



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

Corso di laurea magistrale in

Biologia molecolare e applicata

**Utilizzo di un ceppo non convenzionale di *Torulaspora delbrueckii* nella fermentazione mista con
differenti ceppi starter di *Saccharomyces cerevisiae***

Tesi di Laurea di:
Mariangela Antonucci

Relatore:
Dott.ssa Francesca Comitini

Sessione Estiva
Anno Accademico 2019/2020

INDICE

CAPITOLO 1- INTRODUZIONE

1.1 LA BIRRA: MATERIE PRIME

1.1.1 ACQUA

1.1.2 ORZO

1.1.3 LUPPOLO

1.1.4 LIEVITO

1.2 IL PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA

1.2.1 MALTAZIONE

1.2.2 AMMOSTAMENTO

1.2.3 FERMENTAZIONE

1.2.4 FILTRAZIONE PASTORIZZAZIONE E CONFEZIONAMENTO

1.3 LA BIRRA ARTIGIANALE

1.4 LIEVITI NON CONVENZIONALI IN AMBITO BRASSICOLO

1.4.1 TORULASPORA DELBRUECKII

1.5 CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA

CAPITOLO 2- SCOPO DELLA TESI

CAPITOLO 3- MATERIALI E METODI

3.1 CEPPI DI LIEVITO UTILIZZATI

3.2 CONDIZIONI FERMENTATIVE

3.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE

3.3.1 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI

3.3.2 TERRENI DI COLTURA

3.4 ANALISI CHIMICHE

3.4.1 pH E DENSITA'/ GRADI PLATO

3.4.2 ACIDITA' VOLATILE

3.4.3 ESTRAZIONE ED ANALISI DELLA COMPONENTE VOLATILE

3.4.4 ALCOLI SUPERIORI

3.4.5 ETANOLO

3.5 ANALISI STATISTICA

CAPITOLO 4- RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 CINETICHE FERMENTATIVE

4.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA IN
COLTURA MISTA E PURA

4.3 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

4.4 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

4.5 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

4.6 ANALISI SENSORIALE

CAPITOLO 5- CONCLUSIONI

CAPITOLO 6- BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

La denominazione birra come definito dal D.P.R. n. 272 del 30.06.98 è riservata al “prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi di *saccharomyces carlsbergensis* o di *saccharomyces cerevisiae* di un mosto preparato con malto, anche torrefatto, di orzo o di frumento o di loro miscele ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi”.

La prova scientifica più antica della produzione della birra risale a circa 5000 anni fa, in Asia, in reperti appartenenti alla popolazione dei Sumeri Cinquemila anni dopo, nella fascia di territorio compresa tra i fiumi Tigri ed Eufrate, una tavoletta assira non solo nomina esplicitamente la birra, ma addirittura il mestiere di birraio. Pare che fossero addirittura venti le qualità di birra disponibili sul mercato di Babilonia, anche se quelle più diffuse erano quattro: “bi-se-bar” una comune birra d’orzo, “bi-gig” una birra scura normale, “bi-gig-dug-ga” una birra scura di elevata qualità, e “bi-kal” il prodotto migliore. La birra aveva anche un significato religioso e rituale, infatti, era bevuta durante i funerali per celebrare le virtù del defunto e veniva offerta alla divinità per garantire un tranquillo riposo al trapassato. Nel Medio Oriente alcune antiche iscrizioni riportano la ricetta araba: la materia prima del birraio era costituita da pani d’orzo germinati e cotti, che fornivano il malto che poi sbriciolato e

con aggiunta di acqua, dava inizio ad una fermentazione alcolica spontanea, trasformandosi in birra. In quel periodo già esistevano diverse tipologie di birre: birre scure, chiare, rosse, forti, dolci e aromatiche. Inoltre, si usavano nomi diversi per indicare birre prodotte con cereali differenti: le “sikaru” erano d’orzo, le “Kurunnu” di spelta. Nell’ antico Egitto la birra dal gusto forte (circa 12° alcolici) aromatizzata con i lupini e denominata “zithum”, era la bevanda nazionale. considerata anche alimento e medicina (*enciclopediadelbirra.it*).

Pare ci fosse l’uso di somministrare birra a basso tasso alcolico o diluita con acqua e miele ai bambini in svezzamento quando le madri non avevano latte.

Anche i Greci conoscevano e apprezzavano la birra e ne consumavano soprattutto in occasione delle feste in onore di Demetra, dea delle messi.

In Italia furono gli Etruschi i primi a bere e produrre birra e poi i Romani che la chiamavano “cerevisia” in onore di Cerere, dea delle messi, e ne diventarono grandi consumatori come ad esempio Agricola, governatore della Britannia, che una volta tornato a Roma nell’83 d.C. si portò al seguito tre mastri birrai da Glevum (l’odierna Gloucester) e aprì il primo “pub” della nostra Penisola.

Tra i cosiddetti popoli barbarici, bevitori di birra ricordiamo i Germani e i Celti ed una leggenda attribuisce la nascita del popolo irlandese ai Fomoriani, creature mostruose che avevano potenza e immortalità grazie al segreto della fabbricazione della birra. Il Medioevo vide la birra protagonista soprattutto per

merito dei monasteri, che operarono un decisivo salto di qualità nella produzione della bevanda, introducendo anche alcuni nuovi ingredienti, tra i quali il luppolo (*Bottero et al., 2009*). Prima della sua diffusione, infatti, le birre venivano aromatizzate con erbe, spezie, bacche e cortecce d'albero mentre l'infiorescenza di luppolo produce un liquido giallo e appiccicoso, dal caratteristico sapore amaro e aromatico, che svolge anche una azione antisettica e conservante nella birra. La più antica "birreria" monastica è quella della abbazia di Weihehstephan, nei pressi di Monaco di Baviera, costruita nel 724. Anche le suore avevano tra i loro compiti manuali quello di fabbricare la birra, che in parte destinavano al consumo dei malati e dei pellegrini.

In Gran Bretagna la birra, chiamata "ale", era tipicamente prodotta dalle massaie inglesi e messa a disposizione delle feste parrocchiali, dove veniva venduta a scopo di beneficenza per la manutenzione di chiese e conventi. In Inghilterra la birra diventò bevanda nazionale in quanto l'acqua usata per la sua produzione veniva bollita e sterilizzata, quindi la birra rappresentava una garanzia in un periodo in cui l'acqua era spesso infetta. In Inghilterra il luppolo venne introdotto tardi nella produzione della birra nazionale, che continuò a chiamarsi ale, in contrapposizione dei prodotti continentali luppolati, detti "beer".

Nel 1516 in Baviera venne promulgata una legge conosciuta come "Editto di

Purezza” che stabiliva che la birra poteva essere prodotta solamente con malto d’orzo, acqua e luppolo, vietando qualsiasi altro ingrediente.

Nei tre secoli dopo la scoperta dell’America, in tutta l’Europa andarono sviluppandosi numerose tipologie birrarie, tutte basate sull’alta fermentazione, l’unico sistema di produzione allora conosciuto.

Nel 1883 venne individuato ed isolato un ceppo attivo a basse temperature grazie al lavoro svolto dal ricercatore danese Emil Hansen il quale chiamò il lievito *Saccharomyces carlsbergensis* in onore del fondatore dell’industria Carlsberg. A queste birre venne assegnato il nome di “Lager” (*cronachedibirra.it*).

Una volta conclusosi il secondo conflitto mondiale si assistette alla nascita di nuove birrerie che ad eccezione di quelle belghe e tedesche, che continuavano a mantenere le loro antiche tradizioni, erano essenzialmente delle grandi fabbriche grazie alle quali nacquero i primi grandi marchi internazionali. Dopo questa esplosione delle grandi fabbriche di birra si ricominciò, a partire dagli anni settanta, a riapprezzare la birra di qualità, più personale e meno commerciale.

1.1 LA BIRRA: MATERIE PRIME

Per la produzione della birra sono utilizzate le seguenti materie prime: acqua, malto d'orzo, luppolo e lievito. L'orzo è il cereale più utilizzato però possono essere utilizzati anche altri cereali come il mais, frumento, riso, avena, miglio, che possono conferire gusti particolari alla birra.

Il malto di frumento, principale surrogato del malto d'orzo, è un ingrediente indispensabile nelle birre americane e tedesche a base di frumento.

Anche i cereali non maltati possono essere impiegati nella fabbricazione della birra, però non presentano sufficiente attività enzimatica e quelli più utilizzati sono mais, riso, sorgo, orzo, segale e frumento. Il mais e il riso sono ingredienti predominanti nello stile America light lager, mentre il frumento è un ingrediente chiave della Wit belga e della Lambic.

Per aumentare la componente zuccherina del mosto con ingredienti a basso costo è, inoltre, possibile ricorrere all'aggiunta di zucchero di canna, destrosio ed estratti di mais che sono completamente fermentescibili e quindi consentono di ottenere elevati tassi alcolici.

1.1.1 ACQUA

L'acqua rappresenta un ingrediente fondamentale nella produzione della birra, che ne contiene oltre il 90% ed è in grado di caratterizzarne il flavor.

L'effetto dell'acqua sulla birra si espleta secondo due modalità ben distinte: alcuni sali minerali, come sodio, solfati e cloruri, alterano il profilo organolettico del prodotto finito; altri, invece, come bicarbonati, calcio e magnesio, influenzano alcune fasi del processo di produzione, in particolare quella di ammostamento (www.fermentobirra.it).

I cloruri tendono ad arrotondare il corpo accentuando le note maltate, mentre i solfati producono l'effetto opposto accentuando la componente amaricante. Le concentrazioni di questi sali nell'acqua utilizzata per produrre birra possono variare, ma in genere si cerca di mantenere i cloruri sotto i 150 mg/l e i solfati al di sotto dei 250 mg/l.

Molto più significativo è invece l'impatto di bicarbonati, calcio e magnesio sull'ammostamento, ovvero quella fase in cui gli amidi dei cereali (malto d'orzo, grano, etc...) vengono convertiti in zuccheri. Questa conversione avviene grazie all'azione di alcuni enzimi che scindono le catene di zuccheri complessi (amidi) in zuccheri semplici, digeribili dal lievito durante la fermentazione. L'acqua influenza l'azione di questi enzimi agendo sul pH, che rappresenta la concentrazione degli ioni idrogeno liberi in una miscela.

Nella produzione della birra un pH di 5,5 determina un buon ammostamento (www.enciclopediadellabirra.it).

Infatti, questi ioni, carichi positivamente, se presenti in concentrazioni non ottimali, tendono a deformare la struttura degli enzimi con riduzione dell'efficacia e rendendo difficoltosa (e oltre certi livelli impossibile) la conversione degli amidi in zuccheri.

Un'acqua ricca di bicarbonati, per produrre una birra chiara, potrebbe portare il pH in ammostamento a valori più alti rispetto al range ottimale e ciò comporterebbe una conversione inefficiente degli amidi in zuccheri semplici.

Un pH alto inoltre rende maggiormente solubili i tannini (sostanze contenute nei luppoli e nelle bucce del malto) che producono astringenza al palato ed influenza molto la percezione dell'amaro: più il pH è alto, più l'amaro risulta sgradevole.

1.1.2 ORZO

L'orzo è un cereale ottenuto dalla cariosside dell'*Hordeum vulgare* appartenente alla famiglia delle Poaceae. E' uno dei più diffusi e consumati al mondo, per la sua adattabilità a diverse tipologie di clima e terreno e la facilità di coltivazione, ed è anche l'ingrediente di partenza per la preparazione della birra perché i chicchi di orzo sono ricchi di polisaccaridi (principalmente amido) e proteine tra cui enzimi (α - e β -amilasi) utili al processo di maltazione.

I granuli di amido e le proteine sono contenuti nell'endosperma del chicco ed hanno la funzione di supportare lo sviluppo dell'embrione (la parte feconda e vitale del seme) durante la fase di germinazione. Questo meccanismo fisiologico viene sfruttato per favorire la liberazione degli zuccheri nella fase di maltazione; i chicchi sono inoltre rivestiti da uno strato protettivo, detto glumella che si stacca facilmente dagli stessi, agevolando il processo di filtrazione del mosto.

Nella produzione della birra ci sono due tipi di malti. Sono distinti dal numero di fiori fertili che producono nella spiga. Two-row (*Hordeum vulgare* (due file)) ha solo due fiori della testa fertili su sei, e solo questi possono poi produrre semi. Six-row (sei file) ha tutti i chicchi fertili, ma non viene usato molto nella produzione della birra a causa dell'alto contenuto di proteine. La versione Two-row ha chicchi più grossi, e maggior rendimento del six-row. Di solito ha contenuti minori di azoto e proteine, ma ha anche un guscio più piccolo, il che dà alle birre prodotte un sapore meno di grano. (www.mondobirra.org)

I requisiti ricercati per le migliori varietà di orzo sono:

basso contenuto d'azoto meno dell'1,6%, corrispondente all'11,5% di sostanze azotate, che se in eccesso creano problemi nel processo di fabbricazione della birra;

alta attività amilasica e diastolica in genere;

alta resa in estratto cioè oltre 80% di carboidrati solubili;

buona friabilità con endosperma farinoso;

basso contenuto di glucani, che se eccessivi possono rallentare la maltazione e la filtrazione;

germinabilità, che deve essere superiore al 96% dopo 3 giorni;

uniformità di calibro dei chicchi;

ottimo riempimento dei grani;

glumelle sottili e non pigmentate. (www.enciclopediadelbirra.it)

L'orzo è composto da: 70-85% di carboidrati, 10.5-11.5% di proteine, 2-4% di sostanze organiche (fosfati, silicati e sali di potassio), 1.5-2% di lipidi e 1-2% di altre sostanze. In particolare, i carboidrati presenti sono amido, zuccheri semplici (saccarosio, glucosio e fruttosio), cellulosa ed emicellulosa. Di questi l'amido, che rappresenta il 55-56% dell'orzo totale, previa idrolisi, risulta essere la principale fonte di carboidrati utilizzati dai lieviti durante il processo fermentativo. La cellulosa e l'emicellulosa sono importanti perché facilitano il processo di filtrazione e conferiscono resistenza meccanica e rigidità al seme.

1.1.3 LUPPOLO

Il luppolo è una pianta perenne rampicante dioica, cioè con diversi fiori maschili (pistilliferi) e femminili (staminiferi) su piante diverse. Per la

produzione della birra sono utilizzate solo le infiorescenze femminili, dette coni (*Manzano, Buiatti 2007*).

Il costituente principale dei coni è la luppolina, una sostanza polverosa gialla che contiene resine amare, oli essenziali, tannini e terpeni.

Il luppolo è un ingrediente fondamentale del processo produttivo della birra e il suo ruolo più importante è quello di conferire il sapore amaro alla birra ed arricchirne l'aroma. Per le sue spiccate proprietà antibatteriche funge anche da conservante naturale.

L'uso del luppolo, infine, aiuta a coagulare le proteine in sospensione nella birra rendendola più limpida, e inoltre, incrementa la persistenza della schiuma e questo avviene grazie a forze di natura ionica tra le cariche negative degli iso α - acidi e quelle positive degli ioni ammonio dei polipeptidi che costituiscono la schiuma, e anche grazie alla formazione di complessi metallici (*Blanco et al., 2006*).

Sono due le sostanze nelle resine responsabili dell'azione amaricante: α -acidi e β -acidi (*Ono et al., 1986*). La concentrazione degli α -acidi varia dal 2 al 17% ed essendo gli alfa acidi molto poco solubili, per estrarli bisogna bollire il luppolo da 30 a 90 minuti, mentre i loro isomeri (iso α - acidi) lo sono molto di più.

I β -acidi invece sono ideali per contrastare e ritardare gli effetti inevitabili di deterioramento dovuto ai batteri, prolungando così la durata della birra.

Essendo fiori, i luppoli deperiscono molto rapidamente infatti appena colti vengono essiccati, isolati dall'ossigeno e conservati al freddo: questo per poter meglio preservarli dall'ossidazione. (www.giornaledellabirra.it)

Quando la luppolina appare arancione gli olii essenziali potrebbero essere deperiti, col rischio di conferire un cattivo odore alla birra. È importante conservare i fiori del luppolo sottovuoto e refrigerati, infatti, come in tutte le reazioni biochimiche, la temperatura ha un ruolo fondamentale.

L'IBU rappresenta la concentrazione, espressa in mg/L, degli iso-alfa acidi nel prodotto (quindi solo i composti isomerizzati).

L'UTIL invece non è altro che la percentuale di alfa acidi estratti ed isomerizzati dal luppolo, parametro fondamentale che ci permette di capire il contributo di ogni gettata di luppolo in funzione del tempo.

In base agli α -acidi possiamo quindi classificare le varietà di luppoli in:

LUPPOLI DA AMARO: contengono un % di α -acidi dal 6% al 10%. I luppoli da amaro si inseriscono ad inizio bollitura per ottimizzare la reazione di isomerizzazione aumentando così la solubilità degli α -acidi con conferimento della sensazione di amaro.

LUPPOLI DA AROMA: contengono una % di α -acidi inferiore al 5%, e vengono usati verso la fine della bollitura, in modo da conferire soltanto aroma alla birra.

LUPPOLI SIA DA AMARO CHE DA AROMA: sono luppoli che hanno una buona % di α -acidi, tra il 6%- e l'8%, ma che hanno anche un aroma intenso, quindi oltre all'amaro sono in grado di conferire alle birre anche un aroma (www.artedellabirra.it).

1.1.4 LIEVITO

Il lievito, ingrediente pilastro della produzione brassicola, è un microrganismo eucariota unicellulare appartenente al regno dei funghi il quale è in grado di respirare e/o fermentare a seconda delle proprie caratteristiche e delle condizioni ambientali entro le quali si ritrova riproducendosi essenzialmente per gemmazione.

Nella birra svolge il fondamentale compito di trasformare tutti gli zuccheri scomposti nella fase di ammostamento in alcool, oltre ad aggiungere particolari aromi.

In ambito brassicolo si tende ad utilizzare principalmente i ceppi della famiglia dei *Saccharomyces* (www.ilbirraiomatto.it).

Tra questi, i lieviti impiegati nella produzione della birra sono raggruppati nelle specie *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, che differiscono ulteriormente, anche in base allo specifico ceppo, per alcune proprietà fisiologiche rilevanti dal punto di vista tecnologico, quali la flocculazione, la sedimentazione, la resistenza all'etanolo ed alle alte concentrazioni di zucchero, la capacità di utilizzare il melibiosio (*Manzano, Buiatti, 2007*).

Nell'utilizzo comune, gli operatori dell'industria birraria impiegano i termini ale e lager per identificare rispettivamente i lieviti della specie *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*.

I lieviti ale fermentano meglio a temperature vicine ai 20°C, presentano temperature massime di crescita prossime ai 37,5-40°C. I lieviti lager si sviluppano bene a temperature comprese tra gli 8 e 15°C ed hanno limiti termici massimi di 31,5-34°C ed hanno la caratteristica peculiare e distintiva di fermentare il disaccaride melibiosio (*Manzano, Buiatti, 2007*).

Questa caratteristica ne ha determinato la suddivisione in lieviti definiti di alta fermentazione "ale" e di bassa fermentazione "lager".

I lieviti ad alta fermentazione sono quelli più anticamente impiegati nella produzione della birra, ma i lager sono quelli attualmente maggiormente diffusi.

I lieviti della specie *S. cerevisiae* lavorano in maniera ottimale tra i 12 e i 23°C e una volta esausti, tendono a salire verso la parte alta del fermentatore.

Il loro contributo a livello organolettico può essere molto incisivo, grazie alla produzione di esteri, fenoli ed altre sostanze che vanno ad arricchire il ventaglio aromatico della birra con note, tra le altre, di frutta matura, spezie e fiori.

Molte birre ad alta fermentazione sono rifermentate in bottiglia.

I lieviti della specie *S. pastorianus* lavorano in maniera ottimale tra i 6 e i 13°C e da esausti si depositano sul fondo del fermentatore.

Il loro metabolismo è più lento dei lieviti ad alta fermentazione e il loro contributo aromatico molto più contenuto. In generale la produzione di birre Lager richiede più tempo e per esse è previsto un lungo periodo di maturazione a freddo, chiamato lagerizzazione.

C'è anche una piccola famiglia delle birre a fermentazione spontanea. Queste si differenziano dalle altre per l'assenza dell'inoculo del lievito da parte del birraio: in altre parole la loro fermentazione non è indotta artificialmente, ma è il frutto della "fecondazione" spontanea dei microrganismi (lieviti e batteri) presenti nell'aria (www.baladin.it).

Ceppi di *S. cerevisiae* che si sono adattati durante la selezione ad applicazioni specifiche ed esclusive, ad esempio i ceppi di *S. cerevisiae* utilizzati nella panificazione o nella vinificazione, producono birre di basso livello qualitativo.

1.2 IL PROCESSO PRODUTTIVO DELLA BIRRA

Il processo produttivo della birra è composto da varie fasi:

- maltazione,
- ammostamento
- fermentazione
- filtrazione, pastorizzazione, confezionamento

Tale processo è rimasto praticamente invariato fin dalle sue origini, sebbene alcuni aspetti siano mutati in ragione delle maggiori conoscenze tecnico-scientifiche acquisite nel tempo, così le vecchie attrezzature in legno hanno ceduto il passo a quelle in acciaio, che riducono i rischi di contaminazione e aromi non desiderati, inoltre oggi è possibile effettuare un controllo e una gestione delle temperature durante il processo produttivo.

1.2.1 MALTAZIONE

Il processo di maltazione consiste nell'indurre, grazie all'idratazione del seme, la germinazione del cereale che è successivamente interrotta mediante un trattamento termico di essiccazione.

Lo scopo di tale processo è quello di produrre enzimi amilolitici e proteolitici, assenti nell'orzo non germinato, ma indispensabili per l'idrolisi dell'amido del

malto durante la fase di ammostamento, facilitare la lavorazione e migliorare il profilo aromatico del prodotto.

Le fasi della maltazione consistono nella pulitura e calibratura dell'orzo, macerazione, germinazione, essiccamento.

Nella fase di pulitura e calibratura, le cariossidi vengono pulite mediante ventole, magneti ed aspiratori così da allontanare l'eventuale presenza di sostanze estranee, quindi si effettua la calibratura grazie alla quale si otterranno cariossidi di grandezza standard.

La macerazione del seme consiste nella sua immersione in vasche cilindriche contenenti acqua a pH alcalino, ad una temperatura compresa tra i 12 – 16 °C, che viene costantemente cambiata così da contrastare l'eventuale sviluppo di microrganismi; questa fase dura mediamente 48/72 ore e ha lo scopo di stimolare la germinazione, l'umidità del seme passa da circa 12% a 44 - 46% (*Sicheri, 1983*). Le cariossidi vengono quindi disposte in cassoni di germinazione per circa 5 – 7 giorni, ad una temperatura variabile tra 15 – 19 °C, sotto un'aerazione continua in modo da rimuovere la CO₂ prodottasi, questa fase si protrarrà fin quando i germogli non avranno raggiunto una lunghezza pari a 2/3 del chicco, che intanto avranno assunto un colore verde intenso (malto verde). Durante la germinazione le principali trasformazioni che subisce

l'orzo sono la disgregazione dell'endosperma del seme, la formazione di zuccheri e la solubilizzazione di sostanze azotate.

L'essiccamento, oltre alla rimozione dell'acqua, a seconda delle modalità con cui è condotto il processo, porta alla formazione di composti che contribuiscono al colore e all'aroma caratteristico dei diversi malti.

Nella fase dell'essiccamento è importante avere una corretta gestione della temperatura e dell'umidità del prodotto. Infatti temperature superiori ai 50° C, nella fase iniziale dell'essiccamento, potrebbero inattivare gli enzimi presenti.

L'umidità in questa fase passa dal 44/46% fino al 4%

Secondo le tecniche adottate nel processo di maltazione è possibile ottenere malti molto diversi sia per colore che per caratteristiche aromatiche. Per definizione tutti malti diversi dal malto chiaro tipo Pilsner (malto base) oppure ottenuti da cereali diversi dall'orzo, sono malti speciali. I malti speciali sono generalmente classificati in tre categorie: malti scuri, malti caramello e malti torrefatti (*Manzano, Buiatti, 2007*).

A essiccazione avvenuta, una macchina degerminatrice provvede a rimuovere germe e radichette, il cereale maltato viene quindi macinato fino ad ottenere una farina, che favorisce l'azione degli enzimi in ammostamento.

1.2.2 AMMOSTAMENTO

L'ammestamento consiste nel miscelare il malto macinato con acqua riscaldata per solubilizzare ed estrarre la maggior quantità possibile di sostanze, la miscela viene portata alle temperature ottimali per l'attività enzimatica, raggiunte le quali si attuano soste così che le sostanze originariamente insolubili del malto vengano idrolizzate fino ad ottenere un composto zuccherino fermentabile dai lieviti: il mosto. Si effettuano soste a 45-55°C per la formazione di peptidi ed aminoacidi, a 60-65°C per l'azione delle β amilasi e a 70-75°C per quella delle α amilasi, enzimi amilolitici che idrolizzando l'amido portano rispettivamente alla formazione di maltosio e maltotrioso (fermentescibili) e destrine (non fermentescibili) e per velocizzare le reazioni enzimatiche si può ridurre il pH della miscela.

Nei malti chiari la degradazione enzimatica inizia con l'acid rest (pausa acido), dove le fitasi rompono la fitina in fosfato di calcio o di magnesio e acido fitico, ciò aiuta l'acidificazione del mosto quando l'acqua ha un basso contenuto di calcio e ciò avviene a temperature tra i 35 C° e i 49 C°. Un altro gruppo di enzimi attivi in questo range sono le β -glucanasi, che rompono la emicellulosa e le gomme nelle pareti cellulari di malti non modificati.

Per molti malti l'ammestamento inizia con il protein rest (pausa proteine), che avviene solitamente a temperature comprese tra i 46 C° e i 52° C. Questo processo inizia con la formazione di proteasi, che scindono le molecole delle

proteine in frazioni più piccole come i polipeptidi, che a loro volta sono degradati in peptidi e amminoacidi essenziali per la crescita corretta del lievito. Il processo enzimatico finale converte gli amidi in destrine e zuccheri fermentabili. Gli amidi devono essere prima gelatinizzati, e questo avviene a temperature di 54-65 C° per il malto. La gelatinizzazione per grani non trattati, come mais, avviene a temperature maggiori, quindi questi chicchi devono venir bolliti oppure fatti in fiocchi prima di aggiungerli al mosto. La rottura degli amidi è portata avanti dall'azione combinata degli enzimi α -amilasi e β -amilasi, che rompono i legami 1-6 degli amidi riducendo la complessità delle molecole. Temperature inferiori ai 65 C° favoriscono la β -amilasi, producendo un mosto più fermentabile, mentre temperature superiori a 68 C° favoriscono la α -amilasi, producendo un mosto più destrinico. I monosaccaridi nel mosto includono glucosio, fruttosio, mannosio e galattosio, i disaccaridi includono maltosio, isomaltosio, saccarosio, mellibosio e lattosio, i trisaccaridi includono il maltotriosio, che è lentamente fermentabile e sostiene il lievito durante la lagerizzazione. Gli oligosaccaridi sono solubili in acqua e vengono chiamate destrine. Dopo aver completato questa fase, molti birrai terminano alzando la temperatura del mosto a 75 C° per vari minuti. Questo assicura la disattivazione dell'amilasi, la conversione di destrine in zuccheri fermentabili e riduce la viscosità del mosto, facilitando il filtraggio.

L'ammestamento ci restituisce zuccheri semplici scomponendo gli amidi: un metodo per comprendere quando questi ultimi sono stati convertiti tutti in zuccheri è il test dello iodio. Si miscela su un piatto qualche goccia di tintura di iodio con del mosto: se la colorazione diventa viola/bluastro, siamo ancora in presenza di amidi residui, quindi occorre continuare l'ammestamento; se invece lo iodio si scioglie nel mosto senza scurirsi (qualche riflesso rosso chiaro può rimanere), tutti gli amidi sono stati convertiti in zuccheri si può quindi terminare l'ammestamento.

L'ammestamento può essere condotto sfruttando più modalità di seguito descritte.

Ammestamento per “infusione”: metodo più recente e maggiormente utilizzato sia a livello industriale che artigianale in quanto semplice (può essere condotto infatti in un unico ammostatore) e non eccessivamente costoso. In linea generale prevede un riscaldamento progressivo della miscela di acqua e malto con opportune soste a valori di temperatura specifici per tempi prestabiliti in maniera tale da permettere agli enzimi di esplicare la propria funzione catalitica, senza mai raggiungere l'ebollizione; durante la sosta è importantissimo mantenere la miscela in agitazione in modo tale da evitare, all'interno della stessa, la creazione di zone con temperature differenti che potrebbero alterare la corretta attività degli enzimi.

Ammostamento per “decozione”: metodo più antico e complesso utilizzato oggi soltanto in determinati birrifici (maggiormente tedeschi). Questo metodo consiste nell’andare a prelevare una parte della miscela, trasferirla in un bollitore, portarla all’ebollizione e ritrasferirla nell’ammostatore facendo sì che l’intera miscela raggiunga la temperatura desiderata e lasciandola quindi riposare in modo tale da far lavorare gli enzimi; una volta terminata la sosta si procederà allo stesso modo così da indurre un nuovo innalzamento termico della miscela per una nuova fase di sosta. Per tale procedura è necessario avere a disposizione un impianto dotato oltre che del classico bollitore da mosto anche di un ulteriore tino per la bollitura di parte della miscela durante l’ammostamento. Il metodo per decozione garantisce un’intensa e completa gelatinizzazione dell’amido con una maggiore degradazione enzimatica, un aumento della resa di processo ed una maggior produzione di melanoidine che vanno ad influenzare gusto, aroma e colore anche se l’ebollizione di parte della miscela potrebbe indurre fenomeni di tipo ossidativo a seguito dell’entrata di aria indesiderata.

Qualsiasi sia la modalità utilizzata, la temperatura dell’intera miscela di acqua e malto non dovrà mai essere superiore ai 78 °C; a questa temperatura infatti si ha l’inattivazione degli enzimi e la stabilizzazione della saccarificazione ed è questo il motivo per cui l’ultima sosta termica della fase di ammostamento

viene sempre condotta a questa temperatura (in questo caso si parla solitamente di fase del “mash-out”).

La filtrazione separa il mosto dalle trebbie, cioè la massa dei solidi non solubili, tramite ripetuti lavaggi con acqua calda e ciò si attua per mezzo del tino di filtrazione o del filtro pressa. Al termine della filtrazione il mosto viene bollito per un periodo di tempo non inferiore ad un’ora e non superiore a due ore e mezza, durante questa fase vi si aggiunge il luppolo, che conferisce il classico sapore amarognolo e il caratteristico profumo. La cottura viene condotta in un serbatoio riscaldato, tramite vapore generato da una caldaia esterna o posta nel tino stesso e il luppolo può essere addizionato al mosto in una o più volte in diversi momenti della cottura. Generalmente all’inizio della cottura si aggiungono i luppoli amaricanti per isomerizzare la maggior quantità possibile di sostanze amare e questa è una reazione che richiede elevate temperature. I luppoli aromatici invece vengono aggiunti in un secondo tempo per evitare che gli oli essenziali vengano dispersi dalla volatilizzazione. Con le alte temperature il mosto viene sterilizzato e concentrato, l’acqua in eccesso evapora, gli enzimi e i microrganismi vengono inattivati e le sostanze amare del luppolo isomerizzano, le proteine e i composti polifenolici coagulano, il colore del mosto si fa più intenso per la caramellizzazione degli zuccheri, per la formazione di melanoidine e per l’ossidazione di polifenoli. Si formano e

precipitano molti complessi (definiti trub a caldo) tra le sostanze polifenoliche del luppolo e le proteine del malto.

Durante la cottura diminuisce il pH del mosto sia per l'apporto di sostanze acide da parte del luppolo sia per la formazione di melanoidine. Terminata la cottura il mosto subisce una pseudo centrifugazione mediante la creazione di un vortice in un'operazione nota come "whirlpool" e viene reso limpido allontanando tutte le sostanze che si sono formate in seguito all'innalzamento della temperatura e all'aggiunta di luppolo, ciò avviene in un serbatoio cilindrico dove il mosto viene introdotto ad elevata velocità per favorire la separazione dei torbidi. Quindi il mosto viene raffreddato tramite scambiatore di calore a temperature che favoriscono l'inizio della fermentazione: per le fermentazioni basse si raffredda fino a 5- 8°C mentre per le alte fermentazione si raffredda fino a 15-25°C; il mosto raffreddato viene areato e ossigenato per consentire al lievito di moltiplicarsi (www.thequeenscastle.com).

1.2.3 FERMENTAZIONE

La fermentazione è il processo fondamentale in cui il lievito è inoculato nel mosto di birra a una temperatura desiderata secondo il tipo di birra da produrre. Una buona fermentazione dipende dalle caratteristiche del lievito che deve provenire da colture pure e selezionate, deve essere vitale e avere una buona

resistenza all'alcol, per un tasso di crescita ottimale è necessario monitorare alcuni parametri, come l'inoculo corretto, l'assunzione di nutrienti, l'ossigeno disciolto e la temperatura, inoltre, per una birra di alta qualità, è indispensabile un buon equilibrio tra i nutrienti assorbiti e i prodotti rilasciati (*Lodolo et al, 2008*). L'attività del lievito trasforma zuccheri e amminoacidi in alcol, anidride carbonica e sostanze aromatiche.

La fermentazione del mosto di birra può essere suddivisa in due fasi:

Fermentazione primaria o "tumultuosa": in questa fase, dalla durata di circa sette giorni, si assiste principalmente alla fermentazione degli zuccheri con produzione di etanolo ed anidride carbonica; parallelamente, grazie all'attività del lievito, si avrà la produzione di tutta una serie di composti secondari come alcoli superiori, esteri, acidi organici e composti carbonilici come aldeidi e chetoni che determinano l'aroma della birra.

Al termine di questa fase la biomassa del lievito viene separata dalla birra, che, grazie alla quota di lievito ancora presente, subisce una nuova fermentazione.

Fermentazione secondaria o stagionatura o maturazione: in questa fase, che può avvenire all'interno del fermentatore stesso oppure in specifiche grandi vasche d'acciaio, la temperatura viene portata fino a valori di 0-2°C per la bassa fermentazione e 7-10°C per l'alta fermentazione, in maniera tale da migliorare la qualità del prodotto. La maturazione avviene in quattro o cinque settimane

per le birre ad alta fermentazione (ale) ma per le birre a bassa fermentazione (lager) e per determinate tipologie di birra molto pregiate possono essere necessari anche alcuni mesi. La trasformazione da birra immatura (birra verde) in birra matura avviene quando si ha la saturazione di CO₂ grazie all'attività metabolica dei lieviti residui, si ha la chiarificazione a seguito della precipitazione di tali lieviti e dei flocculi tanno-proteici e l'affinamento del gusto e dell'aroma dovuto all'attenuazione dell'amaro del luppolo e all'armonizzazione dei composti aromatici presenti (*Cabras e Martelli, 2004; Manzoni, 2006*). Durante il processo di fermentazione, temperatura e umidità e pH devono essere mantenute costantemente sotto controllo per garantire un adeguato tasso di crescita del lievito.

Il pH passa da un valore di circa 5,2-5,3 del mosto a un valore di circa 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 regolamentato dal D.M. 2 Maggio 1996, n° 325 la legislazione italiana permette l'impiego anche di batteri lattici del genere *Lactobacillus* come stabilizzanti; in particolar modo è utilizzato *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. delbrueckii aggiunto, ad esempio, prima della luppolatura del mosto (Lowe and Arendt, 2004).

1.2.4 FILTRAZIONE PASTORIZZAZIONE CONFEZIONAMENTO

Al termine della maturazione la birra subisce un processo di filtrazione che ha lo scopo di rimuovere i solidi ancora in sospensione, come cellule di lievito, proteine, polifenoli che sono responsabili della instabilità del prodotto finito e che, formando complessi insolubili con le proteine, provocano intorbidamento.

Per aumentare la stabilità della birra, generalmente essa viene pastorizzata:

La pastorizzazione, il cui scopo è l'inattivazione dei microrganismi e degli enzimi presenti, può essere condotta sul prodotto prima o dopo il confezionamento. La pastorizzazione più utilizzata è quella dove il prodotto viene scaldato in uno scambiatore di calore a piastre alla temperatura di 71°-75°C per 15 – 30 secondi evitando così che il flavor ne abbia a risentire.

La pastorizzazione “a freddo” preserva le proprietà sensoriali della birra, essa può essere effettuata mediante agenti chimici preservanti o membrane filtranti, seguita da un confezionamento asettico. Le birre pastorizzate hanno una shelf-life superiore ai tre mesi, ma esistono anche birre non pastorizzate, aventi una shelf-life di circa un mese le quali devono essere mantenute rigorosamente a basse temperature per preservarne la massima qualità (Harrison MA, 2009).

Alla fine del processo, il confezionamento avviene in bottiglie, lattine e fusti, nel corso del riempimento è fondamentale che la birra non venga a contatto con l'aria poiché l'ossigeno ha effetti negativi (comparsa di *off-flavours*) sulla qualità della birra ; valori inferiori a 0,1 mg di O₂/l indicano che il processo è stato effettuato in maniera ottimale (*Manzano, Buiatti 2007*).

Alcune varietà particolari, per aumentare la carbonatazione, vengono fatte rifermentare una terza volta in bottiglia, nella quale, prima di chiudere il tappo, è stato inserito dello zucchero fermentescibile e lievito: è il caso di alcune tipologie di birre ad elevata gradazione alcolica (trappiste, birre d'abbazia, Strong Ale) nonché birre di frumento della tradizione germanica (www.thequeenscastle.com).

1.3 LA BIRRA ARTIGIANALE

Il 6 luglio 2016 il Ministero delle politiche agricole ha reso nota l'approvazione, da parte del Senato, del cosiddetto *collegato agricoltura* e, con esso, del comma 4 bis dell'articolo 2, riguardante proprio una definizione, la prima di carattere formale per il nostro Paese, 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 200mila ettolitri, includendo in questo quantitativo le quantità di prodotto per conto terzi. La birra prodotta in microbirrifici non subisce il processo di filtrazione e di pastorizzazione e, quindi, dal punto di vista organolettico e produttivo, si differenzia da quella prodotta industrialmente sia per la minore conservabilità che per la maggiore complessità delle caratteristiche organolettiche in quanto, contenendo ancora lieviti, è in continua evoluzione e maturazione.

La birra artigianale, definita cruda per la mancata pastorizzazione, grazie all'aggiunta di zuccheri (5-9 g/l) e lievito (10^5 - 10^6) viene sottoposta ad un processo di rifermentazione in bottiglia, il che comporta sia un gusto più fresco ed una maggiore quantità di schiuma, dovuto alla aumentata produzione di etanolo e di CO_2 , sia una maggiore aromaticità dovuta alla trasformazione delle aldeidi in alcoli e degli aminoacidi residui in chetoacidi per azione dei lieviti. Ciò che però conferisce alla birra artigianale la sua complessità e unicità organolettica è dovuto al tipo di ceppo di lievito utilizzato sia nella fermentazione primaria che durante il processo di rifermentazione in bottiglia.

Nei microbirrifici la produzione di birra è soprattutto di tipo Ale, cioè ad opera di ceppi di *S. Cerevisiae* ed è stato dimostrato che questo porta ad un incremento di composti fruttati e floreali (isoamil acetato, etil ottanoato, etil dodecanoato, fenil etil acetato, β -feniletanolo) che conferiscono alla birra artigianale il bioflavor caratteristico (*Canonico et al. 2014*).

Ulteriori cambiamenti possono esservi al termine della maturazione determinati dal rilascio di materiale intracellulare, come aminoacidi, acidi grassi, enzimi, derivante dalla possibile autolisi dei lieviti.

A livello organizzativo, in Italia si sono affermate quattro differenti tipologie di microbirrifici:

Birrifici artigianali classici: caratterizzati da produzione del prodotto senza mescita; sono quelli contraddistinti da meccaniche lavorative maggiormente paragonabili ai classici birrifici industriali;

Brew Pub: caratterizzati dalla presenza di un locale dedicato alla produzione, abbinato ad un servizio pub e/o di ristorazione;

Beer Firm: rappresentati da produttori che non dispongono di un proprio impianto di produzione e per questo motivo utilizzano impianti di altri birrifici per la realizzazione delle proprie ricette;

Birrifici Agricoli: tipologia di microbirrificio che si distingue da quelli sopra elencati per l'obbligo che l'azienda ha di dover autoprodurre la maggior parte

delle materie prime da utilizzare poi nel processo produttivo, ad esempio maltando i cereali di produzione propria presso una struttura consortile alla quale l'azienda stessa aderisce. Le aziende totali (attive e non attive) nel 2018 ammontavano a 813 birrifici (sola produzione con, al limite, un "tap" interno) 245 brew pub (produzione e mescita nello stesso luogo) 540 beer firm (aziende senza impianto proprio).

Facendo qualche considerazione geografica, riscontriamo che Lombardia (272 aziende) rimane la capofila del fenomeno, seguita dal Veneto (140), Piemonte (137 aziende), Toscana (121), Emilia Romagna (119) e Lazio (111).

Dalla fine del 2018 abbiamo assistito a un deciso rallentamento del settore, concretizzatosi con un numero di nuovi birrifici molto inferiore rispetto agli anni precedenti. È sicuramente il segnale che si sta aprendo una nuova fase per il mercato, in cui le occasioni per accedere sono assai più ridotte in confronto al passato (www.microbirrifici.org).

1.4 LIEVITI NON CONVENZIONALI IN AMBITO BRASSICOLO

La qualità della birra dipende molto dall'attività dei lieviti in fermentazione, non solo per la loro buona efficienza di resa ma anche per la loro influenza sull'aroma, poiché la maggior parte dei composti aromatici sono metaboliti intermedi e sottoprodotti del metabolismo del lievito. La produzione di birra è

un processo tradizionale, in cui *Saccharomyces* è l'unica componente microbica, tuttavia, al giorno d'oggi, il settore della birra si trova di fronte a una domanda crescente di prodotti innovativi. I tentativi di ottenere prodotti con caratteristiche sensoriali più complesse hanno portato alla ricerca di lieviti non convenzionali, ovvero lieviti non-*Saccharomyces*. La maggior parte dei ceppi non appartenenti al genere *Saccharomyces*, che mostrano interessanti potenzialità per la produzione della birra, derivano del settore enologico e sono, in genere, normali componenti della microflora che si sviluppa durante la fermentazione. Tuttavia, poiché i lieviti non-*Saccharomyces* rappresentano ceppi non addomesticati le loro caratteristiche di fermentazione hanno una variazione maggiore rispetto ai lieviti *Saccharomyces* e raramente sono stati utilizzati come colture pure data la produzione inferiore di etanolo rispetto a *S. cerevisiae*. Per questo vengono utilizzati frequentemente in colture miste. Grazie al loro isolamento diversi studi hanno messo in evidenza le loro peculiarità metaboliche e le numerose potenzialità applicative nel settore. Le specie di lieviti principalmente studiati sono: *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia kluyverii*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Lanchancea fermentati* (Ramirez, M. and Velazquez, R. 2018).

Sono tutti accomunati da una ridotta capacità fermentativa e sono quindi potenzialmente utili per la produzione di birre a basso contenuto di alcool, ma dal gusto caratteristico.

Ad esempio, alcuni ceppi alternativi sono già naturalmente presenti nel microbiota responsabile della fermentazione spontanea delle birre lambic, come i *Brettanomyces*. I “Brett”, così vengono chiamati, sono infatti fondamentali nella produzione di alcune birre in tutto il mondo. Recentemente alcuni birrai li usano come unico lievito per fermentare il mosto e sono stati impiegati durante la fermentazione secondaria di molte birre. I monaci di Orval, monastero trappista belga, aggiungono i *Brettanomyces* alla loro birra nel momento dell’imbottigliamento.

Il *Brettanomyces* è un lievito molto attenuante: ciò significa che, anche se lentamente, continua a consumare gli zuccheri presenti nella birra quasi nella loro totalità, comprese le destrine che i *Saccaromyces* non riescono a metabolizzare, donandole così acido, esteri, fenoli aromatici e tetraidropiridine.

I *Brettanomyces* producono molti acidi diversi tra cui i più importanti sono l’acetico, pungente e dai sentori di aceto, e il lattico, aspro penetrante e acidulo.

Molto più significativa è la produzione di esteri, che aggiungono alla birra sentori di agrumi, mela, ananas, ribes nero, banana, albicocca, uva e pera, e sfumature di burro, caramella mou, brandy e cognac oltre alle più evidenti note

di cuoio, sella di cavallo e sidro, dovute anche alle tetraidropiridine. I fenoli volatili prodotti dai Brett, che spesso ritroviamo nel Lambic, apportano alla birra profumi di stalla e cortile accompagnati da fragranze speziate, di miele e rose (*Yakobson et al. 2010*). Inoltre la capacità di consumare tantissime fonti di carbonio, tra cui anche il cellobiosio e le destrine lo rende utile per la produzione di birre a basso contenuto calorico. Ha dimostrato anche un'elevata resistenza all'etanolo (fino al 15% v/v) e a bassi pH (fino a 3) in condizioni di anaerobiosi, caratteristiche che lo rendono adatto a fermentazioni in condizioni estreme (*Barata et al. 2008*);

P. kluyverii recentemente ha trovato applicazione nella produzione di birre alcol-free o a basso contenuto di alcol, grazie ad alcune caratteristiche metaboliche come la ridotta capacità di fermentare il glucosio unita alla capacità di metabolizzare composti presenti nei luppoli in composti volatili desiderabili, che donano aromi peculiari alla birra pur essendo priva di etanolo (max 0.2-0.6%) (*Saerens et al. 2014*); inoltre ha mostrato un'elevata velocità di fermentazione, comparabile a *S. cerevisiae* e la capacità di sintetizzare in grande quantità esteri e alcoli superiori (*Anfang et al. 2009 e Amaya-Delgado et al. 2013*).

Lachancea è stata studiata da *Domizio et al.* per produrre birre acide vista la sua peculiare capacità di produrre elevate quantità di acido lattico durante la fermentazione alcolica.

Wickerhamomyces anomalus infine è risultato essere un buon produttore di etil propanoato, fenil etanolo, 2-feniletile acetato e in particolare etilacetato (*Passoth et al. 2006*). Quest'ultimo composto è metabolicamente importante in conseguenza della sua attività antifungina. Per quanto riguarda l'influenza sensoriale, questo composto influisce sul profilo di gusto e sapore della birra, conferendo un interessante carattere fruttato o sgradevole simile a un solvente, a seconda dei valori di concentrazione.

1.4.1 TORULASPORA DELBRUECKII

T. delbrueckii è un lievito appartenente al genere *Torulaspota* ed è noto per essere uno dei principali lieviti responsabili della fermentazione del vino.

Per quanto riguarda la morfologia, le cellule di *T. delbrueckii* sono sferiche o ovoidali, del diametro di 2-6 x 3-7 μm e quindi più piccole di *S. cerevisiae*. Raramente possono formare pseudoife, ma non producono mai delle ife in senso stretto.

T. delbrueckii è rinomato per il suo ruolo fondamentale nella co-fermentazione del vino insieme a *S. cerevisiae*, infatti l'uso di *T. delbrueckii*

nelle fermentazioni miste con ceppi starter di *S. cerevisiae* era stato precedentemente studiato in enologia (Azzolini et al., 2015; Comitini et al., 2011; Cordero-Bueso et al., 2013; Sadoudi et al., 2012).

Recentemente è stato proposto l'uso di questo lievito non convenzionale per il processo di fermentazione della birra (Canonico et al., 2016; Michel et al., 2016, 2017; Petruzzi et al., 2016).

Nella birra la *Torulaspora delbrueckii* ha dimostrato la capacità di fermentare maltosio, produrre esteri e trasformare l'aroma del luppolo modificando la composizione alcolica monoterpénica (Canonico et al., 2016; King e Dickinson, 2000; Michel et al., 2016; Tataridis et al., 2013). In particolare, *T. delbrueckii* può produrre diversi aromi fruttati, come il β -feniletanolo (aromi di rosa), l'n-propanolo, l'iso-butanolo, l'alcool amilico (aroma di brandy, solvente) e l'etil acetato (Basso et al., 2016; Etschmann et al., 2015; Pires et al., 2014).

Le birre prodotte da colture pure di *T. delbrueckii* e da fermentazioni miste di *S. cerevisiae* / *T. delbrueckii* sono caratterizzate da aromi fruttati e hanno attributi "corposi" (Canonico et al., 2016; Michel et al., 2016) e una bassa gradazione alcolica (2,66% v / v) (Canonico et al. 2017).

A dispetto di *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* è in grado di sintetizzare enzimi utili come esterasi, β -glicosidasi, lipasi e proteasi e di produrre elevate quantità di

aromi, in particolare esteri, infine è in grado di consumare maltosio più lentamente, dando maggior intensità e complessità alla bevanda finale, anche se con un ridotto contenuto di alcol etilico.

Il lievito ha mostrato una bassa produzione di composti indesiderabili, come acetaldeide e acido acetico e concomitante miglioramento di altri composti desiderati (*Bely et al., 2008; Comitini et al., 2011; Loira et al., 2012; Jolly et al., 2014; Azzolini et al., 2015*).

Nell'industria vinicola è stato utilizzato nelle fermentazioni miste per la produzione di vino e spumante (*van Breda et al. 2013*). Per il vino ha aumentato la complessità sensoriale e ha mostrato una produzione molto bassa di aromi come fenoli o composti solforici (*Gonzalez-Royo et al. 2015*), ha prodotto forti note fruttate ed è stato in grado di sopravvivere ad alte concentrazioni di etanolo, caratteristica sorprendente per un genere non-*Saccharomyces* (*Albertin et al. 2014*). È stato anche studiato nel contesto della panificazione; dove *T. delbrueckii* ha dimostrato un'alta tolleranza osmotica allo zucchero e al sale negli impasti da forno. È stato quindi considerato un nuovo lievito per dolci. Inoltre, ha conservato un'elevata vitalità dopo essere stato congelato nell'impasto (*Alves-Araujo et al. 2004*). La velocità complessiva di fermentazione sembra essere più lenta di quella dei soliti ceppi di fermentazione di *S. cerevisiae*, come mostrato da *Tataridis, Canonico e Michel*.

1.5 CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DELLA BIRRA

Alla formazione dell'aroma della birra contribuiscono molti composti. Molti derivano direttamente dalla materia prima impiegata per produrre il mosto, in questo caso sono molti importanti malti e luppoli utilizzati, ma durante la fermentazione, oltre all'etanolo e all'anidride carbonica, il lievito produce una vasta gamma di metaboliti secondari importantissimi per l'aroma. L'insieme di tutti i metaboliti che vengono prodotti durante la fermentazione impartiscono a ciascuna birra un particolare carattere e includono acidi organici, alcoli superiori, esteri, composti carbonilici (aldeidi chetoni) e composti contenenti zolfo. Tra i composti ritenuti positivi per l'aroma della birra abbiamo l'etanolo, l'amaro del luppolo, l'anidride carbonica, l'isoamil acetato e l'etil esanoato e gli alcoli superiori. Per quanto riguarda i cosiddetti difetti dell'aroma vanno ricordate l'odore di zolfo, il diacetile e il 2- trans nonenale.

Alcoli superiori:

Nelle birre sono stati identificati più di 40 alcoli superiori, di questi alcuni sono molto importanti per l'aroma. Se presenti in quantità eccessive nella birra, > di 300mg/L, possono portare a un odore e gusto forte e pungente. Gli alcoli superiori più importanti nella birra includono l'n-propanolo, l'iso-butanolo, gli

alcoli isoamilici (il 2-metilbutanolo ed il 3-metilbutanolo) e 2-feniletanolo (*Pires et al. 2014; Meilgaard et al 1975; Engan et al. 1972*). La soglia di percezione dell'n-propanolo ha un valore alto di 600 mg/L e contribuisce a un sapore alcolico dolce. L'iso-butanolo e l'alcool amilico hanno aromi di solvente ma differiscono nelle loro soglie di percezione di 100 e 50-70 mg/L, rispettivamente. L'alcool isoamilico e il 2-feniletanolo hanno aromi fruttati, in particolare l'alcool isoamilico mostra aroma di banana e di alcol con una soglia di percezione di 50-65 mg/L. Il composto 2-fenil etanolo conferisce un sapore dolce e di rosa a una soglia di percezione di 40 mg/L. Gli alcoli superiori forniscono i precursori per la sintesi degli esteri e vengono sintetizzati attraverso due vie metaboliche.

La prima a partire dai carboidrati del mosto via piruvato (via anabolica), la seconda come sottoprodotti dell'assimilazione degli amminoacidi (via catabolica). Il contributo delle vie anabolica e catabolica alla sintesi degli alcoli superiori è influenzata da molteplici fattori: all'aumentare della lunghezza della catena dell'alcol si ha un progressivo aumento nell'utilizzo della via catabolica. La via catabolica è importante soprattutto nelle fasi iniziali della fermentazione birraia quando gli amminoacidi del mosto sono abbondanti, mentre vi è un progressivo aumento nell'utilizzo della via anabolica in corrispondenza della progressiva assimilazione degli aminoacidi presenti nel mosto. Il controllo

della formazione degli alcoli superiori durante la fermentazione può essere raggiunto in tre modi: la scelta di un adeguato ceppo di lievito, la modificazione della composizione del mosto e la variazione delle condizioni di fermentazione (*Manzano, Buiatti, 2007*). Va ricordato che i ceppi ale producono maggiori concentrazioni di alcoli superiori rispetto ai ceppi lager e la loro produzione è direttamente proporzionale alla crescita cellulare; aumenta quindi in 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 come sherry, madera e porto.

Esteri:

Gli esteri comprendono il più importante gruppo di componenti attivi nei confronti dell'aroma della birra. Gli esteri impartiscono aroma floreale e fruttato alle birre. Tra i vari esteri ve ne sono alcuni la cui concentrazione delle birre è considerata cruciale per l'ottenimento di un prodotto di qualità. Si tratta dell'etil acetato (aroma di frutta), dell'isoamil acetato (aroma di banana), dell'etil esanoato (mela) e del 2-feniletil acetato (rosa, miele, mela). Questi esteri possono essere suddivisi in esteri acetici e esteri etilici di acidi grassi a catena media. Gli esteri acetici sono sintetizzati da un alcol con acido acetico e hanno la più alta concentrazione di esteri attivi nella birra. I più importanti di

questi esteri nella birra sono l'etil acetato (aroma di solvente con una soglia di percezione di 33 mg/L, ma per le birre lager la soglia raccomandata è < 5 mg/L), l'isoamil acetato (aroma di banana con una soglia di 1,6 mg/L), l'isobutil acetato (aroma fruttato e dolce con una soglia di 1,6 mg/L) e il fenilettil acetato (aroma di rosa, mela e miele con una soglia di 3,8 mg/L) (*Meilgaard et al 1975; Engan et al. 1972; Peddie et al. 1990*). Gli esteri etilici sono formati da un acido grasso a catena media e un alcol. Due di questi esteri sono fondamentali per il sapore della birra : l'etil esanoato con una soglia di percezione di 0,23 mg/L che produce aromi di mela e anice e l'etil ottanoato con una soglia di percezione di 0,9 mg/L che produce aroma di mela acida (*Saerens et al. 2008*).

Composti carbonilici:

I principali composti carbonilici nella birra sono l'acetaldeide e i dicetoni vicinali. Di questi ultimi, il diacetile svolge un ruolo importante nel flavor della birra a causa del suo sapore indesiderabile anche ad una bassa soglia di percezione ed è simile al 2,3-pentanedione, un altro composto indesiderato.

L'acetaldeide viene prodotta principalmente durante la fase di crescita del lievito, a causa del metabolismo dello zucchero, e nella successiva fermentazione la maggior parte viene convertita in etanolo (*Liu, 2015*). Valori elevati di acetaldeide nella birra a fine fermentazione vengono associati ad

andamenti metabolici particolari come la separazione anticipata del lievito dal mosto dovuta all'induzione della flocculazione oppure in seguito a condizioni fermentative inadeguate che possono portare il lievito a stress. Ha un sapore indesiderabile simile alla mela verde o di erba con una soglia di percezione di 10 mg/L (*Lodolo et al. 2008*).

Il diacetile porta un sapore burroso alla birra se si trova al di sopra della soglia di percezione di 0,1-0,15 mg/L (*Meilgaard, 1975; Miedaner, 1974*). Si forma a partire dall'acetolattato (proveniente dalla via biosintetica della valina) che fuoriesce dalla cellula e finisce nel mosto, dove viene ossidato formando il diacetile. Fortunatamente queste molecole presenti nel mosto vengono costantemente riassorbite dalla cellula che le converte in 2,3-butanediolo, un composto con una soglia di percezione molto più alta del diacetile.

Il composto 2,3-pentanedione invece è noto per il suo sapore simile alla caramella con una soglia di percezione di ~ 0,9 mg/L e viene sintetizzato in maniera simile al diacetile, ma a partire dall'acetoidrossibutirrato.

Acidi organici:

Nella birra sono stati riscontrati circa un centinaio di acidi organici o acidi grassi a corta catena. Gli acidi organici contribuiscono alla riduzione del pH che avviene durante la fermentazione e alcuni sono responsabili di aromi particolari come per esempio il gusto salato/amaro attribuibile all'acido

succinico. Mentre acidi grassi a corta catena come l'acido caproico e l'acido caprilico hanno aromi negativi, di capra.

Gli acidi organici possono essere suddivisi in due classi principali, che comprendono acidi volatili e non volatili (*Rodrigues et al. 2010*). I principali acidi organici volatili presenti nella birra sono l'acido acetico, propionico, isobutirrico, butirrico, isovalerico, valerico, caproico, caprilico, caprico e laurico. Se sono presenti in alte concentrazioni, contribuiscono alla birra con un sapore acido e salato e possono anche contribuire a sapori sgradevoli come formaggio e sudore. Quantitativamente, gli acidi volatili che incidono maggiormente sul sapore sono l'acetico, caprilico, caprico e laurico. L'acido acetico, la molecola predominante nell'aceto, ha una soglia di percezione di 175 mg/L mentre l'acido caprilico ha una soglia molto più bassa di 15 mg/L. L'acido caprico è descritto come di cera con una soglia di 10 mg/L. L'acido laurico è descritto come di sapone quando si raggiunge una soglia di 6,1 mg/L. I principali acidi non volatili presenti nella birra che influiscono sul sapore e sull'aroma comprendono: acido ossalico (500 mg/L, salato, ossidato), acido citrico (400 mg/L, acido), acido malico (700 mg/L, mela), acido fumarico (400 mg/L, acido), acido succinico (220 mg/L, acido), acido lattico (400 mg/L, acido) e acido piruvico (300 mg/L, salato, foraggio).

Alcoli monoterpenici:

Sono sostanze, che derivano dalle piante, e contribuiscono con aromi altamente floreali al sapore di birra. Nel caso della birra sono derivati dal luppolo e cinque di queste sostanze sono presenti a concentrazioni notevoli, e sono: il linalolo (5 µg/L, lavanda), l' α -terpineolo (2 mg/L, lilla), il β -citronello (8 µg/L, limone, lime), il geraniolo (6 µg/L, rosa) e il nerolo (0,5 mg/L, rosa, agrumi). Il metabolismo dei lieviti è in grado di trasformare questi composti e spostare i rapporti tra i principali alcoli monoterpeni, il che può portare a un cambiamento nel sapore di luppolo della birra dopo la fermentazione. Per esempio durante la fermentazione, il geraniolo viene trasformato in β -citronello e linalolo, mentre il linalolo e il nerolo isomerizzano in α -terpineolo (*King and Dickinson, 2000, 2003; Praet et al. 2012; Steyer et al. 2013; Takoi et al. 2016*).

Composti solforati:

I principali composti solforici includono l'anidride solforosa e l'acido solfidrico e possono originare dagli aminoacidi presenti nel malto oppure da composti sulfurei del luppolo o dell'acqua. Sono composti molto volatili che tendono a dissolversi nell'aria insieme all'anidride carbonica nel corso della fermentazione.

L'anidride solforosa svolge un ruolo importante nella stabilità degli aromi, principalmente agendo come antiossidante nella birra finita per aumentare considerevolmente la durata di conservazione, ma ad alte concentrazioni può impartire odori e sapori sgradevoli (*Vanderhaegen et al., 2003*).

Fenoli:

La maggior parte degli aromi che provengono da fenoli prodotti dal lievito sono definiti "aromi fenolici". Gli odori più comuni che provengono da queste sostanze includono aromi di chiodi di garofano, affumicati, speziati, medicinali e bruciati. I più comuni sono 4-vinilguaiacolo, 4-vinilfenolo, 4-etilguaiacolo, 4-etilfenolo, lo stirene (*Vanbeneden et al. 2008*). La sintesi di questi composti dipende dalle specie di lievito e dalla presenza di precursori nell'erba. I precursori includono acidi fenolici con un'alta soglia aromatica come acido ferulico, cumarico e cinnamico, che provengono dal malto. Le birre fermentate con *S. cerevisiae* conterranno principalmente 4-vinilguaiacolo e 4-vinilfenolo, poiché possono solo eseguire la decarbossilazione degli acidi fenolici. Tuttavia, specie come *Brettanomyces sp.* sono in grado di ridurre alcuni dei composti a 4-etilguaiacolo e 4-etilfenolo. Le soglie per questi fenoli volatili sono basse e sono facilmente percepibili: 4-etilfenolo, 0,9 mg/L (aroma fenolico, astringente); 4-etilguaiacolo, 0,13 mg/L (aroma fenolico, dolce); 4-

vinilguaiacolo, 0,3 mg/L (aroma fenolico, amaro, chiodi di garofano); e 4-vinilfenolo 0,2 mg/L (aroma fenolico, fumoso) (*Meilgaard, 1975*)

CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni c'è stata una crescente domanda di birre di alta qualità e con note aromatiche distintive e la fermentazione ha un ruolo centrale nel determinarne la qualità e le caratteristiche organolettiche. L'utilizzo di specie microbiche alternative è la proposta più innovativa per migliorare il bioflavor della birra.

La maggior parte dei ceppi non-convenzionali che hanno mostrato potenzialità per la produzione della birra derivano dal settore enologico e negli ultimi anni, diversi studi hanno documentato il ruolo positivo dei lieviti non *Saccharomyces* nella vinificazione influenzando il profilo analitico e aromatico. L'attenzione si è focalizzata sull'utilizzo di un ceppo di *Torulasporea delbrueckii*.

Quindi è stato ipotizzato il potenziale uso di *Torulasporea delbrueckii* per migliorare la qualità della birra artigianale.

Lo scopo di questo studio è di sperimentare l'impiego di fermentazioni miste utilizzando tre ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* senza e con l'aggiunta di un ceppo non-*Saccharomyces* in ambito brassicolo al fine di valutare l'influenza sul profilo analitico e aromatico della birra, oltre a produrre una birra a basso indice alcolico.

CAPITOLO 3- MATERIALI E METODI

3.1 CEPPI DI LIEVITO UTILIZZATI

In questo studio sono stati utilizzati tre ceppi di lieviti commerciali di *S. cerevisiae* sia nelle fermentazioni pure, come ceppi di controllo, sia nelle fermentazioni miste con il ceppo di *Torulaspora delbrueckii*.

I ceppi di *S. cerevisiae* utilizzati sono:

il Safale US-05 (lievito ad alta fermentazione destinato alle Ale americane. Permette di produrre birre dagli aromi equilibrati, dal basso tenore di diacetile, dal gusto delicato. Il lievito forma un cappello di schiuma compatta e presenta un'eccellente capacità di rimanere in sospensione durante la fermentazione);

il Sfbrew WB-06 (lievito selezionato per la fermentazione di birre bianche. Si caratterizza da note sottili di eteri e fenolo caratteristiche delle birre bianche. Questo lievito presenta un'eccellente capacità di restare a galla durante la fermentazione. Per favorire gli aromi dei chiodi di garofano è raccomandata una temperatura inferiore ai 22°C e per quanto riguarda gli aromi di banana, una temperatura superiore ai 23°C);

il Belgian Wheat 3942 (questa varietà produce birre con esteri moderati e fenoli minimi. Aromi di mela, gomma da masticare e prugne si fondono bene con malto e luppolo.).

Il ceppo di *Torulaspota delbrueckii* è il DiSVA 254 della collezione presente nel Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA). Originariamente è stato isolato dalle foglie di papaia del Camerun ed è stato precedentemente utilizzato per la produzione di birra (*Canonico et al., 2016*). I lieviti secchi US-05 e WB-06 sono stati reidratati, mentre 0,1 mL di Belgian Wheat 3942 è stato seminato su terreno YPD agar a 25°C. Per valutare la presenza dei batteri lattici è stato utilizzato l'agar MRS con lo 0,005% di cicloeside (che inibisce la crescita del lievito) e incubato in anaerobiosi a 30°C per 3-8 giorni.

Tutti i ceppi di lievito sono stati mantenuti alla temperatura di 4°C per la conservazione a breve termine. Per la conservazione a lungo termine, invece, i ceppi sono stati crioconservati in terreno YPD, senza agar, contenente glicerolo (80%) alla temperatura di -80°C.

I tre diversi ceppi di partenza di *S. cerevisiae* sono stati usati nelle fermentazioni pure e miste con *T. delbrueckii* DiSVA 254, ciascuno con un rapporto di *S. cerevisiae* a *T. delbrueckii* di 1:20, sulla base di lavori precedenti (*Canonico et al., 2016*).

3.2 CONDIZIONI FERMENTATIVE

Il potenziale fermentativo dei ceppi di lievito selezionati e le loro interazioni nel mosto sono stati valutati in prove di fermentazione condotte a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ in matracci contenenti 500 mL di mosto in condizioni sterili. Le boccette sono state sigillate con una valvola di Müller contenente acido solforico, per consentire alla CO_2 prodotta di fuoriuscire dal sistema ed evitare la contaminazione. Le pre-colture sono state allestite in estratto di malto al 10% e lasciate incubare a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ore (per *S. cerevisiae*) e 72 ore (per *T. delbrueckii*), ottenendo un inoculo di circa 5×10^6 cellule / mL.

PRIMA FERMENTAZIONE

Il mosto utilizzato è stato prodotto dal microbirrificio Birra dell'Eremo (Assisi, Italia), con malto Pilsner (il malto base più utilizzato in Europa continentale per produrre birre chiare) e con una varietà di luppolo "Cascade" (è un luppolo da aroma proveniente dagli Stati Uniti particolarmente ricercato dai birrifici statunitensi per il suo carattere agrumato e floreale, con netti sentori di pompelmo.)

I caratteri principali del mosto erano:

pH 5,47;

densità 1042 = 12,3° Plato;

azoto prontamente assimilabile 263 mg N/L;

IBU di 20.

Il mosto è stato prodotto con il seguente schema:

53°C per 10 minuti;

67°C per 70 minuti

76°C per 10 minuti

ebollizione per 60 minuti.

Le fermentazioni sono state eseguite in triplicato e alla fine di ogni fermentazione primaria la concentrazione del lievito era di 1×10^5 cell/mL.

RIFERMENTAZIONE IN BOTTIGLIA

Alla fine di ogni fermentazione, la birra con il lievito rimanente (1×10^5 cellule / mL) è stata trasferita in bottiglie da 330 mL dopo la fermentazione primaria, a cui è stato aggiunto 5 g/L di saccarosio. La fermentazione secondaria in bottiglia è stata effettuata a 19 ± 1 ° C per 10 giorni.

3.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE

3.3.1 MONITORAGGIO DELLE FERMENTAZIONI

Le cinetiche di fermentazione sono state monitorate misurando la perdita di peso delle boccette a causa della CO₂ prodotta, fino alla fine della fermentazione cioè fino a quando il peso rimane costante per tre giorni consecutivi. La quantità di CO₂ prodotta è stata utilizzata per esprimere l'attività fermentativa.

La cinetica della crescita è stata monitorata dalla conta delle unità formanti colonie (CFU) sia su WL Nutrient Agar (Oxoid, Hampshire, Regno Unito) sia su Agar Lisina (Oxoid, Hampshire, Regno Unito). Per le fermentazioni ad inoculo misto il terreno utilizzato è Agar Lisina, in modo da avere una crescita diversificata per le due specie microbiche, mentre il *S. cerevisiae* e la *T. delbrueckii* da soli, vengono piastrati su WL Nutrient Agar.

L'agar lisina è un terreno selettivo che non supporta la crescita di *S. cerevisiae* (Lin, 1975), fornendo così la differenziazione delle colonie di *T. delbrueckii* da *S. cerevisiae* nella fermentazione mista. Le piastre sono state messe ad incubare a 25°C per due o tre giorni.

3.3.2 TERRENI DI COLTURA

I terreni di coltura utilizzati sono:

- WL nutrient agar è costituito da:

Componente	Quantità (g/L)
Estratto di lievito	4
Peptone	5
Glucosio	50

Potassio fosfato monobasico (KH ₂ PO ₄)	0.55
Potassio cloruro (KCl)	0.425
Calcio cloruro (CaCl ₂)	0.125
Magnesio solfato (MgSO ₄)	0.125
Cloruro ferrico (FeCl ₃)	0.0025
Manganese solfato (MnSO ₄)	0.0025
Verde di bromocresolo*	0.0022
Agar	15-20

- Agar lisina (Oxoid), utilizzato per eseguire le conte vitali, permette la crescita dei lieviti non-*Saccharomyces* ed è così composto:

Composizione Agar Lisina (Oxoid) 6.6 g/100 ml	
Destrosio 44.5 g/l	FeSO ₄ 0.0002225 g/l
K ₂ HP ₄ O 1.78 g/l	Lisina 1 g/l
MgSO ₄ 0.89 g/l	Inositolo 0.02 g/l
Ca ₂ Cl 0.178 g/l	Calcio Pantotenato 0.002 g/l
NaCl 0.089 g/l	Aneurina 0.0004 g/l
Adenina 0.00178 g/l	Piridossina 0.0004 g/l
D,L-Metionina 0.000891 g/l	Riboflavina 0.0002 g/l

L-Istidina 0.000891 g/l	A. p-aminobenzoico 0.0002 g/l
D,L-Triptofano 0.000891 g/l	Acido nicotinico 0.0004 g/l
H3BO3 0.0000089 g/l	Biotina 0.000002 g/l
ZnSO4 0.0000356 g/l	Acido folico 0.000001 g/l
MONH4 0.0000178 g/l	Agar 17.8 g/l
MnSO4 0.0000356 g/l	

3.4 ANALISI CHIMICHE

3.4.1 pH E DENSITA'/GRADO PLATO

Al termine della fermentazione, da ogni beuta sono stati prelevati 200 ml circa di birra, che sono stati utilizzati per effettuare varie analisi. Quindi sono stati filtrati con carta da filtro ed è stato misurato il pH, tramite pHmetro Jenway 3510, e la densità attraverso l'utilizzo di un densimetro (DA-300 specific gravity meter - Kyoto Instruments – a 20°C). A partire dalla densità, attraverso una tabella di conversione (in accordo con Brown and Hammond, 2003), è stato possibile determinare il valore di Grado Plato (°P), ovvero la quantità di sostanze zuccherine presenti. La stessa conversione può essere calcolata facendo riferimento alle seguenti formule:

D=Density OG=Original Gravity OGp= “punti di OG”

$$OG=D*1000$$

$$OGp=OG-1000$$

$$Svol=OGp/3.83 \text{ (gradazione saccarometria in volume)}$$

$$Plato=Svol/D \text{ (gradazione saccarometria in peso)}$$

Il valore di 1 °Plato (grado saccarometrico) corrisponde ad un grammo di zuccheri in 100 ml di birra.

3.4.2 ACIDITA' VOLATILE

La determinazione dell'acidità volatile (espressa in g/l di acido acetico) è stata effettuata mediante distillazione in corrente di vapore con l'acidimetro di Juffman. Tale apparecchio, di tipo elettrico, opera su 5 ml di birra, ed è composto dalle seguenti parti:

- un recipiente per la raccolta della birra esausta e delle acque di lavaggio dopo l'analisi;
- una beuta contenente acqua distillata, per la generazione di vapore acqueo, chiusa con un tappo a due fori: in uno di essi passa il tubo di sicurezza, che serve anche per riempire la beuta, nell'altro è inserita una valvola; questa beuta viene riscaldata da una piastra elettrica sottostante ad essa;
- una valvola per indirizzare il flusso di vapore o all'esterno (prima che inizi l'analisi) o dentro il palloncino da distillazione in corrente di vapore (durante

l'analisi);

- un palloncino da distillazione in corrente di vapore, provvisto di bolla di rettifica dei vapori;
- un mantello scaldante, per scaldare il palloncino da distillazione in corrente di vapore;
- una serpentina refrigerante;
- una beuta di raccolta del distillato.

Si aggiunge l'acqua distillata nella beuta generatrice di vapore acqueo, per metà circa del suo volume, e si innesta la corrente elettrica alla piastra per portare ad ebollizione l'acqua. Allo stesso tempo viene attivato il refrigerante e al di sotto si posiziona il recipiente per la raccolta del distillato (40 ml). Quando l'acqua nella caldaia bolle ed il flusso di vapore esce all'esterno dal tubo di sicurezza, nel palloncino da distillazione in corrente di vapore si aggiungono 5 ml di birra. Successivamente il palloncino viene chiuso con l'apposito tappo e si accende il mantello riscaldante per scaldare la birra. Quando si formano le prime gocce di vapore condensato nella bolla di espansione di cui è provvisto il palloncino, si ruota la valvola in modo che il vapore venga convogliato all'interno del palloncino e investa la birra in ebollizione. Si distillano 40 ml, facendo attenzione che il livello della birra all'interno del palloncino rimanga più o meno costante; se il volume diminuisce, si abbassa il mantello scaldante o si

spegne momentaneamente. Terminata la distillazione, il mantello scaldante viene spento e si riporta la valvola nella posizione di partenza in modo che il vapore venga di nuovo convogliato all'esterno; terminata la distillazione la birra esausta e le acque di lavaggio del palloncino vengono aspirate nel recipiente di raccolta degli scarti.

Alla fine si determina l'acidità volatile attraverso una titolazione acidimetrica utilizzando una soluzione di NaOH N/50 (0.02 N). Prima della titolazione si aggiungono al distillato 3 gocce di fenolftaleina come indicatore, in modo tale da determinare il viraggio del colore del campione da trasparente ad un rosa vivo, in seguito all'aggiunta di NaOH. Attraverso una tabella di conversione, a seconda di quanta NaOH è stata aggiunta è stato possibile risalire ai g/L di acido acetico caratterizzanti il campione.

3.4.3 ESTRAZIONE ED ANALISI DELLA COMPONENTE VOLATILE

Il metodo si basa su una estrazione delle sostanze volatili dalla birra con una miscela etere/esano. La preparazione del campione prevede, per gli esteri e gli acidi volatili:

50 ml di birra in un matraccio da 70 ml a cui si aggiungono 2 ml di standard di estrazione (3-ottanolo, 40 mg/l) e 0.3 ml di H₃PO₄ al 30 %. Si procede, poi, all'estrazione dei composti volatili aggiungendo 4 ml di una miscela

etere:esano (1:1 in vol). Si pone il matraccio su un agitatore per 5 minuti a 400 rpm. Si aspetta il tempo necessario (circa 10-15 minuti) affinché le due fasi si separino e poi si recupera la fase organica in una vial da 10 ml provvista di tappo di teflon. Si ripete l'estrazione per altre due volte con 2 ml di miscela etere:esano (1:1) con la stessa procedura. Si recupera aggiunge ogni volta la fase organica nella stessa vial, dove si aggiunge con una spatola solfato di sodio. Dopo l'estrazione, per separare la fase organica da quella acquosa, si mette la vial da 10 ml in congelatore over-night; il giorno dopo, quando solo la fase acquosa sarà congelata, si versa la fase organica in una nuova vial da 2.5 ml. L'estratto è così pronto per essere analizzato mediante gas- cromatografia (GC).

Con questa tecnica, in cui la fase fissa è una colonna contenente il materiale attivo e la fase mobile è un gas (normalmente elio), la separazione avviene sulla base delle diverse caratteristiche di volatilità dei composti; ogni composto, infatti, fornisce un segnale (picco) che permette la sua identificazione sulla base del tempo impiegato per arrivare al rilevatore.

A questo punto 1µl di campione viene iniettato direttamente nel gascromatografo serie GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan) con detector a ionizzazione di fiamma, utilizzando la colonna capillare Supelcowax 10. 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.; iniettato: 1µl;
- 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.

La GC è utilizzata per la separazione di sostanze volatili o volatilizzabili come idrocarburi a basso peso molecolare, aromi, acidi organici.

3.4.4 ALCOLI SUPERIORI

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

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

3.4.5 ETANOLO

Per l'analisi dell'etanolo, il campione viene preparato nello stesso modo con cui viene preparato quello per gli alcoli superiori, ma si usa in questo caso come standard interno il 3-metil-2-butanolo alla concentrazione di 10 mg/l. All'interno dello stesso gascromatografo utilizzato per la determinazione della componente volatile e degli alcoli superiori, viene iniettato 1 μl di campione utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus, secondo il protocollo che segue:

- temperatura dell'iniettore: 150°C;

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

3.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata ai dati sperimentali per le principali caratteristiche delle birre. I mezzi sono stati analizzati utilizzando il software STATISTICA 7. Le differenze significative tra i dati mediati sono state determinate mediante il test di Duncan e i risultati sono stati considerati significativi ad un valore di P associato $<0,05$. L'analisi dei componenti principali (PCA) è stata applicata per valutare il contenuto di esteri, alcoli superiori e composti carbonilici nelle birre dalle fermentazioni pure e miste. La PCA è stata eseguita utilizzando il software Unscrambler 7.5 (CAMO ASA, Oslo, Norvegia) e i dati sono presentati come grafici biplot. I dati medi sono stati normalizzati, per neutralizzare qualsiasi influenza di fattori nascosti. Il PCA fornisce una rappresentazione grafica delle differenze complessive dovute a *T. delbreuckii* in termini di sottoprodotti di fermentazione delle birre finali.

CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 CINETICHE FERMENTATIVE

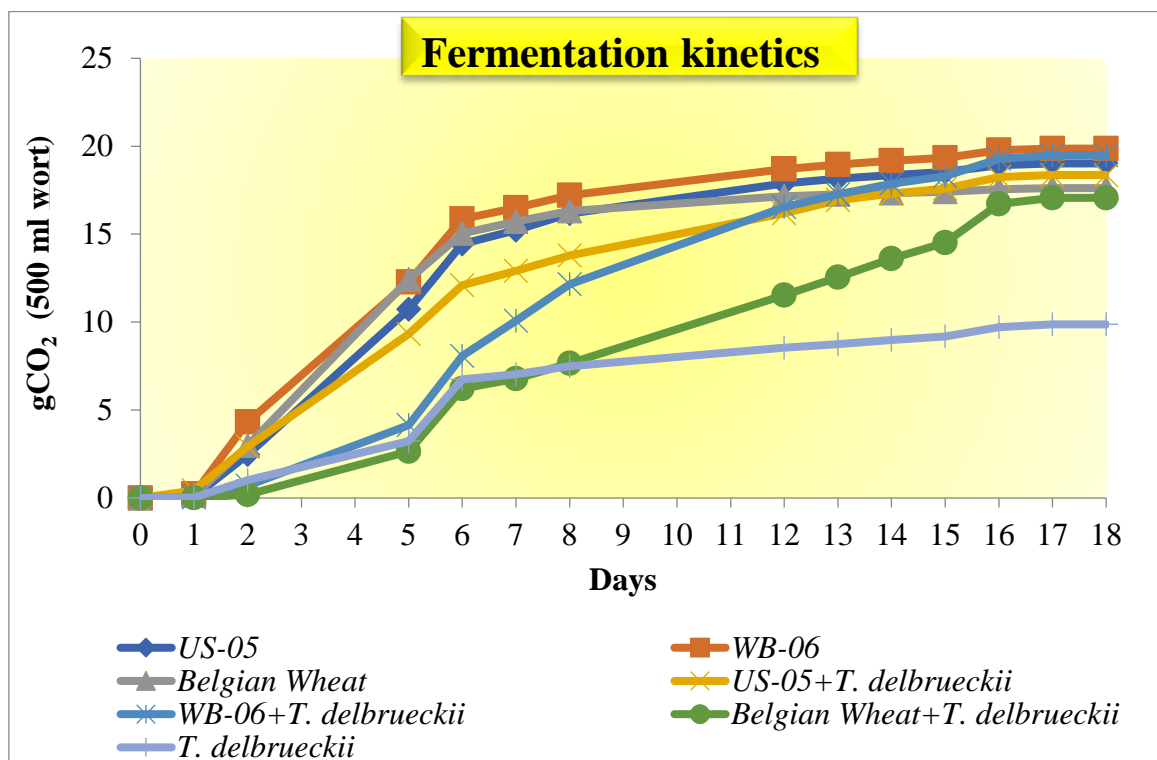


Figura 1 – Cinetiche fermentative di colture pure e miste di ceppi di *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*.

Come riportato nella figura 1, le cinetiche fermentative hanno mostrato un andamento simile per i ceppi di *S. cerevisiae*, sia in colture pure che in colture miste con *T. delbrueckii* (1:20) con produzione della stessa quantità di CO₂.

Tuttavia le fermentazioni miste hanno mostrato una cinetica più lenta rispetto alle corrispondenti fermentazioni pure di *S. cerevisiae*.

Il ceppo di *T. delbrueckii* ha avuto un'influenza diversa a seconda degli starter.

Le fermentazioni miste dei ceppi WB-06 e Belgian Wheat hanno mostrato cinetiche quasi sovrapponibili a quella pura di *T. delbrueckii* rispettivamente fino al quinto e all'ottavo giorno, successivamente hanno incrementato la produzione di CO₂. Il ceppo US-05 non è stato particolarmente influenzato dalla presenza di *T. delbrueckii*. La coltura pura di *T. delbrueckii* ha avuto una cinetica più lenta con un'attenuazione del mosto più bassa, una gravità finale maggiore, più corposità e minor grado alcolico e sapore di malto (Tab.1).

FERMENTATION	APPARENT ATTENUATION (%)	REAL ATTENUATION (%)
US-05	85.81 ± 2.45	69.76 ± 2.00
WB-06	87.23 ± 2.12	70.92 ± 1.73
Belgian Wheat	82.26 ± 1.22	66.88 ± 1.00
US-05/ <i>T. delbrueckii</i>	85.10 ± 0.01	69.19 ± 0.01
WB-06/ <i>T. delbrueckii</i>	88.65 ± 1.23	72.07 ± 1.00
B.Wheat/ <i>T.delbrueckii</i>	82.94 ± 4.25	71.49 ± 3.5
<i>T. delbrueckii</i>	46.80 ± 0.01	38.05 ± 0.01

Tabella 1 – Caratteristiche analitiche delle fermentazioni miste e pure

4.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA IN CULTURA MISTA E PURA

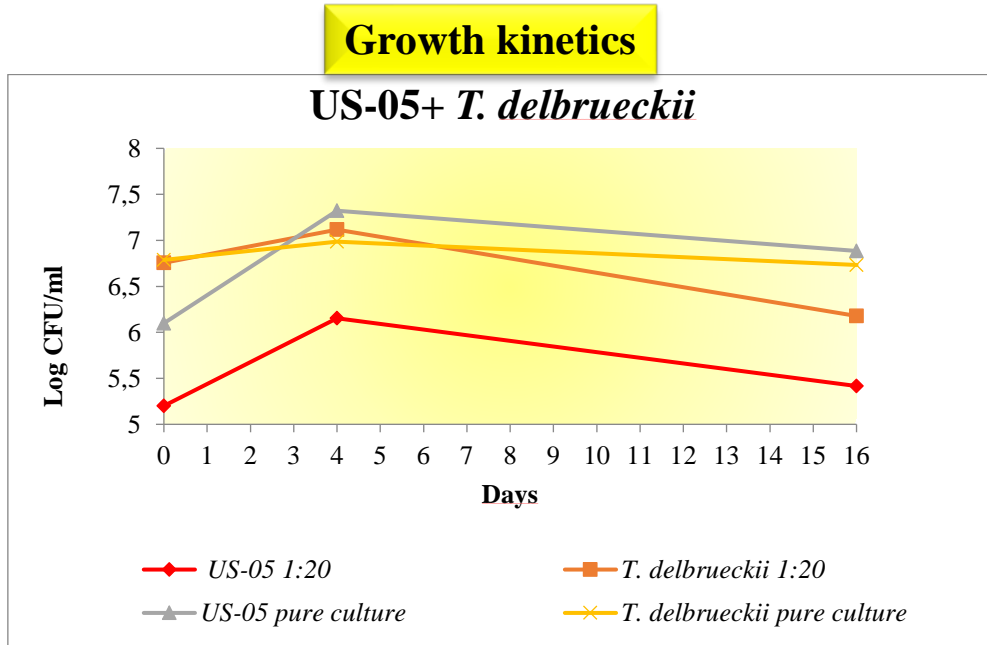


Figura 2 – Cinetiche di crescita di colture pure e miste di ceppi di *S. cerevisiae* US-05 e *T. delbrueckii*.

La crescita cellulare, nella fermentazione pura di *S. cerevisiae* US-05, ha raggiunto una concentrazione $>$ di 10^7 CFU/mL al quarto giorno, mantenendola fino alla fine della fermentazione. Nella fermentazione mista la concentrazione cellulare di US-05 ha raggiunto concentrazioni di $6,1 \times 10^6$ CFU/mL sempre al quarto giorno e ha mantenuto, solo con una leggera riduzione, questa concentrazione fino alla fine del processo di fermentazione.

Per quanto riguarda la concentrazione cellulare di *T. delbrueckii*, sia nella fermentazione pura che in quella mista, la cinetica di crescita ha mostrato risultati simili, a dimostrazione del fatto che nel rapporto di inoculo di 1:20 con

US-05, *T. delbrueckii* ha influenzato la crescita di *S. cerevisiae* dominando il processo.

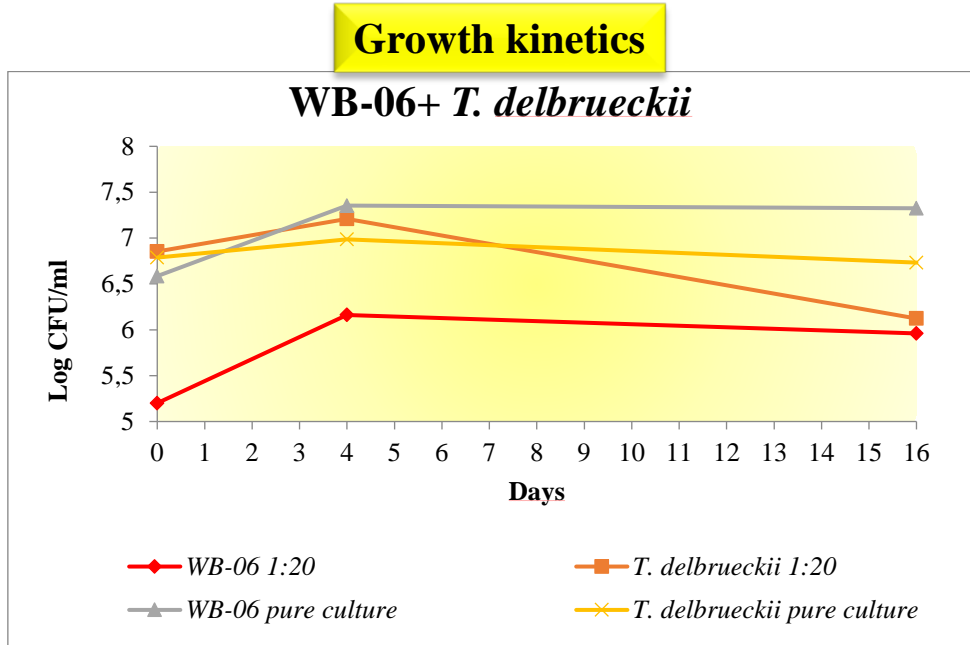


Figura 3 – Cinetiche di crescita di colture pure e miste di ceppi di *S. cerevisiae* WB-06 e *T. delbrueckii*.

Nelle fermentazioni miste le concentrazioni cellulari sia per *S. cerevisiae* WB-06 che per *T. delbrueckii*, a fine processo, sono state di 10^6 CFU/mL, e questo indica che la crescita di *T. delbrueckii* è stata influenzata dal ceppo di *S. cerevisiae* WB-06.

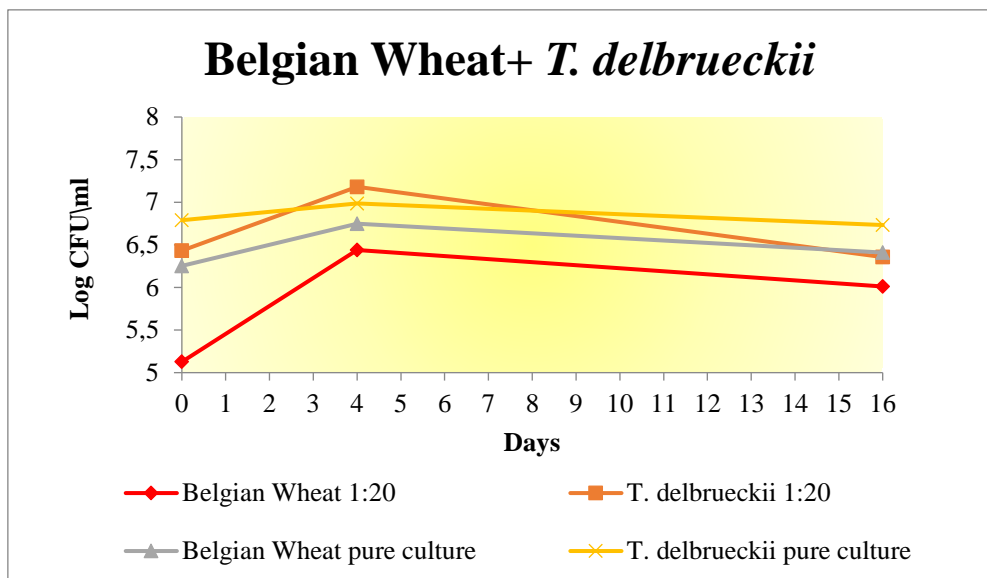


Figura 4 – Cinetiche di crescita di colture pure e miste di ceppi di *S. cerevisiae* Belgian Wheat e *T. delbrueckii*.

Nella fermentazione pura il Belgian Wheat ha mostrato una crescita più lenta per raggiungere una concentrazione cellulare di $6,7 \times 10^6$ CFU/mL al quarto giorno mantenendola fino alla fine della fermentazione. Nella fermentazione mista la concentrazione cellulare ha raggiunto $6,4 \times 10^6$ CFU/mL, molto simile alla fermentazione pura e ciò indica che le prestazioni del Belgian Wheat non sono influenzate dalla presenza di *T. delbrueckii*. Il *T. delbrueckii* da solo mantiene una concentrazione cellulare costante fino alla fine, mentre nella fermentazione mista dopo il quarto giorno comincia a diminuire.

4.3 PROFILO ANALITICO DELLA BIRRA

Le birre così ottenute sono state sottoposte ad analisi riguardanti i principali caratteri analitici. I risultati dei profili analitici delle prove condotte in fermentazioni miste ed in coltura pura sono riportati in Tabella 2.

Analytical profiles


	pH	Wort gravity attenuation (°P)	Apparent attenuation %	Real attenuation %	Ethanol % v/v	Volatile acidity g/L
US-05	4.73±0.01	1.72±0.30	85.81±2.45	69.76±2.00	4.7±0.22	0.24±0.03
WB-06	4.40±0.10	1.64±0.30	87.23±2.12	70.92±1.73	4.64±0.12	0.38±0.03
Belgian Wheat	4.63±0.10	2.15±0.15	82.26±1.22	66.88±1.00	4.72±0.51	0.25±0.01
US-05+<i>T. delbrueckii</i>	4.32±0.03	1.81±0.01	85.10±0.01	69.19±0.01	4.65±0.11	0.33±0.03
WB-06+<i>T. delbrueckii</i>	4.41±0.03	1.38±0.15	88.65±1.23	72.07±1.00	4.78±0.34	0.32±0.02
Belgian Wheat+<i>T. delbrueckii</i>	4.57±0.02	1.46±0.40	82.94±4.25	71.49±3.5	4.89±0.20	0.38±0.03
<i>T. delbrueckii</i>	4.29±0.02	6.11±0.43	46.80±0.01	38.05±0.01	2.62±0.12	0.41±0.01

Tabella 2 – Principali caratteristiche analitiche delle birre prodotte in fermentazione pura e mista.

Non ci sono state differenze significative tra le fermentazioni miste e quelle pure. Solamente la fermentazione pura di *T. delbrueckii* ha mostrato delle differenze significative soprattutto per quanto riguarda il contenuto di etanolo

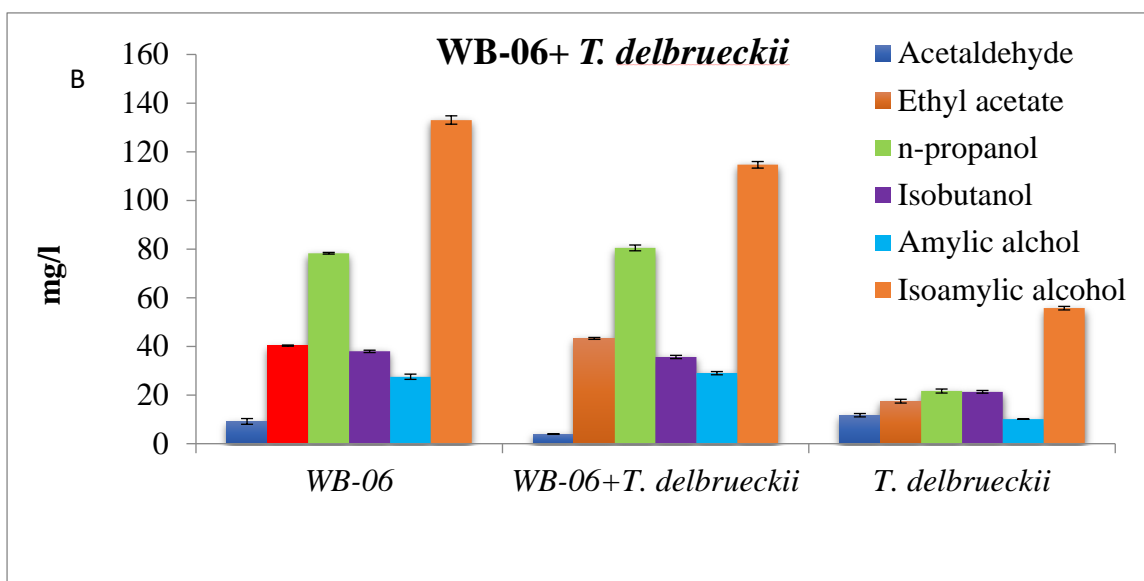
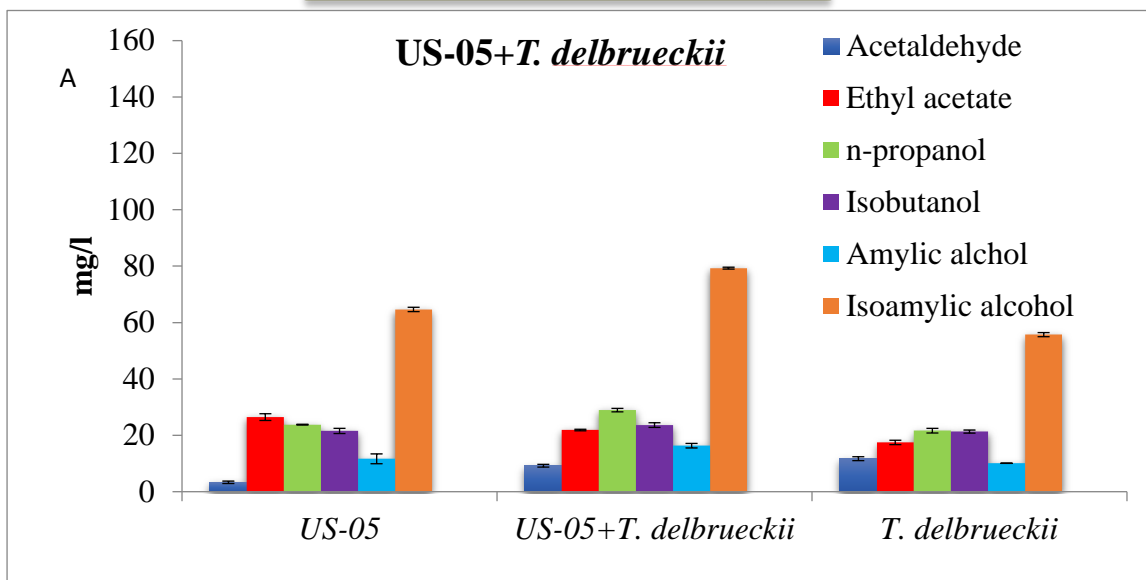
e di acidità volatile. Le fermentazioni miste, infatti, hanno mostrato un contenuto di etanolo che variava dal 4,65 al 4.89% (v/v) che non differiva significativamente dal contenuto di etanolo delle fermentazioni pure di *S. cerevisiae*. In accordo con quanto presupposto, il contenuto di etanolo della fermentazione pura di *T. delbrueckii* è stato decisamente più basso, di 2,62% (v/v), con un residuo di maltosio consistente. Questo basso contenuto di etanolo è stato già confermato da un alto valore di gradi plato (6,11°P rispetto alle fermentazioni miste di 1,38-1,81°P), che ha portato ad una attenuazione reale del 38,05% rispetto a 66,88-72,07% delle fermentazioni miste.

In riferimento all'acidità volatile prodotta, la fermentazione pura di *T. delbrueckii* ha portato alla produzione di un elevato livello di acido acetico, pari a 0,41g/L, nettamente superiore a quella delle fermentazioni pure di *S. cerevisiae* e delle fermentazioni miste, con l'eccezione della fermentazione pura del ceppo WB-06 e di quella mista con il Belgian Wheat entrambe di 0,38g/L.

4.4 PRINCIPALI COMPOSTI SECONDARI

I dati relativi ai principali composti secondari di fermentazione sono riportati nei grafici seguenti.

MAIN BY PRODUCTS



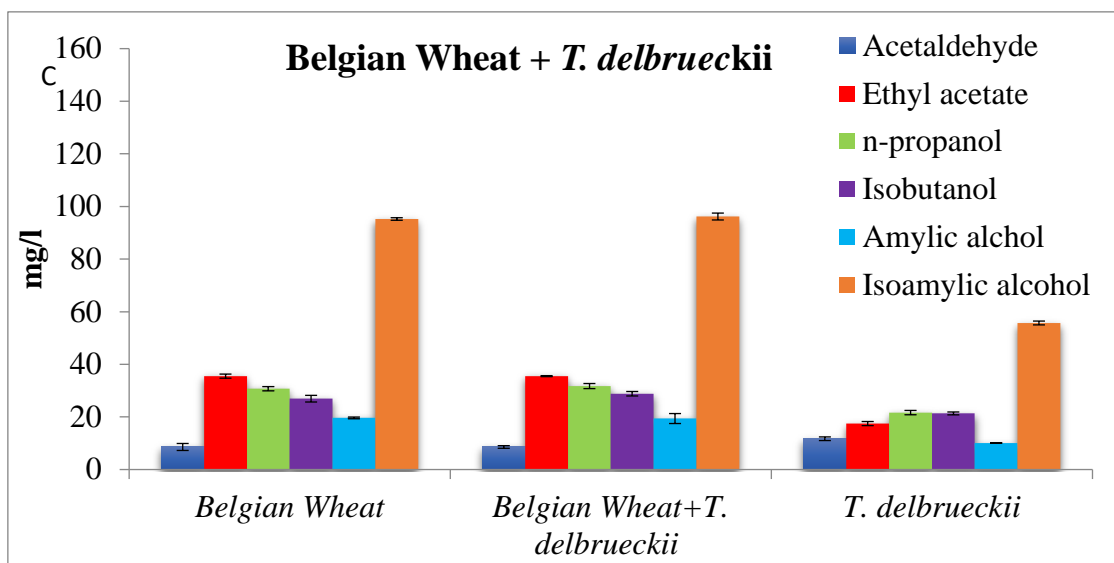


Figura 5 – Principali sottoprodotti di birra ottenuta mediante coltura pura e fermentazioni miste di ceppi di *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae*: A (US-05), B (WB-06), C (Belgian Wheat)

Tutte le birre ottenute con le fermentazioni miste hanno mostrato un contenuto superiore di acetaldeide rispetto alle rispettive fermentazioni pure di *S. cerevisiae*, ad eccezione di quella mista Belgian Wheat / *T. delbrueckii* (mista: 17,61 mg/L – pura: 20 mg/L).

La birra ottenuta con il solo ceppo di *T. delbrueckii* ha mostrato un contenuto più basso di tutti i composti secondari rispetto alle fermentazioni miste e pure, con la sola eccezione del contenuto di acetaldeide (22,59 mg/L).

La fermentazione mista *S. cerevisiae* US-05 / *T. delbrueckii* ha mostrato aumento di acetaldeide, propanolo, isobutanolo, alcol amilico e isoamilico rispetto allo starter.

Anche il contenuto di etil acetato, estere responsabile dell'aroma di fruttato o di solvente della birra (Pires et al. 2014) era più alto in tutte le fermentazioni miste rispetto a quelle pure.

C'è stato anche un significativo miglioramento della gradazione alcolica in tutte le fermentazioni miste rispetto a quelle pure di *S. cerevisiae*, ad eccezione del Belgian Wheat / *T. delbrueckii* che non ha mostrato variazioni significative del contenuto di isobutanolo e n-propanolo.

4.5 PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI

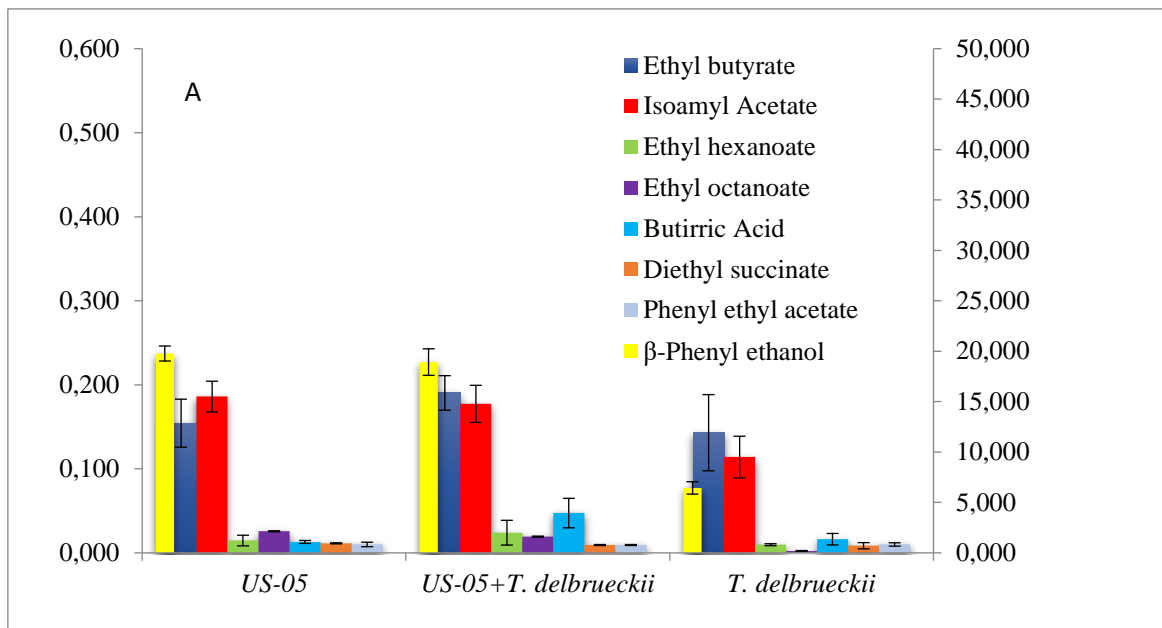
Nelle figure seguenti possiamo osservare i principali composti volatili ottenuti nella birra.

Nella fermentazione mista con il ceppo US-05 c'è stato un aumento di etil esanoato mentre il contenuto di β fenil etanolo è uguale a quello dello starter in coltura pura, inoltre c'è stato un aumento dell'acido butirrico che se in eccesso è responsabile di uno sgradevole sapore di burro rancido e di vecchio. Nelle fermentazioni miste con US-05 e WB-06, il contenuto di etil butirrato era più elevato rispetto a quello delle fermentazioni pure, mentre nella fermentazione mista con il Belgian Wheat non si sono avute variazioni del contenuto di questo composto rispetto a quella pura.

Il contenuto di isoamil acetato, nelle fermentazioni miste di Belgian Wheat è risultato significativamente più alto (0,482 mg/L) rispetto alle loro fermentazioni pure (0,354 mg/L).

Il contenuto degli esteri, come l'etil esanoato (aroma di mela), l'etil ottanato (aroma di mela e anice), il fenil etil acetato (aroma di miele, dolce), e dell'acido butirrico sono risultati significativamente più bassi nelle fermentazioni miste rispetto a quelle pure. Livelli più bassi si sono osservati anche per il dietil succinato (US-05 = 0,008, WB06 = 0,015, Belgian Wheat = 0,016 mg/L) e il β fenil etanolo (US-05 = 15,45, WB06 = 37,72, Belgian Wheat = 18,25 mg/L) nelle fermentazioni miste rispetto a quelle pure.

La birra ottenuta dalla fermentazione miste con *T. delbrueckii*, seppur con interazioni diverse, ha mostrato comunque un aumento dei principali esteri fruttati.



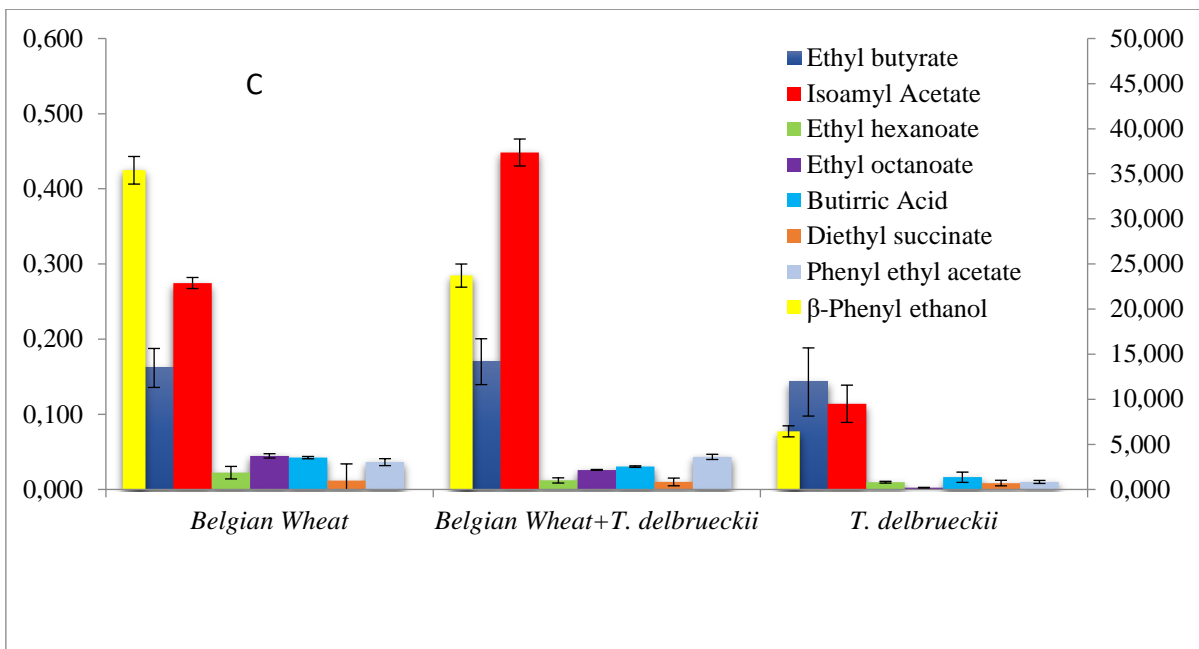
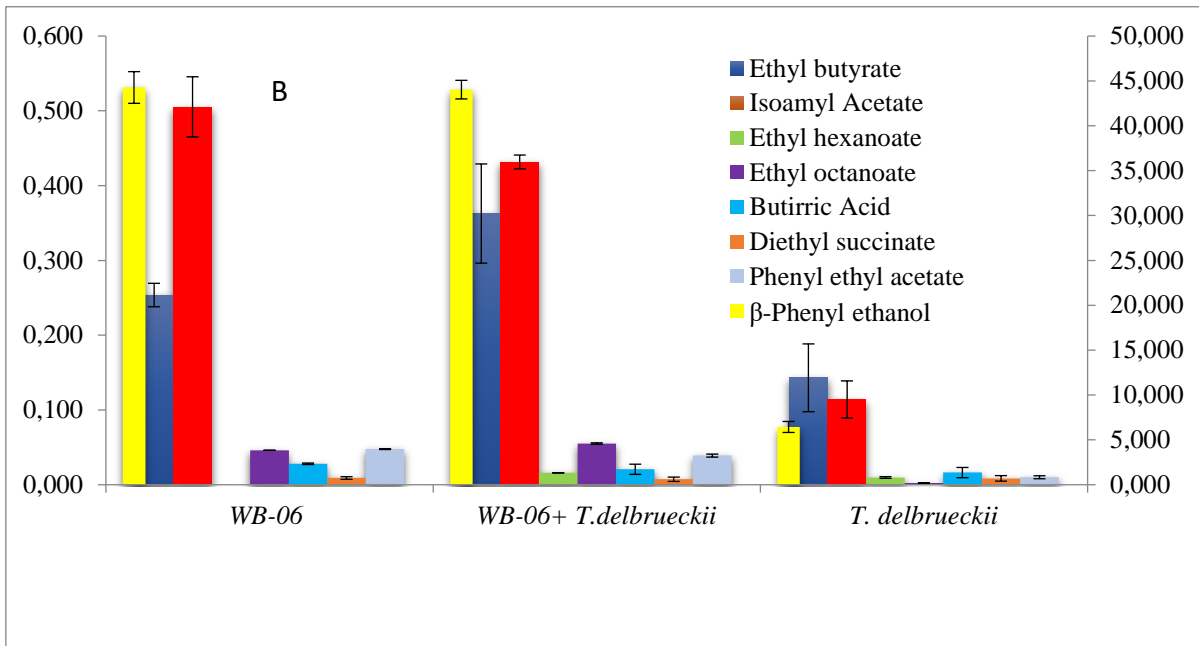


Figura 6 – Principali composti volatili in birra ottenuta mediante colture pure e miste di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*: A (US-05), B (WB-06), C (Belgian Wheat)

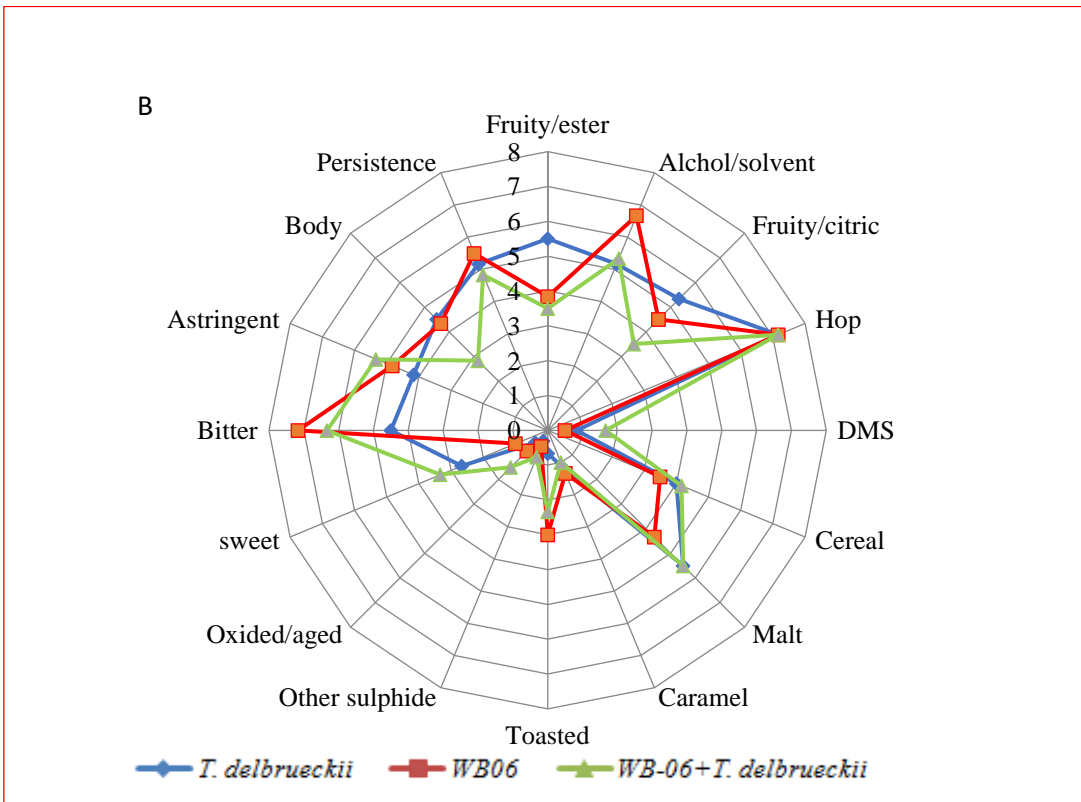
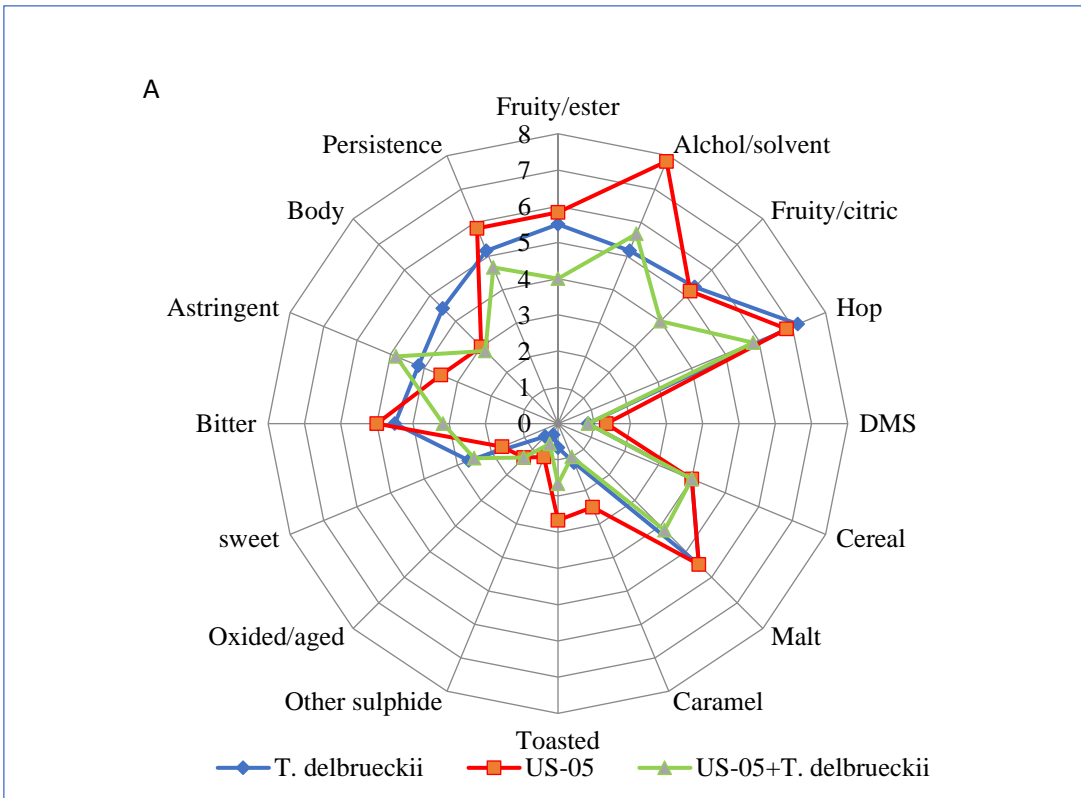
4.6 ANALISI SENSORIALE

Le birre sono state sottoposte ad analisi sensoriale per quanto riguarda i principali descrittori.

I risultati hanno mostrato per il ceppo US-05 note sensoriali meno intense mentre per il WB-06 note esaltate di cereale, malto e luppolo. Un effetto sul profilo sensoriale più marcato si è avuto con il Belgian Wheat, in cui la fermentazione mista si differenzia maggiormente per le note di fruttato/estere, di tostato e percezione di alcolico.

Di particolare interesse sono state anche le birre ottenute da coltura pura di *T. delbrueckii* caratterizzate da note di fruttato/estere, persistenza e corposità nonostante un basso contenuto di alcool (2,62% v/v).

Tutte le birre analizzate hanno mostrato differenze di aspetto visivo, in particolare la birra ottenuta con la fermentazione mista si è caratterizzata per un colore chiaro, limpido ed una schiuma persistente e compatta, aspetti molto importanti per definire una birra di qualità.



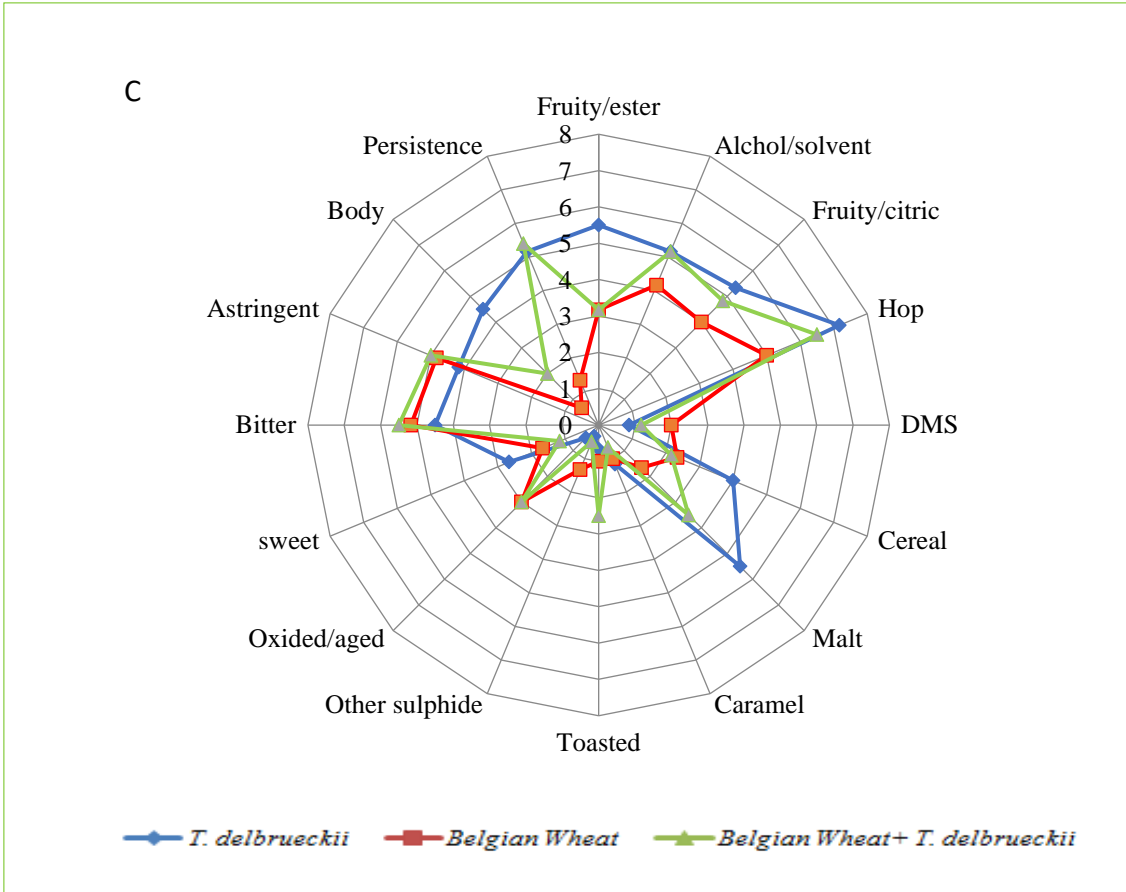


Figura 7 – Risultati del test sensoriale relativi all’odore e al sapore delle birre prodotte da colture pure e inoculi misti: A (US-05), B (WB-06), C (Belgian Wheat)



S. cerevisiae



T. delbrueckii



S. cerevisiae + *T. delbrueckii*

Figura 8 - Aspetto visivo delle birre ottenute mediante colture pure ed inoculo misto di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*.

CAPITOLO 5 – CONCLUSIONI

La birra è tra le bevande alcoliche più consumate al mondo, caratterizzata da una storia millenaria, assumendo forme e stili diversi, è riuscita ad essere apprezzata in ogni paese. Composta semplicemente da acqua, lieviti, malto d'orzo e luppolo, la birra è entrata nelle abitudini di consumo di moltissime persone e, nel corso degli anni, sempre più i birrai hanno cercato di trovare varietà di lievito che potessero migliorare la qualità della loro birra e fornirle specifiche note sensoriali.

Questo aspetto ha assunto particolare importanza con l'avvento sul mercato di birre di tipo artigianale, caratterizzate da un valore economico maggiore, dovuto alla lavorazione peculiare e alle specifiche ricette che i mastri birrai eseguono per immettere nel mercato prodotti di qualità che rispondono alle esigenze sempre più stringenti di consumatori consapevoli. La diversità e l'originalità delle birre, tra cui quelle artigianali, dipende da svariati fattori, soprattutto dalla scelta del lievito per i processi microbiologici che ne conseguiranno e per la microflora che si svilupperà durante i processi fermentativi e che caratterizzerà il prodotto finale. In particolare l'obiettivo del lievito inoculato è quello di aumentare l'efficienza della fermentazione e soprattutto migliorare la complessità sensoriale della birra finale prodotta, legata ai diversi composti volatili.

Il lievito “principe” della birra è il *Saccharomyces* ma anche lieviti non-*Saccharomyces* si dimostrano interessanti per l'intensità e la complessità aromatica capaci di apportare.

Nel presente studio è stato valutato il potenziale utilizzo di ceppi di *T. delbrueckii* in ambito brassicolo con lo scopo di migliorare la qualità della birra artigianale e anche per produrre birra con un ridotto contenuto alcolico ma appagante e con un buon profilo aromatico.

Il *Torulaspora delbrueckii* è stato inizialmente suggerito come potenziale lievito di birra da King e Dickinson. Hanno scoperto che, sebbene questa particolare varietà di *T. delbrueckii* provenisse dall'industria vinicola, è in grado di trasformare l'aroma del luppolo modificando sensibilmente la composizione alcolica monoterpénica.

L'utilizzo di questa specie di lievito nelle fermentazioni miste infatti è stata particolarmente studiata in ambito enologico (*Comitini et al. 2011*) e successivamente per il processo di fermentazione della birra (*Canonico et al. 2016*).

In questo studio le birre prodotte con *T. delbrueckii*, nelle fermentazioni miste e pure, hanno mostrato rilevanti caratteristiche per la produzione di birra di qualità.

La birra ottenuta con colture pure di *T. delbrueckii* ha mostrato una bassa gradazione alcolica mantenendo allo stesso tempo un gusto gradevole e aromatico, un colore più chiaro e una schiuma compatta e persistente.

La birra ottenuta con le fermentazioni miste, invece, è stata di particolare interesse per la produzione degli esteri fenil etil acetato (dolcezza floreale), etil esanoato (mela, aromi di frutta) ed etil ottanoato (mela, sapori di anice).

In conclusione, l'uso di *T. delbrueckii* nelle fermentazioni miste con *S. cerevisiae* è una strategia adatta per controllare la produzione di aromi durante la fermentazione della birra, e quindi per ottenere prodotti con composti aromatici diversi da quelli per le birre prodotte con puro starter di *S. cerevisiae*. Questi dati confermano che il lievito utilizzato può modulare la produzione di composti aromatici nelle birre finali anche in relazione alla composizione del mosto (Saerens et al., 2008; Verstrepen et al., 2003; Younis e Stewart, 1998).

CAPITULO 6 – BIBLIOGRAFIA

- **Albertin, W.; Chasseriaud, L.; Comte, G.; Panfili, A.; Delcamp, A.; Salin, F.; Marullo, P.; Bely, M.** Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94246.
- **Alves-Araújo, C., Almeida, M. J., Sousa, M. J., and Leão, C.** (2004) Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii*: Cellular and biochemical basis, *FEMS Microbiol. Lett.* **240**, 7–14.
- **Amaya-Delgado, L.; Herrera-López, E.J.; Arrizon, J.; Arellano-Plaza, M.; Gschaedler, A.** Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 875–881.
- **Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddard, M.** (2009) Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc, *Aust. J. Grape Wine Res.* **15**, 1–8.
- **Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G.,** 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 277–293
- **Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V.** (2008) Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide, *Int. J. Food Microbiol.* **121**, 201–207.

- **Basso, R.F., Alcarde, A.R., Portugal, C.B.,** 2016. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res. Int.* 86, 112–120.
- **Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D** (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122, 312-320.
- **Blanco, C.A., Rojas, A., Caballero, P.A., Ronda, F., Gomez, M. & Cabellero, I.** (2006). A better control of beer properties by predicting acidity of hop iso – α – acids. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 373 – 377.
- **Bottero L., Dabove L., Billia M.** (2009). *Manuale della birra*. Edizioni Gribaudo, Milano, p. 32.
- **Cabras P. & Martelli A.** (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin Editore pp. 557-598.
- **Canonico L, Comitini F, Ciani M** (2014). Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of craft beer refermentation. *Institute of Brewing & Distilling*. DOI 10.1002/jib.133.
- **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 Microbiol.* 56, 45–51.
- **Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M.** (2017). *Torulaspora Delbrueckii* Contribution in Mixed Brewing Fermentations with Different *Saccharomyces Cerevisiae* Strains. *International Journal of Food Microbiology*, 259, 7–13.

- **Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M.,** 2011. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–888.
- **Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M., Arroyo, T.,** 2013. Biotechnological potential of non-Saccharomyces yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitisvinifera* Cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* 236, 193–207.
- **Engan, S.** (1972) Organoleptic threshold values of some alcohols and esters in beer, *J. Inst. Brew.* 78, 33–36.
- **Etschmann, M., Huth, I., Walisko, R., Schuster, J., Krull, R., Holtmann, D., Wittmann, C., Schrader, J.,** 2015. Improving 2-phenylethanol and 6-pentyl- α -pyrone production with fungi by microparticle-enhanced cultivation (MPEC). *Yeast* 32, 145–157.
- **González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J. M., and Zamora, F.** (2015) Oenological consequences of sequential inoculation with non-Saccharomyces yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production, *Eur. Food Res. Technol.* 240, 999–1012.
- **Harrison MA** (2009). “Beer/Brewing.” *Encyclopedia of Microbiology.* 3rd Edition. Elsevier Inc., 2009.
- **Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S.** (2014). Not Your Ordinary Yeast: Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production Uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237.

- **King, A., Dickinson, J.R.,** 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499–506.
- **King, A., Dickinson, J.R.,** 2003. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Res.* 3, 53–62.
- **Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M.** (2013) *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine, *Food Microbiol.* 33, 271–281.
- **Lin Y.** (1975) Detection of wild yeasts in the brewery efficiency of differential media.
- **Liu, S.-Q.** (2015) *Brewing Microbiology.* (Hill, A. E. Ed.), Woodhead, London.
- **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.
- **Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., ... Suárez-Lepe, J. A.** (2014). Influence of Sequential Fermentation with *Torulaspora Delbrueckii* and *Saccharomyces Cerevisiae* on Wine Quality. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 915–922.
- **Lowe, D.P. & Arendt, E.K.** (2004). The use and effects of lactic acid bacteria on malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *J. Inst. Brew.*, 110: 163 – 180.

- **Manzano M, Buiatti S**, LA MICROBIOLOGIA APPLICATA ALLE INDUSTRIE ALIMENTARI (2007) cap.8
- **Manzoni M** (2006). Microbiologia industriale. Editore: Casa Editrice Ambrosiana.
- **Meilgaard, M. C.** (1975) Flavor chemistry of beer: Part 1: Flavor and thresholds of 239 aroma volatiles, Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 12, 107–117.
- **Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., Hutzler, M.**, 2016. Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast* 33, 129–144.
- **Miedaner, H., Narziß, L., and Wörner, G.** (1974) Über den Einfluss der Gärungsparameter Temperatur und Druck auf die Entwicklung einiger Gärungsnebenprodukte des Bieres, *Brew. Sci. Monatsschr. Brauwiss.* 27, 208–215.
- **Ono M, Kakudo Y, Ueda S** (1986). Automated analysis of hop bittering components with high performance liquid chromatography using precolumn switching. *Anal Sci* 2: 235-238.
- **Passoth, V.; Fredlund, E.; Druvefors, U.Ä.; Schnürer, J.** Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res.* 2006, 6, 3–13.
- **Peddie, H. A. B.** (1990) Ester formation in brewery fermentations, *J. Inst. Brew.* 96, 327–331.
- **Petruzzi, L., Carbo, M., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A.**, 2016. Brewers' yeast in controlled and uncontrolled fermentation, with a focus on novel, non-conventional and superior strains. *Food Rev. Int.* 32, 341–363.

- **Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T., Vincente, A.A.,** 2014. Yeast: The soul of beer's aroma and a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1937–1949.
- **Praet, T., Van Opstaele, F., Jaskula-Goiris, B., Aerts, G., & De Cooman, L.** (2012). Biotransformations of Hop-derived Aroma Compounds by *Saccharomyces Cerevisiae* upon Fermentation. *Cerevisia*, 36 (4), 125–132.
- **Ramirez, M. and Velazquez, R.** (2018) The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation* 4(4) 94
- **Rodrigues, J. E. A., Erny, G. L., Barros, A. S., Esteves, V. I., Brandão, T., Ferreira, A. A., Cabrita, E., and Gil, A. M.** (2010) Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods, *Anal. Chim. Acta* 674, 166–175.
- **Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.J., Ballester, J., Vichi, S., Guerin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H.,** 2012. Yeast- yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* 32, 243–253.
- **Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R.,** 2008. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 454–461.

- **Saerens S & Swingers JH** (2014). Enhancement of beer flavor by a combination of *Pichia* yeast and different hop varieties. United states. Patent application Publication. US 2014/0234480 A1
- **Sicheri, G.** (1983). Industrie agrarie. Hoepli, Milano
- **Steyer, D, Erny, C., Claudel, P., Riveill, G., Karst, F., & Legras, J-L.** (2013). Genetic Analysis of Geraniol Metabolism during Fermentation. *Food Microbiology*, 33, 228–234.
- **Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S., Nerancis, E.,** 2013. Use of non-Saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad*. 124, 415–426.
- **Takoi, K., Tokita, K., Sanekata, A., Usami, Y., Itoga, Y., Koie, K., ... Nakayama, Y.** (2016). Varietal Difference of Hop-derived Flavour Compounds in Late-Hopped/Dry-Hopped Beers. *Brewing Science*, 69, 1–7.
- **van Breda, V., Jolly, N., and van Wyk, J.** (2013) Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains, *Int. J. Food Microbiol.* 163, 80–88.
- **Yakobson, C.** (2010) Pure culture fermentation characteristics of *Brettanomyces* yeast species and their use in the brewing industry, Heriot–Watt University, Edinburgh. Available from: <http://brettanomycesproject.com/dissertation/> (last accessed September 2016).
- **Younis, O.S., Stewart, G.G.,** 1998. Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 104, 255–264.
- **Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R.** (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic

acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107(1), 221-230. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.008

- **Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H** (2003 b). “Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, p. 678-679.
- **Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufuor JP, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, Dalvaux FR** (2003 b). Flavor-active esters: Adding fruitness to Beer. *J. Biosci, Bioeng*, 96. 110-118.

FONTI BIBLIOGRAFICHE ELETTRONICHE

- www.cronachedibirra.it
- www.enciclopediadellabirra.it
- www.baladin.it
- www.fermentobirra.it
- www.mondobirra.org
- www.giornaledellabirra.it
- www.artedellabirra.it
- www.ilbirraiomatto.it
- www.thequeenscastle.com
- www.microbirrifici.org