



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dip. AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

INFLUENZA DEL LIEVITO NEL RILASCIO DI  
AROMI VOLATILI DEL LUPPOLO DURANTE LA  
PRODUZIONE DELLA BIRRA

Relatrice

Prof.ssa Viviana Corich

Laureando

Gottardi Davide

Matricola n. 1223024

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



# Indice

RIASSUNTO .....	1
1. INTRODUZIONE.....	2
2. IL LUPPOLO .....	4
2.1 La botanica.....	4
2.2 La coltivazione .....	5
2.3 Produzione mondiale di luppolo .....	5
2.4 La composizione chimica.....	8
2.4.1 Resine .....	9
2.4.2 Oli essenziali .....	12
3. PRECURSORI AROMATICI .....	17
3.1 Precursori glicosilati .....	17
3.2 Precursori legati a cisteina o glutatione .....	19
3.3 Effetto del processo di birrificazione sui precursori aromatici.....	21
3.3.1 Beta-damascenone .....	23
4. EFFETTO DEL LIEVITO SULLA LIBERAZIONE DEI PRECURSORI AROMATICI: LE REAZIONI DI BIOTRASFORMAZIONE .....	25
4.1 Attività glicosidasica.....	26
4.1.1 Eso- $\beta$ -1,3-glucanasi .....	26
4.1.2 Beta-glucosidasi .....	27
4.1.3 Altri enzimi .....	28
4.1.3 Bioconversioni a carico dell'aglicone.....	30
4.2 Biotrasformazione dei tioli .....	33
4.2.1 Rilascio dei precursori .....	33
4.2.2 Acetilazione .....	35
CONCLUSIONI.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	40



# RIASSUNTO

Negli ultimi anni abbiamo assistito ad una diffusione sempre maggiore di birre luppolate, in particolare a livello artigianale.

Il luppolo, che da sempre è usato per conferire l'amaro a questa bevanda, ora viene sfruttato sempre di più per donarle caratteristiche aromatiche.

A questo proposito risulta interessante capire quali siano le interazioni tra il lievito ed i composti aromatici del luppolo.

Il lievito, infatti, attraverso le sue attività enzimatiche, può liberare alcune molecole aromatiche che si trovano in forma legata, quindi non volatile, nel luppolo. In particolare, la  $\beta$ -lasi libera i tioli (aroma di frutta tropicale), mentre la  $\beta$ -glucosidasi libera i terpeni (aroma di spezie, fiori, resina, agrumi). Inoltre, questo microrganismo, attraverso il suo metabolismo, è in grado di convertire alcune molecole odorose in altre, ad esempio il geraniolo (aroma di rosa) in  $\beta$ -citronellolo (aroma di agrumi).

Lo studio di questi fenomeni ha lo scopo di controllare e sfruttare al meglio il potenziale aromatico del luppolo, aumentando di conseguenza l'efficienza dei processi.

Le ricerche e gli studi promossi recentemente sono volti alla selezione di ceppi per la produzione di birra in cui l'espressione dei geni che codificano per questi enzimi sia maggiore dei ceppi attualmente disponibili in commercio.

L'obiettivo è quello di ottenere birre con aromi più intensi a pari quantità di luppolo usato, oppure, ottenere la stessa quantità di aromi utilizzando una minor quantità di luppolo, che è la materia prima che incide di più sui costi di produzione.

# 1. INTRODUZIONE

Il luppolo rappresenta un ingrediente fondamentale per la produzione della birra in quanto conferisce un sapore amaro, apporta molecole aromatiche, ha attività antimicrobica e contribuisce alla precipitazione delle proteine che rendono torbido il mosto. Tuttavia, non è stato sempre impiegato nella birra.

I reperti più antichi relativi alla produzione di birra risalgono a circa 13.000 anni fa e fino al XII secolo d.C., questa pianta non veniva utilizzata per la produzione della bevanda. È stata la Badessa Hildegard von Bingen a menzionare il luppolo nel XII secolo d.C. come ingrediente per la produzione della birra. Prima di allora, per conferire amarezza alla birra, si faceva ricorso a varie spezie ed erbe, talvolta anche velenose (Gresser, 2010). Durante il XIX secolo, in Inghilterra, i produttori iniziarono a utilizzare quantità significative di luppolo per migliorare la conservazione del prodotto, sviluppando così la tecnica del "dry hopping."

Negli anni '80, negli Stati Uniti, si assistette a una rinascita della birra artigianale, con particolare enfasi sulle India Pale Ale (IPA), che divennero il simbolo di questa rinascita. Questo stile di birra si caratterizza per il processo di aggiunta di luppolo durante la fermentazione (dry hopping), che favorisce la permanenza e la solubilizzazione dei composti aromatici nella birra.

Il mercato delle IPA è in costante evoluzione, con diversi stili molto differenziati. L'ultimo grande successo è rappresentato dalle New England IPA (NEIPA), birre torbide che si distinguono per l'uso di elevate quantità di luppolo (fino a 10g/L) in fermentazione, spesso impiegando varietà moderne, come quelle australiane e neozelandesi, che conferiscono aromi tropicali grazie all'elevato contenuto di tioli.

Tra le classi più importanti di aromi presenti negli oli essenziali del luppolo figurano gli alcoli monoterpenici e i tioli polifunzionali, che possono essere rintracciati sia in forma libera che legata all'interno della pianta. La frazione legata, definita come "potenziale aromatico" nel vino, può essere idrolizzata con conseguente rilascio dei composti volatili durante il processo di produzione della birra.

Le varie fasi del processo di birrificazione offrono condizioni uniche che possono influenzare il rilascio dei composti aromatici legati, con particolare attenzione alle interazioni tra i precursori e gli enzimi dei lieviti che guidano la fermentazione.

A differenza del settore enologico, in quello brassicolo gli studi a riguardo sono preliminari ed i risultati contraddittori, in questo elaborato cercheremo di fare chiarezza sulle reazioni che permettono la liberazione dei precursori aromatici, in particolare quelle degli enzimi dei lieviti definite biotrasformazioni.

## 2. IL LUPPOLO

### 2.1 La botanica

Il luppolo (*Humulus lupulus*) appartiene alla famiglia delle Cannabaceae. Si tratta di una pianta rampicante, dioica (infiorescenze maschili e femminili crescono su due arbusti differenti) e perenne.

Per la birrificazione vengono utilizzati solamente i fiori femminili poiché più fini e profumati, botanicamente definiti strobili.

Dalla ceppaia (apparato radicale) ogni anno partono numerosi fusti annuali che necessitano per il loro sviluppo verticale di un sostegno (in genere filo di ferro dolce o cordone in fibra di cocco), attorno al quale si attorcigliano in senso sinistoso.

Le foglie della pianta del luppolo possono ricordare quelle della vite, possiedono infatti una forma palmato lobata a bordo seghettato, ruvide al tatto poiché ricoperte di peli corti e sottili. Dall'ascella delle foglie partono dei tralci secondari, lunghi fino a qualche metro, dove si sviluppano le infiorescenze dioiche (Gresser, 2010).

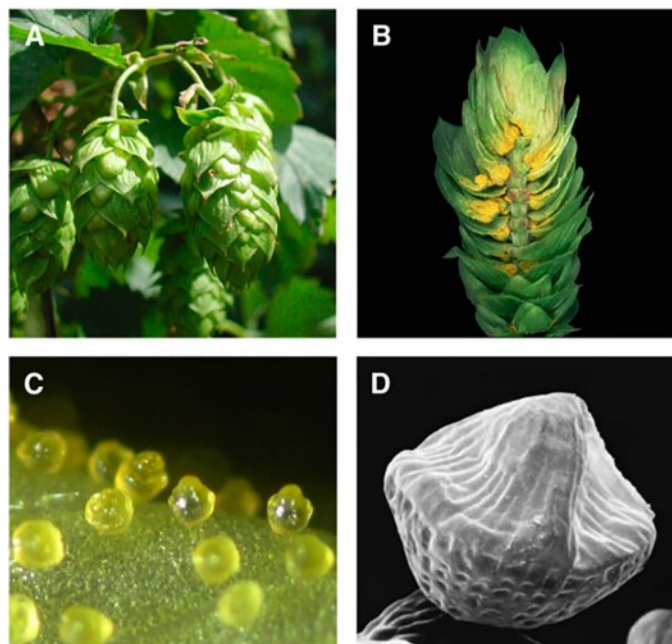


Figura 2.1 (A) Coni del luppolo cultivar *Taurus* (B) Sezione longitudinale di un cono di luppolo che mostra le ghiandole ricche di luppolina (C) Immagine al microscopio ottico delle ghiandole contenenti luppolina mature. (D) Immagine al microscopio elettronico a scansione di una ghiandola matura (Svedlund et al. 2022)



Le infiorescenze, dette più comunemente coni, sono formate da brattee e bratteole inserite su un rachide centrale come si può osservare nella **Fig. 2.1 (B)**. Il numero di brattee presenti in ciascun cono è oggetto di selezione ed è più elevato nelle varietà coltivate, in questo modo l'infiorescenza risulta più compatta, più ricca di luppolina (resina e oli) e più resistente alle sollecitazioni meccaniche.

Nel corso della maturazione, nella parte inferiore delle bratteole, vengono secrete da speciali ghiandole, particelle di resina color giallo, la cosiddetta luppolina (**Fig. 2.1 C, D**). Quest'ultima contiene la maggior parte di sostanze amaricanti (acidi amari) e sostanze aromatiche (oli essenziali), interessanti dal punto di vista tecnologico.

Generalmente acidi amari e oli essenziali sono tra loro proporzionali, infatti, se la pianta accumula molti alfa acidi nelle ghiandole del cono, allora accumulerà anche molti oli essenziali. Proprio per questo le annate migliori sono quelle in cui la media degli alpha acidi è più elevata (Gresser, 2010).

## **2.2 La coltivazione**

Le piante raggiungono la piena produzione al terzo anno per le cultivar europee e già nel secondo anno per quelle americane. Teoricamente un luppoletto può durare 25 anni e oltre, nella realtà la sua vita è più breve data la necessità di seguire i mutamenti della domanda dell'industria o per cali di produzione e qualità causati da malattie.

Il luppolo da birra è propagato unicamente per via agamica, in modo da assicurare uniformità vegetativa alle coltivazioni. Si usano polloni radicali o rizomi, ovvero la porzione ipogea dei tralci annuali, ricavati per potatura della ceppaia in autunno o più frequentemente in primavera (Gresser 2010).

## **2.3 Produzione mondiale di luppolo**

L'area di coltivazione del luppolo a livello mondiale è di 62,802 ha nel 2022, in lieve calo rispetto al 2021 (-0.2%) (BarthHaas 2022).

Come si può osservare nei grafici che seguono, i maggiori Paesi produttori a livello mondiale sono USA e Germania, e soddisfano più del 70% la richiesta del mercato. Altri Paesi degni di nota sono Repubblica ceca, Cina e Polonia.

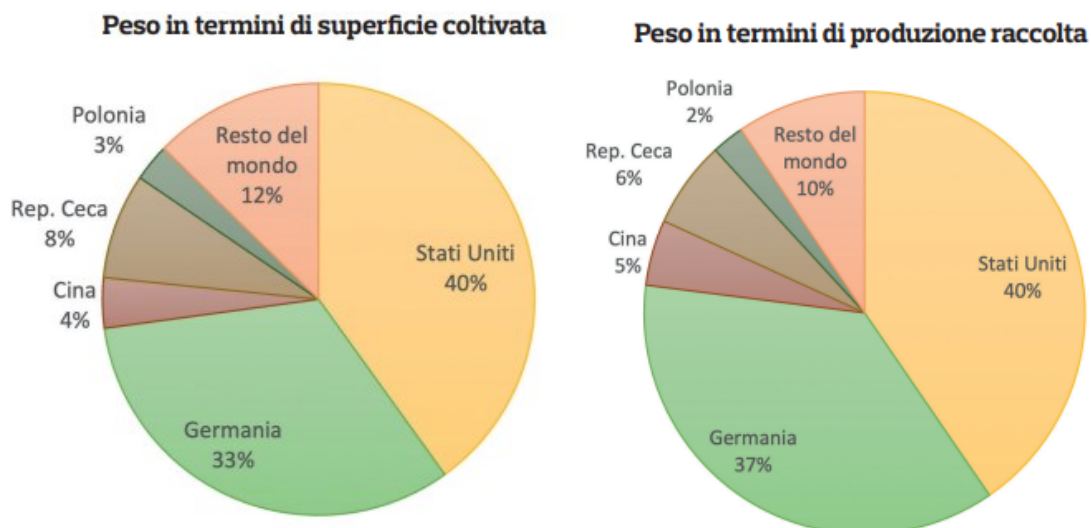
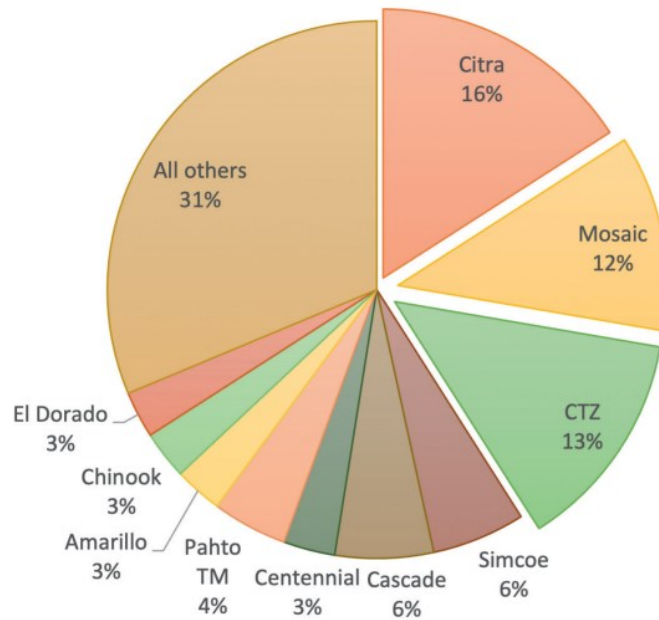


Figura 2.2 Maggiori Paesi produttori di luppolo in termini di superficie coltivata e produzione raccolta nel 2022 (Licciardo e Carbone, 2023)

Il luppolo nella produzione della birra, oltre ad essere utilizzato per le sue proprietà antisettiche e amaricanti, viene adoperato per le sue caratteristiche aromatiche. L'espansione del settore artigianale, sempre più rivolto alla produzione di birre con profilo aromatico accentuato, ha spostato l'interesse dei mastri birrai verso varietà con maggior contenuto di oli essenziali, quindi varietà più profumate. Questo ha prodotto uno spostamento nell'equilibrio varietale a favore di tali varietà, passando da una distribuzione equa 50-50 tra varietà amaricanti (alto contenuto di  $\alpha$ -acidi) e aromatiche (basso contenuto di  $\alpha$ -acidi) ad un 80,5% in favore di queste ultime (HGA, 2022).

Tra le varietà aromatiche prodotte negli USA, il Citra rimane al primo posto con il 16% di tutta la superficie, seguito dal Mosaic e CTZ (Columbus, Thomawok, Zeus), troviamo poi il Cascade e Simcoe che 5 anni fa rappresentava la varietà principalmente coltivate. Il cambiamento varietale è ancora in atto a favore di nuove varietà come Talus, Eureka, Idaho 7, Zappa ed altre, i mastri birrai artigiani, infatti, tendono ad utilizzare sempre nuove cultivar di luppolo come azione di marketing oppure per apportare nuovi aromi ai propri prodotti (HGA, 2022).



*Figura 2.3 Percentuale di superficie delle principali varietà di luppolo coltivate negli USA nel 2021 (Licciardo e Carbone, 2023)*

Per quanto riguarda la Germania si possono identificare 5 aree in cui si coltiva luppolo: Hallertau, Elbe Saale, Tettwang, Spalt e Palatino renano/Bitburg.

Negli ultimi 5 anni 79 produttori hanno abbandonato la coltivazione del luppolo, portando così a 854 il numero di coltivatori in Germania, la superficie di coltivazione è però rimasta pressoché invariata (17.111 ha).

In contrapposizione a quanto accade oltreoceano la superficie coltivata a luppolo aromatico è diminuita del 2%, ma comunque resta superiore rispetto alla quota di superficie coltivata con varietà amare (52% vs 48%) (BarthHaas, 2022).

La principale varietà coltivata è l'Herkules (35%) con alti livelli di  $\alpha$ -acidi, seguono le varietà aromatiche Perle (16%) e Hallertau tradition (14%).

Sarà interessante vedere come si svilupperanno le due nuove varietà del centro di ricerca sul luppolo di Hüll: Tango e Titan. Queste varietà combinano la tolleranza agli stress climatici e le caratteristiche di coltivazione e resistenza ottimizzate con un'ottima qualità di produzione della birra. Nelle prove di birrificazione, la varietà aromatica Tango ha dimostrato di essere una buona varietà a tutto tondo, nel 2022 è stata piantata una superficie di 32 ettari.

Le prove di birrificazione della varietà amara Titan hanno evidenziato un'eccellente qualità amaricante, paragonabile a quella della varietà di luppolo Herkules, leader del

mercato, la semina di questa varietà inizierà nella primavera del 2023 (Licciardo e Carbone, 2023). Altri Paesi importanti per quanto riguarda la produzione di luppolo sono Repubblica ceca in cui la principale varietà coltivata è il famoso Saaz, Polonia in cui principalmente viene coltivato il Lublin, Cina e Paesi dell'Oceania da cui provengono luppoli ricchi di tioli sempre più apprezzati dai mastri birrai, in particolare dall'Australia provengono il Galaxy e Vic Secret e dalla Nuova Zelanda il Nelson Sauvin e Motueka. La birra artigianale italiana copre il 3,1% del mercato nazionale e nonostante questo, vengono importate quasi tutte le materie prime per la produzione della birra, in particolar modo il luppolo (Assobirra, 2022).

La coltivazione del cono amaricante sul territorio nazionale è ancora limitata ad appezzamenti di ridotte dimensioni e alcuni di natura sperimentale, la superficie media aziendale è di 4000 m<sup>2</sup>. Grazie alla crescente domanda di birra artigianale si sta favorendo lo sviluppo di una filiera italiana del luppolo, anche dal punto di vista normativo-istituzionale si è cercato di sviluppare questo settore istituendo, all'interno della legge di bilancio del 2021, un fondo per l'erogazione di aiuti economici alle aziende produttrici (Licciardo e Carbone, 2023).

In Italia si è assistito ad un aumento delle superfici investite a luppolo che sono passate da 43 ettari del 2018 ai 67 ettari del 2020, nello stesso periodo anche il numero di aziende risulta in costante crescita (+60%), a conferma del forte interesse per la filiera brassicola. Nello scenario attuale, il luppolo coltivato in Italia viene utilizzato quasi interamente per le esigenze del mercato delle birre artigianali e agricole (Licciardo e Carbone, 2023).

## **2.4 La composizione chimica**

L'acqua è la molecola maggiormente presente nel cono di luppolo, in media circa 75-80%, infatti per l'immagazzinaggio è necessario essiccarlo fino a che il contenuto di acqua non scende fino al 10-12%. Durante questa operazione una piccola parte degli oli essenziali idrosolubili possono volatilizzare.

La composizione media dei coni di luppolo è sintetizzata nella **Tab. 2.1**.

<b>Molecole</b>	<b>Percentuale</b>
Acqua	10.0
Resine totali	15.0
Oli essenziali	0.5
Tannini	4.0
Monosaccaridi	2.0
Pectina	2.0
Aminoacidi	0.1
Proteine (N X 6,25)	15.0
Ceneri	8.0
Cellulosa, ecc.	43.4
	100.0

*Tabella 2.1 Composizione media del luppolo essiccato (Stevens, 1967)*

I componenti di maggior interesse tecnologico del luppolo sono le resine (15% del peso del luppolo essiccato), possiamo dividerle in resine dure e resine morbide. Quest'ultime sono costituite dagli  $\alpha$  e  $\beta$  acidi che donano l'amaro alla birra una volta isomerizzati. Inoltre, sono importanti gli oli essenziali che ricoprono solamente lo 0,5% in peso del cono di luppolo essiccato ma sono in grado di determinare le caratteristiche aromatiche delle birre luppolate date le loro basse soglie di percezione nell'ordine dei  $\mu\text{g/L}$  per i terpeni e dei  $\text{ng/L}$  per i tioli.

### **2.4.1 Resine**

Le resine totali sono definite, dal punto di vista della solubilità, come la parte dell'estratto di etere che è solubile in metanolo freddo o la parte dell'estratto di metanolo freddo che è solubile in etere. Esse sono costituite dalle resine dure e dalle resine morbide totali, quest'ultime a loro volta si dividono in resine molli non caratterizzate,  $\alpha$  acidi e  $\beta$  acidi.

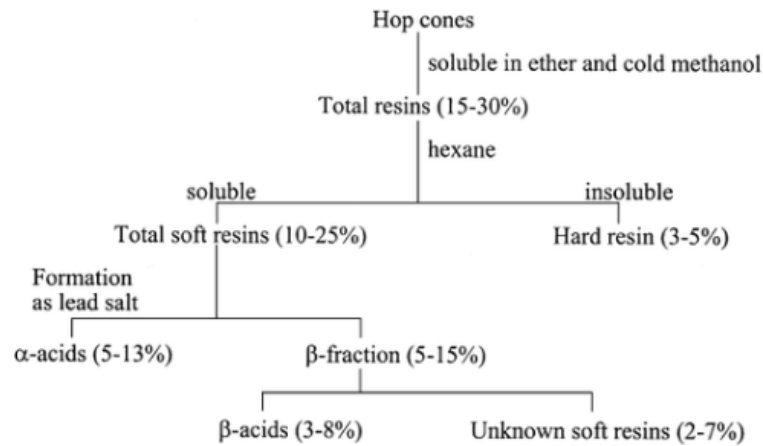


Figura 2.4 Classificazione delle resine del luppolo (Sakamotoa e Konings, 2003)

La chimica è piuttosto complessa, ma la maggior parte dei birrai considera significativo solo un tipo di componente: gli  $\alpha$ -acidi, che rientrano nella frazione delle resine morbide. Queste molecole, note anche come umuloni, possono variare dal 2% al 15% del peso secco del luppolo (Bamforth, 2003). È chiaro che una varietà "ad alto tenore di alfa", come il Target nel Regno Unito o il Nugget negli Stati Uniti, è una fonte di amaro più ricca, per cui sarà necessario utilizzarne una quantità minore per conferire un determinato livello di amaro alla birra, ma ovviamente il contributo degli oli essenziali sarà proporzionalmente inferiore e quindi il potenziale aromatico minore. Al contrario, un luppolo a bassa livello di  $\alpha$ -acidi, come il Fuggles o il Tettnang, deve essere utilizzato in proporzioni maggiori per ottenere l'amaro desiderato, il che comporta anche un maggiore apporto potenziale di aroma. Il birraio rischia, inoltre, di introdurre altri materiali indesiderati, come i tannini che favoriscono la torbidità della birra.

Esistono tre varianti degli  $\alpha$ -acidi (cohumulone, humulone e adhumulone), che si differenziano leggermente per la struttura della cosiddetta catena laterale "R", che si attacca all'anello.

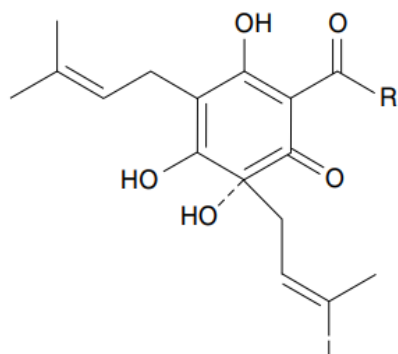


Figura 2.5 Formula chimica degli  $\alpha$ -acidi (Bamfoth, 2003)

Quando il mosto viene fatto bollire gli  $\alpha$ -acidi si riorganizzano per formare iso- $\alpha$ -acidi in reazioni chimiche di isomerizzazione, che li rende molto più solubili e più amari.

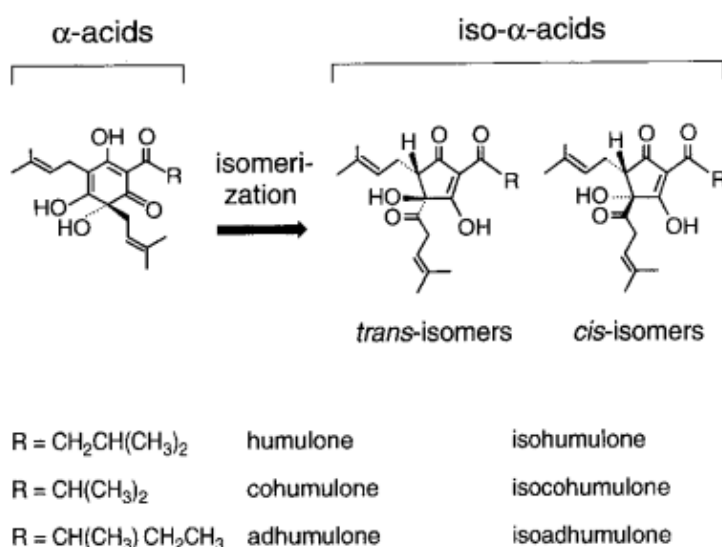


Figura 2.6 Reazione di isomerizzazione degli  $\alpha$  acidi che avviene durante la bollitura del mosto (Bamfoth, 2003)

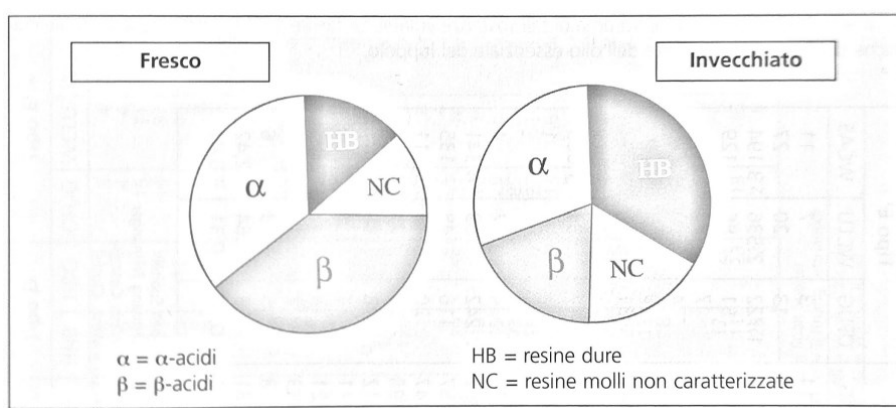
Al termine della bollitura, gli  $\alpha$ -acidi non isomerizzati vengono persi con il materiale luppolato (*trub*). Il processo non è particolarmente efficiente: non più del 50% degli iso- $\alpha$ -acidi viene convertito durante la bollitura e meno del 25% del potenziale amaricante originale sopravvive nella birra (Bamfoth, 2003).

Le resine totali a loro volta si dividono in base alla solubilità in idrocarburi paraffinici a basso punto di ebollizione (propano, n-butano e isobutano).

Le resine molli totali sono costituite dalla frazione delle resine totali che è solubile negli idrocarburi paraffinici a basso punto di ebollizione ed è costituita dagli  $\alpha$ -acidi,  $\beta$ -acidi

(lupulone, colupulone e adlupulone) e resine morbide non caratterizzate, le ultime due frazioni inoltre formano la frazione  $\beta$  delle resine morbide, come si può vedere nella **Fig. 2.4**.

Le resine dure, invece, sono costituite da quella parte delle resine totali che è insolubile in idrocarburi paraffinici a basso punto di ebollizione, si tratta di prodotti dell'ossidazione di  $\alpha$  e  $\beta$  acidi. La frazione delle resine dure aumenta con l'invecchiamento del luppolo poiché avvengono reazioni di ossidazione a danno degli  $\alpha$  acidi e soprattutto dei  $\beta$  acidi (Bamfoth, 2003).



*Figura 2.7 Effetto dell'invecchiamento del luppolo sulla composizione delle resine (Gresser, 2010)*

### 2.4.2 Oli essenziali

Gli oli essenziali costituiscono lo 0,5 - 3% del peso secco del cono di luppolo, la concentrazione varia a seconda della cultivar e dell'annata, ed il contenuto può raggiungere il 4%. Il numero di composti presenti è maggiore di 250, alcuni studi, come quello di Roberts et al. (2004), suggeriscono che il numero sia vicino a 1000. Nessuno può ancora affermare con certezza di aver stabilito una chiara relazione tra la composizione chimica degli oli essenziali e le caratteristiche aromatiche che essi conferiscono, la scienza in questa materia è enormemente complicata, come dimostrato dalla numerosità di molecole che contribuiscono alla formazione dell'aroma di questo prodotto (Klimczak e Cioch-Skoneczny, 2022).

La classificazione degli oli essenziali si basa sulla diversa solubilità degli oli, in particolare i primi studi di classificazione hanno utilizzato la cromatografia su colonna su gel di silice, eluendo gli idrocarburi con etere di petrolio e i composti ossigenati con etere.



Gli composti solforati invece vengono separati con strumenti più sensibili ovvero GC-FPD<sup>1</sup> poiché presenti in concentrazioni molto minori rispetto agli altri oli essenziali. La classificazione degli oli essenziali per convenzione è la seguente (Sharpe e Laws, 1981):

- Idrocarburi
- Composti contenenti ossigeno
- Composti dello zolfo

Il 50-80% dei composti dell'olio essenziale di luppolo sono idrocarburi, che possono essere suddivisi in monoterpeni, sesquiterpeni e composti alifatici. Il mircene è la molecola monoterpica più importante e può rappresentare il 10-72% in peso di tutti gli oli essenziali di luppolo. Tra i sesquiterpeni, le frazioni più importanti sono umulene e il  $\beta$ -cariofillene rispettivamente 15-12% e 2,8-18,2% degli oli essenziali di luppolo in peso. Il rapporto umulene/cariofillene è di solito costante ed è una caratteristica varietale. I composti alifatici sono presenti solo in tracce.

Gli idrocarburi sono caratterizzati da aromi speziati, erbacei e legnosi. Dato che sono scarsamente solubili in acqua ed evaporano quasi completamente durante la bollitura, si trovano nelle birre in piccole quantità, maggiormente in quelle in cui si fa uso della tecnica del dry-hopping (luppolatura a freddo) (Klimczak e Cioch-Skoneczny, 2022).

Le soglie sensoriali delle principali molecole degli idrocarburi sono riportate nella **Tab. 2.2**.

<b>Molecola</b>	<b>Descrittore</b>	<b>Soglia di percezione (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
Mircene	Erbaceo	13
Cariofillene	Speziato, terroso, muschio	64
Umulene	Speziato, terroso	120

*Tabella 2.2 Soglie di percezione dei principali idrocarburi (Svedlund et al. 2022)*

Il mircene avendo la soglia più bassa rispetto agli altri ed essendo la molecola più abbondante negli oli essenziali è di sicuro quello che determina maggiormente le caratteristiche aromatiche del cono di luppolo (Briggs et al., 2004).

Il secondo gruppo è costituito dai composti contenenti ossigeno e rappresenta circa il 30% degli oli di luppolo. Questo gruppo comprende molecole molto diverse fra loro, appartenenti ad acidi, alcoli, aldeidi, chetoni, epossidi, esteri e lattoni. Essi conferiscono soprattutto aromi floreali e fruttati. Questo gruppo di molecole è caratterizzato da una maggiore idrofilia rispetto agli idrocarburi; quindi, sono più solubili nella birra e si ritiene che influenzino l'aroma in misura maggiore (Briggs et al., 2004).

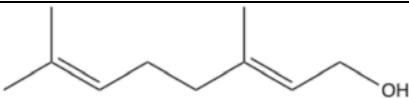
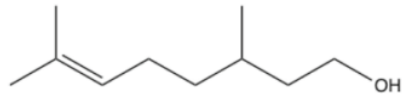
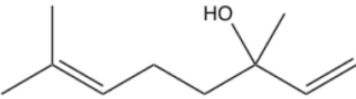
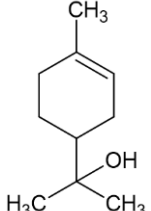
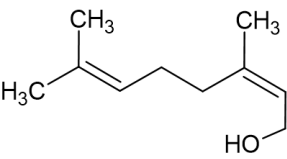
Molecola	Descrittore	Soglia di percezione (µg/L)	Struttura molecolare
Geraniolo	Rosa, lime, giacinto	6	
Citronellolo	Limone, lime, floreale	8	
Linalolo	Lavanda	5	
Alpha-Terpeneolo	Resinoso, legnoso	280-300	
Nerolo	Fruttato verde	500	

Tabella 2.3 Principali composti ossigenati degli oli essenziali ed effetti organolettici (Svedlund et al., 2022; Klimczak e Cioch-Skoneczny, 2022)

Gli alcoli possono essere suddivisi in alcoli monoterpenici (C10), sesquiterpenici (C15) ed alifatici. I più abbondanti sono il linalolo, il  $\beta$ -citronellolo, il nerolo, il geraniolo e l' $\alpha$ -terpineolo. Gli oli aromatici del luppolo possono contenere fino al 15% di esteri e derivano da reazioni di esterificazione degli alcoli monoterpenici con diversi acidi, alcuni

esempi sono l'isobutil isobutirrato, l'isoamil butirrato, il 2-metil isobutirrato (2MIB) e molte forme di esteri del geraniolo. Le aldeidi sature e insature sono presenti solo in piccole quantità nel luppolo, ma lo (Z)-3-esanale è uno dei più importanti determinanti dell'aroma del luppolo fresco. Si tratta di composti deperibili che subiscono rapide trasformazioni, compresa la riduzione agli alcoli corrispondenti. Il luppolo contiene anche un'ampia gamma di chetoni metilati, ramificati e insaturi, tra cui il 2-undecanone che è il più abbondante. Tuttavia, i chetoni presenti nella birra finita sono principalmente quelli prodotti dal lievito e non quelli derivanti dal luppolo.

L'ultimo gruppo è quello dei composti contenenti zolfo, esso comprende i tioli polifunzionali, tioesteri, tiofene, metilsolfuri, polisolfuri ed episolfuri. Le molecole contenenti zolfo più importanti a livello aromatico nel luppolo sono i tioli volatili, in particolare il 3MH ed il 4MMP. Il primo ha un odore che ricorda l'uva e gli agrumi mentre il secondo a basse concentrazioni conferisce un aroma di ribes nero, mentre in elevate concentrazioni inizia ad assomigliare all'urina di gatto (Klimeczak e Cioch-Skoneczny 2022). Oltre ai due tioli già citati, anche altri tioli polifunzionali possono contribuire all'aroma fruttato di alcune varietà di luppolo, come il 3-sulfanil-4-metilpentan-1-olo (3S4MP), il 3-mercaptopentanololo (3MP) e il 3-mercaptoesaniacetato (3MHA) (Svedlund et al., 2022).

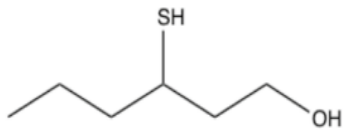
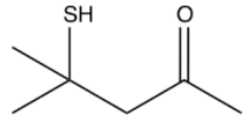
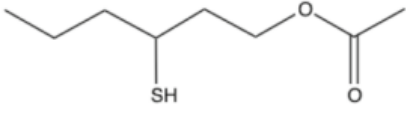
Molecola	Descrittore	Soglia di percezione (ng/L)	Struttura molecolare
3-Mercaptoesanololo (3MH)	Uva, agrumato	55-60	
4-mercapto-4-metilpentan-2-one (4MMP)	Ribes nero, urina di gatto	1,5	
3-mercaptoesaniacetato (3MHA)	Pasion fruit, guava	4	

Tabella 2.4 Principali composti solforati degli oli essenziali ed effetti organolettici (Svedlund et al. 2022)

Si presume che parte della biogenesi dei composti solforati nel luppolo sia data dalla reazione dei terpeni con lo zolfo residuo del trattamento fungicida, questo indica che non solo la genetica e le condizioni climatiche possono modificare la composizione degli oli di luppolo, ma anche gli interventi dell'uomo come i trattamenti fitosanitari (Buiatti et al. 2023).

### 3. PRECURSORI AROMATICI

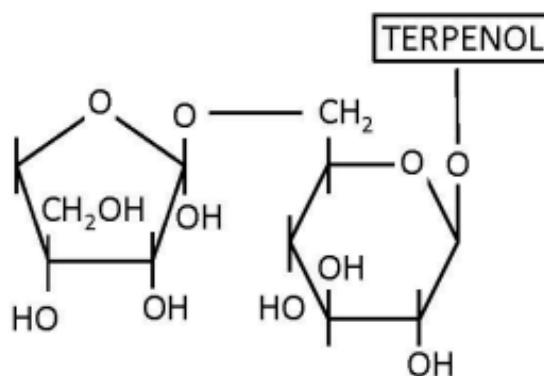
Il luppolo contiene fino al 4% di oli essenziali volatili, infatti, risulta molto profumato. In realtà le molecole aromatiche possono trovarsi anche in forma legata, non volatile per cui non odorose. Per il luppolo Cascade, ad esempio, sono state riportate concentrazioni di 6,5 mg/kg di precursori del 3-mercaptoesanolo, concentrazioni 1000 volte superiori alle concentrazioni di 3MH libero (Svedlund et al., 2022).

Esistono due tipi di legami con gli oli essenziali del luppolo:

- Le glicosilazioni tra alcoli monoterpenici e carboidrati
- Il legame tra i tioli polifunzionali e la cisteina o il glutatione

#### 3.1 Precursori glicosilati

I glicosidi sono una classe di composti inodori e solubili in acqua costituiti da un aglicone glicosilato a una frazione di carboidrato (glicone).



*Figura 3.1 Precursore aromatico formato da un terpenolo (aglicone) e un diglucoside costituito da piranosio e furanosio (glicone) (Mateo e Maicas, 2016)*

In particolare, gli agliconi più studiati e importanti per l'aroma della birra sono gli alcoli monoterpenici (geraniolo, citronellolo, geraniolo, nerolo,  $\alpha$ -terpineolo).

La pianta, dopo aver prodotto gli alcoli monoterpenici attraverso la via isoprenica, li accumula grazie all'enzima glicosiltransferasi che aggiunge gli zuccheri all'aglicone (Buiatti et al., 2023). Questo legame li rende più solubili in acqua e meno reattivi,

facilitando il loro trasporto nel citosol e l'immagazzinamento all'interno delle piante. Sebbene il ruolo diretto dei glicosidi nelle piante non sia stato completamente chiarito, è stato dimostrato che fungono da serbatoio di composti per la difesa delle piante da attacchi di microrganismi e animali, molecole per la comunicazione pianta-pianta e molecole segnale per gli organismi benefici. Oltre a facilitare lo stoccaggio e il trasporto degli agliconi nella pianta, la glicosilazione può essere impiegata per la disintossicazione della pianta stessa (Lafontaine et al., 2021).

Oltre agli alcoli monoterpenici possono trovarsi legati glicosidicamente nel luppolo altre molecole di minore importanza a livello aromatico nella birra. Questa pianta infatti può legare alcoli alifatici, composti aromatici (come alcool benzilico, alcool feniletilico e vanillina), e norisoprenoidi (come il beta-damascenone) (Buiatti et al., 2023).

Le indagini sulla composizione glicosidica dei coni di luppolo si sono concentrate in gran parte sugli alcoli monoterpenici, composti che sono considerati tra i maggiori responsabili dell'aroma del luppolo, e sui norisoprenoidi, come il  $\beta$ -damascenone (Caffrey e Ebeler, 2021).

In generale, il primo zucchero legato a un aglicone da un enzima UGT (UDP glucuronosiltransferasi) è un glucopiranosio. In genere si riteneva che uno zucchero glucopiranosio fosse sempre il primo zucchero legato all'aglicone, studi recenti (Caffrey et al., 2019; Caffrey et al. 2020) hanno dimostrato che alcuni zuccheri non glucosilici sono legati direttamente a dei sesquiterpeni nell'uva, nella birra tuttavia non sono stati rilevati agliconi formati da sesquiterpeni. Sebbene non sia stata effettuata una caratterizzazione completa del contenuto di gliconi dei glicosidi del luppolo, gli studi di idrolisi suggeriscono che questi precursori possono avere uno o due carboidrati, solitamente un pentoso e un esoso. I potenziali zuccheri che possono essere presenti nel glicone sono glucopiranosio(6C), apiofuranosio(5C), xilopiranosio(5C), arabinofuranosio(5C) e ramnopiranosio(6C), halattopiranosio(6C) e glucosidi malonilati (Caffrey e Ebeler, 2021).

Lafontaine (2021) nel suo studio ha trovato che le concentrazioni totali di monoterpenoli pentoso-esosi nel luppolo variavano da 0,46 a 1,81  $\mu\text{g/g}$  di luppolo su base secca al 100%, questo risultato è coerente con studi precedenti. Tra tutte le varietà di luppolo in esame, il Sabro presenta la più alta concentrazione, mentre il Citra è al secondo posto (Lafontaine et al., 2021).

### 3.2 Precursori legati a cisteina o glutatione

Anche i tioli possono essere presenti nel luppolo sia in forma attiva che in forma legata, in quantità variabile a seconda della varietà di luppolo, dell'anno di raccolta e del tempo di conservazione (Buiatti et al., 2023). I tioli nel luppolo sono legati alla cisteina (amminoacido) oppure al glutatione (tripeptide).

Ad oggi sono stati rilevati precursori cisteinilati e glutationati in diverse varietà di luppolo a concentrazioni differenti, i principali tioli legati sono il 3MH e il 4MMP.

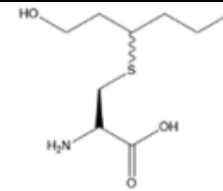
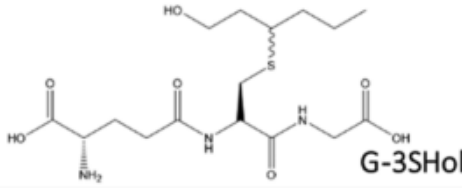
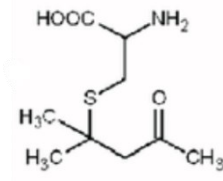
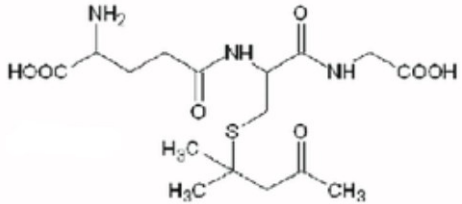
Precursore	Concentrazione	Struttura chimica
Cys-3MH	0,13 mg/kg in Mandarina Bavaria e 1,1 mg/kg in Barbe Rouge	 Cys-3SHol
G-3MH	1,3 mg/kg in Barbe Rouge e 19 mg/kg in Cascade	 G-3SHol
Cys-4MMP	0,005 mg/kg in Saaz e 0,04 mg/kg in Strisselspat	
G-4MMP	Quantificato solo in Chinook a 0,01 mg/kg	

Tabella 3.1 Principali precursori tiolici e relative concentrazioni rilevate nei luppoli (Bonaffoux et al., 2020; Chenot et al., 2021)

Nelle varietà Cascade, Chinook, Mandarina bavaria, Barbe rouge, Saaz e Strisselspat i principali precursori sono quelli del 3MH, in particolare quello legato al glutatione rappresenta l'80% della quantità totale dei precursori tiolici ad eccezione del luppolo Barbe Rouge in cui i livelli di Cys-3MH e G-3MH sono abbastanza simili.

Va sottolineato che, contrariamente all'uva, il luppolo è anche ricco di tioli liberi. Il rapporto tra i tioli liberi e legati dipende dai tipi tioli considerati (3MH o 4MMP) e in misura minore dalla varietà di luppolo. Il rapporto fra la frazione libera e legata di 3MH nella cultivar Chinook e Barbe Rouge è meno dell'1%, nella varietà Citra è del 2%, in Tomahawk è del 4%, mentre in Cascade è del 7%. Per quanto riguarda il 4MMP il rapporto fra la frazione libera e legata in Chinook è del 23%, mentre in Saaz è del 95%. Non è chiaro, al momento, il motivo di questi diversi rapporti ma, oltre alla varietà di luppolo, potrebbero avere un'influenza anche le condizioni di crescita della pianta (condizioni pedoclimatiche, maturità) (Bonnaffoux et al., 2020).

Recentemente sono stati evidenziati quattro nuovi precursori tiolici aromatici nel luppolo, che sono riportati nella **Tab. 3.2**.

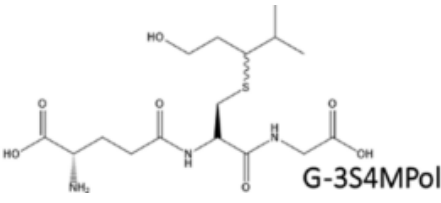
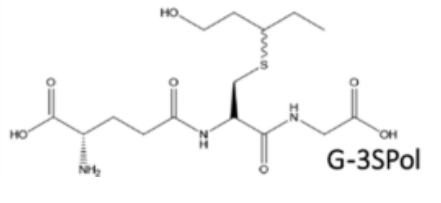
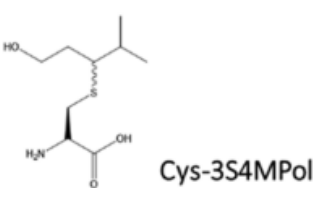
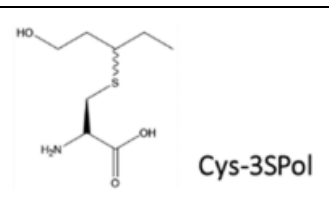
Precursore	Concentrazione in cui è stato rilevato	Struttura chimica
glutazione S-coniugato al 3-mercapto-4-metilpentan-1-olo (G-3M4MP)	20,1 mg/kg in Mosaic e 98,6 mg/kg in Amarillo	
glutazione S-coniugato al 3-mercaptopentanololo (G-3MP)	18 mg/kg in Citra	
cisteina S-coniugata al 3-mercapto-4-metilpentan-1-olo (Cys-3M4MP)	0,7 mg/kg in Hallertau Blanc	
cisteina S-coniugata al 3-mercaptopentanololo (Cys-3MP)	fino a 0,2 mg/kg in Polaris	

Tabella 3.2 Precursori tiolici recentemente rilevati nel luppolo e loro concentrazione (Bonnaffoux et al., 2020) (Chenot et al., 2021)



Anche il malto può contenere dei precursori tiolici come il Cys-3MH e il Glut-3MH, in una recente indagine sono state trovate quantità fino a 700 µg/kg di Glut-3MH in malto d'orzo, mentre altri malti di riso, frumento e sorgo contengono quantità inferiori a 30 µg/kg. Tra i malti d'orzo, l'abbondanza di Glut-3MH è diminuisce con l'entità della tostatura del malto (Molitor et al., 2022).

### 3.3 Effetto del processo di birrificazione sui precursori aromatici

La fase in cui viene aggiunto il luppolo influenza particolarmente l'attività glicosidica a carico dei precursori presenti nel luppolo.

Brewing Stage	Primary Hydrolysis
Mashing	N/A
Lautering and sparging	N/A
Boiling and whirlpool	Acid
Fermentation— <i>Saccharomyces</i>	Exogenous yeast enzymes
Fermentation—non- <i>Saccharomyces</i> yeast and/or mixed fermentations	Exogenous yeast or bacterial enzymes
Dry hopping and hop creep	Exogenous hops enzymes
Storage	Spontaneous Acid Hydrolysis

Figura 3.2 Fasi della birrificazione coinvolte nell'idrolisi dei precursori glicosilati (Caffrey e Ebeler, 2021)

I coni vengono tradizionalmente aggiunto durante la fase di ebollizione, ma possono essere addizionati anche durante la fase di whirlpool e prima, durante o dopo la fermentazione. Ogni fase offre condizioni uniche che potrebbero influenzare l'idrolisi dei glicosidi. Ad oggi mancano degli studi specifici sul comportamento dei glicosidi quando il luppolo viene aggiunto in ciascuna di queste fasi di produzione (Caffrey e Ebeler, 2021).

Durante la bollitura le alte temperature e le condizioni acide possono favorire l'estrazione e l'idrolisi dei glicosidi aromatici dal luppolo; tuttavia, la volatilizzazione degli aromi durante la bollitura riduce al minimo l'impatto dei volatili rilasciati in questa fase. Come si può osservare nella **Fig 3.3** si possono distinguere due diversi comportamenti dei terpenoidi durante la bollitura.

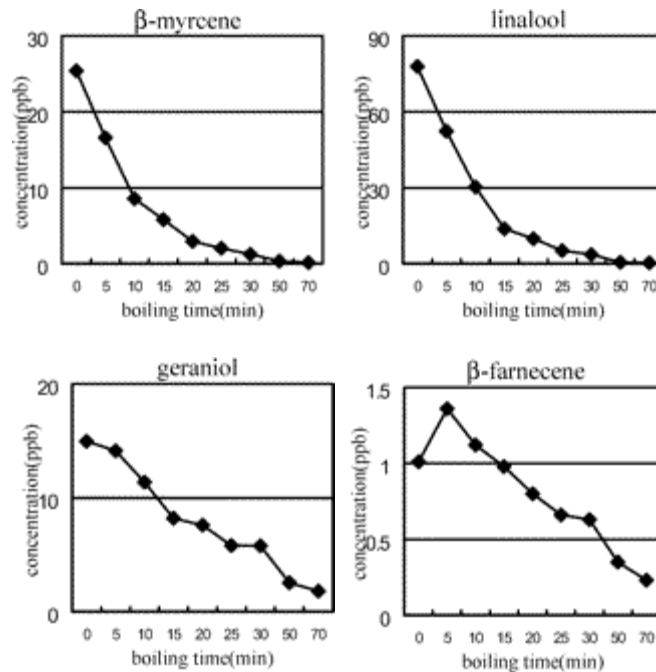


Figura 3.3 Comportamento dei terpenoidi derivati dal luppolo durante la bollitura del mosto (Kashimoto et al., 2005)

Il primo modello è quello del mircene e del linalolo i cui livelli diminuiscono rapidamente durante il processo di ebollizione, ciò è dovuto in parte ai loro bassi punti di ebollizione. Il secondo è quello del  $\beta$ -farnesene, del cariofillene e nel geraniolo, che hanno punti di ebollizione più elevati, per cui le concentrazioni di questi componenti diminuiscono più linearmente, inoltre le condizioni di bollitura possono liberare le loro forme glicosilate che poi evaporano se le condizioni di bollitura persistono (Kishimoto et al., 2005).

Le aggiunte di luppolo che si protraggono oltre la fase di ebollizione della birra hanno un maggiore impatto sulla liberazione dei glicosidi.

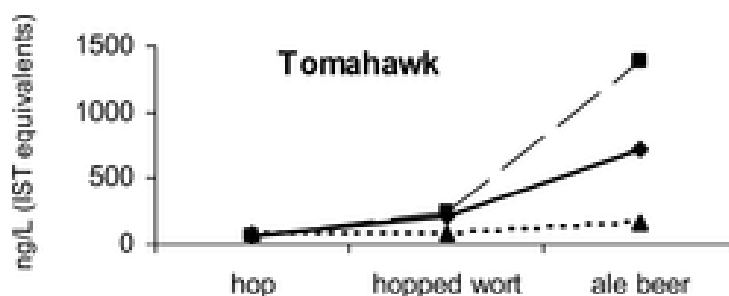
Se il luppolo viene aggiunto nella fase di whirlpool o a inizio fermentazione c'è rischio di perdita degli agliconi liberati a causa della  $CO_2$  sviluppata dalla fermentazione oppure dalla  $CO_2$  introdotta per la gasatura della birra con pietra porosa, una molecola sensibile a questi eventi è il linalolo.

Nel caso in cui i glicosidi non vengono idrolizzati prima, gli agliconi possono essere rilasciati spontaneamente dall'idrolisi acida durante l'invecchiamento. Tuttavia, non si ritiene che l'idrolisi acida dei glicosidi rimasti nella birra abbia un impatto sul prodotto finale, poiché la maggior parte delle birre non viene invecchiata. Ciononostante, la birra ha una moltitudine di stili diversi che possono essere invecchiati. È stato dimostrato che

le birre belghe sviluppano cambiamenti nell'aroma a causa dell'idrolisi acida dei glicosidi durante il processo di invecchiamento. Altri stili di birra emergenti, come le IGA (Italian Grape Ale), in cui il mosto viene fermentato con la presenza di d'uva, aprono scenari interessanti riguardo l'interazioni tra i glicosidi presenti nell'uva e le condizioni di produzione della birra (Caffrey e Ebeler, 2021).

Le condizioni di processo delle diverse fasi di produzione della birra possono anche favorire la liberazione dei tioli polifunzionali legati a cisteina e glutatione.

Come si può osservare nella **Fig 3.4**, durante la bollitura c'è un piccolo aumento di alcoli solfanilalchilici (tioli polifunzionali), in questo studio la luppolatura è stata effettuata con luppolo Tomahawk, nello stesso studio con prove con luppolatura diversa non hanno rilevato aumenti di questi composti.



*Figura 3.4 Evoluzione della quantità totale di alcoli solfanilalchilici (■), acetati solfanilalchilici(◆) e carbonili  $\beta$ -solfanilalchilici(▲) nel luppolo (concentrazioni convertite in equivalenti di mosto), mosto e birra (luppolata con Tomahawk) (Gros et al., 2012)*

### 3.3.1 Beta-damascenone

Oltre agli alcoli monoterpici anche il  $\beta$ -damascenone, che fa parte dei norisoprenoidi, può essere legato glicosidicamente. Questa molecola in forma libera ha una soglia di percezione di 150ppb, essa viene associata al luppolo vecchio, in particolare i descrittori sono tabacco, mela cotta, ribes rosso e marmellata di frutta (Chevance et al., 2002).

Durante la fase di bollitura è stato riscontrato un aumento della concentrazione di  $\beta$ -damascenone, contrariamente a quanto avviene ai monoterpici. È stato poi dimostrato che la liberazione di questa molecola avviene grazie all'idrolisi del legame glicosidico in ambiente acido (generalmente il mosto durante la bollitura ha un pH di 5,1-5,4). Il rilascio di questo aglicone può avvenire anche durante la bollitura della birra poiché stabile ad elevate temperature e durante l'invecchiamento, come mostrato nella **Fig 3.5** (Kishimoto

et al., 2005). Il  $\beta$ -damascenone nella birra viene rilasciato esclusivamente per idrolisi dei glicosidi in condizioni acide, in questo caso il lievito non ha nessun ruolo (Caffrey e Ebeler, 2021).

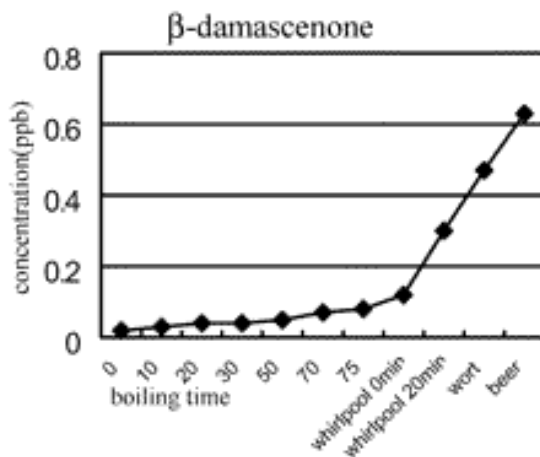


Figura 3.5 Concentrazione del  $\beta$ -damascenone durante la bollitura e l'invecchiamento della birra (Kishimoto et al., 2005)

## 4. EFFETTO DEL LIEVITO SULLA LIBERAZIONE DEI PRECURSORI AROMATICI: LE REAZIONI DI BIOTRASFORMAZIONE

Quando il luppolo viene raccolto i precursori aromatici rimangono nella pianta in forma non odorosa e quando viene aggiunto al mosto per la produzione della birra possono essere liberati. L'idrolisi dei legami glicosidici può avvenire grazie alle alte temperature, pH bassi oppure all'attività enzimatica (Lafontaine et al., 2021). In particolare, quest'ultima è stata recentemente studiata come meccanismo per recuperare composti aromatici nella birra ed è l'oggetto di questa tesi.

Esistono due possibili attività di liberazione degli aromi:

1. Attività glicosidasica per la liberazione degli alcoli monoterpenici e  $\beta$ -damascenone.
2. Attività  $\beta$ -liasica per la liberazione dei tioli polifunzionali.

Oltre all'attività di liberazione dei precursori aromatici, durante la fermentazione, possono avvenire delle reazioni a carico delle molecole odorose in grado di convertirle in altre molecole con differenti aromi e soglie di percezione.

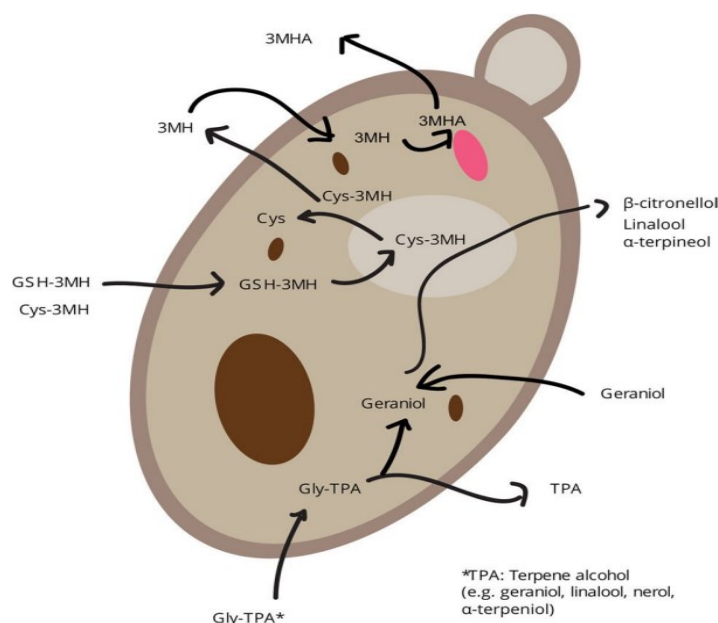


Figura 4.1 Panoramica delle reazioni di biotrasformazione che avvengono nel lievito (Svedlund et al., 2022)

## 4.1 Attività glicosidasica

Le aggiunte di luppolo che si protraggono oltre la fase di ebollizione della birra hanno un maggiore impatto sulla liberazione dei glicosidi.

I precursori monoterpenici possono interagire con diverse vie metaboliche di *Saccharomyces* (nella birra vengono impiegate le due specie *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*) e liberare gli agliconi aromatici. Il lievito, infatti, è dotato di enzimi con attività glicosidasica in grado di liberare gli agliconi odorosi, i terpenoidi ad oggi sono quelli più studiati.

Anche se i glicosidi vengono idrolizzati durante la fermentazione e gli agliconi rilasciati non vengono persi a causa della CO<sub>2</sub>, la presenza di agliconi liberi durante le fasi attive della fermentazione può avere effetti imprevedibili sul risultato gustativo. Alcuni alcoli monoterpenici derivati dal luppolo sono soggetti a reazioni di biotrasformazione che li trasformano in altri terpenoli, ad esempio il geraniolo in citronellolo (Caffrey e Ebeler, 2021).

### 4.1.1 Eso- $\beta$ -1,3-gluconasi

*Saccharomyces* possiede diversi enzimi della famiglia delle gluconasi di parete. Essi hanno un ruolo nella separazione cellulare, mentre altre presentano attività transglicosilasi e possono essere coinvolte nell'estensione e nel riarrangiamento delle catene di 1,3- $\beta$ -glucano e nel legame incrociato di questi polimeri con altri componenti della parete (Adams, 2004). Questi enzimi di parete vengono maturati nell'apparato del golgi e poi, tramite vescicole, vengono trasportati alla membrana cellulare e secreti nello spazio periplasmatico in cui svolgono la loro funzione. I meccanismi di degradazione e produzione della parete cellulare sono molto complessi e questi enzimi non sono codificati solamente da un singolo gene, ma sembra che circa 15 geni in *Saccharomyces* codifichino polipeptidi con attività gluconasiche (Adams, 2004).

Le eso- $\beta$ -gluconasi, essendo enzimi esogeni, sono abituate alle condizioni ambientali extra-cellulari per cui possono svolgere la loro attività anche al di fuori della parete.

Durante la fermentazione alcuni enzimi possono uscire dalla cellula e attaccare i precursori glicosilati liberando gli agliconi monoterpenici aromatici. In particolare, è stato dimostrato che la eso- $\beta$ -1,3-gluconasi codificata dal gene EXG1 è l'enzima principale coinvolto nella liberazione dei glicosidi. Esso ha il vantaggio di essere aspecifico rispetto

al substrato e ciò gli permette di attaccare diversi saccaridi. Il rilascio degli agliconi legati, infatti, dipende in larga misura dagli zuccheri presenti nel glicoside (Klimczak e Cioch-Skonecny, 2022).

Anche l'autolisi potrebbe avere un ruolo nel rilascio dell'enzima nel mosto, tuttavia difficilmente nella fermentazione della birra avviene dato che le cellule di lievito sedimentate nei fermentatori vengono spurgate e le fermentazioni in genere sono molto brevi (7 gg).

In *Saccharomyces* il gene EXG1 produce un polipeptide che ha un ruolo funzionale nel metabolismo dei glucani della parete cellulare.

Alcuni studi hanno trovato un'esoglucanasi correlata a Exg1p secreta da *Candida albicans*, ma non è stato identificato alcun ruolo per questo enzima (Adams, 2004).

#### 4.1.2 Beta-glucosidasi

L'enzima  $\beta$ -glucosidasi è in grado di liberare gli agliconi idrolizzando il legame glicosidico fra l'aglicone ed il primo residuo zuccherino ad esso legato (**Fig 4.2**).

Questo enzima non ha azione endoglucanasi per cui non idrolizza il legame tra i due zuccheri tipici dei gliconi trovati nel luppolo.

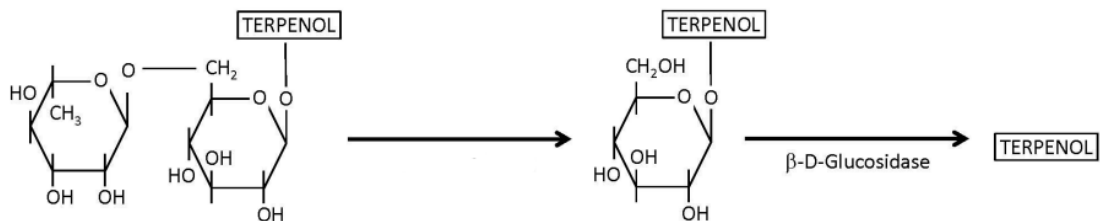


Figura 4.2 Rilascio dell'aglicone attraverso l'attività della  $\beta$ -D-glucosidasi  
(Mateo e Maicas, 2016)

I dati sull'attività della  $\beta$ -glucosidasi in *Saccharomyces* riportati da numerosi studi sono contraddittori. Alcuni riportano una bassa attività, altri hanno individuato ceppi enologici con un'alta attività  $\beta$ -glucosidasica, mentre altri ancora evidenziano l'attività di una  $\beta$ -glucosidasi associata alla parete di vari ceppi di *Saccharomyces*. Tale attività sembra essere indipendente dalla concentrazione di glucosio nel mosto, ma influenzata negativamente dalla presenza di etanolo. Inoltre, alcuni studi suggeriscono che il genoma di *Saccharomyces* non contenga geni per la codifica di questo enzima (Mateo e Maicas,

2016). La maggior parte degli studi sulla birra e sul vino, in realtà, non hanno riconosciuto l'attività della  $\beta$ -glucosidasi come azione principale per la liberazione dei precursori glicosilati in *Saccharomyces*.

Al contrario, i lieviti non-*Saccharomyces* possiedono vari gradi di attività  $\beta$ -glucosidasi e possono svolgere un ruolo nel rilascio di composti volatili da precursori non volatili. Nel settore enologico, in cui i non-*Saccharomyces* sono molto più studiati, sono stati rilevati lieviti appartenenti ai generi *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces* e *Hanseniaspora* in grado di liberare agliconi. I lieviti sono naturalmente presenti sulle bucce degli acidi d'uva e possono contribuire, durante la fermentazione, al rilascio di alcuni terpenoli aromatici. Alcune aziende hanno sviluppato formulazioni commerciali di lieviti non-*Saccharomyces* in grado di produrre vini con caratteristiche aromatiche più gradevoli, tipiche e varietali.

Nel settore brassicolo questi enzimi prodotti da non-*Saccharomyces* sono ancora poco studiati, anche se sono state rilevate attività enzimatiche interessanti ed efficienti in *Brettanomyces custersii* isolato dalla fermentazione di un lambic (Klimczak e Cioch-Skoneczny, 2022). Poiché *Brettanomyces* porta a fermentazioni più lente, si potrebbe pensare di produrre birra attraverso una co-fermentazione, in cui *S.cerevisiae* svolge la fermentazione principale e *Brettanomyces custersii* rilascia gli agliconi volatili nella birra. Non sono ancora stati sviluppati protocolli precisi di co-fermentazione nel settore brassicolo, e sono molto poco frequenti fra i birrifici questi tipi di tecniche, sono necessari studi ulteriori per poterle mettere in atto per il rilascio di monoterpenoli.

Dagli studi effettuati sulla birra fino ad ora risultano interessanti in questo senso i lieviti: *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Brettanomyces anomalus* e *Brettanomyces custerii*.

Al momento l'unico modo per sfruttare la  $\beta$ -glucosidasi per il rilascio di aromi nella birra è usare degli enzimi purificati disponibili in commercio, ad esempio Rapidase®, Sumyzime® o Aromazyme.

#### **4.1.3 Altri enzimi**

La  $\beta$ -glucosidasi per poter lavorare necessita di un solo zucchero legato all'aglicone. I gliconi nel luppolo sono formati da un diglucoside costituito da un pentoso ed un esoso, sono quindi necessari enzimi che idrolizzano il legame con il residuo zuccherino



terminale. L'idrolisi enzimatica dei glicosidi, quindi, può avvenire attraverso l'azione di enzimi che agiscono in sequenza secondo due fasi: in primo luogo, l' $\alpha$ -L-rhamnosidasi, l' $\alpha$ -L-arabinosidasi o la  $\beta$ -D-apiosidasi effettuano la scissione dello zucchero terminale (ramnosio, arabinosio o apiosio); successivamente, avviene la liberazione del monoterpenolo a seguito dell'azione di una  $\beta$ -D-glucosidasi (**Fig 4.3**).

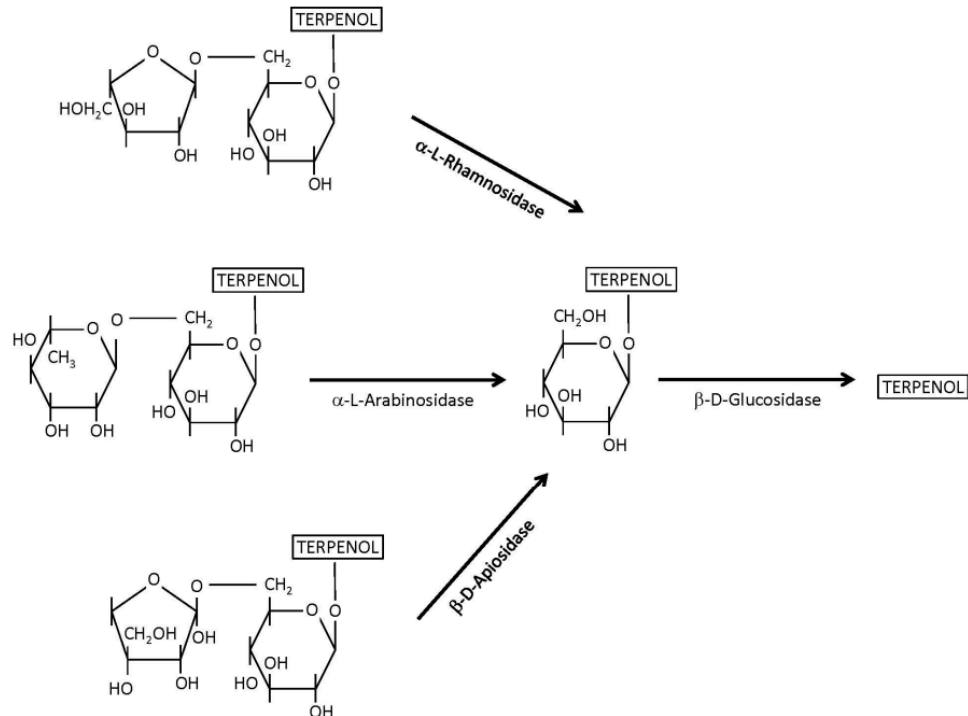


Figura 4.3 Idrolisi enzimatica sequenziale di un precursore aromatico legati ad un disaccaride (Mateo e Maicas, 2016)

L'attività di  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasi,  $\alpha$ -L-rhamnosidasi e  $\beta$ -xilosidasi sono attualmente poco studiate nella birra, per cui non si è certi del loro ruolo nell'idrolisi dei precursori glicosilati (Klimczac e Cioch-Skoneczny, 2022).

Ad oggi, nei ceppi di *Saccharomyces* sono stati trovati solo i geni per la codificazione dell'enzima  $\alpha$ -L-rhamnosidasi e non degli altri due enzimi. In lieviti *non-Saccharomyces*, invece, l'attività di questi enzimi è più interessante. L'  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasi in uno studio di 770 ceppi è stata riscontrata in *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii*, *Wickerhamomyces (Pichia) anomalus*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhodosporium toruloides* e *Cryptococcus amyloletus*; mentre l'attività dell' $\alpha$ -L-rhamnosidasi è stata osservata in particolar modo nella specie *Hansenula polymorpha (Pichia angusta)*. La  $\beta$ -

xilosidasi invece è stata rilevata solo in 4 ceppi del genere *Hanseniaspora*, in particolare in due ceppi di *Hanseniaspora osmophilia* e in due ceppi di *Pichia anomala* (Klimczac e Cioch-Skoneczny, 2022).

Lo stato attuale delle conoscenze indica che questi enzimi sono presenti in pochissime specie di lievito, per cui potrebbero essere necessari ulteriori studi per indagare l'esatto meccanismo dell'idrolisi dei glicosidi derivati dal luppolo.

#### 4.1.3 Bioconversioni a carico dell'aglicone

Oltre alla liberazione dei glicosidi mediante idrolisi, ci sono anche altre reazioni di biotrasformazione che possono avvenire durante la fermentazione della birra. Il lievito infatti è in grado di convertire gli alcoli monoterprenici come il geraniolo e il linalolo in una serie di altri prodotti terpenoidi attraverso reazioni di:

- riduzione
- esterificazione
- altre reazioni

##### **Riduzione**

Il geraniolo può essere uno dei precursori aromatici nella birra, infatti, può essere ridotto in  $\beta$ -citronellolo dall'attività enzimatica di *Saccharomyces*, specialmente durante i primi 2-4 giorni di fermentazione.

Questa reazione di riduzione avviene grazie all'enzima NADPH deidrogenasi II (*Old yellow enzyme*), codificato dal gene OYE2, si tratta di un enzima associato a citoplasma, mitocondrio e nucleo, per cui il geraniolo deve entrare nella cellula per essere bioconvertito a citronellolo (Holt et al., 2018).

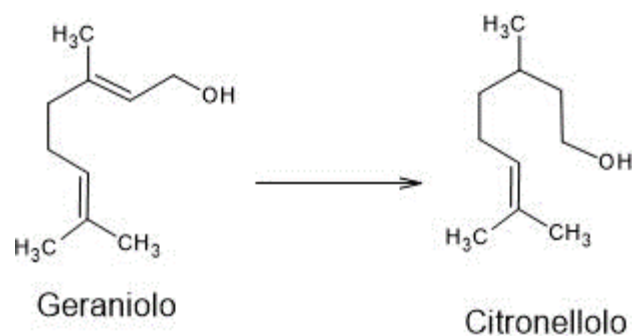


Figura 4.4 Riduzione del geraniolo a citronellolo

La capacità di ridurre il geraniolo a citronellolo non è tipica solamente della specie *Saccharomyces*, ma è stata riscontrata anche in altri lieviti come *Brettanomyces*, in particolare i ceppi con la più bassa attività  $\beta$ -glucosidasi mostravano le più alte concentrazioni di  $\beta$ -citronellolo (liberati fino a 31,5  $\mu\text{g/L}$ ) (Svedlund et al., 2022).

### Esterificazione

Il contenuto di terpeni nelle bevande fermentate è influenzato anche da reazioni di acetilazione per la produzione di esteri acetati.

*Saccharomyces* è in grado di acetilare alcoli monoterpenici attraverso l'enzima acetiltransferasi codificato dal gene ATF1. Tra le molecole che si possono formare le più importanti sono citronellil-acetato e il geranil-acetato. Queste reazioni producono molecole con una più elevata soglia di percezione poiché la molecola viene resa più pesante e quindi meno volatile (Klimczak e Cioch-Skoneczny, 2022).

Queste reazioni in sono reversibili, uno studio ha dimostrato che in varietà Cascade, Hallertau Blanc e Polaris, tutte contenenti alte concentrazioni di acetato di geranile, producano birre con un basso livello di questo aroma ma un alto livello di geraniolo. Questo suggerisce che sia avvenuta l'idrolisi dell'acetato di geranile a favore della formazione di geraniolo (Svedlund et al., 2021).

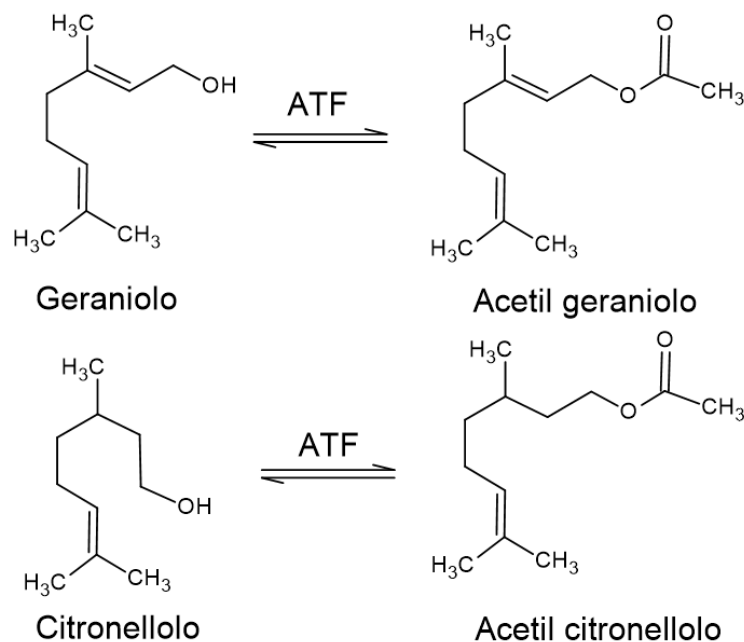


Figura 4.5 Reazioni reversibili di acetilazione

Il potenziale impatto di lieviti non convenzionali sui livelli di esteri acetati dei terpeni non è chiaro. Solo in uno studio, che ha coinvolto *Williopsis saturnus*, è stata rilevata la produzione di acetato di geranile da un mosto luppolato. Questo composto non è stato osservato nel lievito ale di riferimento (Svedlund et al., 2021).

### Altre reazioni

I terpenoidi possono subire altre reazioni ancora poco conosciute e studiate, in alcuni studi è stato osservato un aumento geraniolo a discapito del nerolo, questo è dato probabilmente da reazioni di isomerizzazione.

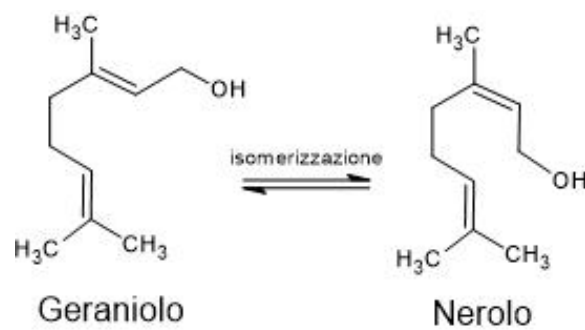


Figura 4.6 Reazione di isomerizzazione del geraniolo a nerolo

In altri studi si è ipotizzata la reazione di ciclizzazione del linalolo in  $\alpha$ -terpineolo (Buiatti et al., 2023).

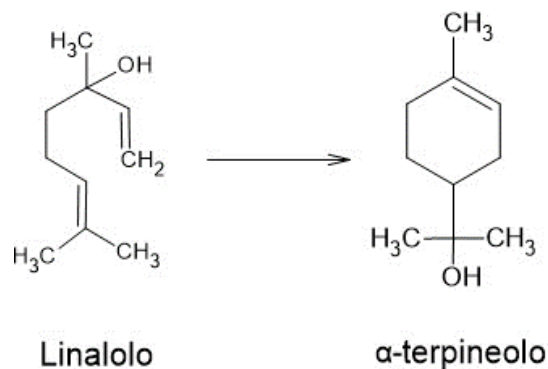


Figura 4.7 Chiusura dell'anello per la formazione di  $\alpha$ -terpineolo

Ad oggi non si conosce con certezza come queste reazioni di bioconversione degli agliconi possano influire sulle caratteristiche organolettiche delle birre.

## 4.2 Biotrasformazione dei tioli

Le principali reazioni di biotrasformazione che coinvolgono i tioli polifunzionali sono la liberazione dei precursori legati a cisteina o glutatione e le reazioni di acetilazione.

### 4.2.1 Rilascio dei precursori

A differenza dell'uva, in cui i tioli liberi sono a malapena rilevabili mentre quelli legati hanno concentrazioni nell'ordine dei mg/L, il luppolo contiene quantità di tioli liberi sopra la soglia di percezione. Il luppolo, in realtà, contiene anche i loro precursori, ad esempio nella varietà Cascade sono state misurate concentrazioni di 6,5 mg/kg di precursore di 3MH, concentrazioni 1000 volte superiori alle concentrazioni di 3MH libero (Buiatti et al., 2023). Ciò significa che questi coni contengono un evidente potenziale aromatico che può essere liberato attraverso l'azione di enzimi del lievito.

L'enzima deputato al rilascio di queste molecole aromatiche è la  $\beta$ -liasi (o C-S liasi). Esistono diversi geni che codificano per la carbonio-zolfo  $\beta$ -liasi, essi sono BNA3, Cys3, Cys4, GLO1, IRC7, STR3 e MET17. Il gene IRC7 è il principale gene che codifica per  $\beta$ -liasi in grado di liberare precursori tiolici (Tofalo et al., 2020). Inoltre, anche la  $\beta$ -liasi codificata dal gene STR3 si è visto essere in grado di rilasciare 3MH e 4MMP legati alla cisteina (Svedlund et al., 2021). Gli altri geni come MET17, Cys3 e Cys4, codificano per C-S liasi che intervengono nella via di biosintesi degli aminoacidi solforati (Tofalo et al., 2020).

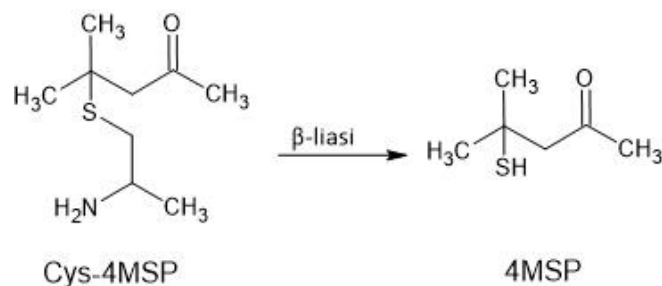


Figura 4.8 Reazione di liberazione del 4MSP dal suo precursore cisteilinati grazie alla  $\beta$ -liasi

L'espressione genica di IRC7 è legata al processo di repressione dell'azoto; in presenza di fonti di azoto, come l'ammonio, IRC7 viene represso. Questo aspetto evidenzia l'importanza di un'adeguata strategia nutrizionale per massimizzare la conversione dei precursori aromatici. Sono stati identificati dei ceppi di *Saccharomyces* portatori di

mutazioni eterozigoti a livello dei geni che modificano l'attività trascrizionale di IRC7, questo permette un aumento del rilascio di tioli. Alcuni ceppi fanno parte del sottogruppo "United Kingdom" del clade "Ale beer"/"Beer 1" (Svedlund et al., 2021).

In realtà la maggior parte dei ceppi di lievito esistenti ha una capacità limitata di rilasciare tioli polifunzionali a causa di una delezione di 38 bp nel gene IRC7.

Solo una piccola percentuale dei precursori tiolici presenti nel mosto viene convertita in tioli volatili attivi sul piano aromatico.

Nel vino sono state registrati tassi di conversione inferiori all'1% mentre nella birra del (0,1-0,5%) è stata osservata nel mosto di birra (Svedlund et al. 2021). Un altro lavoro suggerisce che solo l'8% dei precursori di Glut-3MH e Cys-3MH presenti durante la fermentazione viene convertito in 3MH nella birra finita (Molitor et al., 2022).

Oltre alle mutazioni e alla delezione di 38 bp in IRC7, la scarsa attività della  $\beta$ -liasi può essere determinata dall'ambiente acido e dall'inibizione da parte dei polifenoli (Buiatti et al., 2023).

L'incapacità dei lieviti di birra di catalizzare un'efficiente biotrasformazione si traduce in una perdita significativa del potenziale di produzione dell'aroma di frutta tropicale, poiché la maggior parte dei precursori tiolici presenti durante la fermentazione rimane nella forma di precursore inattivo nella birra finita (Molitor et al., 2022).

Poiché l'attività della  $\beta$ -liasi si svolge all'interno della cellula, i precursori aromatici devono essere trasportati. Ciò significa che l'attività di liberazione dei composti aromatici dipende anche dai trasportatori. È stato identificato il trasportatore di oligopeptidi codificato dal gene OPT1 come il principale responsabile del trasporto di 3MH e 4MMP glutationilati. Il trasporto dei precursori cisteinilati non è altrettanto ben definito. Un lavoro preliminare ha suggerito il coinvolgimento di una permeasi generale degli aminoacidi codificata dal gene GAP1, ma non è stato osservato alcun cambiamento nel rilascio di tiolo dai precursori cisteinilati quando sono stati silenziati i geni che codificano per permeasi note per il trasporto di cisteina (tra cui GAP1) (Svedlund et al., 2021).

Recentemente è stato dimostrato che la temperatura durante la fermentazione della birra influenza il rilascio di vari tioli dai loro precursori coniugati. Più precisamente è stato registrato il rilascio di 3MH e 3MP più elevato a 18-24 °C e di 3S4MP a 28 °C (Buiatti et al., 2023). Tuttavia, le condizioni ottimali di processo per aumentare il tasso di conversione dei precursori in tioli liberi devono ancora essere determinate.

#### **4.2.2 Acetilazione**

Le bevande fermentate, come il vino e la birra, sono note per contenere forme acetilate dei tioli polifunzionali, tra queste, l'acetato di 3-mercaptoesile (3MHA, forma acetilata del 3MH) è quella che ha ricevuto più attenzione per il suo contributo all'aroma. Il 3MHA ricorda il frutto della passione ed è sensibilmente evidente a livelli estremamente bassi nella birra (4 ng/L). La sua presenza, inoltre, può accentuare la percezione di altri tioli polifunzionali come il 4MMP, ha quindi effetto sinergico (Svedlund et al., 2021).

Il 3MHA non si ritiene sia comunemente presente in forma legata nel luppolo, sebbene sia stato rilevato in alcune uve legato al glutatione. Le prove disponibili suggeriscono che questo composto venga formato attraverso l'esterificazione del 3MH da parte del lievito durante la fermentazione. L'esterificazione è dovuta principalmente all'attività dell'enzima alcol acetiltransferasi, codificato dal gene ATF1. Anche altri enzimi possono avere un ruolo, come dimostra il fatto che la delezione di ATF1 non impedisce completamente la reazione di formazione di tale molecola (Svedlund et al., 2021).

## CONCLUSIONI

Il luppolo è ricco di oli essenziali volatili in grado di conferire proprietà aromatiche alla birra. Allo stesso tempo contiene elevate quantità di questi composti aromatici sottoforma di precursori inodori. Si possono distinguere due gruppi di precursori: terpenoidi o norisoprenoidi ( $\beta$ -damascenone) glicosilati oppure tioli polifunzionali legati a molecole contenenti azoto (cisteina e glutatione). I tioli, ad esempio, sono molecole con soglie di percezione molto basse (ng/L) e nel luppolo solo l'1% è in forma libera, ciò fa pensare che ci sia un grande potenziale aromatico non ancora sfruttato.

Come riportato nella prima parte dell'elaborato, le fasi di produzione della birra offrono condizioni uniche per il rilascio dei precursori aromatici. Durante la bollitura le elevate temperature e il pH basso (5,1-5,4 solitamente) possono favorire l'idrolisi dei precursori glicosilati. In questa fase, tuttavia, la maggior parte degli agliconi vengono persi perché volatilizzano a causa delle temperature elevate. La bollitura, quindi, non sembra favorire l'aumento degli agliconi. Per evitare un'eccessiva perdita si potrebbe pensare di aggiungere il luppolo negli ultimi minuti di bollitura oppure durante la fase di *whirlpool*. Ciononostante, è stato dimostrato che anche 5 minuti di bollitura portano ad una riduzione significativa del contenuto di agliconi (Kashimoto et al., 2005). Recentemente, tra i birrifici artigianali, è stata introdotta la tecnica del *dip hopping*, questo processo di luppolatura consiste nel trasferire una porzione di mosto durante la bollitura nel fermentatore in cui è stato messo del luppolo. Grazie a questo nuovo processo di luppolatura viene persa una percentuale minore di aromi volatili rispetto all'aggiunta di luppolo nelle fasi precedenti, inoltre data la temperatura del mosto si presume una liberazione dei precursori. Ad oggi non ci sono ancora studi e dati certi riguardo questa tecnica, anche se i pareri dei birrai sul metodo del *dip hopping* essere positivi.

Non sempre il rilascio di aromi dal luppolo viene considerato positivo. Infatti, l'invecchiamento della birra può favorire la liberazione degli agliconi date le condizioni acide del prodotto (3.9-4.8). In particolare, viene favorito il rilascio di  $\beta$ -damascenone. Questo norisoprenoide volatile in realtà non è voluto nella birra poiché ricorda la marmellata, il tabacco e la mela cotta, descrittori tipici delle birre vecchie. È pensiero



comune che le birre caratterizzate da importanti luppolature non beneficiano di lunghe maturazioni che potrebbero comportare la perdita delle molecole aromatiche più volatili. La fermentazione è il momento in cui avviene la maggiore liberazione dei composti aromatici poiché gli enzimi del lievito possono idrolizzare i legami dei precursori che non permettono la volatilizzazione. Possiamo quindi concludere che per favorire le reazioni di biotrasformazione è consigliabile aggiungere il luppolo durante la prima fase di fermentazione in cui il lievito è ancora attivo e i suoi enzimi possono svolgere questa attività.

Non tutti i lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* hanno la stessa influenza sul rilascio di composti aromatici legati.

Per quanto riguarda la liberazione di precursori glicosilati, tutti i ceppi di *Saccharomyces* possiedono l'enzima eso- $\beta$ -1,3-glucanasi codificato dal gene EXG1 che sembra essere il principale coinvolto nella liberazione degli agliconi in questa specie. Si tratta di un enzima deputato alla lisi della parete cellulare che ha un picco di attività durante i primi giorni di fermentazione, in letteratura tuttavia non ci sono ancora molte informazioni riguardo la sua attività nei confronti dei glicosidi nella birra. Altri enzimi in grado di liberare l'aglicone sono le  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasi,  $\alpha$ -L-rhamnosidasi e  $\beta$ -xilosidasi che staccano il residuo zuccherino terminale e poi le  $\beta$ -galattosidasi il residuo zuccherino legato direttamente al terpenoide.

In questo contesto risultano molto più interessanti i lieviti non-*Saccharomyces* che a differenza di *Saccharomyces* possiedono i geni che codificano per queste specifiche attività. I ceppi più studiati, nei quali è stata rilevata una maggiore attività, appartengono ai generi *Candida*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Metschnikowia* e *Torulaspota* e non sono ad oggi impiegati nella birrificazione per favorire il rilascio di molecole glicosilate. Da questo punto di vista il modo del vino sembra essere un passo avanti rispetto a quello della birra. Infatti, sono state sviluppate colture multistarter contenenti, oltre a *Saccharomyces*, altri lieviti con l'obiettivo di ottenere vini con caratteristiche aromatiche più gradevoli, tipiche e varietali.

Sicuramente nel settore della birra sono necessari ulteriori studi per lo sviluppo di nuovi starter commerciali non convenzionali in grado di sfruttare il potenziale non espresso del luppolo. Tuttavia, questa prospettiva implica nuovi e più complessi protocolli di

produzione. I birrai, perciò, dovranno essere adeguatamente formati riguarda l'uso di specie *non-Saccharomyces*, anche per evitare eventuali contaminazioni in birrificio.

Alcuni studi hanno identificato reazioni di biotrasformazione a carico delle molecole aromatiche liberate dal precursore, in particolare si tratta di reazioni di acetilazione (esterificazione), isomerizzazione, riduzione e altre azioni minori. Queste reazioni sono reversibili quindi non si può prevedere il loro risultato. Spesso vengono rilasciate nel mosto molecole con odori simili rispetto a quelle da cui derivano per cui ci si chiede se abbiano un effetto percepibile all'olfatto. Fa eccezione l'acetilazione del 3 mercapto esanolo (3MH). Questa molecola, infatti, ha una soglia di percezione di 4ng/L molto inferiore rispetto al suo precursore 3MH (55-60 ng/L) quindi una sua minor concentrazione può determinare note tropicali più spiccate nella birra.

La liberazione dei tioli polifunzionali volatili è determinata dall'azione dell'enzima  $\beta$ -liasi codificata dal gene IRC7. In questo caso è molto importante un'adeguata strategia nutrizionale poiché IRC7 viene represso in presenza di fonti azotate come l'ammonio. I ceppi di *Saccharomyces* utilizzati per la fermentazione della birra sono spesso soggetti ad una delezione di 38bp del gene IRC7 che inibisce la sua trascrizione. Per aumentare il tasso di liberazione dei precursori tiolici, fermo a pochi punti percentuali (1% in varietà Cascade), si potrebbe pensare di selezionare lieviti privi della delezione di 38bp, e di mutazioni che impediscono la trascrizione di questo gene, inoltre, dato che l'attività enzimatica si svolge all'interno della cellula, dovrebbero essere oggetto di selezione anche i trasportatori della membrana cellulare. In America sono stati rilasciati sul mercato dei lieviti definiti "*thiolized yeast*" per le loro capacità di liberare tioli dai loro precursori, si tratta di ceppi di lievito OGM che non possono essere usati in Europa.

Gli stili birrai riconosciuti sono molti e tanti altri devono ancora essere codificati, tra quelli emergenti sono interessanti le birre in stile IGA (Italian Grape Ale). Per la produzione di queste birre il mosto viene fermentato con la presenza di d'uva, questo apre scenari interessanti riguardo le interazioni tra i precursori presenti nell'uva e le condizioni di produzione della birra. Non a caso da pochi mesi è disponibile in commercio il prodotto Phantasm® contenente bucce di uve Sauvignon blanc australiano ricche di precursori tiolici.

In conclusione, purtroppo, ci sono ancora pochi studi in merito all'effetto dei lieviti sugli aromi varietali, molti dei quali hanno ottenuto risultati contraddittori. Infatti, il contenuto di precursori aromatici nel luppolo dipende dalla varietà, da diversi fattori di campo (esposizione, del terreno, operazioni colturali, annata, clima), dal momento di aggiunta del luppolo, dalla scelta del ceppo di lievito (*Saccharomyces* o *non-Saccharomyces*) e dalle condizioni di fermentazione. Queste limitazioni, ad oggi, non permettono di sfruttare a pieno le potenzialità aromatiche del luppolo.

## BIBLIOGRAFIA

Assobirra (2022) Annual Report 2022

Bamforth, C. (2003) Beer: Tap into the art and science of brewing. (2nd ed.) Oxford: Oxford University Press, pp 118-120

BarthHaas (2022) BarthHaas General Report 2022

Adams, D.J. (2004) 'Fungal cell wall chitinases and glucanases', *Microbiology*, 150(7), pp. 2029–2035. doi:10.1099/mic.0.26980-0.

Bonnaffoux, H. *et al.* (2021) 'Spotlight on release mechanisms of volatile thiols in beverages', *Food Chemistry*, 339, p. 127628. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127628.

Buiatti, S. *et al.* (2023) 'Biotransformations performed by yeasts on aromatic compounds provided by hop—a review', *Fermentation*, 9(4), p. 327. doi:10.3390/fermentation9040327.

Briggs, D.E. *et al.* (2004) 'The chemistry of hop constituents', in *Brewing: Science and practice*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, pp. 270–320.

Caffrey, A. and Ebeler, S.E. (2021) 'The occurrence of glycosylated aroma precursors in *Vitis vinifera* fruit and *humulus lupulus* hop cones and their roles in wine and beer volatile Aroma Production', *Foods*, 10(5), p. 935. doi:10.3390/foods10050935.

Chenot, C. *et al.* (2021) 'Modulation of the sulfanylalkyl acetate/alcohol ratio and free thiol release from cysteinylated and/or glutathionylated sulfanylalkyl alcohols in beer under different fermentation conditions', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(21), pp. 6005–6012. doi:10.1021/acs.jafc.1c01610.

Chevance, F. *et al.* (2002) 'Investigation of the  $\beta$ -damascenone level in fresh and aged commercial beers', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), pp. 3818–3821. doi:10.1021/jf020085i.

Gresser, A. (2014). Il Manuale del Birraio Pratico: Teoria e Pratica della preparazione del Malto Fabricazione della Birra (2nd ed.). *Fachverlag Hans Carl*, pp.80-85

Gros, J., Peeters, F. and Collin, S. (2012) 'Occurrence of odorant polyfunctional thiols in beers hopped with different cultivars. First evidence of an s-cysteine conjugate in Hop (*humulus lupulus* l.)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), pp. 7805–7816. doi:10.1021/jf301478m.

HGA (2022) Hop Growers of America statistical report

- Holt, S. *et al.* (2018) ‘The molecular biology of Fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages’, *FEMS Microbiology Reviews*, 43(3), pp. 193–222. doi:10.1093/femsre/fuy041.
- Kishimoto, T. *et al.* (2005) ‘Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar–sorptive extraction method with GC-MS’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), pp. 4701–4707. doi:10.1021/jf050072f.
- Klimczak, K. and Cioch-Skoneczny, M. (2022) ‘Biotransformation of hops-derived compounds in beer – a review’, *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 26(1), pp. 1–18. doi:10.2478/aucft-2022-0001.
- Lafontaine, S. *et al.* (2021) ‘Evaluation of variety, maturity, and farm on the concentrations of monoterpene Diglycosides and hop volatile/nonvolatile composition in five *humulus lupulus* cultivars’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(15), pp. 4356–4370. doi:10.1021/acs.jafc.0c07146.
- Licciardo, F. and Carbone, K. (2023) ‘Come sta la brassicoltura italiana? Stato attuale e prospettive di sviluppo.’, *Birra Nostra Magazine*, February, pp. 25–29.
- Mateo, J. and Maicas, S. (2016) ‘Application of non-saccharomyces yeasts to wine-making process’, *Fermentation*, 2(4), p. 14. doi:10.3390/fermentation2030014.
- Molitor, R.W. *et al.* (2022) ‘The sensorial and chemical changes in beer brewed with yeast genetically modified to release polyfunctional thiols from Malt and hops’, *Fermentation*, 8(8), p. 370. doi:10.3390/fermentation8080370.
- Sakamoto, K. and Konings, W.N. (2003) ‘Beer spoilage bacteria and hop resistance’, *International Journal of Food Microbiology*, 89(2–3), pp. 105–124. doi:10.1016/s0168-1605(03)00153-3.
- Sharpe, F.R. and Laws, D.R. (1981) ‘The Essential Oil of hops a review’, *Journal of the Institute of Brewing*, 87(2), pp. 96–107. doi:10.1002/j.2050-0416.1981.tb03996.x.
- Stevens, R. (1967) ‘The chemistry of Hop Constituents’, *Chemical Reviews*, 67(1), pp. 19–71. doi:10.1021/cr60245a002.
- Tofalo, R. *et al.* (2020) ‘Correlation between IRC7 gene expression and 4-mercapto-4-Methylpentan-2-one production in *saccharomyces cerevisiae* strains’, *Yeast*, 37(9–10), pp. 487–495. doi:10.1002/yea.3468.