

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse
Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

I lieviti Non-*Saccharomyces* come strumento di
innovazione nella produzione di birra

Relatrice

Prof.ssa Viviana Corich

Laureanda

Giada Anna Dalla Corte

Matricola n. 2000024

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

Riassunto	5
Abstract	6
1. Il tradizionale processo di fermentazione	7
1.1. Il lievito	7
1.2. La fermentazione	7
1.2.1. Metabolismo degli zuccheri	10
1.2.2. Assorbimento dell'azoto.....	10
1.2.3. La flocculazione del lievito	11
1.3. Le caratteristiche organolettiche	13
1.3.1. Gli alcoli superiori.....	13
1.3.2. Gli esteri	14
1.3.3. I composti carbonilici	15
1.3.4. I composti solforati.....	15
2. Lieviti convenzionali del genere <i>Saccharomyces</i> normalmente impiegati	17
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.1.1. Origine e domesticazione	17
2.1.2. La birra Ale.....	18
2.2. <i>Saccharomyces pastorianus</i>	19
2.2.1. Origine	19
2.2.2. I ceppi Saaz e Froberg	20
2.2.3. La birra Lager	20
3. Lieviti non-<i>Saccharomyces</i>	22
3.1. Generalità	22
3.2. Principali specie di lievito	23
3.2.1. <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	23
3.2.2. <i>Pichia anomala</i>	26
3.2.3. <i>Torulaspora delbrueckii</i>	28
3.3. Aspetti e considerazioni sulla sicurezza	29
3.3.1. Resistenza antifungina.....	30
3.3.2. Ammine biogene	31
3.3.3. Carbammato di etile	32
3.3.4. Acetaldeide	32
3.3.5. Direzioni future	33
4. Birre analcoliche e a basso contenuto alcolico	34
4.1. Il mercato	34
4.2. Metodi di produzione	35
4.2.1. <i>Saccharomyces ludwigii</i>	37
4.2.2. <i>Pichia kluyveri</i>	38
5. Conclusioni	41
6. Bibliografia	44

Riassunto

Nella produzione tradizionale della birra, vengono comunemente impiegati due specie di lievito: *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*. Tuttavia, negli ultimi anni si sono registrati importanti progressi nel settore birrario, spinti anche dalla crescente richiesta da parte dei consumatori di birre con profili aromatici e gustativi diversificati.

Per rispondere a questa domanda di novità, sono stati introdotti i lieviti non-*Saccharomyces* o lieviti non convenzionali, che portano con sé nuove tecniche, approcci e caratteristiche organolettiche nella produzione della birra. L'impiego di tali lieviti è in grado di arricchire il profilo sensoriale del prodotto, introducendo sapori e aromi unici che possono differenziare le birre sul mercato.

Inoltre, c'è una crescente richiesta di birre a basso contenuto alcolico e birre analcoliche. Tuttavia, queste tipologie di birra, prodotte utilizzando i lieviti convenzionali, spesso hanno caratteristiche organolettiche non soddisfacenti per il consumatore. Studi recenti hanno dimostrato che l'utilizzo dei lieviti non-*Saccharomyces* può portare a risultati positivi, introducendo nuovi sapori e aromi senza compromettere l'esperienza di consumo.

In conclusione, l'impiego dei lieviti non-*Saccharomyces* rappresenta un'opportunità interessante per l'industria birraria, consentendo di diversificare e migliorare l'offerta sul mercato, sia in termini di varietà di prodotti sia in termini di soddisfazione del consumatore.

Abstract

In traditional beer production, two species of yeast are commonly used: *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus*. However, in recent years, significant progress has been made in the brewing sector, driven by increasing demand from consumers for beers with diversified aromatic and taste profiles.

To meet this demand for novelty, non-*Saccharomyces* yeasts or unconventional yeasts have been introduced, bringing along new techniques, approaches, and organoleptic characteristics in beer production. The use of such yeasts can enrich the sensory profile of the product, introducing unique flavors and aromas that can differentiate beers in the market.

Furthermore, there is a growing demand for low-alcohol and non-alcoholic beers. However, these types of beer, produced using conventional yeasts, often have unsatisfactory organoleptic characteristics for consumers. Recent studies have shown that the use of non-*Saccharomyces* yeasts can lead to positive results, introducing new flavors and aromas without compromising the consumer experience.

In conclusion, the use of non-*Saccharomyces* yeasts represents an interesting opportunity for the brewing industry, allowing for diversification and improvement of the market offering, both in terms of product variety and consumer satisfaction.

1. Il tradizionale processo di fermentazione

1.1. Il lievito

Per la produzione della birra il lievito è uno dei quattro ingredienti principali insieme ad acqua, malto e luppolo. Infatti, la qualità della birra è in stretto rapporto con la capacità metabolizzante, la vitalità e il potere fermentativo del lievito. Quindi la scelta del ceppo del microrganismo, oltre alla specie è di pari importanza come la selezione delle altre materie prime (Stewart, 2017).

Il lievito è un microrganismo eucariote unicellulare, appartenente al regno dei funghi. Ha una riproduzione asessuata per gemmazione, che consente di produrre nuove cellule geneticamente identiche e colonizzare i vari ambienti. Si tratta di un microrganismo che ha una flessibilità metabolica rispetto l'uso dell'ossigeno. Infatti, riesce a sfruttare sia processi aerobici, come la respirazione, sia processi anaerobici, come la fermentazione, in base all'ambiente in cui si trova. Proprio per questa sua capacità fermentativa, che consiste nel trasformare gli zuccheri in etanolo ed anidride carbonica, ha trovato impiego nell'industria alimentare e nella produzione di bevande alcoliche; come il vino e la birra. Il lievito, oltre a trasformare una soluzione zuccherina in soluzione alcolica, agisce sulla formazione di metaboliti secondari: alcoli superiori, esteri e composti carbonilici, che definiscono l'aroma e il sapore del prodotto finale.

I lieviti più utilizzati ad oggi sono del genere *Saccharomyces*, di cui fanno parte due specie principali per la produzione della birra: *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* (Lodolo et al., 2008).

1.2. La fermentazione

Le fasi del processo produttivo della birra sono: maltazione, ammostamento, fermentazione, maturazione e filtrazione.

La maltazione è un processo che mira a far germinare i chicchi di cereali, tipicamente orzo, creando condizioni ottimali per attivare specifici enzimi, come amilasi e proteasi, che rendono fermentabili gli zuccheri presenti nell'endosperma del chicco sotto forma di amido. Inizialmente, i cereali vengono immersi in acqua per assorbire umidità e avviare il processo di germinazione. Successivamente, i cereali umidi vengono sottoposti ad asciugatura ed essiccazione, seguiti dalla tostatura, che può variare per conferire determinati aromi al prodotto finale. Una volta completati questi passaggi, il malto viene molito per aumentare la superficie di contatto tra i suoi componenti e l'acqua durante le fasi successive del processo di produzione della birra (Stewart, 2017).

L'ammostamento è una fase fondamentale nella produzione della birra, mirata a trasformare l'orzo macinato in mosto e a sviluppare le sostanze necessarie al lievito, per formare le caratteristiche organolettiche della birra. Durante questa fase, il malto viene mescolato con l'acqua e sottoposto a variazioni controllate di temperatura, tempo di permanenza e pH, che attivano gli enzimi cruciali come β -amilasi e α -amilasi. Questi enzimi trasformano gli amidi presenti nell'orzo in zuccheri fermentabili. Successivamente, il mosto attraversa una fase di filtrazione per separare le trebbie (parte solida) dal liquido. Una volta completata la filtrazione, si procede con il processo di bollitura del mosto, che riveste diverse funzioni cruciali: evaporare l'acqua per concentrare gli zuccheri nel mosto, eliminare le componenti aromatiche indesiderate e formare il *trub* una coagulazione di proteine che contribuisce alla chiarificazione del mosto. Inoltre, durante la bollitura, il mosto viene sterilizzato per eliminare batteri e lieviti indesiderati che potrebbero compromettere il risultato finale. Durante la bollitura, viene aggiunto il luppolo, principale ingrediente che conferisce l'amaro caratteristico della birra. L'aggiunta del luppolo può avvenire in diverse fasi della bollitura per ottenere diversi profili aromatici. Prima del raffreddamento, il mosto viene sottoposto al processo di *whirlpooling*, in cui viene creato un vortice per provocare la separazione dei residui di luppolo e *trub*. Questi sedimenti si compattano al centro, facilitando la chiarificazione del mosto. Successivamente, il mosto viene raffreddato rapidamente per prevenire contaminazioni batteriche prima dell'aggiunta del lievito. Questa fase di raffreddamento è fondamentale per garantire la purezza del mosto e assicurare una fermentazione sana e di qualità (Stewart, 2017).

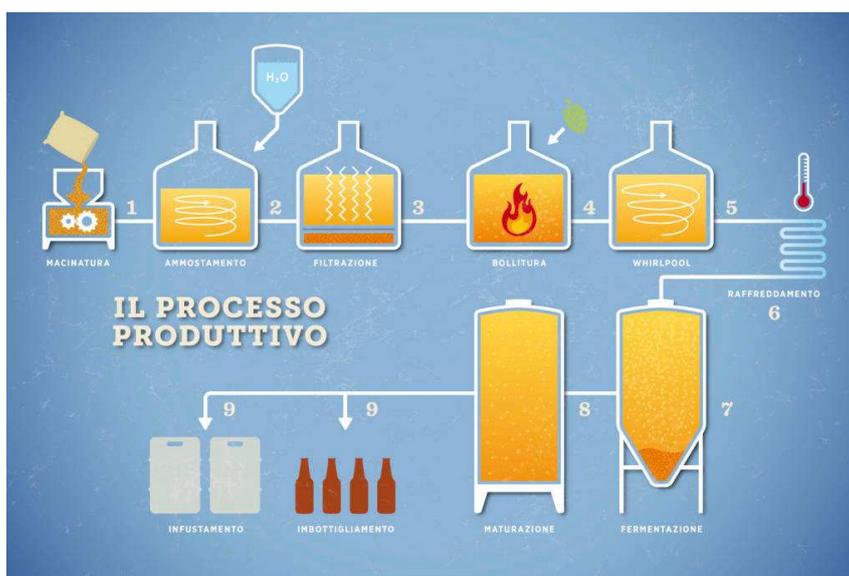


Figura 1.1. Processo produttivo della birra (easybräun-velo.com, 2018)

La fermentazione è il punto del processo produttivo dove il lievito trasforma il mosto di malto in birra, attraverso l'attività metabolica che è alla base del suo sviluppo. Il lievito prima di essere inoculato nell'impianto industriale viene propagato. La propagazione è un procedimento aerobico che utilizza volumi scalari, in cui il ceppo scelto viene cresciuto utilizzando la coltura precedente come inoculo di quella successiva con l'obiettivo di assicurarne un'alta vitalità e di raggiungere il numero di cellule sufficienti per affrontare in modo corretto il processo fermentativo. Avviene in condizioni aerobiche così da aumentare la sintesi di steroli e di acidi grassi, l'espulsione di CO₂ e l'introduzione di O₂ per la crescita della popolazione. La concentrazione di cellule dell'inoculo oscilla intorno alle 10⁷ cell/ml (Lodolo et al., 2008).

La fermentazione inizia con l'introduzione del lievito all'interno del mosto di malto. Il mosto è una soluzione zuccherina derivante dall'ammestramento, ebollizione e raffreddamento di una sospensione contenente malto d'orzo e luppolo. Generalmente ha una composizione formata da: zuccheri fermentescibili; in modo specifico glucosio, fruttosio, saccarosio, maltosio e maltotriosio, zuccheri non fermentescibili (destrine), sostanze azotate, minerali e vitamine.

La fermentazione, tramite il metabolismo del lievito ha lo scopo principale di produrre alcol e CO₂. Il mosto di malto prima dell'inizio della fermentazione viene areato. Poiché essenziale per la sintesi di steroli e degli acidi grassi insaturi, presenti nella membrana cellulare del lievito (Willaert, 2012).

Tabella 1.1. Composizione di mosto (Meier-Dörnberg et al., 2017)

Wort composition	
Parameter	Amount
Original gravity (°P)	12.40
pH	5.19
Spec. weight SL 20/20 °C	1.05
Zinc (mg/L)	0.15
Free amino nitrogen (FAN) (mg/100 mL)	25.00
Total amino acid content (AS) (mg/100 mL)	203.22
Total sugar (g/L)	83.78
EBC-Bittering units	20.20
Glucose (g/L)	11.46
Fructose (g/L)	2.57
Saccharose (g/L)	1.12
Maltose (g/L)	53.65
Maltotriose (g/L)	14.98

1.2.1. Metabolismo degli zuccheri

Il lievito inoculato nel mosto entra nella fase anaerobica, comincia la fermentazione ed inizia a metabolizzare gli zuccheri. In questa fase, viene utilizzata la via glicolitica per la formazione finale di piruvato. Il piruvato è il punto di partenza della fermentazione alcolica, il quale verrà convertito prima in acetaldeide e poi in etanolo e CO₂ (Stewart, 2017).

Gli zuccheri vengono consumati in una sequenza specifica dal lievito. I primi ad essere assorbiti sono gli zuccheri semplici: glucosio e fruttosio che vengono trasportati nella membrana cellulare tramite diffusione semplice. Successivamente, solo quando è stato consumato il 60% del glucosio, inizia l'assorbimento dello zucchero maggiormente presente nel mosto il maltosio, un disaccaride composto da due unità di glucosio, che forma circa il 55% del contenuto totale dei carboidrati nel mosto. L'assorbimento del maltosio avviene tramite due step: permeasi di maltosio e la maltasi, enzima che idrolizza il maltosio nei suoi due monosaccaridi. La capacità del lievito di sintetizzare il disaccaride deriva dalla presenza di tre geni di utilizzo del maltosio, i geni MAL. Infine, alcuni ceppi di lievito consumano anche il maltotriosio, uno zucchero difficile da digerire a causa della sua complessa struttura molecolare, che richiede specifici enzimi per essere metabolizzata (Lodolo et al., 2008).

Tabella 1.2. Tipologia degli zuccheri fermentescibili e quantità presente nel mosto di malto (Walker e Stewart, 2016)

	Percent Composition
Glucose	10–15
Fructose	1–2
Sucrose	1–2
Maltose	50–60
Maltotriose	15–20
Dextrins	20–30

1.2.2. Assorbimento dell'azoto

Le sostanze azotate presenti nel mosto sono prevalentemente amminoacidi e ioni ammonio. La concentrazione di amminoacidi liberi viene espressa come FAN, *Free Amino Nitrogen*, e rappresenta il peso dell'atomo di azoto (espresso in mg/l) presente nel gruppo aminico degli amminoacidi. Questa fonte di azoto viene utilizzata del lievito direttamente per la sintesi di proteine necessarie per la vita della cellula o indirettamente per la formazione di nuovi amminoacidi attraverso un processo di transaminazione: il gruppo aminico dell'amminoacido viene trasferito ad uno scheletro carbonioso idoneo per la sintesi di un nuovo amminoacido (Lodolo et al., 2008). Questa scomposizione per la sintesi di nuovi amminoacidi determina la

produzione di composti aromatici positivi e negativi nel prodotto finale come alcoli superiori, dichetoni vicinali ed esteri. Un'elevata assimilazione delle sostanze azotate può portare alla formazione di aromi indesiderati; quindi, è necessario controllare l'assorbimento e la concentrazione dei composti azotati. Gli aminoacidi vengono assorbiti con diversa velocità dal lievito. Sulla base di questa evidenza gli aminoacidi sono stati suddivisi in diversi gruppi (A, B, C e D). Nel Gruppo A sono presenti gli aminoacidi che vengono assimilati e metabolizzati rapidamente: arginina; asparagina; aspartato; glutammato; glutammina; lisina; serina e treonina. Nel gruppo B fanno parte gli aminoacidi che hanno una assimilazione più lenta: istidina, isoleucina, leucina, metionina e valina. Nel gruppo C sono presenti gli aminoacidi che vengono assorbiti solo dopo la completa assimilazione del gruppo A: alanina; glicina; fenilalanina; tirosina; triptofano e ammoniaca. Nel gruppo D è presente solo la prolina, poiché non contiene gruppi amminici liberi, non può subire la transaminazione (Lodolo et al., 2008).

Tabella 1.3. Ordine di assorbimento degli aminoacidi durante la fermentazione (Walker e Stewart 2016).

Group A	Group B	Group C	Group D
Fast Absorption	Intermediate Absorption	Slow Absorption	Little or No Absorption
Glutamic acid	Valine	Glycine	Proline
Aspartic acid	Leucine	Phenylalanine	
Asparagine	Isoleucine	Tyrosine	
Glutamine	Histidine	Tryptophan	
Serine		Alanine	
Methionine		Ammonia	
Threonine			
Lysine			
Arginine			

1.2.3. La flocculazione del lievito

Al termine della fermentazione, poiché il lievito ha consumato le fonti di nutrimento, si verifica una riduzione della produzione di etanolo e CO₂. Il lievito, alla fine di questa fase, avendo completato la fase logaritmica entra nella fase stazionaria del suo ciclo vitale, non avendo più a disposizione nutrienti adotta un comportamento chiamato flocculazione (Walker e Stewart, 2016).

La flocculazione del lievito di birra è una caratteristica che permette alle cellule di lievito di agglomerarsi tra di loro e formare fiocchi composti da centinaia di cellule. Questa proprietà permette, in base al ceppo di lievito, di risalire nella parte superiore del fermentatore o depositarsi sul fondo di esso. Un fattore chiave della flocculazione è la composizione della parete cellulare del lievito, formata da mannoproteine, ossia proteine glicosilate contenenti mannosio, che regolano la porosità delle cellule e le interazioni tra di esse. Oltre alle

mannoproteine nella parete cellulare sono presenti le adesine o flocculine proteine di superficie, che sostengono l'adesione cellula-cellula per formare agglomerati multicellulari e che vengono codificate dai geni FLO (FLO1, FLO5, FLO9, FLO10 e FLO11). La capacità di flocculazione del lievito varia a seconda della sequenza del suo DNA, che a sua volta influenza la composizione della parete cellulare. Tuttavia, fattori come la temperatura di fermentazione, il pH e le pratiche di gestione e conservazione del lievito influenzano anch'essi un la regolazione della flocculazione (Willaert, 2012).

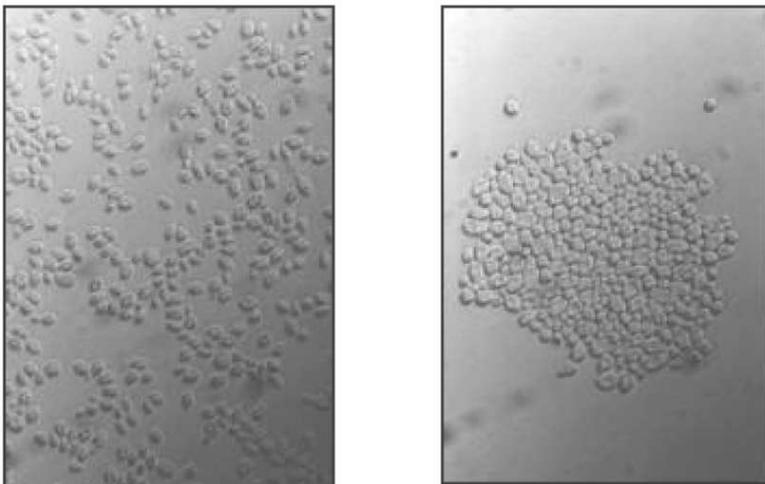


Figura 1.2. La flocculazione del lievito: a sinistra una coltura durante le prime fasi di fermentazione (in sospensione), a destra a fine fermentazione (formazione di un aggregato) (Walker e Stewart, 2016)

La flocculazione serve a separare, il lievito dal prodotto finito. Questo passaggio produce una birra chiara e limpida, assegnando così maggior stabilità e una migliore conservazione nel tempo. Il lievito esausto viene raccolto e riutilizzato dopo la fermentazione per essere rigenerato e impiegato nelle successive fermentazioni. Questa pratica è comune nel processo di birrificazione e costituisce un'importante strategia per ridurre i costi e mantenere la costanza del prodotto. Al contrario, nel processo di vinificazione, il lievito viene generalmente utilizzato una sola volta, poiché le condizioni e le esigenze del mosto possono variare notevolmente da una fermentazione all'altra, rendendo il riutilizzo del lievito meno pratico e più rischioso per la qualità del vino.

Alla fine, si ha la produzione di una birra chiamata “birra giovane” o “birra verde”, perché presenta ancora qualche sentore di birra non matura con combinazioni di sapore e aroma non ancora equilibrati. Durante la fase di sedimentazione della birra, la maggior parte del lievito viene rimossa, però una piccola parte permane nel prodotto e sarà essa a portare la birra a maturazione (Lodolo et al., 2008).

La maturazione è la fase dove si tende ad ottenere un affinamento del gusto e un miglioramento dell'aroma. Il lievito rimasto nel prodotto andrà ad assorbire e trasformare i composti secondari indesiderati. In seguito, in base alla tipologia di birra, si andrà incontro a chiarificazione per eliminare completamente il lievito flocculato (Gresser, 2010).

1.3. Le caratteristiche organolettiche

Il lievito oltre a formare etanolo ed anidride carbonica, tramite il suo metabolismo porta alla produzione di sottoprodotti noti come “*bioflavoring*”, i quali contribuiscono alla definizione del sapore e dell'aroma della birra. Le sostanze che hanno maggior importanza nel formare il profilo aromatico sono le seguenti: alcoli superiori, esteri, composti carbonilici e composti solforati. I fattori che influenzano la produzione di questi composti sono: il ceppo di lievito scelto, la variazione della temperatura durante la fermentazione e la composizione iniziale del mosto (Stewart, 2017).

1.3.1. Gli alcoli superiori

Gli alcoli superiori o “*fusel alcol*” contribuiscono all'aroma generale della birra e rappresentano la frazione principale dei composti volatili. Gli alcoli principali sono: N-propanolo, isobutanolo, 2-metilbutanolo e il 3-metilbutanolo e conferiscono note alcoliche e fruttate alla birra. Tuttavia, se presenti in quantità eccessive, possono influenzare negativamente il profilo aromatico, creando degli “*off-flavor*” indesiderati.

La sintesi degli alcoli può avvenire tramite due vie: la via catabolica di Ehrlich e via anabolica della sintesi delle proteine. Durante la fermentazione il lievito, attraverso la transaminazione trasforma gli amminoacidi presenti nel mosto in glutammato producendo i rispettivi α -chetoacidi i quali vengono sottoposti alle seguenti reazioni: decarbossilazione e riduzione, dando origine agli alcoli superiori. Questi composti possono formarsi, anche tramite la via anabolica che coinvolge gli amminoacidi ramificati BCAA (leucina, isoleucina e valina). L’N-propanolo e l’isobutanolo derivano dall’amminoacido valina, dando un sentore alcolico alla bevanda. Invece, il 2-metil-butanololo che deriva dal metabolismo dell’isoleucina e il 3-metilbutanololo dalla leucina, conferiscono note fruttate alla birra (Willaert, 2012).

Tabella 1.4. Concentrazioni dei principali alcoli superiori presenti nella birra (Willaert, 2012)

Compound	Flavor Threshold (mg/L)	Aroma or Taste ^(b)	Concentration Range (mg/L) Bottom Fermentation	Concentration Range (mg/L) Top Fermentation
<i>n</i> -Propanol	600 ^(c) , 800 ^(b)	Alcohol	7–19 (12) ^(a) , 6–30 ⁽ⁱ⁾	20–45 ⁽ⁱ⁾
Isobutanol	100 ^(c) , 80–100 ^(g) , 200 ^(b)	Alcohol	4–20 (12) ⁽ⁱ⁾ , 6–32 ⁽ⁱ⁾	10–24 ⁽ⁱ⁾
2-Methylbutanol	50 ^(c) , 50–60 ^(g) , 70 ^(b)	Alcohol	9–25 (15) ^(a) , 12–16 ⁽ⁱ⁾	80–140 ⁽ⁱ⁾
3-Methylbutanol	50 ^(c) , 50–60 ^(g) , 65 ^(b)	Fusely, pungent	25–75 (46) ^(a) , 30–60 ⁽ⁱ⁾	80–140 ⁽ⁱ⁾
2-Phenylethanol	5 ^(a) , 40 ^(c) , 45–50 ^(g) , 75 ^(d) , 125 ^(b)	Roses, sweetish	11–51 (28) ^(f) , 4–22 ^(g) , 16–42 ^(h) , 4–10 ⁽ⁱ⁾	35–50 ^(g) , 8–25 ^(a) , 18–45 ⁽ⁱ⁾
Tyrosol	10 ^(a) , 10–20 ^(e) , 20 ^(c) , 100 ^(d) , 200 ^(b)	Bitter chemical	6–9 ^(a) , 6–15 ^(a)	8–12 ^(g) , 7–22 ^(g)
Tryptophol	10 ^(a) , 10–20 ^(e) , 200 ^(d)	Almonds, solvent	0.5–14 ^(a)	2–12 ^(g)

1.3.2. Gli esteri

Gli esteri sono sostanze volatili e sono tra le principali sostanze responsabili dell'aroma fruttato e floreale della birra. Il valore soglia è inferiore rispetto a quello degli alcoli superiori. La produzione degli esteri è correlata al metabolismo dei lipidi. Infatti, vengono ad essere sintetizzati a partire da una reazione intracellulare tra un alcol (etilico o alcoli superiori) e un acido, l'acetil-CoA. L'enzima alcol acetiltransferasi (AATasi I e II) è situato nella membrana plasmatica del lievito e catalizza la produzione di esteri (Lodolo et al., 2008). I principali esteri che si formano sono: l'etilacetato, che porta con sé note aromatiche di mela o frutta matura; l'isoamilacetato, che dona un profumo di banana; e il feniletilacetato, famoso per il suo aroma floreale di rosa e miele (Stewart ,2017). La concentrazione degli esteri dipende da diversi fattori, tra cui il ceppo di lievito utilizzato, il livello di espressione dei geni che codificano per AATasi, la concentrazione di acetil-CoA, la temperatura di fermentazione e la concentrazione di alcoli superiori.

Tabella 1.5. Concentrazioni dei principali esteri presenti nella birra (Willaert, 2012)

Compound	Flavor Threshold (mg/L)	Aroma	Concentration Range (mg/L) in 48 Lagers
Ethyl acetate	20–30, 30 ^(a)	Fruity, solvent-like	8–32 (18.4) ^(a) , 5–40 ^(b)
Isoamyl acetate	0.6–1.2, 1.2 ^(a)	Banana, pear drop	0.3–3.8 (1.72), <0.01–2.8 ^(b)
Ethyl caproate (ethyl hexanoate)	0.17–0.21, 0.21 ^(a)	Apple-like with note of aniseed	0.05–0.3 (0.14), 0.01–0.54 ^(b)
Ethyl caprylate (ethyl octanoate)	0.3–0.9, 0.9 ^(a)	Apple-like	0.04–0.53 (0.17), 0.01–1.2 ^(b)
2-Phenylethyl acetate	3.8 ^(a)	Roses, honey, apple, sweetish	0.10–0.73 (0.54)

1.3.3. I composti carbonilici

I composti carbonilici sono diversificati e comprendono aldeidi, chetoni e dichetoni, tra i più significativi. L'acetaldeide è l'aldeide predominante, prodotta come intermedio dal lievito durante il processo di riduzione del piruvato per la produzione di etanolo. Concentrazioni superiori alla soglia di acetaldeide portano a percezioni di sapori erbacei, tipici della birra ancora non maturata (Gresser, 2010).

I dichetoni vicinali (VDK) si formano durante la fermentazione come sottoprodotti del metabolismo degli amminoacidi, in particolare di isoleucina, leucina e valina. Tra i dichetoni vicinali, il diacetile o 2,3-butanedione e il 2,3-pentandione sono rilevanti per sapore e aroma della birra (Lodolo et al., 2008). Il diacetile, derivante dal metabolismo della valina, conferisce un aroma di burro, mentre il 2,3-pentandione, proveniente dall'amminoacido isoleucina, apporta note di toffee, simili al dolce inglese noto come "mu". Questi aromi sono generalmente considerati difetti o “*off-flavour*”, poiché non sono desiderati nelle varie tipologie di birra. Inoltre, concentrazioni elevate possono indicare problemi nel processo di fermentazione o una possibile contaminazione. Durante la fase di maturazione, sia il diacetile che il 2,3-pentandione vengono ridotti in modo naturale in 2,3-butandiolo e 2,3-pentandiolo, rispettivamente, attraverso l'azione di enzimi (reduttasi) presenti nel lievito. Queste sostanze ridotte non influenzano negativamente il sapore o l'aroma della birra (Willaert, 2012).

1.3.4. I composti solforati

I composti solforati sono molecole volatili che influenzano le caratteristiche organolettiche della birra. Tra i principali composti solforati vi sono l'anidride solforosa (SO₂), l'idrogeno solforato (H₂S) e il dimetilsolfuro (DMS) (Willaert, 2012). Il metabolismo del lievito gioca un ruolo fondamentale nella produzione di H₂S e SO₂. Il lievito trasforma lo zolfo inorganico presente nel mosto in anidride solforosa, che può aggiungere aromi sgradevoli al prodotto, ma conferisce anche proprietà antiossidanti.

L'anidride solforosa può successivamente ridursi a formare acido solfidrico, H₂S. Quest'ultimo è prodotto sia da questa riduzione che come intermedio durante la sintesi degli amminoacidi solforati, come metionina e cisteina. Il lievito rilascia quindi H₂S nel mosto, conferendogli l'odore di uova marce. Fortunatamente, essendo un composto volatile, la CO₂ prodotta durante la fermentazione espelle la maggior parte di questo gas.

Il dimetilsolfuro, invece, deriva dalla degradazione del suo precursore, S-metilmetionina (SMM), presente nel malto. Durante la fermentazione, la SMM viene convertita dal lievito

in dimetilsolfuro, il quale può rimanere nel prodotto finito. Concentrazioni elevate di DMS possono influenzare negativamente il sapore e l'aroma della birra.

I composti solforati sono solo uno dei risultati del metabolismo del lievito, ma possono avere un impatto negativo sul profilo aromatico della birra. Pertanto, è fondamentale gestire la fermentazione in modo ottimale per ridurre la presenza di tali composti indesiderati. (Stewart, 2017).

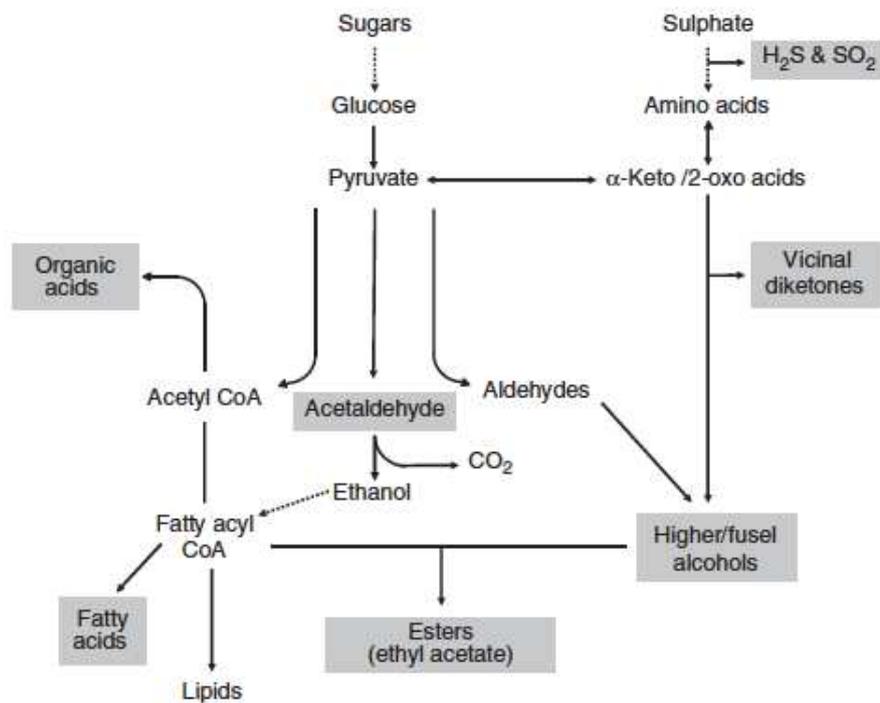


Figura 1.3. Principali vie di formazione di metaboliti secondari (Lodolo et al., 2008)

2. Lieviti convenzionali del genere *Saccharomyces* normalmente impiegati

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.1. Origine e domesticazione

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) è il principale lievito utilizzato per i processi di fermentazione nell'industria alimentare. Nel corso del tempo, il lievito *S. cerevisiae* è stato il soggetto di un processo di domesticazione. Questo fenomeno implica la selezione (volontaria e involontaria) e la coltivazione di specie di lieviti selvaggi, con l'obiettivo di ottenere varianti genetiche che prosperino in ambienti artificiali creati dall'uomo, perdendo le caratteristiche ottimali per la crescita in natura (Gallone et al., 2016). Infatti, il lievito *S. cerevisiae* deve la sua diversità, rispetto ai lieviti selvatici, non solo alle mutazioni genetiche, ma anche alla pressione selettiva generata nell'adattamento alle nuove nicchie ecologiche artificiali. *S. cerevisiae* è risultato essere una combinazione di caratteristiche sia intrinseche, come la tolleranza all'etanolo, sia acquisite attraverso la selezione umana. Queste ultime includono la capacità di metabolizzare il maltotriosio, la perdita della capacità di riprodursi sessualmente e la riduzione (tramite programmi di selezione) della formazione del 4-vinil guaiacolo, un composto aromatico negativo che si origina dall'acido ferulico, presente nella parete cellulare dell'orzo e rilasciato in diverse quantità durante il processo di maltazione (Gallone et al., 2018).

S. cerevisiae possiede un DNA genomico composto da 16 cromosomi e il suo genoma è stato completamente sequenziato. Questo processo ha rivelato che il genoma di *S. cerevisiae* contiene circa 6000 geni. Ad esempio, un gene eucariotico è *FSY1*, che codifica un trasportatore di fruttosio e conferisce a *S. cerevisiae* la capacità di metabolizzare il fruttosio verso la fine della fermentazione quando la quantità degli altri esosi inizia ad abbassarsi (Parapouli et al., 2020).

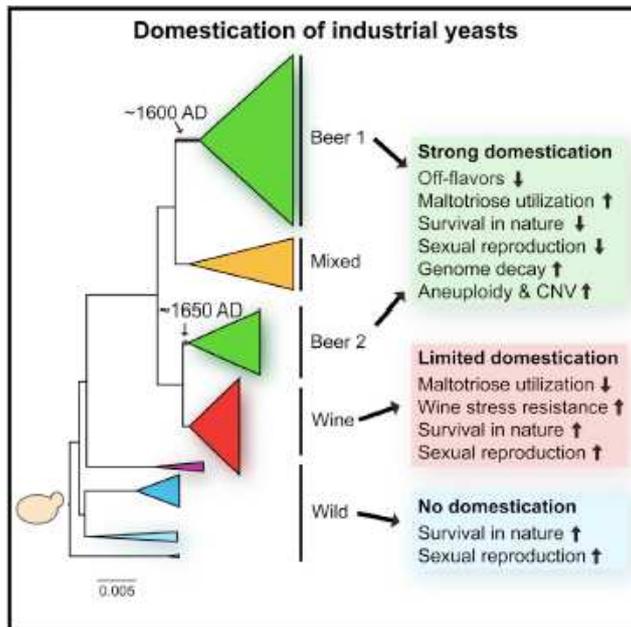


Figura 2.1. Rappresentazione delle caratteristiche di *S. cerevisiae* dovute dall'addomesticazione (Gallone et al., 2016).

2.1.2. La birra Ale

Nella produzione della birra, vengono impiegate due tipologie di lievito, distinte in base alla loro proprietà di flocculazione: il lievito Ale associato a una fermentazione ad alta temperatura e il lievito Lager, associato a una fermentazione a bassa temperatura.

Saccharomyces cerevisiae costituisce lievito Ale, ed è la specie utilizzata per produrre birre ad alta fermentazione. Si differenzia dal lievito Lager per varie caratteristiche fenotipiche, tra cui le modalità di flocculazione e la temperatura ottimale durante il processo di fermentazione. Inoltre, il lievito Ale contribuisce a produrre profili aromatici distintivi nelle birre. A differenza del lievito Lager, il lievito Ale non utilizza il melibiosio, un disaccaride composto da una unità di glucosio e una di galattosio, che deriva dal processo di ammostamento del malto (Lodolo et al., 2008).

Il processo ad alta fermentazione prende il nome proprio dal comportamento di flocculazione del lievito. Infatti, *S. cerevisiae* viene anche definito *top-fermenter* perché durante la fermentazione, le componenti idrofobiche della parete cellulare fanno sì che le cellule aderiscano all'anidride carbonica e risalgano in superficie insieme alla schiuma e quindi l'eliminazione delle cellule a fine fermentazione avviene con la rimozione della schiuma superficiale (Boulton e Quain, 2008). Questa caratteristica porta ad un vantaggio nella produzione, cioè riuscire a recuperare un quantitativo più elevato di lievito vitale. Tuttavia, operando in vasche aperte, si verifica una maggiore esposizione all'ambiente esterno che può incrementare la presenza di contaminazioni microbiche nella massa di lievito e nella birra in produzione (White e Zainasheff, 2016).

La temperatura ottimale di fermentazione di questa specie, che cresce fino a una temperatura di 35°C, varia da 18° e 21°C. Questo range porta alla formazione di rilevanti caratteristiche organolettiche. Infatti, le birre ad alta fermentazione sono caratterizzate da note fruttate, dolci e speziate, derivanti principalmente da alcoli superiori ed esteri (Stewart,2017).

Esistono diverse tipologie di birra Ale, tra le principali si trovano: Pale Ale, India Pale Ale o IPA, Porter o Belgian Ale. Ognuna di queste con diverse caratteristiche di sapore e aroma (Gresser, 2010).

2.2. *Saccharomyces pastorianus*

2.2.1. Origine

Saccharomyces pastorianus (*S. pastorianus*) è il lievito Lager impiegato nella produzione di birra a bassa fermentazione. Diversi studi hanno dimostrato che *S. pastorianus* è un ibrido interspecifico tra *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus*. Inizialmente, non erano chiare le specie coinvolte in questa ibridazione, si supponeva che *S. cerevisiae* si fosse ibridato con una specie geneticamente correlata alla specie *Saccharomyces bayanus*. Tuttavia, la scoperta della specie diploide, *S. eubayanus*, che presenta una corrispondenza genetica con il subgenoma di *S. pastorianus* ha confermato il processo di ibridazione del lievito (Gibson e Liti, 2015).

Si suppone che l'incontro tra i due lieviti sia avvenuto a causa di ripetute contaminazioni del mosto di malto, in cui predominava *S. cerevisiae*, da parte di ceppi della specie freddo fermentante *S. eubayanus*. Questa specie era avvantaggiata rispetto a quella selvatica quando la fermentazione avveniva a basse temperature. Poiché, prima dell'avvento della refrigerazione industriale, la produzione di birra avveniva tradizionalmente solo nei mesi più freddi per migliorarne la conservazione, queste condizioni hanno originato la pressione evolutiva che ha generato l'ibrido interspecifico *S. pastorianus* (Gibson e Liti, 2015). *S. pastorianus* manifesta l'eterosi, ovvero la tendenza di un ibrido a esibire qualità superiori rispetto ai genitori, sviluppando la notevole capacità fermentativa di *S. cerevisiae* e la tolleranza al freddo di *S. eubayanus*. Questo ha portato a un aumento significativo nella popolazione di lieviti durante la fermentazione. Si ritiene che il nuovo microrganismo non abbia avuto effetti negativi sulla qualità della birra e sia stato introdotto involontariamente nelle successive fermentazioni. Sono state, inoltre, osservate diverse divergenze funzionali in *S. pastorianus*. Ad esempio, la presenza del gene KEX2, derivante da *S. eubayanus*, sembra contribuire a rafforzare la criotolleranza, mentre l'omologo gene di *S. cerevisiae* non ha mostrato alcuna influenza su questa caratteristica (Yamagishi et al., 2010).

2.2.2. I ceppi Saaz e Frohberg

Nella specie *S. pastorianus* sono presenti due ceppi geneticamente distinti: Saaz o gruppo ibrido 1 e Frohberg o gruppo ibrido 2. Si sono originati indipendentemente e mostrano caratteristiche tipiche dei lieviti Lager, come la forte capacità fermentativa, la criotolleranza e la capacità di flocculare che determina l'attitudine a sedimentare, ma differiscono per l'intensità con cui esprimono questi caratteri (Gibson e Liti, 2015).

I ceppi del gruppo Saaz, il quale nome deriva dalla città di Žatec in Boemia, la regione dove furono utilizzati la prima volta, dimostrano una forte capacità di flocculazione, ma non riescono a metabolizzare completamente gli zuccheri presenti nel mosto di malto e questo implica un potere fermentativo inferiore. Diversi studi hanno dimostrato che lo zucchero che non viene metabolizzato completamente è il maltotriosio. Rispetto il gruppo 2, questi lieviti sono più tolleranti al freddo e quindi riescono a crescere in modo più efficiente alle basse temperature (Gibson e Liti, 2015).

I ceppi del gruppo Frohberg, così chiamati dal nome dell'omonima città tedesca, presentano una capacità di flocculazione meno pronunciata, ma mostrano una notevole capacità e velocità fermentativa. Questi lieviti metabolizzano rapidamente e completamente il maltotriosio. Tuttavia, i lieviti del gruppo Frohberg dimostrano una maggiore sensibilità all'essiccazione e alla reidratazione rispetto ai lieviti Saaz (Layfield et al., 2011).

Le differenze funzionali tra questi due gruppi derivano dalla presenza di variazioni a livello genomico. Il gruppo Saaz è formato da ibridi diploidi di *S. pastorianus*, derivanti da un incrocio tra una spora aploide di *S. cerevisiae* e una spora aploide di *S. eubayanus*, contenenti più DNA derivante da *S. eubayanus*. Invece, il gruppo Frohberg deriva dall'incontro tra una cellula diploide di *S. cerevisiae* e una cellula aploide di *S. eubayanus*, creando un ibrido contenente più DNA di *S. cerevisiae*. Tuttavia, entrambi i gruppi hanno ereditato, da *S. eubayanus*, il fenotipo criotollerante ma la sensibilità al freddo risulta coerente con la quantità di DNA di *S. eubayanus* presente nei genomi dei due gruppi (Dunn e Sherlock, 2008).

2.2.3. La birra Lager

Il lievito *Saccharomyces pastorianus* è utilizzato per la produzione di birre a bassa fermentazione. Durante il processo di fermentazione con lieviti Lager, che avviene a temperature comprese tra gli 8 e i 13°C, si verifica una fermentazione più lenta rispetto a quella condotta ad alte temperature (Ale) con *S. cerevisiae*. Questo prolungamento dei tempi di fermentazione riduce significativamente la formazione di sottoprodotti indesiderati. A

differenza dei lieviti Ale, i lieviti Lager come *S. pastorianus* sono in grado di metabolizzare il melibiosio, ma producono quantità minori di esteri e alcoli superiori. La differenza principale tra le due specie di lievito è il comportamento di flocculazione: *S. pastorianus*, noto anche come *bottom-fermenter*, forma agglomerati che sedimentano sul fondo del fermentatore alla fine del processo di fermentazione (Lodolo et al.,2008). Le birre lager presentano caratteristiche organolettiche meno complesse rispetto alle birre Ale, ma offrono un sapore distintivo che deriva principalmente dal luppolo e dal malto utilizzato. (White e Zainasheff, 2016).

Tra le principali tipologie di birre lager si possono citare: Pils, Münchner, Bock e Doppelbock (Gresser, 2010).

Tabella 2.1. Principali differenze tra lieviti Ale e Lager (Walker e Stewart, 2016)

Ale Yeast
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ale type). Typical fermentation temperature—18–25 °C. Maximum growth temperature—37 °C or higher. Does not ferment melibiose. “Top” fermenter.
Lager yeast
<i>Saccharomyces pastorianus</i> . Typical fermentation temperature—8–15 °C. Maximum growth temperature—34 °C. Ferments melibiose. “Bottom” fermenter.

3. Lieviti non-Saccharomyces

3.1. Generalità

I lieviti non-*Saccharomyces* sono oggetto di un crescente interesse negli ultimi anni, poiché possono conferire aromi e profili sensoriali unici ai prodotti fermentati, inclusa la birra. I generi di lieviti più studiati includono *Brettanomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Torulaspota* (Michel et al., 2016). Oltre alla loro capacità di produrre alcol e anidride carbonica durante la fermentazione, alcuni di essi possono anche metabolizzare zuccheri complessi, acidi organici e altri substrati, influenzando così il gusto, l'aroma e la stabilità del prodotto finale.

Negli ultimi anni, i cambiamenti socioculturali hanno influenzato le richieste e le preferenze nel settore della birra. La crescente popolarità delle birre speciali e la crescente attenzione alla salute hanno definito nuove tendenze. La ricerca di nuovi gusti e tipologie, inclusi prodotti come birre ipocaloriche e analcoliche, sta guidando la diversificazione del mercato birraio. Infatti, l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* rappresenta un'innovazione significativa nella produzione della birra, con un aumento dell'interesse sia da parte dei birrai che dei ricercatori, come dimostrato dal numero crescente di pubblicazioni su questo argomento (Miguel et al., 2022).

La gestione dei lieviti non-*Saccharomyces* richiede un'attenzione particolare poiché alcuni di essi possono essere considerati contaminanti indesiderati in determinati contesti di produzione. Tuttavia, quando utilizzati sotto controllo, i lieviti non-*Saccharomyces* offrono la possibilità di creare birre innovative e di alta qualità (Basso et al., 2016).

Nei processi di produzione, i lieviti non-*Saccharomyces* sono impiegati attraverso due principali tecniche: la coltura pura o l'inoculo sequenziale.

La coltura pura si concentra sull'isolamento e sull'utilizzo di specifiche specie di lievito non-*Saccharomyces* come unico starter, con l'obiettivo di ottenere una fermentazione controllata e prevedibile. Utilizzando la coltura pura, si mira a mantenere la coerenza nel processo produttivo e a sviluppare profili sensoriali stabili nel prodotto finale.

Invece, l'inoculo sequenziale, consiste nell'inserimento di diversi ceppi di lievito sia *Saccharomyces* che non-*Saccharomyces* in fasi specifiche della fermentazione. L'inserimento di diversi ceppi in momenti diversi della fermentazione mira ad arricchire il profilo sensoriale della birra, aggiungendo complessità e caratteristiche distintive al prodotto finale. Sebbene ci siano ancora pochi studi in merito a questa pratica nell'ambito birraio, essa offre l'opportunità di esplorare nuove dimensioni di gusto e aroma nella birra (Vanderhaegen et al., 2003).

Tabella 3.1. Ruolo dei principali lieviti non-Saccharomyces per la produzione di birre innovative (Capece et al., 2018).

Bioflavouring	Alcohol Reduction	Calories Reduction
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Dekkera/Brettanomyces</i>: ester production (fruity or floral character); β-glucosidase activity 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Saccharomyces ludwigii</i>: low fermentation activity in maltose and maltotriose 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>: glucoamylase activity (digestion of dextrins)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Wickerhamomyces anomalus</i>: production of ethyl acetate, ethyl propanoate, phenyl ethanol, and 2-phenylethyl acetate (fruity aroma) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Torulaspora delbrueckii</i>: inability to ferment maltose and maltotriose 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Dekkera/Brettanomyces</i>: β-glucosidase activity (degradation of dextrins)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Torulaspora delbrueckii</i>: production of 2-phenylethanol and amyl alcohols (fruity and floral aroma) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pichia kluyveri</i>: limited ability to ferment glucose 	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lachancea thermotolerans</i>: production of lactic acid (flavor and mouthfeel) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zigosaccharomyces rouxii</i>: total or partial inability to ferment maltose 	

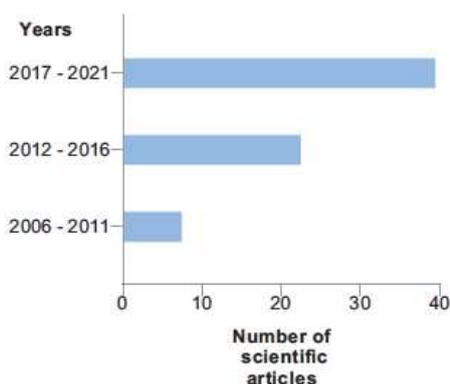


Figura 3.1. Pubblicazioni di studi di lieviti non-Saccharomyces nella produzione della birra (Miguel et al., 2022).

3.2. Principali specie di lievito

3.2.1. *Brettanomyces bruxellensis*

Brettanomyces bruxellensis è tradizionalmente associato alle birre Lamb, prodotte attraverso una complessa serie di fermentazioni spontanee, in quanto parte del microbiota naturale e recentemente ha suscitato un crescente interesse nel settore birrario, al punto di essere proposto come co-starter. Nelle birre Lambic *B. bruxellensis* partecipa alla fase di acidificazione e maturazione, che avviene circa tre o quattro mesi dopo l'inizio della fermentazione. Oltre alle tipiche note fenoliche (etilfenolo ed etilguaiacolo) attribuite ai ceppi appartenenti a questa specie, la presenza di *B. bruxellensis* determina notevoli variazioni del profilo sensoriale complessivo. Si nota, infatti, un carattere fruttato o floreale grazie alla produzione di alti livelli di esteri etilici: acetato di etile (21.9 mg/L), caprato di

etile e caprilato di etile. Questa specie, inoltre, a causa della trasformazione metabolica di composti fenolici, impartisce alcuni sapori particolari i cui descrittori, "horse blanket" e "funky", indicano la presenza di un sentore terroso e selvaggio, contribuendo a un bouquet complesso e positivo (Michel et al. 2016). Questi composti sono generati dalla metabolizzazione gli acidi idrossicinnamici, come l'acido ferulico, presente principalmente nella crusca e nel pericarpo dei cereali, incorporati nel mosto durante il processo di ammostamento. *B. bruxellensis* possiede due enzimi che riducono questi acidi in etilfenoli attraverso due reazioni principali consecutive: la prima è l'azione dell'enzima cinnamato decarbossilasi, che trasforma gli acidi nei rispettivi vinilfenoli; la seconda è l'enzima vinilfenolo reduttasi, che riduce i vinilfenoli in etilfenoli. La presenza di questi ultimi composti sopra la soglia di percezione è considerata indesiderabile nella maggior parte degli stili di birra, ma è essenziale in molti altri, come la Lambic belga e le German Weizen (Basso et al., 2016). Le caratteristiche uniche di gusto e aroma sono strettamente legate all'attività di *B. bruxellensis*. Oltre a possedere caratteristiche che favoriscono una buona attività nelle fermentazioni alcoliche, come la tolleranza alla pressione osmotica, all'etanolo, alla limitata presenza di ossigeno e al basso pH, questa specie mostra un metabolismo diversificato che porta a risultati interessanti e insoliti nella produzione di birra (Basso et al., 2016). I lieviti *Brettanomyces* possono metabolizzare una vasta gamma di fonti di carboidrati, tra cui cellobiosio e destrine. Questi zuccheri non sono facilmente assimilabili dal genere *Saccharomyces*. Il cellobiosio è un disaccaride presente nelle botti di legno utilizzate per la maturazione delle birre, mentre le destrine sono zuccheri più complessi, come maltotetraosio e maltopentaosio ottenuti durante la fase di ammostamento. Difatti, queste molecole sono le principali componenti del contenuto zuccherino residuo nelle birre fermentate da *S. cerevisiae* e possono essere degradate dalla β -glucosidasi. Questo enzima, prodotto comunemente da *B. bruxellensis*, trasformando gli zuccheri complessi in zuccheri semplici facilmente assimilabili, permette la produzione di una birra "super-attenuata", cioè con pochi zuccheri residui. Questo comporta l'ottenimento di un nuovo stile di birra dove il basso contenuto zuccherino residuo costituisce un punto di innovazione. Tuttavia, quando nel mosto ci sono più zuccheri fermentabili, i livelli di alcol nei prodotti finali aumentano. Dato che l'etanolo possiede un valore energetico superiore rispetto ai carboidrati, per produrre birre a basso contenuto calorico è necessario rimuovere ulteriormente una parte dell'alcol (Capece et al., 2018). Le ricerche effettuate da Brandam e collaboratori (2007) hanno dimostrato che effettuando fermentazioni tra 20°C e 22°C si otteneva una migliore produzione di etanolo e la diminuzione del contenuto di acido acetico (55,4 mg/L) rilasciato

nel mezzo. I lieviti *B. bruxellensis* impartiscono alla bevanda una serie di caratteristiche sensoriali peculiari, principalmente attraverso la produzione di composti fenolici (POF), che in alcuni contesti sono considerati off-flavours descritti come "gomma", "plastica bruciata", "medicinale" e "cuoio". Un'altra caratteristica notevole dei *B. bruxellensis* è la produzione di β -glucosidasi, un enzima responsabile dell'idrolisi dei glicosidi. I glicosidi sono composti costituiti da una molecola aromatica (aglicone) e una β -D-glucosio (glicone), con possibili unità di zucchero aggiuntive. Tali composti si trovano comunemente in piante, fiori e frutti, e alcuni di essi sono utilizzati nella birrificazione e sono presenti nei luppoli e nel legno delle botti usate per la maturazione. L'idrolisi enzimatica dei glicosidi libera le molecole di zucchero, che vengono ulteriormente metabolizzate, e l'aglicone, che può esprimere attività aromatica. rappresentando una metodologia poco esplorata per migliorare il potenziale aromatico delle birre. L'attività della β -glucosidasi dipende dal ceppo, ma *B. bruxellensis* si distingue per la sua azione idrolitica su vari substrati, questo significa che può produrre enzimi che catalizzano la scissione (idrolisi) di molecole complesse in molecole più semplici, emergendo come una buona opzione per fermentazioni in coltura pura (Basso et al., 2016).

Questa capacità potrebbe influenzare o arricchire l'aroma determinato dal luppolo, poiché molti dei monoterpeni liberati, come il linalolo (che fornisce aromi di agrumi, floreali e di anice) e il metil salicilato (che dà aromi di menta e spezie), sono tra le principali sostanze aromatiche del luppolo. I ceppi di *B. bruxellensis* che presentano questa attività enzimatica potrebbero essere una scelta interessante per le fermentazioni in coltura pura o tramite inculo sequenziale con *S. cerevisiae* (Capece et al. 2018).

Tabella 3.2. Concentrazioni dei composti volatili alla fine della fermentazione con *B. bruxellensis*, ceppo LTQB6 (Michel et al, 2016)

Volatili compounds	Acetaldehyde	Ethyl acetate	1-Propanol	Isobutanol	Isoamyl alcohol	Acetic acid	Furfural	Higher alcohols
LTQB6	26.3 mg/L	21.9 mg/L	21.7 mg/L	18.3 mg/L	57.7 mg/L	55.4 mg/L	7 mg/L	97.7 mg/L

3.2.2. *Pichia anomala*

Il lievito *Pichia anomala* è stato recentemente riclassificato in *Wickerhamomyces anomalus*. Gli studi hanno dimostrato la sua capacità di metabolizzare una vasta gamma di zuccheri, tra cui esosi, pentosi, disaccaridi e polisaccaridi, così come alcuni alcoli, acidi organici, acidi grassi e idrocarburi aromatici. Sebbene alcune evidenze indichino che *P. anomala* possa avere difficoltà a metabolizzare il maltosio, altri studi dimostrano che alcuni ceppi sono in grado di utilizzare questo zucchero e possono crescere meglio di altri lieviti commerciali utilizzati nella birrificazione. Questa specie dimostra anche una notevole flessibilità fisiologica, potendo crescere in assenza di ossigeno, in un elevato intervallo di temperature e con varie condizioni di pH. I ceppi di questa specie mostrano una certa sensibilità all'etanolo e all'acetato, ma sono tolleranti a elevate pressioni osmotiche e possiedono meccanismi di adattamento efficienti agli stress ambientali. Per quanto riguarda il contributo alle caratteristiche organolettiche *P. anomala* è un efficace produttore di etil propanoato, fenil etanolo, 2-feniletile acetato e, in particolare, etil acetato (100 mg/L). *P. anomala* produce etil acetato principalmente attraverso la reazione inversa dell'enzima esterasi, utilizzando come precursori acetato ed etanolo a differenza di *S. cerevisiae*, che sintetizza l'etil acetato principalmente da acetil-CoA ed etanolo tramite alcol acetiltransferasi. Questo composto è importante anche per la sua attività antifungina, che può contribuire a preservare la qualità del prodotto finale (Capece et al., 2018). Dal punto di vista sensoriale, l'etil acetato ha un impatto diretto sul gusto e sull'aroma della birra, conferendo un carattere fruttato interessante o un aroma sgradevole di solvente, a seconda delle concentrazioni presenti. *P. anomala* ha mostrato una concentrazione di alcoli superiori (65 mg/L) inferiore rispetto a quella prodotta da *S. cerevisiae* (150 mg/L). Inoltre, è stato rilevato che *P. anomala* produce 4-vinilguaiacolo (1,69 mg/L), derivato dagli acidi fenolici, in quantità che superano la soglia di percezione (0,3 mg/L) generando, un aroma di chiodo di garofano (Fig.3.1.). Tradizionalmente il 4-vinilguaiacolo è considerato un difetto, ma è ricercato come profumo distintivo in birre bianche e birre di frumento (Larroque et al.,2021). *P. Anomala* si presenta come un buon candidato nelle fermentazioni sequenziali o co-inoculate con altri lieviti, anche per la sua azione inibitoria contro alcuni microrganismi.

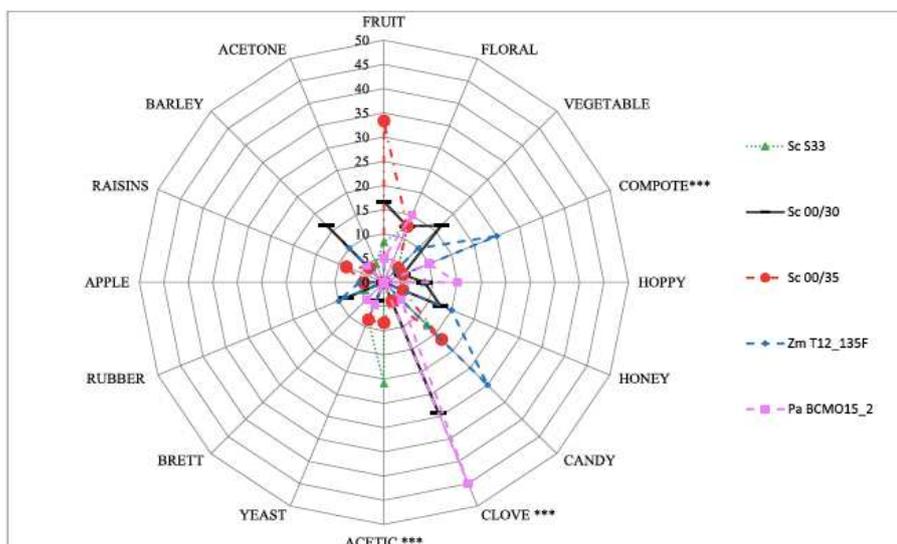


Figura 3.2. Valutazione sensoriale di birre prodotte con colture pure di ceppi di *S. cerevisiae* (*Sc. S33*, *Sc. 00/30*, *Sc. 00/35*), *Pichia anomala* (*Pa BCM015_2*), *Zygoascus meyeriae* (*Zm T12_135F*) (Larroque et al., 2021).

Tabella 3.3. Aromi prodotti da *S. cerevisiae* e *P. anomala*. I valori sono espressi in OAV (Odour Activity Value), calcolati come il rapporto tra la concentrazione di un composto specifico in una matrice (birra) e la soglia di percezione di quel composto. Valori superiori o uguali a 1 hanno influenza sensoriale (Larroque et al., 2021.)

Compounds	OAV		
	Sc 00/30	Sc 00/35	Pa BCM015_2
<i>Higher alcohols</i>			
3-Methyl-1-butanol	2	2	1
3-(Methylthio)-1-propanol	1	2	2
2-Phenylethanol	2	3	2
<i>Ethyl esters</i>			
Ethyl hexanoate	16	20	25
Ethyl octanoate	129	95	95
<i>Acetates</i>			
Isoamyl acetate	19	20	1
2-Phenylethyl acetate	2	2	<1
<i>Acids</i>			
Butanoic acid	4	20	4
Hexanoic acid	1	2	<1
Octanoic acid	16	1	3
<i>Isoacids</i>			
Isovaleric acid	27	29	24
<i>Volatile phenols</i>			
4-Vinylguaiacol	5	4	6
<i>Terpenes</i>			
Limonene	1	1	<1

3.2.3. *Torulaspora delbrueckii*

Torulaspora delbrueckii, lievito generalmente presente in ambiente enologico, è stato anche studiato nel settore della panificazione, dove alte concentrazioni di sale e zucchero, letali per molti lieviti comuni negli impasti, non lo danneggiano grazie alla sua elevata tolleranza osmotica. Pertanto, *T. delbrueckii* è stato considerato un innovativo lievito per panificazione. Dato che l'alta tolleranza osmotica è una sfida nella produzione di birre con tecnologia *high gravity*, ovvero ottenute a partire da mosti ad alta densità, questo lievito è stato preso in considerazione anche per il settore birraio. Recenti studi indicano che molti ceppi riescono a resistere fino a un massimo di 5% di etanolo (Capece et al., 2018). Questo lievito fermenta mosti sia ad alta che a media densità, producendo una quantità significativa di alcoli superiori (114.8 mg/L) ed esteri. Il contributo più interessante di questo lievito è nel profilo dei composti volatili che può conferire alla birra finale. Recenti ricerche indicano che alcuni ceppi producono 2-feniletanolo (aromi dolciastri, di petali di rosa e floreali), n-propanolo, iso-butanolo e alcol amilico (69 mg/L) (aroma di "solvente o brandy"). *T. delbrueckii* produce basse quantità di isoamil acetato, etil esanoato, etil ottanoato ed etil decanoato, con concentrazioni trascurabili e al di sotto della soglia di percezione (0,01 mg/l).

Tataridis e collaboratori, nel 2013, hanno utilizzato il lievito *T. delbrueckii* per produrre birre di frumento tedesche. Hanno impiegato un mosto di malto con 11°P, fermentandolo a 20°C per 8 giorni. Dopo la fermentazione, la birra è stata conservata a 25°C per i successivi 5 giorni seguiti da 14 giorni di maturazione a 10°C. La birra ottenuta è stata confrontata con una birra prodotta da *S. cerevisiae*, alle stesse condizioni, analizzandone il sapore e l'aroma. Lo studio ha dimostrato che la birra prodotta con *T. delbrueckii* aveva un alto contenuto di esteri, che conferivano aromi di rosa e gomma da masticare, ed è stata preferita dai partecipanti del panel rispetto alla birra prodotta da *S. cerevisiae*.

Canonico e collaboratori, in uno studio del 2017, hanno analizzato 28 ceppi di *T. delbrueckii* per l'uso nella fermentazione del mosto di malto, le birre finali sono state descritte come fruttate e citriche, con un corpo pieno, dimostrando l'attitudine dei ceppi testati per produrre birre dal gusto piacevole e aromatico. Queste birre presentavano una bassa concentrazione di etanolo (2,66% v/v), a causa dell'utilizzo parziale del maltosio, suggerendo che *T. delbrueckii* potrebbe essere utilizzato anche per birre a bassa gradazione alcolica. La velocità di fermentazione è generalmente più lenta rispetto ai ceppi di *S. cerevisiae* utilizzati nella birrificazione (Michel et al., 2016).

Un'altra caratteristica importante per il lievito in condizioni di birrificazione è la tolleranza agli iso- α -acidi del luppolo, che hanno un effetto inibitorio su alcuni microrganismi. Il lievito *T. delbrueckii* può crescere, sebbene con un aumento della fase di latenza, fino a 90 ppm di iso- α -acidi, una concentrazione tipica delle birre altamente luppolate (Basso et al., 2016). A differenza di *B. bruxellensis*, *T. delbrueckii* non possiede gli enzimi necessari per la riduzione degli acidi idrossicinnamici, evitando così la produzione di aromi fenolici indesiderati. Tuttavia, spesso produce elevate quantità di diacetile, che non possono essere ridotte durante la maturazione. Nel complesso, le bevande fermentate con *T. delbrueckii* presentano sapori di miele e pera, con un carattere marcatamente citrico e fruttato al palato (Michel et al., 2016).

Tabella 3.4. Concentrazioni dei composti volatili alla fine della fermentazione con *T. delbrueckii*, ceppo LTQV7 (Michel et al., 2016)

Volatile compounds	Acetaldehyde	Ethyl acetate	1-Propanol	Isobutanol	Isoamyl alcohol	Acetic acid	Higher alcohols
LTQB7	47.9 mg/L	16.2 mg/L	22.4 mg/L	23.3 mg/L	69 mg/L	93.4 mg/L	114.8 mg/L

3.3. Aspetti e considerazioni sulla sicurezza

L'avanzamento nell'ambito dell'innovazione per la produzione di birra ha introdotto l'impiego di lieviti non-*Saccharomyces*, suscitando la necessità di valutarne attentamente l'idoneità per l'utilizzo sicuro. Di solito, i criteri di valutazione comprendono: identificazione tassonomica mediante metodi aggiornati, valutazione di virulenza e patogenicità, analisi della resistenza agli agenti antifungini, valutazione della produzione di ammine biogene e analisi delle possibili reazioni allergiche (Miguel et al., 2022). Il primo lievito ad aver ottenuto lo status QPS (Qualified Presumption of Safety) è stato *S. cerevisiae*, grazie alla sua lunga storia di utilizzo documentato nel tempo. Le colture starter, cioè i microrganismi impiegati nella produzione e considerati ingredienti alimentari caratteristici, devono rispettare la legislazione in vigore come qualsiasi altro ingrediente aggiunto volontariamente agli alimenti. Nell'Unione Europea, devono aderire ai requisiti del Regolamento CE n.178/2002 (Hazards (BIOHAZ) et al., 2017). Generalmente, i lieviti non sono considerati agenti infettivi come virus e batteri. Infatti, fanno parte della normale dieta umana senza causare effetti negativi.

La valutazione della sicurezza dei lieviti aggiunti intenzionalmente al prodotto deve essere effettuata a tre livelli: a livello di ceppo, durante la produzione e durante la conservazione del prodotto. La valutazione a livello di ceppo è rilevante poiché alcune preoccupazioni di

sicurezza dipendono dal ceppo stesso, come la resistenza agli antifungini, la produzione di ammine biogene, di acetaldeide e di carbammato di etile (Miguel et al.,2022).

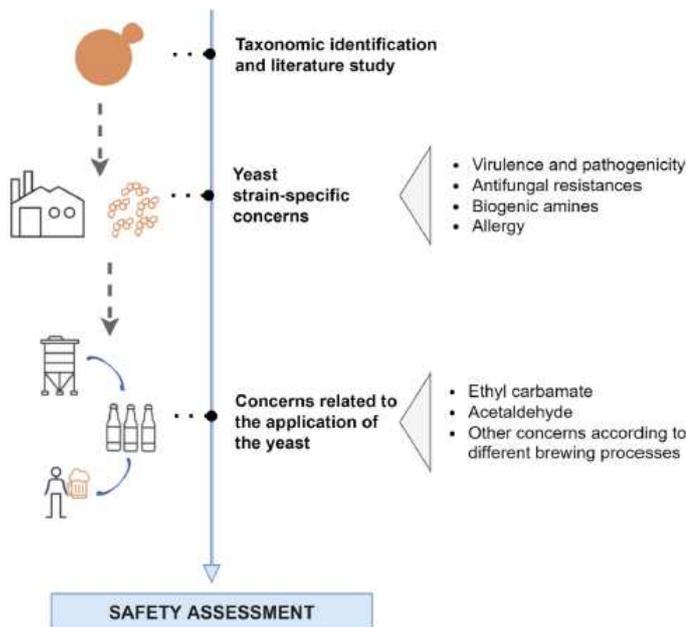


Figura 3.3. Rappresentazione schematica per valutare la sicurezza dei lieviti non-*Saccharomyces* (Hazards (BIOHAZ) et al., 2022).

3.3.1. Resistenza antifungina

La resistenza agli antifungini nei lieviti è meno comune rispetto alla resistenza agli antibiotici nei batteri. Analogamente ai batteri, la suscettibilità antifungina viene valutata fenotipicamente attraverso la misurazione della MIC (concentrazione minima inibente), che rappresenta la concentrazione più bassa di un agente antimicrobico necessaria per impedire la crescita visibile del microrganismo. La resistenza agli antifungini è principalmente dovuta a una resistenza intrinseca, che si verifica quando la capacità dei ceppi di resistere all'antifungino è innata nella maggior parte dei ceppi della specie. Inoltre, la resistenza può essere acquisita attraverso l'esposizione di un ceppo a un antifungino, che causa mutazioni (Miguel et al., 2022).

Nel 2018, Douglass e colleghi hanno rilevato la presenza di resistenza agli antifungini nella specie di lievito non-*Saccharomyces*, *Pichia kudriavzevii*. Questo lievito è stato isolato nella birra fermentata di riso, nel cacao e nel formaggio di capra. Lo studio ha evidenziato una resistenza intrinseca di *P. kudriavzevii* al fluconazolo, un farmaco antifungino impiegato per trattare infezioni micotiche. Inoltre, si è notato anche un rapido sviluppo di resistenza ad altri farmaci antifungini. Infine, lo studio ha raccomandato di valutare l'utilizzo di specie

di *Pichia* non resistenti come potenziali alternative per determinate applicazioni industriali (Douglass et al., 2018).

Considerando la mancanza di trasferimento orizzontale dei geni di resistenza agli antifungini, il gruppo EFSA, l'autorità europea per la sicurezza alimentare che fornisce consulenze scientifiche indipendenti su rischi connessi all'alimentazione, ritiene che i geni di resistenza antifungina acquisita non siano significativi nel contesto dei lieviti utilizzati a scopi alimentari. Nonostante ciò, l'EFSA richiede una valutazione della suscettibilità agli antifungini usati in medicina per il trattamento delle infezioni fungine nei lieviti che rimangono vitali nel prodotto alimentare finale. Questo è particolarmente rilevante nel contesto in cui molte birrerie non pastorizzano i loro prodotti (Miguel et al., 2022). L'attuale qualifica per i lieviti con status QPS richiede l'assenza di resistenza agli antimicotici utilizzati nel trattamento medico delle infezioni da lieviti nei casi in cui le cellule vitali vengono aggiunte alla catena alimentare o mangimistica (EFSA-BIOHAZ Panel, 2022).

3.3.2. Ammine biogene

Le ammine biogene (BA) sono composti derivati dall'attività microbica, risultanti dalla decarbossilazione degli aminoacidi. La loro presenza può rappresentare un problema per la salute umana. L'EFSA ha espresso un parere sulla quantità di BA nella birra, riscontrando generalmente livelli inferiori a 12 mg/L, che sono considerati bassi rispetto ad altri alimenti fermentati, come i formaggi stagionati, dove le quantità possono variare da 177 a 334 mg/kg. Il problema delle ammine biogene nella birra non è tanto la quantità presente nel prodotto, quanto piuttosto il consumo elevato di birra in breve tempo e la presenza di etanolo, che inibisce gli enzimi coinvolti nella disintossicazione delle BA nel corpo umano (Pradenas et al., 2016). Le ammine biogene più comuni nella birra sono la putrescina e la tiramina. Durante la fermentazione, si è osservata una concentrazione stabile di istamina, la più studiata e pericolosa tra le ammine biogene, ma rispettivamente un aumento di tiramina nel corso della fermentazione. La tiramina, la seconda ammina biogena più pericolosa, è spesso associata ad episodi di emicrania e ipertensione. Tuttavia, lo studio della produzione di ammine biogene da parte dei lieviti nelle produzioni alimentari è ancora limitato rispetto a quella dei batteri. L'EFSA afferma *“non vi è alcuna prova circa la formazione massiccia di BA da parte dei lieviti, sebbene essi possano contenere enzimi costitutivi della decarbossilassi degli aminoacidi coinvolti in una serie di funzioni fisiologiche”* (EFSA-BIOHAZ Panel, 2011). La letteratura suggerisce, che l'utilizzo di alcuni lieviti non-

Saccharomyces nella produzione della birra potrebbe diminuire la concentrazione finale di BA, migliorando la sicurezza alimentare (Miguel et al., 2022).

3.3.3. Carbammato di etile

Il carbammato di etile (EC) è un composto chimico noto come uretano, il quale è stato classificato dalla IARC, come “probabilmente cancerogeno per l’uomo” inserendolo nel gruppo 2A (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2010). JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ha dichiarato che l'assunzione media giornaliera di EC è compresa tra 1 e 4 µg al giorno. Tuttavia, l'EFSA ha stabilito per le bevande alcoliche, inclusa la birra, un limite per il contenuto di EC pari a 5 µg/L (Miguel et al., 2022). Questa sostanza si forma attraverso una reazione spontanea non enzimatica tra l'etanolo e un composto contenente un gruppo carbamilico, come l'urea. L'urea viene prodotta dal lievito durante il processo di fermentazione. In *S. cerevisiae*, la produzione di urea avviene tramite l'idrolisi dell'aminoacido arginina, convertito prima in ornitina e poi in urea. In diversi lieviti non-*Saccharomyces*, come *Pichia* e *Zygosaccharomyces*, è stato riscontrato sia l'enzima ureasi, che degrada l'urea in ammoniaca e CO₂, sia l'enzima urea amidoliasi (UA), che converte l'urea in ammoniaca e anidride carbonica tramite una reazione a due fasi. Questo enzima infatti, a differenza dell'ureasi, svolge la sua attività in un'unica fase (Strope et al., 2011). Pertanto, l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* capaci di degradare l'urea, attraverso l'enzima ureasi e l'enzima urea amidoliasi, rappresenta un approccio interessante per ridurre il contenuto di carbammato di etile nel prodotto e, quindi, offrire birre più sicure per il consumatore (Miguel et al., 2022).

3.3.4. Acetaldeide

L'acetaldeide è un composto volatile, che conferisce alla birra note di mela, però in quantità elevata crea un sapore sgradevole e influisce sulla conservazione del prodotto. Nella birra, l'acetaldeide deriva principalmente dalla via glicolitica fermentativa del lievito. Però la natura elettrofila dell'acetaldeide la rende reattiva con bersagli nucleofili biologici, come: proteine, DNA e RNA, il che può causare mutazioni puntiformi (Hernandes et al., 2020). Infatti, la IARC ha classificato l'acetaldeide associata al consumo di bevande alcoliche come "cancerogena per l'uomo" (gruppo 1). Sono stati condotti diversi studi sulla produzione di acetaldeide sia da lieviti convenzionali che non convenzionali e sembra che la quantità prodotta sia ceppo-

dipendente. Al momento, non ci sono limiti massimi stabiliti dagli enti regolatori per il contenuto di acetaldeide nelle bevande alcoliche. Tuttavia, per affrontare le preoccupazioni sanitarie, l'EFSA ha suggerito di ridurre il contenuto di acetaldeide al livello più basso tecnologicamente possibile (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2012).

3.3.5. Direzioni future

In Europa, il concetto di *Qualified Presumption of Safety* (QPS) è stato introdotto nel 2007 per valutare nuove specie di microrganismi. La valutazione di sicurezza avviene dopo che questi microrganismi sono stati presentati o forniti alle autorità competenti per l'approvazione o l'autorizzazione pre-marketing. Attualmente, solo 17 specie di lievito hanno ottenuto lo status QPS. Però, ciò non implica che i microrganismi privi di QPS siano per forza pericolosi, ma piuttosto che rimangono soggetti a valutazione.

Tuttavia, nonostante le tendenze innovative nel settore della birra, il supporto normativo per i lieviti non-*Saccharomyces* è limitato, così come l'implementazione delle linee guida che offrono procedure scientifiche per valutarne la sicurezza. La ricerca sulla fisiologia e sulla patogenicità dei lieviti è in crescita, ma gli studi sulla sicurezza sono ancora indietro rispetto a quelli sui batteri. Ulteriori ricerche sono necessarie per stabilire valori limite per le resistenze antifungine, identificare geni di virulenza e sviluppare screening rapidi per confermare la sicurezza dei lieviti.

Tuttavia, i primi studi suggeriscono che l'impiego di lieviti non-*Saccharomyces* potrebbe ridurre il contenuto di carbammato di etile, acetaldeide e ammine biogene nella birra. Pertanto, l'utilizzo di questi microrganismi mostra promesse per la produzione industriale della birra, non solo come metodo naturale per diversificare il prodotto, ma anche per sviluppare birre sicure per i consumatori (Miguel et al., 2022).

4. Birre analcoliche e a basso contenuto alcolico

4.1. Il mercato

Negli ultimi anni, il mercato della birra analcolica e a basso contenuto alcolico (NABLAB) ha registrato una notevole crescita e tale tendenza è prevista continuare in futuro. Questo aumento della domanda è attribuibile a una società sempre più attenta alla salute e al benessere. Le normative riguardanti il contenuto di etanolo nei prodotti variano da paese a paese. Generalmente, le birre classificate come analcoliche (NAB) hanno il contenuto alcolico compreso tra lo 0,00 % e il 0,5 % v/v. D'altra parte, le birre classificate come a basso contenuto alcolico o birre leggere (LAB) hanno un tenore di etanolo compreso tra lo 0,6 % e il 3,5 % v/v (Bellut e Arendt, 2019). In Italia l'art.2 della legge del 16 agosto 1962, n° 1354, cita *“La denominazione di birra analcolica è riservata al prodotto con grado Plato non inferiore a 3 e non superiore a 8 e con titolo alcolometrico volumico non superiore a 1,2 %”* e *“La denominazione birra leggera o birra light è riservata al prodotto con grado Plato non inferiore a 5 e non superiore a 10,5 e con titolo alcolometrico volumico superiore a 1,2 % e non superiore a 3,5 %”* («LEGGE 16 agosto 1962, n. 1354 - Normattiva», s.d.). Il mercato mondiale delle NABLAB ha registrato una crescita del 44% nel decennio 2011-2021. Per quanto riguarda la tipologia NAB, il volume totale prodotto è aumentato del 21%, passando da 31,9 a 38,7 milioni di ettolitri. Il Retail Sale Price (RPS), cioè il prezzo al quale il prodotto viene venduto direttamente ai consumatori nei punti vendita al dettaglio, a livello globale è aumentato del 38%, passando da 7,1 a 9,9 miliardi di euro nel periodo quinquennale 2012-2017. Le regioni che rappresentano i principali mercati in termini di volume e valore per il prodotto NAB sono: l'Europa occidentale, il Medio Oriente e l'Africa. Nel 2017, all'interno dell'Europa occidentale, la Germania rappresentava il 41% del mercato NAB, uno dei mercati dei NABLAB più grandi al mondo, seguita dalla Spagna con il 38%. Un sondaggio nel 2019 ha evidenziato che il 55% dei consumatori europei opterebbe per birra a bassa gradazione alcolica se il gusto fosse simile a quello della birra tradizionale (Bellut e Arendt, 2019).

Durante la manifestazione Beer & Food Attraction 2024, è stato evidenziato che in Italia il consumo di bevande analcoliche sta registrando un aumento (infatti il consumo nell'ultimo anno è cresciuto dell'8,3%), prospettando un mercato di 1,2 miliardi di euro entro il 2025 («Bevande analcoliche sempre più amate: previsto business da 1,2 miliardi nel 2025», s.d.).

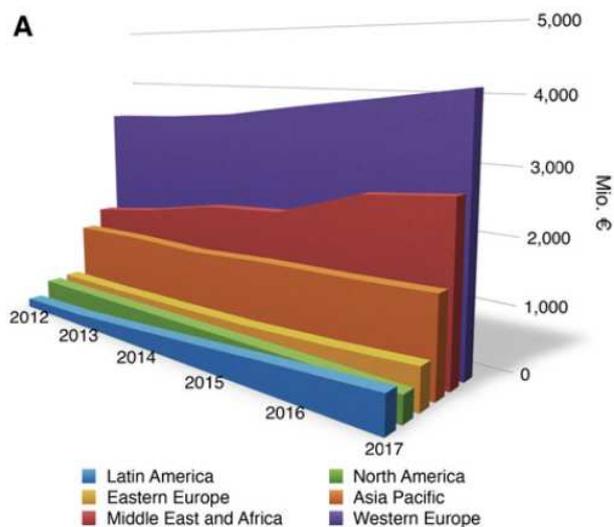


Figura 4.1. Sviluppo mondiale del valore di mercato NABLAB fino al 2017 (Bellut e Arendt, 2019)

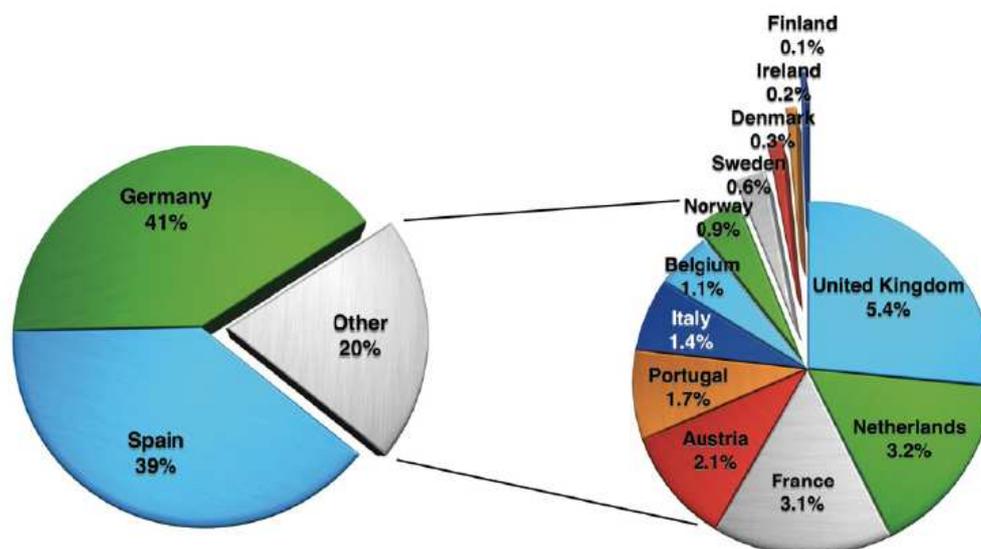


Figura 4.2. Quota di mercato NABLAB in volume dei singoli paesi dell'Europa occidentale nel 2017 (Bellut e Arendt, 2019)

4.2. Metodi di produzione

La produzione delle birre analcoliche impiega due principali tecnologie: i metodi fisici e metodi biologici. I metodi fisici comprendono sia quelli termici sia quelli a membrana, e si concentrano principalmente sulla rimozione dell'etanolo dalla birra tradizionale. Questi metodi richiedono apparecchiature specifiche. Nei processi termici, la birra viene riscaldata per far evaporare l'etanolo, ma questo processo può comportare la perdita dei composti aromatici prodotti durante la fermentazione. Al contrario, nei processi che utilizzano membrane, l'etanolo viene eliminato principalmente in base alla sua dimensione molecolare, ma anche in questo caso può avvenire la rimozione delle componenti aromatiche (Bellut et al., 2018). I metodi biologici possono essere suddivisi in ulteriori due

categorie: quelli che richiedono apparecchiature speciali, come la fermentazione continua e quelli che possono essere eseguiti con attrezzature standard, come la fermentazione arrestata o limitata utilizzando lieviti convenzionali. Quest'ultimo metodo si basa sulla produzione limitata di etanolo da parte del lievito durante la fermentazione. Di solito, le birre ottenute con questo metodo sono dolci perché il lievito non metabolizza completamente gli zuccheri fermentescibili e i metaboliti secondari si formano solo in piccole quantità, principalmente a causa del breve tempo di fermentazione (Bellut et al., 2018). Negli ultimi anni si è sviluppato un nuovo metodo di produzione, basato sull'uso di lieviti non-*Saccharomyces*, i quali hanno limitate capacità di fermentare gli zuccheri, producendo di conseguenza un ridotto contenuto di etanolo quando impiegati come unici starter. Questo nuovo metodo può essere implementato utilizzando le attrezzature standard, rendendolo accessibile a industrie di tutte le dimensioni. Le specie di lieviti utilizzate con questa tecnologia includono *Saccharomyces ludwigii* e *Pichia kluyveri* (Simões et al., 2023).

Nonalcoholic beer production methods			
Physical		Biological	
<i>Thermal</i>	Evaporation Rectification Spinning Cone Column	<i>Traditional brewery equipment</i>	Arrested/limited fermentation Changed mashing Special yeast
<i>Membrane</i>	Dialysis Reverse Osmosis Osmotic Distillation Nanofiltration Pervaporation	<i>Special equipment</i>	Continuous fermentation
<i>Miscellaneous</i>	Supercritical Fluid Extraction Extraction with solid CO ₂ Desorption Microbial Fuel Cell		

Figura 4.3. Metodi di produzione delle birre NABLAB (Bellut e Arendt, 2019)

Queste specie di lievito mostrano una limitata capacità nel metabolizzare il maltosio e il maltotriosio, il che porta a un arresto naturale della fermentazione, lasciando degli zuccheri residui nella birra. Generalmente, un mosto di malto è composto per il 60% da maltosio, uno zucchero con un potere dolcificante (0,320) inferiore rispetto a quello del saccarosio (1) e del glucosio (0,740). Pertanto, il residuo di maltosio nel prodotto finale causa un aroma meno dolce rispetto all'aroma dolce conferito dalla presenza di saccarosio o glucosio nelle birre NABLAB prodotte con lieviti convenzionali.

La presenza di zuccheri residui può influenzare negativamente la stabilità del prodotto e favorire contaminazioni, poiché gli zuccheri semplici sono un ottimo substrato per la crescita microbica. Per commercializzare un prodotto sicuro è quindi necessario utilizzare la pastorizzazione, un metodo che prevede il riscaldamento del prodotto a temperature

relativamente alte per un determinato periodo di tempo, migliorando la conservazione del prodotto e diminuendo la probabilità di contaminazione.

4.2.1. *Saccharomyces ludwigii*

Saccharomyces ludwigii è stato il primo lievito non-*Saccharomyces* ad essere introdotto nell'industria della birra in Germania e Italia per la produzione di birre analcoliche o a bassa gradazione alcolica. Originariamente studiato nella vinificazione al fine di produrre composti aromatici, il lievito ha dimostrato di essere altrettanto promettente nel settore della birra. Nel processo di fermentazione, il catabolismo di aminoacidi è importante per la produzione di alcoli superiori nella birra. Bellut e collaboratori, nel 2018 hanno confrontato due birre analcoliche prodotte da *S. cerevisiae* (WLP001) e *S. ludwigii* (TUM SL 17) andando a visualizzare il metabolismo degli aminoacidi per la produzione degli alcoli superiori. Tramite l'analisi degli aminoacidi, lo studio ha evidenziato un significativo consumo da parte del ceppo WLP001, il quale ha utilizzato il 76,4% degli aminoacidi, rispetto al 26,6% consumato dal ceppo TUM SL 17. Di conseguenza, il ceppo WLP001 ha anche prodotto concentrazioni più elevate di alcoli superiori, pari a 82,4 mg/L, rispetto ai 21,1 mg/L del ceppo TUM SL 17 (Bellut et al., 2018).

Questo particolare lievito non metabolizza né il maltosio né il maltotriosio presenti nel mosto di malto, ma utilizza esclusivamente glucosio, fruttosio e saccarosio, producendo quantità ridotte di etanolo. Di conseguenza, le birre prodotte con *S. ludwigii* presentano una concentrazione alcolica media di circa il 0,5% v/v. Inoltre, gli studi hanno dimostrato la capacità di questo lievito di tollerare valori di amaro compresi tra 0,50 e 50 IBU (International Bitterness Units), derivanti dagli iso- α acidi presenti nel luppolo, (Michel et al., 2016).

Tabella 4.1. Capacità di metabolizzare gli zuccheri presenti nel mosto di birra di *S. cerevisiae* e *S. ludwigii* (Bellut et al., 2018)

Attributo	WLP001	TUM SL 17
Maltosio	+	-
Maltotriosio	+	-
Glucosio	+	+
Fruttosio ¹	+	+
Saccarosio	+	+
Melibiose	-	-
Raffinose	+	+
Cellobiosio	-	+
POF	-	-
Flocculazione (%)	83 ± 3 ^d	60 ± 7 ^c

WLP001: *S. cerevisiae*, TUMSL17: *S. ludwigii*

Uno studio, nel 2015, ha confrontato le birre ottenute da *S. ludwigii* con birre di fumento analcoliche. Le birre prodotte sono state caratterizzate da una debole fermentazione (etanolo 0,48% v/v), con basse concentrazioni di etil acetato (0,80 mg/L), isoamil acetato (0,1 mg/L) e 4-vinilguaiacolo (0,1 mg/L). Tuttavia, presentano elevate quantità di alcoli amilici e alcoli superiori rispetto alle birre di frumento analcoliche tedesche commerciali. La concentrazione di diacetile e 3-metilpropionaldeide è inferiore alla soglia di percezione (0,15 ppm); pertanto, l'aroma di mosto viene coperto dagli altri composti aromatici, anche se vengono descritte con note mielose (Sannino et al., 2019).

Tabella 4.2. Principali caratteristiche delle birre prodotte con *S. cerevisiae* e *S. ludwigii* (Bellut et al, 2018)

Beer Analyses	WLP001	TUM SL 17
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. ludwigii</i>
Ethanol (%v/v)	2.61 ± 0.10 ^d	0.50 ± 0.01 ^c
Final real extract (°P)	2.13 ± 0.02	5.67 ± 0.06
pH	4.18 ± 0.02 ^a	4.76 ± 0.04 ^{cd}
FAN (mg/L)	48 ± 3 ^a	90 ± 6 ^b

Tabella 4.3. Composti volatili (mg/L) presenti nelle birre prodotte con *S. cerevisiae* e *S. ludwigii* (Bellut et al, 2018)

Component	WLP001	TUM SL 17
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. ludwigii</i>
N-Propanol	13.7 ± 3.1 ^b	2.6 ± 0.9 ^a
Isobutanol	17.9 ± 1.8 ^b	6.4 ± 0.1 ^a
Isoamyl alcohols	50.8 ± 3.0 ^c	12.1 ± 0.4 ^{ab}
Σ Higher alcohols (HA)	82.4 ± 7.9 ^b	21.1 ± 0.4 ^a
Ethyl acetate	4.05 ± 0.21 ^b	0.80 ± 0.01 ^a
Isoamyl acetate	0.20 ± 0.00	<0.1
Σ Esters (E)	4.25 ± 0.21 ^b	0.80 ± 0.01 ^a
Diacetyl, total	0.04 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
Ethyl formate	1.05 ± 0.07	1.01 ± 0.13
Acetaldehyde	7.8 ± 0.4 ^c	8.5 ± 0.7 ^c

4.2.2. *Pichia kluyveri*

Il lievito non convenzionale *Pichia kluyveri* è stato recentemente indicato come un microrganismo promettente per la produzione di birra analcolica e birra a basso contenuto alcolico. Diversi studi hanno dimostrato che tramite l'utilizzo di questo lievito, è possibile ottenere birre analcoliche con un contenuto alcolico variabile tra lo 0,1% e lo 0,2%. Durante queste fermentazioni, il glucosio è stato l'unico zucchero completamente metabolizzato (Michel et al., 2016).

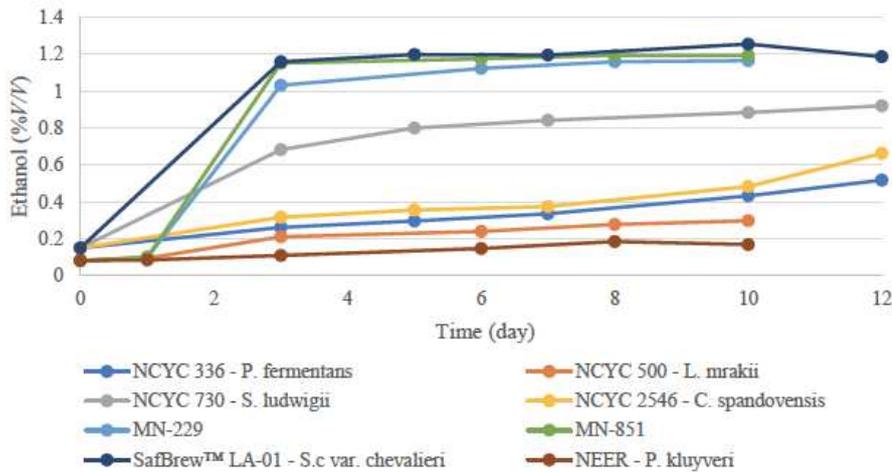


Figura 4.4 Andamento della produzione di etanolo nel corso della fermentazione condotta con i seguenti lieviti: *P. fermentans* (NCYC 336), *S. ludwigii* (NCYC 730), *S. cerevisiae* (MN-229), *S.c var. cavaleri* (SafBrew™LA-01), *L. mrakii* (NCYC 500), *C. spandovensis* (NCYC 2546), *S. cerevisiae* (MN-851) e *P. kluyveri* (NEER) (Simões et al., 2023).

In particolare, Simões e collaboratori, nel 2023, hanno condotto una sperimentazione per produrre birre analcoliche, utilizzando il medesimo mosto di malto 12°P fermentato con starter tradizionali (*S. cerevisiae*, MN-229) e innovativi (lieviti non-Saccharomyces appartenenti a diverse specie di lieviti tra cui *P. kluyveri*). La fermentazione dopo 10 giorni ha visto un contenuto di etanolo da parte di *S. cerevisiae* (MN-229) di 1,17% v/v e di *P. kluyveri* (NEER) di 0,17% v/v, come si può notare osservando la fig. 4.4. Le concentrazioni degli aromi presenti, come gli esteri e gli alcoli superiori, prodotte da *P. kluyveri* (NEER) sono state confrontate con quelle prodotte da *S. cerevisiae* (MN-229). Nello studio, sono emersi livelli simili di alcol isoamilico (2,00 mg/L), etil esanoato ed etil ottanoato, che conferiscono un bouquet aromatico fruttato che va dalla banana alla mela, pera e frutti esotici. Utilizzando il lievito *P. kluyveri*, si sono registrate elevate quantità di acetato di isoamile (9,06 mg/L), rispetto alle birre analcoliche commerciali che solitamente ne sono prive a causa della limitata fermentazione. Inoltre, è stato prodotto un considerevole quantitativo di acetato di etile (32,59 mg/L), il quale contribuisce a conferire note fruttate e fresche tipiche delle birre tradizionali (Simões et al., 2023).

Nel 2019, uno studio ha confrontato il profilo aromatico di birre analcoliche, ottenute da fermentazioni di *P. kluyveri*, con birre tradizionali con un tasso alcolico del 5%. Il risultato ottenuto dimostra che le birre analcoliche prodotte hanno caratteristiche organolettiche molto simili a quelle delle birre tradizionali, in contrasto con le birre analcoliche commerciali. Inoltre, il livello di diacetile formato è inferiore rispetto alle birre prodotte con il lievito *S. cerevisiae*. Per questi motivi, *P. kluyveri* è stato considerato un lievito non convenzionale preferibile anche rispetto a *S. ludwigii* per la produzione di birre analcoliche,

grazie alla sua minore produzione di etanolo e alla maggiore produzione di composti aromatici desiderabili, come l'acetato di isoamile e l'acetato di feniletile, che conferisce note di rosa e per la limitata produzione di composti indesiderati (Bellut e Arendt, 2019).

Tabella 4.4. Quantità dei principali composti aromatici nelle birre prodotte impiegando *S. cerevisiae* (MN-229) e *P. kluyveri* (NEER) (Simões et al, 2023)

Compound	Odor Description	Detection Threshold (mg L ⁻¹)	NEER— <i>P. kluyveri</i> (mg L ⁻¹)		MN-229 (mg L ⁻¹)	
Higher alcohols						
Propanol	Alcohol ^a	600 ^e , 800 ^{f,g}	3.15 ± 0.55	5.46 ± 0.61		
Isobutanol	Alcohol ^a	100 ^e , 200 ^{f,g}	7.22 ± 1.94	4.88 ± 0.94		
Amyl Alcohol	Alcohol, banana, medicinal, solvent, fruity ^a	50–70 ^h	5.06 ± 1.41	15.73 ± 3.17		
Esters						
Ethyl Acetate	Solvent, fruity, sweetish ^b	25–30 ^h	32.59 ± 8.27	3.65 ± 0.87		
Isoamyl acetate	Banana, apple, solvent, estery, pear ^b	1.2 ^{f,h,i} , 2 ^h	9.06 ± 1.94	0.35 ± 0.04		
Vicinal diketones						
Diacetyl	Butter ^a	0.15 ^c	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.02		
2,3-Pentanedione	Honey, toffee-like ^c	1–1.5 ^l	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01		
Aldehydes						
Acetaldehyde	Grassy, green leaves, fruity ^a	10–25 ^k	15.45 ± 3.35	25.83 ± 20.78		
Sulfur compounds						
Dimethyl sulfide (DMS)	Cabbage, Cooked-vegetable ^d	0.025–0.030 ^d , 0.05 ⁱ	16.55 ± 3.45	16.50 ± 1.50		

5. Conclusioni

La selezione del lievito è fondamentale per creare birre innovative. L'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* consente di produrre birre con caratteristiche uniche, al di fuori della tradizione birraria, rispondendo alle nuove tendenze dei consumatori.

Gli studi riportati dimostrano che alcuni lieviti non-*Saccharomyces* possono fermentare il mosto di malto, producendo birre interessanti con contenuti aromatici e grado alcolico molto variabile. Le specie di lieviti utilizzate ad oggi nell'industria birraia includono solo una piccola parte di quelle testate a livello sperimentale. Caratterizzare un numero maggiore di specie di lieviti non convenzionali e i relativi ceppi per la loro capacità di fermentazione potrebbe offrire ai birrai nuovi ceppi per sviluppare diversi stili di birra. Ampliando la gamma di lieviti disponibili per la fermentazione, possiamo allontanarci dai tradizionali sapori di birra e creare opportunità per sviluppare nuovi stili.

Il lievito *Brettanomyces bruxellensis* è utilizzato principalmente per la produzione di birre Lambic, ma studi recenti dimostrano che, se impiegato in inoculo sequenziale con *Saccharomyces cerevisiae*, può produrre birre con caratteristiche organolettiche particolari. Questo avviene tramite la produzione l'enzima β -glucosidasi, che idrolizza i glicosidi presenti nel luppolo, rilasciando una maggiore quantità di linalolo e metilsalicilato nel prodotto.

Invece, il lievito *Pichia anomala* è in grado di produrre composti aromatici come β -feniletanolo e alcol isoamilico. Inoltre, produce basse concentrazioni di 4-vinilguaiacolo, sufficienti però a superare la soglia di percezione, conferendo note di chiodi di garofano ricercate nelle birre in stile belga e nelle birre di frumento.

La sicurezza nell'uso dei lieviti è fondamentale per commercializzare un prodotto sicuro per il consumatore. La valutazione della sicurezza deve essere condotta a livello di ceppo, poiché alcuni problemi dipendono specificamente da esso, come la resistenza antifungina e la produzione di composti pericolosi per la salute umana. Questa valutazione deve essere effettuata attraverso una collaborazione tra l'industria di produzione del lievito e l'industria birraia. L'industria di produzione del lievito valuta i potenziali problemi specifici del ceppo, tra cui virulenza e patogenicità, resistenza antifungina e produzione di ammine biogene. L'industria birraia si occupa della valutazione relativa all'applicazione del lievito, come la produzione di carbammato di etile e acetaldeide.

In questo contesto alcune ricerche recenti hanno dimostrato che l'applicazione di lieviti non-*Saccharomyces* può offrire vantaggi in termini di sicurezza alimentare, come la

riduzione del carbammato di etile, dell'acetaldeide e delle ammine biogene. Poiché in alcuni casi è difficile, da parte dell'industria della birra la completa attuazione delle linee guida che offrono procedure scientifiche per valutare la sicurezza dei lieviti non convenzionali, una misura efficace in caso di incertezze riguardo l'utilizzo del lievito è la pastorizzazione del prodotto.

Negli ultimi anni, il mercato delle birre analcoliche e a basso contenuto alcolico è in crescita. Ricercare metodi biotecnologici innovativi, tra cui l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces*, è diventato importante.

Recenti studi hanno evidenziato che la produzione di birre analcoliche e a basso contenuto alcolico (NABLAB) con l'impiego di lieviti non-*Saccharomyces* è promettente e può affiancare i metodi fisici di dealcolizzazione, soprattutto perché non c'è la perdita di aromi dovuta ai sistemi fisici impegnati. Attualmente, la ricerca su queste specie è principalmente a livello di screening e fermentazioni su scala di laboratorio. Tuttavia, a partire dal 2023, il ceppo NEER di *Pichia kluyveri* è stato commercializzato da un'azienda danese ed è pronto per l'uso industriale.

Inoltre, è l'unico lievito non convenzionale a produrre birre NAB con caratteristiche organolettiche simili alle birre Ale con 5% v/v di alcol.

Gli studi riportati in questo elaborato evidenziano che il ceppo NERR, usato per la produzione di birre NAB, può portare delle note fruttate molto interessanti, dovute alla presenza di acetato di etile, acetato di isoamile, e isobutanolo in concentrazioni più elevate. Questa leggera deviazione dai sapori tipici della birra, si rivela vantaggiosa in quanto incontra i nuovi gusti dei consumatori. Inoltre, è importante poiché nasconde l'odore mieloso, tipico di un mosto non fermentato, che è presente quando la birra NAB viene prodotto con lieviti convenzionali.

L'impiego dei lieviti non-*Saccharomyces* nella produzione di NABLAB potrebbe essere un'opportunità, poiché l'utilizzo di nuovi lieviti è una modifica relativamente semplice rispetto all'investimento necessario per la dealcolizzazione fisica.

Tuttavia, nei prodotti NABLAB, rimangono ancora irrisolti alcuni aspetti sensoriali, in particolare il problema del sapore dolce. Nonostante il potere dolcificante del maltosio e maltotriosio sia inferiore a quello del glucosio, un elevato residuo zuccherino limita l'accettabilità da parte del consumatore.

In conclusione, l'impiego dei lieviti non-*Saccharomyces* nella produzione della birra presenta diverse opportunità per migliorare il sapore e l'aroma del prodotto, ridurre il grado alcolico e offrire benefici per la salute del consumatore.

6. Bibliografia

1. Basso, Rafael Felipe, André Ricardo Alcarde, e Cauré Barbosa Portugal. 2016. «Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?» *Food Research International* 86 (agosto):112–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>.
2. Bellut, Konstantin, e Elke K. Arendt. 2019. «Chance and Challenge: Non-*Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review». *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 77 (2): 77–91. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1569452>.
3. Bellut, Konstantin, Maximilian Michel, Martin Zarnkow, Mathias Hutzler, Fritz Jacob, David P. De Schutter, Luk Daenen, Kieran M. Lynch, Emanuele Zannini, e Elke K. Arendt. 2018. «Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer». *Fermentation* 4 (3): 66. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030066>.
4. «Bevande analcoliche sempre più amate: previsto business da 1,2 miliardi nel 2025». s.d. Italia a Tavola. Consultato 2 maggio 2024. <https://www.italiaatavola.net/wine/2024/2/20/bevande-analcoliche-sempre-piu-amate-previsto-business-da-1-2-miliardi-nel-2025/103250/>.
5. Boulton, Christopher, e David Quain. 2008. *Brewing Yeast and Fermentation*. John Wiley & Sons.
6. Capece, Angela, Rossana Romaniello, Gabriella Siesto, e Patrizia Romano. 2018. «Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production». *Fermentation* 4 (2): 38. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>.
7. development. 2018. «Impianti per Birra Artigianale: il Processo Produttivo | easybrau-velo.com». *Easybräu-Velo* (blog). 9 novembre 2018. <https://www.easybrau-velo.com/2018/11/09/impianti-per-birra-artigianale-processo-produttivo-birra/>.
8. Douglass, Alexander P., Benjamin Offei, Stephanie Braun-Galleani, Aisling Y. Coughlan, Alexandre A. R. Martos, Raúl A. Ortiz-Merino, Kevin P. Byrne, e Kenneth H. Wolfe. 2018. «Population Genomics Shows No Distinction between Pathogenic *Candida Krusei* and Environmental *Pichia Kudriavzevii*: One Species, Four Names». *PLOS Pathogens* 14 (7): e1007138. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007138>.
9. Gallone, Brigida, Stijn Mertens, Jonathan L Gordon, Steven Maere, Kevin J Verstrepen, e Jan Steensels. 2018. «Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts». *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology*, 49 (febbraio):148–55. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>.

10. Gallone, Brigida, Jan Steensels, Troels Prah, Leah Soriaga, Veerle Saels, Beatriz Herrera-Malaver, Adriaan Merlevede, et al. 2016. «Domestication and Divergence of *Saccharomyces Cerevisiae* Beer Yeasts». *Cell* 166 (6): 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>.
11. Gibson, Brian, e Gianni Liti. 2015. «*Saccharomyces Pastorianus*: Genomic Insights Inspiring Innovation for Industry». *Yeast* 32 (1): 17–27. <https://doi.org/10.1002/yea.3033>.
12. Gresser. 2010. *Il manuale del birraio pratico - teoria e pratica della preparazione del malto e della fabbricazione della birra*. Fachverlag Hans Carl.
13. Hazards (BIOHAZ), EFSA Panel on Biological, Kostas Koutsoumanis, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, et al. 2022. «Update of the List of QPS-Recommended Microbiological Agents Intentionally Added to Food or Feed as Notified to EFSA 16: Suitability of Taxonomic Units Notified to EFSA until March 2022». *EFSA Journal* 20 (7): e07408. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7408>.
14. Hazards (BIOHAZ), EFSA Panel on Biological, Antonia Ricci, Ana Allende, Declan Bolton, Marianne Chemaly, Robert Davies, Rosina Girones, et al. 2017. «Scientific Opinion on the Update of the List of QPS-Recommended Biological Agents Intentionally Added to Food or Feed as Notified to EFSA». *EFSA Journal* 15 (3): e04664. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4664>.
15. Larroque, M. N., F. Carrau, L. Fariña, E. Boido, E. Dellacassa, e K. Medina. 2021. «Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds». *International Journal of Food Microbiology* 337 (gennaio):108953. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108953>.
16. «LEGGE 16 agosto 1962, n. 1354 - Normattiva». s.d. Consultato 30 aprile 2024. <https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:legge:1962;1354>.
17. Lodolo, Elizabeth J., Johan L. F. Kock, Barry C. Axcell, e Martin Brooks. 2008. «The Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*– the Main Character in Beer Brewing». *FEMS Yeast Research* 8 (7): 1018–36. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x>.
18. Meier-Dörnberg, Tim, Mathias Hutzler, Maximilian Michel, Frank-Jürgen Methner, e Fritz Jacob. 2017. «The Importance of a Comparative Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Pastorianus* Strains for Brewing». *Fermentation* 3 (3): 41. <https://doi.org/10.3390/fermentation3030041>.
19. Michel, Maximilian, Tim Meier-Dörnberg, Fritz Jacob, Frank-Jürgen Methner, R. Steven Wagner, e Mathias Hutzler. 2016. «Review: Pure Non-*Saccharomyces* Starter Cultures for Beer Fermentation with a Focus on Secondary Metabolites and Practical Applications». *Journal of the Institute of Brewing* 122 (4): 569–87. <https://doi.org/10.1002/jib.381>.
20. Miguel, Gabriela A., Simon Carlsen, Nils Arneborg, Sofie M. G. Saerens, Svend

- Laulund, e Gitte M. Knudsen. 2022. «Non-Saccharomyces yeasts for beer production: Insights into safety aspects and considerations». *International Journal of Food Microbiology* 383 (dicembre):109951. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109951>.
21. Parapouli, Maria, Anastasios Vasileiadis, Amalia-Sofia Afendra, e Efstathios Hatziloukas. 2020. «Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications». *AIMS Microbiology* 6 (1): 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>.
 22. Sannino, Ciro, Ambra Mezzasoma, Pietro Buzzini, e Benedetta Turchetti. 2019. «Non-Conventional Yeasts for Producing Alternative Beers». In *Non-Conventional Yeasts: From Basic Research to Application*, a cura di Andriy Sibirny, 361–88. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_11.
 23. Simões, João, Eduardo Coelho, Paulo Magalhães, Tiago Brandão, Pedro Rodrigues, José António Teixeira, e Lucília Domingues. 2023. «Exploiting Non-Conventional Yeasts for Low-Alcohol Beer Production». *Microorganisms* 11 (2): 316. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020316>.
 24. Stewart, Graham G. 2017. *Brewing and Distilling Yeasts*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8>.
 25. Strobe, Pooja K., Kenneth W. Nickerson, Steven D. Harris, e Etsuko N. Moriyama. 2011. «Molecular evolution of urea amidolyase and urea carboxylase in fungi». *BMC Evolutionary Biology* 11 (1): 80. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-80>.
 26. Vanderhaegen, B., H. Neven, S. Coghe, K. J. Verstrepen, G. Derdelinckx, e H. Verachtert. 2003. «Bioflavoring and Beer Refermentation». *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (2): 140–50. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1340-5>.
 27. Walker, Graeme M., e Graham G. Stewart. 2016. «Saccharomyces Cerevisiae in the Production of Fermented Beverages». *Beverages* 2 (4): 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>.
 28. White, Chris, e Jamil Zainasheff. 2016. *Gli ingredienti della birra - IL LIEVITO: Guida pratica alla fermentazione della birra*. Edizioni LSWR.
 29. Willaert, Ronnie. 2012. «Biochemistry of Beer Fermentation». In *Food Biochemistry and Food Processing*, 627–53. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch33>.
 30. Zuckerman, A. J. 1995. «IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans». *Journal of Clinical Pathology* 48 (7): 691–691. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.7.691-a>.