



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse
Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e tecnologie alimentari

Produzione di diacetile durante la
fermentazione alcolica: l'effetto della gestione
del lievito nel processo di birrificazione

Relatore
Prof. Viviana Corich
Correlatore
Dott. Alberto Marzaioli

Laureanda
Teresa Famoso
Matricola n. 2006869

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

Indice

Riassunto.....	3
Abstract.....	4
1. La gestione del lievito nel processo di produzione della birra.....	5
1.1 Il processo di birrificazione.....	5
1.1.1 Produzione del mosto.....	5
1.1.2 Fermentazione.....	6
1.1.3 Finitura e confezionamento.....	7
1.2 Il lievito.....	8
2. Chimica del sapore della birra.....	10
2.1 Aromi della birra.....	10
2.2 Effetti organolettici del diacetile.....	12
3. Dichetoni vicinali: Diacetile e 2,3-Pentandione.....	14
3.1 Relazione tra diacetile e valina.....	14
4. La maturazione della birra come strumento di riduzione del diacetile.....	17
5. Il reinocolo seriale e la produzione di diacetile.....	19
6. Esperienza in Birra Peroni.....	21
7. Prova sperimentale.....	23
7.1 Materiali e metodi.....	23
7.2 Analisi chimiche.....	25
7.2.1 Alcolyzer.....	25
7.2.2 Analisi dei dichetoni vicinali (VDK).....	25
7.2.3 Rilevazione dell'amaro in HPLC.....	26
7.2.4 Conta cellulare e vitalità del lievito starter.....	26
8. Risultati.....	27
8.1 - E III TC 73.....	27
8.2 - D IV TC 53.....	29
8.3 - A VII TC 26.....	31
9. Discussione dei risultati.....	33
10. Conclusioni.....	36
Bibliografia.....	37

*“Di fatto, tutto sta scritto: la quantità, né troppo
né troppo poca che è l’avvio ideale.
Il benessere immediato sottolineato da un sospiro,
uno schioccar della lingua, o un silenzio altrettanto eloquente.
La sensazione ingannevole di un piacere che sboccia all’infinito...
Assaporiamo il colore, finto miele, sole freddo,
con tutto un rituale di circospezione e di attesa.”*

Philippe Delerm, 1998

Riassunto

Il diacetile è un dicetone vicinale, che si forma come sottoprodotto del metabolismo della valina da parte del lievito nella fermentazione alcolica, e contribuisce al profilo aromatico di molti prodotti fermentati, tra cui le birre a bassa fermentazione.

Il suo tipico sapore di burro è considerato un “*off flavor*” nelle birre in stile lager e la sua rimozione ha un grande impatto sul tempo e sul dispendio di energia nei birrifici.

In alcuni casi può anche indicare una contaminazione microbica quando gli standard igienici non sono conformi.

Il processo di riduzione del diacetile da parte del lievito non è ben compreso come quello di formazione, ma dipende da fattori quali le condizioni fisiologiche, la composizione della membrana cellulare, la temperatura e il pH.

Per migliorare l'efficienza complessiva del sistema di produzione si applicano diverse strategie, tra cui una minore formazione di diacetile nella birra verde e l'incremento della velocità di riduzione del diacetile in 2,3-butandiolo.

Il presente elaborato mette in luce la relazione tra l'abbattimento del diacetile in fermentazione e il numero di generazioni del lievito, verificando l'effettiva influenza sulla qualità finale della birra. A tal proposito è stato condotto uno studio in collaborazione con lo stabilimento di Birra Peroni (PD), in cui sono state sfruttate diverse generazioni e ceppi di lievito (*S. pastorianus*). La fermentazione delle cotte è stata analizzata e comparata con le cartelle di fermentazioni di altre cotte, presenti nell'archivio di Birra Peroni, e con i risultati dello studio di “*The effect of yeast generations on fermentation, maturation and volatile compounds of beer*” di Kucharczyk K. et al. (2020). La prova sperimentale ha confermato che i ceppi di terza e quarta generazione hanno una migliore performance, espressa in giorni, nella riduzione del diacetile, poiché l'adattamento del lievito al mosto avviene in tempistiche più brevi (riducendo la “*lag phase*”).

Il re-inoculo seriale e l'uso di lieviti di terza e quarta generazione sembrano essere una strategia naturale, semplice ed economica per il controllo del diacetile e la gestione del lievito nella produzione della birra.

Abstract

Diacetyl is a vicinal diketone, which is formed as a by-product of valine metabolism by yeast in alcoholic fermentation, and contributes to the aromatic profile of many fermented products, including low fermentation beers.

Its typical butter flavor is considered an "off flavor" in lager style beers and its removal has a great impact on the time and energy expenditure in breweries. Furthermore, in some cases it may also indicate microbial contamination when hygiene standards do not comply.

The process of reduction of diacetyl by yeast is not well understood as that of formation, but depends on factors such as physiological conditions, cell membrane composition, temperature and pH.

Several strategies are applied to improve the overall efficiency of the production system, which are based on minimising the formation of diacetyl in green beer and accelerating the reduction of diacetyl to 2,3-butanediol.

This paper highlights the relation between the reduction of diacetyl in fermentation and the number of generations of yeast, verifying the effective influence on the final quality of beer. In this regard, a study was carried out in collaboration with the Birra Peroni (PD) factory, in which several generations and strains of yeast (*S. pastorianus*) were exploited. The fermentation of brews has been analyzed and compared with the fermentations of other brews, present in the archive of Birra Peroni, and with the results of the study of "The effect of yeast generations on fermentation, maturation and volatile compounds of beer" by Kucharczyk K. et al. (2020). The experimental test confirmed that the third and fourth generation strains have a better performance, expressed in days, in the reduction of diacetyl, since the adaptation of yeast to must takes place in shorter times (reducing the "lag phase").

Serial re-inoculation and the use of third and fourth generation yeast seem to be a natural, simple and economical strategy for diacetyl control and yeast management in beer production.

1. La gestione del lievito nel processo di produzione della birra

1.1 Il processo di birrificazione

La birrificazione è il processo in cui viene prodotta la birra mediante macerazione di una fonte di amido in acqua con aggiunta di luppolo, seguita da fermentazione con ceppi specifici di lievito.

Il processo di birrificazione può essere suddiviso in tre grandi sezioni: produzione del mosto, fermentazione, finitura e confezionamento. Nello schema sottostante sono rappresentate tutte le fasi del processo produttivo (**figura 1**).



Figura 1. Fasi del processo di birrificazione

1.1.1 Produzione del mosto

Il mosto è un liquido zuccherino ottenuto dalla miscelazione in acqua, a specifici valori di pH e temperatura, di malto d'orzo macinato, o succedanei, e luppolo.

Il processo di produzione del mosto può essere suddiviso in diverse fasi, che vanno dalla macinazione del chicco d'orzo fino al Whirlpool (**figura 1**).

La prima fase del processo prevede che il chicco di malto venga macinato al fine di moltiplicare le superfici di contatto con l'acqua, facilitando le reazioni diastatiche degli enzimi al corpo farinoso che si verificano nelle successive fasi.

Nella fase di ammostamento viene miscelata al macinato acqua calda, tra i 35°C e i 62°C, e successivamente viene portato il composto alla temperatura di 75-77°C, in cui si attivano le α -amilasi e β -amilasi (figura 2). Tali enzimi degradano le catene polisaccaridiche di amido in zuccheri fermentescibili (mono-, di- e tri-saccaridi di maltosio) e zuccheri non fermentescibili (destrine e malto destrine).

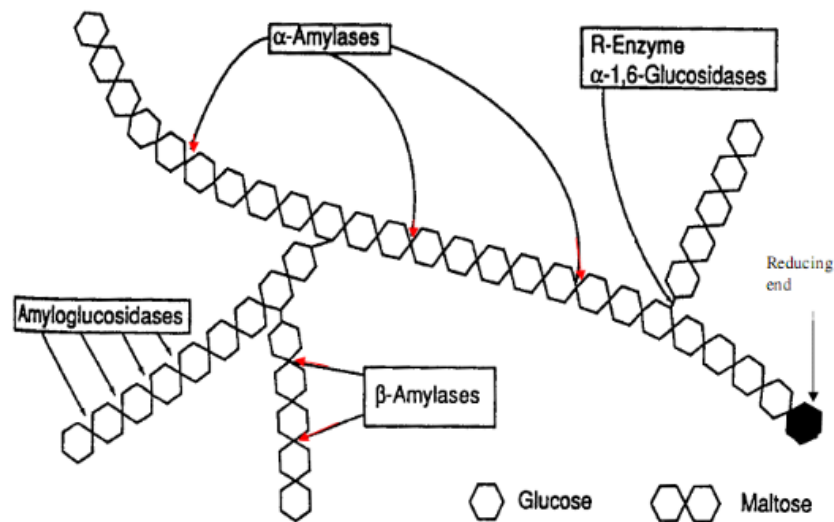


Figura 2. Meccanismo dell'attività amilasica (Manners et al, 1992)

Dopodiché si susseguono le fasi di separazione delle trebbie, aggiunta del luppolo e bollitura del filtrato al fine di sviluppare potere amaricante e aromatico; ma anche di allontanare tutte le sostanze indesiderate quali: complessi tanno-proteici (*Hot-trub*), dimetilsolfuro (DMS) ed altre sostanze volatili, il cui aroma ricorda i vegetali cotti.

Il mosto bollito viene chiarificato attraverso il *Whirpool*, un'apparecchiatura che sfruttando il flusso tangenziale permette la precipitazione dei coaguli insolubili (*cold-trub*). Infine, il filtrato viene raffreddato e ossigenato per essere inoculato con il lievito.

1.1.2 Fermentazione

Dopo l'aggiunta di lievito, avviene il processo fermentativo che si svolge in due fasi: la prima eseguita in aerobiosi per consentire la riproduzione del lievito, mentre la seconda viene svolta in anaerobiosi per degradare gli zuccheri fermentescibili in CO₂, alcol e calore. Al termine della fermentazione il lievito (*"bottom fermenting yeasts"*) tende ad

aggregarsi (flocculazione) e precipitare sul fondo del serbatoio, detto “tank di fermentazione”.

Il lievito “flocculato” viene recuperato e utilizzato per i successivi processi produttivi. Questo tipo di operazione, rispetto ad altri processi alimentari, viene eseguita solo nell’industria birraria, poiché permette un risparmio economico e la diminuzione della fase di latenza (intervallo di tempo trascorso tra l’inoculo del lievito e l’inizio della fermentazione).

Successivamente la birra rimane in una fase detta “*VDK REST*”, in cui le cellule di lievito rimaste in sospensione trasformano i diacetoni vicinali (*off-flavours*) in specie inodore.

In seguito avviene un’ulteriore fase di riposo, detta maturazione o “lagerizzazione” fredda, volta a chiarificare e confermare il sapore e l’aroma della birra.

1.1.3 Finitura e confezionamento

La birra viene filtrata e diluita per raggiungere il “*final gravity*” o grado commerciale, il quale esprime la gradazione saccarometrica finale della birra da cui viene ricavato il grado alcolico. Tale parametro dipende dal tipo di prodotto finale che si vuole ottenere. Nell’ultima fase il prodotto viene confezionamento secondo le richieste del mercato.

1.2 Il lievito

Nella birra, il lievito è considerato un ingrediente e viene riportato in etichetta nella lista degli ingredienti. Il suo ruolo è quello di fermentare gli zuccheri in etanolo ed anidride carbonica. In base al tipo di prodotto finale, si riconoscono due tipologie di processo fermentativo: “Lager” (bassa fermentazione) e “Ale” (alta fermentazione).

A livello industriale si prediligono birre a bassa fermentazione, che utilizzano i cosiddetti “*bottom fermenting yeasts*”, appartenenti alla specie *Saccharomyces pastorianus*, definita precedentemente nei primi anni del ‘900 come *Saccharomyces carlsbergensis*.

Tale specie si definisce “crio-tollerante”, poiché sfrutta temperature di fermentazione che variano tra i 5°C e i 15°C, per un tempo pari a 5-14 giorni. Inoltre è in grado di produrre altri composti solforati e di modificare quelli ottenuti precedentemente lungo il processo di ammostamento e di bollitura.

I “*bottom fermenting yeasts*” hanno la capacità di flocculare grazie alle proteine flocculine, prodotti dai geni “flo” e presenti a livello della parete, che formano ponti tra le cellule attraverso gli ioni calcio Ca^{2+} . In questo modo si creano i cosiddetti “fiocchi”, che si depositano sul fondo e costituiscono la fine della fermentazione.

Dopo la fermentazione, la biomassa di lievito viene prelevata dalla birra verde e conservata fino a quando non sarà necessaria per l’uso di successive fermentazioni, in un processo noto come “*serial repitching*”. Durante la reintroduzione seriale, la cellula di lievito passa attraverso diversi stati fisiologici: dalla crescita attiva (divisione cellulare durante la propagazione e le prime fasi della fermentazione) alle fasi stazionarie temporanee (durante la fermentazione), per culminare in una fase stazionaria prolungata durante la conservazione in un cono di fermentazione (Jenkins et al. 2003).

Il lievito recuperato viene utilizzato fino a 7-9 fermentazioni successive con simile gravità iniziale. Durante il ripasso in serie, la fisiologia del lievito può deteriorarsi e può verificarsi una contaminazione microbica. Lo stato fisiologico del lievito prima dell’avvio della fermentazione determina la consistenza e la qualità del prodotto finale (Axcell & O'Connor-Cox, 1996). A tal proposito si analizzano la velocità di avvio della fermentazione, il numero di cicli di coltura in serie, stoccaggio e re-inoculo (o “numero di generazione”), il quale può influenzare la flocculazione.

La coltivazione prolungata può, inoltre, influenzare la variabilità genotipica, causando cambiamenti genetici nel profilo di flocculazione di un particolare ceppo (Jin & Speers, 2000; Verstrepen et al., 2003; Lodolo et al., 2008; Vidgren & Londesborough, 2011).

E' bene ricordare che la biomassa cellulare aumenta grazie alla riproduzione vegetativa attraverso il sistema di gemmazione ("*budding*"): si forma una gemma per estroflessione del citoplasma (a seguito di una degradazione della parete in un punto specifico), la quale si accresce fino a staccarsi dalla cellula madre (**figura 3**).

Il distacco della cellula figlia produrrà una cicatrice a base di chitina sulla parete della cellula madre, che non permetterà la formazione di altre gemme (Bitterman et al, 2003).

Nei capitoli successivi verrà spiegato come tale processo influenzerà direttamente e indirettamente sulla produzione e riduzione dei dichetoni vicinali nella produzione di birra a bassa fermentazione.

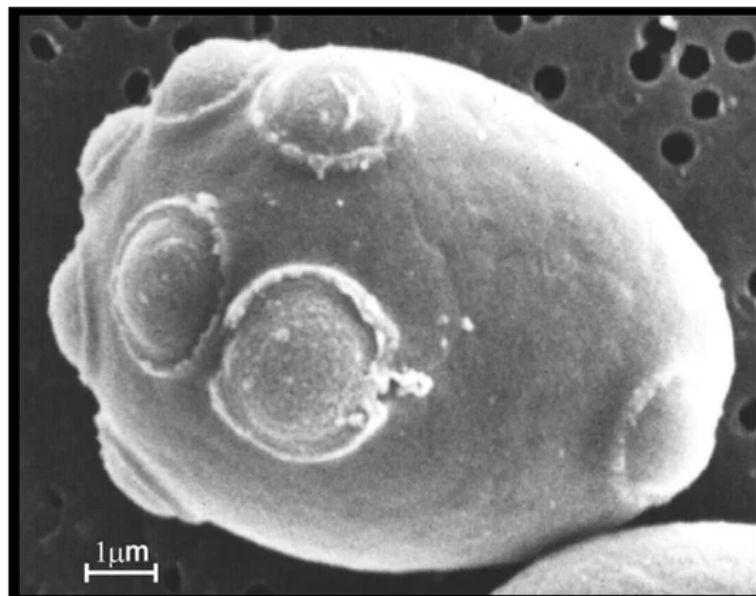


Figura 3. Micrografia elettronica di una cellula di lievito in fase di gemmazione contenente cicatrici di gemmazione e di nascita. (Stewart G, 2016).

2. Chimica del sapore della birra

Durante la fermentazione del mosto si formano principalmente etanolo, anidride carbonica e glicerolo (**figura 4**), i quali contribuiscono alle proprietà della birra. Il sapore e l'aroma sono in gran parte influenzati dai prodotti metabolici secondari del ceppo di lievito utilizzato, dalla composizione del mosto e dalle condizioni di fermentazione. (Meilgaard et al., 1975)

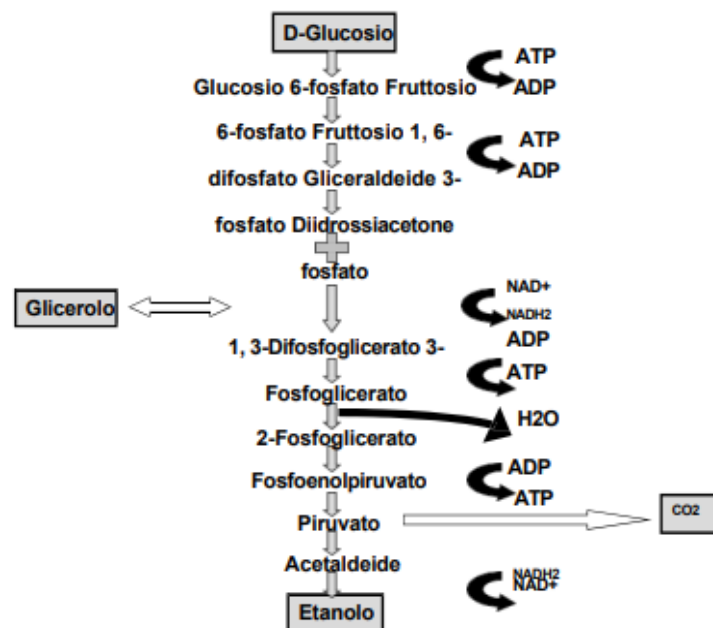


Figura 4. Formazione di etanolo, glicerolo e CO₂ dal glucosio attraverso la via di Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Da una molecola di glucosio si formano due molecole di etanolo e CO₂ o glicerolo.

2.1 Aromi della birra

Il profilo aromatico si compone di metaboliti secondari volatili, provenienti dal metabolismo degli aminoacidi, e si differenziano in alcoli superiori, esteri, dichetoni vicinali (VDK), carbonili e composti solforati. Vengono prodotti dal lievito durante la fermentazione, sia come intermedi sia come sottoprodotti, determinando la qualità finale della birra.

I composti attivi sul piano aromatico devono essere mantenuti entro certi limiti. In caso contrario, un singolo composto o un gruppo di composti (ad esempio, i VDK) possono

predominare e pregiudicare l'equilibrio aromatico della birra. Inoltre, i composti aromatici, come gli esteri, spesso agiscono in sinergia con altri componenti per influenzare l'aroma della birra in concentrazioni ben inferiori ai loro valori soglia individuali (Stewart G.G., 2017).

Nella **tabella 1** sono presenti i principali esteri e alcoli superiori nella birra; mentre nella **figura 5** sono riportate le principali vie metaboliche che li sintetizzano.

Congeneri di aromi	Soglia organolettica (mg/L)
Esteri	
Acetato di etile (fruttato, simile a un solvente)	3.0
Acetato di isoamile (aroma fruttato di banana)	1.2
Acetato di isobutile (ananas)	0.7
Caproato di etile (mela acida)	0.22
Caprilato di etile (frutta acida)	0.9
Acetato di fenile ed etile (rosa, miele, fruttato)	0.4
Alcoli superiori	
Alcool amilico (Alcool)	65
Isobutanolo (solvente)	70
Propanolo (solvente)	200
Metil butanolo (Banana, medicinale)	65
Alcool fenilico (Rose, dolci, profumo)	125

Tabella 1. Principali esteri e alcoli superiori nella birra (Meilgaard, 1975). [4]

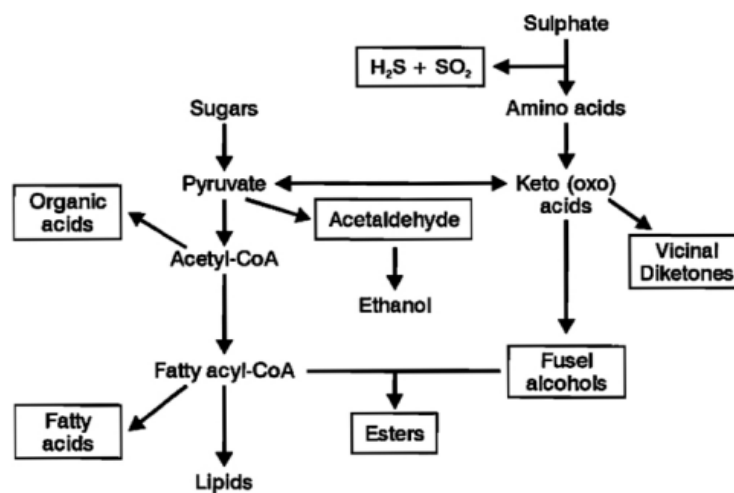


Figura 5. Principali vie metaboliche attraverso le quali i lieviti sintetizzano alcoli superiori, esteri, composti solforati, VDK, acetaldeidi ed etanolo (Stewart et al., 2009). [1]

2.2 Effetti organolettici del diacetile

I dicetoni vicinali hanno un effetto significativo sul sapore, sull'aroma e sulla bevibilità della birra (Wainwright, 1973).

Il diacetile attribuisce alla birra un sapore di latte stantio simile al burro ("*butterscotch*"), con una soglia gustativa percepita maggiormente intorno a 0,1-0,2 mg/L nelle birre lager (Stewart G.G., 2017) fino a valori di 1,7 mg/L (Krogerus e Gibson, 2013). La soglia avvertita cambia in base al contesto geografico, all'etnia, alla dieta e se l'assaggiatore selezionato è un fumatore (Inoue, 2008).

Generalmente la presenza di diacetile in quantità superiori alla soglia olfattiva è considerata un difetto, poiché il sapore è indesiderabile in molti stili di birra e alcune volte può anche indicare una contaminazione microbica quando gli standard igienici sono inadeguati (Stewart G., 2017).

Le birre lager sono caratterizzate da profili gustativi freschi e puliti, di conseguenza il diacetile viene considerato come un "*off-flavours*" in quanto appesantisce il complesso aromatico. Dunque, si gestisce la fermentazione in modo da ridurre al minimo i livelli di diacetile nel prodotto finale.

Dal metabolismo del lievito (**figure 6 e 7**), si può affermare che il lievito è coinvolto indirettamente nella produzione di diacetile (prodotto solo quando la valina è in eccesso) e direttamente nella sua eliminazione. Infatti, il lievito è in grado di assimilare e ridurre il diacetile in 2,3-butandiolo, che ha soglia olfattiva maggiore intorno a 4500ppm e non influisce sul sapore e l'aroma (Hughes et al., 2001).

Dopo la rimozione del lievito, è importante tenere sotto controllo qualsiasi precursore rimasto, in quanto può essere convertito in diacetile durante la conservazione della birra e influenzare direttamente il gusto finale (Gibson et al., 2018).

Dagli studi condotti da Gibson B. (2013) e Krogerus K. et al. (2018), sono state proposte e attuate varie metodiche per ridurre la concentrazione di diacetile residuo durante la fermentazione della birra. Esse si basano su manipolazioni genetiche del genoma del lievito, introducendo mutazioni, al fine di modificare il metabolismo del lievito.

Un altro studio condotto nel 2020 da Kucharczyk K. et al. dimostra l'influenza del numero di generazioni di lievito ("*serial repitching*") sull'attività fermentativa e maturazione, sul contenuto di composti volatili della birra e sulla vitalità della biomassa di lievito in processi su scala industriale.

In particolar modo, gli esperimenti si collegano al sistema dell'economia circolare e della sostenibilità economica nei processi industriali; poiché il lievito viene sfruttato al massimo senza compromettere la qualità finale della birra.

Questo studio è stato oggetto della prova sperimentale svolta nella sede Birra Peroni di Padova e viene approfondito nei capitoli successivi.

3. Dichetoni vicinali: Diacetile e 2,3-Pentandione

Il diacetile e il 2,3-pentandione sono sottoprodotti naturali derivati dalla decarbossilazione ossidativa spontanea non enzimatica degli α -acetoidrossiacidi, nella via biosintetica della valina e dell'isoleucina (**figura 6**), prodotti dal lievito durante la fermentazione della birra.

Il diacetile, come riportato nel capitolo precedente, è noto per il suo sapore simile al burro, mentre il 2,3- pentandione ha un sapore più simile a quello delle caramelle “mou”, ma con una soglia di sapore più alta di circa 0,9-1,0 ppm (Meilgaard,1975).

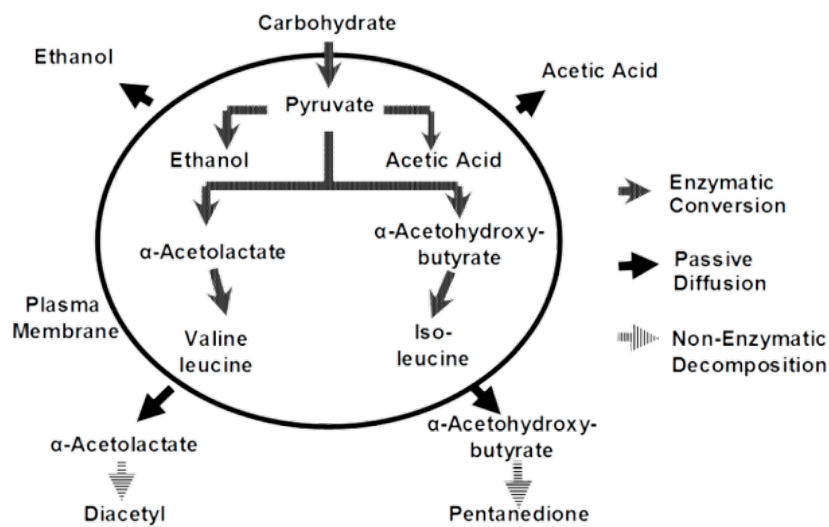


Figura 6. Formazione di diacetile e 2,3-pentandione

3.1 Relazione tra diacetile e valina

La performance fermentativa e la crescita del lievito sono strettamente legate all'assimilazione e al metabolismo dei composti azotati presenti nel mosto, come avviene nel caso della sintesi di valina e della formazione di diacetile.

Nella via della valina, l' α -acetolattato viene prodotto dal lievito e secreto nel mosto dove avviene la decarbossilazione spontanea (in modo ossidativo o non ossidativo) con formazione rispettivamente di diacetile o acetoina e rilascio (in entrambi i casi) di anidride carbonica. La produzione di diacetile aumenta con l'aumento della biosintesi di valina, che a sua volta dipende dal fabbisogno e dall'accesso della cellula alla valina e di altri aminoacidi. Pertanto, se il contenuto di aminoacidi liberi del mosto risulta

insufficiente, il lievito produrrà maggiormente diacetile durante la fermentazione (Krogerus e Gibson, 2013).

La concentrazione di diacetile dipende da una serie di fattori, tra cui:

- velocità di formazione del precursore α -acetolattato, da parte del lievito;
- decarbossilazione spontanea dell'acetoidrossiacido in diacetile;
- rimozione del diacetile, da parte del lievito, attraverso l'azione di vari enzimi reductasi.

Nella performance di fermentazione, bisogna considerare anche il tasso di assorbimento della valina, in quanto la sua concentrazione intracellulare influenza la produzione di diacetile attraverso una forte inibizione dell'enzima acetoidrossiacido sintasi (AHAS). Tale enzima è responsabile della catalizzazione del piruvato in α -acetolattato (**figura 7**) (Magee et al., 1968; Barton et al., 1992). Di conseguenza più valina sarà presente nelle cellule di lievito, meno α -acetolattato sarà sintetizzato (poiché l'enzima catalizzatore sarà inibito) e si formerà meno diacetile.

La valina rientra nel gruppo B della classificazione di Jones e Pierce (**tabella 2**) e il suo assorbimento avviene lentamente nelle prime 12 ore di fermentazione, poiché nella cellula vengono assorbiti prima la maggior parte degli amminoacidi del gruppo A (Garcia et al., 1994; Perpète et al., 2005).

Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo D
Assorbimento rapido	Assorbimento moderato	Assorbimento lento	Nessun assorbimento
Acido glutammico Acido aspartico Asparagina Glutammina Serina Treonina Lisina Arginina	Valine Metionina Leucina Isoleucina Istidina	Glicina Fenilalanina Tirosina Triptofano Alanina Ammoniaca	Proline

Tabella 2. Classificazione degli aminoacidi del mosto in base al loro tasso di assorbimento in *Saccharomyces cerevisiae* (Jones et al, 1964)

Altri studi hanno dimostrato l'esistenza di svariate proteine di membrana responsabili del trasporto della valina nella cellula di lievito (De Boer et al., 1998; Didion et al., 1998; Kodama et al., 2001). Tali trasportatori non sono specifici, ma sono utilizzati

anche da altri amminoacidi, soprattutto a catena ramificata come leucina e isoleucina (Stanbrough M. e Magasanik B., 1995).

Tuttavia non è ancora ben conosciuto il trasporto intracellulare della valina, ma è stato ipotizzato l'utilizzo del trasporto attivo della leucina nell'assorbimento mitocondriale.

In un'ottica di riduzione del diacetile, un primo approccio potrebbe essere quello di modificare il tasso di assorbimento della valina. È stato dimostrato che abbassando il rapporto di leucina, isoleucina e valina nel mosto; l'assorbimento della valina è maggiore, mentre la quantità di diacetile prodotto risulta essere minore.

L'applicazione industriale, tuttavia, risulterebbe difficile e potrebbe anche aumentare la sintesi di 2,3-pentanedione, dato che viene prodotto dal lievito negli intermedi della sintesi dell'isoleucina (**figura 7**). Si deduce che abbassando il rapporto dei tre aminoacidi, sarà favorita la sintesi di isoleucina e in modo analogo anche la sintesi di 2,3-pentanedione.

I processi descritti precedentemente sono reazioni di ossido-riduzione, che svolgono una potenziale via per il bilanciamento del potere riducente da parte del lievito (poiché la via gliceropiruvica viene inibita dal calo degli zuccheri nel mosto). Infatti, nella cellula, il diacetile può essere trasformato in acetoino e successivamente convertito in 2,3-butandiolo.

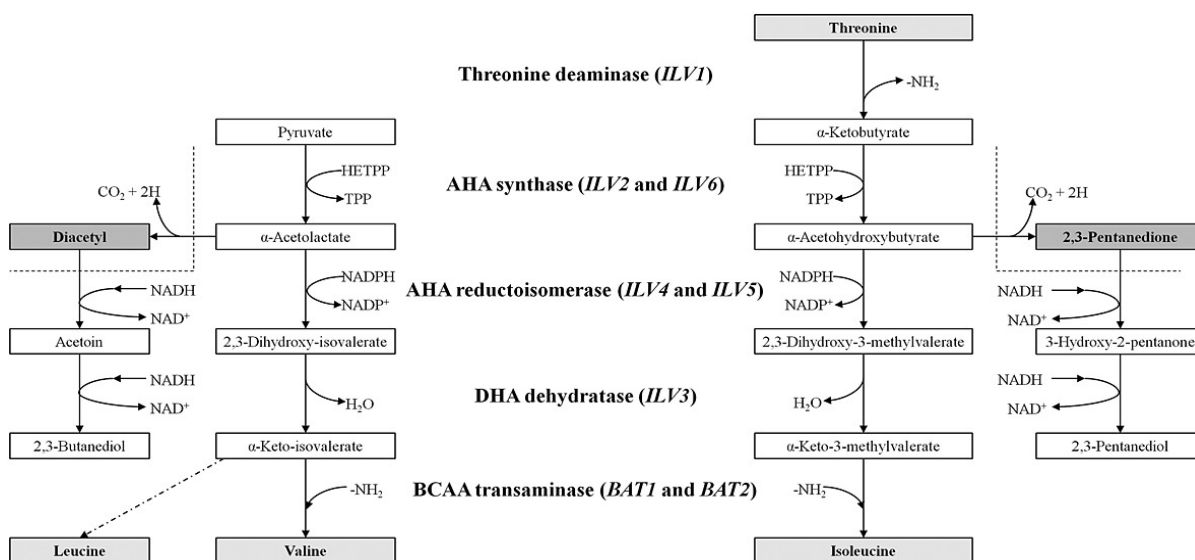


Figura 7. Le vie di sintesi e riduzione di valina, isoleucina, diacetile e 2,3-pentandione. (Nedović et al., 2005)

4. La maturazione della birra come strumento di riduzione del diacetile

Lo scopo principale della maturazione aromatica (o fermentazione secondaria) è quello di rimuovere i dichetoni vicinali, diacetile e 2,3-pentanedione, e i loro precursori, α -acetolattato e α -acetoidrossibutirrato.

Il diacetile viene ridotto dalle reductasi del lievito a 2,3-butandiolo tramite l'acetoina; mentre il 2,3-pentanedione viene ridotto a 2,3-pentandiolo tramite l'acetilettilcarbinolo (**figura 7**). Nel complesso i VDK vengono assimilati e ridotti in dioli, che hanno soglie di percezione molto più alte rispetto ai dichetoni vicinali e non influiscono sul sapore e sull'aroma finale della birra (Nedović et al., 2005).

Sebbene le ultime fasi della fermentazione e maturazione siano fondamentali per la riduzione del diacetile e la qualità complessiva della birra, questo aspetto del processo non è stato ancora ben identificato (Garcia et al., 1994). Tale processo avviene rapidamente ed è influenzato da diversi parametri di fermentazione (temperatura e ossigenazione di lievito e mosto), che modificano la composizione della membrana del lievito. Inoltre, bisogna tenere in considerazione le caratteristiche di flocculazione e sedimentazione del lievito selezionato (Stewart et al., 2016).

Nel cosiddetto “riposo del diacetile” (“*VDK rest*”) può essere sfruttato l'aumento del tasso di decarbossilazione dell' α -acetolattato a diacetile in presenza di lievito a temperature più elevate, poiché si tratta di una reazione di primo ordine: maggiore sarà la temperatura e minore sarà il periodo di maturazione (Garrett O., 2011).

Diverse pubblicazioni (Rondags et al., 1999; Kobayashi et al., 2005) hanno individuato una relazione tra il pH e il tasso di reazione per la decarbossilazione ossidativa dell' α -acetolattato in diacetile. Nello specifico si è visto come al diminuire del pH si rilevano tassi di reazione più elevati, che potrebbero portare alla riduzione del tempo di maturazione e della quantità finale di diacetile.

Un altro parametro da considerare è la composizione della membrana cellulare del lievito (Krogerus e Gibson, 2013). La letteratura vigente ha osservato come la

formazione e la quantità di cicatrici durante la riproduzione del lievito facciano sì che venga ridotto il riassorbimento dei dicetoni vicinali nella fase di maturazione.

Come detto nei capitoli precedenti, le cosiddette cicatrici o “*scars*” (**figura 3**), sono costituite da chitina, un polimero molto resistente che tende ad indurire la superficie cellulare nel punto di formazione della ferita (Chaudhari et al., 2012; Eigenfeld et al., 2021) modificando la permeabilità della cellula (Kalayu G., 2019).

5. Il reinocolo seriale e la produzione di diacetile

Il re-inocolo seriale o reintroduzione seriale è una pratica comune nell'industria birraia. Il lievito raccolto alla fine della fermentazione viene impiegato nuovamente nelle fermentazioni successive.

Il numero di re-inoculi varia tra i birrifici. Alcuni birrifici hanno dimostrato come il lievito lager può essere reintrodotta fino a 20 volte alle stesse condizioni di fermentazione e gravità del mosto (Stewart, 2009; Kordialik-Bogacka e Diowski 2013; Bühligen et al., 2013). Tuttavia, la coltura di lievito è sottoposta a stress costanti che possono provocare danni reversibili o irreversibili, in relazione al ceppo (Layfield e Sheppard, 2015).

È stata affermata una riduzione della “*viability and vitality*” cellulare e una modifica delle attività fisiologiche delle cellule di lievito. Di conseguenza le cellule “invecchiate” possono provocare la fuoriuscita di composti intracellulari nel prodotto fermentato (Wang et al., 2019). Per “*viability and vitality*” si intendono, rispettivamente, la percentuale di cellule viventi in una popolazione di lievito e la loro capacità fisiologica. Entrambi sono importanti indicatori per esprimere lo stato fisiologico delle cellule di lievito.

Lo studio di Speers e Stokes (2009) afferma che la re-inocolo seriale fino a 13 volte non ha influenzato il contenuto di diacetile e 2,3-pentanedione. Al contrario, in Sigler et al. (2009), il VDK è aumentato nel corso delle ripetizioni con l'aumento dell'osmolarità del mosto (le cellule lottano con gradienti di concentrazione elevati).

Sulla base delle citazioni precedenti, Kucharczyk K. et al. (2020) hanno svolto degli esperimenti sull'effettiva influenza delle diverse generazioni di lievito sulla qualità finale della birra. Per il “*re-pitching*” sono state utilizzate quattro generazioni (1^a, 2^a, 3^a e 4^a) di lievito *Saccharomyces pastorianus*, mentre i processi (fermentazione e maturazione) sono stati condotti nelle stesse condizioni tecnologiche industriali di temperatura e pressione.

Sebbene le differenze tra le generazioni siano lievi, i cambiamenti sono stati statisticamente significativi, in quanto il contenuto di diacetile è risultato maggiore di circa il 30% per la quarta generazione rispetto a quelle precedenti.

Nel complesso viene affermato che le varie generazioni utilizzate non hanno influito in modo significativo sulla qualità finale della birra.

Questo studio è stato il primo su scala industriale a sperimentare l'influenza del numero di generazioni di lievito sulla qualità della birra e, per tal motivo, sono necessari ulteriori studi e confronti con prove simili per confutare questa teoria.

Ciononostante, i dati della letteratura concordano nell'affermare che la pratica di reinoculo riduce la fase di latenza del processo fermentativo, importante per la riattivazione delle nuove cellule nel mosto di birra.

6. Esperienza in Birra Peroni

Al fine di approfondire la relazione tra l'abbattimento di diacetile in fermentazione e il numero di generazioni del lievito è stato svolto un tirocinio presso lo stabilimento Birra Peroni di Padova. L'intero progetto formativo è stato supervisionato dal dott. Marzaioli, *Brewing Manager*, con il supporto del personale di fabbricazione e del dott. Lighezzolo, *Laboratory Supervisor*, per la parte svolta in laboratorio.

Il programma è stato suddiviso nelle seguenti fasi:

- Fase 1: analisi delle cartelle di fermentazione ed inserimento dei dati;
- Fase 2: lavoro in affiancamento agli operatori di fabbricazione e laboratorio:
 - analisi del mosto (°Pp, pH, colore);
 - analisi della fermentazione (riduzione della densità, analisi dell'alcol prodotto, pH giornaliero);
 - analisi dei campioni (diacetile e conta cellulare);
- Fase 3: discussione e conclusione dei risultati.

La prima fase è stata dedicata all'analisi di cartelle di fermentazione nell'archivio di Birra Peroni (PD), a cui è seguita una correlazione tra le performance di fermentazione (tempo di degradazione degli zuccheri e abbattimento del diacetile) e la generazione del lievito. Nella fattispecie sono state analizzate 500 cartelle di fermentazione e i risultati ottenuti sono i seguenti (**tabella 3**).

N° campioni (%)	Generazione lievito	Fermentazione*	VDK*	Giorni al raffreddamento
7.99	1	9,3	3,8	13,1
7.99	2	6,9	4,4	11,3
20.47	3	6,5	3,8	10,3
39.57	4	6,9	3,5	10,4
13.84	5	7,3	3,5	10,8
2.14	6	7,2	4,4	11,6
4.87	7	7	4,9	11,9
2.14	8	7,1	5,5	12,6
0.97	9	7,9	6,4	14,3

*I valori di fermentazione e di VDK sono relativi alla durata del processo, espressa in giorni.

Tabella 3. Correlazione tra le performance di fermentazione e la generazione del lievito.

I risultati dell'analisi hanno dimostrato che la 3^a, 4^a e 5^a generazione sono le migliori in quanto, nel giro di circa 10 giorni, è stata rilevata una media di 3-4 giorni nell'abbattimento dei VDK. Questa differenza è di elevata importanza in quanto influenza anche la capacità della cantina di fermentazione. Infatti, un aumento di 24-48 ore del “*VDK REST*” determina una diminuzione della disponibilità dei serbatoi per la produzione di birra, con una riduzione della capacità di circa il 15-20%. Si deduce che i lieviti di generazione più alta (7^a e 8^a) e quelli più bassa (1^a e 2^a) richiedono tempistiche più lunghe, dai cinque ai sette giorni; poiché è presente una maggiore difficoltà ad adattare il metabolismo della cellula alle condizioni di fermentazione, la cosiddetta “*lag phase*” del ciclo cellulare.

Nelle fasi due e tre del programma è stata svolta una prova sperimentale, basata sullo studio “*The effect of yeast generations on fermentation, maturation and volatile compounds of beer*” di Kucharczyk K. et al. (2020), descritto nel capitolo precedente. Tuttavia, in questo caso sono state sfruttate diverse generazioni e ceppi di lievito (*S. pastorianus*) presenti nello stabilimento di Birra Peroni (figura 8).



Figura 8. Stabilimento di Birra Peroni Padova

7. Prova sperimentale

In questo capitolo viene illustrato come è stata svolta la prova sperimentale.

È doveroso promettere che avendo attuato l'intero processo secondo le procedure attuali di Birra Peroni per la realizzazione di tre cotte di birra, è stato oscurato il “*brand*” di appartenenza delle cotte.

7.1 Materiali e metodi

Per la prova sperimentale sono stati selezionati tre ceppi di lievito (*S. pastorianus*), denominati: E III TC-62, D IV TC-34, A VII TC-63. Le generazioni sono state classificate in numeri romani, mentre la sigla “TC-numero” identifica il *tank* di fermentazione della cotta.

I principali parametri analizzati sono stati: tempo (ore), temperatura (°C), conta cellulare (10^6 cells/ml), pH ($-\log [H^+]$), diacetile e 2,3-pentanedione (mg/L).

La rilevazione dei dati è stata eseguita ogni 24 ore fino al raggiungimento del limite desiderato del rapporto diacetile su 2,3-pentanedione. Tale valore è diverso dal tipo di brand e di stile birrario. In questo caso è stato utilizzato lo stesso brand, cosiddetto “*Lager 1*”, per tutte le cotte e il limite considerato di VDK è inferiore ai 50 ppb.

Le analisi svolte durante la fermentazione sono state suddivise in due momenti: giornalieri, eseguite dall'operatore in cantina (primo cantiniere), e alla fine della fermentazione, eseguite in laboratorio su campioni prelevati dagli appositi *tank*.

Giornalmente sono stati rilevati:

- grado Plato (°Pp) con densimetro digitale (misura della densità espressa in percentuale peso/peso);
- temperatura rilevata ogni 12 ore con sonde presenti all'interno dei serbatoi;
- pH con pH-metro digitale. Tipicamente è stata rilevata una riduzione da 5,3 a 4,1-4,3 al termine della fermentazione.

In laboratorio sono state eseguite analisi complete sul profilo complessivo dei campioni attraverso Alcolyzer, Gas-cromatografia (dichetoni vicinali), HPLC o cromatografia liquida ad alta prestazione (amaro espresso in IBU) e counter ottico (conta cellulare e vitalità del lievito starter).

Di seguito sono riportate alcune immagini raccolte durante il tirocinio in Birra Peroni.



Figura 9 e 10. Anton Paar per rilevazione in tempo reale di estratto, temperatura e densità.



Figura 11. Confronto colore di due campioni di birra.



Figura 12. Laboratorio di microbiologia dello stabilimento Birra Peroni.

7.2 Analisi chimiche

7.2.1 Alcolyzer

L'Alcolyzer è un analizzatore che permette di effettuare un'analisi completa della birra con un solo ciclo (**figura 13**). Il sistema è composto da un densimetro, un modulo di misura e un campionatore. In questo modo si possono determinare il contenuto di alcol (da 0%v/v a 12%v/v), la densità (da 0g/cm³ a 3g/cm³) e il grado Plato (da 0°Plato a 30°Plato). Opzionalmente si può anche rilevare il pH e il colore, espresso in EBC (da 0 EBC a 120 EBC).

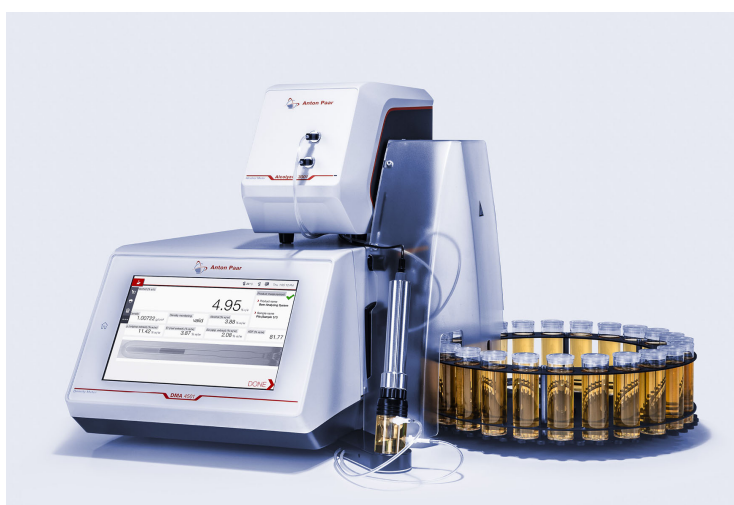


Figura 13. Alcolyzer (Anton Paar).

7.2.2 Analisi dei dichetoni vicinali (VDK)

L'analisi dei VDK è stata eseguita attraverso gascromatografia o GC, che ricava la concentrazione della sostanza desiderata con un apposito rilevatore ottico posto all'estremità finale dell'apparecchio.

La concentrazione è stata misurata in ppb (parti per miliardo) e poi convertita in mg/L di birra, per facilitare la correlazione con gli altri dati.

Ai fini della prova, i campioni sono stati prelevati tutti i giorni dai tank di riferimento fino al raggiungimento del limite stabilito (inferiore ai 50 ppb).

7.2.3 Rilevazione dell'amaro in HPLC

L'amaro all'interno della birra è dato dal quantitativo di ISO-alfa acidi, espresso in IBU o International Bitterness Unit (mg/l). L'analisi quantitativa è effettuata con cromatografia liquida ad alta prestazione, o "High Performance Liquid Chromatography", e si basa su un sistema di pompe che spingono un solvente liquido pressurizzato (miscela campione) attraverso una colonna riempita con un materiale adsorbente solido. Ogni componente nel campione interagisce in modo diverso con il materiale adsorbente fino alla separazione delle singole parti.

Lo studio dei cromatogrammi e la relazione dei vari tempi di ritenzione ha permesso l'individuazione delle specie amare e la loro quantificazione, grazie ad uno standard interno.

7.2.4 Conta cellulare e vitalità del lievito starter

La conta cellulare è stata eseguita mediante *counter* ottico (**figura 14**), atto a valutare la vitalità del lievito starter. I campioni sono stati prelevati da mosto inoculato quattro ore prima, predisposto per l'inizio della fase fermentativa. Successivamente è stata effettuata una diluizione 1:1000 e un'aliquota è stata introdotta nello strumento, che ha rilevato le cellule di lievito presenti ed il loro numero.

Il sistema sfrutta la microscopia a fluorescenza duale, eliminando la soggettività e l'enorme impiego di tempo legato ai metodi classici manuali.

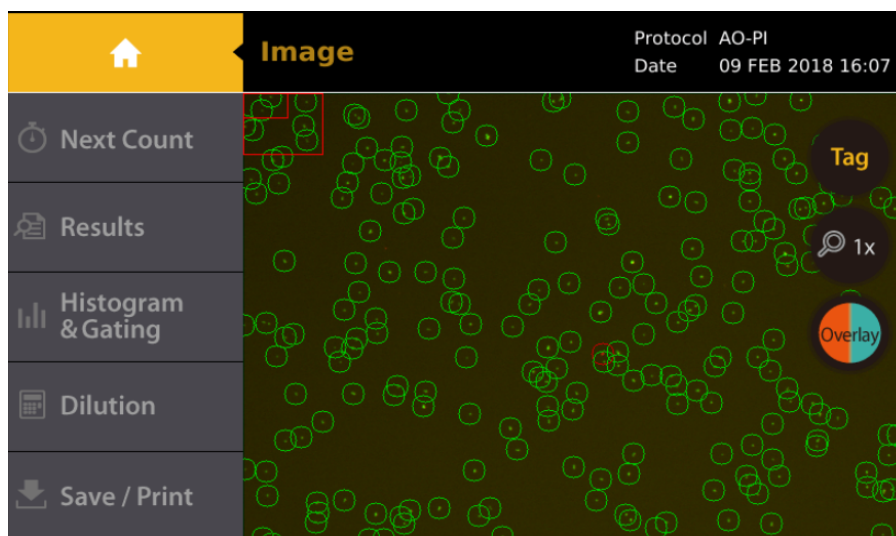


Figura 14. Rilevazione delle cellule di lievito (Pat Way Solutions).

8. Risultati

I dati rilevati dalle diverse analisi e misurazioni sono stati riportati in tabelle e grafici.

8.1 - E III TC 73

La rilevazione dei dati di fermentazione (**tabella 4**) del ceppo E III TC 73 è stata eseguita nel periodo 01/10/2022 – 11/10/2022.

Gli andamenti di fermentazione sono riportati nella pagina successiva (**figura 15 e 16**).

La fase di anaerobiosi è iniziata il 03/10/2022 e il raffreddamento è stato eseguito l'11/10/2022.

Per questo ceppo la conta cellulare è stata riportata in 10^7 cells/ml, per facilitare la visuale grafica dell'andamento.

La tabella 4 è divisa in due colori: l'arancione identifica il periodo di produzione e rilascio dei dichetoni vicinali all'esterno della cellula, mentre il verde identifica il periodo di riassorbimento dei VDK dall'esterno all'interno della cellula.

Time	Temperature	Extract	Yeast cell	pH	Linear	Diacetyl	2,3-pentanedione
h	°C	% 12,51	10^7 cells/ml	(-) log [H+]	%	mg/L 1/10	mg/L 1/10
0	10,00	16,05	1,59	5,40	16,05	0,00	-
24	10,50	14,50	1,56	5,30	14,50	0,25	-
48	10,30	12,60	2,60	5,17	12,60	-	-
72	10,45	10,30	5,00	4,26	10,30	0,50	0,97
96	11,00	7,80	7,49	4,27	7,80	0,47	0,86
120	13,50	4,90	5,90	4,26	4,90	0,44	0,75
144	14,00	3,20	2,12	4,24	3,20	0,30	0,54
168	14,00	2,40	1,00	4,30	2,40	0,20	0,43
192	14,00	-*	0,86	4,27	-*	0,15	0,32
216	14,00	-	0,77	4,28	-	0,09	0,28
240	13,90	-	0,95	4,29	-	0,02	0,02

Tabella 4. Misurazioni di fermentazione – ceppo: E III TC 73

*“-”: il valore desiderato è stato raggiunto e non sono stati raccolti ulteriori dati.

Figura 15. Andamento fermentazione E III TC 73

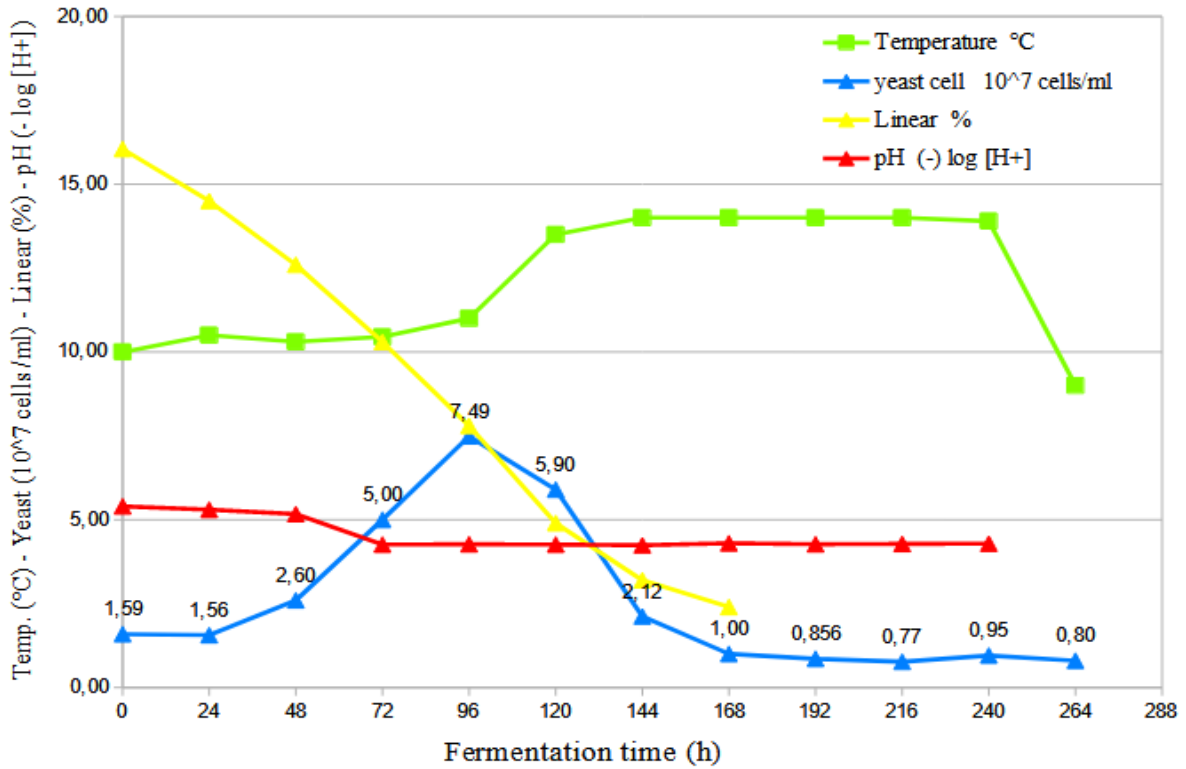
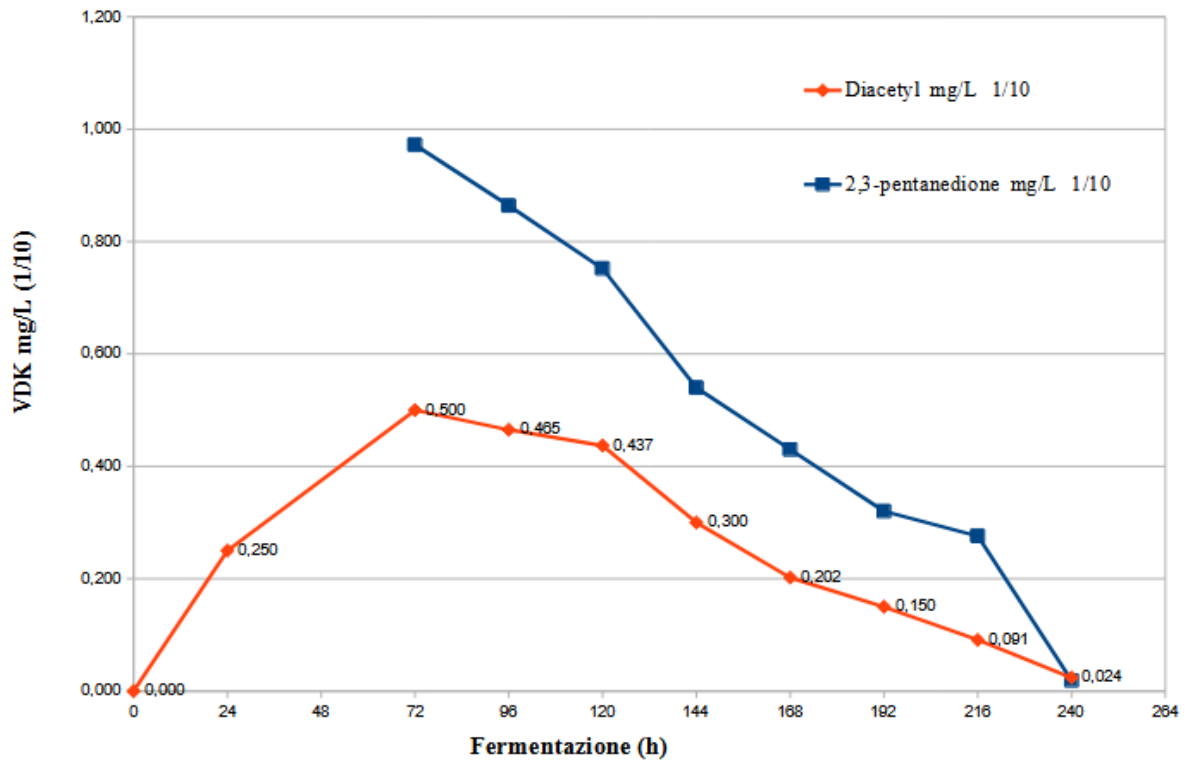


Figura 16. Abbattimento VDK durante la fermentazione - E III TC 73



8.2 - D IV TC 53

Time	Temperature	Extract	Yeast cell	pH	Linear	Diacetyl	2,3-pentanedione
h	°C	% 12,51	10 ⁶ cells/ml	(-) log [H ⁺]	%	mg/L 1/10	mg/L 1/10
0	7,00	16,05	15,60	5,35	16,05	0,00	-
24	10,00	13,90	26,00	5,30	13,90	-	-
48	10,00	11,40	32,00	5,25	11,40	0,17	-
72	11,50	8,00	28,00	5,20	8,00	-	-
96	13,00	4,00	15,60	5,18	4,00	0,25	-
120	13,00	2,70	15,00	4,12	2,70	-	-
144	13,00	- *	14,00	4,16	- *	0,15	1,25
168	14,00	-	13,10	4,25	-	0,10	0,20
192	14,00	-	3,87	4,22	-	0,06	0,11
216	13,00	-	3,14	4,20	-	0,04	0,06

Tabella 5. Misurazioni di fermentazione – ceppo: D IV TC 53

*: il valore desiderato è stato raggiunto e non sono stati raccolti ulteriori dati.

La rilevazione dei dati di fermentazione (**tabella 5**) del ceppo D IV TC 53 è stata eseguita nel periodo 29/09/2022 – 08/10/2022. La fase di anaerobiosi è iniziata il 01/10/2022 e il raffreddamento è stato eseguito l'08/10/2022.

La tabella 5 è divisa in due colori: l'arancione identifica il periodo di produzione e rilascio dei diacetoni vicinali all'esterno della cellula, mentre il verde identifica il periodo di riassorbimento dei VDK dall'esterno all'interno della cellula.

Gli andamenti di fermentazione sono riportati nella pagina successiva (**figura 17 e 18**).

Figura 17. Andamento fermentazione D IV TC 53

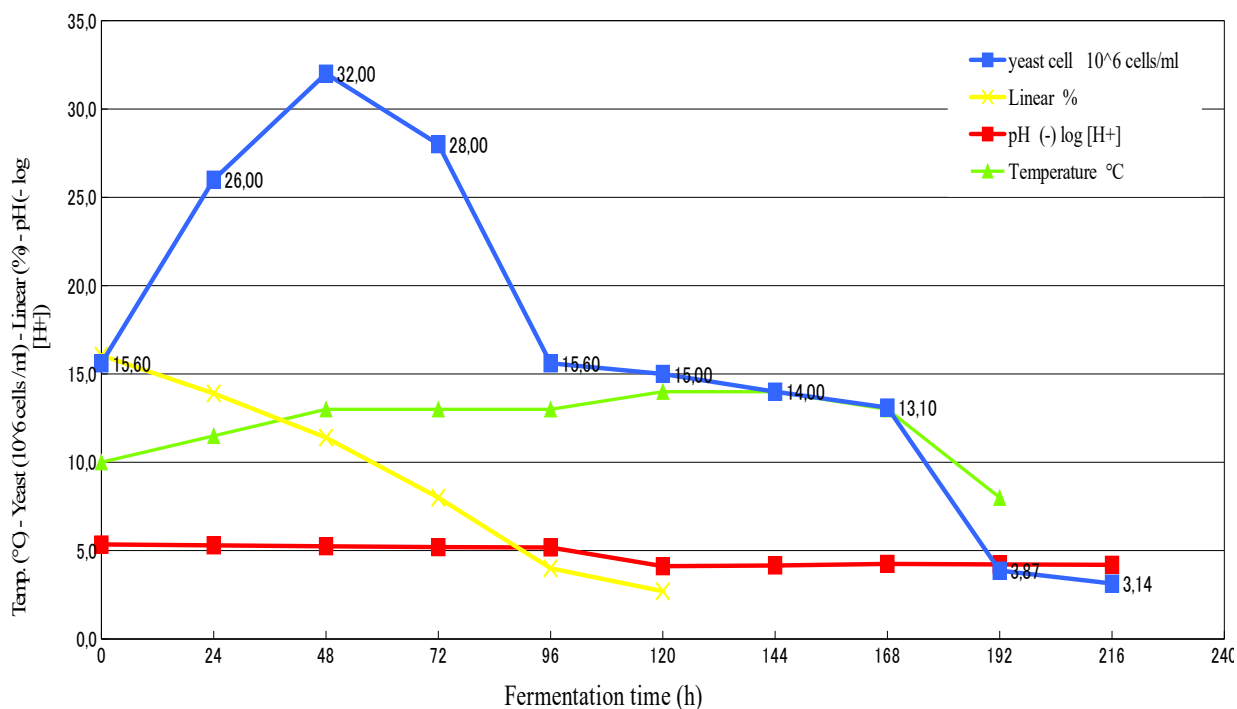
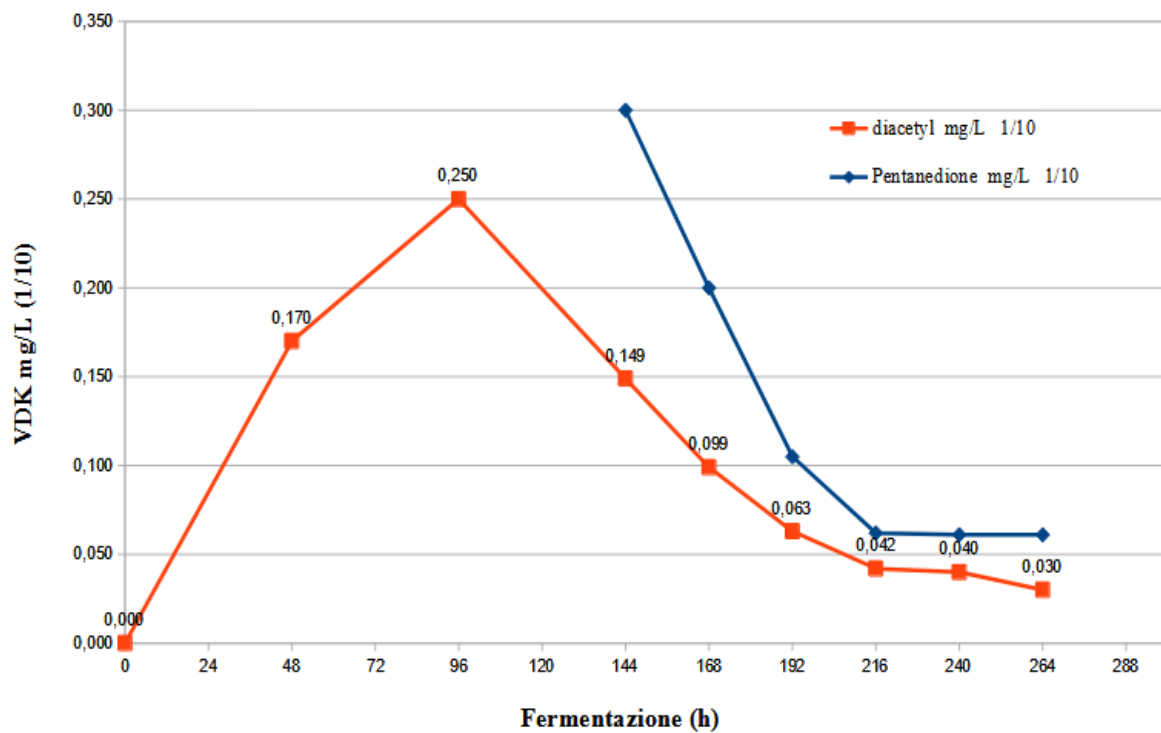


Figura 18. Abbattimento VDK durante la fermentazione - D IV TC 53



8.3 - A VII TC 26

La rilevazione dei dati di fermentazione del ceppo (**tabella 6**) A VII TC 26 è stata eseguita nel periodo 29/09/2022 – 10/10/2022. La fase di anaerobiosi è iniziata il 01/10/2022 e il raffreddamento è stato eseguito il 10/10/2022.

La tabella 6 è divisa in due colori: l'arancione identifica il periodo di produzione e rilascio dei dichetoni vicinali all'esterno della cellula, mentre il verde identifica il periodo di riassorbimento dei VDK dall'esterno all'interno della cellula.

Gli andamenti di fermentazione sono riportati nella pagina successiva (**figura 19 e 20**).

Time	Temperature	Extract	Yeast cell	pH	Linear	Diacetyl	2,3-pentanedione
h	°C	% 12,51	10 ⁶ cells/ml	(-) log [H ⁺]	%	mg/L 1/10	mg/L 1/10
0	10,00	16,00	15,60	5,50	16,05	0,00	-
24	11,00	14,70	26,00	5,40	14,70	0,50	-
48	10,30	13,10	32,00	5,30	13,10	-	-
72	10,80	10,80	28,00	5,20	10,80	0,70	-
96	10,20	8,60	13,80	5,10	8,60	-	-
120	12,00	6,70	10,30	4,24	6,70	-	-
144	14,00	4,70	5,36	4,30	4,70	0,58	0,71
168	14,00	3,20	2,68	4,28	3,20	0,41	0,50
192	14,00	2,70	1,81	4,32	2,70	0,22	0,40
216	14,00	- *	1,16	4,35	2,55	0,15	0,32
240	14,00	-	0,10	4,30	- *	0,10	0,23
264	14,00	-	0,09	4,32	-	0,07	0,08
288	10,00	-	0,09	4,29	-	0,05	0,08

Tabella 6. Misurazioni di fermentazione – ceppo: A VII TC 26

*: il valore desiderato è stato raggiunto e non sono stati raccolti ulteriori dati.

Figura 19. Andamento fermentazione A VII TC 26

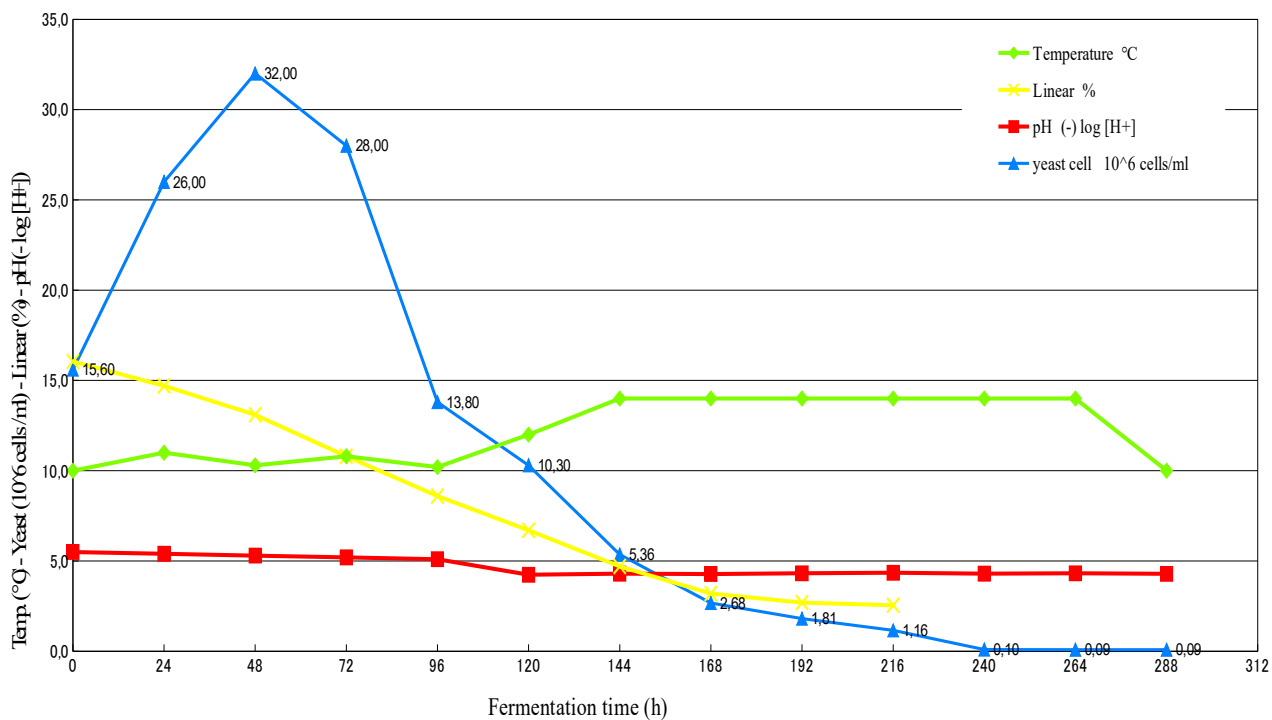
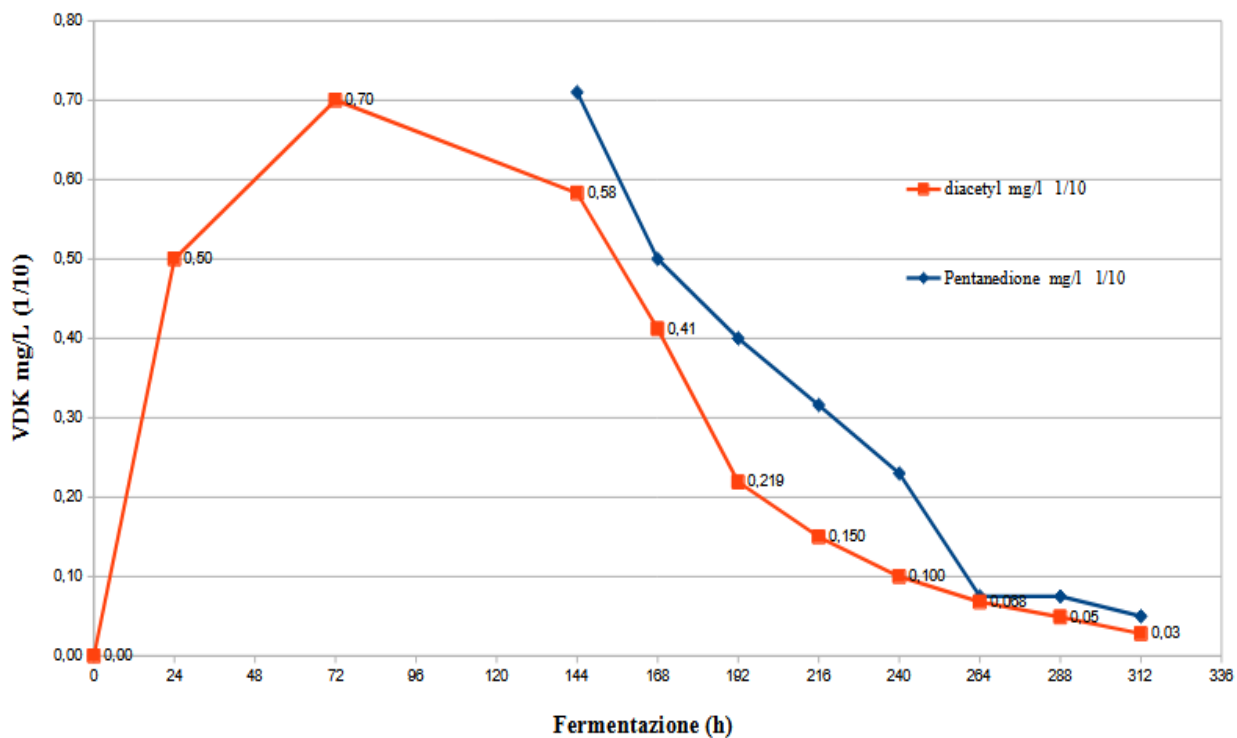


Figura 20. Abbattimento VDK durante la fermentazione - A VII TC 26



9. Discussione dei risultati

Lo studio di fermentazione dei tre ceppi ha dimostrato che il ceppo D IV TC 53 di quarta generazione è il migliore in performance fermentativa per l'abbattimento del diacetile durante il processo di produzione della birra.

Come detto nei capitoli precedenti, a livello industriale è molto importante valutare in quanto tempo il lievito completa la fermentazione, poiché influisce direttamente sulla capacità produttiva della cantina di fermentazione.

L'andamento fermentativo (**figura 21**) mostra come il lievito all'inizio produce gradualmente i VDK e li rilascia all'esterno per bilanciare il potere riducente della cellula; successivamente essi vengono recuperati ed utilizzati per la produzione di 2,3-butandiolo e 2,3-pentandiolo.

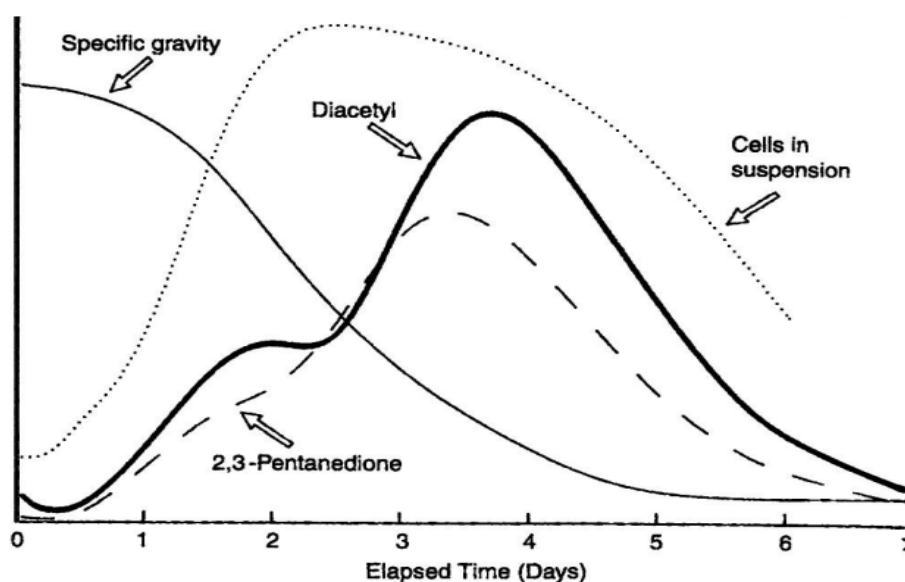


Figura 21. *Metabolismo dei VDK durante la fermentazione del mosto. La figura mostra la relazione tra il diacetile, il 2,3-pentanedione, la crescita delle cellule di lievito e il grado specifico del mosto. (Krogerus e Gibson, 2013)*

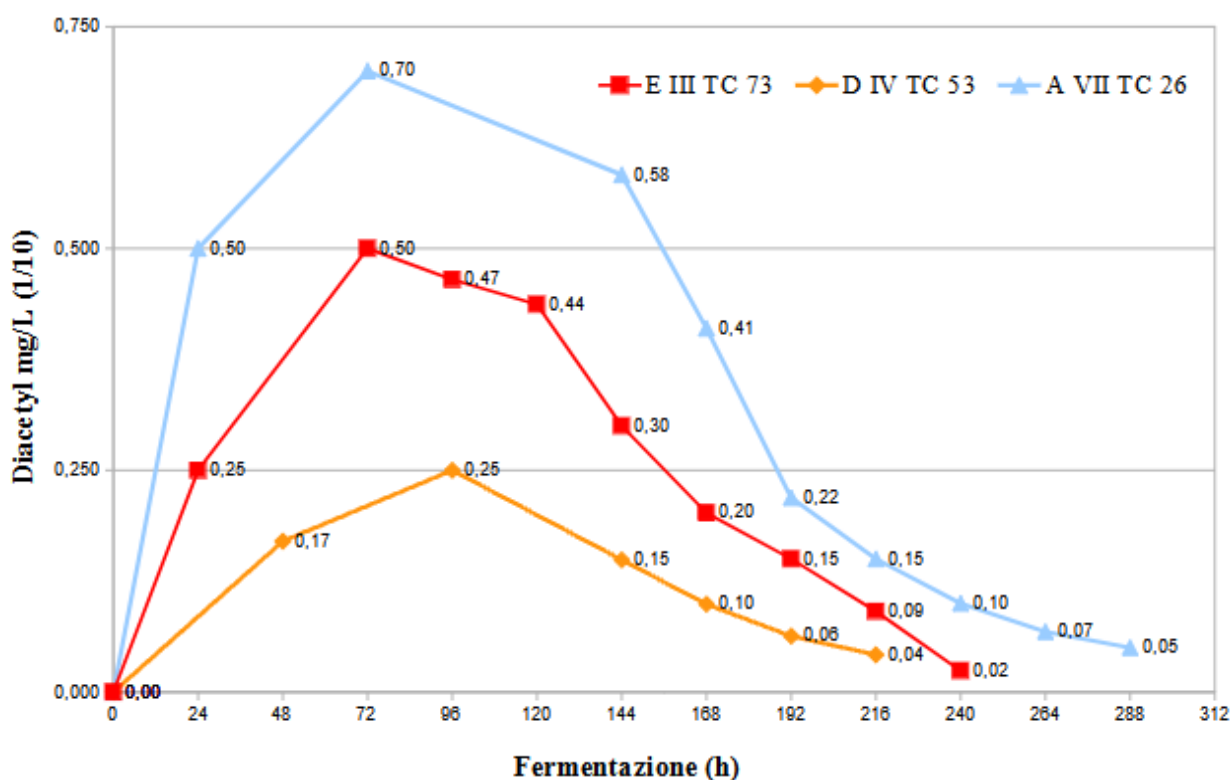
I dati raccolti nella prova sperimentale sono stati riassunti nella **tabella 7**, in particolare è posta in evidenza la relazione tra l'abbattimento dei dicetoni vicinali in fermentazione e il numero di generazioni del lievito.

Nello specifico è possibile notare l'andamento del diacetile dei tre ceppi nella **figura 22**.

Tabella 7. Risultati della prova sperimentale.

Ceppo	Generazione lievito	Tempo (h)	Diacetile (mg/L)	2,3-pentanedione (mg/L)	Produzione VDK (gg)	Riduzione VDK (gg)	Totale (gg)
E TC 73	3	240	0,02	0,02	3	7	10
D TC 53	4	216	0,04	0,06	5	4	9
A TC 26	7	288	0,05	0,08	5	7	12

Figura 22. Andamento del diacetile dei tre ceppi presi in esame.



Il ceppo **E III TC 73** (terza generazione) ha ridotto il diacetile nell'arco di 7 giorni partendo da un valore di 0,50 mg/L fino a 0,02 mg/L. L'andamento generale è stato abbastanza costante nel tempo. Nelle prime 48-72 ore, i livelli di diacetile risultano alti, poiché il lievito sfrutta il processo di sintesi dei VDK per bilanciare il potere riducente.

Successivamente, il lievito riassorbe dal mosto i VDK prodotti e i valori diminuiscono sempre di più fino alla conclusione della fermentazione.

Si può notare un calo brusco dei valori di diacetile (da 0,091 mg/L a 0,024 mg/L) e 2,3-pentanedione tra le 216 e le 240 ore (**figura 16**).

È interessante notare come il ceppo ha impiegato soltanto 3 giorni nella produzione dei VDK, mentre sono stati necessari ben 7 giorni per ridurli in dioli.

Il ceppo **D IV TC 53** (quarta generazione) è risultato il migliore in quanto ha ridotto il diacetile in 4 giorni partendo da un valore massimo di 0,25 mg/L fino a raggiungere 0,04 mg/L a fine fermentazione.

L'andamento della riduzione del diacetile è stato abbastanza lineare e la variazione dei diversi valori è pressoché minima. È importante tenere in considerazione il valore iniziale di diacetile, in quanto è molto più basso rispetto agli altri due ceppi. Si può ipotizzare che il lievito abbia preferito sfruttare maggiormente altre reazioni per bilanciare il potere riducente.

La **figura 18** evidenzia un calo significativo dei VDK nell'arco temporale tra le 144 e le 192 ore, infatti proprio in queste ore avviene il riassorbimento massimo di diacetile e 2,3-pentanedione e la loro riduzione in 2,3-butandiolo e 2,3-pentandiolo.

Comparando questo ceppo con il ceppo di terza generazione, è possibile osservare delle differenze (**tabella 7**): il ceppo D IV TC 53 ha impiegato 5 giorni per produrre i dichetoni vicinali, mentre ne ha impiegati 4 per ridurli in dioli. A livello di performance fermentativa risulta essere la generazione più adatta alle richieste industriali.

Il ceppo di settima generazione, **A VII TC 26**, è risultato essere il meno performante rispetto ai ceppi presenti, poiché ha impiegato complessivamente 12 giorni dall'inizio della fermentazione fino a 0,05 mg/L.

Inoltre, il ceppo ha prodotto una grande quantità di diacetile nelle prime 72 ore di fermentazione per poi calare bruscamente tra le 144 e le 192 ore.

Alla fine della fermentazione, tra 216 e 288 ore, la riduzione del diacetile è risultata sempre più lenta, con una variazione minore di ppb, fino al raggiungere il limite stabilito (**figura 20**).

10. Conclusioni

L'obiettivo di questo progetto di tesi è stato verificare l'eventuale influenza tra l'incremento delle generazioni di lievito e l'aumento del "*VDK rest*". Tale relazione è fondamentale in un birrificio industriale in cui, un aumento della permanenza della birra in un fermentatore, può causare seri problemi in termini di capacità produttiva dell'intero stabilimento.

Il "*VDK rest*" è associato alla produzione di diacetile, molecola fortemente legata al fabbisogno di valina della cellula. Qualsiasi modificazione delle condizioni di processo (che aumenti il fabbisogno di biosintesi intracellulare di valina) comporta un aumento della produzione di diacetile, con il prolungamento delle fasi di fermentazione e maturazione.

L'individuazione del giusto compromesso, tra numero di generazione effettuate dal lievito e tempo di permanenza della birra all'interno del fermentatore, permette al birraio di ottimizzare al massimo le performance produttive conservando le qualità chimiche, fisiche e organolettiche del prodotto finale.

Il progetto di tesi, suddiviso in due fasi (analisi bibliografica e attività di stabilimento), ha permesso di evidenziare come un eccessivo re-inoculo del lievito non risulta essere conveniente in termini di capacità produttiva, poiché prolunga la permanenza della birra nei fermentatori e ritarda la fermentazione delle cotte successive.

La prova sperimentale dimostra che la convenienza in termini economici risulta essere presente solo per i lieviti di terza e quarta generazione; dopodiché l'aumento del numero di generazioni del lievito sarà direttamente proporzionale all'aumento del tempo di fermentazione della birra e dell'abbattimento dei diacetoni vicinali.

Questo progetto di tesi ha potuto confermare a livello industriale i risultati ottenuti nel lavoro svolto da Kucharczyk K. et al. nel 2020 e può essere considerato un ulteriore punto di riferimento per future ipotesi e prove sperimentali su scala industriale.

Bibliografia

1. Bitterman, K. J., Medvedik, O., Sinclair, D. A. (2003). Longevity Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking Metabolism, Genome Stability, and Heterochromatin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 376–399. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.376-399.2003>
2. Bühligen, F., Rüdinger, P., Fetzer, I., Stahl, F., Scheper, T., Harms, H., Müller, S. (2013). Sustainability of industrial yeast serial repitching practice studied by gene expression and correlation analysis. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 718–728. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.09.008>
3. Chaudhari, R. D., Stenson, J. D., Overton, T. W., Thomas, C. R. (2012). Effect of bud scars on the mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Chemical Engineering Science*, 84(188-196), 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.08.027>
4. De Boer, M., Jan Paul Bebelman, Gonçalves, P., Maat, J., Harm van Heerikhuizen, Planta, R. J. (1998). Regulation of expression of the amino acid transporter gene BAP3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 30(3), 603–613. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01094.x>
5. Didion, T., Birgitte Regenberg, Jørgensen, M. U., Kielland-Brandt, M. C., Andersen, H. A. (1998). The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 27(3), 643–650. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00714.x>
6. Eigenfeld, M., Kerpes, R., Becker, T. (2021). Recombinant protein linker production as a basis for non-invasive determination of single-cell yeast age in heterogeneous yeast populations. *RSC Advances*, 11(51), 31923–31932. <https://doi.org/10.1039/d1ra05276d>

7. García, A. I., García, L. A., Díaz, M. (1994). MODELLING OF DIACETYL PRODUCTION DURING BEER FERMENTATION. *Journal of the Institute of Brewing*, 100(3), 179–183. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1994.tb00819.x>
8. Garrett, O. (2011). *The Oxford Companion to Beer Definition of maturation. Craft Beer & Brewing*. Retrieved from <https://beerandbrewing.com/dictionary/7JSOfuS2SQ/>
9. Gibson, B., Vidgren, V., Peddinti, G., Krogerus, K. (2018). Diacetyl control during brewery fermentation via adaptive laboratory engineering of the lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(12), 1103–1112. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2087-4>
10. Grenson, M., Hou, C., Crabeel, M. (1970). Multiplicity of the Amino Acid Permeases in *Saccharomyces cerevisiae* IV. Evidence for a General Amino Acid Permease. *Journal of Bacteriology*, 103(3), 770–777. <https://doi.org/10.1128/jb.103.3.770-777.1970>
11. Inoue, T. (2008). *Diacetyl in Fermented Foods and Beverages*. American Society of Brewing Chemists.
12. Kalayu, G. (2019). Serial re-pitching: its effect on yeast physiology, fermentation performance, and product quality. *Annals of Microbiology*, 69(8), 787–796. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01493-4>
13. Kobayashi, K., Kusaka, K., Takahashi, T., Sato, K. (2005). Method for the simultaneous assay of diacetyl and acetoin in the presence of α -acetolactate: Application in determining the kinetic parameters for the decomposition of α -acetolactate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(5), 502–507. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.502>
14. Kodama, Y., Omura, F., Ashikari, T. (2001). Isolation and Characterization of a Gene Specific to Lager Brewing Yeast That Encodes a Branched-Chain Amino Acid Permease. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3455–3462. <https://doi.org/10.1128/aem.67.8.3455-3462.2001>

15. Kordialik-Bogacka, E., Diowksz, A. (2013). Physiological state of reused brewing yeast. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(No. 3), 264–269. <https://doi.org/10.17221/84/2012-cjfs>
16. Krogerus, K., Gibson, B. R. (2013). 125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 86–97. <https://doi.org/10.1002/jib.84>
17. Kucharczyk, K., Tuszyński, T., Żyła, K., Puchalski, C. (2020). The effect of yeast generations on fermentation, maturation and volatile compounds of beer. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(No. 3), 144–150. <https://doi.org/10.17221/193/2018-cjfs>
18. Layfield, J., Sheppard, J. (2015). What Brewers Should Know About Viability, Vitality, and Overall Brewing Fitness: A Mini-Review. *Technical Quarterly*, 52(132-140). <https://doi.org/10.1094/tq-52-3-0719-01>
19. Manners, D. J. (1963, January 1). Enzymic Synthesis and Degradation of Starch and Glycogen. Retrieved September 16, 2023, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0096533208601393>
20. Meilgaard, M. (1975). Flavor chemistry of beer : Part II : Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. Retrieved September 28, 2023, from <https://www.semanticscholar.org/paper/Flavor-chemistry-of-beer-%3A-Part-II-%3A-Flavor-and-of-Meilgaard/e9759ef0116500164023bfd00ee9af93689640a1>
21. Meilgaard, M. C. (1975). MBAA TQ - Flavour chemistry of beer. part i: flavour interaction between principal volatiles. Retrieved September 28, 2023, from <https://www.mbaa.com/publications/tq/tqPastIssues/1975/Abstracts/tq75ab24.htm>
22. Pat Way, S. (2019). Contacellule per lieviti | Process Automation Technologies |. Retrieved October 3, 2023, from <https://www.patwaysolutions.com/laboratorio/contatore-di-cellule/contacellule-per-lieviti/>

23. Rondags, E., Germain, P., Marc, I. (1999). Quantification of extracellular α -acetolactate oxidative decarboxylation in diacetyl production by an α -acetolactate overproducing strain of *Lactococcus lactis* sp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *Biotechnology Letters*, 21(4), 303–307. <https://doi.org/10.1023/a:1005420312412>
24. Sigler, K., Matoulková, D., Dienstbier, M., Gabriel, P. (2009). Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor, and haze. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(6), 1027–1035. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1830-6>
25. Smart, K. A. (2007). Brewing yeast genomes and genome-wide expression and proteome profiling during fermentation. *Yeast*, 24(11), 993–1013. <https://doi.org/10.1002/yea.1553>
26. Speers, R. A., Stokes, S. (2009). Effects of Vessel Geometry, Fermenting Volume and Yeast Repitching on Fermenting Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(2), 148–150. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00360.x>
27. Stanbrough, M., Magasanik, B. (1995). Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177(1), 94–102. <https://doi.org/10.1128/jb.177.1.94-102.1995>
28. Stewart, G. (2016). *Saccharomyces* species in the Production of Beer. *Beverages*, 2(4), 34. <https://doi.org/10.3390/beverages2040034>
29. Stewart, G. G. (2009). The Horace Brown Medal Lecture: Forty Years of Brewing Research. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(1), 3–29. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00340.x>
30. Stewart, G. G. (2017). The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. *Fermentation*, 3(4), 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>

31. Stewart, G. G., Maskell, D. L., Speers, A. (2016). Brewing Fundamentals – Fermentation. *Technical Quarterly*, 53(2-22). <https://doi.org/10.1094/tq-53-1-0302-01>
32. Viktor Nedović, Willaert, R., Leskosek-Cukalovic, I., Obradovic, B., Branko Bugarski. (2005). Beer Production Using Immobilised Cells. *Focus on Biotechnology*, 24(33-34), 259–273. https://doi.org/10.1007/1-4020-3363-x_15
33. Wainwright, T. (1973). DIACETYL-A REVIEW: PART I-ANALYTICAL AND BIOCHEMICAL CONSIDERATIONS: PART II-BREWING EXPERIENCE. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(6), 451–470. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03567.x>
34. Wang, J., Ding, H., Zheng, F., Li, Y., Liu, C., Niu, C., Li, Q. (2019). Physiological Changes of Beer Brewer's Yeast During Serial Beer Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(1), 10–20. <https://doi.org/10.1080/03610470.2018.1546030>