces e *S.cerevisiae* US-05.

Per quanto riguarda, invece, il contenuto di etanolo (tabella n.6 ) dei prodotti ottenuti con questo substrato, risulta essere in linea con l'andamento fermentativo

registrato: tutti i campioni analizzati sono caratterizzati da una bassa gradazione alcolica. Dall'analisi statistica, infatti, non ci sono state differenze significative tra i diversi ceppi. Le birre prodotte hanno mostrato valori che rientrano nella definizione di legge che per le no-alcohol ammettono valori tra 0%v/v-0.5%v/v e per le low alcohol 0.5%v/v a 1.2 %v/v.

<b>CEPPI</b>	<b>ETANOLI (v/v%)</b>
<b>M.caribica 18</b>	0.00±0.00
<i>M.caribbica 26</i>	0.10±0.49 <sup>a</sup>
<i>M.caribbica 58</i>	0.07±0.36 <sup>a</sup>
<i>M.caribbica 95</i>	0.10±6.04 <sup>a</sup>
<i>M.guillermondi 51</i>	0.09±0.38 <sup>a</sup>
<i>M.guillermondi 85</i>	0.08±0.29 <sup>a</sup>
<i>M.guillermondi 112</i>	0.11±1.11 <sup>a</sup>
<i>L.thermotollerans 101</i>	0.01±0.20 <sup>a</sup>
<i>S.cerevisiae</i> <i>2PV</i>	0.05±7.04 <sup>a</sup>
<i>S.cerevisiae</i> <i>US-05</i>	0.11±0.48 <sup>a</sup>
<i>K.unispora M3B3</i>	0.10±0.18 <sup>a</sup>

Tabella 6-Profilo analitico delle birre ottenute con lieviti non-Saccharomyces e *S.cerevisiae* US-05.



### 4.3. CONTE VITALI

Nella tabella sottostante sono riportati i valori inerenti alle conte vitali al momento dell' inoculo (T0), al termine della fermentazione e dopo un periodo di tempo di quattro mesi. Questi dati dimostrano un mantenimento della vitalità per tutti i ceppi intorno a  $10^6$  cell a ml, valore interessante per i ceppi con attitudine probiotica.

<b>Ceppi</b>	<b>Concentrazione cellulare CFU/ml T 0</b>	<b>Concentrazione cellulare CFU/ml T Fine Fermentazione</b>	<b>Concentrazione cellulare CFU/ml T A quattro mesi</b>
<i>L.thermotollerans 101</i>	6.10 ± 0.03	6.78±0.02	6.68±0.01
<i>K.unispora M3B3</i>	5.18±0.02	6.06±0.14	5.97±0.06
<i>M.caribica 26</i>	5.61±0.22	6.26±0.14	6.33±0.01
<i>M.caribica 58</i>	5.32±0.10	6.73±0.02	6.55±0.03
<i>M.caribica 18</i>	4.85±0.003	5.30±0.09	5.33±0.02
<i>M.caribica 95</i>	6.61±0.14	6.75±0.02	6.69±0.01
<i>M.guillermondi 51</i>	6.15±0.03	6.35±0.00	6.22±0.01
<i>M.guillermondi 85</i>	5.30±0.14	6.85±0.77	5.69±0.00
<i>M.guillermondi 112</i>	5.37±0.03	6.65±0.01	6.61±0.01
<i>S.cerevisiae 2PV</i>	5.01±0.003	6.86±0.01	6.77±0.13
<i>S.cerevisiae US-05</i>	5.69±0.48	6.86±0.42	6.77±0.01

Tabella n.7- Conte vitali al tempo zero, a fine fermentazione e dopo quattro mesi.

#### 4.4. PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

I dati relativi ai principali composti secondari delle fermentazioni condotte sulle acque di lavaggio delle trebbie sono riportati all'interno della tabella 6.

CEPPI	ACETALDEIDE (mg/L)	ACETATO (mg/L)	PROPANOLO (mg/L)	ISOBUTANOLO (mg/L)	AMILICO ATTIVO (mg/L)	ISOAMILICO (mg/L)
<i>M.guillermondi</i> 58	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	3.39±0.46 <sup>bc</sup>	10.99 ± 0.14 <sup>c</sup>	6.35 ± 0.70 <sup>bc</sup>	0.40±0.49 <sup>bc</sup>	10.07±2.17 <sup>d</sup>
<i>M.guillermondi</i> 51	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	21.77 ± 0.97 <sup>b</sup>	20.43 ± 1.93 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	62.26±1.82 <sup>b</sup>
<i>M.guillermondi</i> 112	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	12.39 ± 7.78 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	43.05±2.48 <sup>c</sup>
<i>M.guillermondi</i> 85	45.81± 0.90 <sup>a</sup>	3.76±2.41 <sup>bc</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	8.08 ± 2.81 <sup>c</sup>	3.28±2.55 <sup>a</sup>	8.73±0.41 <sup>de</sup>
<i>M.caribica</i> 18	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	12.39 ± 7.78 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
<i>M.caribica</i> 95	9.64 ± 7.73 <sup>bc</sup>	94.00±4.18 <sup>b</sup>	13.09±0.23 <sup>cd</sup>	7.56 ± 1.24 <sup>bc</sup>	0.91±1.06 <sup>bc</sup>	16.95±0.00 <sup>d</sup>
<i>M.caribica</i> 26	15.88± 1.12 <sup>bc</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	16.34 ± 1.31 <sup>bc</sup>	9.24 ± 2.41 <sup>c</sup>	2.49±1.57 <sup>ab</sup>	32.87±2.81 <sup>d</sup>
<i>S.cerevisiae</i> 2PV	19.92 ± 1.30 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	18.96±0.24 <sup>cd</sup>	11.63 ± 2.64 <sup>c</sup>	2.62±0.11 <sup>ab</sup>	34.12±0.37 <sup>d</sup>
<i>L.thermotollerans</i> 101	0.68± 0.97 <sup>c</sup>	4.82±1.22 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0,00±0.00 <sup>c</sup>	10.36±1.09 <sup>d</sup> e
<i>S.cerevisiae</i> US05	86.77±12.00 <sup>a</sup>	23.70±4.05 <sup>a</sup>	32.71±2.23 <sup>a</sup>	31.19±4.,87 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	83.01±7.45 <sup>a</sup>
<i>K.unispora</i> M3B3	1,814±2.511 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	5.755±8.11 <sup>d</sup>	6.165±0.48 <sup>bc</sup>	0.556±0.55 <sup>b</sup> c	6.09±8.61 <sup>e</sup>

Tabella 6: Profilo analitico delle birre ottenute mediante lieviti non *Saccharomyces* e *S.cerevisiae* US-05 (controllo). I dati riportati in tabella sono i valori medi ± deviazione standard.

Analizzando nel dettaglio i dati all'interno della tabella 6 è significativo notare che, sebbene nello studio siano stati utilizzati ceppi appartenenti alla stessa specie, queste possono differire tra loro in termini di risultati.

Per quanto riguarda i lieviti appartenenti a *M.guilliermondi*, l'unica specie ad aver riportato un valore significativo per il contenuto di amilico attivo (che apporta una nota fruttata) e di acetaldeide (composto che conferisce un'aroma riconducibile alla mela verde) è stata *M.guilliermondi* 85. Invece, bassi contenuti di acetaldeide sono stati osservati nelle fermentazioni condotte con i lieviti *L.thermotollerans*, paragonabili ai ceppi *M.guilliermondi* 58, *M.guilliermondi* 51 e *M.guilliermondi* 112 (0.00mg/L).

All'interno della specie *M.caribica*, l'unico lievito a mostrare una rilevante quantità di acetato è *M.caribica* 95 con un valore di 94.00 mg/L.

La prova condotta con *K.unispora*, invece, ha riportato i valori significativamente più alti nel contenuto di alcol isoamilico e nel contenuto di isobutanolo (odore di solvente).

Il propanolo che conferisce una nota di durezza, invece, è stato rilevato in quantità maggiore in *S.cerevisiae* US05, seguito da *M.guilliermondi* 51. È risultato assente nei ceppi *M.caribica* 18, *M.guilliermondi* 112 e *L.thermotollerans* 101 (basso fermentanti).

## 4.5. PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

Le concentrazioni dei principali composti volatili sono riportate in Tabella n.7.

Analizzando i dati riportati in tabella 7, si osserva che i valori maggiormente rilevanti sono stati ottenuti per il composto acetato di isoamile, responsabile dell'aroma fruttato (banana), con le concentrazioni più significativamente più alte che state osservate nelle prove ottenute con *K.unispora* M3B3 dove ha raggiunto 1,30 mg/L e con *L.thermotollerans* 101 con 0.5 mg/L.

L'etilsanoato che conferisce un odore di mela è stato riscontrato in concentrazioni molto basse nella maggior parte dei campioni, con una piccola eccezione su *M.caribbica* 95 e *M.guillermondi* 5, rispettivamente con 0.47 mg/L e 0.40 mg/L.

L'etilettanoato, il linalolo e il dietilsuccinato risultano essere presenti in concentrazioni minime in tutte le prove, generalmente con valori pari a 0.00 mg/L.

La tesi condotta con le specie *M.caribbica* 95 è l'unica ad aver riportato una presenza significativa di esanolo, composto responsabile dell'aroma erbaceo.

Il nerolo, invece, nella prova condotta con *K.unispora* M3B3 e *M. caribbica* 58 ha riportato valori di 0.24 mg/L.

<b>CEPPI</b>	<b>Etilbutirrato (mg/L)</b>	<b>Acetato di isoamile (mg/L)</b>	<b>Etilsanoato (mg/L)</b>	<b>Esilacetato (mg/L)</b>	<b>Esanolo (mg/L)</b>	<b>Etilettanoato (mg/L)</b>	<b>Linalolo (mg/L)</b>
<b><i>L.thermotollerans</i> 101</b>	0.12 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.95 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.002±0.00 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>ab</sup>
<b><i>M.caribbica</i> 95</b>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.40±0.50 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>ab</sup>
<b><i>M.caribbica</i> 18</b>	0.10 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.60 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.005±0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.001±0.00 <sup>a</sup>	0.005 ± 0.00 <sup>ab</sup>
<b><i>M.caribbica</i> 26</b>	0.14 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.39 ± 0.55 <sup>ab</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.002 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.01 <sup>ab</sup>
<b><i>S.cerevisiae</i> US05</b>	0.07 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.47 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.14 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
<b><i>K.unispora</i> M3B3</b>	0.30 ± 0.01 <sup>ab</sup>	1.30 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>
<b><i>M.guillermondi</i> 58</b>	0.16 ± 0.23 <sup>ab</sup>	0.45 ± 0.63 <sup>ab</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.003 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.002 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.005 ± 0.01 <sup>ab</sup>
<b><i>M.guillermondi</i> 112</b>	0.06 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.80 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.14 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.002 ± 0,00 <sup>a</sup>	0.00±0,00 <sup>ab</sup>
<b><i>M.guillermondi</i> 85</b>	0.57 ± 0.64 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.005 ± 0.00 <sup>ab</sup>
<b><i>M.guillermondi</i> 51</b>	0.08 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.75 ± 0.79 <sup>ab</sup>	0.47 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.003 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.002 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.00 <sup>b</sup>
<b><i>S.cerevisiae</i> 2PV</b>	0.11±0.00 <sup>ab</sup>	0.47±0.00 <sup>ab</sup>	0.12±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>ab</sup>

CEPPI	Dietilsuccinato (mg/L)	Fenietilacetato (mg/L)	Nerolo (mg/L)	Geraniolo (mg/L)	βfeniletanolo (mg/L)	β –damascenone (mg/L)
<i>L.thermotollerans</i> 101	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.16±0.02 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.006±0.00 <sup>ab</sup>	0.72±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>M.caribbica</i> 95	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.83±0.02 <sup>b</sup>	0.18±0.04 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	2.56±0.18 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>M.caribbica</i> 18	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>ab</sup>	0.10±0.02 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>M.caribbica</i> 26	0.01±0.10 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.15±0.09 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>ab</sup>	1.38±0.67 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>S.cerevisiae</i> US05	0.00±0.00 <sup>c</sup>	1.17±0.55 <sup>a</sup>	0.03±0.04 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	1.15±0.53 <sup>c</sup>	0.007±0.00 <sup>ab</sup>
<i>K.unispora</i> M3B3	0.02±0.02 <sup>c</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.24±0.09 <sup>a</sup>	0.01±0.01 <sup>ab</sup>	0.06±0.09 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>M.guillermondi</i> 58	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.13±0.10 <sup>b</sup>	0.24±0.10 <sup>a</sup>	0.03±0.02 <sup>a</sup>	0.01±0.01 <sup>c</sup>	0.08±0.10 <sup>a</sup>
<i>M.guillermondi</i> 112	0.02±0.03 <sup>c</sup>	0.22±0.25 <sup>b</sup>	0.08±0.12 <sup>a</sup>	0.01±0.12 <sup>ab</sup>	1.07±0.34 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>M.guillermondi</i> 85	0.07±0.03 <sup>b</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.10±0.14 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>ab</sup>	2.13±0.68 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>ab</sup>
<i>M.guillermondi</i> 51	0.02±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.14±0.20 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	2.63±0.43 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>S.cerevisiae</i> 2PV	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>ab</sup>

Tabella 7-Principali composti volatili nelle birre ottenute dalla fermentazione di ceppi di lieviti non-Saccharomyces e *S. cerevisiae* US-05(controllo). I dati riportati in tabella sono i valori medi ± deviazione standard.

#### 4.6. ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE DELLA MATRICE

L'attività antiossidante è stata testata mediante il saggio con il DPPH , un radicale libero organico che permette di determinare il potenziale di riduzione attraverso il trasferimento di un idrogeno. I campioni di birra sono stati poi letti in doppio e successivamente , viene calcolata la percentuale di inibizione del DPPH. I Valori ottenuti sono riportati nella tabella sottostante.

Campioni	% Attività antiossidante
<i>M.caribica 26</i>	69.26%
<i>M.caribica 58</i>	72.71%
<i>M.caribica 18</i>	62.85%
<i>M.caribica 95</i>	55.17%
<i>M.guillermondi 51</i>	69.06%
<i>M.guillermondi 85</i>	71.25%
<i>M.guillermondi 112</i>	75.51%
<i>L.thermotollerans 101</i>	73.93%
<i>K.unispora M3B3</i>	53.64%
<i>S.cerevisiae 2PV</i>	75.51%
<i>S.cerevisiae US-O5</i>	62.36%

Tabella 8-Attività di inibizione DPPH della matrice di birra.

Dai risultati riportati nella tabella 8, si è riscontrata un' ottima inibizione del radicale da parte di tutte le birre analizzate. In particolar modo *M.guillermondi 112* e

*S.cerevisiae* 2PV hanno riportato una percentuale di inibizione di 75.51%, mentre tutte le altre birre hanno mostrato valori tra il 60-70%.



## ***CAPITOLO 5-DISCUSSIONI E CONCLUSIONI***

Il consumo di birra rientra tra le abitudini di moltissime persone e questo ha comportato conseguentemente un notevole incremento dei birrifici artigianali. Questi birrifici hanno l'obiettivo di soddisfare le aspettative dei consumatori, sempre più attenti al benessere della propria salute. In ambito brassicolo, il riutilizzo delle risorse e delle materie prime risulta essere, ancora oggi, piuttosto carente. Per tale ragione sono state condotte azioni volte ad individuare e proporre soluzioni alternative, sostenibili per il recupero e la valorizzazione delle trebbie, il sottoprodotto principale nella produzione di birra, il cui utilizzo potrebbe costituire un valore economico aggiuntivo per i birrifici (*Amoriello et al., 2016*). Per riuscire a fronteggiare i problemi ambientali, la ricerca si propone di utilizzare processi sostenibili che abbiano uno scarso impatto sull'ambiente. Per tale ragione, nel presente studio è stato valutato il potenziale dei lieviti *non-Saccharomyces* in ambito brassicolo con lo scopo non solo di produrre una birra a basso contenuto alcolico, ma anche di migliorare la qualità della birra stessa, utilizzando un substrato non convenzionale, rappresentato dalle acque di lavaggio delle trebbie. È chiaramente importante selezionare ceppi di lievito, sulla loro capacità di produrre composti aromatici specifici che permetteranno quindi di ottenere birre dalle caratteristiche complesse. Nel dettaglio, in questo studio sono state valutate le differenze tra gli andamenti fermentativi, i principali caratteri analitici e i composti volatili. Per lo svolgimento delle fermentazioni, sono stati impiegati, lo starter commerciale *S.cerevisiae* e diversi lieviti *non-Saccharomyces* (*L.thermotollerans*, *M.caribbica*, *M.guillermondi*, *K.unispora*).

Da questa ricerca è emerso che questo substrato caratterizzato dalle acque di lavaggio rappresenta una strategia valida per ottenere un prodotto a bassa gradazione alcolica. Nell'industria birraia, i lieviti, considerate le innumerevoli variabilità genetiche, rappresentano una fonte di diversificazione del prodotto. Oltre alla scelta del ceppo, anche la scelta e le condizioni in cui si fa lavorare il lievito sono di cruciale importanza al fine di ottenere il risultato desiderato. Alcune birre sono caratterizzate proprio dallo specifico ceppo di lievito adoperato durante il corso della fermentazione e, in alcuni casi anche dalla rifermentazione in bottiglia, processo che conferisce numerose potenzialità da un punto di vista sensoriale.

L'originalità delle birre artigianali, dipende da svariati fattori, ma in primo luogo dalla scelta del lievito per i processi microbiologici che ne conseguiranno. In particolare l'obiettivo del lievito inoculato è quello di poter aumentare l'efficienza della fermentazione, ma anche e soprattutto migliorare la complessità sensoriale della birra finita. Il lievito per eccellenza della birra è il *S.cerevisiae*, ma anche i lieviti non-Saccharomyces si sono dimostrati particolarmente interessanti in questo studio. L'obiettivo del presente progetto di tesi è stato quello di produrre birre artigianali caratterizzate da un basso contenuto di etanolo, utilizzando come substrato di partenza le acque di lavaggio delle trebbie, proveniente dall'ammestamento di un mosto Pils.

Le fermentazioni sono state condotte utilizzando i seguenti lieviti non-convenzionali appartenenti alle specie: *L.thermotollerans*, *M.caribbica*, *M.guillermondi*, *K.unispora* e il ceppo commerciale *S.cerevisiae* (US-O5).

Da tale studio è emerso che i ceppi più promettenti per ottenere sia una significativa riduzione di etanolo nella birra, che per conferire al prodotto composti aromatici distintivi sono state alcune delle fermentazioni ottenute con i lieviti: *S.cerevisiae* 2PV, *M.guillermondi* 85, *M.caribica* 95 e *L.thermotollerans* 101.

La specie *L. thermotolerans* è una specie di lievito che include ceppi con capacità variabile di fermentare il maltosio (Ciani et al, 2019), Inoltre, dalla valutazione dell'etanolo, si evince che i ceppi della specie *L. thermotolerans*, possano essere una strategia valida e promettente per la produzione di birra a ridotta gradazione alcolica.

Le birre ottenute con i lieviti della specie *M.caribica* 18, hanno mostrato invece un'attitudine fermentativa decisamente lenta rispetto allo starter, ma anche rispetto alle altre specie in esame. Questo ha determinato un quantitativo di zuccheri residui, il particolare modo il maltosio e il saccarosio.

Riguardo all'attività antiossidante delle birre testate, i risultati ottenuti risultano essere particolarmente incoraggianti; infatti, in alcuni campioni di birra si è manifestata un'inibizione superiore al 70%.

Tuttavia, saranno necessarie ulteriori indagini per studiare al meglio la produzione di birra artigianale, valutando le capacità metaboliche di questi lieviti, per poter ottimizzare al meglio il processo di fermentazione.

## ***CAPITOLO 7-BIBLIOGRAFIA***

- **Basso RF, Alcarde AR, Portugal CB. (2016).** Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations?
- **Blanco, C.A., Rojas, A., Caballero, P.A., Ronda, F., Gomez, M. & Cabellero, I. (2006).** A better control of beer properties by predicting acidity of hop iso –  $\alpha$  – acids. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 373 – 377.
- **Boulton, C., & Quain, D. (2008).** Brewing yeast and fermentation. John Wiley & Sons.
- **Briggs, D. E., Brookes, P. A., Stevens, R. B. C. A., & Boulton, C. A. (2004).** Brewing: science and practice (Vol. 108). Woodhead Publishing.
- **Buiatti, S. (2004).** “Birra”. In Martelli A., Cabras P. (Ed.), *Chimica degli alimenti*, Padova: Piccin Nuova Libreria S.P.A.
- **Cabras P. & Martelli A. (2004).** *Chimica degli alimenti*. Piccin Editore pp. 557-598.
- **Callejo, M. J., Tesfaye, W., González, M. C., & Morata, A. (2019).** Craft beers: Current situation and future trends. New advances on fermentation processes.
- **Canonico L, Comitini F, Ciani M, (2014)** Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of craft beer refermentation. Institute of Brewing & Distilling.
- **Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016).** *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, 56, 45-51.

- **Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa, A., Siesto, G., Pietrafesa, R., Zambuto, M., & Romano, P. (2018).** Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value added. *International journal of food microbiology*, 284, 22-30.  
Chemistry, Vol. 51, p. 678-679.
- **Ciani M, Canonico L, Comitini F. (2019).** Beer between tradition and innovation.
- **De Keukeleire, D. (2000).** Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica nova*, 23, 108-112.  
during Aging of Top-Fermented Beer". *Journal of Agricultural and Food*
- **Fastigi, M., Esposti, R. & Viganò, E. (2015).** The irresistible rise of the craft brewing sector in Italy: can we explain it Paper prepared for the 4th Aieaa Conference. Ancona.
- **Ferreira, I. M., & Guido, L. F. (2018).** Impact of wort amino acids on beer flavour: A review. *Fermentation*, 4(2), 23.
- **Fischer, K., & Bipp, H. P. (2005).** Generation of organic acids and monosaccharides by hydrolytic and oxidative transformation of food processing residues. *Bioresource technology*, 96(7), 831-842.
- **Giardini L., Baldoni R. (2002).** *Coltivazioni erbacee: cereali e proteaginose*, Bologna, Ed. Patron, 2000.
- **Goerges S, Aigner U, Silakowski B, Scherer S. (2006).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Appl Environ Microbiol* 72(1): 313– 8.

- **Gupta,M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E. (2010).** Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 318-328.
- **Hammond, J. R., van Waesberghe, J. W., & Wheeler, R. E. (2007).** Mashing and Mash -Separation (Manual of Good Practice).
- **Harrison MA (2009).** “Beer/Brewing.” *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd Edition. Elsevier Inc.
- **Hieronimus, S. (2016).** Gli ingredienti della birra: il luppolo: La guida pratica all’aroma e alla cultura del luppolo. Edizioni LSWR.
- **Indrani Bhattacharya, Song Yan, Jay Shankar Singh Yadav, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli (2013).** *Saccharomyces unisporus: Biotechnological Potential and Present Status*.
- **Jackowski, M., Niedźwiecki, L., Jagiello, K., Uchańska, O., & Trusek, A. (2020).** Brewer’s spent grains—Valuable beer industry by-product. *Biomolecules*, 10(12), 1669
- **Jackowski, M., Niedźwiecki, L., Jagiello, K., Uchańska, O., & Trusek, A. (2020).** Brewer’s spent grains—Valuable beer industry by-product. *Biomolecules*, 10(12), 1669.
- **Jaeger, A., Arendt, E. K., Zannini, E., & Sahin, A. W. (2020).** Brewer’s spent yeast (BSY), an underutilized brewing by-product. *Fermentation*, 6(4), 123.
- **Kunze W. (2004).** *Brewing Malting*. Vlb, Berlin.

- **Lodolo E, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M. (2008).** The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Res* 8, 1018-1036.
- **Lowe, D.P. & Arendt, E.K. (2004).** The use and effects of lactic acid
- **Manzano M., Buiatti S.** *La microbiologia applicata nelle industrie alimentari* (2007).
- **Manzoni M (2006).** *Microbiologia industriale*. Editore: Casa Editrice Ambrosiana.
- **Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016).** Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569-587.
- **Montanari L, Floridi S, Marconi O, Tironzelli M, Fanozzi P. (2005).** Effect of mashing procedures on brewing. *European Food Research and Technology*. 1-2 (221), 175-179 (2005).
- **Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., and Fantozzi, P. (1999).** Organic and Phenolic Acids in Beer, *LWT - Food Sci Technol*. 32,535–539.43. Clapperton, J. F. (1978).
- **Mussatto, S. I. (2009).** Biotechnological potential of brewing industry by-products. In *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation* (pp. 313-326). Springer, Dordrecht.
- **O. Olaniran, Lettisha Hiralal, Mduduzi P. Mokoena and Balakrishna Pillay. (2016).** Flavour-active volatile compounds in beer:production, regulation and control.

- **Palmer, John J., and Colin Kaminski. (2013).**Water: A comprehensive guide for brewers. Brewers publications.
- **Pepe C. (2010).** “Caratterizzazione della componente polipeptidica della birra e identificazione di epitopi potenzialmente immunogenici per i pazienti celiaci”.
- **Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., and Vicente, A. A. (2014).** Yeast: The soul of beer’s aroma – A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast.
- **Pokrivčák, J., Supekova, S. C., Lančarič, D., Savov, R., Toth, M., & Vašina, R. (2019).** Development of beer industry and craft beer expansion. Journal of Food & Nutrition Research, 58(1).
- **Sicheri Giuseppe (1983).** Industrie agrarie e agroalimentari enologica lattiero-casearia olearia conserviera volume in esaurimento.
- **Smith BD, (2016).** *Brettanomyces bruxellensis*, a survillant prepared for the wine apocalypse and other beverages, in Food Microbiology, Vol.59.
- **Sunier, J. (1988).** La fabbricazione del malto e della birra. Unione italiana fabbricanti birra e malto, Roma.
- **Tiziana Amoriello, Katya Carbone, Alessandro Monteleone, Mauro Pagano, Serena Tarangioli. (2016).** Criticità e opportunità per lo sviluppo sostenibile della filiera brassicola. Publisher: CREA Documento realizzato nell’ambito del Programma Rete Rurale Nazionale 2014-2020 Autorità di gestione: Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali Ufficio DISR2.



- **Tremblay e Tremblay, 2011; Benvenuto e Bianchi, 2014.** The craft beer revolution in Italy and the agricultural craft breweries: evolutionary trajectories and main critical issues.
- **Tubb, R. S. (1986).** A colony-colour method which differentiates  $\alpha$ -galactosidase-positive strains of yeast. *J. Inst. Brew.*, 92, 588-590.
- **Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H (2003 b).** “Evolution of Chemical and Sensory Properties
- **Willaert, R., & Nedovic, V. A. (2006).** Primary beer fermentation by immobilised yeast—a review on flavour formation and control strategies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(8), 1353-1367.
- **Zambonelli C, Tini C., Giudici P., Grazia L. (1999).** *Microbiologia degli alimenti fermentati.* Calderini edagricole Bologna.
- **Karlović, A., Jurić, A., Ćorić, N., Habschied, K., Krstanović, V., & Mastanjević, K. (2020).** By-products in the malting and brewing industries—re-usage possibilities. *Fermentation*, 6(3), 82
- **Huige, N. J. (2006).** Brewery by-products and effluents. In *Handbook of brewing* (pp. 670-729). CRC Press.

## ***SITOGRAFIA***

- [www.unionbirrai.it](http://www.unionbirrai.it)
- [www.beerinba.com](http://www.beerinba.com)
- [www.chimicaonline.it](http://www.chimicaonline.it)
- [www.fermentobirra.it](http://www.fermentobirra.it)
- [www.puccini.chimica.it](http://www.puccini.chimica.it)