



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DAGRI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
E TECNOLOGIE AGRARIE,
ALIMENTARI, AMBIENTALI E FORESTALI

FOOD
MICRO
TEAM



Relatore:
Silvia Mangani
FoodMicroTeam

18 Novembre 2021

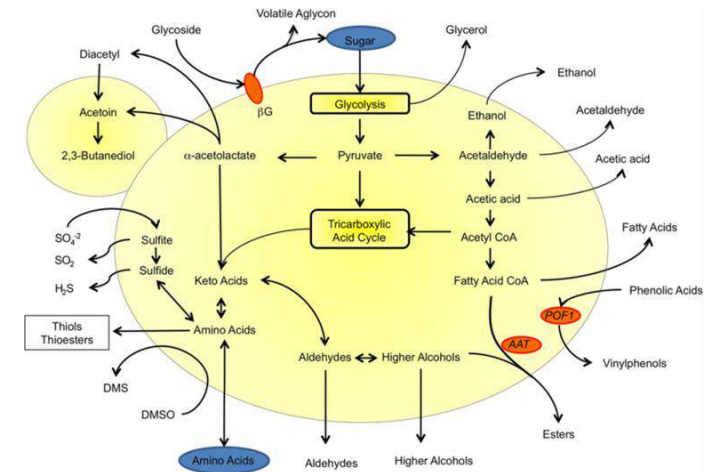
Le analisi chimiche per il monitoraggio del processo di produzione della birra artigianale





Il monitoraggio del processo di produzione è fondamentale per avere uno standard produttivo alto e un prodotto privo di difetti

- FAN (free alfa aminoacidic nitrogen)
- Zuccheri fermentescibili
- Etanolo
- Glicerina
- Acido acetico (batteri acetici)
- Acido lattico (batteri lattici)
- Acido propionico (gram neg anaerobi)
- Ammine biogene (batteri lattici)
- Etil fenoli (*Brettanomyces*)



Biochemical Changes during Fermentation

1. Fermentation of carbohydrates
2. Nitrogen in wort Assimilation/ Dissimilation
3. Formation of metabolic compounds
 - Acids CO₂
 - Organic acids
 - Alcohols
 - Ethanol
 - Secondary and tertiary alcohols
 - Higher aliphatic alcohols (HAA)
 - Aromatic alcohols
 - Esters
 - Aldehydes and Ketones
 - Vicinal Diketones (VDK)
 - Sulphur-containing compounds



FOOD
MICRO
TEAM



FAN: azoto alfa amminoacidico libero

- Misura dei composti azotati che possono essere assimilati e/o metabolizzati dal lievito
- Comprende gli amminoacidi (ad eccezione della prolina), l'ammonio, e i piccoli peptidi che si liberano dalle proteine dell'endosperma dell'orzo durante la fase di maltazione e di ammostamento
- Importante nutriente che svolge un ruolo essenziale nella moltiplicazione e nella performance fermentativa del lievito ma ha anche un impatto sul gusto e sulla formazione di sostanze aromatiche



FOOD
MICRO
TEAM



FAN: azoto alfa amminoacidico libero

Contenuto ottimale del mosto **130mg/L** (contenuto minimo **100-140mg/L**)*

- Inferiori-fermentazioni lente, incomplete e formazione di idrogeno solforato
- Superiori-aumenta il rischio di una contaminazione microbica della birra

Impatto sulla formazione di esteri, aldeidi, dicetoni vicinali (diacetile), alcoli superiori, acidi e composti solforati.

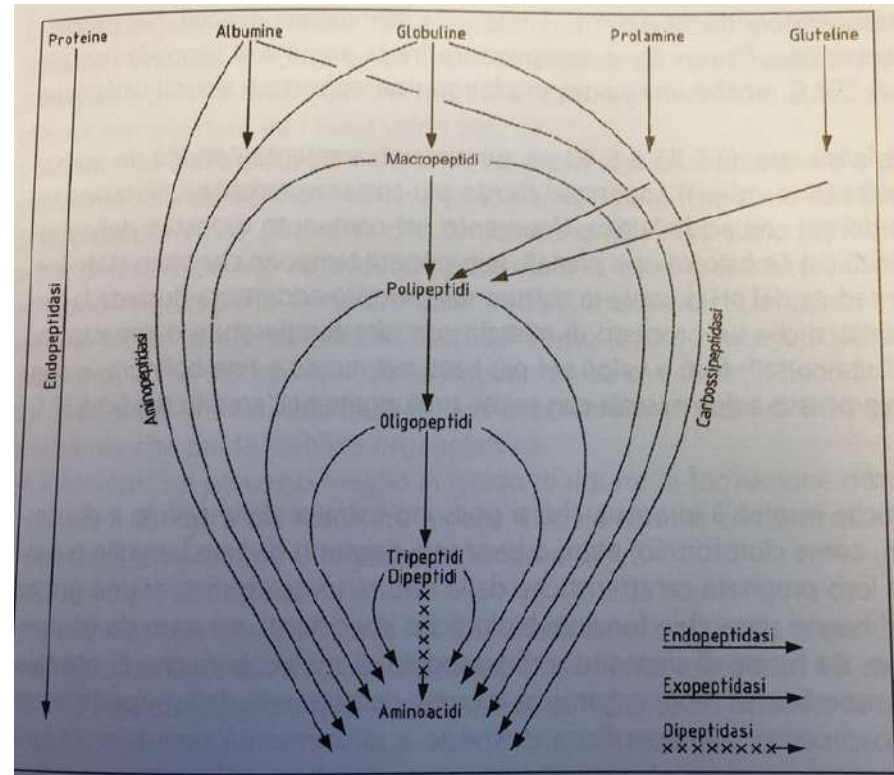
il contenuto ideale di FAN differisce da fermentazione a fermentazione e dipende dal ceppo di lievito (lager o ale), dal livello e dal tipo di zuccheri del mosto



Contenuto di FAN del mosto



Deriva dalle proteine dell'endosperma dell'orzo che liberano aminoacidi e piccoli peptidi durante la fase di **maltazione** e di **ammestamento**





Contenuto di FAN del mosto



Dipende da:

- Grado di disgregazione del malto (durata della pausa proteolitica e della cottura)
- Varietà di orzo

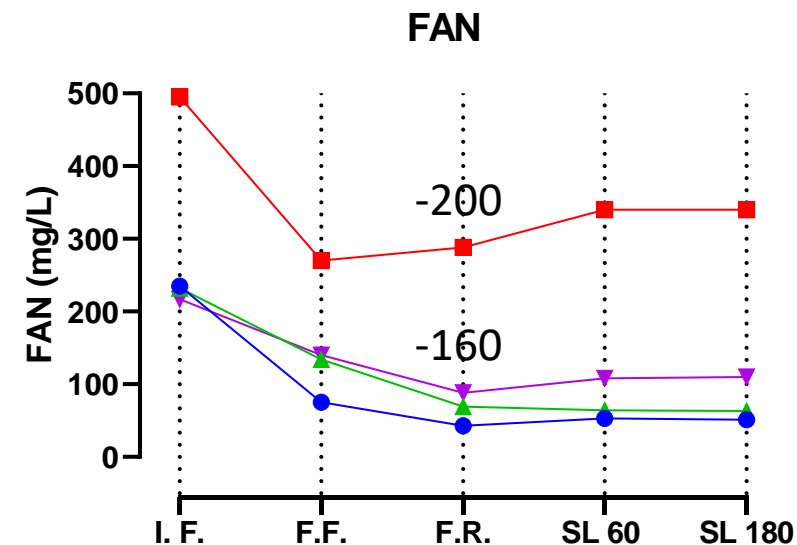
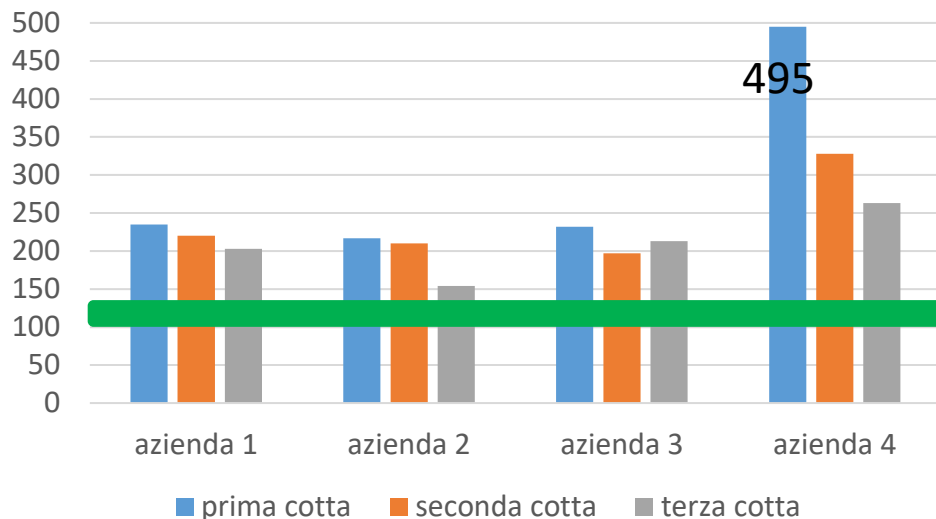
Tabella 19: Analisi dei mosti da orzi primaverili e invernali (cotte piccole) da «Il manuale del birraio pratico» di Gresser

| Varietà | Dim. | Aura | Aramir | Europa | Tirana | Igri | Sonia |
|------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| N totale | mg/100mL | 96,2 | 103,3 | 91,0 | 83,7 | 95,1 | 96,1 |
| N coagulabile | mg/100mL | 1,8 | 2,2 | 2,8 | 2,3 | 3,0 | 2,6 |
| FAN mosto (12%) | mg/L | 222 | 234 | 214 | 184 | 197 | 202 |

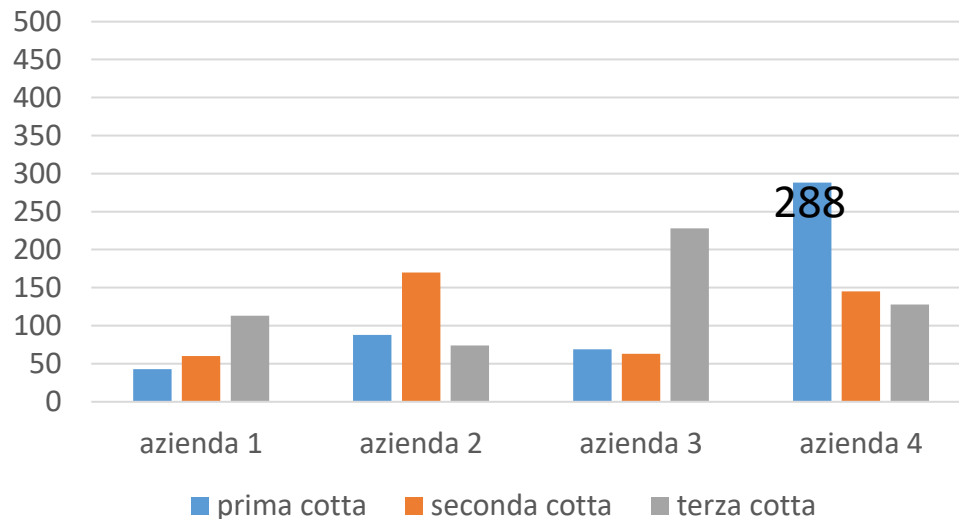


Contenuto di FAN nei mosti del Progetto Qualibirre

FAN (mg/L) mosto prima dell'inoculo



FAN (mg/L) a fine rifermentazione



18
Novembre
2021



FOOD
MICRO
TEAM



FOOD
MICRO
TEAM



18
Novembre
2021

Ammine biogene

Sono composti basici azotati a basso peso molecolare con molteplici funzioni in natura e possono rappresentare un rischio per la salute umana

Si formano principalmente per decarbossilazione microbica degli aminoacidi (**lattobacilli** e **pediococchi**)

| Amminoacido | Enzima | Prodotto |
|--------------|----------------------|-----------------|
| Istidina | Istidina decarb. | Istamina |
| Tirosina | Tirosina decarb. | Tiramina |
| Fenilalanina | Fenilalanina decarb. | Feniletilammina |
| Arginina | Arginina decarb. | Agmatina |
| Lisina | Lisina decarb. | Cadaverina |
| Serina | Serina decarb. | Etanolammina |
| Triptofano | Triptofano decarb. | Triptamina |
| Ornitina | Ornitina decarb. | Putrescina |
| Putrescina | | Spermina |
| Spermina | | Spermidina |



Effetti sulla qualità salutistica della birra



Molecole biologicamente attive sul sistema nervoso e vascolare.



- ISTAMINA: emicrania, ipotensione, nausea, vomito, diarrea.
- TIRAMINA: ipertensione, aumento della ventilazione, attivazione secrezioni salivari e lacrimali.
- FENILETILAMMINA: disturbi psichici, ipertensione.
- POLIAMMINE: potenziatori della tossicità dell'istamina.





Zuccheri fermentescibili

Sono gli zuccheri che i lieviti sono in grado di fermentare e derivano dalla idrolisi enzimatica dell'amido:

- Monosaccaridi: glucosio e fruttosio
- Disaccaridi: saccarosio e maltosio
- Trisaccaridi: maltotriosio

| Carboidrati nel mosto % | Stewart, Beverages 2016, 2, 34 |
|----------------------------|-----------------------------------|
| Fruttosio | 1-2 |
| Glucosio | 10-15 |
| Saccarosio | 1-2 |
| Maltosio | 50-60 |
| Maltotriosio | 15-20 |
| Destrine | 20-30 |



Trasporto e metabolismo degli zuccheri da parte dei lieviti



FOOD
MICRO
TEAM

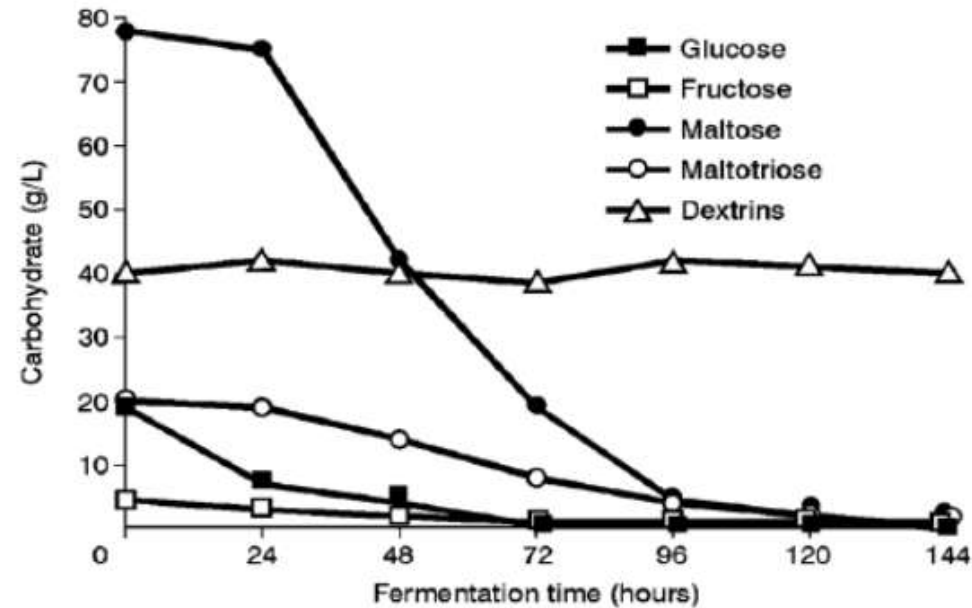


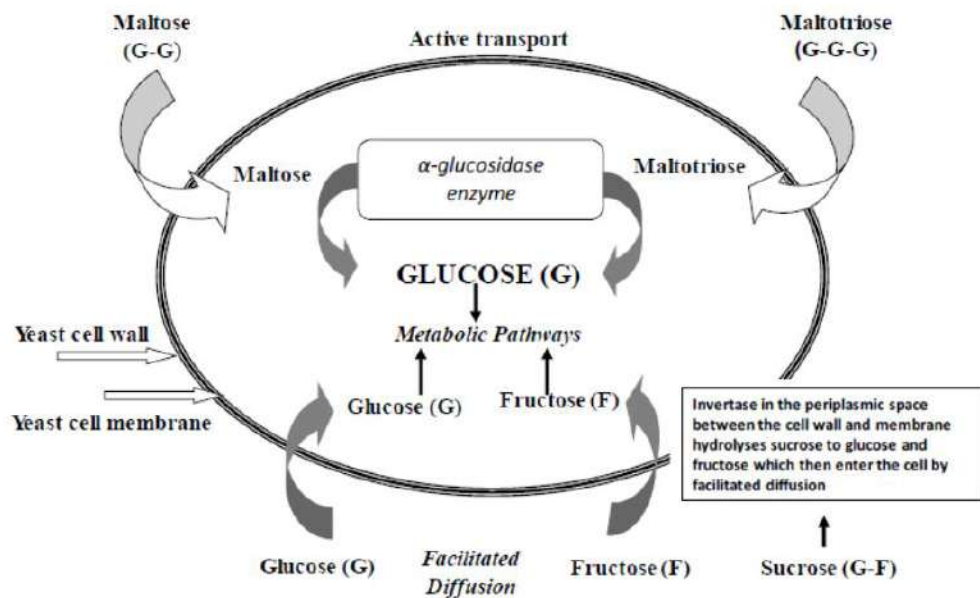
Figure 5. Uptake order of wort sugars by brewer's yeast cultures.



Trasporto e metabolismo degli zuccheri da parte dei lieviti



FOOD
MICRO
TEAM



- Il **glucosio** ed il **fruttosio** si diffondono passivamente attraverso la membrana cellulare all'interno della cellula dove vengono fermentati.
- Il **saccarosio** viene scisso in glucosio+fruttosio nella zona adiacente alla membrana cellulare da una invertasi

Maltosio e **maltotriosio** sono trasportati all'interno da una permeasi e, una volta nella cellula, sono idrolizzati in glucosio dalla maltasi. Questo avviene quando il lievito si è adattato al maltosio e maltotriosio.

18

Novembre
2021

(Stewart, Beverages 2016, 2, 34)



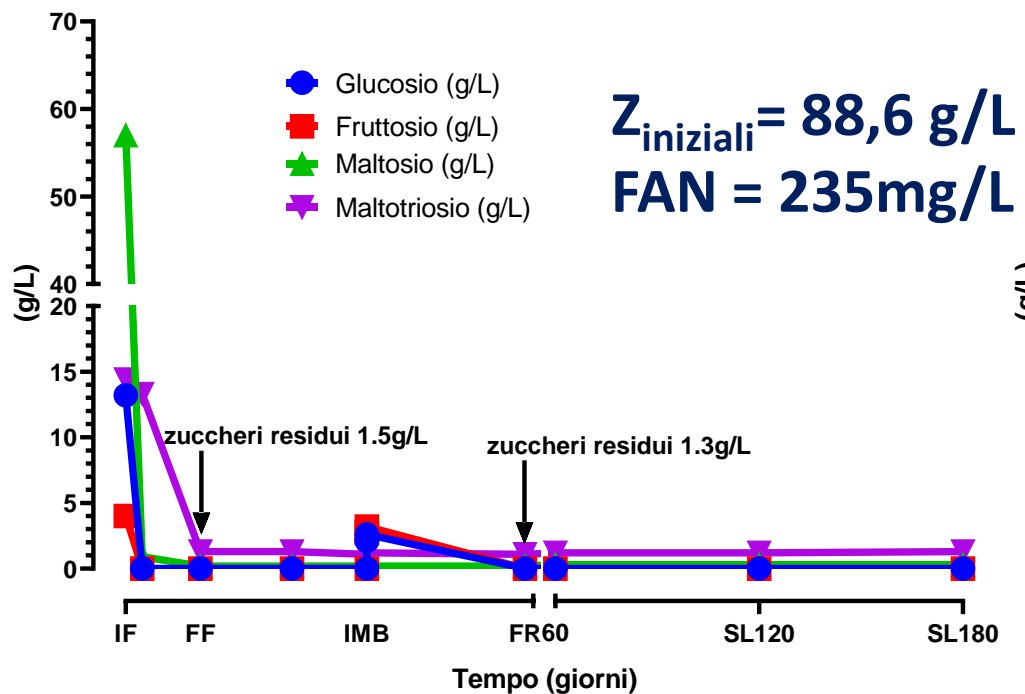
Monitoraggio della concentrazione degli zuccheri fermentescibili



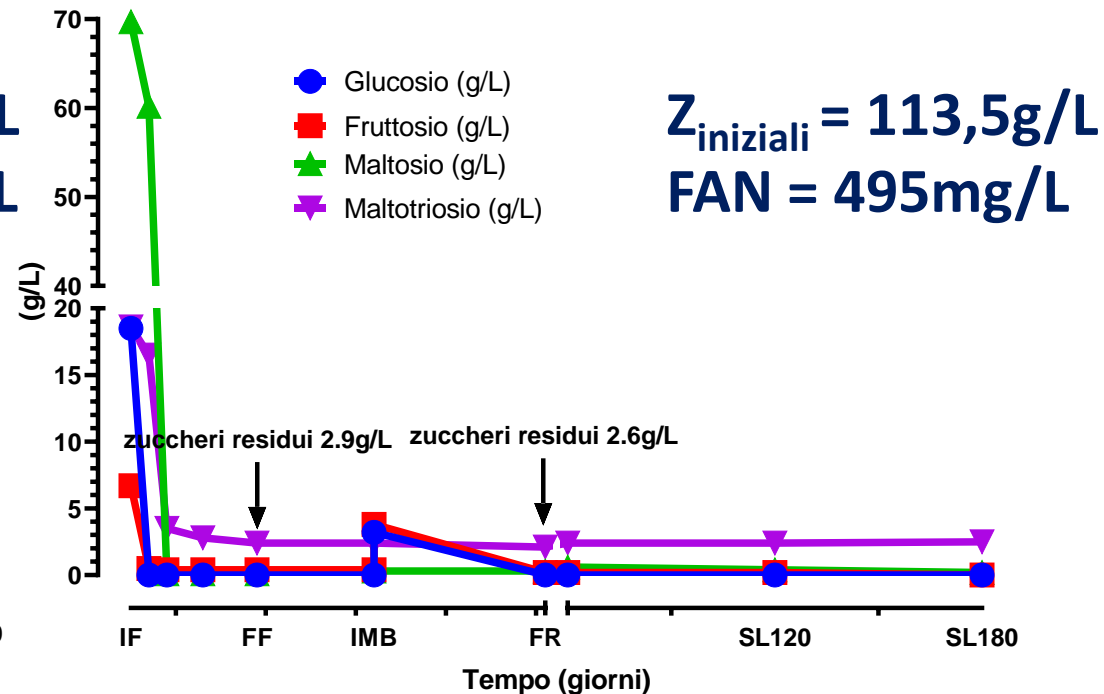
FOOD
MICRO
TEAM



Birrificio 1



Birrificio 4

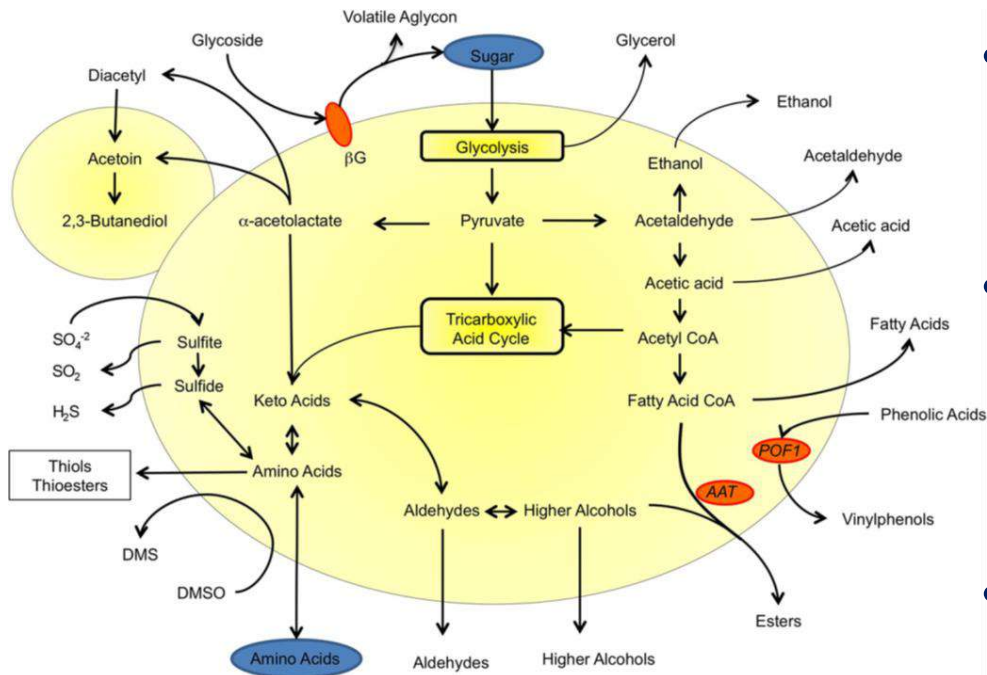




Etanolo e glicerina, acido acetico e lattico



FOOD
MICRO
TEAM



- Principali metaboliti della fermentazione alcolica
- Monitoraggio di etanolo/zuccheri fermentescibili per seguire l'andamento della fermentazione alcolica
- Glicerina conferisce corpo alla birra



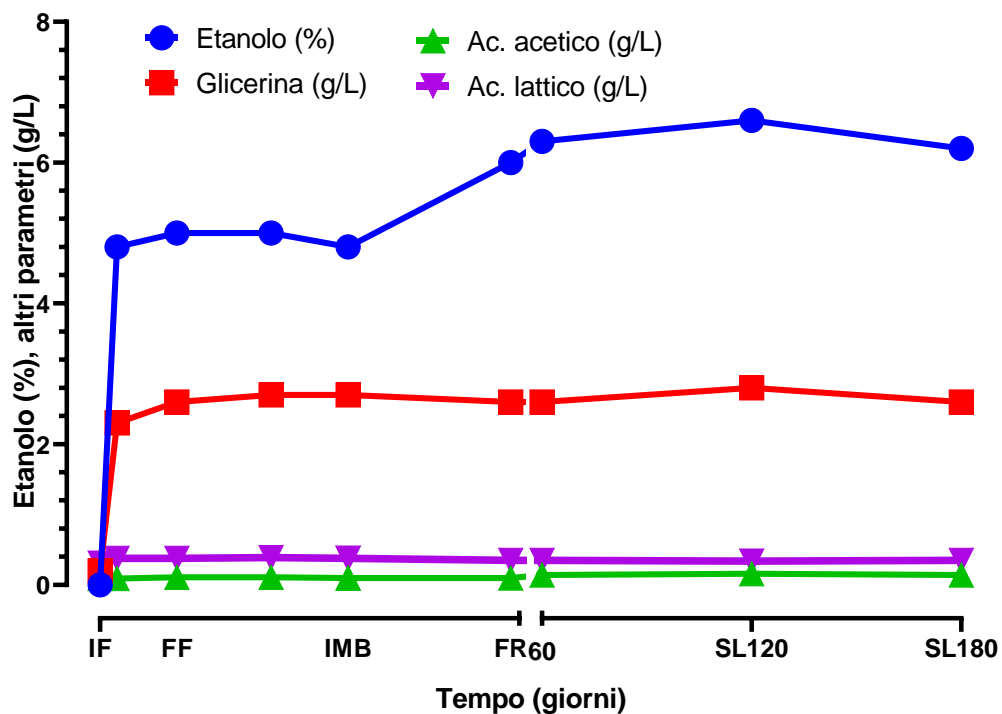
Andamento dei metaboliti principali durante la fermentazione e la shelf life



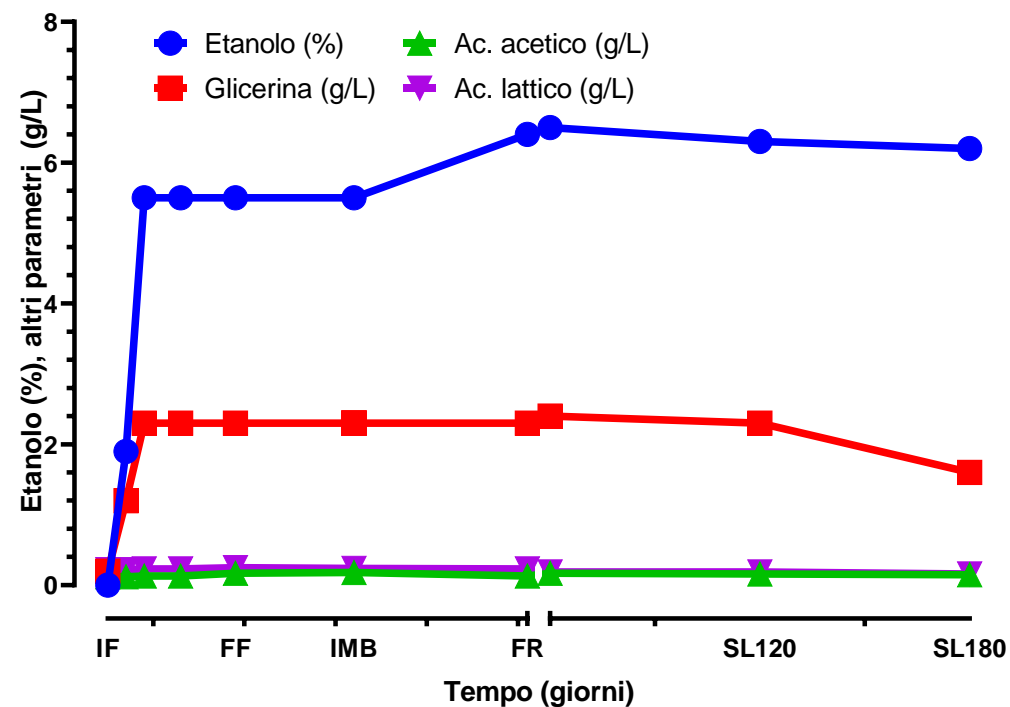
FOOD
MICRO
TEAM



Birrificio 1



Birrificio 4





Valori anomali di acido lattico e acido acetico



FOOD
MICRO
TEAM



| | Birra 1 | Birra 2 |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Batteri lattici (UFC/mL) | $1,37 \times 10^8$ | $3,5 \times 10^7$ |
| Tipologia | <i>Lactobacillus</i> spp | <i>Lactobacillus</i> spp |
| Acido lattico (g/L) | 0,60 | 0,31 |
| Acido acetico (g/L) | 0,23 | 0,17 |



Analisi da effettuare per il monitoraggio della fermentazione alcolica



FOOD
MICRO
TEAM

- Monitorare il contenuto in **zuccheri fermentescibili** durante la fermentazione e la rifermentazione congiuntamente all'**etanolo** per individuare tempestivamente **arresti fermentativi** e la **fine della fermentazione**
- Controllare il contenuto di **FAN** a inizio e fine fermentazione e monitorare le birre con contenuti elevati con analisi microbiologiche e delle **ammine biogene**
- Monitorare il contenuto di **acido lattico**, **acetico** e **propionico** per valutare una eventuale non concordanza con i valori abituali e individuare precocemente, con l'ausilio dell'analisi microbiologica, lo sviluppo di **batteri indesiderati**



18

Novembre
2021



Analizzatore automatico



Criticità:
Utilizzo pipetta p1000
Utilizzo capillare
Limite massimo determinazione
zuccheri 25g/L

Zuccheri totali (glu+fru+sacc+malt)

Zuccheri (glu+fru+sac)

pH

Acido D-lattico

Acido L-lattico

Grado alcolico

Azoto alfa amminico

Acido acetico



Analisi chimiche e alterazioni microbiche



Le analisi chimiche possono coadiuvare l'analisi microbiologica nel diagnosticare tempestivamente la presenza di microrganismi alteranti prima che l'alterazione diventi evidente



| Composto chimico | Microrganismi responsabili |
|------------------|------------------------------------|
| Acido acetico | Batteri acetici, gram neg anaerobi |
| Acido lattico | Lattobacilli e Enterobatteri |
| Acido propionico | Gram neg anaerobi |
| Diacetile | Enterobatteri |
| Ammine biogene | Lattobacilli e Pediococchi |
| Vinilfenoli | Enterobatteri |
| Etilfenoli | <i>Brettanomyces</i> |



Vinilfenoli e etilfenoli



PAD+ *Saccharomyces cerevisiae* (ceppi Ale per produrre Hefeweizen),
Brettanomyces spp, *Lactobacillus* e *Pediococcus*

VPR+ *Brettanomyces*



Vinilfenoli e etilfenoli



Brettanomyces:

Nella maggior parte degli stili di birra è considerato un contaminante ma contribuisce alle qualità organolettiche di alcuni stili di birra particolari (Lambic, Gueuze, Flanders red, ecc..)



Table 1. Flavor and aroma descriptors for common volatile phenols.

| Compound | Descriptors | Sources | References |
|------------------|---|---|--------------|
| 4-vinylguaiacol | Clove, curry, spice, smoky, bacon | Thermal or enzymatic decarboxylation of ferulic acid | [3,18,81] |
| 4-vinylphenol | Phenolic, medicinal, spicy | Thermal or enzymatic decarboxylation of <i>p</i> -coumaric acid | [18,81] |
| 4-ethylguaiacol | Clove, phenol, spice, woody, smoky, vanilla | Enzymatic reduction of 4-vinyl guaiacol | [3,71,81,82] |
| 4-ethylphenol | Leather, phenol, spice, stable, smoke, creosote | Enzymatic reduction of 4-vinyl phenol | [3,71,81,82] |
| Guaiacol | Smoke, bacon | Lignin pyrolysis | [3,83] |
| Vanillin | Sweet, vanilla | Lignin pyrolysis, wood aging, degradation of 4-vinyl guaiacol | [3,84] |
| 4-vinyl syringol | Stale, "old beer" | Degradation of synapic acid glycosides | [3,8] |

18

Novembre
2021



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Silvia Mangani
FoodMicroTeam s.r.l.
Vice-presidente e responsabile
del laboratorio chimico
silvia@foodmicroteam.it