

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

**IL LUPPOLO NELLA BIRRA:
COMPOSIZIONE E PROPRIETÀ**

Relatore: Prof. Elisabetta Schievano

Laureando: Luca Vaccarin

1217913

Anno accademico 2021/2022

Indice

1. INTRODUZIONE.....	3
2. COMPOSIZIONE CHIMICA DEL LUPPOLO	4
2.1. Resina.....	4
2.2. Oli essenziali.....	6
2.3. Polifenoli.....	8
3. PROPRIETÀ ORGANOLETTICHE DEL LUPPOLO.....	9
3.1. Luppolo da aroma e luppolo da amaro	9
3.2. Isomerizzazione degli acidi	9
3.3. Oli essenziali ed aromi.....	11
4. ALTRE PROPRIETÀ DEL LUPPOLO	13
4.1. Potere batteriostatico	13
4.2. Antiossidanti	14
4.3. Schiuma.....	14
5. METODI DI IMPIEGO DEL LUPPOLO	15
5.1. Polvere/pellet.....	15
5.2. Pellet arricchiti.....	15
5.3. Pellet speciali	15
5.4. Estratti di luppolo	16
5.5. Oli di luppolo.....	17
6. LIGHTSTRUCK: IL COLPO DI LUCE.....	18
7. ANALISI DEGLI OLI ESSENZIALI E IDENTIFICAZIONE DELLA VARIETÀ DI LUPPOLO.....	20
7.1. Metodi di analisi comuni	20
7.2. Analisi con SPME-GC-MS	21
7.3. Miglioramento della gas-cromatografia	21
8. BIBLIOGRAFIA.....	23

1. INTRODUZIONE

La birra è, per definizione, una bevanda ottenuta tramite la fermentazione alcolica del malto d'orzo o di altri cereali, aromatizzata con il luppolo.

Il luppolo (*Humulus lupulus*) è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Cannabaceae ¹. È una pianta dioica, per cui si hanno piante maschili e femminili, ma quasi esclusivamente quest'ultime trovano un impiego pratico. Le infiorescenze femminili vengono dette "strobili" (o coni del luppolo) e sono molto importanti perché al loro interno contengono la luppolina: una polvere resinosa di colore giallo composta da molte sostanze con proprietà amaricanti e aromatizzanti. Proprio per queste sue caratteristiche, circa il 97% del luppolo coltivato nel mondo viene destinato alla produzione di birra. Oltre che per le sue qualità organolettiche, il luppolo viene utilizzato nella birra per il suo potere batteriostatico e antimicrobico e per la capacità di favorire la stabilità della schiuma.

Esistono molte varietà di luppolo e la regione di provenienza ne caratterizza sensibilmente il profilo aromatico; quindi, è compito del birraio selezionare quello adatto in base agli aromi e al potere amaricante che vuole introdurre nella birra ². Il luppolo viene commercializzato in forme differenti: i fiori essiccati, i pellet (coni polverizzati e pressati) e gli estratti (concentrati ottenuti tramite CO₂). Nel processo produttivo, il luppolo può essere utilizzato in momenti diversi per esaltarne le qualità amaricanti o quelle aromatiche.

2. COMPOSIZIONE CHIMICA DEL LUPPOLO

Il cono del luppolo è formato da varie componenti: resine, oli essenziali, proteine, polifenoli, lipidi, cere, cellulosa e aminoacidi (Tab.1). Proteine, carboidrati e polifenoli derivano dai petali del luppolo che hanno una natura erbacea, ma le componenti di maggior interesse che hanno un valore utile per la produzione della birra si trovano soprattutto nella luppolina, la quale viene secreta dalle ghiandole resinose (Fig.1).

Componente	Quantità (%)
Resine totali	15-30
Oli essenziali	0.5-3
Proteine	15
Monosaccaridi	2
Polifenoli	4
Pectine	2
Aminoacidi	0.1
Cere e steroidi	tracce-25
Ceneri	8
Umidità	10
Cellulosa	43

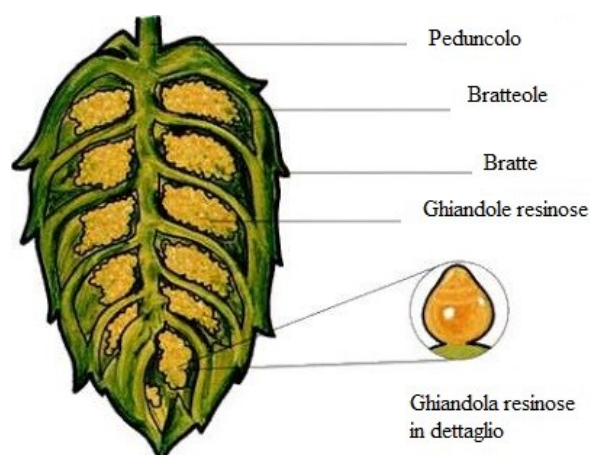


Fig.1 - Struttura di un cono del luppolo

Tab.1 - Composizione media dei coni di luppolo essiccati¹

2.1. Resina

La resina è uno dei costituenti principali della luppolina e rappresenta tra il 15 e il 30% del peso totale del cono essiccato (Fig.2). È definita come la parte del luppolo che viene solubilizzata da etere dietilico e metanolo freddo. Le resine totali possono essere suddivise in due sottocategorie: le resine soft (solubili in esano) e le resine hard (insolubili in esano).

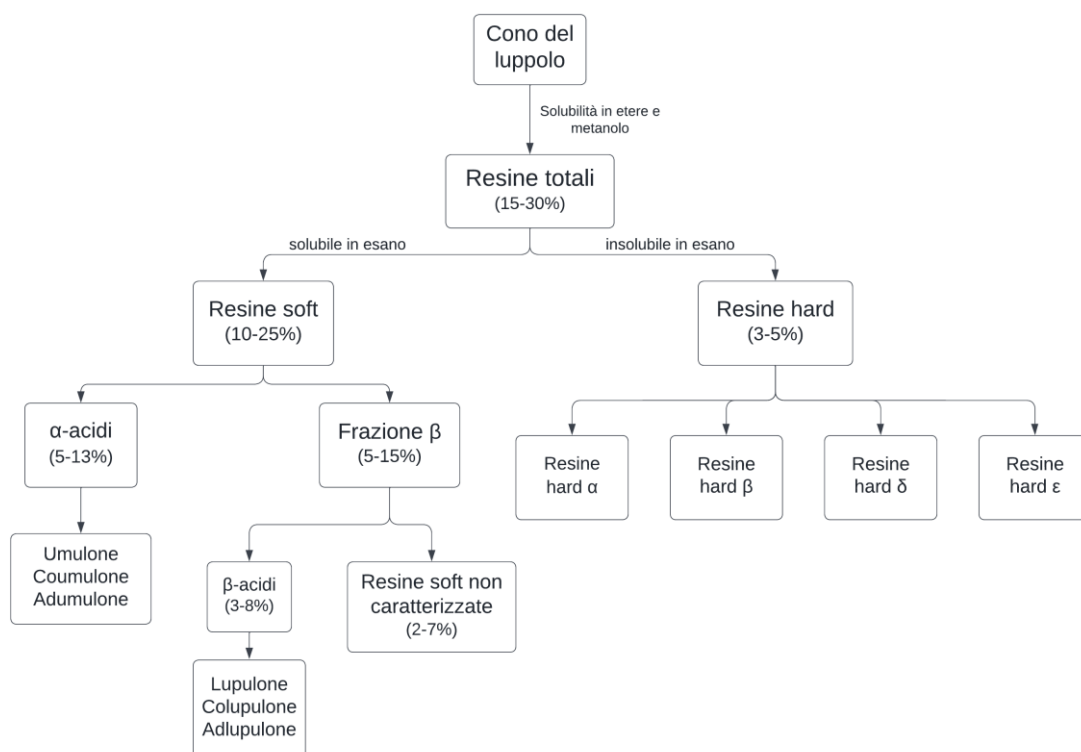


Fig.2 – Schema composizione resine

Le resine soft (10-25% del cono essiccato) sono quelle in cui risiede il potenziale maggiore per gli scopi di un birraio. I composti più importanti presenti nelle resine soft sono gli α -acidi (umulone, coumulone e adumulone) e i β -acidi (lupulone, colupulone e adlupulone) che sono i precursori dei principali composti amaricanti presenti nella birra (Fig.3).

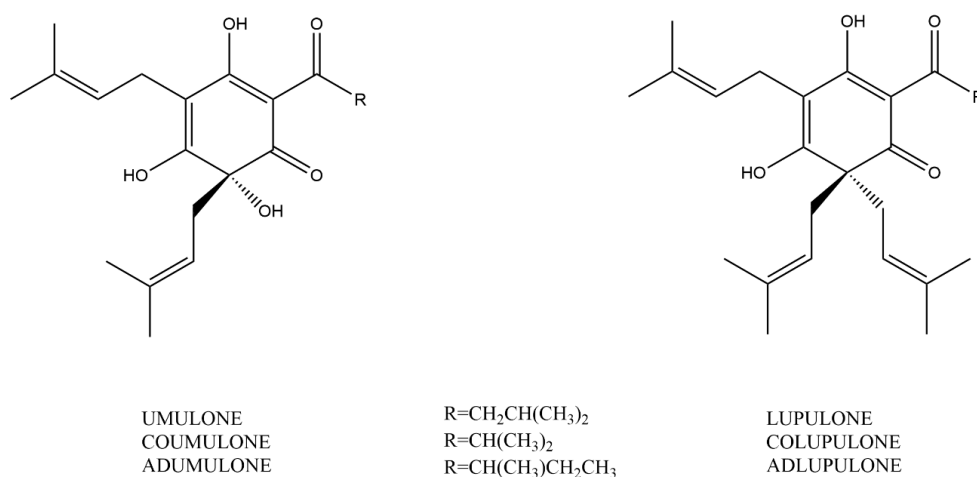


Fig.3 – Struttura α -acidi e β -acidi

La composizione chimica delle resine hard (3-5% del cono essiccato) non è molto conosciuta ma si suppone che i suoi componenti derivino dall'ossidazione delle resine soft. Le resine hard sono anch'esse divise in più categorie (α , β , δ , ϵ) in base alla loro solubilità in vari solventi e alla capacità di formare sali di piombo insolubili per reazione con acetato di piombo. Il composto più importante nelle resine hard è lo xantumolo (Fig.4).

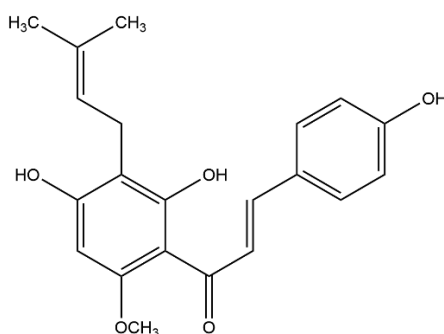


Fig.4 - Struttura dello xantumolo

2.2.Oli essenziali

Gli oli essenziali contenuti nel luppolo sono la frazione volatile delle sostanze presenti nel cono. Il luppolo essiccato contiene dallo 0.5 al 3% di oli essenziali la cui quantità e composizione dipende dalla varietà, dalla regione e dalle condizioni in cui viene coltivato. Gli oli essenziali sono l'insieme delle sostanze che forniscono alla birra l'aroma distintivo del luppolo. Quest'ultimo non può essere attribuito a molecole specifiche in quanto la composizione degli oli è molto complessa, infatti, sono state identificate 485 sostanze diverse in letteratura e alcuni studi recenti ipotizzano che possano essere presenti più di 1000 composti ³.

Gli oli essenziali vengono distinti in tre categorie principali (Fig.6):

- idrocarburi;
- composti ossigenati;
- composti solforati.

Gli idrocarburi presenti tra gli oli essenziali sono: idrocarburi alifatici, monoterpene e sesquiterpene. Il monoterpene più presente è il β -mircene, che costituisce da solo tra il 30 e il 60% degli oli, mentre tra i sesquiterpene troviamo in maggior quantità α -umulene, β -cariofillene e β -farnesene (Fig.5).

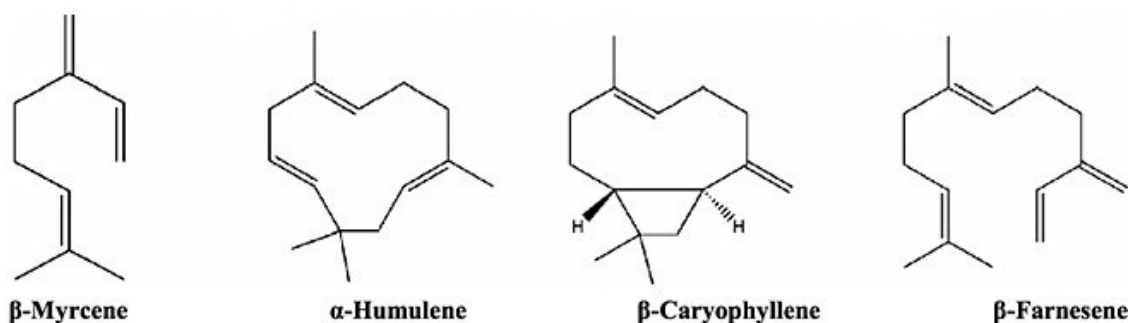


Fig.5 - Struttura degli oli essenziali principali

I composti ossigenati costituiscono circa il 30% di tutti gli oli essenziali ed è la categoria che contiene una maggior quantità di sostanze diverse poiché racchiude tutti i tipi di alcoli, aldeidi, acidi, chetoni, epossidi ed esteri. Questa frazione tende ad aumentare all'invecchiare dei luppoli perché molti dei composti derivano dall'ossidazione di altre molecole.

I composti solforati sono presenti in piccole quantità tra gli oli essenziali ma, data la loro bassa soglia di percezione, è necessario prenderli in considerazione in quanto possono influenzare sensibilmente l'odore e il gusto di una birra. In generale, la presenza di composti contenenti zolfo è considerata un difetto perché causa degli *off-flavours* nel prodotto finito.

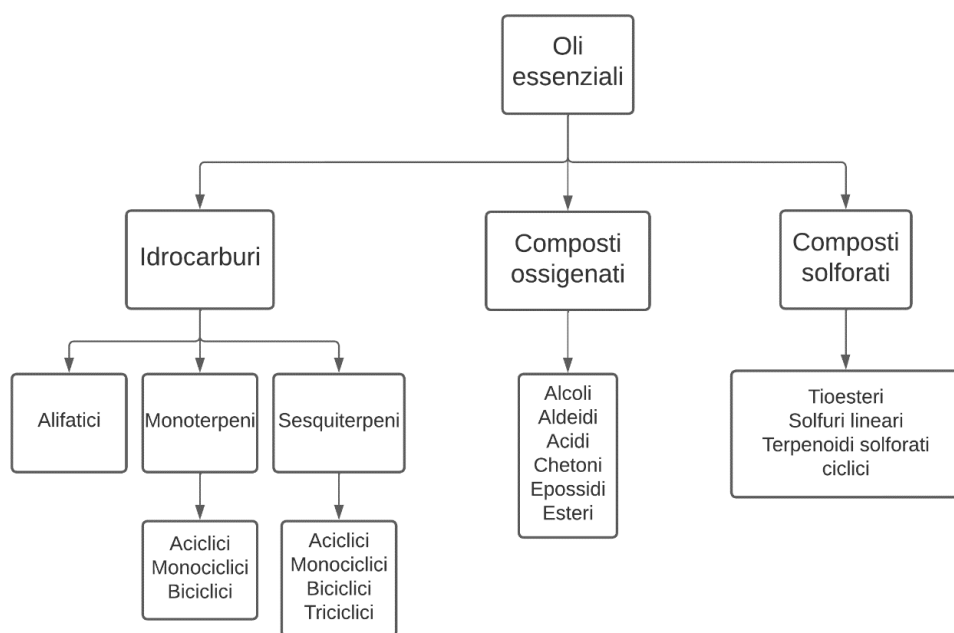


Fig.6 - Schema composizione oli essenziali

2.3. Polifenoli

Al contrario di resine e oli essenziali, i polifenoli si trovano soprattutto nelle bratteole e nel peduncolo. Questa classe di composti è piuttosto vasta ma la caratteristica comune è la presenza di un anello aromatico con almeno due gruppi ossidrilici. I polifenoli contenuti nel luppolo si dividono in: flavonoli, flavan-3-oli, acidi carbossilici fenolici e altri polifenoli come i prenilflavonoidi. I flavonoli e i flavan-3-oli sono composti che derivano dal flavone.

All'interno del mosto, i polifenoli derivanti dal luppolo sono circa il 20-30%, mentre gli altri derivano dal malto. La loro presenza è importante perché contribuiscono all'aroma della birra ed agiscono da antiossidanti inibendo reazioni di ossidazione che possono causare sapori sgradevoli.

3. PROPRIETÀ ORGANOLETTICHE DEL LUPPOLO

Il motivo principale per il quale il luppolo viene utilizzato dai birrai è la sua capacità di trasmettere alla birra vari aromi. Inoltre, è necessario a conferire il tipico gusto amaro che contrasta le note dolci derivanti dagli zuccheri residui non consumati dal lievito durante la fermentazione. Nella produzione della maggior parte delle birre, il luppolo viene utilizzato in varie fasi del processo produttivo in quanto le operazioni che si svolgono durante la lavorazione del mosto influiscono molto sulla presenza di determinati composti e sulle reazioni che questi possono subire.

3.1. Luppolo da aroma e luppolo da amaro

Si può fare una distinzione generale tra luppolo da aroma e luppolo da amaro: nel primo caso il luppolo viene utilizzato con lo scopo di fornire alla birra il tipico aroma "luppolato" che viene spesso descritto come erbaceo, fruttato o floreale in base alla tipologia che viene utilizzata. Nel secondo caso, invece, il luppolo viene utilizzato con lo scopo di sprigionare il più possibile il potere amaricante che possiede. La distinzione tra queste due categorie non è così netta perché la differenza deriva, oltre che dalle caratteristiche della specie, anche dal momento in cui il luppolo entra a contatto con il mosto durante la produzione della birra e, di conseguenza, dal tempo per il quale viene sottoposto ad alte temperature in fase di bollitura.

3.2. Isomerizzazione degli acidi

Nonostante la composizione chimica di una birra sia molto complessa, è stato scoperto che il gusto amaro proviene per lo più da alcuni precursori di composti amaricanti presenti nel luppolo⁴. Queste sostanze vengono chiamate α -acidi e β -acidi. Gli α -acidi sono i principali responsabili dell'amaricatura grazie alla trasformazione che subiscono durante la fase di bollitura (Fig.7), mentre i β -acidi, sebbene vengano sottoposti anch'essi a reazioni di isomerizzazione, non sono altrettanto decisivi nel contributo amaricante perché sono presenti in quantità minore rispetto agli α -acidi ed hanno una solubilità minore nel mosto⁵. Strutturalmente, queste due classi di composti si differenziano tra loro per un sostituente dell'anello legato al carbonio C6.

Gli α -acidi comprendono umulone, coumulone e adumulone mentre i β -acidi sono costituiti da lupulone, colupulone e adlupulone (Fig.3). In ognuna delle due categorie, le tre molecole differiscono tra loro per la struttura della catena laterale R. Gli α -acidi non possiedono proprietà amaricanti, ma durante il processo di

bollitura del mosto subiscono una reazione di isomerizzazione per trasformarsi in iso- α -acidi.

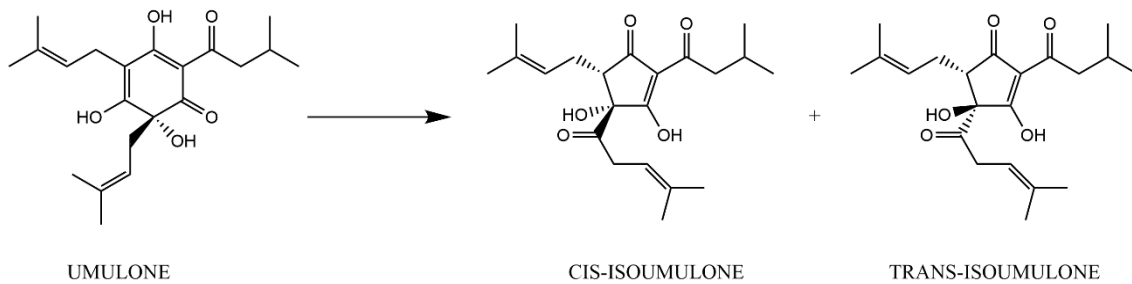


Fig.7 – Reazione di isomerizzazione dell'umulone

La reazione consiste in una contrazione dell'anello con conseguente produzione di due stereoisomeri cis e trans per ognuno dei tre acidi di partenza. Ciò comporta che in soluzione siano presenti sei diversi composti che contribuiscono all'amaricatura della birra. La cinetica del processo di conversione dipende molto dalla temperatura, ma l'isomerizzazione non è l'unica reazione che avviene⁶. Infatti, studiando l'andamento delle concentrazioni delle molecole in soluzione, si nota che la comparsa di iso- α -acidi non avviene in rapporto 1:1 con la perdita di α -acidi perché gli iso- α -acidi subiscono un processo di degradazione trasformandosi in prodotti secondari.

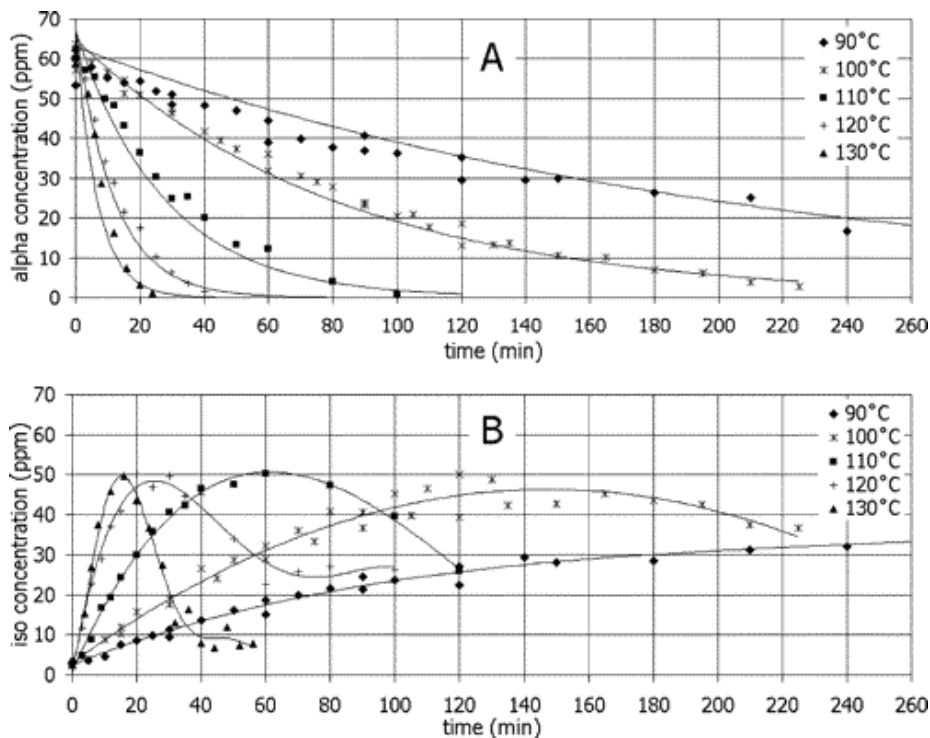


Fig.8 – Andamento della concentrazione di α -acidi e iso- α -acidi nel tempo⁶

Entrambe le reazioni seguono una cinetica del primo ordine. Di conseguenza, la concentrazione di iso- α -acidi durante la bollitura tende ad aumentare in un primo momento (la concentrazione di α -acidi è elevata) fino al raggiungimento di un massimo, per poi calare nel momento in cui la velocità della degradazione supera quella dell'isomerizzazione (Fig.9). Per questo motivo, in fase di produzione, la bollitura del mosto dev'essere mantenuta per un tempo adeguato in modo da ottenere il grado di conversione desiderato. L'isomerizzazione degli α -acidi è influenzata anche dal pH, dalla densità del mosto e dall'eventuale presenza di metalli catalizzatori⁷.

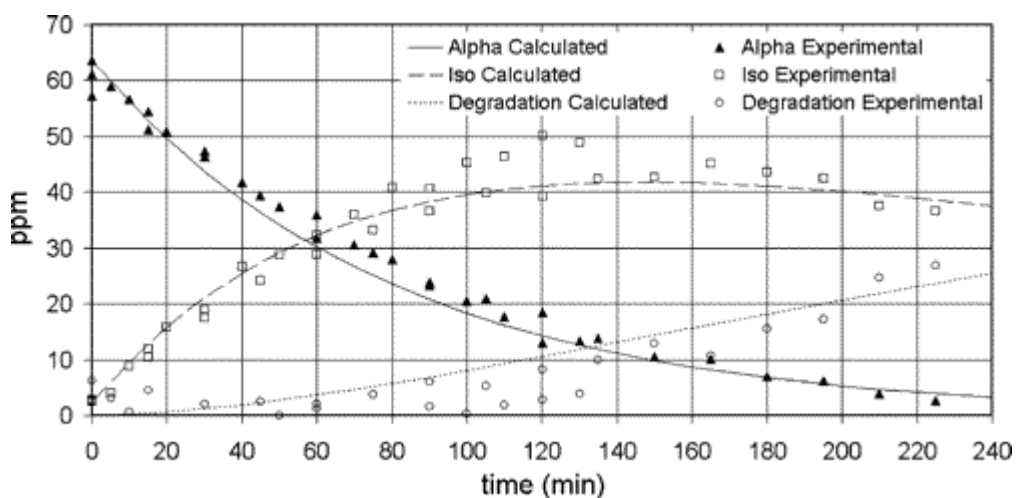


Fig.9 - Andamento della concentrazione di α -acidi e iso- α -acidi a 100°C⁶

Per quantificare il grado di amaro in una birra si utilizzano le IBU, *International Bitterness Units*. Una IBU corrisponde ad una concentrazione di 1 ppm di isoumulone. Per misurare la quantità di iso- α -acidi si possono usare varie tecniche analitiche: HPLC, elettroforesi capillare, NMR, spettroscopia di fluorescenza e misure di assorbanza UV.

3.3. Oli essenziali ed aromi

Un altro motivo molto importante per cui il luppolo viene utilizzato per la produzione della birra è la sua capacità di rilasciare tipi diversi di aromi grazie agli oli essenziali che si trovano al suo interno. Il profilo aromatico di un certo tipo di luppolo è molto complesso perché viene generato da centinaia di composti diversi che hanno varie soglie di percezione e differente volatilità; inoltre, queste molecole interagiscono fra loro rafforzandosi o mascherandosi rendendo così più complicata la valutazione degli aromi⁸.

L'aroma luppolato nella birra si nota più facilmente quando si utilizzano le tecniche late-hopping e dry-hopping. Il late-hopping consiste nell'aggiungere il luppolo durante gli ultimi minuti di bollitura o all'inizio della fase di raffreddamento, mentre

nel dry-hopping, o luppolatura a freddo, il luppolo viene aggiunto durante la fermentazione del mosto, quando la temperatura è già quella ottimale per l'azione del lievito. Dato che la maggior parte dei composti aromatici presenti all'interno del luppolo sono piuttosto volatili, se vengono sottoposti a bollitura tendono ad evaporare, così come accade nel caso dei luppoli da amaro aggiunti ad inizio bollitura. Al contrario, se queste sostanze non sono esposte ad alte temperature (o lo sono solo per pochi minuti), vengono trattenute nel mosto manifestandosi nel prodotto finito.

In generale gli aromi del luppolo possono essere riassunti nel seguente modo: le aldeidi conferiscono un aroma erbaceo; esteri, nerolo e linalolo sono responsabili delle note agrumate; gli aromi floreali e fruttati derivano da linalolo, geraniolo, β -ionone, citronellolo, 4MMP, chetoni, epossidi ed esteri; i sesquiterpeni sono responsabili di essenze di erbe aromatiche⁸.

Molecola	Aroma
β -mircene	resinoso, legnoso, fruttato
α -umulene	erbaceo, legnoso, speziato
β -cariofillene	speziato, cedro, limone, floreale
β -farnesene	legnoso, agrumato, floreale
β -damascenone	miele, frutti rossi
β -ionone	lampone, viola
linalolo	lavanda, floreale
geraniolo	rosa, geranio, calendula
umulenolo	speziato, ananas

Tab.2 - Descrizione dell'aroma di alcuni oli essenziali

4. ALTRE PROPRIETÀ DEL LUPPOLO

Il luppolo trova largo impiego nella birra grazie al valore aggiunto che porta dal punto di vista del gusto e dei profumi ma è in grado di conferire alla birra altre proprietà di grande interesse.

4.1. Potere batteriostatico

Uno dei passaggi fondamentali nella produzione della birra è la fermentazione, che permette al lievito selezionato dal birraio di consumare gli zuccheri presenti nel mosto trasformandoli in alcol etilico. Il mosto, tuttavia, essendo molto ricco di zuccheri, rappresenta un ottimo terreno di coltura per un gran numero di batteri. La contaminazione microbiologica da parte di microorganismi indesiderati va assolutamente evitata perché può far comparire dei difetti che rovinano irreparabilmente la birra, come ad esempio lo sviluppo di composti aromatici sgradevoli o l'eccessiva torbidità.

Gli α -acidi, i β -acidi e gli iso- α -acidi giocano un ruolo fondamentale nella prevenzione di contaminazioni da parte di batteri Gram-positivi, mentre sono quasi totalmente inattivi nei confronti dei batteri Gram-negativi che impediscono il passaggio di sostanze non polari all'interno della loro membrana ⁹.

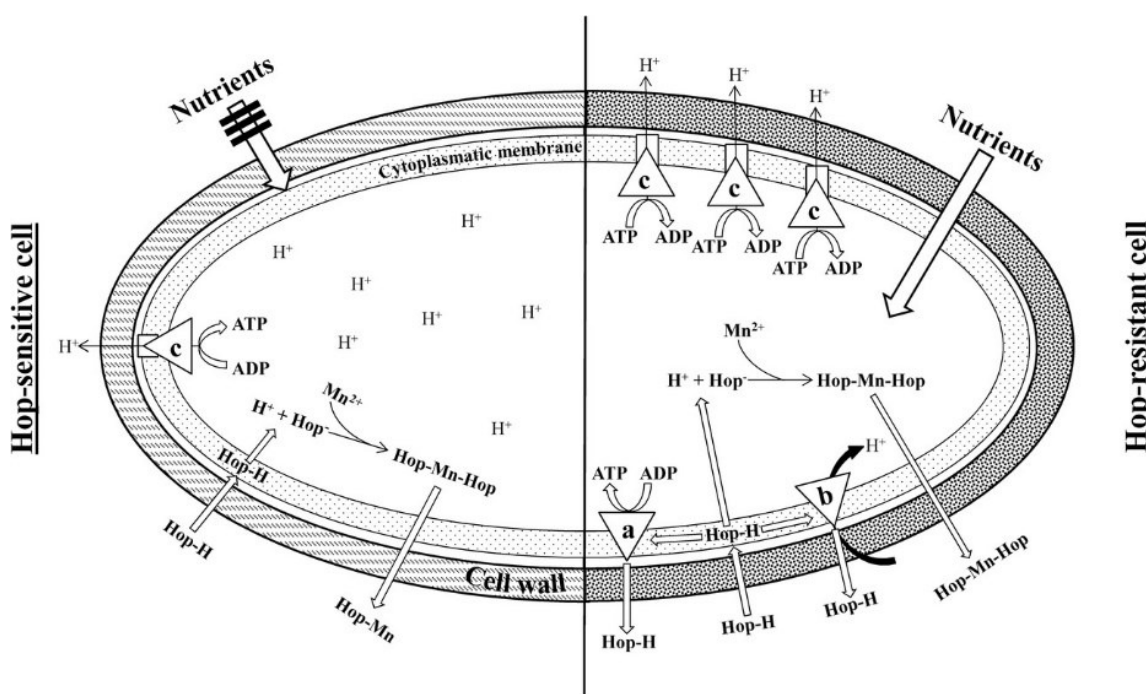


Fig.10 - Meccanismo dell'effetto antimicrobico e resistenze delle cellule agli α -acidi ⁹

Il potere antibatterico degli acidi deriva dalla loro capacità di penetrare le membrane dei batteri come molecole indissociate e di scambiare protoni con cationi

divalenti all'interno del citoplasma. L'accumulo di protoni all'interno della cellula batterica non permette l'assimilazione di nutrienti e ne provoca la morte (Fig.10).

Anche i polifenoli esercitano un'azione antimicrobica contro batteri e funghi grazie al loro carattere idrofobico che gli permette di interagire con la membrana cellulare e di accumularsi all'interno delle cellule ⁹.

4.2. Antiossidanti

Gli antiossidanti di origine vegetale sono una componente importante dell'alimentazione perché hanno effetti positivi sulla salute dell'uomo in quanto riescono a neutralizzare specie ossidanti radicaliche che danneggiano il nostro organismo. I polifenoli sono i principali antiossidanti presenti nel luppolo e la loro importanza è data, oltre che dai loro effetti benefici, anche dalla capacità di aumentare la stabilità della birra nel tempo.

4.3. Schiuma

La formazione e la stabilità della schiuma nella birra sono influenzate dalla presenza di diverse sostanze:

- le proteine derivanti dal malto che formano un film che rinforza le pareti delle bolle;
- i cationi metallici che formano complessi con gli iso- α -acidi in grado di stabilizzare la schiuma;
- i polisaccaridi che inibiscono il trasferimento del liquido dalla schiuma alla birra.

Ogni iso- α -acido agisce in modo leggermente diverso in qualità di stabilizzatore in base alle proprietà superficiali che possiede. In genere, gli isomeri trans sono più presenti nella schiuma rispetto agli isomeri cis ⁸.

5. METODI DI IMPIEGO DEL LUPPOLO

L'utilizzo del fiore del luppolo tal quale per la produzione di birra è una tecnica quasi completamente abbandonata perché è poco efficace e la sua efficienza altalenante non permette di ottenere risultati costanti e riproducibili ¹⁰. Ciò deriva dal fatto che gli α -acidi vengono facilmente ossidati e gli oli essenziali vengono persi per evaporazione. Per questo motivo, sono stati sviluppati una serie di derivati del luppolo con lo scopo di rendere l'utilizzo di questo prodotto più semplice ed efficace.

5.1. Polvere/pellet

Il luppolo viene lavato, essiccato e macinato per ottenere una polvere. Polveri provenienti da luppoli diversi possono essere miscelate per ottenere prodotti con il contenuto di α -acidi desiderato e successivamente vengono pressate per ottenere dei pellet compatti. Se vengono conservati sottovuoto, i pellet si conservano meglio rispetto ai luppoli non lavorati e solitamente si ha un'estrazione degli α -acidi più efficiente perché le ghiandole del luppolo vengono rotte e le sostanze presenti nelle resine sono più disponibili.

5.2. Pellet arricchiti

I pellet comuni sono una fonte piuttosto diluita di acidi ed oli essenziali perché possono contenere ancora fino al 90% del materiale proveniente dal luppolo di partenza. Per aumentarne la concentrazione, il luppolo viene macinato a temperature inferiori a -35°C , alle quali la luppolina perde il suo carattere coloso e può essere separata dal materiale vegetale. In questo modo quasi tutta la luppolina presente nel luppolo di partenza verrà concentrata in circa il 50% del materiale vegetale iniziale.

5.3. Pellet speciali

Le polveri per i pellet possono essere addizionate di alcune sostanze o subire dei trattamenti per ottenere dei vantaggi che li rendano più utili nella produzione della birra ¹⁰:

- l'acido ascorbico può essere aggiunto in piccole quantità alle polveri di luppolo per aumentarne la stabilità all'aria grazie al suo potere antiossidante;

- la bentonite è un'argilla contenente cationi mono, di e trivalenti che aumenta l'utilizzo degli α -acidi favorendo l'isomerizzazione e la dispersione dei pellet nel mosto;
- sali di calcio e magnesio possono essere miscelati alla polvere di luppolo per ottenere una parziale isomerizzazione durante la formazione del pellet e lo stoccaggio;
- i pellet possono essere sottoposti ad un riscaldamento controllato per isomerizzare buona parte degli α -acidi.

5.4. Estratti di luppolo

L'utilizzo di estratti di luppolo ha il grande vantaggio di semplificare il processo di produzione della birra perché risolve il problema della filtrazione e chiarificazione del mosto che è necessario compiere dopo il contatto con il luppolo. L'obiettivo principale durante l'estrazione del luppolo è l'isolamento degli oli essenziali e degli α -acidi ma la composizione del prodotto finale dipende dalla tecnica usata per l'estrazione ¹¹. Gli estratti di luppolo possono essere successivamente purificati e isomerizzati per essere aggiunti alla birra direttamente dopo la bollitura contribuendo al contenuto di iso- α -acidi.

In passato la tecnica più utilizzata per ottenere gli oli essenziali era l'estrazione in corrente di vapore, mentre per estrarre gli acidi venivano utilizzati solventi organici come cloruro di metilene, tricloroetilene, esano, metanolo, propanolo e butanolo. Dato che queste tecniche possiedono una bassa selettività, una scarsa efficienza e l'utilizzo di solventi organici viene preferibilmente evitato per prodotti alimentari, sono stati introdotti nuovi metodi più adeguati ¹¹.

L'idrodistillazione con microonde consiste in una distillazione in corrente di vapore che viene migliorata dall'utilizzo di onde elettromagnetiche che permettono una maggior resa d'estrazione in tempi più brevi rispetto alla distillazione convenzionale.

Gli oli essenziali possono essere estratti immergendo il luppolo in acqua o in un altro solvente e applicando un campo elettrico pulsato che causa la rottura delle membrane cellulari per elettroporazione. La composizione del prodotto finale è influenzata dal solvente utilizzato, dalla temperatura, dal tempo e dalla forza del campo elettrico applicato.

Le normali tecniche di estrazione con solvente possono essere migliorate utilizzando alte pressioni e la polarità dei solventi può essere modificata durante l'estrazione per aumentare l'affinità verso determinate specie.

Tra le tecniche attualmente più utilizzate troviamo l'estrazione con CO₂ liquida o supercritica. Le condizioni di lavoro influenzano molto la composizione dell'estratto e la resa di estrazione.

5.5. Oli di luppolo

L'olio di luppolo può essere ottenuto per distillazione degli estratti di luppolo con lo scopo di isolare solo le essenze aromatiche che verranno aggiunte a fine bollitura.

6. LIGHTSTRUCK: IL COLPO DI LUCE

La birra è una bevanda nota per la sua sensibilità alla luce e per questo motivo normalmente viene conservata in bottiglie scure. L'effetto che la luce produce sulla birra è il *lightstruck* (o colpo di luce) che conduce alla formazione irreversibile di un sapore sgradevole che ricorda l'odore emanato dalle puzzele ¹².

L'LSF (lightstruck flavour) è causato da una reazione fotochimica che coinvolge diversi composti presenti nella birra: l'isoumulone o i suoi derivati, la riboflavina e un composto contenente zolfo. Il composto responsabile dell'LSF è il 3-metilbut-2-ene-1-tiolo (MBT), un composto solforato che ha una soglia di percezione molto bassa (4 nanogrammi per litro).

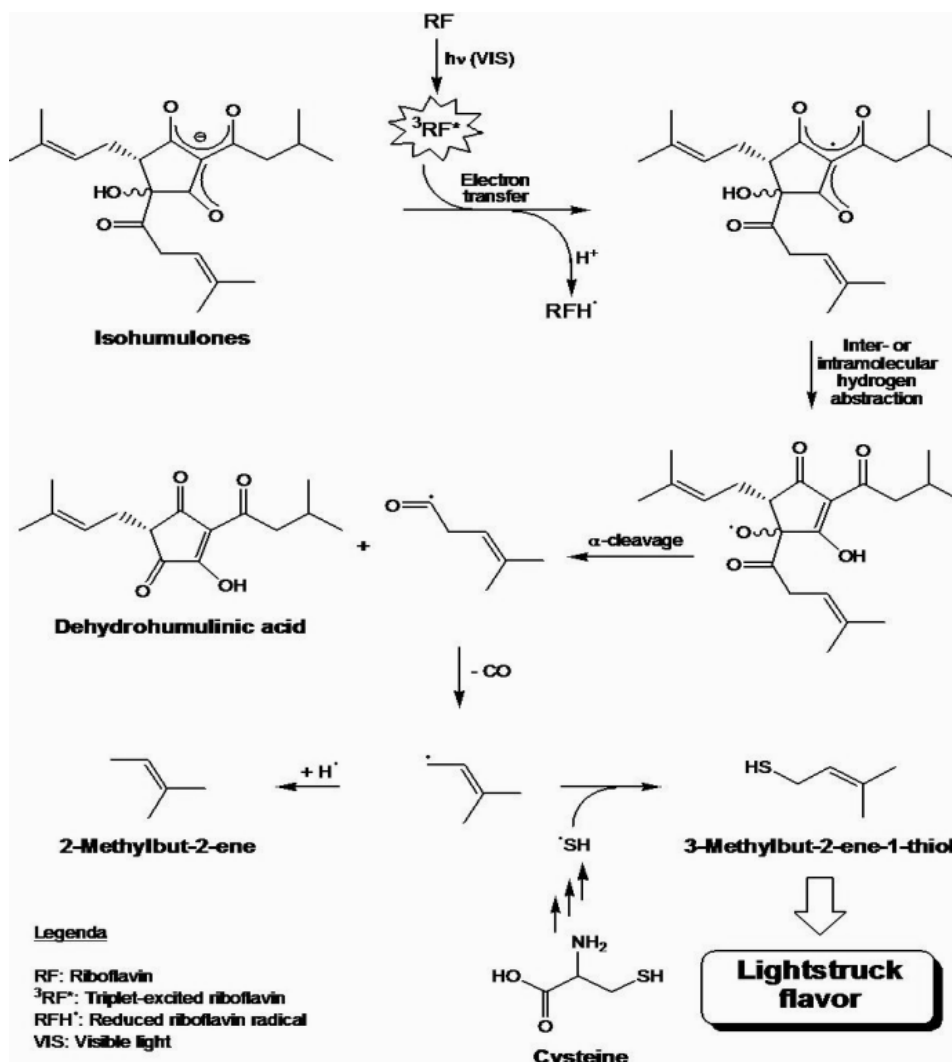


Fig.11 – Reazioni per la produzione di MBT¹²

Il meccanismo con il quale viene prodotto l'MBT è il seguente: la riboflavina, irradiata con luce visibile, è in grado di reagire con una molecola di isoumulone

estraendo un protone ed un elettrone. L'isoumulone radicalico riarrangia e subisce una scissione formando acido deidroumulinico e 4-metilpent-3-enale radicalico che, dopo la perdita di una molecola di CO, reagisce con composti solforati formando l'MBT (Fig.11).

La formazione dell'MBT si osserva nei campioni che vengono irradiati con luce compresa tra i 350 e 500 nm ma gli isoumuloni non assorbono in questo intervallo di lunghezze d'onda quindi la produzione dell'MBT deve dipendere dalla presenza di un composto sensibilizzatore. Nel caso della birra questo composto è la riboflavina (vitamina B2), la quale è in grado di assorbire luce visibile e trasferirla ad altre sostanze. Quando la riboflavina (RF) assorbe energia dalla luce, si eccita allo stato di singoletto ($^1\text{RF}^*$). Tramite un meccanismo di intersystem crossing, la riboflavina passa alla forma eccitata di tripletto ($^3\text{RF}^*$). In questo stato la riboflavina è in grado di interagire con gli isoumuloni, in particolare con la porzione della molecola che contiene il gruppo β -tricarbonile, portando alla formazione di un radicale tramite l'estrazione di un elettrone e di un protone. Il radicale formato riarrangia attraverso un meccanismo intermolecolare o intramolecolare per spostare l'elettrone spaiato sull'ossigeno legato al carbonio 4 e il prodotto ottenuto subisce una rottura dalla quale si forma l'acido deidroumulinico e il 4-metilpent-3-enale radicalico. Quest'ultimo perde una molecola di CO e forma il 3-metilbut-2-enil radicale, l'intermedio chiave nel processo che porta alla formazione del lightstruck flavour. Parallelamente, la riboflavina eccitata allo stato di tripletto può reagire con substrati che contengono tioli come la cisteina o l'S-metilcisteina per produrre il radicale solfidrile. A questo punto, il radicale derivante dagli isoumuloni e il radicale solfidrile possono combinarsi per formare l'MBT ¹².

La formazione dell'MBT può essere inibita tramite l'aggiunta di composti che eseguono un'azione di quenching in quanto sono in grado di neutralizzare i radicali. Tra questi composti troviamo anche i polifenoli, antiossidanti che sono naturalmente presenti nella birra.

7. ANALISI DEGLI OLI ESSENZIALI E IDENTIFICAZIONE DELLA VARIETÀ DI LUPPOLO

Esistono molte varietà di luppolo che vengono coltivate in luoghi diversi del mondo (tra i più importanti troviamo USA, Germania, Inghilterra, Slovenia ed Australia) e si diversificano tra loro per il contenuto di α -acidi e di oli essenziali ¹³. La composizione degli oli essenziali nei luppoli dipende soprattutto dalla varietà di pianta che viene utilizzata e in parte minore anche dall'area geografica, dalle condizioni di crescita, di lavorazione e di stoccaggio. Per questo motivo analizzando gli oli essenziali possiamo avere informazioni sulla varietà di luppolo in esame.

7.1. Metodi di analisi comuni

Una delle caratteristiche di maggiore interesse che può dare indizi sulla varietà di luppolo che stiamo analizzando è la percentuale di oli essenziali contenuta nel cono essiccato. Secondo le indicazioni della EBC (*European Brewery Society*), questa misura viene effettuata eseguendo una distillazione in corrente di vapore dei coni del luppolo e si esprime in ml/g. Questo valore ha una sua importanza, ma è altrettanto utile conoscere il rapporto tra il contenuto di oli essenziali e quello di α -acidi per sapere in che percentuale le resine contribuiscono all'aroma ¹³.

La composizione degli oli essenziali viene determinata tramite gas-cromatografia accoppiata con ionizzazione di fiamma (GC-FID) o con la spettrometria di massa (GC-MS). Prima di essere analizzati, gli oli essenziali vengono isolati tramite varie modalità di estrazione. Il metodo più classico è l'estrazione in corrente di vapore ma se non viene condotta a pressioni ridotte può causare la perdita di alcuni composti termolabili. Un'altra tecnica nota è l'estrazione con solvente, in particolare con esano o etanolo, ma il suo impiego è ormai abbandonato per la scarsa resa e per la possibile perdita di analiti nel momento in cui si fa evaporare il solvente. I metodi utilizzati attualmente sono l'estrazione con CO₂ liquida e con CO₂ supercritica che permettono di ottenere estratti rappresentativi della reale composizione dei coni.

In generale queste tecniche richiedono grandi quantità di solvente, lunghi tempi di estrazione e utilizzo di dispositivi costosi, per questo è in crescita l'impiego di tecniche alternative più moderne come la microestrazione in fase solida.

7.2. Analisi con SPME-GC-MS

La microestrazione in fase solida si è confermata come una tecnica di estrazione efficace, affidabile e di semplice applicazione¹⁴. Questo metodo consiste nell'utilizzo di una fibra rivestita su cui avviene l'assorbimento e il desorbimento di composti volatili o semivolatili presenti in un campione. Nel caso della HS-SPME (*headspace solid phase microextraction*), il campionamento viene eseguito direttamente sullo spazio di testa del campione. L'efficienza dell'estrazione dipende da alcuni parametri come la natura della fibra, la temperatura di estrazione e il tempo di estrazione; quindi, è necessario ottimizzare questi parametri per ottenere dei risultati ottimali. La fibra contenente gli analiti viene inserita direttamente nell'iniettore della gas-cromatografia. La GC è una tecnica molto efficace per separare gli oli essenziali perché sono specie volatili e anche in questo caso parametri come temperatura e tipologia di fase solida devono essere scelti accuratamente per ottenere una separazione ottimale delle componenti. Solitamente la rivelazione viene effettuata tramite uno spettrometro di massa.

La selezione della fibra che viene utilizzata per l'estrazione è uno step importante nell'ottimizzazione dell'analisi perché la sensibilità del metodo dipende dal valore della costante di distribuzione degli analiti tra il campione e la fibra. L'efficienza di una fibra può essere valutata tramite vari parametri come l'area totale dei picchi, il numero di picchi e la riproducibilità.

Il tempo e la temperatura di estrazione influenzano la quantità di massa che viene trasferita nella fibra. Gli analiti hanno diversi comportamenti nel tempo, infatti in alcuni casi la quantità di sostanza estratta aumenta all'estendersi del tempo di estrazione, mentre in altri casi l'equilibrio di ripartizione viene raggiunto dopo pochi minuti e talvolta l'area del picco diminuisce se il processo viene prolungato. Anche nel caso della temperatura si hanno andamenti diversi per gli analiti ma, in generale, una temperatura maggiore aumenta la volatilità dei composti e diminuisce il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio.

7.3. Miglioramento della gas-cromatografia

Il numero di composti presenti negli oli essenziali del luppolo è talmente vasto che solitamente una colonna per gas-cromatografia convenzionale non è sufficiente a separare tutti i picchi del cromatogramma. Per migliorare la risoluzione si può utilizzare una cromatografia multidimensionale (MDGC) che sfrutta due colonne in serie con fasi stazionarie diverse in modo da riuscire a separare con la seconda colonna gli analiti che non vengono separati dalla prima. Tra le due colonne viene

posta una valvola per trasferire determinate porzioni di eluito uscente dalla prima colonna nella seconda.

Nel caso della cromatografia in due dimensioni (GC X GC) il campione viene separato completamente da due colonne durante l'analisi grazie alla presenza di un modulatore criogenico che blocca e rilascia continuamente gli analiti in uscita dalla prima colonna e li introduce nella seconda. Il cromatogramma viene rappresentato come un grafico in cui troviamo i tempi di ritenzione delle due colonne negli assi x ed y e la presenza di analiti viene indicata da zone più chiare o più scure nel piano xy.

La gas cromatografia in due dimensioni può essere migliorata variando diversi parametri. Il modulatore è un dispositivo che svolge un ruolo cruciale nella GC X GC e perciò è possibile agire su di esso per aumentare l'efficienza della separazione. In particolare, si possono modificare il tempo di modulazione, che determina quanto impiega il modulatore per completare un ciclo, e la temperatura di modulazione.

Le due colonne vengono trattate indipendentemente quindi ciascuna ha le proprie caratteristiche ed una specifica ottimizzazione. L'aspetto più importante da considerare è il tipo di fase stazionaria di ciascuna colonna e il risultato che si ottiene dalla loro combinazione.

Le dimensioni delle colonne sono molto importanti perché determinano quanto vengono separati gli analiti e la larghezza dei loro picchi, inoltre influiscono sul tempo di eluizione che è un valore da tenere in considerazione in quanto è presente il modulatore che lavora ad intervalli di tempo prestabiliti. La velocità del gas di trasporto è strettamente legata al numero di piatti teorico della colonna, quindi influisce particolarmente sull'efficienza delle colonne. Infine, è possibile selezionare temperature diverse per le due colonne o programmare delle scale di temperatura in modo da sfruttare la diversa volatilità degli analiti.

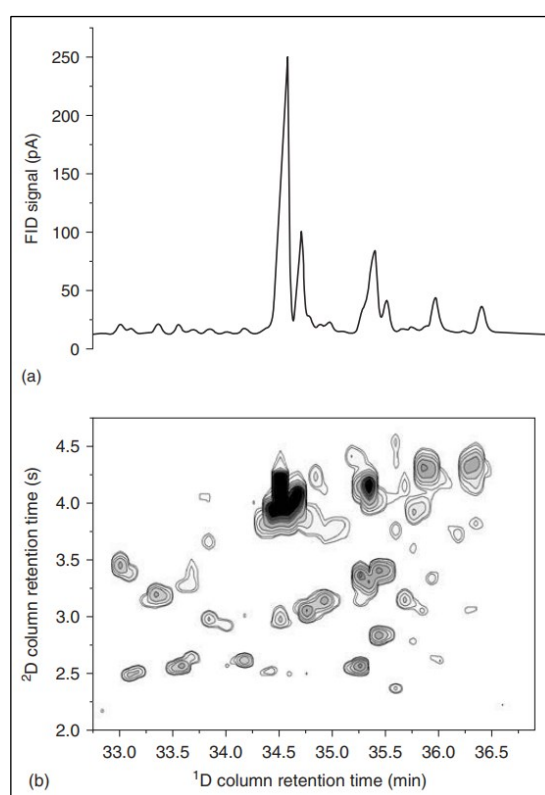


Fig.12 - Separazione della frazione dei sesquiterpeni ossigenati usando a) GC-FID e b) GC X GC-FID ¹³

8. BIBLIOGRAFIA

1. Almaguer, C.; Schönberger, C.; Gastl, M.; Arendt, E. K.; Becker, T. *J. Inst. Brew.* **2014**, *120*, 289-314
2. Antonelli, F.; Ruggiero, A.; *Fare la birra in casa*; Publignovane srl, Roma, 2021
3. Eyres, G.T.; Marriott, P.J.; Dufour J. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6252-6261
4. De Keukeleire, D. *Química Nova* **2000**, *23*, 109
5. Zhang, G.; Zhang, N.; Yang, A. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 4345
6. Malowicki, M.G.; Shellhammer, T.H. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4434-4439
7. Calado, L.S.; Lacerda, A.L.F.; Fiaux, S.B.; Sphaier, L.A.; Silva, V.N.H.; Peixoto, F.C. *J. Food Eng.* **2019**, *262*, 9-12
8. Schönberger, C.; Kostelecky, T.; *J. Inst. Brew.* **2011**, *117*, 259-267
9. Karabín, M.; Hudcová, T.; Jelínek, L.; Dostálek, P. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2016**, *15*, 542-567
10. Hughes, P.S.; Simpson, W. J. *Technical quarterly-master brewers association of the Americas* **1993**, *30*, 146-146
11. Sanz, V. et al. *Trends in Food Sci. & Tech.* **2019**, *93*, 12-22
12. De Keukeleire, D.; Heyerick, A.; Huvaere, K.; Skibsted, L. H.; Andersen, M. L. *Cerevisia* **2008**, *33*, 133-144
13. Eyres, G.; Dufour, J.; *Beer in Health and Disease Prevention*; Academic Press, 2009, pp. 239-254
14. Gonçalves, J. et al.; *J. of separation sci.* **2012**, *35*, 2282-2296