

**Università degli Studi di Bologna**

*(Sede amministrativa)*

**Università degli Studi di Perugia**

*(Sede consorziata)*

**Facoltà di Agraria**

**Dipartimento di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti**

Settore scientifico disciplinare:

AGR/15 Scienze e Tecnologie Alimentari

**GLI ANTIOSSIDANTI NELLE MATERIE PRIME DELL' INDUSTRIA BIRRARIA.  
IL CASO DEL LUPPOLO.**

Dottoranda

**Michela Tironzelli**

Coordinatore

**Prof. Giuseppe Losi**

Relatore

**Prof. Paolo Fantozzi**

# INDICE

<b>1.</b>	<b>Introduzione</b>	
1.1	I radicali liberi e il ruolo degli antiossidanti.....	1
1.2	Classificazione degli antiossidanti.....	3
1.3	Gli antiossidanti più comuni in natura.....	4
1.4	Meccanismi di azione dei principali composti antiossidanti.....	15
1.5	Ruolo salutistico ed effetti biologici degli antiossidanti.....	18
1.6	Materie prime usate nell'industria birraria.....	21
1.7	Composizione chimica della birra e sue proprietà salutistiche.....	39
1.8	Misura dell'attività antiossidante.....	42
1.9	Review sul potere antiossidante degli ingredienti birrari:.....	43
1.9.1	L'orzo.....	43
1.9.2	Il malto d'orzo.....	44
1.9.3	Gli altri cereali.....	46
1.9.4	Il lievito.....	50
1.9.5	Il luppolo.....	51
<b>2.</b>	<b>Scopo.....</b>	<b>52</b>
<b>3.</b>	<b>Strategia sperimentale.....</b>	<b>54</b>
<b>4.</b>	<b>Materiali e metodi</b>	
4.1	Campioni.....	56
4.2	Reagenti e strumentazioni.....	65
4.3	Mini impianto pilota su scala di laboratorio.....	67
4.4	Metodi di estrazione .....	71
4.5	Metodi analitici.....	72
4.6	Limiti e applicazioni dei saggi per la determinazione del potere antiossidante.....	75
<b>5.</b>	<b>Risultati e discussione: il luppolo</b>	
5.1	Metodo di estrazione per l'analisi del luppolo con saggio ABTS.....	81
5.2	Attività antiossidante totale (TAA) di 15 cultivars inglesi.....	91
5.3	Altre determinazioni analitiche sui luppoli raccolti nel 2004 e nel 2005.....	95
5.4	Curve di accumulo di alcuni componenti durante lo sviluppo dei coni.....	103
5.5	L'analisi ABTS sul luppolo fresco.....	117
5.6	Mini sperimentazione su scala di laboratorio: l'influenza del luppolo sul potere antiossidante della birra.....	121

<b>6.</b>	<b>Considerazioni conclusive</b>	
6.1	Il luppolo.....	127
6.2	Le prospettive future. ....	130
6.2.1	Biodisponibilità dei composti antiossidanti: il ruolo degli alimenti funzionali .....	130
6.2.2	L'impiego degli antiossidanti delle materie e birre arricchite.....	133
<b>7.</b>	<b>Bibliografia</b>	
7.1	Fonti bibliografiche cartacee.....	135
7.2	Fonti bibliografiche elettroniche.....	148

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I RADICALI LIBERI E IL RUOLO DEGLI ANTIOSSIDANTI

In ogni cellula dell'organismo umano avvengono processi biochimici che consumano ossigeno per la generazione di energia. Tuttavia, dal processo di utilizzazione dell'ossigeno (ossidazione), vitale per la cellula, si producono dei prodotti "di scarto" potenzialmente dannosi: i radicali liberi. Dal punto di vista biochimico, i radicali liberi sono molecole particolarmente instabili in quanto presentano uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno. Questo induce i radicali liberi alla ricerca del proprio equilibrio chimico tramite acquisizione degli elettroni mancanti da altre molecole che, di conseguenza, diventano a loro volta instabili e cercano un altro elettrone da altre molecole, innescando così un meccanismo di instabilità a "catena". L'alta reattività dei radicali liberi può causare reazioni spesso indesiderate e lesive per le cellule e, quindi, per i tessuti e per gli organi (Mitscher *et al.*, 1997; Cestaro, 1994; Wiseman e Halliwell, 1996; Berliner e Heinecke, 1996).

Tra le molecole altamente reattive rientrano le "specie reattive dell'ossigeno" (ROS) che, tra l'altro, includono il radicale superossido, il radicale idrossilico, il radicale perossidico e l'ossido d'azoto, nonché specie non radicaliche, come il perossido d'idrogeno, l'ossigeno singoletto, l'acido ipocloroso e l'ozono. Il radicale idrossilico è il ROS più reattivo e dannoso nei sistemi biologici. Tale radicale è generato dalla reazione dello ione ferroso ( $Fe^{++}$ ) con il perossido d'idrogeno. In questo processo, noto come reazione di Fenton, la quantità di radicale prodotto è direttamente proporzionale alla concentrazione di ferro o rame.

La produzione endogena di ROS ha luogo principalmente nei mitocondri, dove avvengono i processi ossidativi con trasporto di elettroni (respirazione cellulare) e nei quali l'ossigeno funge da accettore finale di elettroni per la produzione di energia. L'ossigeno, quando svolge azione ossidante, viene esso stesso sottoposto ad una serie di riduzioni in cui sottrae elettroni da altre molecole, dando luogo ad una serie di intermedi radicalici. I ROS sono prodotti anche dal metabolismo degli acidi grassi poliinsaturi a partire dall'acido arachidonico durante la produzione degli eicosanoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni), molecole che svolgono importanti funzioni a livello dell'apparato vascolare. Un altro caso in cui la produzione di radicali liberi è considerata fisiologica ed utile all'organismo, è quello che si realizza nei macrofagi, in cui il radicale superossido viene utilizzato come "killer" contro batteri e virus patogeni. Oltre ai meccanismi endogeni, i fattori che causano la produzione di radicali liberi sono: stress, diete sbilanciate, alcool, fumo, intenso esercizio fisico, inquinamento e raggi solari.

Un eccesso cellulare di ROS contribuisce ai processi di invecchiamento ed è implicato nello sviluppo di malattie croniche, neurodegenerative, cardiovascolari e cancro, quali: ischemia, sclerosi multipla, arteriosclerosi, cataratta, diabete, epatiti, morbo di Parkinson, Alzheimer, dermatiti e distrofia muscolare. (Ames, 1983; Halliwell e Gutteridge, 1990; Ames e Shigenaga, 1992; Cestaro, 1994; Chen *et al.*, 1995; Stocker, 1999; Benzie, 2000).

Anche un'eccessiva e non regolata (patofisiologica) sintesi di ossido nitrico (NO) è considerata causa di molte malattie, alcune delle quali anche letali. La pericolosità dell'NO è dovuta alla formazione dell'anione perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>) o dell'acido idroperossinitroso (HOONO, pK 6.8), altamente tossici, e che derivano da una reazione rapida di ricombinazione dell'anione superossido e dell'ossido nitrico. D'altra parte, l'NO è coinvolto in processi fisiologici fondamentali, quali l'azione vasodilatatrice, la trasmissione di segnali al sistema nervoso centrale e periferico, la risposta citotossica e citostatica del sistema immunitario (Geletii *et al.*, 2002).

In condizioni normali, il danno da radicali liberi non si evidenzia per la presenza, nei sistemi biologici, di fonti generatrici di antiossidanti, quali: enzimi (es. superossido dismutasi, glutatione perossidasi e catalasi); macro molecole (es. albumina, ceruloplasmina, ferritina ed altre proteine); micro molecole (es. acido ascorbico, glutatione, acido urico, tocoferoli, carotenoidi e (poli)-fenoli); ormoni (es. estrogeni, angiotensina, melatonine, etc.).

Ad esempio, i ROS sono trasformati in perossido d'idrogeno per azione di enzimi citoplasmatici e mitocondriali, come la superossido-dismutasi (SOD), la catalasi e il glutatione. Il perossido d'idrogeno, essendo esso stesso tossico e dannoso per le strutture cellulari, grazie alla catalasi ed alla glutatione-perossidasi, è quindi scisso in ossigeno ed acqua.

Alcune proteine, pur non agendo direttamente sui radicali, svolgono un'attività di prevenzione sul manifestarsi dei fenomeni ossidativi, per la formazione di complessi stabili con i metalli di transizione che fungono da catalizzatori (ferro e rame principalmente) (Es: albumina, ferritina e transferrina per il ferro; albumina, ceruloplasmina e metallotioneina per il rame) (Geletii *et al.*, 2002).

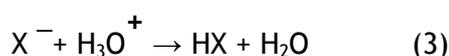
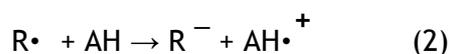
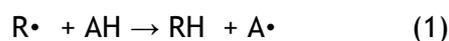
L'altro importante meccanismo di difesa delle cellule avviene per azione degli antiossidanti. Sono considerati antiossidanti gli agenti con potenziale di riduzione negativo in grado di fornire ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi ripristinando così l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono. Presupposto per funzionare da antiossidanti è che la loro forma radicalica, una volta ossidati, sia non reattiva o poco reattiva nei confronti delle altre molecole. Gli antiossidanti devono essere introdotti con la dieta ed

esplicano la loro azione a certi livelli di concentrazione, generalmente piuttosto bassi; quando le concentrazioni aumentano, alcuni composti possono diventare proossidanti favorendo la formazione di radicali (Shahidi e Naczki, 1995).

## 1.2 CLASSIFICAZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI

In relazione al meccanismo d'azione, gli antiossidanti si possono distinguere nelle seguenti tipologie:

**Tipo I: "Chain breaker"**, agiscono da inattivatori di radicali liberi donando idrogeno o trasferendo un singolo elettrone alle specie radicaliche. La loro efficacia dipende dalla stabilità dei radicali nei quali si trasformano; pertanto, più efficiente è la delocalizzazione degli elettroni spaiati, prodotti nella reazione con i radicali liberi, maggiore è il loro potere antiossidante. Come sopra accennato, gli antiossidanti di questo tipo possono disattivare le specie radicaliche tramite due tecniche fondamentali: per trasferimento di un atomo di idrogeno (Hydrogen Atom Transfer: HAT) o per trasferimento di un singolo elettrone (Single Electron Transfer: SET). Il risultato finale è lo stesso, ma le cinetiche e il potenziale delle reazioni sono diversi (Prior *et al.*, 2005). In realtà questi meccanismi possono aver luogo anche contemporaneamente, ma sarà la struttura chimica dell'antiossidante, unitamente alle sue proprietà di solubilità, coefficiente di partizione e solvente, a determinare il meccanismo di azione prevalente. L'energia di dissociazione dei legami e il potenziale di ionizzazione sono i due principali fattori che influiscono sul meccanismo e sull'efficienza dell'antiossidante (Wright *et al.*, 2001). Gli antiossidanti "donatori" di un atomo di idrogeno, agiscono secondo lo schema (1). Le reazioni HAT sono indipendenti dal solvente e dal pH del mezzo e, generalmente, avvengono abbastanza rapidamente, concludendosi nel giro di qualche minuto. Viceversa, le reazioni SET (vedi reazioni (2), (3) e (4)), decorrono lentamente e sono pH-dipendenti. In entrambi i meccanismi, la presenza di agenti riducenti, inclusi i metalli, può condurre ad interferenze ed errori nelle misurazioni. Appartengono a questo gruppo di antiossidanti: il *terz*-butil-idrossianisolo (BHA), il *diterz*-butil-idrossitoluene (BHT), il *terz*-butil-idrossichinone (TBHQ), il propil-gallato (PG), i tocoferoli ed i fenoli.



Dove R indica una specie radicalica; AH un antiossidante in grado di donare un idrogeno o un elettrone ed M un metallo.

**Tipo II: “Metal scavenger”**, prevengono la formazione di radicali liberi, agendo soprattutto da agenti chelanti dei metalli; le tracce di metalli normalmente presenti negli alimenti, riducono l’energia di attivazione delle reazioni nella fase di iniziazione di ossidazione lipidica.

Esempi ne sono: l’acido etilen-diamminotetraciclico (EDTA), l’acido citrico, l’acido ascorbico ed alcuni amminoacidi.

**Tipo III: “Fattori ambientali”**, come luce, pressione parziale dell’ossigeno, temperatura e umidità. In questo caso non è corretto parlare di antiossidanti in senso stretto, in quanto non si tratta di composti chimici, ma piuttosto del controllo di fattori di processo al fine di ridurre la velocità dell’ossidazione lipidica.

Tuttavia, in natura, i limiti tra tali classi di antiossidanti non sono così netti sia perché ancora alcuni meccanismi d’azione con cui agiscono certe sostanze antiossidanti non sono stati ben definiti sia perché esistono sostanze, quali i composti fenolici, che possono comportarsi contemporaneamente come da primo ed secondo tipo (Cuvelier, 1997).

### 1.3 GLI ANTIOSSIDANTI PIÙ COMUNI IN NATURA

La maggior parte degli antiossidanti che si conoscono appartengono al regno vegetale. Molte piante sintetizzano questi composti per soddisfare varie necessità fisiologiche: la propria difesa contro parassiti, agenti tossici, condizioni ambientali, raggi ultravioletti; l’attrazione degli impollinatori (gli antociani e i flavonoidi sono responsabili della colorazione di fiori e foglie); il supporto strutturale (lignina e tannini); la regolazione mediante fitormoni (flavonoidi ed altre sostanze fenoliche semplici).

Queste funzioni avvengono a spese del metabolismo primario delle piante (accrescimento e riproduzione) in quanto parte degli assimilati sono destinati allo svolgimento delle suddette attività (metabolismo secondario). Una funzione particolarmente importante del metabolismo secondario è la protezione da stress ossidativi e le piante che hanno uno spiccato metabolismo secondario sono tendenzialmente più ricche in sostanze antiossidanti.

Gli antiossidanti naturali, ampiamente presenti in alimenti quali frutti e vegetali, ricadono essenzialmente in tre grandi gruppi di sostanze: le vitamine, i composti fenolici e i carotenoidi. L’acido ascorbico ed i fenoli sono i più noti tra gli antiossidanti idrofili, i

carotenoidi tra quelli lipofili (Halliwell, 1996). Anche alcuni minerali (selenio, rame e zinco) svolgono indirettamente funzioni antiossidanti, poiché partecipano alla regolazione di enzimi coinvolti nel meccanismo di difesa antiossidante.

Per completezza d'esposizione, sono sintetizzate, nei successivi paragrafi, le caratteristiche chimico-strutturali dei principali antiossidanti menzionati, nonché i relativi meccanismi d'azione ed effetti biologici, al fine di definire lo stato dell'arte sulle conoscenze in questo ambito.

**VITAMINA C:**  $\gamma$ -lattone dell'acido 2-chetogulonico; comunemente nota come acido ascorbico è caratterizzata da uno spiccato potere riducente: il suo prodotto di ossidazione è l'acido L-deidroascorbico. Le piante ed alcuni organismi animali sono in grado di sintetizzarlo a partire dai glucidi, mentre l'uomo deve introdurlo con gli alimenti. Nelle piante è coinvolto, insieme alla glutatione-perossidasi, nella detossificazione del perossido d'idrogeno nei cloroplasti. La vitamina C è il più potente antiossidante idrosolubile presente nel plasma sanguigno e agisce anche come rigeneratore di vitamina E (Niki *et al.*, 1995) e di specie cationiche radicaliche di carotenoidi (Mortensen *et al.*, 2001). E' noto l'effetto sinergico delle vitamine E, C e del  $\beta$ -carotene come scavengers nei confronti di specie reattive dell'azoto (Böhm *et al.*, 1998a,b).

**TOCOFEROLI (VITAMINA E):** antiossidanti liposolubili prodotti dagli organismi fotosintetizzanti, appartenenti alla classe dei tocoli. Chimicamente, sono derivati del benzodiidropirano: presentano in posizione 6 un ossidrilico e in posizione 2 un gruppo metilico e una catena prenoide a 16 atomi di carbonio. I tocoli sono distinti in tocoferoli (se la struttura è satura) e tocotrienoli (se hanno tre doppi legami nella catena prenoide). Ogni tocolo include quattro derivati (a, b, g, and d) per la presenza di diversi sostituenti metilici sull'anello. Gli organismi animali ed i batteri non sono in grado di sintetizzarli e devono introdurli con gli alimenti (Hidalgo *et al.*, 2006).

**CAROTENOIDI:** molecole lipofile, molte delle quali derivanti dalla struttura isoprenica a 40 atomi di carbonio. Presentano quindi un sistema di doppi legami coniugati alle cui estremità sono presenti gruppi ciclici che possono essere sostituiti da gruppi funzionali contenenti ossigeno. I carotenoidi si distinguono in caroteni, quando la loro struttura presenta solo atomi di carbonio e idrogeno, e xantofille, se possiedono anche funzioni ossigenate. Solo piante, funghi, batteri e alghe sono in grado di sintetizzarli.

**SOSTANZE FENOLICHE:** classe di composti organici naturali caratterizzati dalla presenza di almeno un anello aromatico, mono o pluri-sostituito da gruppi ossidrilici. Una classificazione generale delle principali classi di composti fenolici prende in considerazione

lo scheletro carbonioso che costituisce l'asse fondamentale per la differenziazione strutturale (Tabella n.1 ).

Struttura	Classi fenoliche
$C_6$	Fenoli semplici
$C_6-C_1$	Acidi idrossibenzoici
$C_6-C_2$	Acetofenoni e acidi fenilacetici
$C_6-C_3$	Acidi cinnamici, cumarinici e isocumarinici
$C_6-C_4$	Naftachinoni
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenoni e Xantoni
$C_6-C_2-C_6$	Antrachinoni
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoidi
$(C_6-C_3)_2$	Lignani
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Bioflavonoidi, <i>biflavani</i>
$(C_6-C_3)_n$	Lignine
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Proantocianidine

**Tabella 1:** *classi fenoliche e scheletro carbonioso (Harborne, 1989).*

Sulla base del peso molecolare dei composti menzionati, le sostanze fenoliche si possono distinguere in composti a basso peso molecolare, a peso intermedio e ad alto peso molecolare (Tabella n. 2).

Peso molecolare	Struttura	Classe fenolica
Basso	$C_6-C_1$	Acidi idrossibenzoici
	$C_6-C_3$	Acidi idrossicinnamici
Intermedio	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoidi
Alto	$(C_6-C_1)_n$	Tannini idrolizzabili
	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tannini condensati

**Tabella 2:** *classificazione dei composti fenolici in base al peso molecolare.*

Di seguito sono descritte in dettaglio le singole classi di fenoli.

**Fenoli semplici:** sono caratterizzati dalla presenza di un solo anello benzenico e pertanto rappresentano le strutture più semplici dei composti fenolici. Si trovano principalmente negli oli essenziali ricavati dalle piante. Un esempio è il timolo.

**Acidi idrossibenzoici:** sono così chiamati per la struttura base derivata dall'acido idrossibenzoico (Fig. n.1). L'acido gallico e l'acido vanillico sono i composti idrossibenzoici maggiormente presenti e studiati per la loro distribuzione nel mondo vegetale. L'acido gallico è, insieme all'acido ellagico (Fig. n. 2) il monomero base per la formazione dei tannini idrolizzabili.

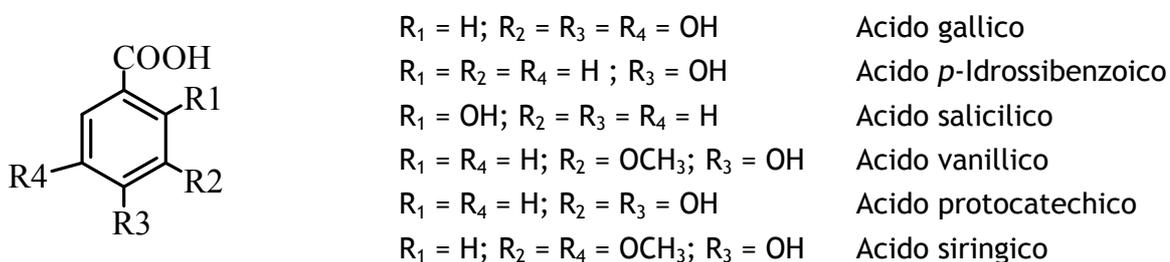


Fig. 1: strutture chimiche dei principali acidi idrossibenzoici.

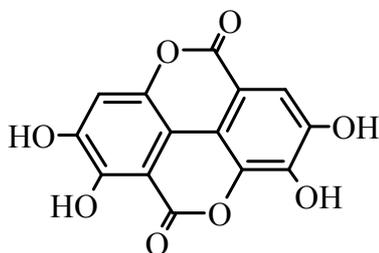


Fig. 2: struttura chimica dell'acido ellagico.

**Acidi Idrossicinnamici:** sono fenilpropanoidi derivanti dall'acido *p*-cumarico (o *p*-idrossicinnamico). Sono comuni in natura quattro varianti della loro formula di base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> : l'acido caffeico, cumarico, ferulico e sinapico (Fig. n. 3). Si trovano nel regno vegetale legati chimicamente ad altri composti. Ad esempio, l'acido clorogenico (Fig. n. 4) deriva dall'esterificazione dell'acido caffeico con l'acido chinico. Gli acidi idrossicinnamici svolgono, nelle piante, azione antibiotica e varie funzioni biologiche connesse all'inibizione della crescita e della germinazione.

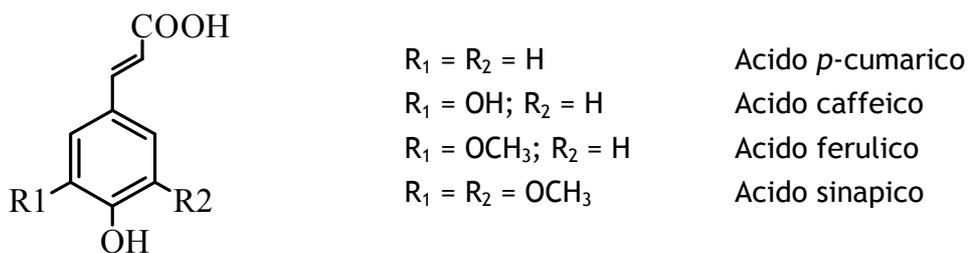


Fig. 3: strutture chimiche dei principali acidi idrossicinnamici.

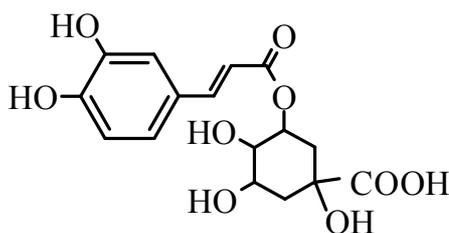


Fig. 4: struttura chimica dell'acido clorogenico.

**Flavonoidi:** derivati del benzo- $\gamma$ -pirone, sono formati da due anelli aromatici (A e B) e da un eterociclo di collegamento (Fig. 5).

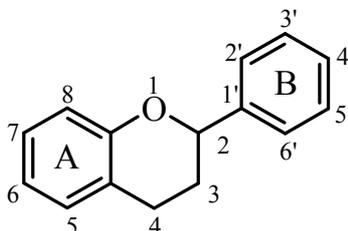


Fig. 5: scheletro base dei flavonoidi; a seconda della natura e del grado di ossidazione dell'eterociclo ossigenato si distinguono le varie strutture dei composti facenti parte di questa classe.

In base al tipo di eterociclo, ai suoi sostituenti ed ai sostituenti degli anelli benzenici, i flavonoidi sono suddivisi in:

- \* Antocianidine
- \* Flavonoli
- \* Flavani
- \* Flavanoni
- \* Flavoni
- \* Isoflavoni
- \* Tannini idrolizzabili

Le antocianidine sono caratterizzate da una carica positiva sull'ossigeno dell'eterociclo ossigenato e dal fatto che tutti gli atomi di carbonio sono insaturi. Sono i responsabili della pigmentazione di molti fiori e frutti: hanno infatti la capacità di essere colorati in modo diverso a seconda del pH del mezzo in cui si trovano. Tra le antocianidine più comuni si ricorda la cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina e malvidina.

Le loro formule di struttura, si differenziano per il tipo di sostituente legato alla struttura base (Fig. 6).

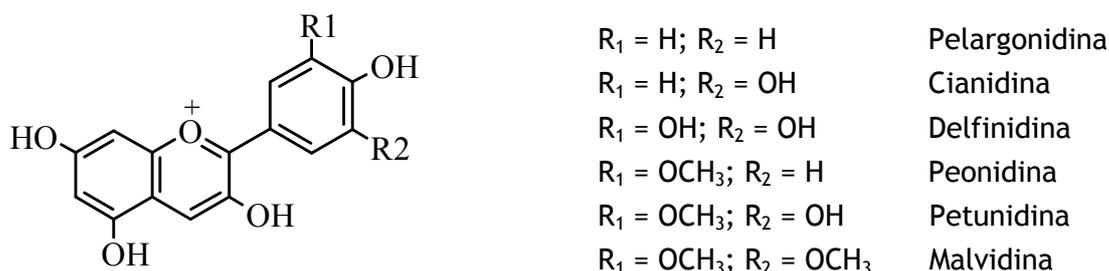
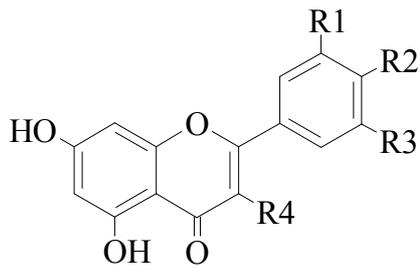


Fig. 6: strutture chimiche di varie antocianidine.

In natura, si trovano quasi esclusivamente forme antocianiche, in quanto le antocianidine sono legate con una o più molecole di zucchero (responsabile della loro stabilità e solubilità in acqua (Harborne, 1989). L'idrossilazione dell'anello B tende ad abbassare la stabilità della molecola, al contrario di quanto avviene con la metilazione. Lo zucchero che frequentemente esterifica con gli agliconi è il glucosio, però si possono trovare anche il ramnosio, il galattosio e l'arabinosio. L'esterificazione può riguardare uno, due o, raramente, tre funzioni alcoliche, generando così antociani mono-, di- o tri-glucoside. Inoltre, i glucosidi possono avere forme ancora più complesse, come quelle acilate, dove la molecola di zucchero viene, a sua volta, esterificata con un acido fenolico (es: acido *p*-cumarico).

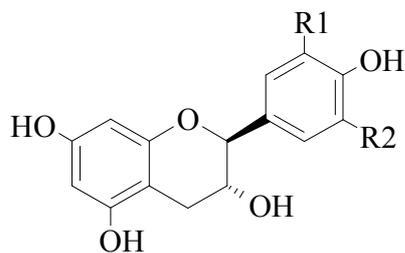
I flavonoli, conosciuti anche come antoxantine, hanno formula C6-C3-C6 e sono caratterizzati da un eterociclo di tipo  $\gamma$ -pirone. In molti casi sono glicosilati. Il legame glicosidico si forma sul gruppo ossidrilico in posizione 3. Le strutture monoglicosilate più diffuse sono, nell'ordine, 3-glucoside, 3-galattoside, 3-ramnoside e 3-glucoronide. Sono stati isolati più di 200 agliconi, tra questi, la quercetina, il kemferolo, la miricetina e l'isoramnetina sono i più diffusi (Fig. n.7). Il kamferolo e la quercetina glicosilati sono i più abbondanti in natura, seguiti da rutina, quercetina 3-rutinoside e kemferolo 3-rutinoside.



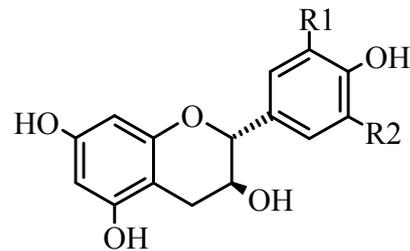
$R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = H; R_4 = OH$	Kemferolo
$R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = OH; R_4 = OH$	Miricetina
$R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = H; R_4 = OH$	Quercetina
$R_1 = OCH_3; R_2 = OH; R_3 = H; R_4 = OH$	Isoramnetina
$R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = H; R_4 = Rut$	Rutina

Fig. 7: struttura chimica dei più comuni flavonoli.

I flavani hanno formula  $C_6-C_3-C_6$  con l'eterociclo rappresentato dal pirano. Si distinguono in flavan-3-oli o catechine e flavan-3,4-dioli o leucoantocianidine. A differenza degli antociani, le catechine non sono legate a molecole glucidiche e non hanno gruppi metossili come sostituenti dell'anello B. I flavan-3-oli costituiscono il gruppo di flavonoidi più diffusi nel mondo vegetale. Poiché gli atomi di carbonio in posizione 2 e 3 sono asimmetrici, presentano 4 forme otticamente attive e 2 forme racemiche dette catechine ed epicatechine (Fig. 8).



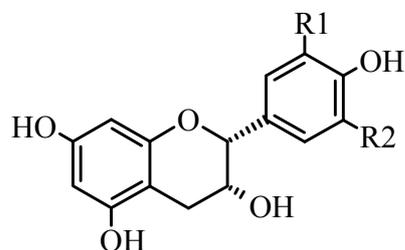
(+) - catechina



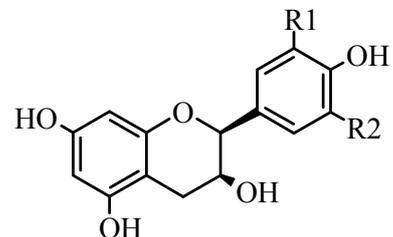
(-) - catechina

$R_1 = OH; R_2 = H$  Catechina;

$R_1 = OH; R_2 = OH$  Gallocatechina



(-) - epicatechine



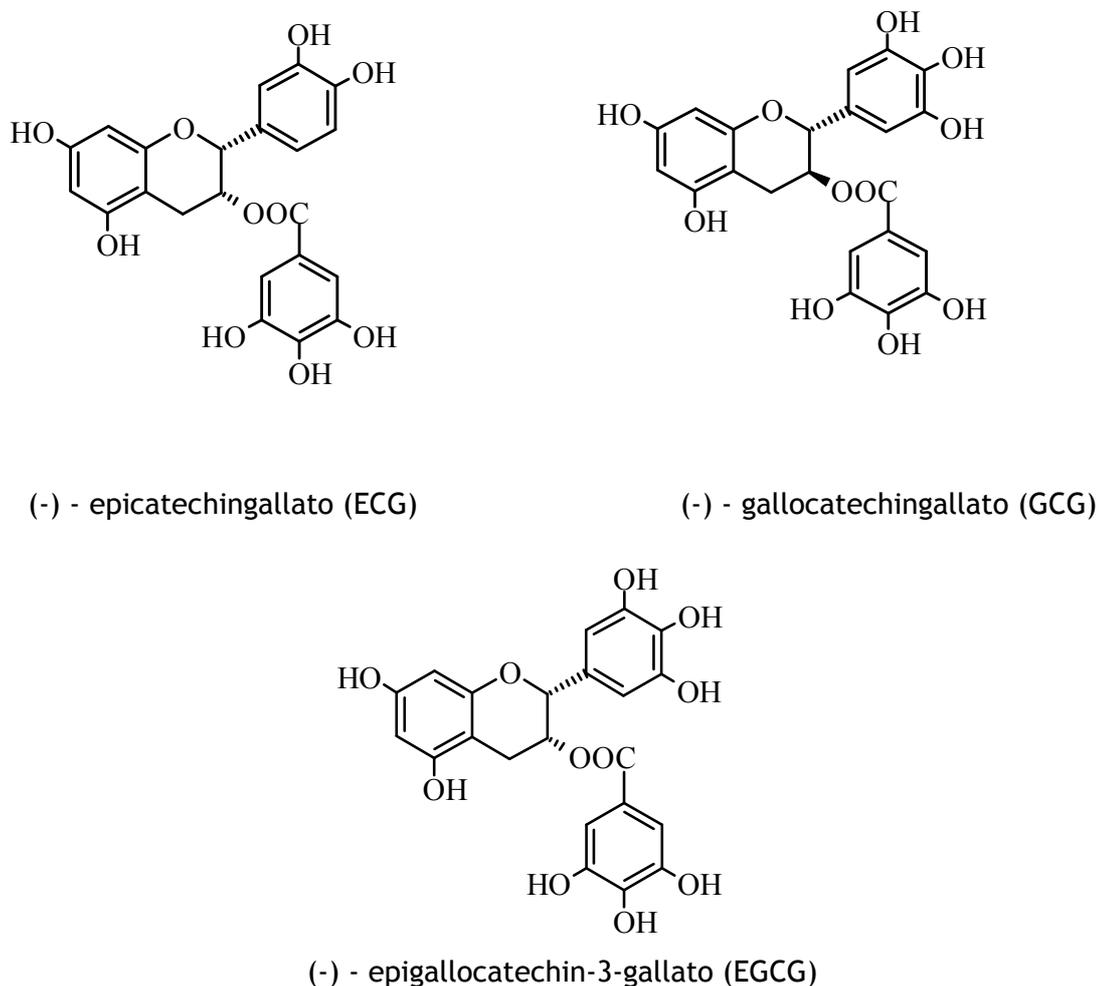
(+) - epicatechine

$R_1 = OH; R_2 = H$  Epicatechina;

$R_1 = OH; R_2 = OH$  Epigallocatechina

Fig. 8: struttura chimica di alcune catechine ed epicatechine.

Inoltre, le catechine possono combinarsi con molecole di acido gallico in posizione 3, dando origine ai catechin-gallati (Fig. n. 9).



**Fig. 9:** struttura chimica di alcune catechine ed epicatechine gallate.

I flavandioli presentano due funzioni idrossiliche agli estremi 3 e 4 dell'eterociclo (Fig. 10). I monomeri ed i polimeri delle leucoantocianidine hanno la caratteristica, che li distingue dalle catechine, di trasformarsi in antocianidine rosse quando vengono scaldate in un mezzo acido, conseguentemente alla perdita d'acqua. La reazione non è però completa in quanto, solo il 20% delle leucoantocianidine presenti nel mezzo è soggetta a questo fenomeno, il restante 80% effettua una rapida condensazione, formando composti giallo-bruni insolubili chiamati flobafeni. Le catechine sottoposte allo stesso trattamento, si trasformano totalmente in flobafeni.

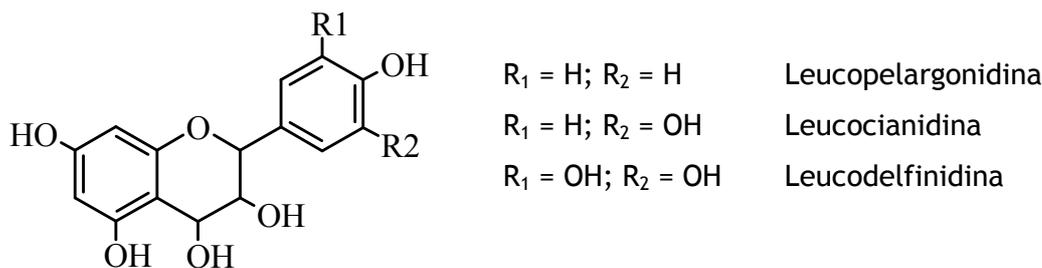


Fig. 10: struttura chimica di alcune leucoantocianidine. Avendo dei carboni asimmetrici, questi composti presentano anche gli isomeri ottici ed i relativi racemi.

I flavanoni (Fig. 11) si ritrovano tipicamente negli agrumi dove sono presenti sotto forma agliconica; negli altri vegetali sono molto meno comuni e prevalgono le forme glicosilate.

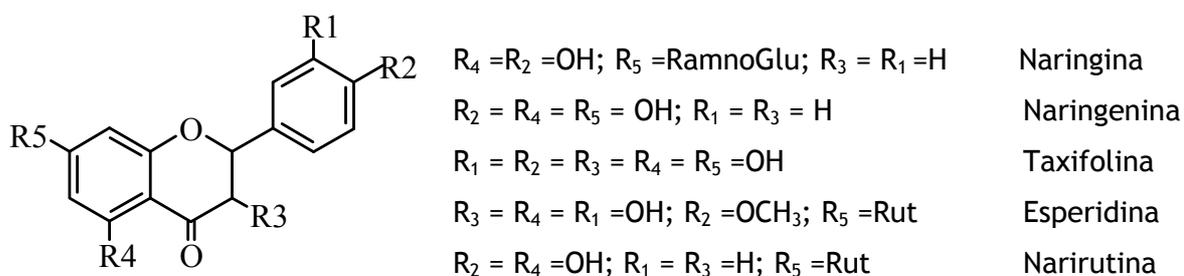


Fig. 11: struttura chimica di alcuni flavanoni più comuni in natura.

I flavoni costituiscono la classe fenolica meno rappresentata nel regno vegetale. Al pari di tutti i flavonoidi, sono presenti nella loro forma glicosilata. Esiste una forma bi-glicosilata della luteolina (Fig. 12 ) dove il glucosio si lega, oltre che in posizione 4', anche in posizione 7.

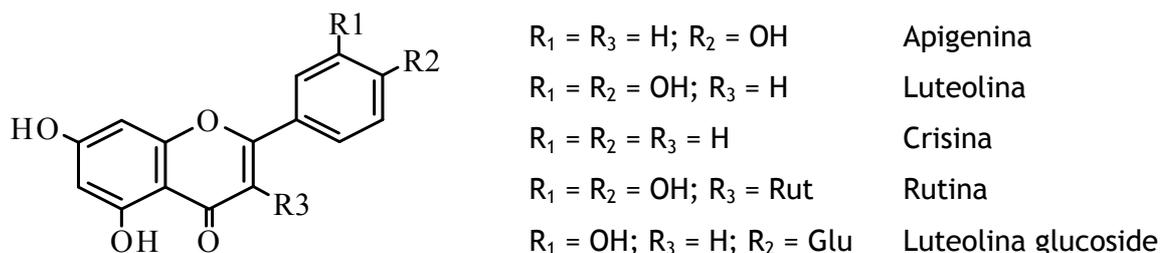


Fig. 12: struttura chimica di alcuni flavoni.

Gli isoflavonoidi sono tipici delle piante leguminose. La loro caratteristica è quella di avere legato l'anello B in posizione 3, e non in posizione 2 come gli altri flavonoidi (Fig. 13)

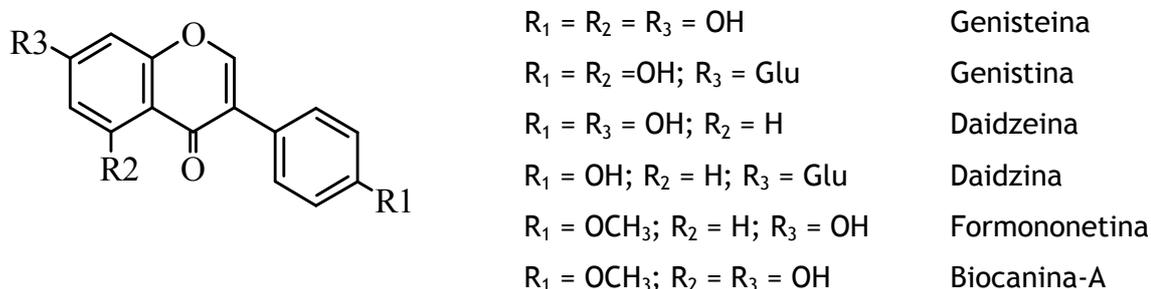


Fig. 13: struttura chimica di alcuni isoflavonoidi.

I tannini non rappresentano una vera e propria classe di composti, ma piuttosto un gruppo di composti fenolici, variamente combinati fra loro, caratterizzati da alto peso molecolare (variabile tra 500 e 3000 Da) e da proprietà colloidali (sono colloidali negativi). Pertanto, tendono a legarsi con alcaloidi, gelatine e altre proteine, dando frequentemente luogo a precipitati. Si distinguono due tipologie di tannini: idrolizzabili e condensati. I tannini idrolizzabili (Fig. 14) sono poliesteri che, per idrolisi acida o alcalina, liberano l'acido gallico, il suo dimero e l'acido esaidrossifenolico, che per lattonizzazione, forma l'acido ellagico. I tannini condensati non vengono di solito inclusi nella classe dei flavonoidi e pertanto verranno trattati separatamente nel paragrafo successivo.

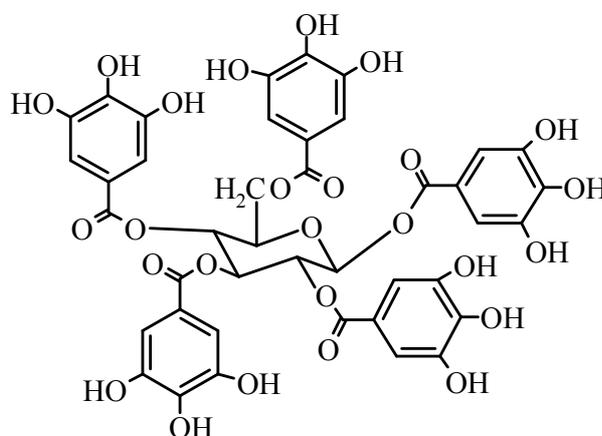
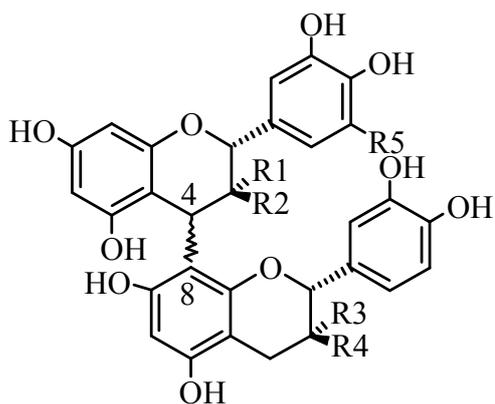


Fig. 14: esempio di tannino idrolizzabile: acido tannico.

**Tannini condensati o proantocianidine:** sono oligomeri (se fino a dieci unità) o polimeri derivanti dalla condensazione o polimerizzazione ossidativi dei flavan-3-oli e dei 3,4 flavan-dioli uniti con legami covalenti. Il nome “proantocianidine” deriva dal fatto che, tali sostanze, ossidate in ambiente fortemente acido, si trasformano essenzialmente negli agliconi cianidina e delphinidina. Le proantocianidine più diffuse sono le procianidine e le prodelfinidine. In generale, le proantocianidine si formano come prodotti secondari della sintesi dei flavan-3-oli nei tessuti delle piante. Durante il processo di formazione dei flavan-3-oli è necessaria la presenza di un substrato riducente come il NADPH. Per ciascun tessuto, il livello di NADPH condiziona l'equilibrio fra la sintesi dei diversi tipi di molecole. I tessuti nei quali si ritrova molto NADPH conterranno proantocianidine di tutte le dimensioni. Al contrario, dove la presenza di NADPH è limitata, si formeranno soprattutto oligomeri. Il grado di polimerizzazione dei tannini influenza la loro solubilità in mezzo acquoso: si suppone che siano solubili fino ad un peso molecolare di 7000 Da (circa 20 unità di flavan-3-oli per polimero).

Le procianidine (Fig. 15) sono costituite da (+) - catechina, (-) - epicatechina ed i rispettivi esteri gallici; le prodelfinidine invece hanno come unità monomeriche (+) - gallocatechina, (-) - epigallocatechina ed i rispettivi esteri gallici. Le procianidine dimere sono i tannini condensati più diffusi in natura; vengono chiamate B1, B2, B3 e B4, quelle caratterizzate da un legame C4-C8 ; B5, B6, B7, B8 e B9, quelle caratterizzate da un legame C4-C6 che comunque sono presenti in concentrazione minore rispetto alle prime quattro. Esistono, inoltre, delle formule trimere di procianidine, identificate come procianidine C.

Le prodelfinidine, contenendo unità monomeriche triidrossilate (gallocatechina, epigallocatechina e derivati gallici), risultano più polari e quindi posseggono un grado di solubilità maggiore.



$R_1 = R_4 = \text{OH}; R_2 = R_3 = R_5 = \text{H}$	Procianidina B1
$R_1 = R_3 = \text{OH}; R_2 = R_4 = R_5 = \text{H}$	Procianidina B2
$R_1 = R_3 = R_5 = \text{H}; R_2 = R_4 = \text{OH}$	Procianidina B3
$R_1 = R_4 = R_5 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{OH}$	Procianidina B4
$R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}$	Prodelfinidina

$R_1 = R_4 = \text{OH}; R_2 = R_3 = \text{H}$  Procianidina B5

$R_1 = R_3 = \text{OH}; R_2 = R_4 = \text{H}$  Procianidina B7

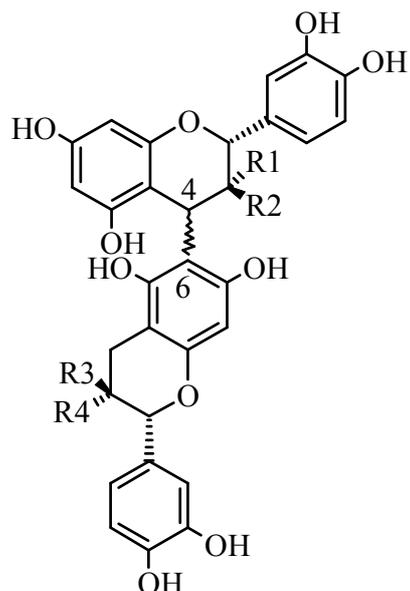


Fig. 15: strutture di alcune proantocianidine.

#### 1.4 MECCANISMI DI AZIONE DEI PRINCIPALI COMPOSTI ANTIOSSIDANTI

**ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DELLA VITAMINA C.** Dal punto di vista delle funzioni biologiche, l'acido L-ascorbico agisce da cofattore enzimatico, da "radical scavenger", nonché da donatore/accettore nel trasporto di elettroni nelle membrane plasmatiche.

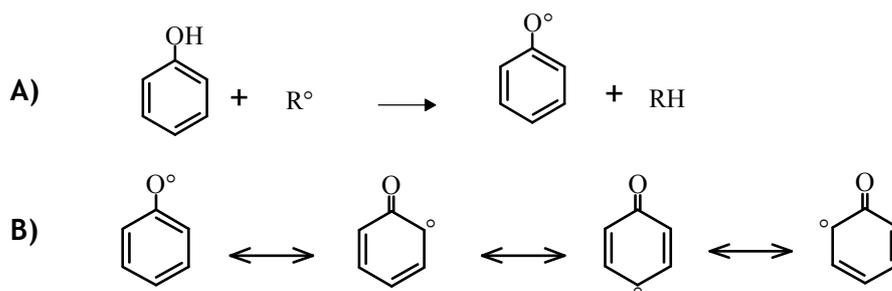
**ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DELLA VITAMINA E.** Il meccanismo di azione predominante dei tocoferoli, come agenti antiossidanti, è la donazione di un atomo di idrogeno con formazione del tocoferossil-radical (Lampi *et al.*, 2002).

**ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEI CAROTENOIDI.** I carotenoidi agiscono contro due tipi di ROS: l'ossigeno molecolare allo stato di singoletto ( $^1\text{O}_2$ ) ed i radicali perossilici. Inoltre sono effettivi disattivatori di molecole coinvolte nella generazione di radicali liberi e ossigeno singoletto (Truscott, 1990; Young e Lowe, 2001).

I carotenoidi agiscono contro l' $^1\text{O}_2$  con effetto “*quenching*” intervenendo sul trasferimento di energia tra le molecole. Infatti, i carotenoidi sono in grado di ricevere l'energia molecolare dell'ossigeno singoletto producendo ossigeno stabilizzato e caroteni eccitati allo stato di triplette. Invece di generare ulteriori reazioni chimiche, i carotenoidi dissipano l'energia in eccesso nel mezzo in cui si trovano. Inoltre, poiché nel corso di questa reazione i carotenoidi non si modificano, si rendono nuovamente disponibili per altri cicli di “ $^1\text{O}_2$  - quenching” (Stahl e Sies, 2003). L'efficacia dei carotenoidi come quencher è relazionata al numero di doppi legami; pertanto, il  $\beta$ -carotene, la zeaxantina, la criptoxantina, l' $\alpha$ -carotene e, soprattutto, il licopene sono molecole particolarmente attive da questo punto di vista. Il licopene è un carotenoide a catena lineare dalla cui ciclizzazione, ad un'estremo, si origina l' $\alpha$ -carotene, mentre per ciclizzazione su entrambe le estremità si ottiene il  $\beta$ -carotene. Nella mucosa intestinale degli animali, dal  $\beta$ -carotene, per azione enzimatica, si forma la vitamina A (Lotti, 1985).

Come detto in precedenza, i carotenoidi sono attivi anche contro i radicali perossilici come “spazzini” (*scavenger*) proteggendo le membrane cellulari e le lipoproteine dai danni dell'ossidazione (Sies e Stahl, 1995). E' tuttavia opportuno sottolineare che l'attività antiossidante dei carotenoidi dipende dalla presenza di altre specie antiossidanti, quali la vitamina E e C e dalla tensione dell'ossigeno presente nel sistema (Young e Lowe, 2001). A basse pressioni parziali di ossigeno, così come quelle che si riscontrano nei tessuti umani, il  $\beta$ -carotene inibisce l'ossidazione, mentre ad alte pressioni mostra effetti pro-ossidanti.

**ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEI COMPOSTI FENOLICI.** I fenoli sono antiossidanti a funzioni multiple: possono agire come agenti riducenti, antiossidanti donatori di idrogeno, quencher di ossigeno singoletto e agenti chelanti dei cationi metallici. L'attività antiossidante dei composti fenolici è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche ed alla geometria della molecola (Fig. 16). Le condizioni fondamentali, affinché sia esplicata l'attività antiossidante sono: la presenza degli antiossidanti in basse concentrazioni, rispetto al substrato di ossidazione, per ritardare o prevenire l'autossidazione o l'ossidazione mediata da radicali (Halliwell e Gutteridge, 1990) e la formazione di radicali fenolici stabili attraverso la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche.



**Fig. 16:** reazione generica di un composto fenolico con un radicale libero (A); la delocalizzazione dell'elettrone dell'ossigeno sull'anello aromatico contribuisce alla stabilizzazione della nuova specie radicalica formata (B).

L'attività antiossidante dei flavonoidi, ed il loro metabolismo in vitro, dipende anche dalla posizione dei gruppi funzionali nella struttura (Heim *et al.*, 2002).

La configurazione idrossilica dell'anello B è significativamente determinante per l'azione *scavenging* nei confronti dei ROS e degli RNS (specie reattive dell'azoto). Gli idrossili di tale anello cedono idrogeno, o un elettrone, ai radicali idrossilici, perossilici e perossinitriti stabilizzandoli, e trasformandosi a loro volta in un radicale flavonoide relativamente stabile.

Gli ossidrilici presenti sull'anello A (Fig. n. 5) hanno un'attività antiossidante decisamente più blanda rispetto a quelli dell'anello B. Tuttavia, in alcuni isoflavonoidi, i gruppi OH presenti in posizione 5 contribuiscono ad aumentarne la capacità antiossidante ed hanno una spiccata abilità *scavenging* nei confronti dei radicali perossinitrito.

Anche l'eterociclo contribuisce all'attività antiossidante per la presenza di un OH libero in posizione 3, e perché permette la coniugazione tra i due anelli aromatici A e B. Non è essenziale, ai fini dell'attività antiossidante, la presenza dell'eterociclo chiuso, dato che i calconi mostrano comunque una spiccata attività antiossidante.

L'angolo di torsione dell'anello B, rispetto al resto della molecola, condiziona le proprietà di "free radical scavenger". La planarità permette una migliore delocalizzazione elettronica e, di conseguenza, una maggior stabilità del radicale fenossilico dei flavonoidi. La differente attività antiossidante, tra flavonoidi poli-idrossilati e polimetossilati, è da attribuirsi fondamentalmente alle differenze di planarità e di idrofobicità delle molecole stesse. Ad esempio, la quercetina è uno dei più efficienti scavenger di radicali perossilici, ma le sue forme metilate e glicosilate sono molto meno potenti (Ioku *et al.*, 1995). Sebbene il grado di metossilazione non predichi l'abilità *scavenging* di un flavonoide, l'anello B è particolarmente sensibile alla posizione del gruppo metossi. Se si alterna la configurazione 6'-OH/4'-OMe con la configurazione 6'-OMe/4'-OH, si annulla

completamente l'attività scavenging nei confronti del DPPH radicale (2,2-difenil-1-picrilidrazile) per alterazione della planarità della molecola.

Nella dieta, i flavonoidi sono parzialmente glicosilati in posizione 3 e 5. Gli agliconi sono degli antiossidanti più potenti dei loro corrispettivi glucosidi; infatti, come la metossilazione, la glicosilazione interferisce con la planarità della molecola e la capacità di delocalizzazione degli elettroni. Il rutinosio è l'unico zucchero che, legato al flavonoide, non ne riduce l'attività antiossidante.

Anche il grado di polimerizzazione influenza l'attività antiossidante. Le procianidine dimere e trimere sono, effettivamente, più efficaci dei loro monomeri nell'azione contro l'anione superossido. Le procianidine tetramere sono più potenti dei trimeri, dimeri e monomeri nei confronti dello ione perossinitrito e superossido. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che solo le procianidine dimere e trimere sono molto resistenti all'idrolisi acida dello stomaco e, quindi, assorbibili dall'organismo umano nella loro forma originale.

Anche le proprietà chelanti dei flavonoidi e dei tannini contribuiscono al loro potere antiossidante. I punti di attacco degli ioni metallici sono l'*o*-diidrossi nell'anello B nelle posizioni 3' e 4', e la struttura carbonilica in posizione 4 con l'OH in posizione 3. I flavonoidi inibiscono il danno ossidativo rimuovendo e neutralizzando gli ioni ferro negli epatociti. La chelazione dello ione bivalente non necessariamente neutralizza il flavonoide che può mantenere la propria attività scavenger nei confronti dei ROS.

Riassumendo si può dire che i fenoli sono donatori effettivi di idrogeno; in particolare, sono molto attivi, in questo senso, i flavonoli come la quercetina (Rice-Evans *et al.*, 1995), i flavanoli come gli esteri dei catechin-gallati del tè verde e nero (Salah *et al.*, 1995), le antocianine del vino (Frankel *et al.*, 1993), ed i prenilpropanoidi (Castelluccio *et al.*, 1995), quali l'acido clorogenico del succo di mela (Miller *et al.*, 1995)

## **1.5 RUOLO SALUTISTICO ED EFFETTI BIOLOGICI DEGLI ANTIOSSIDANTI**

In questo paragrafo, si tratterà, in dettaglio, delle principali caratteristiche biologiche dei più comuni antiossidanti presenti e noti in natura. Le proprietà biologiche delle componenti antiossidanti del luppolo sono esposte a parte, nel paragrafo 1.6.

Diversi studi epidemiologici hanno indicato che il consumo frequente di antiossidanti naturali, essenzialmente introdotti nella dieta tramite frutta e vegetali, è associato ad un basso rischio di contrarre malattie cardiovascolari e cancro (Renaud *et al.*, 1998; Temple, 2000).

Block *et al.* (2004) hanno osservato che la vitamina C può ridurre i livelli di proteina C-reattiva (CRP), un marker usato per monitorare l'infiammazione delle malattie cardiovascolari. E' noto che l'acido ascorbico è in grado di eliminare i radicali superossido e idrossilico, e di rigenerare i tocoferoli (Davey *et al.*, 2000).

Gli effetti biologici dei tocoli sono dovuti al loro potere antiossidante, in modo specifico all'inibizione della perossidazione lipidica delle membrane biologiche. La vitamina E mostra effetti protettivi contro le malattie cardiovascolari e coronariche per l'azione inibente l'ossidazione del colesterolo LDL (Stampfer e Rimm, 1995). Recenti studi hanno evidenziato che i tocotrienoli possono essere più efficienti dei tocoferoli nel prevenire sia le malattie cardiovascolari che il cancro (Theriault *et al.*, 1999). Tutti i tocoli esibiscono attività antiossidante, a volte paragonabile, se non migliore, di quella dell' $\alpha$ - tocoferolo (Miller *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2003).

Nell'uomo è particolarmente significativo il ruolo degli  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenoidi che risultano coinvolti nella biosintesi di vitamina A, fattore essenziale per la riproduzione cellulare, il normale sviluppo dell'embrione e del feto e per le funzioni visive (Zile, 1998). Vari studi epidemiologici hanno dimostrato che una dieta ricca in carotenoidi è correlata ad un diminuzione del rischio di contrarre vari tipi di disordini degenerativi, inclusi alcuni tipi di cancro, malattie cardiovascolari e danni fotossidativi (Mayne, 1996; Stahl e Sies, 2001). In particolare, il basso livello di  $\beta$ -carotene, nell'organismo, è associato ad un alto rischio di cancro, così come ad una maggiore possibilità di infarto in soggetti fumatori (Rice-Evans *et al.*, 1997). Viceversa, eccessive concentrazioni di  $\beta$ -carotene nella dieta sembrano avere un effetto pro-ossidante (Palozza, 1998).

Oltre che contrastare i radicali liberi, i composti fenolici svolgono numerose attività biologiche come la protezione dei capillari sanguigni, l'azione antinfiammatoria, antibatterica, immuno-stimolante, antiallergica, antivirale, estrogenica ed anticancerogena (Robards e Antolovich, 1997; Cook e Samman, 1996; Cieczot, 2000; Hollman *et al.*, 1996; Kuntz *et al.*, 1999). E' stata inoltre dimostrata la loro azione inibente nei confronti di alcuni enzimi, quali la fosfolipasi A<sub>2</sub>, la cicloossigenasi, la glutatione riduttasi e la xantina ossidasi (Havsteen, 2002). Havsteen (2002) ha osservato che i polifenoli posseggono attività antivirale nei confronti dell'HIV, dell'Herpes simplex, di vari virus influenzali e del Rhinovirus. La relazione tra attività antiossidante (determinata con spettroscopia a risonanza di spin elettronico, ESR), attività vasodilatatrice e contenuto polifenolico è stata studiata *ex vivo* saggiando diversi vini, su dei conigli adulti. Il contenuto totale di polifenoli è risultato fortemente correlato con l'attività antiossidante e vasodilatatoria. All'interno delle varie classi di composti fenolici,

la maggiore attività antiossidante è stata esibita dall'acido gallico, dal resveratrolo e dalla (+) - catechina.

I flavonoidi, più che gli acidi fenolici, hanno un notevole effetto protettivo nei confronti delle LDL (low density lipoprotein). Tale fenomeno è stato ampiamente studiato in quanto si ritiene strettamente connesso con le fasi iniziali nel processo di aterosclerosi. Questo è dovuto sia all'azione diretta dei polifenoli come scavenger di radicali, sia alla rigenerazione della vitamina E nelle LDL a partire da un radicale  $\alpha$ -chromanossi (Davey *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000). Uno studio condotto da Chen *et al.* (1995) ha rivelato che l'epigallocatechingallato (EGCG) inibisce la crescita delle cellule del cancro del colon-retto. È stata valutata l'azione antiossidante dell'EGCG su un fenomeno degenerativo dei macrofagi nel peritoneo di ratto, che porta alla liberazione extracellulare di ROS ed intermedi azotati reattivi: a diverse concentrazioni, l'EGCG blocca la produzione di ossido nitrico da parte dei macrofagi, inibisce la liberazione extracellulare di ROS ed agisce sottraendo l'anione superossido.

Analogo discorso può essere fatto per le antocianine: dopo aver alimentato dei ratti con estratti ricchi di proantocianidine a diverse concentrazioni per tre settimane, si è valutato il recupero delle funzioni cardiache sui cuori isolati durante la riperfusione sanguigna post-ischemica. I risultati hanno evidenziato una diminuzione della fibrillazione e della tachicardia ventricolare indotta dalla riperfusione nel 92% delle cavie, il recupero del flusso coronario, aortico e lo sviluppo di pressione sono migliorati rispettivamente del 32%, 98% e 37%. In un altro studio, si è indotto un tumore sulla pelle di topi da laboratorio, e si sono eseguite applicazioni locali di un estratto di procianidine, valutandone l'effetto anti-tumor-promotore in termini di incidenza della malattia, molteplicità e volume tumorale. In base ai risultati ottenuti, sono stati separati i diversi polifenoli presenti nell'estratto ed è stata misurata l'attività antiossidante in termini di inibizione della perossidazione lipidica dell'epidermide. La relazione tra struttura ed attività ha evidenziato che l'aumento del grado di polimerizzazione aumenta il potenziale di inibizione dell'ossidazione; le procianidine con legame 4-6 hanno una maggiore attività inibitrice rispetto alle procianidine con legame 4-8, ed il gruppo gallato in posizione 3' incrementa l'inibizione dell'ossidazione lipidica a livello epidermico (Zhao *et al.*, 1999).

L'epicatechina, ed il suo principale metabolita in vivo, l'epicatechina-3'-metossi, sono state comparate in uno studio sull'attività protettiva verso la morte cellulare indotta da stress ossidativo su colture di fibroblasti umani trattati con perossido di idrogeno. Valutando la funzionalità mitocondriale ed i danni alle membrane, è stata evidenziata un'azione protettiva dell'epicatechina-3'-metossi simile a quella dell'epicatechina (Spencer *et al.*, 2001).

In generale si può affermare che gli antiossidanti possono agire sinergicamente nel ridurre i ROS. Ad esempio, l'attività combinata della quercetina, o delle catechine, con l'alfa tocoferolo è molto superiore alla somma dei singoli contributi, così come la combinazione di alfa tocoferoli, o vitamina C, e polifenoli.

Infine, anche ai lignani sono state attribuite proprietà antiossidanti ed effetti anticarcinogeni. In particolare, i lignani sono in grado di ridurre la produzione di ROS in alcuni tipi di cellule tumorali e del sistema immunitario (Cassidy, 1996).

## 1.6 MATERIE PRIME USATE NELL'INDUSTRIA BIRRARIA

I principali ingredienti, previsti dalla normativa vigente per la produzione di birra, sono:

- \* acqua
- \* malto d'orzo ed eventuali sucedanei
- \* lievito
- \* luppolo

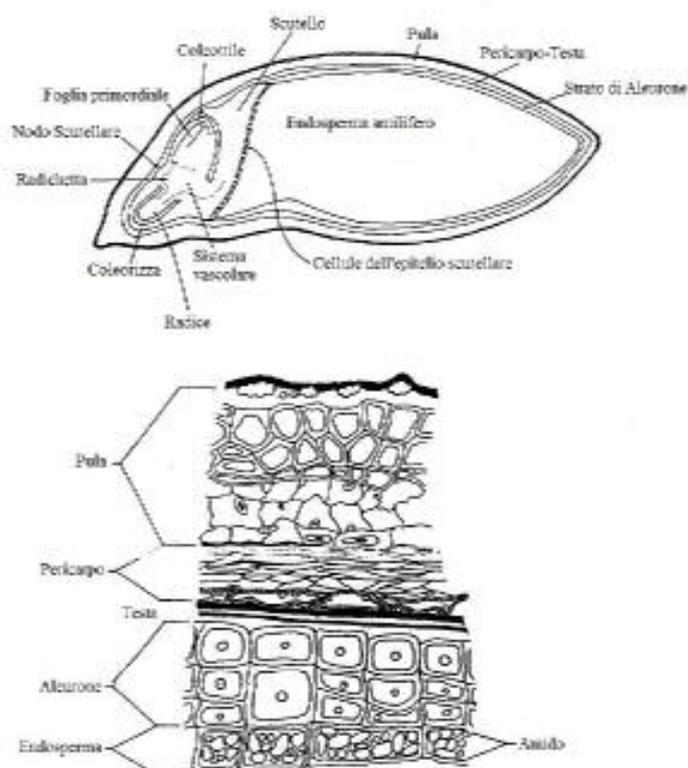
Di seguito sono descritti i singoli ingredienti, soffermandoci, in particolare, sulla composizione fisico-chimica dell'orzo e del luppolo, in quanto i principali antiossidanti che si ritrovano nella birra derivano da queste fonti (si veda paragrafo 1.9).

**L'ACQUA.** In termini quantitativi è l'ingrediente predominante nelle ricette birrarie: si stima che ne occorrono circa circa 700 l per ogni 100 l di birra prodotti. D'altra parte, l'acqua, per la sua composizione salina, ha un'importanza fondamentale nel caratterizzare il tipo di birra che si vuole produrre. Non a caso, nei secoli scorsi, i birrifici nascevano in prossimità di sorgenti: sia per gli ingenti quantitativi d'acqua necessari, sia perché la particolarità delle acque non era diversamente riproducibile. Le birre chiare erano fatte solo con acque molto "tenere" povere di sali (Pilsen in Cecoslovacchia); le birre scure con acque molto "dure" ricche di sali (Monaco di Baviera) (Zasio *et al.*, 1997). Acque troppo dure diminuiscono l'acidità del mosto, mentre le acque dolci, che sono in genere da preferire, danno origine a mosti più colorati, ma rallentano la separazione delle proteine durante la cottura e rendono più acre l'aroma della birra, favorendo la solubilità di alcuni componenti del luppolo (Varnam e Sutherland, 1994).

Oggi le caratteristiche di un'acqua, necessarie per la produzione di una certa tipologia di birra, sono aggiustate all'interno dell'industrie stesse, o modificando i livelli di ioni inorganici presenti (il processo è detto "bartonizzazione"), o tramite passaggio su

scambiatori di ioni acidi (il processo è chiamato “dealcalinizzazione”) (Bastasin e Ceresa, 1991). L’unico prerequisito per poter essere impiegate è la potabilità delle acque stesse.

**L’ORZO.** L’orzo distico (*Hordeum vulgare L. -distichum-*) è il cereale da sempre utilizzato nella produzione della birra, soprattutto perché germinando produce una maggiore quantità d’enzimi rispetto agli altri cereali, in particolare diastasi ( $\alpha$  e  $\beta$ -amilasi) (Sunier, 1988). La struttura della cariosside d’orzo, schematizzata in Fig. n. 17, è caratterizzata dalla sovrapposizione di diversi strati.



**Fig. 17:** struttura morfologica macroscopica (in alto) e microscopica (in basso) di una cariosside d’orzo (sezione longitudinale).

Dall’esterno verso l’interno, si trovano: le glume, il pericarpo, la testa, lo strato aleuronico, l’endosperma amilifero ed il germe. Le glume rappresentano il 10% circa del peso della cariosside e sono principalmente costituite da cellulosa, emicellulosa, lignina e da una piccola quantità di proteine. Lo strato aleuronico, che racchiude l’endosperma amilifero ed il germe, è costituito da cellule aleuroniche bi e tri-stratificate. Queste cellule presentano un nucleo con più nucleoli ed un citoplasma ricco di vacuoli proteici, noti come granuli di aleurone. L’aleurone contiene una quantità di proteine ed enzimi

connessi alla digestione dell'endosperma. Il pericarpo e la testa sono separati dalle glume da uno strato ceroso e sono di natura lipidale, per cui costituiscono una barriera protettiva per gli strati più interni della cariosside. L'endosperma amilifero è una risorsa di nutrienti per lo sviluppo dell'embrione. Nello strato sub-aleuronic le cellule amilifere sono allungate e si caratterizzano per l'elevato tenore proteico ed un basso contenuto in amido; al centro appaiono irregolari e ricche di amido, mentre più internamente si presentano cilindriche e meno ricche in proteine. Il germe è la parte embrionale della cariosside, dal quale si sviluppano la radichetta e la piumetta durante la germinazione.

La composizione chimica media di una cariosside è presentata nella Tabella n. 3.

Componenti	Quantità % sul peso secco
Amido	60-64
Arabinoxylani	4.4 -7.8
β-glucani	3.6 -6.1
Cellulosa	1.4 -5.0
Carboidrati semplici	0.4 -2.9
Oligosaccaridi	0.2 -1.8
Proteine	8.0 -15
Lipidi	2.0 -3.0
Sali minerali	3.0

**Tabella 3:** valori percentuali delle principali componenti chimiche di una cariosside d'orzo (MacGregore Fincher, 1993).

In genere l'umidità della cariosside alla raccolta varia tra il 12 ed il 13%. La composizione chimica della cariosside d'orzo varia notevolmente a seconda degli strati che si considerano.

Gli strati aleuronic e sub-aleuronic sono più ricchi in fibra e proteine, mentre l'endosperma è costituito prevalentemente da amido.

L'amido è il principale carboidrato presente e la sua concentrazione è inversamente proporzionale a quella della fibra alimentare. L'amido è costituito da due componenti: amilosio e amilopectina. Il rapporto tra le due componenti varia con il genotipo: nell'orzo normale l'amido è costituito per il 74-78% da amilopectina e per il 22-26% da amilosio; nei genotipi "waxy" è presente quasi esclusivamente l'amilopectina (98-100%); mentre nei genotipi "high-amylose" l'amido è costituito per il 44% da amilosio e per il 56% da

amiliopectina. Inoltre nell'endosperma amilifero sono presenti anche basse percentuali di zuccheri semplici (glucosio e fruttosio) e oligosaccaridi (maltosio).

Le proteine dell'orzo possono essere classificate in: proteine solubili in acqua (albumine), proteine solubili in soluzioni saline neutre (globuline), proteine solubili in soluzioni alcoliche (prolamine o ordeine) e proteine solubili in soluzioni acide o basiche (gluteline). Le albumine e le globuline, che costituiscono rispettivamente il 30 ed il 10% delle proteine totali dell'orzo, sono localizzate prevalentemente nello strato aleuronico e nel germe, mentre le gluteline e le ordeine, che costituiscono ognuna il 30% delle proteine totali, sono confinate nell'endosperma amilifero.

I lipidi sono principalmente localizzati nell'embrione. Di questi, il 65-78% sono trigliceridi, il 7-13% glicolipidi ed il 15-26% fosfolipidi. Sulla quota totale degli acidi grassi, i più abbondanti sono: l'acido linoleico (50-59%), l'acido palmitico (18-27%) e l'acido oleico (9-21%).

I pentosani ed arabinosilani, sono polisaccaridi non celluloseici abbondanti nelle pareti cellulari di aleurone e nell'endosperma amilifero. I pentosani contenuti nei semi d'orzo variano da un range da 4 a 7%, a seconda del genotipo e dei fattori di crescita. In generale, i pentosani dei cereali hanno pesi molecolari minori rispetto ai  $\beta$ -glucani e la loro viscosità in soluzione è data dalla loro asimmetria molecolare. Nella dieta umana, i pentosani, sono dei componenti della fibra fornita dai semi d'orzo o suoi prodotti; altri effetti dei pentosani sulla nutrizione umana non sono stati esaminati in dettaglio. I problemi attribuiti ai pentosani in fase di maltaggio e di produzione della birra, sono simili a quelli dei  $\beta$ -glucani (Vis e Lorenz, 1997).

Infine, tra i componenti minori della parete cellulare dell'orzo si ritrova la cellulosa, i glucomannani e gli (1-3)  $\beta$ -glucani (Bacic e Stone, 1981). La cellulosa, che costituisce solo il 2% della parete, è inglobata in una matrice di  $\beta$ -glucani e pentosani. I glucomannani (2% della parete) non sono stati purificati dalle pareti dell'orzo. Il deposito di (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -glucani nell'endosperma è attribuito allo stress fisiologico.

I  $\beta$ -glucani sono polisaccaridi di molecole di glucosio legate mediante legami glicosidici  $\beta$ -(1-3) e  $\beta$ -(1-4). Circa il 90% della catena polisaccaridica dei  $\beta$ -glucani è costituita da gruppi continui di due o tre residui glicosidici tenuti insieme con legami  $\beta$ -(1-4), e separati da un singolo residuo glicosidico unito con legame  $\beta$ -(1-3). La restante parte della catena polisaccaridica è costituita, invece, da lunghi gruppi con più di 14 residui glicosidici legati da legami  $\beta$ -(1-4). Questi lunghi blocchi sono indispensabili nel mantenimento della conformazione dei  $\beta$ -glucani (Buliga *et al.*, 1986). I  $\beta$ -glucani hanno una struttura piuttosto eterogenea per dimensioni, solubilità e struttura molecolare (Edney *et al.*, 1991). Nella

cariosside d'orzo sono distribuiti nelle pareti dell'endosperma amilifero e nello strato di aleurone e la loro concentrazione aumenta procedendo dall'esterno verso l'interno. Il contenuto di  $\beta$ -glucani nell'orzo, il cui valore medio è compreso tra il 4 ed il 7% (Åman e Newman, 1986), è influenzato sia da fattori genetici che ambientali. In genere l'orzo esastico ha un contenuto inferiore rispetto all'orzo distico. Nella struttura dei  $\beta$ -glucani sono presenti tracce di arabinosio e xilosio, insieme all'1% di proteine che, in genere, si trovano associate ai  $\beta$ -glucani. L'elevato peso molecolare, la struttura asimmetrica e il fatto che non sono molecole facilmente idratibili, i  $\beta$ -glucani sono caratterizzati dalla proprietà di formare soluzioni acquose molto viscosi (Vis e Lorenz, 1998). I  $\beta$ -glucani sono i maggiori componenti della frazione solubile della fibra alimentare e come tali esercitano, nel nostro organismo, una serie di effetti benefici correlati alla fibra alimentare, quali: rallentamento dello svuotamento gastrico ed incremento della peristalsi intestinale. Inoltre, ricerche sperimentali, negli ultimi anni, hanno evidenziato il ruolo dei  $\beta$ -glucani dell'orzo e dell'avena nel contenimento del livello di colesterolo e di glucosio ematico nell'uomo e in animali da laboratorio.

I principali sali minerali dell'orzo sono rappresentati da: fosforo e potassio (ognuno è circa 450 mg/100 g), calcio (circa 70 mg/100 g) e, in quantità minore, cloro, sodio, magnesio e zolfo (Ragaee *et al.*, 2006; Newman e Newman, 1991). Questi sono localizzati essenzialmente nello strato aleuronico e nel germe. Anche nell'orzo, come nella maggior parte dei cereali, i fitati legano irreversibilmente alcuni minerali, in particolar modo ferro, zinco, magnesio e calcio, riducendone la biodisponibilità.

I tocoli, estratti con i lipidi dell'orzo, sono rappresentati dai tocoferoli e dai tocotrienoli. Nell'orzo sono stati isolati tutti gli otto isomeri dei tocoli, la cui concentrazione media è di circa 21 g/kg di olio (Newman e MacGuire, 1985). La concentrazione di tocoli totali varia, a seconda dei genotipi, da 42 a 80 mg/kg. Fisicamente i tocotrienoli, sono concentrati soprattutto nell'endosperma e nella crusca, mentre il germe contiene essenzialmente  $\alpha$ -tocoferolo ed una quantità significativa di  $\beta$ -tocotrienolo. I tocoli rimangono inalterati durante il maltaggio e la birrificazione e si ritrovano, in alte concentrazioni, nei semi esausti dopo birrificazione (152.9 mg/kg), più dei carboidrati e delle proteine che vengono rimossi.

L'orzo è un'ottima fonte di vitamine del complesso B, in particolar modo tiamina, piridossina, riboflavina ed acido pantotenico, con piccole quantità di biotina ed acido folico. Sono stati ritrovati anche elevati livelli di niacina, di cui una quota legata alle proteine. Le vitamine liposolubili sono presenti in tracce, ad eccezione dell' $\alpha$ -tocoferolo localizzato prevalentemente nel germe.

IL MALTO D'ORZO significa cariossidi d'orzo, germinate e tostate, alle quali è stata asportata la piumetta e la radichetta. Questo si ottiene attraverso un processo, chiamato maltaggio, che viene effettuato nelle malterie. Il malto d'orzo giunge in birreria come materia prima che a sua volta subirà ulteriori trasformazioni.

Il maltaggio induce delle modificazioni chimiche nella cariosside, che si ripercuotono anche a livello di antiossidanti e non. Di seguito è riportata una descrizione sommaria del processo di maltaggio per comprendere come si degradano, o si generano, le microcomponenti dall'orzo al malto d'orzo. Scopo del maltaggio è:

- permettere lo sviluppo degli enzimi necessari, in fase di ammostatura, per la conversione dell'amido, presente nei granuli dell'endosperma nella cariosside, in zuccheri fermentescibili;
- permettere la solubilizzazione delle sostanze azotate;
- rendere il chicco abbastanza friabile da facilitarne la saccharificazione;
- aromatizzare il prodotto secondo il tipo di birra al quale è destinato.

Dopo l'operazione di pulitura, effettuata tramite vagli sull'orzo appena raccolto per allontanare paglia, corpi o semi estranei e cariossidi danneggiate, si procede alla calibratura per avere omogeneità nell'assorbimento d'acqua e quindi nella germinazione. Si utilizza un tamburo cilindrico a maglie di diverse dimensioni che permette di individuare tre classi d'orzo: le cariossidi con diametro minore di 2.2 mm (III classe) sono scartate e destinate all'alimentazione zootecnica. Lo stoccaggio in silos è indispensabile se si vuole garantire una produzione di malto annua, visto che la raccolta dell'orzo si concentra in un mese. Conservare l'orzo significa rallentare i processi respiratori regolando temperatura (minore di 15 °C), umidità (minore del 14%) e apporto d'ossigeno, in modo da evitare attacchi parassitari e da preservare la germinabilità dell'orzo anche per 15 mesi. La seguente operazione di macerazione ha lo scopo di fornire all'orzo, l'acqua e l'ossigeno necessari per l'avvio della germinazione. Il macero consiste in un'alternanza di fasi di immersione dell'orzo in acqua, con insufflazione di aria, a fasi di stazionamento dell'orzo senza acqua. L'apporto di ossigeno è essenziale per far respirare l'orzo che altrimenti innesca processi fermentativi producendo alcol etilico. L'intera operazione si svolge in 24-48 ore, a seconda del calibro della cariosside, della varietà dell'orzo e della temperatura dell'acqua (generalmente 12-18 °C): temperature elevate accelerano l'operazione ma rischiano di compromettere la vitalità del germe delle cariossidi e favoriscono la proliferazione di microrganismi sul chicco. Dalla vasca di macerazione, l'orzo è sistemato in un apposito locale, il germinatoio, in strati spessi anche 1 o 2 metri in cassoni o è ammassato in cilindri orizzontali ruotanti su rulli. Qui avviene la germinazione in condizioni

controllate, regolando parametri quali aerazione (tramite rivoltamento periodico della massa), temperatura (maggiore di 10 °C) e umidità (maggiore del 35%). La germinazione dell'orzo si manifesta con lo sviluppo prima della radichetta, e poi della piumetta, grazie alla degradazione e al consumo delle sostanze di riserva complesse contenute nell'endosperma. Durante la germinazione si ha quindi la sintesi di fitoregolatori (soprattutto acido gibberellico) e di enzimi idrolitici, che determinano:

- \* la degradazione delle pareti cellulari rendendole permeabili alle altre diastasi (enzima xilanasi,  $\beta$ -glucanasi, citasi ecc.);
- \* la demolizione delle ordeine e gluteline, che sono proteine di riserva, fino ad ottenere amminoacidi e frazioni azotate assimilabili dal lievito nella fermentazione (enzima proteinasi e peptidasi);
- \* l'attacco parziale dei granuli di amido con formazione di zuccheri fermentescibili in misura del 5% rispetto al quantitativo iniziale di amido (enzima  $\alpha$  e  $\beta$ -amilasi o diastasi) (Home *et al.*, 1999).

Dopo circa una settimana, la germinazione è interrotta con l'essiccamento, o torrefazione del malto, che avviene su griglie investite da correnti d'aria calda; le alte temperature applicate devitalizzano il germe e bloccano l'attività enzimatica. Tuttavia le diastasi, a differenza del germe, mantengono inalterate le loro proprietà cosicché l'amido può essere completamente modificato durante la fabbricazione della birra, in fase di ammostatura, se si creano le temperature ottimali per la ripresa dell'attività diastatica. Nella prima fase di essiccamento si adottano temperature inferiori a 60 °C cosicché l'umidità delle cariossidi passa da valori del 44-47% a valori inferiori al 10%. In un secondo momento si effettua il *colpo di fuoco* per inattivare gli enzimi e formare composti colorati e aromatici dalla reazione di Maillard; l'umidità si riduce ulteriormente dal 10% al 3.5-4.0%. Le temperature adottate (da 80 °C fino a 180 °C) e il tempo di trattamento (da 3 a 5 ore) variano a seconda della tipologia di malto che si vuol ottenere: malto chiaro per birre tipo Pilsen, malto scuro per birre scure tipo Monaco, malto caramello per birre speciali, malto colorante per birre scure. In pratica il colore del malto, e quindi della birra, dipende dalle modalità di torrefazione e dal grado di degradazione delle sostanze di riserva delle cariossidi germinate: più la degradazione è spinta, più sostanze azotate e zuccheri semplici possono contribuire alla reazione di Maillard conferendo aroma e colore al prodotto. Macerazione spinta, germinazione calda e lunga, essiccamento lento e colpo di fuoco ad elevate temperature permettono di avere malti scuri. Condizioni opposte danno malti chiari. Il malto essiccato è sottoposto a degerminazione meccanica per allontanare le piumette e le radichette che, essendo ricche di materiale proteico, aumenterebbero il tenore d'azoto della birra conferendogli un'aroma e un gusto sgradevole. Ogni 100 Kg di

malto si producono da 3 a 5 Kg di radichette che vengono destinate all'alimentazione zootecnica.

**I SUCCEDANEI DELL'ORZO:** sono materie prime rappresentate essenzialmente da zuccheri, o sciroppi zuccherini, e "grani crudi", impiegati nella misura massima del 40% calcolato sull'estratto secco del mosto. I primi sono usati, in conformità al D.M. n° 209 del 1996, per migliorare le caratteristiche della birra con un minimo aumento dei costi. Ad esempio, il caramello contribuisce al colore e all'aroma delle birre scure.

I grani crudi sono cereali non maltati, aggiunti nella fase di ammostatura come fonte di amido. Il motivo principale dell'utilizzazione dei grani crudi è da attribuirsi al loro minor costo rispetto al malto d'orzo. Non bisogna tuttavia trascurare gli effetti che tali aggiunte hanno sulle proprietà e sul flavour della birra. Infatti, i grani crudi, cedono al mosto minime quantità d'azoto solubile, e perciò possono considerarsi dei diluenti del contenuto totale di proteine, migliorando quindi la stabilità colloidale e la tenuta della schiuma della birra (Briggs *et al.*, 1981). I grani crudi maggiormente impiegati sono mais, riso, grano, avena, sorgo, manioca e orzo non maltato, sotto forma di farina, semola o fiocchi.

**IL LUPPOLO** è una pianta rampicante (*Humulus lupulus L.*) alta anche 7-9 metri, perenne, dioica, appartenente alla famiglia delle *Cannabaceae* (Fig. n. 18). Nella maggior parte dei Paesi, i produttori di luppolo coltivano piante femminili non fecondate, in quanto sono solo i fiori femminili, di forma conica, ad essere utilizzati in birreria: i luppoli con semi sono considerati di valore inferiore rispetto alle varietà "non seminate". Fanno eccezione le piantagioni inglesi in cui si coltivano varietà di luppolo fertili, ossia con semi, che hanno il vantaggio di essere meno suscettibili a varie malattie e generalmente sono più produttive rispetto a quelle senza semi (AA.VV. The Hop Atlas, 1994). I luppoli seminati sono ben adatti alla produzione di birra ad alta fermentazione, ma meno per birre lager and pils che hanno un più pronunciato aroma di luppolo. Ogni fiore femminile, presenta, alla base, una sostanza pulverolenta e gialla, in gergo chiamata luppolina. La luppolina contiene resine amare, oli essenziali, tannino e terpeni. Il valore birrario e commerciale del luppolo deriva dalle sua proprietà amaricanti ed aromatizzanti. In particolare, circa il 90% della sensazione di amaro della birra è dovuta a composti che si ottengono per isomerizzazione degli  $\alpha$ -acidi (umulone) e dei  $\beta$ -acidi (lupulone) durante la bollitura del mosto. Infatti, sia gli  $\alpha$ -acidi che i  $\beta$ -acidi, che si trovano nelle resine della luppolina, sono poco solubili nel mosto, mentre i loro isomeri (iso- $\alpha$ -acidi e iso- $\beta$ -acidi) sono molto più solubili e decisamente più amari rispetto alle molecole non isomerizzate.



**Fig. 18:** piante femminili di luppolo, in prossimità del periodo di raccolta dei coni, allevate secondo la tipica forma ad Y. Nella foto i tralicci di sostegno sono alti circa 5 metri.

Dal punto di vista tecnologico, le resine, congiuntamente con i tannini, migliorano la stabilità della schiuma, sia per la formazione di complessi metallici, sia grazie a forze di natura ionica tra le cariche negative degli iso-alfa-acidi e quelle positive degli ioni ammonio dei polipeptidi della schiuma (Blanco *et al.*, 2006). Inoltre, i tannini, in fase di fermentazione del mosto, provocano la precipitazione delle albumine, contribuendo a chiarificare naturalmente la birra. D'altra parte, questi composti sono anche responsabili di uno dei difetti più temibili, poiché, se la birra viene esposta alla luce, l'iso alfa acido si aggrega per fotosintesi a composti solforati che si formano durante la fermentazione; ne scaturisce un orrendo sapore, simile a quello dell'anguria, detto "gusto di luce" (Zasio G. *et al.*, 1997).

Oltre che in ambito birrario, i composti del luppolo sono noti da secoli nella Farmacopeia tradizionale per gli effetti che hanno sull'organismo umano. Agli oli volatili è attribuita azione sedativa; agli alfa e beta-acidi, e loro derivati, sono riconosciute proprietà antibiotiche e batteriostatiche (favoriscono dunque la conservazione della birra), mentre i flavonoidi del luppolo possiedono proprietà ormonali (De Keukeleire, 2003). Nella tabella n. 4, sono riassunte le proprietà/usi del luppolo nella medicina tradizionale. La coltivazione del luppolo per scopi medico-salutistici resta comunque marginale rispetto all'impiego che ne viene fatto nelle industrie birrarie.

---

### Usi del luppolo nella medicina tradizionale

---

Attività sedativa e soforetica  
Azione antibatterica (contro i batteri Gram positivi)  
Attività anti-infiammatoria  
Stimolazione della digestione  
Azione antidepressiva  
Effetti antiafrodisiaci  
Effetti diuretici  
Effetto antiobesità  
Rimedi contro le infezioni uro-ginecologiche  
Azione contro i sintomi della menopausa

---

**Tabella 4:** *usi e proprietà del luppolo nella medicina tradizionale. Circa l'1% della produzione mondiale di luppolo è destinata al mercato salutistico per la preparazione di composti generalmente volti ad alleviare i sintomi di stress ed insonnia. Il restante 99% della produzione è devoluto alle industrie birrarie (De Keukeleire, 2003).*

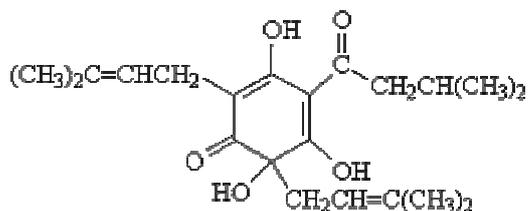
In tabella n. 5, è riportata la composizione chimica media di fiori di luppolo essiccati. Al momento della raccolta, l'umidità dei coni è intorno al 75-80% (peso/peso). Per preservare il prodotto nel tempo, i coni di luppolo sono essiccati in forni ad aria fino a che l'umidità raggiunge valori intorno al 10%. Le classi dei composti citati in tabella 5 sono descritte di seguito, focalizzando l'attenzione sulle componenti antiossidanti del luppolo.

Le resine totali rappresentano la frazione del luppolo solubile sia in alcol metilico (a freddo) sia in dietil-etero. Sulla base della loro solubilità in solventi organici sono distinte in "soft resins" e "hard resins". Le soft resins, solubili in esano e in idrocarburi paraffinici, comprendono gli alfa e beta-acidi; le hard resins, non solubili in idrocarburi paraffinici, includono invece i prodotti di ossidazione degli alfa e beta-acidi. In realtà, sono state identificate diverse strutture chimiche sia per gli alfa-acidi che per i beta-acidi: umulone, co-umulone, ad-umulone, lupulone, co-lupulone, ad-lupulone con i relativi isomeri (Moir, 2000) (Fig. n. 18).

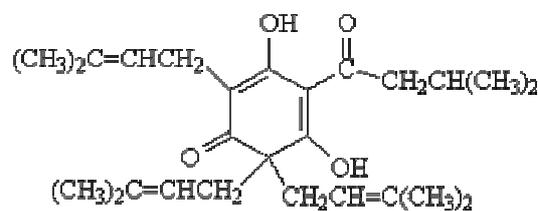
Composti	Quantità % (p/p)
Acqua	10.0
Resine Totali	15.0
Olii essenziali	0.5 - 3.0
Tannini e polifenoli	4.0 - 6.0
Zuccheri monosaccaridi	2.0
Pectine	2.0
Aminoacidi	0.1
Proteine (N x 6.25)	15.0
Lipidi and Cere	3.0
Ceneri	8.0
Cellulosa and lignina	40.0

**Tabella 5:** principali classi di composti presenti nei coni di luppolo essiccati, espresse in termini quantitativi in percentuale peso/peso (da European Brewery Convention, 1997).

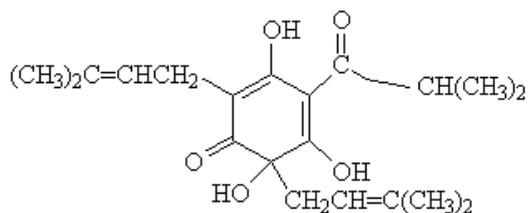
**Umulone**



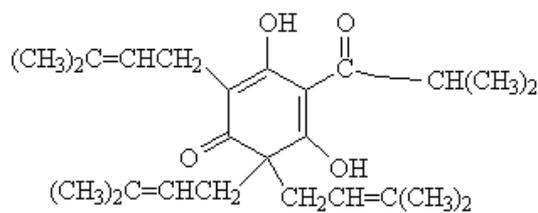
**Lupulone**



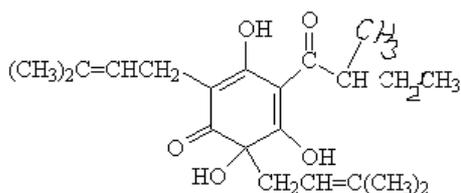
**Co-umulone**



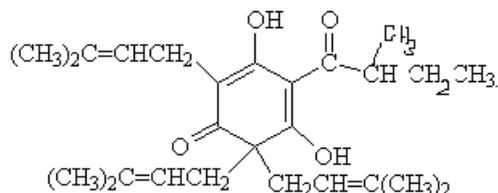
**Co-lupulone**



**Ad-umulone**



**Ad-lupulone**

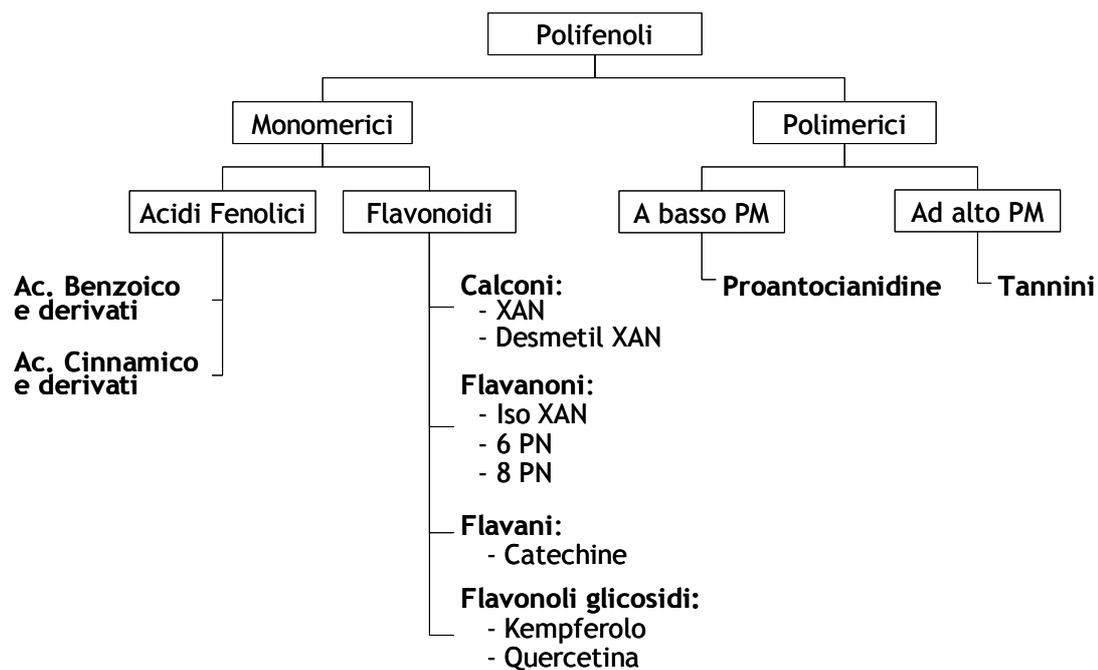


**Fig. 18:** strutture chimiche dei principali alfa acidi e beta acidi identificati nel luppolo.

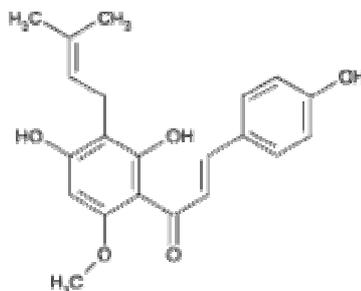
L'umulone, l'alfa-acido più rappresentato, inibisce l'osteoporosi già a bassi livelli di concentrazione (Tobe *et al.*, 1997) ed esercita una pronunciata attività antinfiammatoria (Yamamoto *et al.*, 2000). Inoltre, inibisce l'angiogenesi e la crescita incontrollata di cellule endoteliali (De Keukeleire, 2003). Sotto questi aspetti, i beta-acidi sono molto meno attivi, ma a quest'ultimi è attribuita l'azione antibatterica contro i Gram-positivi.

Gli olii essenziali del luppolo rappresentano un complesso insieme di composti (ne sono stati individuati più di 300), gran parte dei quali di natura volatile. Dall'analisi qualitativa è emerso che la composizione chimica degli olii essenziali è varietà-dipendente e pertanto può essere usata per identificare le varietà di luppolo (Kovačević e Kač, 2002). Chimicamente gli oli essenziali sono terpeni idrocarboniosi e loro prodotti di ossidazione, tra cui si annoverano: monoterpeni (es. mircene, farnesene), sesquiterpeni (es. alfa-umulene e beta-cariofillene), alcoli (es. linalolo), esteri (es. 2-metilpropilisobutirato), acidi carbossilici (es. acido 2-metil butirrico), sulfidi (es. 1,2 epitiumulene) (Moir, 2000). Ad oggi, non si sa ancora se gli olii essenziali del luppolo siano anche bioattivi nello svolgere funzioni salutistiche nell'organismo umano.

Nei coni femminili, la concentrazione dei polifenoli varia mediamente dal 3 al 6% (p/p) sul peso secco. I fenoli presenti nel luppolo sono elencati in Fig. n.19, in cui si ripropone lo schema modificato di Kamhuber *et al.* (1998) per la classificazione sistematica dei polifenoli del luppolo. Lo xantoumulone (3'-[3,3-dimetil allil]-2',4',4-triidrossi-6'-metossicalcone) è un calcone prenilato, così come il desmetilxantoumulone (DesmetilXAN): entrambi sono caratterizzati dalla presenza, nella struttura chimica, del gruppo prenico e dell'anello centrale aperto (Fig. n. 20). Oggi, le nuove tecniche cromatografiche e spettroscopiche, hanno permesso di identificare molte altre strutture analoghe alle principali. A titolo di esempio, oltre allo xantoumulone (XAN), sono state isolate, nella resina di luppolo, altre 13 forme di calconi, ma ad una concentrazione da 10 a 100 volte minore di quella dello XAN (Stevens e Page, 2004).

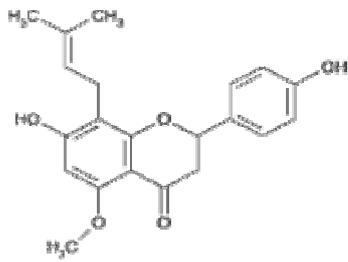


**Fig. 19:** classificazione sistematica dei principali composti fenolici del luppolo (da Kammhuber et al. (1998)). Nello schema sono state usate le seguenti abbreviazioni: XAN per Xantoumolone; Desmetil XAN per Desmetilxantoumolone; Iso XAN per Isoxantoumolone; 6 PN per 6-prenilnaringenina; 8 PN per 8-prenilnaringenina; PM per Peso Molecolare.

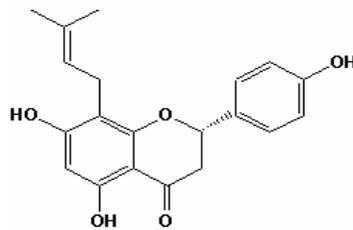


**Fig. 20:** struttura chimica dello Xantoumolone.

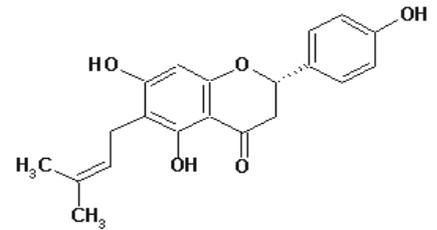
Anche i flavanoni del luppolo possiedono il gruppo prenico, ma gli anelli ciclici sono tutti chiusi (Fig. n. 21).



Isoxantoumulone



8-Prenilnaringenina



6- Prenilnaringenina

**Fig. 21:** strutture chimiche dei flavanoni: Isoxantoumulone, 8-Prenilnaringenina e 6-Prenilnaringenina.

Nel regno vegetale, i prenilflavonoidi sono stati isolati solamente in poche famiglie di piante superiori. In particolare, quattro prenilcalconi, tra cui lo xantoumulone, sono esclusivi del luppolo, nel senso che, ad oggi, non sono stati individuati in nessun'altra pianta. Tra i prenilflavonoidi, XAN è di gran lunga il più rappresentato (0.1-1% sul peso secco) (Stevens e Page, 2004). Generalmente i composti fenolici del luppolo sono localizzati intracellularmente; viceversa i prenilflavonoidi sono secreti dalle ghiandole di luppolina insieme ai composti amari e agli oli essenziali del luppolo (Stevens *et al.*, 1998). Il gruppo libero -OH, nella struttura dei calconi, rende possibile l'isomerizzazione dello XAN nel corrispondente flavanone: l'Isoxantoumulone (IsoXAN). Questa conversione, che è in pratica una reazione di ciclizzazione, è indotta per via termica, tramite riscaldamento. Analogamente, il DesmetilXAN, presentando 2 gruppi OH liberi, può originare due diversi isomeri, la 6 prenilnaringenina (6 PN) e l'8 prenilnaringenina (8 PN). Sebbene XAN sia il più abbondante nel luppolo, nella birra è tra i prenilflavonoidi meno presenti a causa della sua isomerizzazione termica durante il processo tecnologico. Non è ancora chiaro se l'8 PN e gli altri flavanoni prenilati siano propri del luppolo o se siano artefatti che si generano solo in seguito ad isomerizzazione dei relativi precursori. Stevens e Page (2004) ritengono che la maggior parte del contenuto di 8 PN, negli estratti di luppolo e nella birra, si formi dal DesmetilXAN per ciclizzazione, spontanea o indotta dal calore nel corso dei trattamenti tecnologici. Il DesmetilXAN è stato trovato in tracce solo in alcune tipologie di birra *Pale Ale*: generalmente nella birra è del tutto assente (Stevens *et al.*, 1999).

Poiché l'introduzione nella dieta di XAN, e degli altri prenilflavonoidi derivati, avviene solo bevendo birra, da un'indagine sulla popolazione americana, che consuma mediamente 225 ml di birra al giorno, si è stimato che il quantitativo di prenilflavonoidi introdotti quotidianamente nell'organismo dovrebbe essere di circa 0.14 mg, con IsoXAN quale principale prenilflavonoide formatosi durante la bollitura del mosto (Stevens *et al.*, 1999).

In vitro, XAN ha manifestato un ampio spettro di azioni nella chemioprevenzione del cancro, inibendo l'attivazione metabolica di agenti pro-tumorali, stimolando l'azione degli enzimi coinvolti nella detossificazione carcinogenetica e, infine, inibendo la crescita del tumore in stadio precoce. In quest'ultima accezione, XAN è risultato il prenilflavonoide con l'azione citotossica più spiccata (Miranda *et al.*, 1999) nell'inibire la proliferazione di cellule tumorali del seno, colon e ovaie (Gerhauser *et al.*, 2002). Come agente anticarcinogenetico, XAN è in grado di: bloccare l'attività del citocromo P 450, che è un enzima che media il metabolismo di attivazione di alcuni agenti tumorali (es: benzo[a]pireni: BaP); inibire l'attivazione metabolica della 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] chinolina (IQ), che è un attivatore carcinogenetico trovato nella carne cotta (Miranda *et al.*, 2000a); potenziare l'attività della chinone-riduttasi, un'enzima che interviene nei meccanismi di "detossificazione" nei confronti di certi agenti carcinogenetici (Stevens e Page, 2004). Inoltre, lo XAN e il deidro-cicloxantoumolone idrato, sono responsabili dell'inibizione, testata su cavie, della diacilglicerol transferasi, un'enzima del fegato coinvolto nel metabolismo di formazione di triacilgliceroli. L'inibizione di questo enzima può ridurre il rischio di ipertrigliceridemia e il rischio associato a malattie quali il diabete e l'aterosclerosi (Tabata *et al.*, 1997; Stevens *et al.*, 2003). Mizobuchi e Sato (1984) hanno indagato sull'attività antimicrobica di XAN, IsoXAN, 6 PN e 8 PN, concludendo che la presenza della funzione prenilata nella struttura di questi flavonoidi è coinvolta nell'azione antimicrobica, in quanto renderebbe le molecole sufficientemente lipolitiche da passare le membrane cellulari microbiche. Nessun flavonoide è attivo contro *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* ed *Escherichia coli*; infine, umulone e lupulone sono molto meno efficienti dei prenilflavonoidi contro *Trichophyton* spp. e *Mucor rouxianus*, ma sono efficaci contro *Fusarium oxysporum* (Mizobuchi e Sato, 1985). Infine, XAN è attivo contro la formazione dei ROS, quali: il radicali idrossile, perossile e l'anione superossido (Gerhauser *et al.*, 2002); in vitro si è rivelato addirittura più efficiente dell'alfa-tocoferolo e della genisteina, ma meno valido della quercetina (Miranda *et al.*, 2000b). La potenza di Xan come antiossidante è considerevolmente maggiore se si trova combinato con un'equivalente quantità di vitamina E. IsoXAN, naringenina e calconaringenina non hanno esibito nessuna attività antiossidante (Miranda *et al.*, 2000b; Gerhauser *et al.*, 2002). Per buona parte l'attività antiossidante dei flavonoidi si può attribuire al gruppo prenil. Infatti, la calconaringenina e la naringenina, che non hanno gruppi prenilici, agiscono promuovendo l'ossidazione dell'LDL; tuttavia, se alle molecole di questi flavonoidi si aggiunge il gruppo prenil, la loro azione pro-ossidante viene annullata.

L'8 PN è il più potente fitoestrogeno che si conosca ad oggi (De Keukeleire, 2003). I fitoestrogeni sono metaboliti secondari delle piante che, essendo strutturalmente simili all'ormone endogeno 17,beta-estadiolo, possono interagire con il sistema ormonale della

donna e, in minor misura con quello dell'uomo. Le piante producono questi fitoestrogeni come meccanismi di difesa, messi a punto nel corso dell'evoluzione, per "disturbare" il sistema riproduttivo di alcuni predatori. In natura si conoscono quattro classi di fitoestrogeni: gli isoflavoni, i flavavoni, i lignani e i cumestani. L'estrogenicità dell'8 PN è stata dimostrata da diverse ricerche indipendenti (Kitaoka *et al.*, 1998; Milligan *et al.*, 1999; Milligan *et al.*, 2000; Coldham e Sauer, 2001; Zierau *et al.*, 2002; Gerhauser *et al.*, 2002) dalle quali è anche emerso che l'8 PN è più attivo anche del cumesterololo del trifoglio rosso e della genisteina e dadzeina della soia. Viceversa, XAN è completamente inattivo come fitoestrogeno, mentre svolgono attività estrogenica molto blanda IsoXAN e la 6 PN (De Keukeleire, 1997). L'8 PN esercita la sua attività legandosi ai recettori ormonali in competizione con il più potente 17 $\beta$ -estradiolo. Per questo motivo potrebbe agire contro il cancro dell'utero, del seno e, nell'uomo, potrebbe inibire l'iperplasia benigna della prostata (Rong *et al.*, 2001; De Keukeleire, 2003). Infine, Pepper *et al.* (2004) hanno dimostrato che, in cellule di bovino, l'8 PN inibisce l'angiogenesi.

Nonostante questa lista di interessanti aspetti salutistici, è ancora prematuro speculare sugli aspetti benefici, per l'organismo umano, connessi all'introduzione di prenilflavonoidi tramite consumo di birra (Stevens *et al.*, 1998; Nikolic *et al.*, 2004). Infatti, l'assunzione giornaliera di prenilflavonoidi è molto esigua, soprattutto se confrontata con il quantitativo degli altri polifenoli presenti nella birra (42 mg espressi come catechine equivalenti al giorno, Vinson *et al.*, 2003). Tuttavia, la natura anfifilica dei flavonoidi prenilati, li rende particolarmente interessanti per l'attività che possono svolgere nei sistemi biologici (Stevens *et al.*, 2003). Il carattere polare è conferito dalla presenza dei gruppi fenolici, mentre il gruppo prenilo contribuisce a quello lipofilo. Ulteriori studi sono necessari per validare i risultati ottenuti in vitro, nonché per assodare i rischi, per la salute umana, legati all'uso, peraltro crescente, di integratori a base di estratti vegetali, contenenti un'alta percentuale di prenilflavonoidi.

Tra i flavonoli glicosidici, il kempferolo e la quercetina sembrano essere quelli maggiormente rappresentati negli estratti acquosi e alcolici di coni di luppolo (Sägesser e Deinzer, 1996). In particolare, sono stati identificate le seguenti forme glicosidiche: 3-O-glucoside, 3-O-rutinoside (o ramnoglucoside) e 3-O-malonilglucoside del kempferolo e della quercetina (Stevens *et al.*, 1998). La quantità di quercetina e kempferolo presente nella birra contribuisce in buona parte al suo potere antiossidante, ad un livello almeno pari a quello del vino (De Keukeleire, 2003). La quantità totale di proantocianidine del luppolo varia dallo 0.5 al 5% del peso secco, a seconda della varietà considerata e del metodo di analisi usato (Neve, 1991). Chimicamente sono oligomeri di catechine, che variano dalla forma dimera a quella di ottameri; una minor percentuale di oligomeri contiene uno o due

unità di gallo catechine (Bravo, 1998; Fine, 2000). Si stima che circa il 70-80% delle proantocianidine della birra derivino dall'orzo, mentre solo un 20-30% origini dal luppolo. Le proantocianidine del luppolo sono strutturalmente simili a quelle trovate nell'orzo: la principale differenza è nella più alta proporzione di unità di gallo catechine negli oligomeri di orzo (Stevens *et al.*, 2002). Stevens *et al.* (2002) hanno studiato la struttura delle proantocianidine negli estratti delle infiorescenze femminili di luppolo avvalendosi della Spettrometria di Massa. Ne è emerso che le unità di catechine, che compongono gli oligomeri, sono presenti con le seguenti proporzioni: 24% dimeri, 27% trimeri, 15% tetrameri, 14% pentameri, 10% esameri, 6.5% eptameri e 3.5% ottameri, con solo una o due unità di gallo catechine. Sono ancora in corso studi sulle strutture di altri oligomeri isolati nella medesima matrice di proantocianidine. Lo stesso Stevens ha trovato che la miscela di quattro procianidine dimere (B1-B4) più una trimera (epicatechina-(4 $\beta$ →8)-catechin--(4 $\alpha$ →8)-catechina) è un potente inibitore dell'attività dell'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS). Tra gli oligomeri, la procianidina B2 è la più efficace contro i nNOS, mentre nessuna attività è stata registrata per la B3, la catechina e l'epicatechina. D'altra parte, tutti gli oligomeri testati individualmente, nonché le loro miscele, sono forti inibitori della 3-morfolinossidomina (SIN-1) che induce l'ossidazione dell'LDL. In generale, le proantocianidine esercitano diverse azioni benefiche sulla salute umana, offrendo protezione contro malattie cardiovascolari, disordini immunitari e malattie di tipo neurologico (Sanbongi *et al.*, 1997; Plumb *et al.*, 1998; Packer *et al.*, 1999; Bagchi *et al.*, 2000; Lotito *et al.*, 2000). Questi effetti sarebbero dovuti essenzialmente al loro pronunciato carattere di radical scavenger. L'attività antiossidante è relazionata alla lunghezza della catena: le catechine trimere sono efficienti più dell' $\alpha$ -tocoferolo o dell'acido ascorbico come antiossidanti (Plumb *et al.*, 1998; Lotito *et al.*, 2000).

Infine si accenna alla recente scoperta del trans-resveratrolo e di alcuni suoi isomeri nelle pellets di luppolo. Callemien *et al.* (2005) hanno quantificato il resveratrolo, tramite HPLC-APCI(+)-MS/M, nella misura di 0,5 fino ad 1 ppm di *trans*-resveratrolo e nessuna forma di *cis*-resveratrolo in nove cultivars di pellets. Il trans-resveratrolo è uno stilbene, sintetizzato dalle piante come "fitoalessina", in risposta ad infezioni fungine (Jeandet *et al.*, 1995; Langcake e Pryce, 1976). E' noto che la presenza di resveratrolo, identificato anche nell'uva, mirtillo e more, è correlata con una certa attività anticarcinogenica, antiossidante, antinfiammatorio ed estrogena.

In conclusione, considerando che meno di un terzo dei polifenoli presenti nella birra provengono dal luppolo, si può affermare che solo i composti del luppolo con spiccata bioattività, evidente già a basse concentrazioni, possono esibire proprietà salutistiche.

Oggi il luppolo è usato in fiore solo nelle lavorazioni artigianali, in quantità pari a 2-5 etti per ogni ettolitro di birra, a seconda della varietà di luppolo impiegato e dello stile di birra che si vuol produrre. Indicativamente, per birre chiare di tipo speciale, si aggiunge 300-350 g di luppolo/hl; per le scure 120-150 g/hl, così si conserva un aroma di malto più pronunciato. Le industrie impiegano concentrato di luppolo (solido o fluido), prodotto macinato, essiccato, estruso (pellets) o estratti degli alfa acidi. Alcune varietà della pianta di luppolo sono divenute famose per l'uso che se ne è fatto nell'industria birraria. Il Saaz è impiegato per le pilsner; in Nord America troviamo il forte Northern Brewer e il più tenue Willamette; in Inghilterra sono noti il Fuggles, Goldings, Challenger, etc.

Si distinguono due diverse tipologie di luppolo: varietà aromatizzanti e varietà amaricanti, a seconda della prevalente caratterizzazione che impartiscono alla birra. D'altra parte, il luppolo ha un'azione diversa in rapporto al momento in cui viene aggiunto al mosto: più amaricante all'inizio dell'ebollizione, più aromatizzante alla fine, in quanto l'isomerizzazione degli alfa acidi nei relativi composti amari richiede circa 90 minuti.

**IL LIEVITO.** E' un microrganismo unicellulare appartenente al genere *Saccharomyces*, che può vivere sia in condizioni di aerobiosi che in anaerobiosi. La sua funzione è quella di attivare la fermentazione, ovvero una serie di reazioni chimiche che permettono di ottenere come prodotti principali alcol etilico e anidride carbonica. Risale solo al XIX secolo la pratica di aggiungere al mosto colture pure di questo microrganismo, allo scopo di controllare il processo ed evitare lo sviluppo di gusti cattivi nella birra, dovuti all'insorgere di fermentazioni anomale. A seconda della specie di lievito impiegata, distinguiamo due metodi di fermentazione: l'"alta" e la "bassa fermentazione". La prima, la più antica dopo quella spontanea, prevede l'impiego del *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. n. 22). Questo lievito, che ha uno sviluppo ottimale tra 15 e 25 °C, dopo aver consumato tutto lo zucchero presente nel mosto, affiora sulla superficie del tino di fermentazione: le birre che si ottengono sono definite *Ale*. Nel secondo metodo si impiega il *Saccharomyces carlsbergensis*, riclassificato e riconosciuto oggi come *Saccharomyces pastorianus* (Vaughan e Martini, 1998). Per semplicità, dato che nella normativa vigente tale lievito è ancora oggi denominato con la vecchia dicitura, anche qui si continuerà ad usare l'aggettivo *carlsbergensis* per identificare questo microrganismo. L'optimum di azione per il *Saccharomyces carlsbergensis* è compreso tra 8 e 12 °C e, a fine processo, si deposita sul fondo delle vasche: la birra che si ottiene è detta *Lager*. Oggi questo termine è inflazionato e viene di solito usato per descrivere il tipo di birra più diffuso al mondo: chiara, di mediocre alcolicità, non particolarmente caratterizzata nel gusto e negli aromi. Al contrario *Ale*, in senso stretto, può essere usato per identificare una famiglia di birre

inglesi aromatiche. Il ceppo di lievito impiegato è fondamentale non solo nel determinare il tipo di fermentazione, ma perché è in grado di caratterizzare la birra in ogni suo aspetto, dalla schiuma agli aromi, alla ricchezza del corpo. Per questo ogni produttore attinge alle proprie colture di lieviti, talvolta tramandate attraverso le generazioni



Fig. 22: cellule di *Saccharomyces cerevisiae* viste al microscopio elettronico.

### 1.7 COMPOSIZIONE CHIMICA DELLA BIRRA E SUE PROPRIETÀ SALUTISTICHE

La composizione di una birra varia notevolmente a seconda della tipologia di prodotto che si considera. La normativa italiana in vigore distingue le birre fondamentalmente in base a: contenuto d'alcol, espresso in gradi alcolometrici (% volume), e grado saccarometrico iniziale, espresso in gradi Plato (°P) volume (Tabella n. 6). Un grado Plato volume corrisponde ad 1 grammo di zucchero in 100 ml di mosto prima della fermentazione.

Tipo di birra	Contenuto in alcol (% vol.)	Grado saccarometrico (°P)
Birra	superiore a 3.5	superiore a 10.5 fino a 12.4
Birra Speciale		non inferiore a 12.5
Birra Doppio Malto		non inferiore a 14.5
Birra Light	superiore a 1.2 fino a 3.5	compreso tra 5 e 10.5
Birra Analcolica	non superiore a 1.2	compreso tra 3 e 8

**Tabella 6:** tipologie di birra contemplate dall'art. 2 della Legge 16.8.62 n. 1354 (Disciplina igienica della produzione e del commercio della birra), così come sostituito dal D.P.R. 30.6.98 n. 272. La birra può essere denominata "speciale" o "doppio malto" a seconda del grado plato; la normativa non specifica il titolo alcolometrico, il cui valore minimo è da intendersi, pertanto, uguale a quello di una birra normale.

A fronte di questi parametri merceologici e molto restrittivi, il ventaglio di birre che si producono oggi è molto ampio: Lager, Ale, Rosse, Stout, Trappiste, etc. Inoltre,

all'interno di una stessa categoria di birra, la composizione, il sapore e l'aroma variano da Paese a Paese, a seconda del gusto e delle tradizioni birrarie consolidate negli anni.

Considerando quanto detto, si descriverà la composizione chimica di una birra riportando i valori medi di una birra italiana normale, con eventuali altri riferimenti anche ad altre tipologie di birre. I maggiori componenti della birra sono: acqua, alcol, carboidrati e proteine. Questi composti, le cui proprietà nutrizionali e fisiologiche sono ben note, sono accompagnati da una serie di microcomponenti, molti dei quali rivestono anche un'interessante ruolo fisiologico (De Stefano e Montanari, 1996).

**MACROCOMPONENTI:** la quantità d'acqua varia tra il 91 e il 95%, mentre il contenuto d'alcol tra il 3.5-5.0% a seconda della tipologia di birra. Ogni grammo di alcol apporta 7,1 Kcal. Questo incide notevolmente sul contenuto calorico della birra. Considerando che le proteine, che apportano circa 4 Kcal/g, sono presenti nel prodotto finito per lo 0.2-0.65%, mentre i carboidrati, che forniscono 3.75 Kcal/g, variano dal 3 al 4.5%, il contenuto totale calorico di birra normale è di circa 40-45 Kcal per 100 ml di prodotto. Questo valore è più basso dell'apporto energetico fornito, ad esempio, dai comuni soft drink, succhi di frutta, vino o dallo stesso latte intero, ovviamente a parità di quantità introdotta.

La frazione proteica (0.2-0.7%) è costituita per la maggior parte da polipeptidi, che derivano dal malto, e da amminoacidi che, per un 30% circa, derivano dal metabolismo del lievito. In questa frazione sono rappresentati quasi tutti gli amminoacidi essenziali.

Il 3.0-4.5% è costituito da carboidrati. In particolare, il 75-80% dei carboidrati è rappresentato da destrine, il 10-15% da zuccheri semplici e il 7-15% da pentosi, pentosani e  $\beta$ -glucani.

**MICROCOMPONENTI:** meno dell'1%, sono rappresentati da minerali ed elementi in tracce, vitamine, acidi organici, polifenoli e composti amari ed aromatici.

Gli elementi e i minerali presenti nella birra provengono per la maggior parte dal malto (potassio, magnesio e fosfati) e dall'acqua usata durante il processo tecnologico (calcio, solfati e cloruri) (Devreux, 1986). L'elevato contenuto di potassio (160-500 mg/l), contrapposto alla bassa concentrazione di sodio, può arrecare vantaggio nella terapia dell'ipertensione, nella profilassi dell'infarto cardiaco e stimolare la diuresi più di alcuni tipi di acque. Altri elementi presenti in notevole quantità sono il magnesio (circa 150 mg/l) e il fosforo (circa 500 mg/l). E' invece da considerarsi vantaggioso il contenuto di rame, ferro e piombo, che sono presenti nella birra in quantità assolutamente trascurabili sotto il profilo nutrizionale e fisiologico. Le proprietà organolettiche della birra vengono influenzate negativamente da tali metalli, cosicché la tecnologia di produzione, e

soprattutto la scelta di impianti idonei, permettono di ottenere birre pressoché esenti da tali elementi.

Le vitamine contenute nella birra derivano dal malto e molte appartengono al gruppo B, come l'acido pantotenico (0.4-1.2 mg/l). Sono presenti, inoltre, la vitamina C (20-50 mg/l), l'acido nicotinico (5-20 mg/l), la biotina (5 mg/l) ed altre in minor misura. Tutte le vitamine sono fosforilate e quindi in forma assimilabile dal nostro organismo (De Stefano e Montanari, 1996). Il contenuto di tiamina è basso (0.005-0.15 mg/l), pur essendone ricco il lievito. Questo fenomeno deriva essenzialmente dall'abitudine del consumatore moderno di pretendere una birra perfettamente limpida; la tecnologia di produzione provvede quindi ad un'accurata filtrazione che, togliendo ogni traccia di lievito prima della commercializzazione, determina contemporaneamente un impoverimento di tiamina nel prodotto.

I sali degli acidi organici influenzano il gusto della birra. I più rappresentati sono i citrati (circa 130 mg/l), che hanno potere antiossidante, i piruvati (circa 60 mg/l), i gluconati (circa 30 mg/l) e gli ossalati (circa 15 mg/l) (Devreux, 1986). I polifenoli della birra (150 - 300 mg/l) provengono per l' 80% dal malto, mentre la restante quota deriva dal luppolo. La classe di polifenoli più rappresentata è quella delle proantocianidine, ma sono presenti anche acidi fenolici, catechine e flavonoli (soprattutto quercetina).

I polifenoli della birra si stimano intorno a 150-300 mg/l (De Stefano e Montanari, 1996). Tra quelli presenti in forma monomericata ritroviamo gli acidi fenolici, i flavonoli, i loro glucosidi e le catechine. Le forme polimeriche derivano essenzialmente dalla condensazione di catechine. I polifenoli più rappresentati sono le proantocianidine (14-77 mg/l), seguite da catechine, quercetina, acido clorogenico, acido caffeico, acido ferulico, acido p-cumarico, acido gallico (in varie forme), miricetina e kempferolo. Ne sono stati individuati molti altri ancora, ma a concentrazioni talmente basse che non sono in grado di esercitare nessuna azione fisiologica. La maggior parte degli acidi fenolici presenti nella birra è in forma legata (Nardini e Ghiselli, 2004). I composti fenolici della birra, una volta assorbiti, contribuiscono ad incrementare la capacità antiossidante del plasma umano (Ghiselli *et al.*, 2000).

I composti amari derivano dall'uso luppolo, come descritto in dettaglio in precedenza. Il luppolo conferisce anche composti aromatici rappresentati da olii essenziali, quali monoterpeni e sesquiterpeni, alcoli terpenici (geraniolo e linalolo), esteri, aldeidi e chetoni. In parte, la componente volatile deriva dal processo fermentativo e dalle reazioni che avvengono nel corso dello stoccaggio-maturazione della birra giovane.

E' comunque ovvio sottolineare che chi beve regolarmente birra non lo fa in considerazione della composizione chimica di questa bevanda, ma il bevitore di birra

ricerca la soddisfazione della sete, l'accompagnamento gradevole di qualche pietanza, e essenzialmente un senso di appagamento e distensione.

Nel 4<sup>a</sup> "Beer and Health symposium", organizzato dai tecnici birrai Europei, è stato discusso sulle ultime evidenze scientifiche in merito alle proprietà salutistiche connesse ad un moderato, ma costante, consumo di birra. È stato condiviso che molti di questi benefici sono unici della birra e derivano dai suoi ingredienti caratterizzanti, principalmente malto e luppolo. La ricerca scientifica, ad oggi, ha mostrato che bere moderatamente birra può: ridurre il rischio di malattie cardiovascolari, ridurre il rischio di trombosi; regolarizzare la pressione sanguigna; migliorare il sistema di difesa immunitario; avere effetti antinfiammatori; migliorare la densità minerale nelle ossa, utile nel combattere l'osteoporosi; aiutare a combattere certi tipi di cancro; diminuire il rischio di demenza; proteggere contro il diabete di tipo II (siti web: Barth-Haas Group, 2006; Beer and Health symposium, 2006).

## 1.8 MISURA DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

Diverse metodiche sono frequentemente usate per stimare la capacità antiossidante di frutti freschi, vegetali, dei loro prodotti e di vari alimenti per studi clinici.

In linea di principio, si sfruttano reazioni chimiche che generano radicali liberi capaci, direttamente o indirettamente, di emettere un segnale quantificabile con metodi strumentali. L'aggiunta di un antiossidante nel sistema inibisce la formazione di radicali con conseguente diminuzione del segnale in modo proporzionale al potenziale antiossidante e alla concentrazione impiegata del composto in esame.

I saggi più comuni sono il:

- \* 2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (**ABTS**) test (Leong e Shui, 2002; Miller e Rice-Evans, 1997), basato su una lettura spettrofotometrica a 734 nm;
- \* 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (**DPPH**)test (Brand-Williams *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 2002) basato su una lettura spettrofotometrica a 515 nm;
- \* ferric reducing antioxidant power (**FRAP**) test (Benzie e Strain, 1999; Guo *et al.*, 2003; Jimenez-Escrig *et al.*, 2001), basato sulla determinazione, a 595 nm, della riduzione di 2,4,6-tripiridil-s-triazina ferrica (TPTZ);
- \* oxygen radical absorption capacity (**ORAC**) test (Cao *et al.*, 1993; Ghiselli *et al.*, 1995; Ou *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2003), basato sulla misurazione della fluorescenza.

Una trattazione più dettagliata dei metodi appena menzionati, nonché delle loro applicazioni e dei limiti, è fornita nel capitolo “Materiali e Metodi”.

## 1.9 REVIEW SUL POTERE ANTIOSSIDANTE DEGLI INGREDIENTI BIRRARI

Di seguito sono illustrate le principali caratteristiche delle materie prime usate in birreria, limitatamente agli aspetti inerenti la capacità antiossidante da loro esibita. In generale, si può affermare che i cereali sono un'importante fonte di polifenoli per la dieta animale e umana. Come nelle altre piante, i composti fenolici dei cereali sono numerosi e chimicamente differenti. Principalmente includono acidi fenolici, sia liberi che legati, la maggior parte dei quali si trovano in forma insolubile, legati alle pareti cellulari (Sosulski *et al.*, 1982; Lloyd *et al.*, 2000; Bunzel *et al.*, 2001). Altri composti fitochimici sono esclusivi di alcune specie (Naczki e Shahidi, 2004; Bonoli *et al.*, 2004; Emmons e Peterson, 1999; Peterson *et al.*, 2002) come l'orizanolo del riso (Lloyd *et al.*, 2000).

Di conseguenza, anche l'attività antiossidante è alquanto varia, poiché rispecchia la variegata composizione in composti fenolici. Ciò premesso, si riportano di seguito gli esiti degli ultimi studi scientifici, specificando di volta in volta il caso sperimentale e la metodica analitica adottata per la determinazione della capacità antiossidante. Il fine è quello di tracciare un quadro aggiornato della ricerca in questo ambito, evitando di fare delle considerazioni troppo generali e quindi superflue.

### 1.9.1 L'ORZO

Tutti i polifenoli dell'orzo (flavonoidi, derivati dell'acido benzoico e cinnamico, proantocianidine e tannini) potenzialmente possiedono proprietà antiradicaliche e antiossidanti (Hernanz *et al.*, 2001; Bonoli *et al.*, 2004). Poi, a seconda del processo a cui è sottoposta la materia prima, la composizione chimica in polifenoli varia e con essa variano le sue proprietà biologiche. Tuttavia, la sola determinazione dei polifenoli non può essere ritenuta sufficiente per definire il potere antiossidante di specie vegetali, in quanto molti altri composti (tocoferoli, carotenoidi, vitamina C, steroli, acido fitico) interferiscono, direttamente o indirettamente, nel determinare il potere antiossidante di una pianta. Ad esempio, si stima intorno a 75 mg/kg sul peso secco, il contenuto di tocoli (tocoferoli e tocotrienoli) dell'orzo (Panfili *et al.*, 2003). Per questa ragione molti ritengono che stimare la capacità antiossidante totale con studi in vitro è uno dei migliori mezzi per determinare il potere antiossidante di una specie.

Zienlinski e Kozlowska (2000) hanno dimostrato che, in vitro, l'attività antiossidante di estratti metanolici all'80% di granella intera di cereali è, in ordine decrescente, la seguente: grano saraceno, orzo, avena e grano (saggi utilizzati: ABTS e il sistema della fosfatidilcolina). Tra i cereali presi in considerazione da Zdunczyk *et al.* (2006) (orzo, avena vestita svestita e triticale), il potere antiossidante più elevato è stato esibito dall'orzo, il più basso dall'avena svestita. Da prove condotte su cavie alimentate con cereali a diversa capacità antiossidante, è emerso che la dieta con orzo aumenta l'attività della glutatione perossidasi e diminuisce il livello di sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico nel siero dei ratti. Oltre che l'orzo tal quale, è stato provato che anche l'orzo fermentato e l'orzo tostato possiedono attività antiossidanti (Goupy *et al.*, 1999; Lu e Hsu, 1996). In Cina, quotidianamente, l'orzo tostato è usato, da secoli, come bevanda. Tuttavia, coesistono pareri contrastanti circa le proprietà antiossidanti dell'orzo sottoposto a tostatura. Duh *et al.* (2001) hanno dimostrato che gli orzi non tostati sono molto più efficienti, di quelli trattati al calore, come agenti riducenti, "quencher" di radicali liberi e idrossilici, e agenti chelanti il ferro. Ciò perché il trattamento termico abbassa i livelli di catechine, tocoferoli e luteina. Viceversa, Papetti *et al.* (2006) hanno riscontrato che gli antiossidanti dell'orzo tal quale sono attivi contro i radicali perossilici, ma non offrono un'apprezzabile protezione contro i radicali derivanti dalla perossidazione dei lipidi microsomiali. Al contrario, la presenza di prodotti della reazione di Maillard (MRP) conferisce, all'orzo tostato, la capacità di essere efficiente come "radical scavenger" in tutti i sistemi esaminati.

### 1.9.2 IL MALTO D'ORZO

La differente composizione chimica che distingue l'orzo dal malto d'orzo è da attribuirsi essenzialmente ai cambiamenti che avvengono nella cariosside con il maltaggio e che possono consistere, per esempio, nella degradazione di composti fenolici, o nella sintesi di nuove sostanze, ad esempio, tramite la reazione di Maillard o, infine, nell'interazione tra i composti fenolici e loro derivati, con i prodotti della reazione di Maillard (MRP). Prendendo in considerazione i cambiamenti che avvengono nel patrimonio antiossidante passando dall'orzo al malto, si può asserire che la fase di essiccamento svolge, in questo senso, un ruolo chiave ed le modificazioni che esso induce variano molto a seconda dei parametri di processo adottati. Maillard e Berset (1995) hanno osservato un incremento nella capacità antiossidante del malto, rispetto a quella dell'orzo, valutata come inibizione dell'ossidazione del metil-linoleato. Woffenden *et al.* (2002) hanno evidenziato, tramite i saggi ABTS e il FRAP, che i cambiamenti che avvengono nella capacità antiossidante del malto al variare del tempo di essiccamento, sono in parte attribuibili a modificazioni che

avvengono a carico dei composti fenolici. I fenoli più abbondanti, identificati nel malto, sono le (+)-catechine e l'acido ferulico (Goupy *et al.*, 1999; Maillard e Berset, 1995). Woffenden *et al.* (2002) hanno osservato un decremento delle catechine unitamente ad un aumento del potere antiossidante di malti con il 4.8% di umidità, ottenuti a seguito di essiccamento per 27 ore, senza ricircolo d'aria. Questo è in parte dovuto alla degradazione delle catechine che avviene nelle condizioni esperite (alte temperature/bassa umidità). Anche se in letteratura non sono riportati lavori circa la relazione intercorrente tra i livelli di (+)-catechine e l'attività antiossidante del malto, è stato dimostrato (Goupy *et al.*, 1999) che il contenuto totale di flavan-3-oli, estratti dal malto con solventi organici, è positivamente correlato con l'azione di "radical scavenger" studiata con saggio DPPH. Gli stessi Woffenden *et al.* (2002) hanno registrato, verso la fase finale dell'essiccamento, una diminuzione nel potenziale redox dei malti ed un incremento dell'abilità di "radical scavenger" degli stessi, riconducibile all'aumento del potere antiossidante di polifenoli oligomeri, (+)-catechine comprese, rispetto ai monomeri originali (Hagerman *et al.*, 1998). Anche in questo caso, in letteratura non vi sono informazioni inerenti le relazioni tra oligomerizzazione dei polifenoli e riduzione del ferro. Il maggior potere antiossidante esibito dai polifenoli oligomeri potrebbe essere riconducibile all'accresciuta abilità di donare un atomo di idrogeno e/o di supportare l'elettrone spaiato tramite la delocalizzazione (Miller *et al.*, 1995). La velocità con cui i polifenoli oligomeri agiscono da antiossidanti è comunque più bassa di quella dei rispettivi monomeri originali (Haslam, 1998). Monitorando le variazioni dell'attività antiossidante (con metodo basato sull'autoossidazione del metil-linoleato) unitamente alle oscillazioni del contenuto totale degli acidi fenolici legati, durante l'essiccamento del malto, è stata dimostrata una relazione positiva, ma non lineare, tra l'attività antiossidante ed i composti fenolici, in forma libera e legata, da estratti di radichette del malto (Bonnely *et al.*, 2000). In generale, si può affermare che, oltre ai polifenoli e agli acidi fenolici caratteristici del malto e, in aggiunta ai tocoferoli e carotenoidi già presenti nell'orzo (Goupy *et al.*, 1999), gli MRP, sviluppati nel corso dell'essiccamento, concorrono a determinare il potere antiossidante del malto. Gli MRP con attività antiossidante includono le melanoidine e i riduttori; entrambi sono "radical scavengers" e agenti riducenti (Ames, 2000; Wijewickreme e Kitts, 1998). I riduttori sono incolori e sono potenti *scavenger* di radicali liberi in soluzioni acquose.

Durante l'essiccamento dei malti, si è registrato, inoltre, un aumento di sostanze ad azione proossidante al verificarsi di certe combinazioni di parametri di processo (tempo - umidità - temperatura). Woffenden *et al.* (2002) hanno tracciato diversi profili di attività antiossidante di malti ottenuti con diverse tecniche di essiccamento, concludendo che il processo adottato influisce sui meccanismi e/o tassi di sintesi di radicali derivanti dalla reazione di Maillard. L'attività pro-ossidante degli estratti di malto può essere dovuta, per

esempio, a flavonoidi (Yen *et al.*, 1997), procianidine (Hagerman *et al.*, 1998), e certi MRP (Ames, 2000). Alcuni flavonoidi possono autossidarsi, generando ROS, mentre molti composti fenolici agiscono da antiossidanti solo a determinate concentrazioni, fuori dalle quali hanno effetto contrario (Yen *et al.*, 1997). Anche le procianidine hanno effetto pro-ossidante a basse concentrazioni, sebbene in misura minore delle forme monometriche (Hagerman *et al.*, 1998). Lo sviluppo di sostanze a basso PM, con attività antiossidante, avviene negli stadi intermedi della reazione di Maillard. Questi composti comprendono aminoriduttoni (Pischetsrieder *et al.*, 1998) e carbonili (Hashimoto, 1972). La loro concentrazione dipende dall'intensità e dalla durata del trattamento termico poiché, quando sono applicate basse temperature, le fasi della reazione che inducono la formazione di pro-ossidanti durano più a lungo dei trattamenti ad alta temperatura (Nicoli *et al.*, 1999). In conclusione, il regime di essiccamento del malto influisce, oltre che sul colore e flavour dello stesso, anche sulle sue proprietà antiossidanti. In particolare, è stato dimostrato che il suo potere antiossidante aumenta se i livelli di umidità del malto sono inferiori al 6.7% (Woffenden *et al.*, 2002). Vista la scarsa correlazione esistente tra quantità di (+)-catechine e acido ferulico, ed i livelli di attività antiossidante, si può affermare che altre sostanze, quali i polifenoli oligomeri e i prodotti della reazione di Maillard, intervengono nel determinare il potere antiossidante del malto.

### 1.9.3 GLI ALTRI CEREALI

I succedanei maggiormente impiegati in birreria, in forma di grani crudi, sono mais, riso, grano, avena, sorgo, manioca e orzo non maltato. Questi possono essere aggiunti come farine, semola o fiocchi. Per le caratteristiche dell'orzo si vedano i paragrafi 1.6 e 1.9.1. Nella tabella n. 7 è riportata la composizione chimica media dei tre principali cereali impiegati come succedanei a livello mondiale, riferita a 100 grammi di parte edibile, al 12 % (circa) di umidità.

Riguardo al contenuto in tocoli, Panfili *et al.* (2003) hanno trovato che grano e orzo contengono circa 75 mg di tocoli per kg di cereale sul peso secco; il  $\beta$ -tocotrienolo è il più rappresentato nel frumento (da 33 a 43 mg/kg sul peso secco), mentre il  $\gamma$ -tocoferolo predomina nel mais (45 mg/kg sul peso secco), e l' $\alpha$ -tocotrienolo nell'orzo e nell'avena (rispettivamente 56 e 40 mg/kg sul peso secco). L'alfa tocoferolo è stato ritenuto per anni il più efficiente tra i tocoli come antiossidante ma, recentemente, è stato visto che l'alfa tocotrienoli è almeno tre volte più attivo dell'alfa tocoferolo come "scavenger" di radicali perossilici (Packer, 1995).

Nel panorama mondiale il mais (*Zea mays* L.) è il terzo cereale dopo frumento e riso per diffusione, ma occupa il primo posto per quantità prodotte. I maggiori produttori mondiali

sono USA, Cina e Europa, con Italia e Francia tra i primi produttori europei. Nell'Unione europea, circa l'80% del mais è destinato ad alimentazione zootecnica, circa il 10% alla trasformazione industriale e solo l'8% per il consumo umano. Nel mais giallo è abbondante la vitamina A, assente in quello bianco; scarsa è la presenza di vitamina PP e B12 (Petrini *et al.*, 2005). Adom e Liu (2002) hanno trovato che il mais ha un elevato contenuto di fenoli totali ( $15.55 \pm 0.60$   $\mu\text{mol}$  equivalenti di acido gallico per grammo di cereale), seguito dal frumento ( $7.99 \pm 0.39$   $\mu\text{mol}$  equivalenti di acido gallico per grammo di cereale), avena ( $6.53 \pm 0.19$   $\mu\text{mol}$  equivalenti di acido gallico per grammo di cereale), e riso ( $5.56 \pm 0.17$   $\mu\text{mol}$  equivalenti di acido gallico per grammo di cereale). Inoltre, il mais mostra un contenuto di fenoli liberi pari a  $2.12 \pm 0.09$   $\mu\text{mol}$  /g di cereale, simile a quello riscontrato nel riso ( $2.10 \pm 0.12$   $\mu\text{mol}$  /g di cereale), mentre per il frumento è solo pari a  $1.90 \pm 0.06$   $\mu\text{mol}$  /g di cereale; segue l'avena con  $1.77 \pm 0.12$   $\mu\text{mol}$  /g di cereale). Ancora, la quantità di composti fenolici legati è risultata pari  $13.43 \pm 0.59$   $\mu\text{mol}$  /g di cereale per il mais,  $6.10 \pm 0.39$   $\mu\text{mol}$  /g di cereale per il frumento,  $4.76 \pm 0.14$   $\mu\text{mol}$  /g di cereale per l'avena e  $3.46 \pm 0.13$   $\mu\text{mol}$  /g di cereale per il riso. Circa il 74% e il 69% dei fenoli del riso e del mais, rispettivamente, sono legati, in forma insolubile. Tra questi, l'acido ferulico è il più rappresentato, e si ritrova in forma libera, coniugata-solubile e legata in rapporto, rispettivamente, di 0.1 :1 :100. In forma libera, nel mais è quantificato pari a  $0.92 \pm 0.02$   $\mu\text{mol}/100$  g, nel riso, in forma libera è pari a  $0.7 \pm 0.05$   $\mu\text{mol}/100$  g, nell'avena  $0.65 \pm 0.04$   $\mu\text{mol}/100$  g e nel grano  $0.57 \pm 0.02$   $\mu\text{mol}/100$  g. Viceversa, il contenuto di flavonoidi liberi è maggiore nell'avena ( $0.45 \pm 0.02$   $\mu\text{mol}/\text{g}$ ) rispetto al riso ( $0.33 \pm 0.01$   $\mu\text{mol}/\text{g}$ ), mais ( $0.16 \pm 0.004$   $\mu\text{mol}/\text{g}$ ) e grano ( $0.09 \pm 0.01$   $\mu\text{mol}/\text{g}$ ).

Componenti (per 100 g parte edibile)	Mais (granella)	Mais (farina)	Riso (granella)	Grano (granella)
Acqua (g)	12.5	12.5	12.0	12.0
Proteine (g)	9.2	8.7	7.9	11.6
Lipidi (g)	3.8	2.7	2.7	2.0
Carboidrati (g), di cui:	75.0	80.8	76.1	71.0
- amido (g)	70.5	72.1		
- zuccheri solubili (g)	2.5	1.5		
- fibra totale (g)	2.0	3.1	1.0	2.0
Ceneri (g)	1.2	0.1	1.3	1.6
Ferro (mg)	2.4	1.8	1.8	3.5
Calcio (mg)	15	6	33	30
Fosforo (mg)	256	99		
Magnesio (mg)	120	-		-
Zinco (mg)	2.21	-		-
Selenio (mg)	15.5	-		-
Tiamina (mg)	0.36	0.35	0.41	0.41
Riboflavina (mg)	0.20	0.10	0.04	0.10
Niacina (mg)	1.50	1.90	4.3	5.10
Vitamina A retinolo eq. (µg)	62	67		
ENERGIA (KCAL)	353	362	362	348

**Tabella 7:** *composizione chimica e valore energetico, per 100 grammi di prodotto edibile, dei succedanei più frequentemente utilizzati in birreria: granella e farina di mais (Zea mays L.), riso (Rizum sativum), grano (Triticum spp.), sorgo (Sorghum spp.) (Fonte: Banca Dati Alimenti Interattiva dell'INRAN e fonte USDA/HNIS, Laing and Pearson, United States National Research Council/National Academy of Science, 1982).*

Tra questi cereali, Adom e Liu (2002) hanno trovato che l'attività antiossidante più elevata è esibita dal mais ( $181.42 \pm 0.86 \mu\text{mol/g}$ ), a cui seguono grano, avena ( $76.70 \pm 1.38$  e  $74.67 \pm 1.49 \mu\text{mol/g}$ ) ed infine il riso ( $55.77 \pm 1.62 \mu\text{mol/g}$ ). Questi autori hanno determinato la capacità antiossidante con il "total oxyradical scavenging capacity" test ed i risultati sono espressi in micromoli equivalenti di vitamina C per grammo di cereale. L'aspetto più interessante riguarda il rapporto di causalità evidenziato tra i composti "legati" e la capacità antiossidante misurata: si è stimato che essi contribuiscono per il 90% nel frumento, l'87% nel mais, il 71% nel riso e il 58% nell'avena.

I composti fenolici “legati” passano inalterati nel tratto digestivo fino a raggiungere il colon. Qui vengono disgregati e parzialmente assorbiti. Andreasen *et al.* (2001) hanno dimostrato che la microflora umana e dei ratti può rilasciare acidi di-ferulici a partire da crusca di cereali assunta con l'alimentazione. Ossia, i composti fitochimici, non digeriti o legati, possono avere dei benefici per l'organismo umano dopo il loro assorbimento nel colon. Ciò spiega in parte l'azione dei cereali nel prevenire vari tipi di cancro (al colon, alle ovaie, alla prostata).

Il grano (*Triticum* spp.) è forse il cereale che nei secoli è stato più sfruttato dall'uomo, per la sua ampia versatilità di impieghi (dall'alimentazione animale ai prodotti da forno, dalle bevande fermentate ai cereali per la prima colazione, alla pasta). Le sue caratteristiche chimiche variano molto con il genotipo e fenotipo che si considera, nonché con la forma e/o tipologia di impiego. Limitandoci ai soli aspetti inerenti la capacità antiossidante esibita da questo cereale, si può asserire che anche le relative proprietà biologiche e nutrizionali sono molto diversificate in base a questi fattori. La granella intera e la farina di frumento differiscono significativamente per il contenuto totale in polifenoli che varia da 879 a 4128 µg/g nelle farine, e da 501 a 562 µg/g nelle cariossidi (contenuto totale in polifenoli espresso come µg/g equivalenti di acido gallico) (Ragae *et al.*, 2006). Tuttavia, diversi autori (Zienlinski e Kozłowska, 2000; Ragae *et al.*, 2006) hanno mostrato, applicando vari saggi, quali il DPPH e l'ABTS, che il grano esibisce una scarsa capacità antiossidante in vitro, e comunque inferiore rispetto a quella di orzo, segale, avena e sorgo. Gli stessi autori hanno trovato che il sorgo possiede un elevato contenuto di fenoli totali che gli conferiscono un'eccezionale proprietà antiossidante, maggiori di quelle dell'orzo (saggi ABTS e DPPH eseguiti su estratti metanolici all'80%).

Anche l'avena (*Avena sativa* L.) è una ricca fonte di antiossidanti, concentrati soprattutto negli strati più esterni della cariosside. Tra i principali si annovera la vitamina E ed i tocoli, l'acido fitico, i composti fenolici, l'avenantramide. Quest'ultimo composto, identificato per la prima volta da Collins (1989), si caratterizza per la presenza di azoto e di due anelli ciclici nella struttura. L'avenantramide sembra che sia sintetizzata dalla pianta come risposta di difesa da attacchi parassitari fogliari. Diversi tests in vitro (ORAC, DPPH, metodo dell'auto-ossidazione del beta carotene, chemiluminescenza, saggio di auto-ossidazione del metil-linoleato) ne hanno mostrato l'abilità antiossidante in estratti di avena (Peterson, 2001). Resta ancora da definire la biodisponibilità degli stessi, nonché i relativi effetti biologici in vivo.

A conclusione di questo paragrafo si ribadisce che, comunque, non è possibile generalizzare parlando di antiossidanti di una certa specie, piuttosto che un'altra, poiché è stato ormai dimostrato che le sostanze bioattive variano in identità e concentrazione a

seconda del genotipo e fenotipo che si considera (Yu *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2002b). Inoltre, le piante mettono a punto vari sistemi antiossidanti, enzimatici e non, per far fronte a situazioni di stress che generalmente hanno modificato l'equilibrio nella concentrazione dei ROS endogeni. Sarebbe sempre auspicabile specificare la cultivar e l'areale di coltivazione preso in considerazione, nonché i parametri di processo relativi alle modalità d'impiego del cereale usato nel processo produttivo. Ad esempio, quando il mais (genotipo blu) viene lavorato per la preparazione di popcorn, tortillas e chips, si assiste ad una perdita in composti fenolici, rispettivamente pari al 37%, 54% e 78%, che è strettamente correlata ( $r= 0.94$ ) con la perdita della relativa capacità antiossidante, valutata con il saggio ORAC (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006). Circa il processo produttivo birrario, nessuna ricerca è stata impostata per studiare, in modo rigoroso e alla luce delle ultime conoscenze, il contributo apportato dall'uso dei succedanei sul potere antiossidante della birra.

#### 1.9.4 IL LIEVITO

Relativamente al contributo del lievito sul potere antiossidante della birra, non sono disponibili fonti di nessun genere al riguardo. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che, con la filtrazione della birra, si rimuove ogni traccia di lievito prima della commercializzazione della stessa, al fine di renderla sufficientemente limpida ed accettabile dal consumatore. Pertanto, si produce contemporaneamente anche un impoverimento in micronutrienti, quali la tiamina, di cui è ricco il lievito. E' stato provato, applicando il saggio ABTS, che la tiamina (vitamina B1) è in grado di agire come "scavenger" di radicali liberi ed è una delle più efficienti tra le vitamine del gruppo B (Gliszczynska-Swigło, 2006). Applicando il saggio FRAP, lo stesso autore ha trovato che solo l'acido folico è attivo nel ridurre il  $Fe^{3+}$ , anche se in maniera molto blanda. La birra contiene tracce di vitamine del gruppo B (De Stefano e Montanari, 1996), e quasi tutte provenienti dal malto. La tiamina nella birra varia da 0.005 a 0.15 mg/l. Tra le più rappresentate vi è la piridossina (vitamina B6)(0.4-1.7 mg/l). Essa rallenta la produzione di omocisteina, ritenuto uno delle concause di problemi cardiaci. Sembra che vi sia una correlazione tra il consumo di birra e la riduzione di questo agente chimico. Considerando quanto sopra, si ritiene di poter affermare che il contributo antiossidante del lievito, come residuo tal quale nella birra, è pressoché nullo. Tuttavia, come sottoprodotto della birrificazione, esso è ancora utilizzabile, poiché ricco in nutrienti. In questo senso, restano ancora insoluti diversi problemi legati sia alla sua conservazione che alla necessità di sottoporlo ad opportuni trattamenti prima della sua utilizzazione per uso alimentare.

Se il lievito non contribuisce direttamente all'attività antiossidante della birra, è comunque interessante considerare l'interazione tra il lievito stesso e gli antiossidanti, soprattutto nella produzione di birre arricchite. Pietercelie e Dauchol (2005) hanno notato che lo xantoumulone esogeno, aggiunto con il luppolaggio, ostacola la performance dei lieviti in fermentazione.

#### **1.9.5 IL LUPPOLO**

Circa le caratteristiche antiossidanti del luppolo si rimanda ai paragrafi 1.5 e 1.6 dove sono state esposte dettagliatamente le proprietà biologiche, unitamente alla descrizione delle sue principali componenti chimiche. Ulteriori informazioni verranno fornite nel capitolo relativo alla discussione dei risultati ottenuti con la presente ricerca.

## 2. SCOPO

L'attività di ricerca, svolta nel corso triennale di dottorato in Biotecnologia degli Alimenti, ha riguardato lo studio degli antiossidanti nelle materie prime dell'industria birraria.

Lo scopo del lavoro è stato quello di esaminare, sotto molteplici aspetti, il patrimonio antiossidante delle materie prime impiegate in birreria (orzo, malto d'orzo, cereali usati come succedanei, luppolo e lievito) identificandone le principali componenti, valutandone il ruolo lungo l'intera filiera produttiva ed, infine, considerando l'influenza dei parametri tecnologici sul contenuto e sul potere degli antiossidanti nella birra.

Da un'approfondita ricerca bibliografica, condotta nei mesi iniziali di corso di dottorato, in concomitanza con alcune analisi preliminari di laboratorio, è emersa un'abbondante letteratura riguardante il potere antiossidante dell'orzo e del malto d'orzo rispetto agli altri ingredienti birrari. Solo pochissimi lavori hanno considerato il contributo antiossidante delle altre matrici cerealicole impiegate, mentre è apparso molto frastagliato, ma in piena fase di espansione, l'interesse dei tecnici birrai sul luppolo come "ingrediente salutistico", anche se le sue proprietà erano note e sfruttate nella Farmacopea tradizionale già da anni. Nessun autore, in nessun ambito, ha indagato sulle funzioni espletate dal lievito come antiossidante, o come potenziale fattore di sinergismo/antagonismo che può influenzare il patrimonio antiossidante della birra.

Pertanto, tenuto conto dei mezzi e dei materiali disponibili, delle tempistiche analitiche in ragione della portata del lavoro da svolgere, e considerato quanto sopra detto circa lo stato dell'arte della ricerca, si è ritenuto opportuno focalizzare l'attenzione sul luppolo, a cui è stata riservata la parte analitico-sperimentale.

Pertanto, il presente studio è stato impostato in modo da raggiungere i seguenti obiettivi:

1. Mettere a punto un metodo di estrazione per la preparazione di coni essiccati di luppolo per l'analisi con saggio ABTS (saggio per la determinazione della capacità antiossidante di un campione basato sulla decolorazione del radicale cationico: 2,2'-Azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-acido sulfonico);
2. Indagare sulla capacità antiossidante di 15 varietà di luppoli inglesi, collezionati in forma di coni essiccati interi;
3. Ottenere valori, indicativi del livello antiossidante dei campioni in esame, confrontabili ed oggettivi, tramite la standardizzazione delle condizioni operative sia in campo sia in laboratorio;

4. Verificare l'andamento del potere antiossidante dei coni in fase di maturazione sulla pianta e, analogamente, tracciare le curve di accumulo degli alfa e beta-acidi, xantoumulone e catechine;
5. Indagare sul potere antiossidante di coni freschi, allo scopo di studiare i termini con cui il trattamento di condizionamento del luppolo in post-raccolta ne influenza il potere antiossidante. In questa ricerca il trattamento considerato è l'essiccamento con forni ad aria per l'utilizzo dei coni così ottenuti, in forma intera;
6. Identificare le potenziali componenti del luppolo che contribuiscono al potere antiossidante riscontrato nelle varietà;
7. Studiare la distribuzione di catechine monomere nei vari luppoli, in quanto nessuno studio era mai stato affrontato in maniera sistematica su cultivar inglesi, allevate nella stessa area adottando gli stessi parametri tecnico-agronomici. Infatti, è noto in letteratura che le catechine sono dotate di elevato potere antiossidante e che il profilo delle proantocianidine del luppolo è variabile dipendente dalle cultivar e dall'origine geografica delle stesse;
8. Valutare l'influenza delle varietà di luppolo, con diversa capacità antiossidante, sul potere antiossidante nella birra e lungo il relativo processo di fabbricazione della stessa.

Infine, per avere una visione globale ed esaustiva della “problematica” degli antiossidanti nel prodotto birra, nella parte introduttiva di questa tesi si è esposto circa gli antiossidanti contenuti nelle matrici cerealicole birrarie. Analogamente, nel capitolo finale, è stato fatto un breve cenno alle possibilità applicative di questo argomento in altri campi della ricerca e in ambito industriale.

### 3. STRATEGIA SPERIMENTALE

L'attività svolta nel corso del dottorato ha visto susseguirsi tre momenti fondamentali: nella prima parte si è compiuto un lavoro di raccolta di dati inerenti l'orzo, il malto d'orzo, gli altri cereali succedanei ed il lievito, scremando e ri assemblando quanto ad oggi noto sugli antiossidanti di tali matrici, peraltro studiate anche in ambiti non prettamente birrari. L'esito è stata una review critica dell'argomento che ha messo in risalto i limiti e traguardi ottenuti sino ad oggi.

Il secondo momento della ricerca si è caratterizzato per l'approccio analitico-sperimentale sul luppolo. Per la prima volta si è indagato sulla capacità antiossidante di luppoli inglesi. Infatti, nonostante che l'Inghilterra sia un Paese tradizionalmente coltivatore di questa pianta, gli studi sulle varietà britanniche di luppolo hanno riguardato essenzialmente gli aspetti commerciali (rese/ha, amaro, aroma, conservabilità, etc.).

L'ultimo momento di questo studio è stato speso per l'analisi dei risultati e per tracciare un quadro di insieme di quanto appurato nelle due precedenti fasi, al fine di avere una visione di filiera che possa essere un valido supporto per impostare altre ricerche sugli antiossidanti, nel "mondo birra" e non solo. Con questa finalità è stato inserito nella tesi un breve paragrafo, di carattere compilativo, sulla biodisponibilità dei composti antiossidanti introdotti con una normale alimentazione, sui loro possibili impieghi nella supplementazione della dieta e quindi sul ruolo degli alimenti funzionali nella vita odierna.

Lo svolgimento della parte analitica è stato possibile grazie alla collaborazione attiva tra il "Dipartimento di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti" dell'Università degli Studi di Perugia, il "Centro di Eccellenza per la Ricerca sulla Birra" (CERB) di Casalina (Perugia), il centro internazionale di ricerca sulla birra "Brewing Research International" (BRi) (Nutfield, Surrey, UK) e l'istituto di ricerca sul luppolo "East Malling Research" (EMR) (Wye, Kent, UK). A quest'ultimo si deve la fornitura di tutti i campioni di luppolo esaminati.

Il prelievo dei coni in maturazione, delle varietà Omega e Challenger, è stato effettuato, nel 2005, intensificando la frequenza in prossimità del periodo di raccolta, secondo il seguente calendario: 22 agosto, 30 agosto, 5 settembre, 9 settembre, 13 settembre, 16 settembre, 19 settembre e 29 settembre.

Su tutti i campioni sono state effettuate le seguenti determinazioni: sostanza secca, alfa-acidi, beta-acidi, coumulone, lupulone, xantoumulone, catechine e potere antiossidante. Fa eccezione il luppolo fresco che è stato esaminato solo per la capacità antiossidante con saggio ABTS. Va tenuto presente che, per ragioni connesse alla ciclicità di coltivazione della coltura, tutti i campioni di luppolo sono stati analizzati a partire da ottobre 2005.

Per quanto riguarda il mini impianto pilota, i prelievi dei campioni, lungo il processo produttivo, sono stati fatti secondo quanto riportato nel capitolo “Materiali e metodi”. Sui mosti è stata valutata solo la capacità antiossidante, mentre sulle birre sono stati determinati anche il pH, il contenuto d'alcol ed il grado di amaro in IBU.

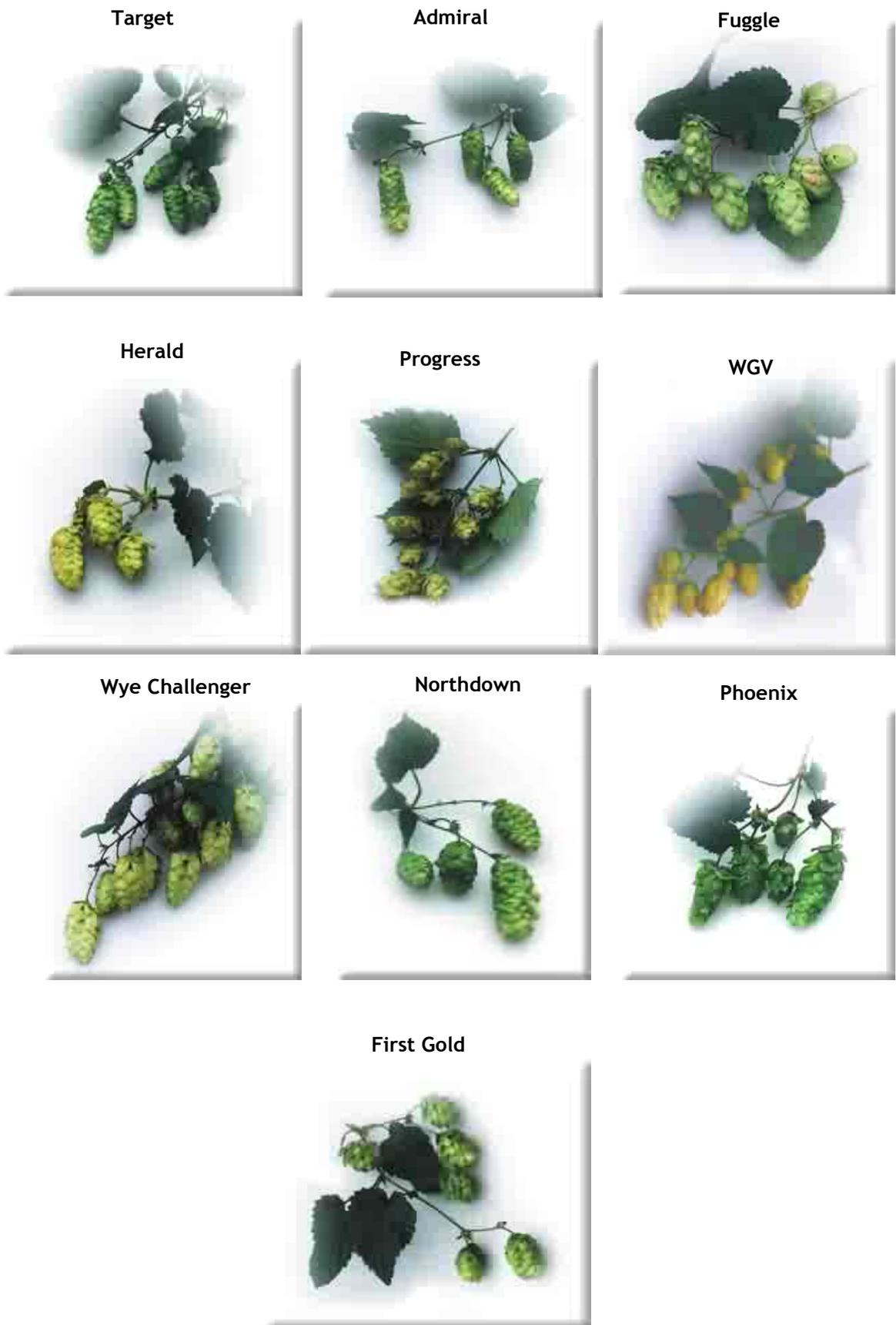
## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 CAMPIONI

Tutti i campioni sono stati forniti dall'East Malling Research (EMR) Hop Research Imperial College di Wye (Kent, UK) e la ricerca è stata pianificata e condotta in collaborazione con il centro di ricerca Brewing Research International (BRI) di Nutfield (Surrey, UK). Quindici varietà inglesi di luppolo sono state cresciute nel giardino sperimentale dell'EMR, nella contea del Kent, in Inghilterra, applicando le stesse tecniche agronomiche. Le cultivars, impiantate con sesto 6' x 6', sono state allevate con la tipica forma ad Y, con i rami principali agganciati a tralicci alti circa 5 metri. Tutte le varietà presentavano semi. Il terreno delle parcelle sperimentali si caratterizzava per essere un suolo esposto, povero e poco profondo. I coni delle 15 cultivars sono stati collezionati in due annate, nel 2004 e nel 2005. Dopo la raccolta, i coni freschi, interi, sono stati essiccati in forno ad aria (modello Gallenkemp Hotbox) applicando la temperatura di 50 °C per 12 ore. Il campione secco, del peso di circa 150 grammi, è stato stoccato in congelatore a -18 °C, fino al momento delle analisi. In pratica le varietà prese in considerazione per questo progetto sono state: Admiral, Boadiacea, Challenger, First Gold, Fuggle, Herald, Northdown, Omega, OT48, Phoenix, Progress, Sovereign, Target, Yeoman e WGV. Di alcune di esse è riportata la fotografia in Fig. n. 23.

Per ogni varietà raccolta nel 2005, è stato depositato nel medesimo congelatore, anche un esemplare di coni freschi.

Infine, sono state scelte due varietà, Omega e Challenger, per il prelievamento di coni durante la loro maturazione sulla pianta, prima e dopo il periodo della raccolta. Le due cultivar sono state allevate nello stesso giardino delle altre, con le medesime modalità, ma in particelle diverse da quelle utilizzate per il prelievo di coni maturi. Pertanto, le varietà Omega e Challenger, richiamate nel paragrafo "Curve di accumulo di alcuni componenti durante lo sviluppo dei coni" non sono le stesse piante di cui è fatta menzione nei capitoli precedenti. Le due varietà sono state esaminate in otto diverse fasi di crescita, che temporalmente si sono estese da fine agosto, in cui i coni sono molto piccoli e compatti, agli inizi di settembre, in coincidenza del periodo di raccolta, sino a fine settembre, in fase di senescenza (i coni, anziché essere raccolti a piena maturazione, sono lasciati sulla pianta). Ad ogni prelievo, si sceglieva un ramo a caso tra i filari della varietà di interesse, tirandolo a terra; quindi, circa 300 grammi di coni freschi, raccolti a caso per tutta la lunghezza del ramo, venivano posti in sacchetti di plastica trasparente e subito congelati a -18°C. Ad ottobre 2005, finita la fase di collezione dei campioni, i coni sono stati essiccati esattamente come descritto in precedenza per quelli raccolti a piena maturità.



**Fig. 23:** *illustrazioni che mettono in evidenza la diversa morfologia dei coni delle varietà di luppolo indicate sopra ogni immagine.*

Di seguito, per ogni cultivar, sono elencate le principali caratteristiche, evidenziando la storia genetica ed i parametri chimico-merceologici che le contraddistinguono. Per semplicità, i luppoli sono stati classificati, secondo la prassi comune in: varietà ad alto contenuto di alfa-acidi, se il contenuto di composti amari è molto al di sopra del 10%; varietà amaricanti, se il contenuto di composti amari è mediamente intorno all'8%; varietà aromatizzanti, se il contenuto di composti amari oscilla dal 3 al 5% ed è molto pronunciato il carattere aromatico. Nei prospetti illustrati di seguito alla descrizione di ogni varietà, sono riportati, tra l'altro, alcuni dati pertinenti la coltivazione della varietà in esame, limitatamente al territorio inglese. Lo zentner, ivi citato, è un'unità di misura usata solo nel settore del luppolo e corrisponde a 50 kg (20 zentner = 1 tonnellata).

**TARGET** (varietà amaricante): è stata incrociata al Wye College (Kent) ed immessa sul mercato nel 1972. Target è geneticamente "cugina" di Challenger, ma è contraddistinta da un'eccellente resistenza alla ruggine pulverulenta. I coni sono grandi tanto che, in certi siti, possono cadere dai sostegni. L'alto contenuto di alfa acidi è accompagnato da un povero contenuto in semi e da un flavour robusto, che si ritrova nel tipico aroma delle birre inglesi. Lo scarso quantitativo di semi rende Target molto adatta alla pellettizzazione, così come il suo elevato contenuto in olii è sfruttato per la produzione di estratti di CO<sub>2</sub> arricchiti di olii essenziali. E' ancora pratica comune usare i coni interi, essiccati, nella produzione di birre *Ale* per la positiva nota floreale che Target gli conferisce (sito web: Botanix Ltd, 2006).

<b>Cultivar: Target</b>			
Fonte: National Hop Association of England (London, UK)			
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	9.9 ~ 12.6%	Area (2000)	478 ha
Beta acidi (range)	4.3 ~ 5.7%	Produzione (media)	32 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	2.2 ~ 2.8 :1	Maturazione	Tardiva
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	35 ~ 39%	Stabilità nello stoccaggio	Moderata
Olii totali (ml/100 g coni secco)	1.2 ~ 1.4		
Alta tolleranza alla siccità, suscettibilità alle muffe lanuginosa, resistenza alla ruggine pulverulenta			

**YEOMAN** (varietà amaricante): è stata immessa sul mercato nel 1981, come varietà complementare a Target. Ha delle eccezionali doti di stabilità allo stoccaggio, molto più spiccate di Target: dopo sei mesi di conservazione a temperatura ambiente, Yeoman è in grado di mantenere circa l'80 % della quantità originaria di alfa acidi. Buona è la sua resistenza alla ruggine pulverulenta, alle muffe lanuginose e a *Verticillium spp.* Di solito è

impiegata nella produzione di Lager; buone sono anche le sue proprietà aromatiche (Neve e Darby, 1983; Neve, 1991; sito web: Just Hops, 2006).

<b>Cultivar: Yeoman</b>			
		Fonte: Neve e Darby, 1983	
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	8.0 ~ 12.0%	Area (2000)	- - -
Beta acidi (range)	4 ~ 5%	Produzione (media)	- - -
Rapporto alfa:beta acidi	2 ~ 2.5 :1	Maturazione	Media
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	25 %	Stabilità nello stoccaggio	Ottima
Olii totali (ml/100 g coni secco)	1.7 ~ 2.4		
Buona resistenza alla ruggine pulverolenta, alle muffe lanuginose e a <i>Verticillium spp.</i>			

**OMEGA** (varietà amaricante): è una tradizionale varietà inglese, ottenuta allo Wye College dal Dott. Neve, da un incrocio tra la varietà Wye Challenger ed una varietà maschile inglese. E' una varietà a media maturazione, con una buona stabilità allo stoccaggio: mostra circa il 78 % del contenuto di alfa acidi originari, dopo sei mesi di conservazione a temperatura ambiente (fonte: Annual Report for Hop Research, USDA/ARS,1992 e anni seguenti). Omega ha incontrato favorevolmente il parere dei birrai europei per il suo aroma; tuttavia la sua coltivazione è abbastanza limitata per la scarsa produttività, nonostante la sua resistenza al *Verticillium* (fonte: USDA/OSU Hop Research Farm; Neve e Darby,1983).

<b>Cultivar: Omega</b>			
		Fonte: Neve e Darby, 1983	
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	9.0 ~ 10.0%	Area (2000)	- - -
Beta acidi (range)	3 ~ 4%	Produzione (media)	- - -
Rapporto alfa:beta acidi	2.5 ~ 3 :1	Maturazione	Media
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	29%	Stabilità nello stoccaggio	Buona
Olii totali (ml/100 g coni secco)	1.72		
Ottima resistenza al <i>Verticillium</i>			

**ADMIRAL** (varietà ad alto contenuto di alfa-acidi): anch'essa sviluppata allo Wye College, Admiral cresce vigorosamente, producendo coni piccoli e compatti che si adattano bene alla raccolta meccanizzata. Rispetto a Target, questa varietà matura circa una settimana prima, produce una più elevata quantità di alfa acidi per ettaro e la stabilità degli alfa

acidi stessi durante lo stoccaggio è migliore di quella di Target. La suscettibilità alle muffe è paragonabile a quella di Progress. E' una varietà molto versatile che si presta bene a svolgere la doppia funzione amaricante ed aromatizzante (sito web: Botanix Ltd, 2006).

<b>Cultivar: Admiral</b>		Fonte: National Hop Association of England (London, UK)	
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	13.5 ~ 16.2%	Area (2000)	46 ha
Beta acidi (range)	3.8 ~ 6.0%	Produzione (media)	20 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	2.6 ~ 3.2 :1	Maturazione	Media
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	37 ~ 45%	Stabilità nello stoccaggio	Modesta
Olii totali (ml/100 g coni secco)	1.0 ~ 1.7		
Resistente alla muffa lanuginose, suscettibile a quella pulverolenta			

**FUGGLE** (varietà aromatizzante): introdotta nel commercio nel 1875 da Richard Fuggle, divenne una delle cultivar più coltivate in Inghilterra (nel 1949 Fuggle si estendeva sul 78% della superficie coltivata a luppolo), fino a che le infestazioni di *Verticillium* resero quasi impossibile praticare questa piantagione nel sud-est Inghilterra. Attualmente rappresenta circa il 9% della produzione inglese, dove è coltivato essenzialmente nel West Midlands. Fuggle è cresciuto anche negli USA, principalmente in Oregon, ed in Slovenia, dove è diffuso col nome di Styrian Golding. E' una varietà a maturazione precoce ed è una delle poche nate per propagazione con seme (A.A.V.V. The Hop Atlas, 1994). Fuggle, caratterizzata dal tipico flavour, è forse la più famosa varietà inglese; è frequentemente miscelata con Goldings per migliorare il gusto della birra e aggiungere rotondità e pienezza al palato. A causa del suo basso contenuto in alfa acidi, Fuggle richiede alti tassi di luppolaggio per raggiungere il grado di amaro desiderato. E' impiegata nella produzione di Ales in forma di coni essiccati interi (sito web: Botanix Ltd, 2006; sito web: HRI HortiTechTM, 2006).

<b>Cultivar: Fuggle</b>		Fonte: National Hop Association of England (London, UK)	
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	3.0 ~ 5.6%	Area (2000)	270 ha
Beta acidi (range)	2.0 ~ 2.7%	Produzione (media)	25 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	1.5 ~ 2.2 :1	Maturazione	Precoce
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	29 ~ 30%	Stabilità nello stoccaggio	Buona
Olii totali (ml/100 g coni secco)	0.7 ~ 1.1		
Sensibile alle muffe e suscettibile a quelle pulverulente.			

**HERALD** (varietà aromatizzante): è stata la prima varietà “nana” ad alto contenuto di alfa acidi con un accettabile flavour. In birreria, l’equilibrio tra flavour e amaro, si ritengono accettabili. Pertanto, si presta bene ad essere una varietà dalla duplice attitudine, adatta a tutti i tipi di birre. Possiede un’elevata tolleranza al *Verticillium*, matura precocemente producendo coni compatti e pesanti (sito web: Botanix Ltd, 2006).

<b>Cultivar: Herald</b>			
Fonte: National Hop Association of England (London, UK)			
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	11.0 ~ 13.0%	Area (2000)	55 ha
Beta acidi (range)	4.8 ~ 5.5%	Produzione (media)	10 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	2.4 ~ 2.8 :1	Maturazione	Precoce
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	37%	Stabilità nello stoccaggio	Buona
Olii totali (ml/100 g coni secco)	1.0 ~ 1.9		
Moderatamente resistente alla muffa lanuginosa e resistente a quella pulverulenta			

**PROGRESS** (varietà aromatizzante): sviluppata allo Wye College nel 1951, è stata immessa nel commercio nel 1964 come varietà tollerante alle muffe, alternativa a Fuggle. Come luppolo aromatizzante ha avuto ampia popolarità: simile a Fuggle, ha note aromatiche un pò più dolci e generalmente conferisce alle birre un amaro meno pronunciato (sito web: Botanix Ltd, 2006).

<b>Cultivar: Progress</b>			
Fonte: National Hop Association of England (London, UK)			
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	6.0 ~ 7.5%	Area (2000)	52 ha
Beta acidi (range)	2.0 ~ 2.7%	Produzione (media)	25 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	2.8 ~ 3.3 :1	Maturazione	Media
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	27 ~ 36%	Stabilità nello stoccaggio	Discreta
Olii totali (ml/100 g coni secco)	0.5 ~ 0.8		
Tollerante alle muffe			

**WGV (WHITBREAD GOLDING VARIETY)** (varietà aromatizzante): selezionata in Kent, nel 1911, da una varietà chiamata Bates' Brewer, ebbe diffusione solo negli anni '30 per le sue qualità aromatiche e la sua resistenza alle malattie. Dimostrando tolleranza al *Verticillium*, è stata piantata in modo estensivo durante gli anni '50, quando le coltivazioni di Fuggles e Goldings erano devastate dalla diffusione di questa malattia (sito web: HRI HortiTechTM, 2006). Conferisce alla birra un tipico flavour fruttato-dolce, simile a quello

di Goldings, ma più robusto e deciso. Trasmette alle birre Ales, dove è di solito impiegata, un moderato gusto amaro (sito web: Botanix Ltd, 2006).

<b>Cultivar: WGV</b>		Fonte: National Hop Association of England (London, UK)	
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	5.4 ~ 7.7%	Area (2000)	78 ha
Beta acidi (range)	2.0 ~ 3.3%	Produzione (media)	24 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	2.3 ~ 3.0 :1	Maturazione	Media
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	32 ~ 43%	Stabilità nello stoccaggio	Buona
Olii totali (ml/100 g coni secco)	0.8 ~ 1.2		
Resistente alla muffa lanuginosa e suscettibile alle mufte pulverulente.			

**BRAMBLING CROSS (OT48)** (varietà aromatizzante): ottenuta dal Professor Salmon a Wye, nel 1927, da un incrocio tra Brambling (una delle varietà Golding tradizionali) ed una pianta selvaggia maschile di Manitoba(Canadese). Dà buone produzioni, matura precocemente ed è in grado di trattenere circa il 68% del contenuto originario di alfa acidi dopo sei mesi di stoccaggio a temperatura ambiente (fonte: vari Rapporti Annuali dello Wye College, UK; Rapporti Annuali USDA, 1979). Il suo aroma si contraddistingue perché richiama il flavour “americano” e questo ha reso OT48 meno gradita ai tecnici birrai europei, anche se ultimamente è stata impiegata nella produzione di alcune birre speciali. Se aggiunta al mosto quasi a fine bollitura, fornisce aromi fruttati, che richiamano il limone e l’uva sultanina: queste note aromatiche sono apprezzate nelle tradizionali Ales, fabbricate nel periodo natalizio (sito web: Hops from England, 2006).

<b>Cultivar: OT48</b>		Fonte: National Hop Association of England (London, UK)	
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	6.0 ~ 7.8%	Area (2000)	21 ha
Beta acidi (range)	2.2 ~ 2.8%	Produzione (media)	20 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	2.4 ~ 3.1 :1	Maturazione	Precoce
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	26 ~ 31%	Stabilità nello stoccaggio	Discreta
Olii totali (ml/100 g coni secco)	0.7 ~ 1.0		
Suscettibile alle mufte pulverulente e a quelle muffa lanuginosa.			

**BOADIACEA** (varietà aromatizzante): è una varietà nana sviluppata dal Dott. Peter Darby all’EMR di Wye. E’ la prima varietà al mondo resistente agli afidi. Questo significa che può essere allevata riducendo di molto la quantità di pesticidi normalmente impiegati nelle

altre coltivazioni di luppolo. Da recenti prove tecnologiche effettuate in birreria, è risultato che Boadicea cede alla birra raffinatezza, concedendo un aroma delicato e sottile, ed un amaro morbido e pulito. Per la sua caratteristica di non avere un flavour di luppolo molto pronunciato, è tuttavia molto apprezzata usata da sola o come partner con qualche altra varietà più forte. E' quindi indicata per produrre sia Lager sia Ales (sito web: Newsletter of Camra, 2006).

<b>Cultivar: Boadiacea</b>			
Fonte: Newsletter of Camra, 2006			
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	7.5 -10.0 %	Area (2000)	- - -
Beta acidi (range)	3.0 -4.0 %	Produzione (media)	- - -
Rapporto alfa:beta acidi	2 - 2.5 :1	Maturazione	- - -
Coumulone (in % sugli alfa acidi)	26 - 29%	Stabilità nello stoccaggio	- - -
Olii totali (ml/100 g coni secco)	- - -		
Resistenza agli afidi.			

**WYE CHALLENGER** (varietà a duplice attitudine): anch'essa selezionata al Wye College, è stata immessa in commercio nel 1972. Wye Challenger è stata ottenuta da Northern Brewer incrociata con una varietà maschile nana resistente alle muffe. E' quindi "nipote" di Northern Brewer e "cugina" di Target. Ha buone caratteristiche di crescita ed alte rese alla produzione. Cresce nel West Midlands e nel Kent inglese, ma piccoli appezzamenti si trovano anche in Belgio ed in Francia. L'aroma raffinato si caratterizza per le note fruttate dai toni speziati che la rendono una varietà versatile per tutti i tipi di birra (sito web: Botanix Ltd, 2006).

<b>Cultivar: Challenger</b>			
Fonte: National Hop Association of England (London, UK)			
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	6.5 - 8.5%	Area (2000)	153 ha
Beta acidi (range)	2.5 - 4.3%	Produzione (media)	29 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	1.8 - 2.1 :1	Maturazione	Tardiva
Co-umulone (in % sugli alfa acidi)	20 - 25%	Stabilità nello stoccaggio	Buona
Olii totali (ml/100 g coni secco)	1.0 - 1.5		
Resistente alla muffa lanuginosa, suscettibile alla muffa pulverulenta.			

**FIRST GOLD** (varietà aromatica): è stata ottenuta da un'impollinazione tra WGV ed una varietà maschile nana. First Gold è stata la prima varietà nana, commercializzata solo nel 1996. Subito diffusa tra gli agricoltori, ad oggi conta per il 12% della produzione inglese di

luppolo. L'aroma è simile a quello di Goldings; il contenuto di alfa acidi è più elevato di quello delle tradizionali varietà aromatizzanti. Produce coni di media grandezza, ed è discretamente tollerante al *Verticillium* come il genitore WGV. Prove tecnologiche hanno indicato che First Gold è adatta per tutti i tipi di birra: può essere sfruttata per il luppolaggio tardivo e/o aggiunta nella caldaia in forma di coni essiccati. Ha eccellenti qualità aromatiche e trattiene molto più flavour di WGV, donando alle Ales amaro e note aromatiche fruttate, leggermente speziate, ben bilanciate (sito web: Botanix Ltd, 2006; The Hop Atlas, 1994).

<b>Cultivar: First Gold</b>			
Fonte: National Hop Association of England (London, UK)			
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	5.6 ~ 8.7%	Area (2000)	164 ha
Beta acidi (range)	2.3 ~ 3.6%	Produzione (media)	20 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	2.4 ~ 3.2 :1	Maturazione	Media
Co-umulone (in % sugli alfa acidi)	29 ~ 34%	Stabilità nello stoccaggio	Moderata
Olii totali (ml/100 g coni secco)	0.7 ~ 1.3		
Suscettibile alla muffa lanuginosa, resistente alla muffa pulverulenta.			

PHOENIX (varietà a duplice attitudine) : sviluppata all'EMR di Wye, contemporaneamente ad Admiral, Phoenix è ottenuta da Yeoman, per incrocio con una pianta maschile. Cresce meno vigorosamente di Target, rispetto alla quale matura due settimane in anticipo ed è più resistente alle infezioni. Accettabile è l'equilibrio tra flavour ed amaro, che si adatta bene a qualsiasi tipo di birra. La conservabilità degli alfa acidi è tra le più alte al mondo (National Hop Association of England, London, UK).

<b>Cultivar: Phoenix</b>			
Fonte: National Hop Association of England (London, UK)			
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	12 ~ 15%	Area (2000)	137 ha
Beta acidi (range)	3.3 ~ 5.3%	Produzione (media)	26 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	2.1 ~ 2.6 :1	Maturazione	Precoce
Co-umulone (in % sugli alfa acidi)	24 ~ 28%	Stabilità nello stoccaggio	Eccellente
Olii totali (ml/100 g coni secco)	1.2 ~ 2.5		
Suscettibile alla muffa lanuginosa, resistente alla muffa pulverulenta.			

WYE NORTHDOWN (varietà a duplice attitudine): ottenuta da Northern Brewer e da un luppolo maschile resistente alla muffa lanuginosa, Wye Northdown è la "zia" di Challenger

e Target. Per la produzione commerciale è stata diffusa negli anni '70. E' generalmente cresciuta fertile (con semi), ma si possono trovare aziende agricole che la coltivano senza semi (senza maschi impollinatori). Ha eccellenti proprietà aromatiche, anche se è meno pregiato il contributo degli alfa acidi. Per il suo gentile e neutro aroma, tipicamente inglese, Northdown trova impiego in tutti i tipi di birra (sito web: Botanix Ltd, 2006).

<b>Cultivar: Northdown</b>		Fonte: National Hop Association of England (London, UK)	
<b>Dati analitici</b>		<b>Coltivazione</b>	
Alfa acidi (range)	6.8 - 9.6%	Area (2000)	98 ha
Beta acidi (range)	3.3 - 6.2%	Produzione (media)	31 zentner/ha
Rapporto alfa:beta acidi	1.5 - 2.2 :1	Maturazione	Media
Co-umulone (in % sugli alfa acidi)	24 - 29%	Stabilità nello stoccaggio	Buona
Olii totali (ml/100 g coni secco)	1.2 - 2.2		
Suscettibile alla muffa pulverulenta, mostra qualche resistenza alla muffa lanuginosa,			

## 4.2 REAGENTI E STRUMENTAZIONI

Per tutte le analisi è stata utilizzata acqua distillata o deionizzata, prodotta nel laboratorio del BRI (Brewing Research International) con un depuratore per laboratorio Purite (High Wycombe, UK) Labwater RO50, ed è stata impiegata vetreria ordinaria di laboratorio.

Per determinare il contenuto d'umidità dei coni di luppolo si è adoperata una bilancia elettronica, con grado di accuratezza alla 4<sup>a</sup> cifra decimale, un forno ad aria mantenuto a 103 °C ± 2 °C e dei contenitori in metallo con i rispettivi coperchi.

I solventi per la preparazione degli estratti di α-acidi, β-acidi e xantoumulone (diethyl etere, acido idrocloridrico 0.1 M, metanolo e acido fosforico) sono stati acquistati dalla Fisher Scientific (Leicester, UK) ed erano tutti di grado analitico. Gli standard (α-acidi, β-acidi e xantoumulone) erano della Versuchsstation Schweizerische Brauereien (Zurich, Switzerland). La strumentazione adoperata è stata un macinino da caffè Moulinex, un agitatore automatico con ancorette magnetiche, filtri membrana da 0,45 µm e la strumentazione HPLC-DAD richiesta e specificata nella metodica di analisi EBC.

Per la determinazione dell'attività antiossidante (saggio ABTS) si è impiegato: 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) 97% della Aldrich; 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 98% della Sigma; acido L-Ascorbico 99% della SigmaUltra; Sodio acetato triidrato 99% della Sigma, mentre acido

acetico glaciale di grado analitico, metanolo e dietiletere erano della Fischer Scientific (Leicester, UK). Per lo stesso saggio sono stati adoperati: macinino da caffè Moulinex; bilancia elettronica, con grado di accuratezza alla 4<sup>a</sup> cifra decimale; vasca termoriscaldata a 55 °C (Grant Instrument, Cambridge, UK); pH-metro; agitatore automatico; sonicatore; ultracentrifuga; spettrofotometro a raggi UV con vasca termostata (Thermo-Electron Corporation, Scientific Instrument Division, Hempstead, UK) e cuvette in plastica di diametro di 10 mm.

Per la quantificazione delle catechine, lo standard è stato acquistato dalla Sigma (Catechina (+) idrata 98%), mentre i solventi (acetone, cloroformio, metanolo, acetonitrile e acido trifluoroacetico) erano tutti di grado HPLC, presi dalla Fisher Scientific (Leicester, UK). L'apparecchiatura utilizzata consisteva in: agitatore automatico Gerhardt (Fig. n.24); filtri carta, tipo Faltenfilter Ederol 85 g/m<sup>2</sup>; HPLC con rivelatore combinato Diode Array (DAD) e Fluorescenza (FD). Il dispositivo HPLC era composto da: pompa LaChrom L-7100, autocampionatore LaChrom L-7200 con iniettore a loop da 100µl, colonna di guardia Sphereclone ODS (2) (30 x 4.6 mm, 5µm, Phenomenex), colonna Sphereclone ODS (2) (250 x 4.6 mm, 5µm, Phenomenex), unità filtro di assemblaggio Millipore e membrane 0.45µm HVHP per filtrare tutti i reagenti, LaChrom L-7450 DAD (Channel 1), LaChrom L-7480 FD (Channel 2) e software Merck Hitachi D-7000 Interface Module per l'elaborazione dei dati con personal computer in linea.



**Fig. 24:** *agitatore automatico utilizzato per la preparazione degli estratti di luppolo nella determinazione delle catechine con analisi HPLC. In figura sono state fotografate le beute, contenenti i coni macinati di luppolo con 100 ml of acetone/acqua (75:25), al termine della corsa di estrazione di 30 minuti.*

### 4.3 MINI IMPIANTO PILOTA SU SCALA DI LABORATORIO

Per valutare il contributo di diverse varietà di luppolo sul potere antiossidante della birra, e monitorare le eventuali variazioni della capacità antiossidante lungo il processo produttivo, è stato allestito un mini impianto birrario, dal mosto non bollito sino alla birra pastorizzata, utilizzando esclusivamente le attrezzature di laboratorio. Il mosto è stato ottenuto diluendo, con acqua deionizzata, l'estratto Muntons Light Malt, acquistato dalla Art of Brewing (Leatherhead Road, Chessington, Surrey, UK), fino a raggiungere 14-15 gradi Plato. La concentrazione del mosto è stata valutata con metodo gravimetrico (Casey *et al.*, 1983). L'estratto Muntons Light Malt si caratterizzava per avere 8-12 unità di colore EBC ed essere non luppolato. Le fasi del processo produttivo, l'apparecchiatura e le modalità operative adottate sono riportate di seguito.

**BOLLITURA DEL MOSTO E LUPPOLAGGIO:** circa 500 ml di mosto sono portati ad ebollizione su piastre preriscaldate. Per minimizzare l'evaporazione si sono utilizzate delle perle in vetro e dei piccoli imbuti, quest'ultimi piazzati a mò di tappo sul collo della beuta contenente il campione. I coni interi di luppolo sono aggiunti ad inizio bollitura ed in ogni prova, un campione di mosto senza luppolo, è usato come controllo. Il quantitativo di coni aggiunti è calcolato in modo da avere una birra con circa 20 International Bitterness Unit (IBU). Tecnicamente un IBU equivale ad un milligrammo di iso-alfa acido per litro di birra; esprimendo i ppm di iso-alfa acidi, l'IBU è un parametro proporzionale alla sensazione di amaro che si ha bevendo una birra. In letteratura, sono state pubblicate diverse formule per la misurazione dell'amaro, molte delle quali matematicamente simili. Semplificando, gli elementi che sono inclusi in tutte le formule, sono:

- Volume del mosto bollito con il luppolo;
- Contenuto di alfa acido del luppolo utilizzato;
- Percentuale di utilizzazione del luppolo. Infatti, non tutto l'amaro potenziale del luppolo passa nella birra (Miller, 1994; sito web "Brewing techniques", 2005). Questa è la variabile più difficile da stimare, ed è a questa che si deve molta dell'aleatorietà che si riscontra stimando il quantitativo di luppolo da utilizzare in relazione all'amaro che si vuole ottenere nella birra. I fattori che influiscono sull'isomerizzazione degli alfa-acidi, e che quindi interferiscono sulla percentuale di utilizzazione, sono:

*Durata della bollitura:* più è lunga e più componenti amare sono estratte. Analogamente, un'aggiunta di luppolo tardiva, ottimale per preservare l'aroma ed il flavour del luppolo nella birra, conferirà meno amaro.

*Intensità della bollitura:* più è intensa e turbolenta, e più componenti amare sono estratte. Al riguardo anche il materiale e la conformazione della caldaia, la posizione

della fonte di calore e il tempo che la massa bollente impiega a raffreddarsi, sono parametri che influenzano la percentuale di utilizzazione, ma essendo di difficile quantificazione matematica, sono generalmente trascurati.

*Volume:* generalmente bollendo un grande volume di mosto, si ottiene una migliore efficienza estrattiva nei confronti delle sostanze amare, rispetto a volumi ridotti.

*Gravità specifica del mosto:* mosti concentrati con molti zuccheri disciolti o le lavorazioni in high-gravity riducono l'abilità estrattiva dei mosti nei confronti delle sostanze amare.

*Qualità del luppolo:* si è notato che le pellets, ad esempio, in bollitura rispondono con una più alta percentuale di utilizzazione rispetto ai corrispondenti coni interi di uguale contenuto in alfa acidi.

Nel caso specifico si è assunto pari a 20 l'IBU che si desidera avere nella birra. Pertanto, considerato quanto sopra, la quantità di luppolo da aggiungere è calcolata applicando la seguente formula, ipotizzando pari a 20 la percentuale di utilizzazione:

$$\text{Luppolo (mg)} = \frac{\text{IBU} \times \text{vol. mosto}}{\alpha\text{-acidi} \times \% \text{utilizzazione}}$$

Con: *Luppolo (mg)* è la quantità, in milligrammi, di luppolo da aggiungere al mosto in bollitura per avere una birra con l'amaro (IBU) desiderato;

*IBU* (International Bitterness Units) unità di amaro della birra;

*vol. mosto* è il volume del mosto prima della bollitura, espresso in litri;

*α-acidi* è il contenuto di alfa acidi dei coni di luppolo, espresso in percentuale peso/peso;

*% utilizzazione* è un numero percentuale.

**ELIMINAZIONE DEL TORBIDO E STEAMING:** la bollitura è interrotta dopo un'ora esatta, filtrando su carta "Schleicher and Shuell" il mosto caldo. Questa operazione mima quello che in birreria si fa utilizzando la centrifuga denominata comunemente whirlpool. Quest'ultima rimuove i coni esauriti di luppolo e provvede ad eliminare il torbido, ossia i complessi proteico-tannici, coagulati durante l'ebollizione insieme alle resine provenienti dal luppolo. Il torbido ha un'influenza nociva sulla fermentazione perché imbratta la parete esterna delle cellule di lievito, riducendone l'attività fermentativa, e perché nel corso della fermentazione può tornare in soluzione per precipitare in seguito nella birra finita, soprattutto a bassa temperatura. Dopo il raffreddamento a 20 °C, il volume del mosto è

aggiustato con acqua deionizzata per avere una concentrazione standard di 13 gradi Plato  $\pm 0,2$ . Quindi, circa 400 ml di mosto, chiusi in contenitori Duran, sono passati a vapore per 30 minuti, usando un generatore di vapore (steamer) della British Steralizer Company Ltd., London. Lo steaming (vaporizzazione, colpo di calore) è un'operazione che non viene effettuata nelle birrerie, ma che in questo ambito è necessaria per garantire l'attecchimento dei lieviti inoculati, dopo le manipolazioni fatte sul mosto a fine bollitura. Inoltre, lo steaming, consente altresì di stoccare i campioni fino a due settimane, senza alterazioni dal punto di vista microbiologico; i campioni sono posti in frigo  $+3^{\circ}\text{C}$  subito dopo la vaporizzazione. Tuttavia, per evitare che il potere antiossidante dei mosti cambiasse nel tempo, e soprattutto per standardizzare i parametri di processo, ogni campione è stato analizzato al massimo entro tre giorni dallo steaming.

**FERMENTAZIONE:** i mosti sono ossigenati approssimativamente alla concentrazione di 8 ppm di  $\text{O}_2$  disciolto, dopodichè sono inoculati con un lievito di tipo lager, *Saccharomyces pastorianus*, moltiplicato nel laboratorio microbiologico del BRI. L'aerazione dei mosti è un'operazione necessaria per garantire un buon attecchimento del lievito. Infatti il lievito, non appena viene inoculato, utilizza rapidamente l'ossigeno disciolto nel mosto per la biosintesi di componenti della membrana cellulare. Una membrana cellulare ben funzionante consente una corretta entrata e uscita di zuccheri ed enzimi dalla cellula del lievito, e quindi una regolare fermentazione. Tutte le attrezzature e la vetreria impiegate in questa fase, sono state precedentemente sterilizzate in autoclave (tipo Herald della Rodwell Scientific Instrument) ed ogni operazione è stata portata a termine sotto cappa a flusso laminare. Il lievito, conservato fino al bisogno a  $+3^{\circ}\text{C}$ , su YM Agar in forma di becco di clarino, è stato propagato, prima dell'inoculazione, in due momenti: da 15 ml a 250 ml con la soluzione nutritiva MYGP (estratto di malto, estratto di lievito, glucosio e peptone). In questo modo è possibile raggiungere un "pitching rate" di 20 milioni di cellule per millilitro di mosto. Ogni campione è inoculato in doppio, così che il sub-campione misura circa 180 ml cadauno. La fermentazione, condotta a  $11-12^{\circ}\text{C}$ , è interrotta solo dopo che il grado Plato dei mosti raggiunge il valore di  $2.5^{\circ}\text{P}$ : generalmente dopo 7 - 10 giorni.

**RIMOZIONE DEL LIEVITO:** i campioni, tolti dalla camera di fermentazione, sono lasciati a  $12^{\circ}\text{C}$  per tre giorni (warm rest). Dopo un ulteriore sosta per giorno a  $+3^{\circ}\text{C}$ , le birre torbide sono filtrate su carta per rimuovere il lievito, che per lo più si deposita sul fondo. Negli impianti birrari, dopo l'aerazione dei mosti prima dell'inoculo, il contatto dell'ossigeno con la birra è accuratamente evitato in ogni fase in quanto è causa di meccanismi d'ossidazione che portano ad alterazioni del gusto e dell'aroma sul prodotto finito. Nella presente mini-sperimentazione, non è stato possibile mettere in atto accorgimenti tali da rispettare questa condizione operativa. Pertanto, andrà tenuto conto di questa circostanza

nell'analisi dei risultati, poiché nella rimozione del lievito, o nel prelievo della birra per l'analisi ABTS, c'è stato contatto di ossigeno con il prodotto, anche se per tempi limitati.

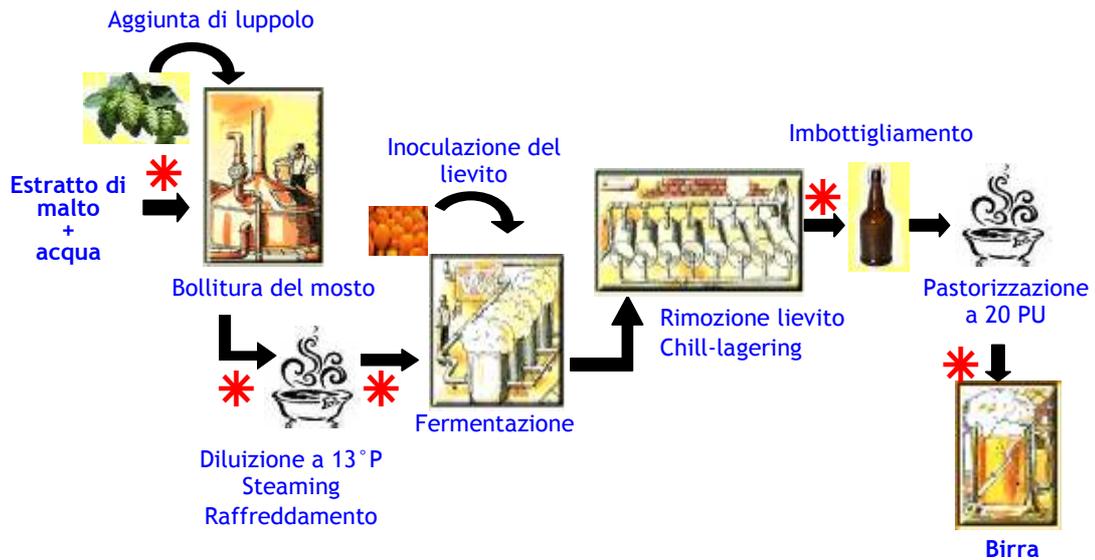
**CHILL-LAGERING:** dopo la filtrazione, le birre sono conservate a 0° C, in bottigliette di vetro chiuse con tappo a vite e sigillate con nescofilm, per una settimana: questa fase, tipica della produzione di birre Lager, è detta chill-lagering. La fase post-fermentativa è utile all'affinamento del gusto e dell'aroma della birra. Per monitorare l'andamento della maturazione spesso si usa come parametro di riferimento il quantitativo di diacetile che, da 0.35-0.40 mg/l, scende a meno di 0.10 mg/l, per opera del lievito in sospensione. Ciò migliora notevolmente il gusto della birra, che altrimenti acquisterebbe il tipico sapore di burro.

**PASTORIZZAZIONE:** le birre scongelate, sono pastorizzate nelle bottiglie McCartney, per immersione a bagno maria, a 20 unità di pastorizzazione (PU: pasteurization units, come definite dall' European Brewing Convention), il che equivale a 60 °C per 20 minuti a pieno regime. Quindi, i campioni sono raffreddati passandoli in acqua fredda. Le birre giovani, così ottenute, sono stoccate in frigorifero a + 3°C fino al momento del loro utilizzo.

**PRELIEVO DEI CAMPIONI:** la capacità antiossidante è stata determinata su campioni prelevati in vari punti del processo produttivo (Fig. 25). In particolare il TAA è stato misurato su:

1. Mosto prima della bollitura, senza luppolo. Per rendere confrontabili i risultati del saggio ABTS, ripetuto nelle varie prove, la concentrazione di ogni campione è stata aggiustata a 13 °P utilizzando acqua deionizzata.
2. Mosto dopo un'ora di ebollizione e dopo essere stato portato alla concentrazione di 13 °P.
3. Mosto prelevato dalla cella frigorifero a + 3 °C, il giorno dopo che è stato effettuato lo steaming.
4. Birra dopo il chill-lagering e prima della pastorizzazione. Il medesimo campione è stato anche utilizzato per determinare pH, contenuto d'alcol e amaro.
5. Birra dopo essere stata pastorizzata.

In ogni caso, le analisi sono state eseguite a 20 °C e, sia i mosti sia le birre, sono stati diluiti 1:5, con la soluzione tampone, prima della lettura spettrofotometrica (saggio ABTS).



**Fig. 25:** schema che illustra le principali fasi del processo produttivo, così come è stato riprodotto a laboratorio a partire da mezzo litro di mosto. Sono evidenziati con un asterisco i punti di prelievo dei campioni per l'analisi con saggio ABTS.

#### 4.4 METODI DI ESTRAZIONE

**METODO A:** 0,5 grammi di coni essiccati interi di luppolo sono macinati e sottoposti ad estrazione con 12 ml di metanolo, per 5 volte, tramite agitazione dei campioni per 10 minuti, e sonicazione per 3 minuti. Alla fine di ogni ciclo, il supernatante è riunito e stoccato in frigorifero a + 3°C fino al seguente ciclo di estrazione. Prima della lettura spettrofotometrica è necessario chiarificare i campioni tramite micro-centrifugazione (high speed x 2 min). Tutti i campioni sono diluiti 1:5 con metanolo. Per le estrazioni effettuate sui coni freschi del 2005, non essiccati, si procede a macinazione con azoto solido e, dopo una pausa per consentire l'allontanamento dell'azoto, si segue esattamente il metodo A su 2,17 grammi di campione. In quest'ultimo caso, gli estratti di luppolo fresco sono diluiti 1:2, prima della lettura spettrofotometrica, per ottenere un range di inibizione dell'assorbanza sempre compreso tra il 15-80 %.

**METODO B:** 0,5 grammi di coni essiccati interi di luppolo sono macinati e sottoposti a delipidazione con 6 ml di dietilere tramite agitazione e centrifugazione (1700 g x 10 minuti); il supernatante è gettato. Questa procedura è ripetuta 3 volte per rimuovere le resine e le sostanze lipidiche dei luppoli. Dopo l'ultimo ciclo, il campione è portato a secco con azoto per eliminare eventuali tracce residue di solvente. Da qui in poi è applicato il metodo A.

#### 4.5 METODI ANALITICI

**DETERMINAZIONE DI ALFA ACIDI, BETA ACIDI E XANTOUMULONE (XAN):**  $\alpha$ -acidi,  $\beta$ -acidi e Xan sono quantificati, in singolo, tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) secondo la metodica EBC (Analytica EBC, 1998). Per un corretto calcolo dei risultati è necessario conoscere il contenuto d'umidità dei campioni, in quanto i risultati sono espressi in percentuale peso/peso. Pertanto, per ogni campione, è stato determinato il contenuto d'umidità seguendo le linee guida riportate nei "Recommended Methods of Hop Analysis" (1964): 10 grammi di coni interi di luppolo sono posti in forno, preriscaldato a  $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , per un'ora esatta da quando la temperatura interna del forno si è ristabilita al valore di 103 gradi. I contenitori con i campioni sono quindi rimossi dal forno e richiusi con i rispettivi coperchi; dopo 15 minuti di raffreddamento a temperatura ambiente, si ripesano e la tara (contenitore più coperchio) si sottrae dal peso lordo del contenitore con il luppolo, dopo e prima l'essiccamento in forno. La sostanza secca (DMC) è calcolata come segue:

$$\text{DMC} = \frac{W2}{W1} \times 100$$

Con:            DMC esprime il contenuto di sostanza secca in percentuale (peso/peso);  
                  W2 è il peso del campione DOPO l'essiccamento in forno;  
                  W1 è il peso del campione PRIMA dell'essiccamento in forno.

L'estrazione degli  $\alpha$ -acidi,  $\beta$ -acidi e dello Xan è fatta agitando, per 40 minuti a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 grammi di coni macinati di luppolo con 20 ml di metanolo, 100 ml di dietiletere e 40 ml di acido cloridrico 0,1 mol/l. 230  $\mu\text{l}$  di supernatante sono posti in palloncini da 25 ml e portati a volume con metanolo. I campioni, filtrati con membrane a 0,45  $\mu\text{m}$  nelle vials, sono stoccati al buio fino all'analisi. La soluzione standard è preparata giornalmente pesando, e portando a volume, 200 mg  $\pm$  10 mg di  $\alpha$ - e  $\beta$ -acidi e 10 mg di Xan in 100 ml di metanolo. Da questa soluzione sono ricavate sette diluizioni in metanolo (da 1 a 7 ml in palloncini da 25 ml) per costruire la retta di calibrazione esterna. Gli eluenti impiegati nell'analisi HPLC consistono in 1700 ml di metanolo, 5 ml di acido fosforico e 300 ml di acqua con 75 mg di EDTA. Il flusso è settato a 1.5 ml/min ed il rivelatore a 325  $\mu\text{m}$ . I risultati sono espressi in % (peso/peso) alla seconda cifra decimale.

**DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAA) CON SAGGIO ABTS:** è stata adattata la versione del metodo messo a punto per la prima volta da Miller *et al.* (1993), e poi ulteriormente modificato da altri autori (Re *et al.*, 1999; Van den Berg *et al.*, 1999; Cano *et al.*, 2000). Questo saggio permette di determinare l'attività antiossidante totale di un campione avvalendosi della tecnica spettrofotometrica. Il metodo si basa sull'uso di una soluzione contenente una sostanza radicalica (ABTS<sup>°+</sup>), la cui assorbanza, a determinate lunghezze d'onda, diminuisce in maniera proporzionale alla quantità di composti antiossidanti aggiunti alla soluzione stessa. L'ABTS è una sostanza cromogena incolore che può essere convertita nella sua forma monocationica radicalica (ABTS<sup>°+</sup>) se trattata con un agente ossidante. La forma radicalica dell'ABTS è colorata e presenta diversi picchi di assorbimento, ben accentuati a 645, 734 e 815 nm. L'aggiunta di sostanze antiossidanti, capaci di donare un elettrone o un atomo di idrogeno, riduce l' ABTS<sup>°+</sup>, colorata, ad ABTS, incolore. Ciò determina una decolorazione della soluzione iniziale ed una diminuzione dell'assorbanza proporzionale alla quantità di antiossidante aggiunto. La percentuale di inibizione dell'assorbanza, misurata con lo spettrofotometro a 734 nm, entro una certa scala di tempo, è calcolata come funzione della concentrazione del campione nei confronti di uno standard di riferimento (nel caso specifico, acido ascorbico ). Pertanto l'attività antiossidante totale (TAA) di un campione è espressa in unità equivalenti di acido ascorbico e può essere definita come la concentrazione di acido ascorbico con attività equivalente ad 1 µg/g di estratto di lippolo analizzato (si vedano formule sotto riportate).

$$\% \text{ Inibizione} = \frac{A_{\text{bianco}} - A_{\text{campione}}}{A_{\text{bianco}}} \times 100$$

$$TAA = \frac{\% \text{ Inibizione} \times \text{diluizione} \times \text{vol. estrazione}}{m \times \text{peso lippolo}}$$

Con: *% Inibizione*: percentuale di inibizione dell'assorbanza, misurata a 734 nm, della soluzione contenente il radicale ABTS<sup>°+</sup>, dopo l'aggiunta del campione di cui si vuole misurare la capacità antiossidante;

*A bianco*: assorbanza del bianco di riferimento;

*A campione*: assorbanza del campione di cui si vuole misurare la capacità antiossidante;

*TAA*: attività antiossidante totale di un campione, espressa in unità equivalenti di acido ascorbico (µg/g);

*diluizione*: è un numero che esprime il fattore di diluizione del campione;

*vol. estrazione*: è il volume dell'estratto di luppolo, espresso in ml;

*m*: è il coefficiente dell'equazione della curva di calibrazione;

*peso luppolo*: è il peso, in grammi, del campione di luppolo considerato.

La soluzione cromogena è preparata a partire da una soluzione tampone di acetato di sodio 50 mM, aggiustato a pH 5,4 con acido acetico glaciale 50 mM. Per evitare interferenze nelle letture spettrofotometriche, la soluzione tampone è sempre passata su filtri membrana 0,45 µm prima di ogni altro utilizzo. Quindi 25 ml di AAPH 40 mM in soluzione tampone e 50 ml di ABTS 1,5 mM, in soluzione tampone, sono riuniti e portati a 500 ml con il tampone acetato. La soluzione così ottenuta, incolore, dopo essere stata incubata al buio per un'ora esatta a 55 °C, diviene di colore blu-verde ed è pronta per l'analisi spettrofotometrica. 3,125 ml di soluzione cromogena sono aggiunti a 25 µl di standard, o di campione, esattamente 15 secondi dopo la miscelazione iniziale e fino a 14 minuti dopo la preparazione del relativo bianco (Fig. n. 26). Ogni misurazione è stata replicata tre volte. La curva di calibrazione è costruita con sei punti, adoperando acido L-ascorbico 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 e 3 mM.



**Fig. 26:** spettrofotometro con camera termostata utilizzato per il saggio ABTS. A sinistra le cuvette, riempite con 3,125 ml di soluzione cromogena e 25 µl di campione o di "bianco", sono pronte per la lettura spettrofotometrica. Lo spettrofotometro in dotazione consentiva la lettura di otto cuvette, ossia due campioni, per ogni ciclo di analisi: tre cuvette per ogni campione più una per il rispettivo bianco. A destra, è visualizzata, sullo schermo del computer, parte delle letture di assorbanza a 734 nm relative ad un campione.

**DETERMINAZIONE DELLE (+)CATECHINE:** L'estrazione delle catechine è stata fatta adattando il metodo di Forster (Forster *et al.*, 2002). 3,5 grammi di luppolo macinato sono sottoposti ad agitazione per 30 minuti con 100 ml of acetone/acqua (75:25). Dopo essere filtrati, le sostanze non polari dei campioni sono rimosse con 30 ml di cloroformio. Il supernatante raccolto è portato a 50 ml con acqua, e ulteriormente diluito dieci volte prima dell'analisi

HPLC. Lo standard, preparato giornalmente, consiste in una soluzione metanolica di 1 g/l di (+)-catechina. La separazione cromatografica è condotta con un programma a gradiente. Le fasi mobili che sono impiegate sono una soluzione allo 0,05% di acido trifluoroacetico in acetonitrile (fase A) ed una soluzione acquosa allo 0,05% di acido trifluoroacetico (fase B). Il programma di eluizione è: da 10% A - 90% B a 20% A - 80% B nei primi 20 minuti con gradiente lineare; 80% A e 20% B dal minuto 20,1° al 25,0°; 10% A - 90% B dal 25,1° al 30,0° minuto. Alla fine di ogni corsa, è stato usato metanolo per pulire il sistema prima della successiva analisi. Le condizioni operative del sistema sono le seguenti: temperatura della colonna, 20 °C; flusso, 1 ml/min; volume d'iniezione, 30 ml; range di lunghezza d'onda, da 200 a 300 nm; larghezza della banda, 4 nm; intervallo dello spettro, 200 msec.

**DETERMINAZIONE DELLE UNITA' DI AMARO E DEL CONTENUTO DI ALCOL:** queste determinazioni sono effettuate solo sulle birre ottenute dalla sperimentazione pilota allestita a laboratorio, seguendo esattamente la metodica EBC (Analytica EBC, 1998). Il grado di amaro ottenuto è espresso come International Bitterness Unit (IBU), mentre il contenuto d'alcol è riportato in percentuale volume/volume di alcol (% v/v).

#### **4.6 LIMITI E APPLICAZIONI DEI SAGGI PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE**

Nel presente lavoro di ricerca è stato applicato solo il saggio ABTS. Tuttavia, per poter meglio interpretare i dati ottenuti, comprenderne il significato ed eventualmente confrontare i risultati con quelli disponibili in letteratura, dove spesso sono applicati saggi diversi per effettuare la stessa determinazione, si è ritenuto opportuno fare qualche cenno anche sui principi, applicazioni e limiti dei metodi che ricorrono con più frequenza nei laboratori.

Alcuni antiossidanti, considerati individualmente, sono in grado di agire con molteplici meccanismi in un singolo sistema (Ishige *et al.*, 2001); in altri casi, sono in grado di rispondere con lo stesso meccanismo pur trovandosi in sistemi diversi. Sia per i molteplici meccanismi di azione, sia per le diverse localizzazioni di fase, che generalmente sono coinvolte, nessun singolo saggio può rispondere a tutte le fonti radicaliche o riflettere accuratamente tutti gli antiossidanti presenti in una matrice complessa (Prior *et al.*, 2005). Valutare la combinazione tra: fonti di radicali presenti, caratteristiche del sistema e meccanismi di azione degli antiossidanti, è un momento critico per la scelta del metodo più appropriato per la determinazione della capacità antiossidante, poichè dipende anche dall'uso finale che se ne farà dei risultati.

L'esigenza di disporre di linee guida per la corretta applicazione del metodo da adottare, la necessità di poter comparare alimenti e prodotti commerciali e di poter monitorare le variazioni entro un campione, hanno evidenziato come sia fondamentale standardizzare questi metodi analitici. Questo argomento è stato al centro delle tematiche affrontate nel Primo Congresso Internazionale sui Metodi Antiossidanti, tenutosi ad Orlando (Florida, USA) nel Giugno 2004. In questo meeting si è ribadito che un metodo standardizzato per la valutazione della capacità antiossidante, dovrebbe rispondere ai seguenti requisiti: misurare chimicamente quello che avviene nelle potenziali applicazioni; utilizzare una fonte radicalica biologicamente rilevante; semplicità; possedere un meccanismo chimico ben definito; facilità di reperire la strumentazione necessaria; buona riproducibilità tra le repliche e nel tempo; adattabilità del saggio a rilevare antiossidanti lipofili, idrofili e a rispondere a differenti fonti radicaliche. Analogamente, le performance analitiche che bisognerebbe considerare nella standardizzazione del metodo, sono: range analitico; recupero; ripetibilità; riproducibilità e individuazione degli interferenti.

Come accennato nel capitolo introduttivo, gli antiossidanti agiscono contro i radicali secondo due meccanismi fondamentali: per trasferimento di un atomo di idrogeno (Hydrogen Atom Transfer: HAT) o per trasferimento di un singolo elettrone (Single Electron Transfer: SET). Diversi saggi per la determinazione della capacità antiossidante sono stati messi a punto sulla base del meccanismo di azione HAT, SET o entrambi.

#### **SAGGI ANTIOSSIDANTI BASATI SUL MECCANISMO DI AZIONE HAT**

**ORAC** (Capacità di Assorbimento del Radicale Ossigeno): misura l'inibizione antiossidante del radicale perossile indotto per ossidazione; ciò riflette la classica attività antiossidante di "radical chain breaking" per trasferimento di un atomo di idrogeno (Cao *et al.*, 1993; Ghiselli *et al.*, 1995; Prior *et al.*, 2003). Nel metodo base, il radicale perossile reagisce con una sostanza fluorescente (marker) a formare un prodotto nonfluorescente, che può essere facilmente quantificato per fluorescenza. La capacità antiossidante è determinata dal tasso decrescente e dalla perdita di fluorescenza dovuta all'ossidazione del marker formatosi nel tempo. Di solito si usa come sostanza fluorescente, la fluorescina (FL) o la diclorofluorescina. I prodotti di ossidazione della FL, indotti dal radicale perossile, sono stati identificati per cromatografia liquida-MS ed il meccanismo di reazione è stato riconosciuto come un tipico HAT (Ou *et al.*, 2001). Il risultato è espresso come Trolox equivalenti. Le prime versioni del metodo sono state successivamente modificate per poter rendere l'ORAC adatto alla determinazione di antiossidanti sia lipofili sia idrofili (Huang D. *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). Questa caratteristica è uno dei principali vantaggi dell'ORAC, unitamente al fatto che il metodo può essere completamente automatizzato.

D'altra parte l'ORAC è sensibile alle variazioni di temperatura e ciò richiede uno stretto monitoraggio delle temperature stesse per garantire la riproducibilità del saggio. Infine, il metodo richiede lunghi tempi di analisi (circa 1 ora) ed una strumentazione non sempre disponibile nei comuni laboratori.

#### **SAGGI ANTIOSSIDANTI BASATI SUL MECCANISMO DI AZIONE SET**

**FRAP** (Ferric Reducing/Antioxidant Power): messo a punto per la prima volta da Benzie e Strain (1999) per misurare il potere riducente del plasma, è stato poi adattato per saggiare la capacità antiossidante di specie botaniche. Il test misura la riduzione della 2,4,6-tripiridil-s-triazina ferrica (TPTZ) a formare un prodotto colorato blu intenso (Guo *et al.*, 2003; Jimenez-Escrig *et al.*, 2001). Il potere riducente è relazionato al grado di idrossilazione ed estensione della coniugazione nei polifenoli (Pulido *et al.*, 2000). Tuttavia il FRAP non è in grado di rivelare composti che agiscono per trasferimento di idrogeno (radical quenching), come tioli e proteine. Questo comporta una sottostima del risultato soprattutto nel siero. Inoltre, il pH fortemente acido, che si usa nel FRAP per mantenere il ferro in solubilità, comporta uno spostamento del meccanismo di reazione dominante con la conseguente implicazione che i risultati del FRAP non sono comparabili con altre misurazioni di test antiossidanti. Il FRAP si fonda sull'ipotesi che le reazioni redox avvengono piuttosto rapidamente (da 4 a 6 min), ma in realtà questo non si verifica sempre. Ciò rende questo test fortemente dipendente dai tempi analitici adottati. Un'altra critica che comunemente viene sollevata contro questo saggio è che esso misura solamente l'abilità riducente nei confronti dello ione ferrico, che è un meccanismo antiossidante fisiologicamente marginale. Tuttavia, poiché il FRAP si basa esclusivamente su un meccanismo SET, se usato in combinazione con altri tests, può essere sfruttato utilmente per distinguere il meccanismo di azione dominante in presenza di diversi antiossidanti. Infine, altri vantaggi sono che è un saggio semplice, veloce, economico, che può essere completamente automatizzato e non richiede una strumentazione di laboratorio specifica.

#### **SAGGI ANTIOSSIDANTI BASATI SU UN MECCANISMO DI AZIONE MISTO HAT E SET.**

**ABTS:** sul principio del metodo si è esposto nel paragrafo precedente. Alcune modificazioni del metodo hanno previsto una diversa lunghezza d'onda per monitorare la reazione o in molte determinazioni sono usati come standard, oltre l'acido ascorbico, le catechine o il Trolox, ovvero la forma solubile della vitamina E (Fig. n. 27). In quest'ultimo caso l'attività antiossidante è indicata come TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). In ogni caso

tutte le varianti del metodo condividono lo stesso meccanismo di azione e usano la stessa specie radicalica  $ABTS^{\circ+}$ ; sono pertanto chiamate col termine TEAC o più spesso ABTS.

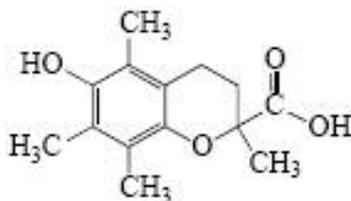


Fig. 27: molecola di Trolox.

L'ABTS è un saggio semplice che può essere applicato con un ampio range di valori di pH. Questa caratteristica è utilmente sfruttata per studiare gli effetti del pH sui meccanismi antiossidanti. L' $ABTS^{\circ+}$  reagisce rapidamente con gli antiossidanti, tipicamente entro 30 minuti, è solubile sia in solventi acquosi che organici e non è influenzato dalla forza ionica. Questo significa che il metodo è valido per la determinazione dell'attività antiossidante di estratti sia idrofili sia lipofili (Arnao *et al.*, 2001). Dal punto di vista termodinamico, un composto può ridurre l' $ABTS^{\circ+}$  se ha un potenziale redox più basso dell'ABTS (0,68 V). Molti composti fenolici hanno un potenziale redox basso e perciò possono reagire con l' $ABTS^{\circ+}$ . Una critica mossa a questo saggio è che l'ABTS non è fonte radicalica "fisiologica"; inoltre la reazione decorre in modo non prevedibile per reazioni lente. A questo proposito, alcuni autori (Thaipong *et al.*, 2006; Ozgen *et al.*, 2006; Van den Berg *et al.*, 1999) hanno concluso che il TEAC è un saggio che può dare problemi nella valutazione della capacità antiossidante in termini assoluti, ma può essere sfruttato utilmente per fornire una scala relativa di potere antiossidante fra diversi composti.

**2,2- DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH) TEST:** questo metodo coinvolge l'uso del radicale organico 2,2-difenil-1-picrilidrazile ( $DPPH^{\circ}$ ). Questa sostanza è uno dei radicali azotati più stabili, ed è commercialmente disponibile, ossia non ha bisogno di essere generato prima del saggio come nel caso dell' $ABTS^{\circ+}$ . Il metodo si basa sulla misura dell'abilità riducente degli antiossidanti, verso il  $DPPH^{\circ}$ , tramite risonanza di spin elettronico o, più frequentemente, tramite misurazione dell'inibizione dell'assorbanza (Brand-Williams *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 2002). L'assorbanza, a 515 nm, viene registrata sino a quando la reazione non raggiunge un plateau. La concentrazione iniziale di DPPH è calcolata mediante una retta di taratura determinata con una regressione lineare. L'attività antiossidante è definita o come riduzione percentuale della concentrazione del  $DPPH^{\circ}$  o come quantità di antiossidante necessario a ridurre del 50% la concentrazione iniziale di

DPPH. Il metodo è semplice, rapido e di facile realizzazione, ma l'interpretazione dei risultati è complicata soprattutto se i composti testati hanno uno spettro che si sovrappone a quello del DPPH a 515 nm. Questo, ad esempio, si verifica per i carotenoidi (Noruma *et al.*, 1997). Il DPPH si decolora sia per reazione radicalica (HAT) che per riduzione (SET) così come per reazioni collaterali. L'accessibilità sterica ai siti attivi del radicale è il principale determinante della reazione. In questo senso, le molecole piccole hanno accesso facilitato al sito radicalico del DPPH, così che mostrano un maggiore potere antiossidante apparente. Inoltre, gli antiossidanti che reagiscono rapidamente con il perossil radicale possono reagire lentamente con il DPPH o non reagire affatto se sono stericamente inaccessibili. Perciò l'interpretazione dei risultati del saggio DPPH non sempre riflette accuratamente l'abilità antiossidante del campione.

Questi tests hanno spesso fornito risultati variabili anche applicati allo stesso campione o, in alcuni casi, quando eseguiti in laboratori di analisi diversi. Ad esempio, Ou *et al.* (2002) non hanno evidenziato nessuna correlazione tra l'attività antiossidante misurata con il FRAP e l'ORAC su 927 specie vegetali essiccate congelate; viceversa, gli stessi metodi hanno rilevato buone correlazioni nei frutti di mirtillo (Connor *et al.*, 2002). Verosimilmente, Awika *et al.* (2003) hanno osservato alta rispondenza tra i saggi ABTS, DPPH, e ORAC nel sorgo e nei suoi derivati. Altri autori (Thaipong *et al.*, 2006) hanno riscontrato buona riproducibilità nelle determinazioni dell'attività antiossidante nei frutti di guava applicando il DPPH e il FRAP test, ma non l'ABTS e l'ORAC.

Secondo Prior *et al.* (2003), il saggio ORAC è uno dei più validi poiché si basa su fonti radicaliche biologiche, così che la capacità antiossidante, mostrata in vitro, può effettivamente riflettere l'azione in vivo.

Dal Primo Congresso Internazionale sui Metodi Antiossidanti è emerso che, allo stato attuale, non esiste un metodo valido "per la determinazione della capacità antiossidante totale" del sistema. E' stato quindi suggerito di valutare la capacità antiossidante totale con saggi multipli, in grado di generare un "profilo antiossidante" derivante da una reattività verso radicali sia acquosi sia lipofili, tramite meccanismi diretti, di radical quenching e di riduzione radicalica, e indiretti, per complessamento dei metalli.

Analoghe osservazioni possono essere fatte in merito al solvente usato. Per la grande eterogeneità degli antiossidanti nelle matrici vegetali, nessun "sistema-solvente" è ottimale per estrarre tutti gli antiossidanti presenti nel campione. Inoltre, è frequente estrarre con gli antiossidanti anche degli interferenti che falsano il risultato. Infine, il tipo di solvente e la sua polarità, influenzano il meccanismo di azione nel trasferimento del singolo elettrone (SET) o dell'idrogeno (HAT). E' pertanto opportuno scegliere il compromesso più vantaggioso. D'altra parte il confronto a posteriori dei risultati ottenuti

da differenti metodi antiossidanti, non è detto che produca informazioni ulteriori rispetto a quelle ricavate applicando il singolo saggio. Questo perché il fattore limitante dei metodi antiossidanti è la scarsa riproducibilità dei saggi menzionati.

Un'altra problematica che tange tutte le metodiche menzionate, riguarda il fatto che l'abilità antiossidante, mostrata dai composti in vitro, non trova seguito nell'inibizione del deterioramento degli alimenti che contengono tali sostanze. Questo perché nel sistema "alimento" l'attività antiossidante dipende non solo dalla reattività chimica dei composti, ma anche dalla loro localizzazione, dalle interazioni con altri costituenti e dalle condizioni ambientali (es. pH) (Decker *et al.*, 2005).

Infine, si accenna di seguito alle molteplici difficoltà che si incontrano nella misurazione della capacità antiossidante, in vivo, nel plasma umano. Molti dei saggi sono basati sull'uso di sostanze induttori di radicali idrofili, come il 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) diidrocloreto (AAPH), di substrati esogeni idrofili ossidabili (sonde) e quindi di misure della capacità antiossidante limitate ai compartimenti acquosi del plasma. Di conseguenza i risultati che si ottengono con questi saggi sono influenzati principalmente dalla presenza di antiossidanti, come l'acido ascorbico e l'acido urico, mentre gli antiossidanti lipofili, come i tocoferoli e i carotenoidi, svolgono un ruolo marginale nel contribuire al valore della misurazione. Recentemente diversi studi hanno focalizzato l'attenzione sul significato biologico degli antiossidanti lipofili, ma sono ancora in corso di validazione saggi in grado di riflettere l'eterogeneità del matrice-plasma considerando gli antiossidanti presenti in entrambi i compartimenti, idrofili e lipofili. (Beretta *et al.*, 2006).

A conclusione del Congresso di Orlando, sono stati proposti tre metodi, tra quelli già normalmente applicati nei laboratori, per la standardizzazione delle relative procedure e applicazioni: l'ORAC, il Folin-Ciocalteu ed il TEAC. Il Folin-Ciocalteu è un saggio quantitativo per la determinazione totale dei polifenoli, messo a punto da Shahidi e Naczk (1995), a cui si rimanda per la metodica.

Tenendo in mente le considerazioni finora fatte sui metodi antiossidanti, è facile evincere come i risultati di questo studio sono stati fortemente influenzati dal saggio adottato (l'ABTS). Riportando il presente lavoro di ricerca nel panorama scientifico attuale, relativo allo studio degli effetti antiossidanti di taluni composti sull'organismo umano, questa tesi si profila come un valido suggerimento per impostare ulteriori indagini sul potere antiossidante del luppolo, quale ingrediente birrario. Se verranno confermate le proprietà antiossidanti dell'*Humulus lupulus*, l'auspicio per il futuro è quello di poter scegliere le varietà di luppolo anche in base a questa caratteristica, forti del fatto che la qualità degli alimenti presenti nelle nostre tavole inizia dalla qualità delle colture nei campi.

## 5. RISULTATI E DISCUSSIONE: IL LUPPOLO

### 5.1 METODO DI ESTRAZIONE PER L'ANALISI DEL LUPPOLO CON SAGGIO ABTS

Nell'introduzione della presente tesi si è largamente esposto sugli effetti benefici che, ad oggi, sono riconosciuti ad alcuni composti del luppolo. Alcune proprietà sono esclusive della pianta *Humulus lupulus* L., in quanto sono attribuite a sostanze che sono state identificate solo nel luppolo o in pochissime altre specie vegetali.

Riguardo il suo potere antiossidante, diversi autori hanno affrontato la misurazione mettendo a punto vari saggi e varie metodiche di estrazione. Purtroppo, gli esiti di queste investigazioni sono risultati spesso contraddittori.

Innanzitutto perché in letteratura la capacità antiossidante, delle singole varietà di luppolo, è ricavata applicando differenti tests, i cui risultati sono riportati con unità di misura non omogenee e non equiparabili. Inoltre, a parità di saggio adottato, è frequente trovare che questo fa seguito a preparazioni del campione alquanto disparate.

Secondariamente non si hanno a disposizione dati relativi a matrici uniformi: alcuni saggi sono condotti su estratti di luppolo, altri su coni interi essiccati, altri ancora su pellets di varia concentrazione, ed ognuno dei quali su cultivar allevate in diversi areali. Queste condizioni rendono assolutamente non confrontabili i valori assoluti ricavati dalle varie indagini scientifiche.

Non di minor importanza sono le controverse opinioni dei ricercatori relativamente all'identificazione delle sostanze contribuenti il potere antiossidante del luppolo. Ad esempio: Van Waesberghe (1996) con lo "Siwft Test", saggio che misura i prodotti dell'ossidazione formati per invecchiamento spinto dell'olio di mais, ha trovato caratteristiche prossidative in tutti i campioni di luppolo. Tageshira *et al.* (1995) hanno ottenuto risultati tra loro opposti applicando due differenti *cell-tests*, uno che intrappola i radicali e l'altro che si basa su un sistema di ossidazione dei grassi. Questi autori hanno mostrato che esiste una spiccata attività antiossidante degli alfa e beta acidi, paragonabile a quella dell'acido ascorbico e dell'alfa-tocoferolo. Forster *et al.* (2001) hanno applicato il Rancimat test sul luppolo che, come lo "Siwft Test", evidenzia il carattere pro- o anti-ossidante delle sostanze testate. Questi autori hanno concluso che il Rancimat test riflette la capacità antiossidante del luppolo, dovuta ai polifenoli, solo se vengono precedentemente rimosse le sostanze amare, in quanto la degradazione degli acidi amari incide falsificando il risultato. Tuttavia, lo stesso Forster *et al.* (2001), applicando il "Fluoro scan" test, ha inaspettatamente ottenuto una forte capacità antiossidante delle sostanze amare, confermando così i risultati dei ricercatori giapponesi.

Secondo Lermusieau *et al.* (2001) l'alto potere antiossidante delle pellets di luppolo con basso contenuto di alfa-acidi, indica che gli acidi amari non contribuiscono significativamente al potere riducente del luppolo ma, in questo senso, è il loro contenuto in polifenoli a giocare un ruolo fondamentale. In questa indagine l'attività antiossidante era stata determinata come tempo di inibizione dell'ossidazione dell'acido linoleico, indotta, in soluzione acquosa, da l'iniziatore di radicali liberi 2,2'-Azobis(2-amidino-propano)diidrocloreto (AAPH). D'altra parte è nota da tempo l'inversa correlazione tra alfa acidi del luppolo e suo contenuto in polifenoli (Asano *et al.*, 1981; Erdal *et al.*, 1985), confermata successivamente anche da Forster *et al.* (2002), il quale ha evidenziato come i luppoli amari siano caratterizzati da un esiguo contenuto di polifenoli a basso peso molecolare.

Infine, da questo excursus storico sull'identificazione delle sostanze contribuenti il potere antiossidante del luppolo, non si possono non menzionare gli ultimi studi circa le proprietà riconosciute ai composti prenilati del luppolo. In particolare, lo Xantoumulone (Xan) è attivo contro la formazione di alcuni ROS (radicale idrossile, perossile e anione superossido) (Gerhauser *et al.*, 2002); in vitro si è rivelato addirittura più efficiente dell'alfa-tocoferolo e della genisteina, ma meno valido della quercetina (Miranda *et al.*, 2000b). L'isoxantoumulone (IsoXan), la naringenina e la calconaringenina non hanno esibito alcuna attività antiossidante (Miranda *et al.*, 2000b; Gerhauser *et al.*, 2002).

Di fatto, ad oggi, le conoscenze sul potere antiossidante del luppolo mostrano ancora diversi punti contraddittori, e restano da definire le relazioni intercorrenti tra questi aspetti e la differenziazione varietale in base all'area geografica di origine, alla tecnica di allevamento, etc.

Pertanto, con la presente ricerca, si è voluto impostare uno studio sistematico per lo studio sulla capacità antiossidante di quindici popolari cultivars di luppolo inglese, circoscrivendo l'areale geografico di origine e uniformando quanto più possibile le tecniche di coltivazione. Nessuno studio, prima d'ora, aveva mai investigato le proprietà, in vitro, di così tante varietà di luppolo provenienti tutte dal medesimo areale di allevamento. Si è dunque proceduto alla scelta della metodica di analisi per la determinazione dell'attività antiossidante, tenendo conto dei vantaggi e limiti dei tests più comunemente usati per questo scopo, già illustrati nel capitolo Materiali e Metodi.

Nel presente lavoro di ricerca è stato applicato il saggio ABTS, in quanto è un test semplice e veloce, che si adatta ad essere adoperato con un ampio range di valori di pH. Infatti, il radicale ABTS<sup>•+</sup> reagisce rapidamente con gli antiossidanti, tipicamente entro 30 minuti; è solubile sia in solventi acquosi che organici e non è influenzato dalla forza ionica. Infine, le controversie letterarie sull'identificazione dei composti contribuenti al potere

antiossidante del luppolo ci hanno indotto a preferire questo saggio, piuttosto che un altro, poiché l'ABTS è valido sia per la determinazione dell'attività antiossidante di estratti idrofili sia lipofili.

Dapprima, si è messo a punto un metodo per l'estrazione degli antiossidanti dai campioni secchi. Diversi solventi, combinati con varie procedure di estrazione, sono stati testati su alcune delle varietà di luppolo disponibili, scelte casualmente; inoltre tutti i sistemi di estrazione, di seguito descritti, sono stati provati su un campione di una varietà anonima, genericamente indicata con la sigla SJ96. I solventi comparati sono stati: metanolo, acetone-acqua (75:25, v/v), metanolo-acqua (75:25, v/v), etanolo, dietilere + metanolo. A prescindere dal metodo, la scelta del solvente è un punto critico per l'esito del saggio ABTS poiché il sistema solvente utilizzato dovrebbe essere in grado di recuperare, dalla matrice luppolo, tutti gli antiossidanti in essa presenti. Questo presuppone, teoricamente, la conoscenza esatta dell'identità chimico-fisica degli antiossidanti stessi. Ad oggi, non disponendo di queste conoscenze, si è adottato un approccio empirico per l'individuazione del sistema-solvente più efficiente per lo screening e l'analisi degli antiossidanti.

Il criterio adottato, per la scelta del metodo di estrazione, è stato quello di verificare l'intensità con cui i singoli campioni rispondono al saggio ABTS.

Prima di entrare nel merito dell'argomento, come nota a margine, si richiama l'attenzione sul fatto che comunque, in ogni analisi, si dà per scontato che la metodica seguita possa essere in grado di estrarre tutto il composto d'interesse, e che le altre sostanze presenti nella matrice, siano "inerti". Anche nella presente sperimentazione si aderirà a queste premesse teoriche e, pertanto, si parlerà di capacità antiossidante del luppolo intendendo, in realtà, quella *dell'estratto* di luppolo in esame.

Per lo scopo della nostra indagine (applicazione del saggio ABTS ai luppoli essiccati), la scelta dei solventi da comparare è stata fatta tenendo conto della natura dei principali antiossidanti conosciuti nel luppolo, delle proprietà fisico-chimiche della matrice, della disponibilità e costo dei reagenti, nonché della loro sicurezza nell'utilizzo. Tutte le procedure di estrazione sono state condotte a temperatura ambiente (20 °C) e sono state pensate per portare a termine l'estrazione nel più breve tempo possibile in modo da ridurre il contatto con l'aria e non sottoporre gli antiossidanti, per un tempo prolungato, ad uno "stress" eccessivo che avrebbe potuto rovinarli.

Il metanolo è stato scelto per la sua abilità di recupero della maggior parte degli antiossidanti solubili in soluzioni acquose (McMurrough e Madigan, 1996; Liegeois *et al.*, 2000; Lermusieau *et al.*, 2001; Gerhauser *et al.*, 2002). Inoltre, si è tenuto conto del fatto che, nel saggio ABTS, la polarità del solvente incide, in maniera direttamente proporzionale, sul valore della capacità antiossidante totale (Perez-Jiménez e Saura-

Calixto, 2006). Infine è noto che gli antiossidanti sono molto più stabili in estratti metanolici piuttosto che in acqua o in misture di metanolo e acqua.

In ogni caso si è ritenuto di non escludere la possibilità di testare anche la soluzione estraente metanolo-acqua (75:25, v/v) in quanto, alcuni autori (Zienlinski e Kozłowska, 2000) hanno dimostrato che il metanolo acquoso è più efficiente della sola acqua nell'astrarre i fenoli totali e gli antiossidanti, da alcune varietà di frumento, testati per la capacità di "radical scavenger" nei confronti del catione ABTS<sup>°+</sup>.

D'altra parte, su matrici analoghe, Zhou e Yu (2004) hanno ottenuto risultati differenti dimostrando che acetone-acqua (1:1, v/v) è la miscela solvente migliore per la preparazione di estratti da frumento per l'analisi routinaria della capacità antiossidante con saggio ABTS e ORAC. La miscela acetone-acqua è stata usata anche da Forster *et al.* (2002) ma nella proporzione 75:25, per dosare i polifenoli a basso peso molecolare del luppolo. Visto quanto appena detto e considerando la spiccata attività antiossidante dei composti fenolici, si è ritenuto opportuno effettuare prove estraenti anche con una soluzione acquosa di acetone al 75%.

Infine delle prove sono state realizzate anche con etanolo puro, che è uno dei solventi migliori per estrarre lo xantoumulone. Lo Xan è difficile da solubilizzare: è un composto non polare, ma non solubilizza in acqua calda o in solventi apolari, come l'esano; lo stesso dicasi per l'estrazione con normale CO<sub>2</sub> a pressione inferiore a 300 bar. Risultati migliori (Xan estratto pari al 32%) si ottengono applicando una pressione di 800 bar a 85 °C (Geyer, 2006). Viceversa, lo Xan mostra buona solubilità in etanolo o in misture di etanolo che, tra l'altro, nelle applicazioni commerciali, è uno dei solventi più economici (Yu *et al.*, 2002).

Infine si è testata la procedura di delipidazione, combinata all'estrazione con metanolo, poiché molti autori hanno dimostrato che una preliminare rimozione delle resine e dei lipidi del luppolo è necessaria per recuperare la quasi totalità dei polifenoli presenti. Il dietile etere è stato preferito ad esano o ad altri solventi lipofili per la sua capacità di rimuovere efficacemente sia le "hard" che le "soft" resine. (Milligan *et al.*, 1999; Merken e Beecher, 2000; Callemien *et al.*, 2005).

La procedura seguita è quella dettagliata nel capitolo Materiali e Metodi (Metodi di estrazione A e B), variando ovviamente il solvente.

Il criterio adottato, per la scelta del metodo di estrazione, è stato quello di verificare l'intensità con cui i singoli campioni rispondono al saggio ABTS. In pratica, si è esaminato in quale tipologia di estratto si registrava la risposta più alta, tenendo conto delle caratteristiche del metodo ABTS, della natura dei composti antiossidanti e della matrice chimico-fisica dei coni. Infatti, il metodo ABTS, si basa sull'uso di una sostanza radicalica,

monocationica e cromogena (cioè l'ABTS<sup>°+</sup>) che presenta diversi picchi di assorbimento nel visibile, tra i quali a 734 nm. L'aggiunta di sostanze antiossidanti, capaci di donare un elettrone o un atomo di idrogeno, riducono la soluzione cromogena di ABTS<sup>°+</sup> ad ABTS, incolore. Ciò determina una decolorazione della soluzione iniziale ed una diminuzione dell'assorbanza, misurata con lo spettrofotometro, proporzionale alla quantità di sostanza antiossidante aggiunta. In realtà, non è da escludere che nel luppolo, oltre i composti antiossidanti noti, ve ne siano altri non ancora definiti, che contribuiscono all'inibizione dell'assorbanza, e quindi all'attività antiossidante del luppolo stesso. La scelta di valutare i metodi di estrazione sulla base dell'intensità della risposta spettrofotometrica, è stata motivata anche dal fatto che la diversità dei composti antiossidanti, ad oggi noti nel luppolo (composti con differente polarità, diversa localizzazione nei coni, etc..) non consente la loro estrazione in un'unica soluzione. Pertanto, si è assunto per ipotesi che l'estratto di antiossidanti, comunque ottenuto, contenga la totalità dei composti target desiderati.

Inoltre, è doveroso sottolineare che non è stato possibile effettuare prove di recupero per valutare la bontà del metodo di estrazione, in quanto, gli antiossidanti aggiunti sotto forma solida, in polvere, al macinato secco di luppolo, avevano effetto protettore e sinergico nei riguardi degli antiossidanti endogeni del luppolo stesso. Il risultato era che la lettura spettrofotometrica non risultava essere proporzionale alla quantità di standard aggiunto (acido ascorbico nel caso specifico), ma la decolorazione della soluzione cromogena era amplificata in modo non quantificabile.

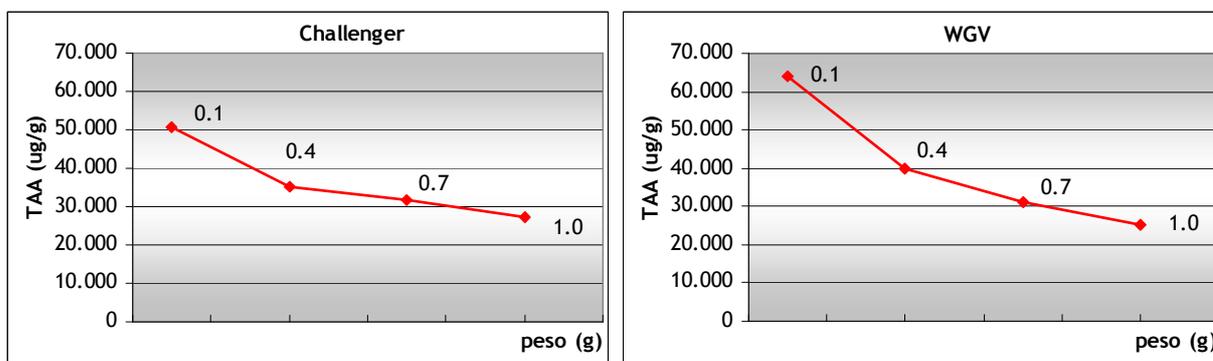
Infine, nella scelta del metodo di estrazione, ha giocato un ruolo non marginale anche la velocità di esecuzione delle procedure. Infatti, i saggi per la determinazione del potere antiossidante sono molto sensibili a qualsiasi fattore esterno, e gli antiossidanti tendono a degradarsi col tempo e a rovinarsi tanto più sono manipolati. Si è pertanto optato per la preparazione del campione più semplice e rapida possibile.

Le prove preliminari eseguite sugli estratti ottenuti con acetone-acqua (75:25, v/v), metanolo-acqua (75:25, v/v) ed etanolo, hanno fornito letture spettrofotometriche assolutamente inefficaci per lo scopo del presente lavoro. Pertanto non si esporranno i dati ad esse relativi, poiché questi solventi sono stati esclusi già dopo le prime prove. Infatti, si verificava o che la percentuale di inibizione dell'assorbanza fosse prossima allo zero, oppure che, per alcune varietà il saggio funzionasse ottimamente, mentre la risposta spettrofotometrica di altre varietà non trovasse affatto riscontro (non si aveva decolorazione). Nel caso della miscela metanolo-acqua, i TAA erano molto più bassi di quelli ottenuti estraendo con solo metanolo, ed il fatto che la percentuale d'acqua

presente rendesse più instabili i campioni, ha portato a non testare ulteriormente questo solvente.

Buoni risultati sono stati ottenuti trattando i coni con solo metanolo (metodo di estrazione A) o con dietilere e metanolo (metodo di estrazione B). Al riguardo, sono di seguito esposti i risultati relativi alle rispettive prove effettuate in doppio su tutte le varietà della raccolta del 2004. Le procedure applicate sono quelle già descritte nel capitolo Materiali e Metodi, al paragrafo Metodi di estrazione. A queste si è giunti dopo aver dedicato molto tempo alla ricerca della miglior combinazione di operazioni estraenti, al fine di snellire quanto più possibile la procedura di lavoro. Da alcune prove iniziali è emerso che sia la sonicazione, che la microcentrifugazione finale, sono passaggi inevitabili per avere un estratto limpido, senza interferenti nella lettura spettrofotometrica.

Inizialmente, si è molto lavorato per trovare il rapporto ottimale tra il volume (ml) di solvente da impiegare per l'estrazione e la quantità (g) di campione su cui lavorare. Infatti, a parità di volume di metanolo utilizzato, i TAA ( $\mu\text{g}$  di acido ascorbico equivalente per grammo di luppolo), risultanti dalle estrazioni eseguite su differenti quantitativi di campione macinato (ad esempio: 0.1 g; 0.3 g; 0.5 g; 0.7 g e 1 g), mostravano valori proporzionalmente decrescenti all'aumentare del peso del campione. A titolo di esempio si vedano i grafici in Fig. n. 28, in cui è palese quanto sopraesposto.

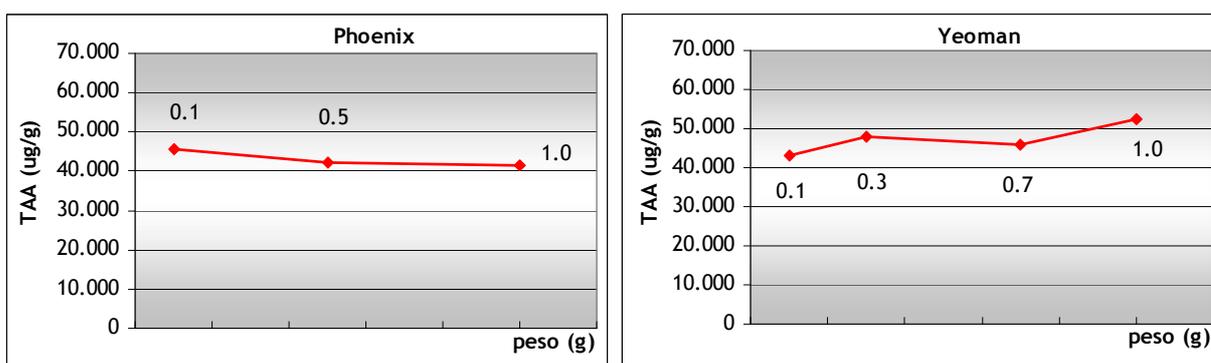


**Fig. 28:** alcune prove per la messa a punto del metodo di estrazione A (si veda il capitolo Materiali e Metodi), applicato utilizzando 48 ml di metanolo (12 ml x 4 cicli) su diversi quantitativi di campioni di luppolo (0.1, 0.4, 0.7 e 1 g) delle varietà indicate nei grafici.

Questo andamento è stato riscontrato per tutte le varietà di entrambe le annate di raccolta. Indipendentemente dalle spiegazioni che si possono dare a tale fenomeno, si è visto che, di fatto, 20 ml di metanolo su 0.1 g di luppolo riuscivano ad estrarre un maggior quantitativo di antiossidanti rispetto ad estrazioni simili, ma applicate a quantità di luppolo superiori. Tuttavia, risultando difficoltoso lavorare con quantitativi di campione

così piccoli, si è aggiustato il rapporto ml solvente/g campione, cercando di trovare una combinazione ideale che riuscisse a dare, entro limiti ragionevoli, un TAA indipendente dal peso del campione, ma proporzionale alle variazioni dei parametri operativi del campione in esame (peso, fattore di diluizione, volume dell'estratto, etc.).

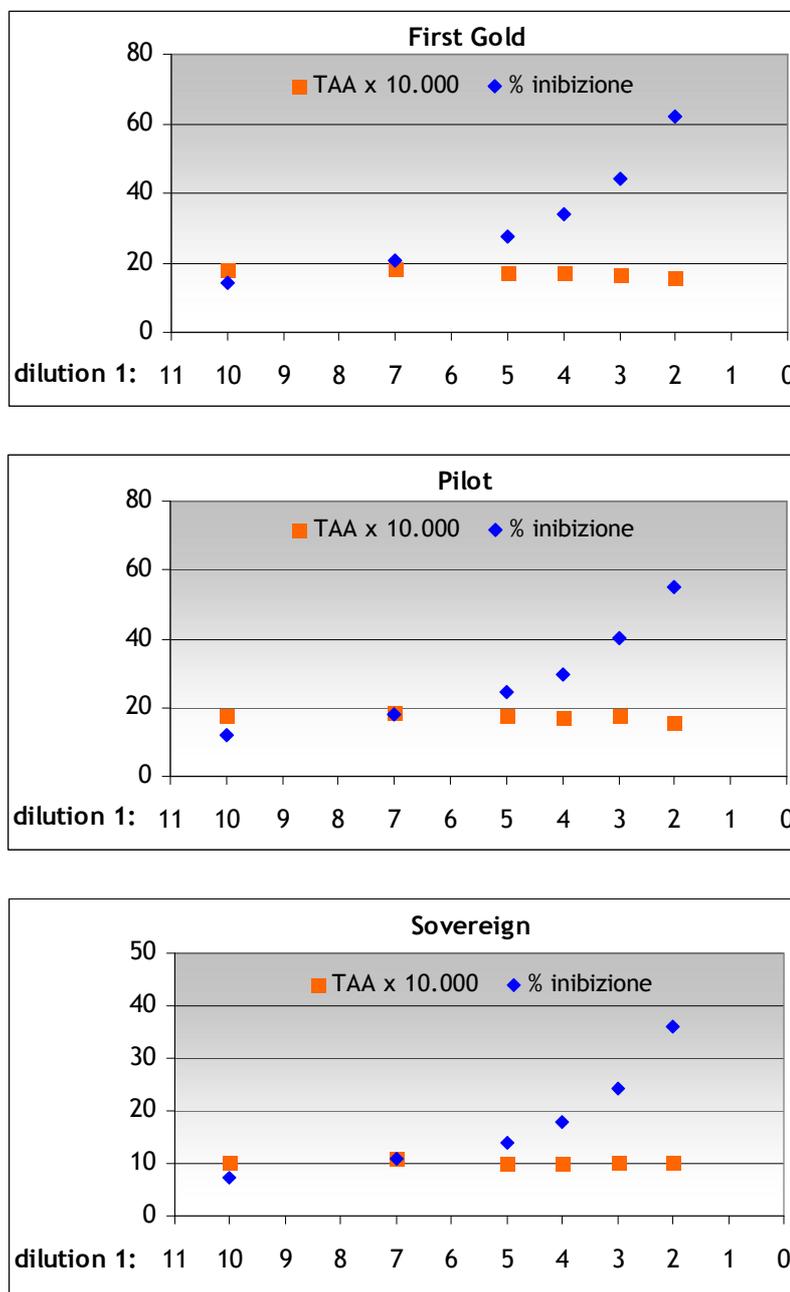
In pratica, il metodo messo a punto definitivamente, che d'ora in poi chiameremo metodo di estrazione, è quello descritto nel capitolo Materiali e Metodi, come Metodo A. Infatti, procedendo empiricamente, si è notato che 60 ml di metanolo (12 ml x 5 cicli di estrazione), riescono a dare valori di TAA equiparabili, entro il margine di errore del metodo, a quelli ottenuti estraendo con 20 ml di metanolo su 0.1 g di campione, ritenuti ottimali. Inoltre, non vi sono eccessive oscillazioni al variare del quantitativo di campione considerato. A questo proposito, si vedano, a titolo di esempio, i grafici in Fig. n. 29, relativi alle varietà Phoenix e Yeoman.



**Fig. 29:** alcune prove per la messa a punto del metodo di estrazione A (si veda il capitolo Materiali e Metodi), applicato utilizzando 60 ml di metanolo (12 ml x 5 cicli) su diversi quantitativi di campioni di luppolo indicati nel grafico. Il TAA corrispondente al valore di 0.1 grammi è stato ricavato adoperando 20 ml di metanolo (5 ml x 4 cicli) in quanto quest'ultima combinazione estrante ha dato risposte ottimali, prese come riferimento. Tutti i TAA riportati in ogni singolo grafico sono derivati da analisi condotte simultaneamente.

Analogamente, per verificare che il fattore di diluizione del campione con metanolo, non costituisse motivo di interferenza nella risposta spettrofotometrica e nel calcolo matematico del TAA, come dovrebbe essere a rigor di logica, si sono effettuate delle letture spettrofotometriche su vari campione, a diverse concentrazioni, variando il rapporto di diluizione. I risultati ottenuti hanno confermato quanto ci si aspettava di trovare. Ossia, la percentuale di inibizione dell'assorbanza aumenta proporzionalmente tanto più il campione è concentrato, mentre il potere antiossidante totale (TAA), calcolato matematicamente tenendo conto del volume del solvente d'estrazione, del quantitativo di campione, della diluizione effettuata e della risposta spettrofotometrica, non varia al variare della diluizione praticata (si vedano a titolo di esempio i grafici in Fig. n. 30). Nella

fattispecie, per avere una risposta strumentale corretta, si è adottata una diluizione pari a 5 in tutte le determinazioni, in modo da avere percentuali di inibizione dell'assorbanza sempre comprese tra il 20 e l'80%.



**Fig. 30:** curve di saturazione effettuate per testare l'eventuale influenza della diluizione sulla lettura spettrofotometrica nel saggio ABTS. In ogni grafico, uno per ogni varietà citata, è riportata la diluizione praticata, in ascissa, ed i corrispondenti valori di capacità antiossidante (i TAA in arancione, sono da riportare al valore reale, moltiplicando per 10.000) e della percentuale di inibizione (in blu), in ordinata.

Nella tabella n. 8, sono riportate le medie e deviazioni standard dei TAA ottenuti dal saggio ABTS condotto su estratti di luppolo, relativi ai campioni varietali del 2004,

preparati seguendo due tecniche: metodo A (estrazione metanolica) e metodo B (delipidazione seguita da estrazione con metodo A). Per chiarezza d'esposizione, si ricorda che la procedura di estrazione degli antiossidanti, indicata con Metodo di estrazione A, è una estrazione metanolica, mentre quella chiamata Metodo di estrazione B, prevede una preliminare rimozione, con dietiletere, delle sostanze lipidiche e resinose dai coni di luppolo, dopodichè viene applicato il metodo A. Per ulteriori approfondimenti al riguardo, si rimanda al Capitolo Materiali e Metodi.

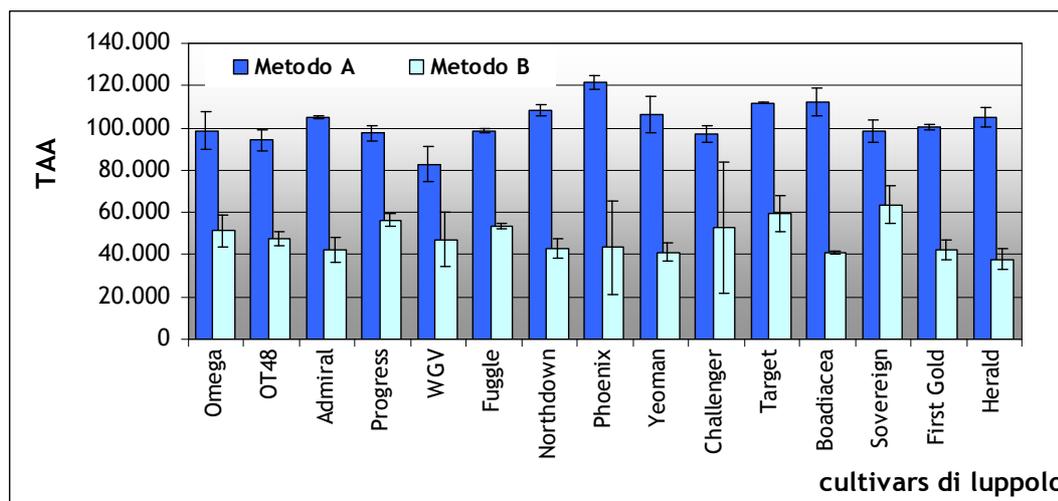
Varietà	TAA di estratti A ( $\mu\text{g}$ eq. ac. ascorbico/g coni)	TAA di estratti B ( $\mu\text{g}$ eq. ac. ascorbico/g coni)
Omega	98.687 $\pm$ 9.055	51.258 $\pm$ 7.430
OT48	94.282 $\pm$ 4.946	47.519 $\pm$ 3.133
Admiral	105.028 $\pm$ 691	42.123 $\pm$ 6.028
Progress	97.614 $\pm$ 3.603	56.323 $\pm$ 2.995
WGV	82.849 $\pm$ 8.154	52.509 $\pm$ 12.440
Fuggle	98.570 $\pm$ 1.117	53.481 $\pm$ 1.324
Northdown	108.302 $\pm$ 2.344	42.847 $\pm$ 4.426
Phoenix	121.534 $\pm$ 3.371	43.878 $\pm$ 5.838
Yeoman	106.223 $\pm$ 8.637	41.272 $\pm$ 4.169
Challenger	97.049 $\pm$ 3.679	52.845 $\pm$ 7.281
Target	111.762 $\pm$ 227	60.194 $\pm$ 11.714
Boadiacea	112.132 $\pm$ 6.445	40.845 $\pm$ 609
Sovereign	98.561 $\pm$ 5.142	63.650 $\pm$ 8.934
First Gold	100.654 $\pm$ 1.288	42.409 $\pm$ 4.470
Herald	105.027 $\pm$ 4.587	37.882 $\pm$ 5.034

**Tabella 8:** confronto tra i metodi di estrazione A e sulla base della capacità antiossidante (TAA), mostrata da varietà di luppoli inglesi, preparate per l'analisi ABTS, con i suddetti metodi. Gli estratti A sono ottenuti attuando il metodo A, mentre gli estratti B sono ottenuti dal metodo B. Tutte le determinazioni sono state effettuate in doppio ed ogni lettura spettrofotometrica è stata ripetuta in triplo per ciascun sub-campione.

L'analisi statistica conferma quello che intuitivamente si coglie dall'esame dei dati in tabella: la differenza tra i due metodi di estrazione, testata tramite i valori della capacità antiossidante mostrata dai campioni così ottenuti, è statisticamente significativa (Wilcoxon Signed rank Test,  $n=6$ ,  $P<0.001$ ). Il Wilcoxon Signed rank Test è un test non parametrico, che non richiede che i dati siano normalmente distribuiti. Esso equivale formalmente al test parametrico Paired T-test. Il Wilcoxon Signed rank Test è stato utilizzato per provare che l'effetto del trattamento sugli individui (in questo caso la delipidazione) non è statisticamente significativo (ipotesi nulla). Come si preciserà anche più avanti, per la

tipologia di dati che il saggio ABTS è in grado di fornire, nonché per la ristrettezza del campione in esame, si è scelto di trattare tutti i dati derivanti dall'applicazione del saggio ABTS, con test statistici non parametrici.

Il grafico in figura n. 31, relativo ai dati in tabella n. 8, evidenzia, in maniera ancora più diretta, come la procedura di delipidazione riduca l'attività antiossidante di circa il 50% in tutte le cultivar analizzate.



**Fig. 31:** grafico costruito con i dati riportati in tabella n.8. Ogni istogramma rappresenta la media delle capacità antiossidanti ( $n=6$ ) sugli estratti di luppolo preparati seguendo il Metodo A (blu scuro) o il Metodo B (in azzurro). La barra di errore rappresenta la deviazione standard. I TAA sono espressi in unità equivalenti di acido ascorbico ( $\mu\text{g/g}$ ).

Nell'ambito delle varietà, i due metodi non hanno sortito effetti analoghi tra le stesse, ossia, la riduzione mostrata dagli estratti B non è riconducibile ad alcun fattore ripetuto tra le cultivar. Poichè, tecnicamente, i due metodi si differenziano solo per la purificazione dei campioni con dietilere, come avviene nel metodo B, è corretto pensare che sia la delipidazione a non permettere di evidenziare in modo ottimale la capacità antiossidante dei coni di luppolo. Questo fatto può semplicemente essere attribuito alla presenza, nelle resine della luppolina, di sostanze con spiccata attività antiossidante, chimicamente affini per polarità al metanolo. Va comunque ribadito che quanto trovato è strettamente collegato al meccanismo di reazione del saggio utilizzato per la determinazione dell'attività antiossidante, costituendo un limite, ed allo stesso tempo un vantaggio, da tener sempre presente anche per i risultati che si esporranno di seguito.

Non si può comunque escludere che parte della riduzione dell'attività antiossidante dei campioni sia attribuibile non alla fase di delipidazione in sè, ma piuttosto alle modalità di svolgimento che essa comporta. Di fatto la procedura di rimozione delle resine lipofile

implica tempi più lunghi di analisi durante i quali i campioni rimangono a contatto prima con l'aria, e poi con il flusso di azoto, per un periodo prolungato.

Oltre la miglior risposta spettrofotometrica dei campioni ottenuti con metodo A, l'estrazione con solo metanolo richiede circa la metà in meno di tempo rispetto al metodo B. Questo ha il vantaggio che i coni, come accennato prima, subendo meno manipolazioni, sono molto meno suscettibili ad essere rovinati. Inoltre, ciò ha consentito di esaminare le 15 cultivar di ogni annata, tutte nello stesso giorno della loro estrazione che, pertanto, è stata condotta simultaneamente. Questo aspetto è stato fondamentale per monitorare e uniformare le condizioni di analisi. Infatti, considerando che la capacità antiossidante varia repentinamente con molti parametri (solventi, pH, temperatura, tempi di reazione, etc.) (Perez-Jiménez e Saura-Calixto, 2006; Zhou e Yu, 2004), standardizzare i tempi e le condizioni di analisi è stato assolutamente necessario per ottenere valori di TAA, ripetibili nel tempo e confrontabili tra le varietà. Il saggio ABTS non ha dato una risoluzione tale da fornire dei valori assoluti di potere antiossidante ma, nell'ambito di una medesima analisi, ha fornito una scala relativa di valori di TAA molto attendibile. Tenendo in mente questo, si può comprendere come sia stato basilare l'aver analizzato tutti i campioni nello stesso giorno e sotto le medesime condizioni.

A conclusione di questo paragrafo, si può pertanto dire che il solvente più idoneo per estrarre gli agenti "scavenger", reattivi nei confronti del radicale ABTS<sup>+</sup>, è risultato essere il metanolo puro, impiegato sui coni secchi, secondo il metodo A. Appurato questo, si è provveduto ad applicare il metodo suddetto nella preparazione di tutti i campioni di luppolo disponibili, al fine di indagare e confrontare le loro capacità antiossidanti con saggio ABTS. Pertanto, nella seguente trattazione, si sottointenderà che l'attività antiossidante totale (TAA) dei coni di luppolo è quella valutata con saggio ABTS su campioni preparati con il metodo di estrazione A.

## **5.2 ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE (TAA) DI 15 CULTIVARS INGLESII**

In tabella n. 9, sono esposti i valori relativi all'attività antiossidante totale (TAA) delle 15 cultivar di luppolo, allevate nel giardino sperimentale di Wye, raccolte nell'anno 2004 e nel 2005. I TAA, espressi, come al solito, in µg equivalenti di acido ascorbico per peso unitario dei coni, sono riportati come media di prove in duplicato, e le letture spettrofotometriche sono state ripetute in triplo per ogni sub-campione. Tutti i campioni erano coni essiccati con all'incirca, lo stesso contenuto di sostanza secca, che mediamente si attestava intorno al  $92.4 \pm 0.5$  % peso/peso.

Prima di commentare i dati, è importante ricordare che i campioni delle varietà, considerate nelle due annate, sono riconducibili esattamente alle stesse piante, allevate con le medesime tecniche. I coni raccolti ed essiccati nel 2004 sono stati analizzati solo nel 2005, dopo un anno di conservazione in congelatore a  $-18^{\circ}\text{C}$ , mentre quelli del 2005 sono stati analizzati nello stesso anno in cui sono stati raccolti. In quest'ultimo caso, la sosta a  $-18^{\circ}\text{C}$  è stata temporanea e della durata di qualche giorno. Ogni batch di analisi, costituito dalle 15 varietà di una medesima annata, è stato testato contemporaneamente per la determinazione dell'attività antiossidante. Le prove, in doppio, sono state ripetute, su ciascun batch, in giorni seguenti, sia per verificare la ripetibilità del metodo, sia per avere a disposizione dati statisticamente consistenti. Questo modo di procedere ha consentito di evidenziare le differenze esistenti tra le varietà di campioni considerate, svincolandoci parzialmente dai valori assoluti dei singoli TAA. Come si evince dall'esame della tabella n.9, le deviazioni standard sono piuttosto ampie per poter prendere in considerazione i valori originali dei singoli TAA. Tuttavia, tra le prove ripetute, non è stata evidenziata differenza statisticamente significativa (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $P>0.5$ ). Questo equivale a dire che le differenze tra i due gruppi di osservazioni del medesimo batch, sono attribuibili a variabilità casuale. Nonostante il test di normalità e di equal variance siano positivi, si è scelto di trattare i campioni con test non parametrici per la tipologia di dati che il saggio ABTS fornisce (si vedano le considerazioni sul saggio ABTS) applicati). Il Rank Sum Test è l'equivalente del T-test per le procedure non parametriche. Esso ordina i dati numerici e li compara per ranghi piuttosto che per i loro valori originali; i ranghi di ogni gruppo sono sommati e le loro somme comparate. Il fatto che, dalle prove ripetute, si sia ottenuto sempre lo stesso ordine varietale, nella scala per valori di TAA, ha permesso di valutare positivamente l'applicazione del saggio ABTS per il confronto del potere antiossidante delle cultivar di luppolo, vista la buona ripetibilità delle risposte stesse nel tempo.

Varietà	TAA cv 2004		TAA cv 2005	
	(µg equiv. ac. ascorbico/g con)		(µg equiv. ac. ascorbico/g con)	
Omega	98.687	± 9.055	169.195	± 10.850
OT48	94.282	± 4.946	127.879	± 8.855
Admiral	105.028	± 691	192.494	± 95
Progress	97.614	± 3.603	127.957	± 2.886
WGV*	82.849	± 8.154	116.721	± 4.994
Fuggle*	98.570	± 1.117	125.007	± 15.124
Northdown*	108.302	± 2.344	174.146	± 17.291
Phoenix	121.534	± 3.371	170.757	± 6.128
Yeoman*	106.223	± 8.637	143.964	± 14.608
Challenger	97.049	± 3.679	138.865	± 2.768
Target	111.762	± 227	179.866	± 12.335
Boadiacea*	112.132	± 6.445	152.824	± 16.198
Sovereign*	98.561	± 5.142	104.286	± 10.374
First Gold*	100.654	± 1.288	108.702	± 7.020
Herald	105.027	± 4.587	164.442	± 9.202

**Tabella 9:** valori medi dei TAA, e relative deviazioni standard, delle varietà sopra elencate, raccolte nell'anno 2004 e 2005. I campioni del 2004 sono stati analizzati nel 2005, dopo 1 anno di conservazione a -18 °C. Per le varietà contrassegnate con un asterisco, i TAA dei conii raccolti all'anno 2004 e stoccati per un anno, non sono risultati statisticamente differenti da quelli testati su conii raccolti ed analizzati nello stesso anno (2005) (Wilcoxon Signed Rank Test, n=6, P<0.001).

Tra le cultivar del 2005, il range di TAA registrati è variato da un minimo di 104.286 ± 10.374 unità equivalenti di acido ascorbico (µg/g conii) in Sovereign, ad un massimo di 192.494 ± 95, unità equivalenti di acido ascorbico (µg/g conii), in Admiral. In ordine decrescente, le varietà risultate più attive dal punto di vista antiossidante sono state Admiral, Target, Northdown, Phoenix, Omega, Herald e via dicendo fino a trovare First Gold e Sovereign agli ultimi posti. Le varietà del 2004, dopo un anno di stoccaggio, hanno mostrato capacità antiossidanti decisamente più basse rispetto a quelle dell'altro batch di analisi. Di fatto, in quest'ultimo caso, i valori di TAA hanno oscillato tra 82.849 ± 8.154 unità equivalenti di acido ascorbico (µg/g conii) in WGV, e 121.534 ± 3.371 unità equivalenti di acido ascorbico (µg/g conii) in Phoenix. Anche la scala relativa di potere antiossidante è variata poichè, in ordine decrescente, ritroviamo Phoenix, Boadiacea, Target, Northdown, fino a OT48 e WGV agli ultimi posti.

Assumendo per ipotesi, che le condizioni climatiche delle due annate di raccolta siano state simili, e comunque tali da non stimolare risposte fisiologiche diverse nelle piante di luppolo del 2004 e del 2005, la sola fonte di variabilità, tra le determinazioni degli anni considerati, è riconducibile allo stoccaggio che hanno subito le cultivar del 2004, stando

per un anno in congelatore sino all'analisi. Allora, sarebbe possibile asserire che, con il tempo, il potere antiossidante del luppolo diminuisce e la conservazione a - 18°C non ostacola tale fenomeno, nemmeno su coni essiccati. In questo caso, lo stoccaggio risulterebbe statisticamente determinante la differenza riscontrata in alcune varietà (Wilcoxon Signed Rank Test,  $P < 0.001$ ). In tabella n. 9, sono contrassegnate con un asterisco le cultivar caratterizzate da una stabilità antiossidante molto elevata, ossia quelle per cui lo stoccaggio non ha contribuito in modo significativo a ridurre i rispettivi TAA. A prescindere dal tipo di luppolo considerato, era prevedibile che il potere antiossidante, ad un anno dalla raccolta dei luppoli, diminuisse, indipendentemente dalla cultivar in questione. Infatti, è risaputo che gli antiossidanti sono molto sensibili all'ossigeno, la luce, le alte temperature, umidità, etc. A parte il contatto con l'aria, i fattori luce e temperatura sono stati arginati ponendo i campioni in congelatore. Tuttavia altri elementi, quali l'attività enzimatica endogena, il contenuto di lipidi (localizzati anche nei semi e per i quali il congelamento non blocca l'ossidazione), concorrono a rovinare il patrimonio antiossidante.

Non è fuori luogo pensare che i composti che concorrono alla capacità antiossidante delle singole cultivar siano chimicamente differenti o diversamente localizzati o legati alla matrice luppolo, a seconda della varietà considerata. Questa ipotesi potrebbe spiegare la maggiore o minore stabilità antiossidante allo stoccaggio osservata tra i luppoli. In realtà, il vizio di fondo di questo ragionamento, consiste nel voler ridurre ad una sola variabile, lo stoccaggio, il differente comportamento osservato tra i due batch di campioni. Effettivamente i parametri che sarebbero da considerare nel corso di prove di questo genere, in campo e con individui geneticamente distinti, sono molteplici e spesso sfuggono anche al monitoraggio più accorto (andamento stagionale, temperature, umidità, etc..). Inoltre, il campione esaminato alquanto ristretto, e le prove in campo non ripetute, non rendono possibile trarre conclusioni adeguate e generalizzate sul comportamento dei singoli tipi genetici. In vista di ciò, si è scelto di applicare test non parametrici per l'interpretazione dei risultati e di limitare la valutazione della capacità antiossidante dei luppoli ad una comparazione relativa tra gli stessi. Pur ritenendo validi i discorsi sopra fatti, la consapevolezza dei limiti della presente sperimentazione ci porta ad asserire che, ad oggi, non è possibile approfondire ulteriormente l'argomento in quanto mancano prove di conferma di quanto ipotizzato. Sarebbe auspicabile ripetere la sperimentazione negli anni di raccolta a venire, sulle stesse varietà dello stesso giardino sperimentale e, sulle medesime, dopo un anno di conservazione a -18°C.

### 5.3 ALTRE DETERMINAZIONI ANALITICHE SUI LUPPOLI RACCOLTI NEL 2004 E NEL 2005

Al fine di identificare chi contribuisce alla capacità antiossidante totale dei luppoli in esame, e in che misura, sono stati scelte e determinate alcune componenti tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). In particolare, si è focalizzata l'attenzione sul contenuto di alfa e beta acidi, per l'importanza che rivestono commercialmente; sullo xantoumulone perché è un composto proprio della pianta del luppolo al quale sono state riconosciute proprietà salutistiche; sulle catechine monomere in quanto, ad oggi, non sono stati pubblicati studi scientifici inerenti il contenuto dei flavan 3-oli, condotti specificatamente su varietà inglesi di luppolo. Inoltre, come esposto nella parte introduttiva di questo capitolo, in letteratura sono riportati risultati discordanti circa i rapporti intercorrenti tra il contenuto di alfa acidi, polifenoli e attività antiossidante. In tabella n. 10, sono riportati i dati relativi alle suddette componenti.

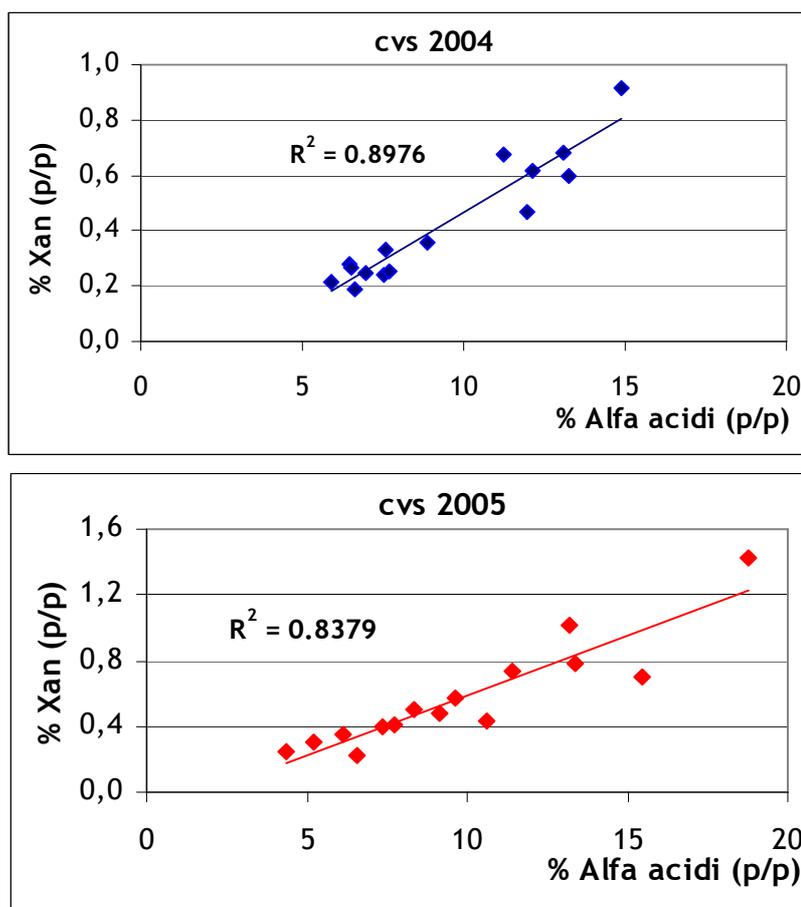
Le misurazioni degli alfa acidi, beta acidi, coumulone, colupulone e xantoumulone (Xan) sono state effettuate in singolo, poiché sono state conseguite a conferma di quanto noto ai tecnici del settore da anni. Si è applicata la metodica EBC ed i dati trovati sono risultati effettivamente congruenti con quanto era atteso. Per le catechine la determinazione è stata ripetuta in doppio.

Dal punto di vista statistico, non sono state riscontrate differenze significative nel contenuto di alfa acidi, beta acidi, coumulone, colupulone e xantoumulone tra i due batch di campioni (luppoli del 2004 stoccati per un anno e luppoli del 2005) (T-test,  $P < 0.05$ ).

Varietà di luppolo	α - acidi (% p/p)		β - acidi (% p/p)		Coumulone (% alfa)		Colupulone (% beta)		Xan (% p/p)		(+ ) catechine (ppm)	
	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005
Omega	7,54	10,59	4,37	4,13	33,26	31,90	52,31	53,65	0,24	0,43	246 ± 23	683 ± 37
OT48	6,66	6,57	3,06	3,19	31,76	32,57	51,16	51,38	0,19	0,23	535 ± 11	192 ± 17
Admiral	14,91	18,79	5,13	7,81	40,32	41,02	62,92	61,22	0,91	1,43	122 ± 8	144 ± 9
Progress	6,94	7,37	3,16	3,18	34,78	34,15	57,31	54,46	0,25	0,39	272 ± 10	555 ± 51
WGV	6,53	6,13	3,51	3,46	37,34	36,57	59,11	56,59	0,27	0,35	524 ± 14	378 ± 32
Fuggle	6,44	5,21	5,53	4,27	34,08	33,44	53,49	50,13	0,28	0,30	517 ± 20	282 ± 1
Northdown	12,12	9,61	6,82	6,92	31,42	28,15	52,68	48,60	0,62	0,58	120 ± 9	390 ± 29
Phoenix	13,11	11,39	5,48	6,11	30,82	30,92	52,00	52,09	0,68	0,73	305 ± 30	362 ± 36
Yeoman	13,25	13,37	5,98	7,03	32,24	27,71	52,59	50,29	0,60	0,78	130 ± 4	129 ± 23
Challenger	7,56	8,35	5,80	4,98	25,78	24,63	45,84	43,28	0,33	0,51	221 ± 16	499 ± 7
Target	11,25	13,22	4,16	6,26	37,96	37,03	60,04	58,44	0,68	1,02	213 ± 6	164 ± 2
Boadiacea	7,71	9,13	3,31	4,02	28,54	26,64	49,11	45,59	0,25	0,48	140 ± 12	139 ± 13
Sovereign	5,87	4,35	2,99	2,15	28,35	27,91	44,67	45,76	0,22	0,25	597 ± 18	547 ± 16
First Gold	8,85	7,72	3,85	3,74	36,40	36,12	60,26	59,81	0,36	0,41	352 ± 21	223 ± 7
Herald	11,95	15,44	3,51	5,91	41,27	34,55	63,15	56,07	0,47	0,70	131 ± 13	161 ± 9

**Tabella 10:** dati analitici relativi alle componenti indicate nell'intestazione delle colonne, riferiti alle 15 varietà di luppolo raccolte nell'anno 2005 e 2004. Entrambi i batch, ciascuno costituito dai 15 esemplari, sono stati analizzati nel 2005. Le misurazioni degli alfa acidi, beta acidi, coumulone, colupulone e xantoumulone (Xan) sono state eseguite in singolo, mentre per le catechine la determinazione è riportata come media e deviazione standard di prove ripetute in doppio.

In realtà, esaminando ogni singola varietà a sé, si possono notare delle differenze più o meno accentuate a seconda della cultivar considerata e quindi della rispettiva stabilità in acidi amari. Si vedano a tal proposito i prospetti delle cultivar in questione, riportati nel capitolo Materiali e Metodi. Il giudizio eccellente/buona/discreta/modesta/scarsa stabilità allo stoccaggio trova effettivamente riscontro con i dati riportati. Ad esempio, Target ed Admiral, definite come varietà con moderata capacità di conservazione degli acidi amari, hanno mostrato, in questa sperimentazione, rispettivamente 2 e 4 punti percentuali in più di alfa acidi nel luppolo del 2005, non stoccato a lungo. Fuggle, WGV, Challenger e First Gold considerate varietà con buona stabilità degli acidi amari, hanno riproposto gli stessi valori, nell'ambito della sensibilità del metodo e della variabilità dei campioni, in entrambi gli esemplari considerati. Per Phoenix, ritenuta eccellente, il contenuto di alfa acidi nel campione del 2005 è stato minore di quello dell'anno precedente, nonostante la fase di stoccaggio. In quest'ultimo caso, il fenomeno è da imputare alla precisione del metodo di analisi nonché alla variabilità di campionamento.



**Fig. 32:** grafici che illustrano il grado di correlazione esistente tra lo Xantoumulone ed il contenuto di alfa acidi. Il grafico in alto è stato costruito con i dati delle varietà raccolte nel 2004 e analizzate nel 2005; il grafico in basso è riferito ai luppoli del 2005, raccolti ed analizzati nello stesso anno.  $R^2$  è il coefficiente di correlazione tra Xan vs Alfa acidi.

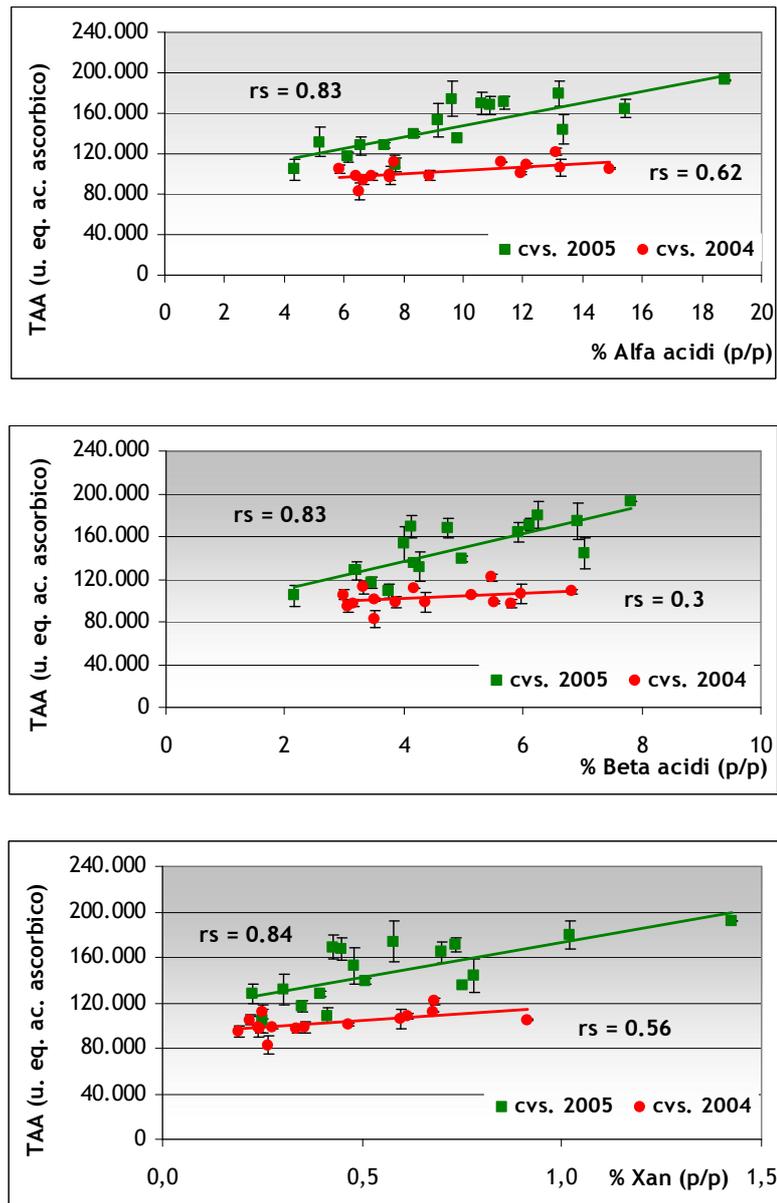
Poichè sembra che, esaminando i dati, la quantità di Xantoumulone vari seguendo le oscillazioni degli alfa acidi, è stato calcolato il coefficiente di correlazione esistente tra i parametri suddetti (Fig. n. 32). Effettivamente tra Xan e alfa acidi esiste una correlazione positiva piuttosto elevata (coefficiente di correlazione,  $R^2$  pari a 0.84-0.89), matematicamente confermata per entrambi i batch campionati. Anche se le modalità di sintesi delle varie componenti del luppolo non sono ancora del tutto chiare, la correlazione trovata si pone a sostegno dell'ipotesi che la via biosintetica dello xantoumulone e degli alfa acidi sia la medesima, o per lo meno, sia in comune per la maggior parte.

E' stato studiato anche il rapporto di correlazione tra il potere antiossidante dei luppoli e le altre componenti riportate in tabella n. 10. Da questa indagine sono state escluse le catechine, poiché non si è ritenuto formalmente corretto cercare delle relazioni tra la capacità antiossidante, testata su estratti metanolici, con il contenuto di questi flavan 3-oli, isolati con solventi completamente differenti (acetone/acqua più cloroformio).

Quando i livelli di TAA sono riportati in ordinata verso i rispettivi valori di alfa acidi, beta acidi e xantoumulone, in ascissa, si ottengono i grafici in figura n.33.

Si è studiato il grado di associazione esistente tra le variabili applicando il test "Spearman Rank Order Correlation". Questo è un saggio non parametrico che non richiede che i dati siano normalmente distribuiti, intorno alla linea di regressione, con varianza costante e, pertanto, si adatta bene a scale di valori (rank data) come nel caso nostro. Lo Spearman Rank Order Correlation test misura il grado di associazione tra una coppia di grandezze senza che venga specificata quale variabile sia dipendente o indipendente. Il significato di questo test è riassunto nel coefficiente di correlazione di Spearman ( $r_s$ ) che esprime la forza, con cui le due variabili sono associate, attraverso un numero compreso tra -1 e +1: se  $r_s$  è positivo, le due variabili tendono a crescere o decrescere insieme; viceversa se è negativo. Inoltre, tanto più  $r_s$  si avvicina all'unità, tanto più l'associazione trovata è forte.

Nei grafici sotto riportati, gli  $r_s$  sono indicati nelle vicinanze delle coppie di grandezze alle quali si riferiscono. Si evince chiaramente che, tra le variabili considerate, esiste una correlazione positiva piuttosto spiccata per i campioni di luppolo raccolti ed analizzati nel 2005: con  $P < 0.05$ , gli  $r_s$  sono tutti sullo 0.8 (Spearman Rank Order Correlation). Tale relazione è molto più blanda nei campioni raccolti nel 2004 ed analizzati l'anno successivo (TAA vs alfa acidi:  $r_s = 0.62$ ,  $P < 0.05$ ; TAA vs Xan:  $r_s = 0.56$ ,  $P < 0.05$ ), fino addirittura a non essere riscontrata tra TAA e beta acidi ( $r_s = 0.3$ ,  $P > 0.05$ ).



**Fig. 33:** grafici riportanti i valori di TAA, espressi in unità equivalenti di acido ascorbico ( $\mu\text{g/g}$  coni), vs il contenuto percentuale di alfa acidi (grafico in alto), beta acidi (grafico al centro) e xantoumulone (grafico in basso), per entrambi i batch di raccolta dei campioni (2005 in verde, 2004 in rosso).  $rs$  è il coefficiente di Spearman che esprime il grado di associazione esistente tra le coppie di variabili in parola.

I dati suggeriscono che gli alfa acidi, i beta acidi e lo xantoumulone contribuiscono al potere riducente del luppolo. Poiché, come accennato precedentemente, alcuni autori (Asano *et al.*, 1981; Erdal *et al.*, 1985; Forster *et al.*, 2002) hanno evidenziato una correlazione inversa tra alfa acidi e contenuto in polifenoli del luppolo, è plausibile ipotizzare che l'alto potere antiossidante, mostrato da alcune cultivars (Admiral, Northdown, Target, Phoenix, etc.), sia da attribuirsi alla quantità di alfa acidi.

Sarebbe interessante poter quantificare il livello di attività antiossidante, nonché alcuni metaboliti secondari del luppolo (calconi prenilati, flavanoni, etc.) in quelle varietà a basso contenuto di acidi amari, per realizzare dei riscontri incrociati che consentano, o meno, di confermare quanto sopra esposto, su una popolazione di campioni più ampia. L'aspetto importante sarebbe, anche in questo caso, applicare il saggio antiossidante sugli stessi estratti da utilizzare anche per le determinazioni relative ai composti che si vogliono porre in correlazione. Il fine è sempre quello di ottenere una scala della capacità antiossidante attendibile per il confronto varietale dei campioni in esame.

Relativamente alla determinazione delle catechine (si vedano i dati in tabella n.10) si può notare che il range di variazione delle stesse, tra le varietà, è piuttosto ampio, oscillando da 120 ppm (Northdown, raccolta del 2004) a 683 ppm (Omega, raccolta del 2005). Da quanto noto in letteratura, le proantocianidine totali si attestano su valori che vanno dallo 0.5% al 5% del peso secco del luppolo, a seconda della varietà in questione e del metodo di analisi adottato (Neve, 1991). Le proantocianidine del luppolo hanno ricevuto un'attenzione particolare nel mondo dell'industria birraria, sia perché intervengono nella formazione del torbido (Moll *et al.*, 1984; Siebert, 1999), sia perché esibiscono diversi effetti benefici contro le malattie di tipo cardiovascolare, neurologico ed alcuni disordini immunitari (Bagchi *et al.*, 2000; Plumb *et al.*, 1998; Packer *et al.*, 1999; Sanbongi *et al.*, 1997; Lotito *et al.*, 2000). Alcuni autori (Stevens *et al.*, 2002; Taylor, 2003) hanno elucidato le strutture chimiche delle proantocianidine del luppolo tramite spettrofotometria di massa (HPLC MS-MS). Da questi studi è emerso che gli estratti, ricavati dalle infiorescenze femminili di luppolo, contengono una mistura complessa di proantocianidine oligomere, con eventuali una o due unità di galocatechine, caratterizzate dalla presenza di dimeri (24%), trimeri (27%), tetrameri (15%), pentameri (14%), esameri (10%), eptameri (6.5%) ed ottameri (3.5%). Le percentuali riportate fra parentesi indicano la composizione approssimativa delle frazioni procianidiniche specificate. È da sottolineare che la maggior parte degli studi citati si riferiscono a luppoli tedeschi o americani: solo pochissime ricerche hanno preso in considerazione i luppoli di varietà inglesi che, tra l'altro, differiscono dalle altre per il fatto che presentano i semi poiché sono allevate senza praticare l'eradicazione delle piante maschili. Considerando quanto sopra esposto, e tenendo anche conto dell'importanza riconosciuta a questi composti nel vino, si è provveduto a determinare il contenuto di catechine nei campioni disponibili. In questo ambito si è circoscritto lo studio ai (+) flavan-3-oli monomerici, poiché si è tenuto conto del fatto che gli oligomeri sono tanto più attivi come antiossidanti, tanto più le catene sono semplici e corte. I dati riportati in tabella n. 10, sono relativi all'analisi HPLC-DAD condotta sugli stessi batch di campioni, già descritti: 15 varietà di luppolo raccolte nel 2004 e stoccate per un anno fino all'analisi nel 2005 (1°

batch) e le medesime 15 varietà raccolte nel 2005 e analizzate nello stesso anno (2° batch). Il metodo di estrazione e di analisi è stato descritto nel capitolo Materiali e Metodi.

Il fatto di avere avuto a disposizione delle cultivars di luppolo, allevate nello stesso giardino sperimentale, con le stesse condizioni climatiche ed agronomiche, ha rappresentato sicuramente un dettaglio fondamentale per l'attendibilità dei risultati ottenuti. Infatti, è noto che il profilo delle proantocianidine dei luppoli è influenzato dall'origine geografica dei luppoli stessi ed è variabile dipendente dalla cultivar in esame (Li e Deinzer, 2006). In questa ricerca, per la prima volta, si è approntato lo studio sui livelli di (+)catechine, in 15 varietà di luppoli inglesi, minimizzando l'influenza del fattore geografico che tanto incide sul metabolismo della pianta per la sintesi di catechine. Questo ha consentito di confrontare, in modo sistematico, i dati varietali ottenuti, focalizzando l'attenzione sul contributo del fattore genetico sull'accumulo delle catechine monomere.

I luppoli in esame hanno mostrato, come già accennato, contenuti di catechine abbastanza diversi spaziando da un valore minimo di 120 ppm ad massimo di 683 ppm (circa 6 volte superiore). Sovereign, una delle ultime varietà incrociate al College di Wye, è risultata tra i luppoli con il più alto contenuto di catechine. Fino al 2006 Sovereign è stata testata solo in via sperimentale, in campo ed in produzioni birrarie limitate, per verificarne le peculiarità e l'effettiva bontà per uso tecnologico. Non è escluso che il suo alto contenuto in catechine possa avere conseguenze sia a livello del flavour, sia dal punto di vista della stabilità della birra, con probabili restrizioni negli impieghi commerciali di questa varietà. Tuttavia, sono necessarie ulteriori prove in impianti industriali adeguati, per confermare questa ipotesi, in considerazione anche della tipologia di birra prodotta. Esaminando i dati trovati, in relazione alle tipologie genetiche delle cultivars, è possibile fare le seguenti considerazioni:

- a) la maggior parte delle varietà mostra approssimativamente gli stessi contenuti di catechine in entrambi i batch di analisi (esempio: Admiral, Phoenix, Yeoman, Target, Boadiacea, Herald e Sovereign). Al limite, sono stati registrati valori leggermente inferiori per le varietà raccolte nel 2004, stoccate un anno, rispetto alle medesime del 2005, subito analizzate. Questo è dovuto al fatto che la variabile "tempo" influisce nel deterioramento dei polifenoli in generale.
- b) i campioni speculari, tra i batch in parola, di Omega, Challenger, Northdown e Progress hanno dato risposte molto dissimili tra loro. Infatti, gli esemplari della raccolta del 2004, dopo un anno di stoccaggio, hanno mostrato valori inferiori agli altri di circa il 50%. Questo comportamento è abbastanza scontato poichè, al di là delle differenze che potrebbero avvenire nell'accumulo di catechine a seguito delle condizioni stagionali, un anno di conservazione provoca comunque un danneggiamento a carico di composti

molto delicati, come i flavan-3-oli. Per completezza di ipotesi, si potrebbe anche supporre che, durante l'anno 2004, si sono verificate delle condizioni anomale che hanno ostacolato la via biosintetica delle catechine conducendo, dunque, ad un minor accumulo delle stesse, rispetto al loro livello medio. Purtroppo, vista la limitatezza delle prove condotte in campo, le ipotesi che si possono fare sono tutte valide finché non si avvalora l'una o l'altra con dati statisticamente corposi. Tuttavia, al di là di queste potenziali spiegazioni, è interessante notare che il profilo genetico varietale influisce in maniera determinante nell'accumulo di catechine. A riguardo si ricorda che Omega, Challenger e Northdown sono geneticamente "imparentate". Pertanto, considerata come costante l'influenza esercitata sugli ecotipi dal fattore "genetico" e dal fattore "ambiente", per ciascun anno di raccolta, si ritiene che l'interazione "genoma-habitat" abbia giocato un ruolo fondamentale nel determinare la stessa tipologia di risposta nello sviluppo biosintetico dei flavan-3-oli.

- c) viceversa, OT48, WGV, First Gold e Fuggle hanno mostrato un maggior contenuto di catechine nei campioni raccolti nel 2004 e analizzati l'anno successivo. Infatti, nel 2005, gli esemplari raccolti e subito analizzati nel medesimo anno, contengono dal 30 al 60% in meno di catechine monomere rispetto ai relativi campioni del 2004. Potrebbe essere alquanto plausibile supporre che, nel corso della stagione 2005, delle particolari condizioni climatiche, o magari delle infezioni fungine, siano intervenute nell'ostacolare o nel rallentare la biosintesi di catechine. Anche in questo caso, sicuramente di più difficile interpretazione rispetto ai precedenti, si può tuttavia evidenziare che i campioni, geneticamente relazionati (WGV e First Gold), hanno reagito, alle condizioni esterne, mostrando lo stesso comportamento (si parla sempre in riferimento al contenuto di catechine monomere).

A conclusione di questo paragrafo si ritiene opportuno fare delle ulteriori considerazioni circa l'influenza dei fattori esterni sulla sintesi delle sostanze polifenoliche, in senso lato. Di fatto, non per tutte le categorie di composti è possibile evidenziare una correlazione tra annata di raccolta e loro accumulo: il fattore "annata di raccolta" ne influisce sul contenuto, in maniera via via decrescente, passando dagli acidi cinnamici alle proantocianidine, flavanoli, acidi idrossi benzoici fino ai flavonoidi. Nel caso delle proantocianidine e dei flavanoli, il fattore varietale del luppolo incide profondamente sul loro contenuto, mentre gli acidi fenolici e i derivati dell'acido benzoico e cinnamico, sono molto meno determinati dal patrimonio genetico della cultivar. Non è comunque possibile differenziare le varietà sulla base di una sola sostanza marker; per questo scopo dovrebbero essere considerate contemporaneamente diversi composti. Dalla ricerca di Forster *et al.* (2002), condotta per tre annate consecutive su due varietà di luppolo (Perle

e Nugget) allevate in USA e nell'Hallertau, è emerso che i polifenoli a basso peso molecolare sono chiaramente caratterizzati dalle rispettive regioni di crescita e, quindi, dalle condizioni climatiche della zona. E' possibile evidenziare una differenza quantitativa per molti composti tra le annate di coltivazione. In particolare, la formazione di Xan e dei polifenoli a basso peso molecolare è stimolata dal clima mite dell'Hallertau, rispetto agli USA.

Pertanto, tenendo presente che l'areale di crescita caratterizza più o meno fortemente la presenza di alcuni composti del luppolo e, visti i risultati ottenuti in questa sperimentazione soprattutto per quanto riguarda l'accumulo delle catechine, si ritiene di poter suggerire, ai tecnici birrai, di considerare anche l'origine del luppolo come ulteriore elemento di supporto nelle scelte di acquisto delle varietà.

#### 5.4 CURVE DI ACCUMULO DI ALCUNI COMPONENTI DURANTE LO SVILUPPO DEI CONI

La biosintesi di alfa-acidi, beta-acidi e flavonoidi prenilati coinvolge alcune vie metaboliche comuni che includono, tra l'altro, l'estere malonil- coenzima A e l'isoprenil pirofosfato (Zuurbier *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2001). Non è da escludere, pertanto, che le vie che conducono alla sintesi dell'uno, o dell'altro composto, siano competitive tra loro. Si è ritenuto quindi opportuno monitorare la formazione di questi composti, nonché il loro accumulo durante lo sviluppo dei coni sulla pianta. Al fine di poter tracciare eventuali correlazioni tra la loro concentrazione e la capacità antiossidante dei coni, si è inoltre provveduto a registrare le variazioni di TAA negli stessi campioni collezionati.

In letteratura sono disponibili diversi lavori analitici sugli acidi amari, Xan e DesmetilXan, determinati sui coni in maturazione (De Keukeleire *et al.*, 2003) ma, ad oggi, nessuno studio ha mai valutato la capacità antiossidante dei coni durante la loro crescita sulla pianta. Infine, è stato determinato il contenuto di catechine in tutti i campioni in parola, poiché in bibliografia non sono riportati studi simili nelle varietà di luppolo inglese.

Tra i luppoli disponibili nel giardino sperimentale di Wye, sono state scelte due varietà per questa indagine: Omega e Challenger.

Omega è una tipica varietà amaricante, il cui contenuto in alfa acidi si aggira sul 10% (p/p). Viceversa, Challenger è considerata una varietà a duplice attitudine, poiché mostra un contenuto in alfa acidi modesto (approssimativamente intorno all'8%, p/p) ma note aromatiche molto apprezzate. Sono varietà geneticamente legate in quanto Omega è stata ottenuta da un incrocio tra una pianta femminile di Wye Challenger e una varietà inglese maschile. Inoltre Omega e Challenger sono rappresentative di due differenti tipologie di

accumulo degli alfa acidi nelle ghiandole di lupulina. Infatti, a parità di condizioni ambientali e di trattamenti agronomici, è noto che la velocità di sintesi degli alfa acidi può seguire un andamento esponenziale, logaritmico o gaussiano a seconda della varietà che si considera. I primi due tipi si distinguono essenzialmente per il tasso di accumulo della sostanza in questione nelle prime settimane di ingrossamento dei coni, mentre nell'ultima tipologia menzionata, la via biosintetica segue un andamento a campana. Questo significa che, dopo aver raggiunto il picco di massimo degli alfa acidi, la concentrazione relativa decresce. In quest'ultimo caso il periodo ottimale per la raccolta dovrà cadere in coincidenza del massimo valore registrato altrimenti si perde in resa, poiché il valore commerciale del luppolo è stato da sempre identificato con il suo contenuto in acidi amari. Da questo punto di vista conoscere il comportamento di una varietà è un valido supporto decisionale per ottimizzare e programmare la raccolta dei coni a piena maturità.

In pratica, gli alfa acidi in Omega sono accumulati con andamento assimilabile ad una curva che cresce esponenzialmente, mentre in Challenger raggiungono il plateau dopo una fase iniziale di crescita di tipo logaritmico. Nella tabella seguente sono riportati, per le due varietà, i valori degli alfa acidi, beta acidi, coumulone, colupulone e xantoumulone determinati nei coni in maturazione, raccolti nelle date indicate. Questi dati sono presentati in un unico prospetto poiché sono stati ottenuti dall'analisi cromatografia con HPLC-DAD eseguita sul medesimo estratto metanolico, come da procedura EBC (vedi capitolo Materiali e Metodi). Per ogni varietà sono stati analizzati rispettivamente otto campioni prelevati nel periodo dal 22 agosto 2005 al 29 settembre 2005. Considerato l'andamento stagionale poco piovoso e caldo registrato nell'anno 2005 nel sud-est inglese, la maggior parte degli agricoltori hanno raccolto il luppolo nella settimana dal 12 al 17 settembre. Pertanto, i campioni prelevati in "post-raccolta" (19 e 29 settembre) sono da considerarsi già coni in fase di senescenza.

Prima di passare all'esame dei dati vero e proprio, è opportuno ricordare che i coni freschi (circa 300 grammi per ogni prelievo) sono stati conservati in congelatore a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Terminata la fase di collezione, i campioni sono stati sottoposti simultaneamente ad essiccamento, in forno ad aria, seguendo le modalità normalmente applicate per la preparazione dei coni interi in birreria (si veda il capitolo Materiali e Metodi). Pertanto, tutti i risultati, di seguito illustrati, si riferiscono non al prodotto fresco, ma ai coni secchi con circa il 7-8% di umidità. La scelta di essiccare i coni, raccolti in via di sviluppo, prima delle prove analitiche, è stata motivata dal fatto che: ad oggi, non esistono metodiche validate di analisi sul luppolo fresco; i risultati che si sarebbero ottenuti non sarebbero stati confrontabili con gli altri ricavati in questi progetto o presenti in letteratura, poiché il luppolo fresco non è adoperato tal quale nelle birrerie; il luppolo fresco non si conserva

agevolmente. Pertanto, poiché la raccolta del luppolo per uso industriale è comunque seguita dall'essiccamento dei coni, si è ritenuto di dover seguire questa prassi al fine di ottenere dati utilmente riferibili alla realtà commerciale.

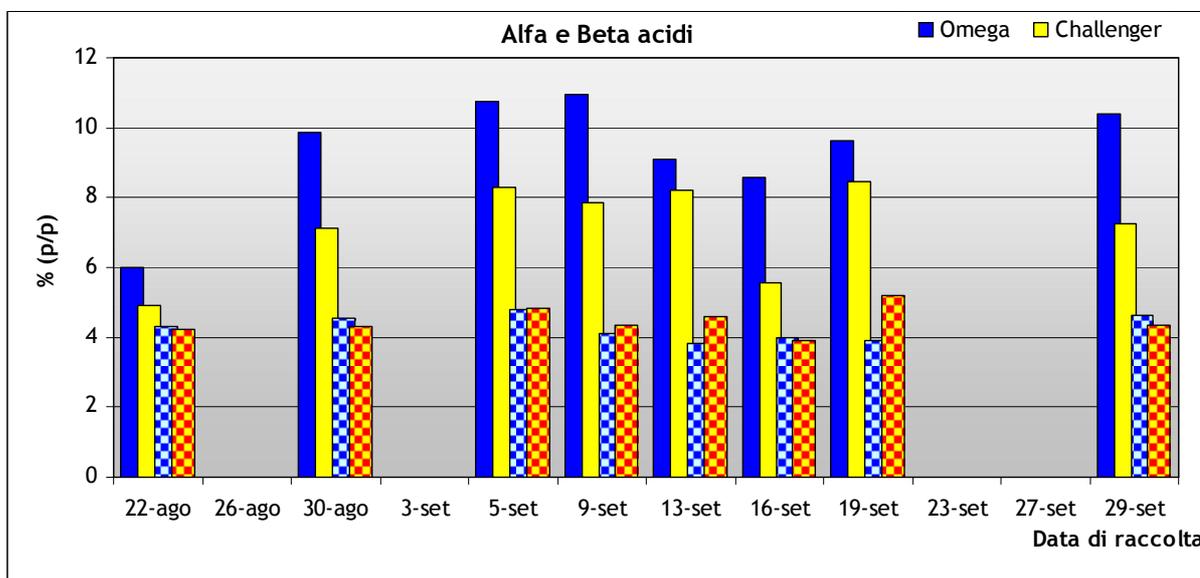
Data di raccolta	$\alpha$ - acidi % (p/p)	$\beta$ - acidi % (p/p)	Alfa/Beta	Alfa+Beta % (p/p)	Coumulone % di $\alpha$ -acidi	Colupulone % di $\beta$ -acidi	Xan % (p/p)
<b>Omega</b>							
22 ago	5.99	4.32	1.38	10.31	25.22	40.37	0.17
30 ago	9.88	4.55	2.17	14.43	27.05	46.11	0.38
05 sett	10.75	4.79	2.24	15.54	29.34	50.05	0.40
09 sett	10.95	4.11	2.66	15.06	29.24	51.81	0.40
13 sett	9.08	3.83	2.37	12.91	33.97	53.93	0.31
16 sett	8.56	3.97	2.15	12.53	36.64	57.00	0.31
19 sett	9.60	3.89	2.46	13.49	30.29	50.18	0.37
29 sett	10.39	4.65	2.23	15.04	30.74	50.85	0.34
<b>Challenger</b>							
22 ago	4.93	4.24	1.16	9.17	24.32	42.31	0.17
30 ago	7.14	4.29	1.66	11.43	19.62	37.67	0.29
05 sett	8.31	4.83	1.72	13.14	25.04	46.33	0.35
09 sett	7.85	4.36	1.80	12.21	25.11	45.76	0.31
13 sett	8.19	4.60	1.78	12.79	23.30	45.37	0.3
16 sett	5.56	3.88	1.43	9.44	29.11	49.15	0.22
19 sett	8.46	5.19	1.63	13.65	25.97	46.65	0.41
29 sett	7.25	4.33	1.67	11.58	25.56	50.69	0.27

**Tabella 11:** contenuto di alfa acidi, beta acidi, coumulone, lupulone e xantoumulone (Xan) dei coni in maturazione di Omega e Challenger raccolti nelle date indicate, riportati in percentuale (peso/peso). Nella quarta colonna è riportato il rapporto alfa su beta acidi, mentre nella quinta è stata calcolata la loro somma (alfa più beta acidi).

Dall'esame della tabella n. 11, si evince che, a prescindere dal valore assoluto dei dati, tutti gli acidi, incluso il calcione xantoumulone, sono già presenti nel luppolo, fin dalle prime fasi di crescita dei coni.

Esaminando i livelli degli alfa acidi, emerge che la varietà Omega mostra un contenuto di gran lunga maggiore di Challenger in tutte le fasi di campionamento. Non si può dire altrettanto per i beta acidi, poiché le due varietà si mantengono sempre su livelli molto simili sin dall'inizio. Fanno eccezione i campioni del 13 e 19 settembre, in cui Challenger supera Omega, in beta-acidi, rispettivamente con 4.60% e 5.19% (p/p) contro 3.83% e

3.89% di Omega (p/p). Quanto detto si può chiaramente cogliere nella rappresentazione grafica seguente (Fig. n. 34).



**Fig. 34:** contenuto degli alfa e beta acidi, espressi in percentuale peso su peso, determinati durante la maturazione dei coni di luppolo, raccolti nelle date indicate sul grafico. Le colonne di colore uniforme rappresentano gli alfa acidi di Omega, in blu, e Challenger, in giallo. Le colonne a scacchi raffigurano il livello dei beta acidi di Omega, in tinta blu, e di Challenger, in tinta gialla.

Poichè l'asse delle ascisse, nel grafico in figura n. 34, riporta le date di raccolta dei campioni in scala temporale, è possibile trarre informazioni immediate anche sulla strategia messa in atto per il campionamento: la frequenza di raccolta dei coni è stata infatti aumentata in prossimità della settimana di "battitura" del luppolo, in cui erano previsti cambiamenti fisico-chimici molto repentini, essendo i coni prossimi alla maturazione.

Il contenuto totale degli acidi (alfa più beta), ottenuto da una mera somma matematica dei singoli addendi, si prospetta comunque a favore di Omega, così come il rapporto alfa su beta acidi, riportato anch'esso in tabella n.11. Tale rapporto conferma il carattere amaricante di Omega le cui vie biosintetiche sono palesemente spostate a favore degli alfa acidi. Infatti il rapporto alfa/beta è, in ogni fase di maturazione, abbondantemente superiore a 2 in Omega, mentre si attesta intorno all'1.4-1.8 in Challenger. Fanno eccezioni i campioni del 22 agosto, di entrambe le varietà, che mostrano tale rapporto poco superiore all'unità. Evidentemente, in questa prima fase, il metabolismo dei coni non si è ancora propriamente differenziato, ma la via biochimica che conduce alla formazione degli alfa acidi viene favorita non appena che le infiorescenze iniziali avanzano nello sviluppo dei coni.

Per quanto riguarda il tasso di accumulo degli alfa acidi, l'andamento riscontrato in Challenger conferma quanto già noto in letteratura e precedentemente riportato. Infatti, esaminando il trend di concentrazione degli alfa acidi, per Challenger si ottiene una curva che ricalca quasi perfettamente quella logaritmica. Non altrettanto scontati sono i risultati rilevati per Omega, dove la curva di accumulo degli alfa acidi segue un andamento piuttosto contorto, fuori dagli schemi noti. In ogni modo si può osservare come Omega accumuli l'umulone, per lo meno nel periodo iniziale, molto velocemente. Al riguardo si osservi che Omega raggiunge il massimo valore di alfa acidi già il 9 settembre, mentre Challenger solo dieci giorni dopo (campione del 19 settembre).

E' ben noto che i beta acidi sono molto propensi all'ossidazione (Verzele e De Keukeleire, 1991) e la loro suscettibilità può essere varietà-dipendente. E' interessante notare che, nel nostro studio, la formazione dei beta acidi precede quella degli alfa acidi negli stadi iniziali della formazione dei fiori.

Un'ulteriore osservazione riguarda la diminuzione della concentrazione di acidi, nonché dello xantumolone, dopo la fase iniziale di crescita dei coni. Sembra, infatti, che gli acidi amari e lo Xan subiscano una riduzione dopo i primi dieci giorni di settembre, per poi riaumentare nella fase di post-raccolta. In realtà, non è propriamente corretto parlare di *incrementi* e *decrementi* di queste sostanze che, una volta che sono state sintetizzate, non possono "sparire" nella matrice, tanto più se il loro valore assoluto subisce un incremento nella fase di senescenza dei coni. Senza lasciarsi trarre in inganno dai valori assoluti, è opportuno osservare che la diminuzione degli alfa acidi e dello Xan avviene in coincidenza della fase di ingrossamento morfologico dei coni. E' pertanto più adeguato parlare di variazione della concentrazione relativa delle sostanze menzionate, poiché tale fenomeno è dovuto ad una "diluizione" dei composti in questione nella matrice luppolo. Molto meno probabile è che siano avvenuti fenomeni di degradazione degli alfa acidi, più stabili dei beta, la cui concentrazione è variata molto poco. A conferma di ciò, si vedano le fotografie dei coni (Fig. n. 35), rappresentativi dei campioni raccolti, che evidenziano i cambiamenti morfologici avvenuti nel corso della loro maturazione. Si presti attenzione anche alla variazione di colore che da verde brillante volge a marrone nella fase di post raccolta. Infine si noti la caratteristica forma globosa e compatta dei coni della varietà Omega, rispetto a quella allungata e snella dei coni della varietà Challenger (Fig. n. 36).



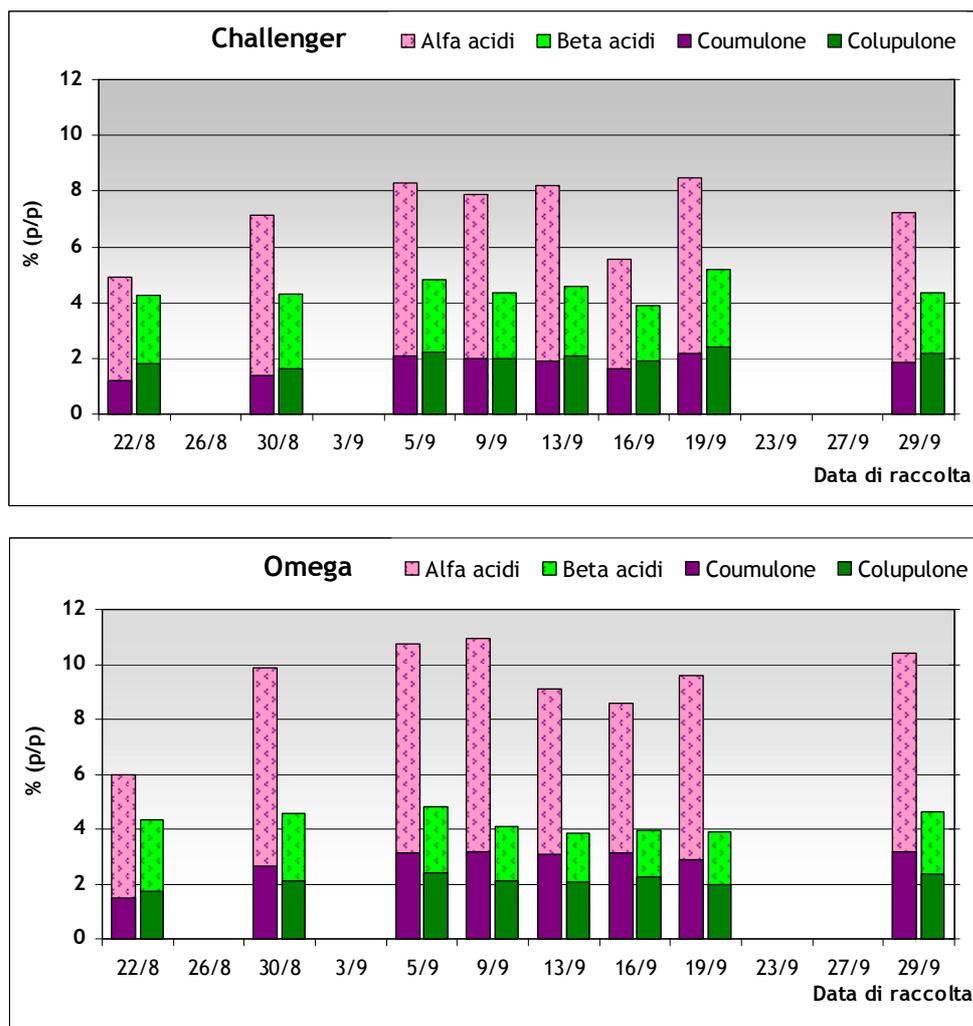
**Fig. 35:** cambiamenti morfologici dei coni di Challenger (in alto) e Omega (in basso) rappresentativi dei campioni raccolti nelle date indicate.



**Fig. 36:** confronto morfologico tra i coni di luppolo in maturazione, raccolti nelle date indicate, delle varietà Challenger (coni posizionati a sinistra) e Omega (coni posizionati a destra).

Un'ulteriore considerazione merita di essere fatta relativamente al pronunciato "avvallamento" che si osserva nel trend degli acidi amari e dello xantoumulone, nei campioni del 13 e soprattutto in quelli del 16 settembre. Infatti, in quest'ultima data, entrambe le cultivar mostrano la concentrazione più bassa di alfa acidi (Omega: 8.56%, Challenger 5.56%), beta acidi (Omega: 3.97%, Challenger 3.88) e Xan (Omega: 0.31%, Challenger: 0.22%). Quanto finora asserito, è valido trascurando i dati relativi al primo campionamento in cui, i coni, poco differenziati anche morfologicamente, stanno giusto iniziando la fase rapida di crescita. L'avvallamento citato, registrato in piena fase di sviluppo del luppolo, resta di difficile interpretazione. Probabilmente, potrebbe aver condotto a questo risultato, un cambiamento repentino nelle condizioni climatiche o nel metabolismo della pianta. Sarebbero necessarie ulteriori prove parallele, sulle stesse varietà, e su varietà diverse, in annate successive, per confermare o meno il presunto carattere anomalo del trend registrato. Inoltre, per un'analisi più scientifica dei dati, sarebbe stato opportuno prendere nota anche delle condizioni ambientali durante il prelievo (temperatura esterne, umidità dell'aria, peso specifico dei coni freschi, ecc.), e dell'andamento stagionale (mm e frequenza della pioggia caduta, irraggiamento solare, ecc.).

E' interessante notare il trend di concentrazione del co-umulone e co-lupulone, i cui valori, riportati in tabella n.11, sono espressi come percentuale sulla quantità dei rispettivi alfa e beta acidi. Salta subito in evidenza come il co-umulone ed il co-lupulone tocchino il livello più alto in corrispondenza della sopra menzionata "depressione", dove si è registrato il valore minimo, sia per gli alfa sia per i beta acidi. In particolare, nei campioni del 16 settembre, il coumulone è risultato presente, in Omega, per il 36.64% ed in Challenger, per il 29.11%, mentre il colupulone per il 57.00% ed il 49.15%, rispettivamente per Omega e Challenger. In realtà, poichè queste percentuali sono riferite ad un contenuto di alfa e beta acidi più basso, la proporzione di "co-acidi" (coumulone e lupulone) sul totale degli alfa e beta acidi è da ritenersi pressochè costante. A tal proposito si vedano i grafici in figura n. 37, distinti per varietà, in cui il contributo del coumulone e del colupulone sono riportati e confrontati con il totale della rispettiva categoria (alfa acidi e beta acidi). I grafici confermano quanto detto in precedenza: il coumulone e colupulone, una volta sintetizzati, non subiscono nessuna profonda variazione nel corso della maturazione dei coni. In altre parole, ciò significa che sono le altre strutture (umulone, ad-umulone e relativi isomeri) degli alfa e beta acidi, a contribuire in maniera decisiva alla loro fluttuazione nel corso dello sviluppo dei coni. Purtroppo, non essendo state fatte analisi per l'identificazione dei singoli acidi amari, non si hanno ulteriori dati per avallare questa ipotesi, che resta in attesa di conferma.



**Fig. 37:** grafici che illustrano, per ogni varietà, il contributo del coumulone e del colupulone riportato e confrontato sul totale della rispettiva categoria di appartenenza (alfa acidi e beta acidi). La base degli istogrammi, di colore scuro ed uniforme, rappresenta il contributo dei “co-acidi” al livello totale degli alfa e beta acidi, rappresentato dalla colonna nella sua interezza. I valori sono espressi, come al solito, in percentuale peso/peso.

Per quanto riguarda lo xantoumulone, si possono ritenere valide le stesse considerazioni fatte per gli alfa acidi, poichè questo calcione ne ricalca andamento. Naturalmente il range di variazione dello Xan oscilla su una scala di valori molto più ristretta di quella osservata per gli acidi amari, in quanto, costitutivamente, lo Xan è presente, nella maggior parte delle cultivar di luppolo, in misura inferiore all'1%.

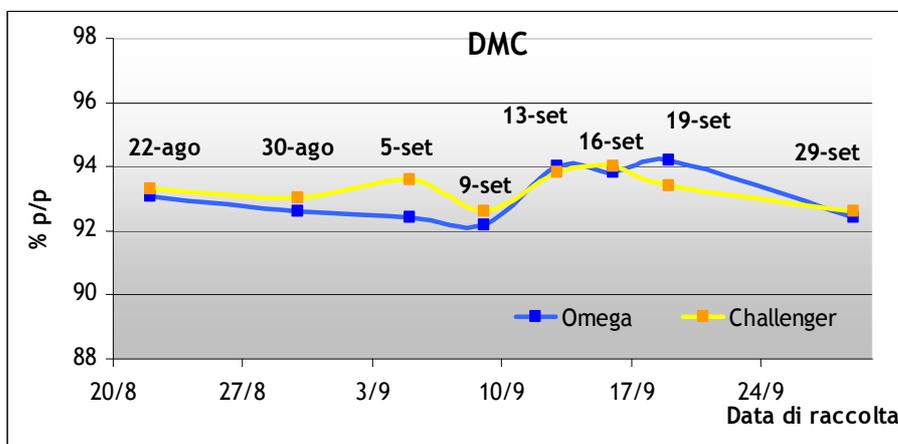
Nella tabella sottostante sono riportati i risultati relativi alle determinazioni della sostanza secca (DMC: dry matter content), dell'attività antiossidante totale (TAA), e delle catechine.

Data di raccolta	DMC % (p/p)	TAA (µg/g)	Catechine ppm	
<b>Omega</b>			<i>media</i>	<i>ds</i>
22 agosto	93.1	92 607	215.3	± 5.0
30 agosto	92.6	107 520	101.6	± 28.8
05 settembre	92.4	113 964	115.0	± 0.7
09 settembre	92.2	120 013	122.9	± 10.4
13 settembre	94.0	93 397	113.0	± 9.7
16 settembre	93.8	92 206	125.5	± 13.3
19 settembre	94.2	113 775	169.1	± 0.9
29 settembre	92.4	103 774	104.7	± 8.3
<b>Challenger</b>				
22 agosto	93.3	68 805	208.5	± 3.0
30 agosto	93.0	92 245	158.3	± 20.3
05 settembre	93.6	112 704	154.6	± 18.5
09 settembre	92.6	95 159	168.4	± 3.3
13 settembre	93.8	75 968	179.6	± 3.5
16 settembre	94.0	69 019	154.3	± 14.1
19 settembre	93.4	97 044	191.3	± 2.0
29 settembre	92.6	84 834	150.4	± 0.1

**Tabella 12:** per ogni campione, raccolto nelle date indicate, sono riportati i dati delle cultivar indicate, relativamente ai: valori della sostanza secca (DMC: dry matter content), espressi in percentuale (peso/peso); livelli di attività antiossidante totale (TAA), riportati come µg/g di unità equivalenti di acido ascorbico per peso unitario dei coni essiccati; valori medi e deviazione standard (ds) delle catechine, espresse in ppm (n=2).

Il contenuto della sostanza secca è stato effettuato, come del resto tutti gli altri dosaggi, sui campioni essiccati, come descritto in precedenza. Nella fattispecie, il DMC è stato determinato quale dato utile per calcolare precisamente il contenuto degli acidi amari, dello xantoumulone e delle catechine. Inoltre è servito come utile informazione per verificare che il processo di essiccazione fosse stato eseguito a regola d'arte, come avviene realmente nel condizionamento del luppolo intero per uso industriale. Il contenuto di sostanza secca, trovato per le due varietà essiccate, intorno al 92-93%, rispecchia pienamente i valori che usualmente si ottengono dall'essiccamento dei coni nei forni. Viceversa, i campioni del 13-16 e 19 settembre hanno mostrato un contenuto di umidità intorno al 6%, valore leggermente inferiore rispetto agli altri campioni. A tal proposito si veda il grafico in Fig. n. 38, che illustra i livelli di sostanza secca dei vari campioni, espressi in percentuale peso su peso. Escludendo che ciò sia dovuto a variabilità incontrallata di alcuni parametri di processo durante l'essiccamento, poichè tutti i campioni sono stati condizionati insieme, nel medesimo forno, è possibile ipotizzare che

siano avvenuti, nel metabolismo della pianta, cambiamenti da influenzare, tra l'altro, la disponibilità di acqua cellulare. Non a caso, nelle suddette date, si sono riscontrate anche anomalie nelle altre determinazioni (si vedano i risultati sopra descritti).



**Fig. 38:** livelli di sostanza secca delle varietà Omega (in blu) e Challenger (in giallo), determinati nei campioni raccolti nelle date indicate sul grafico. DMC (Dry Matter Content), ovvero il contenuto di sostanza secca, è espresso in percentuale peso/peso.

I valori dell'attività antiossidante totale (TAA), riportati in tabella n. 12 come  $\mu\text{g/g}$  di unità equivalenti di acido ascorbico per peso unitario dei coni essiccati, sono stati ottenuti applicando il saggio ABTS. Tale determinazione è stata effettuata in singolo, ma ripetuta in triplo per ogni sub-campione. Come evidenziato nel capitolo Materiali e Metodi, le estrazioni degli antiossidanti dal luppolo, e le relative letture spettrofotometriche eseguite in giornata, contemporaneamente su più campioni, permettono di ottenere una scala relativa di valori di TAA indicativa del potere antiossidante dei diversi campioni analizzati. Pertanto, i valori della capacità antiossidante, in tabella n. 12, non sono considerati singolarmente ma, in questo ambito, verranno apprezzate solo le variazioni di TAA nel corso della maturazione dei coni. Al riguardo si può sottolineare come Omega abbia mostrato, a parità di fase di sviluppo, valori di attività antiossidante sempre più elevati di quelli di Challenger. Omega ha raggiunto il massimo con  $120.000 \mu\text{g/g}$  unità equivalenti di acido ascorbico, il 9 settembre; Challenger ha dato il picco più elevato il 5 settembre con circa  $112.000 \mu\text{g/g}$  unità equivalenti di acido ascorbico. In entrambe le varietà, il saggio ABTS ha rivelato che il potere antiossidante è minimo nelle primissime fasi di ingrossamento dei coni ed in corrispondenza della già menzionata data del 16 settembre. All'inizio il TAA aumenta fino ai primi dieci giorni di settembre, dopodiché si assiste ad una serie di oscillazioni la cui interpretazione resta alquanto aleatoria. Tuttavia, i risultati ottenuti in questo ambito ci consentono di poter cogliere i seguenti suggerimenti pratici: al

fine di disporre di luppolo con un'alto potere antiossidante è auspicabile anticipare i tempi di raccolta di qualche giorno, piuttosto che avanzare eccessivamente con la maturazione e rischiare di perdere in capacità antiossidante. Poiché non è ancora noto come le condizioni climatiche influenzino le singole varietà di luppolo a sviluppare il loro potere antiossidante, non si possono fare previsioni a carattere scientifico per capire quali siano i tempi migliori per la raccolta. Tuttavia, poiché la capacità antiossidante determinata con saggio ABTS, è risultata variare concordemente con il contenuto di alfa acidi, indipendentemente dalle relazioni di causa-effetto esistenti tra queste due grandezze, è utile l'indicazione di raccogliere il luppolo seguendo i già noti criteri per raggiungere la massima resa in acidi amari. D'altra parte, questa è la miglior soluzione per ottenere un prodotto con un buon valore commerciale, dato dal contenuto di acidi amari, ed una buona capacità antiossidante, che si auspica sia trasferibile, almeno in parte, nella birra. Resta inteso che altri saggi per la determinazione della capacità antiossidante potrebbero non confermare quanto trovato in questa sede. Il presente lavoro rimane in attesa di ulteriori sviluppi e/o di essere ripreso con differenti approcci. La determinazione analitica dei composti, che si ritengono contribuire alla capacità antiossidante (polifenoli e fitoestrogeni in senso lato), effettuata su coni in maturazione, sarebbe sicuramente utile per chiarire molto al riguardo. Infine, dall'esperienza di questo lavoro in campo, si può suggerire, come strategia sperimentale, di effettuare campionamenti più frequenti su varietà diverse, registrando le condizioni climatiche, poiché i cambiamenti che avvengono nei coni prossimi alla maturazione (prima e dopo) sono molto repentini.

Nel grafico di Fig. n.39, è illustrato l'andamento di TAA, unitamente a quello degli altri parametri considerati.

L'analisi statistica (test di Correlazione di Pearson,  $P < 0.05$ ) ha confermato quanto l'evidenza grafica pone in risalto, ossia che tra il contenuto di alfa acidi ed il livello di attività antiossidante esiste una correlazione positiva in ogni fase di sviluppo dei coni. Lo stesso dicasi per potere antiossidante e xantoumulone. I coefficienti di correlazione ( $r$ ), calcolati tra TAA e alfa acidi (0.76 in Omega e 0.75 in Challenger) e tra TAA e Xan (0.77 in Omega e 0.79 in Challenger) sono riportati nei grafici sottostanti.

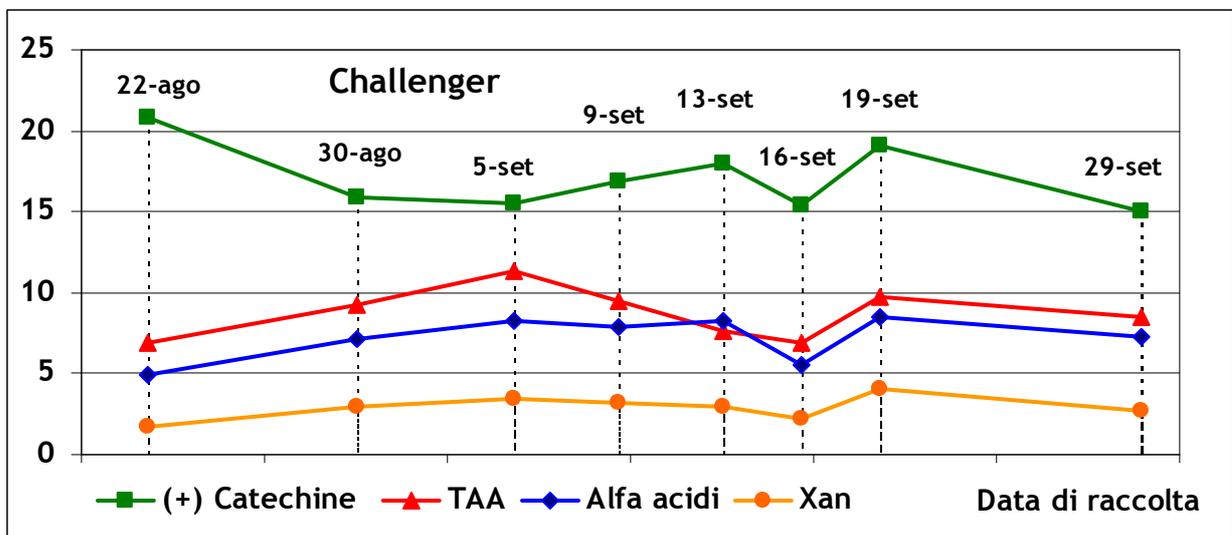
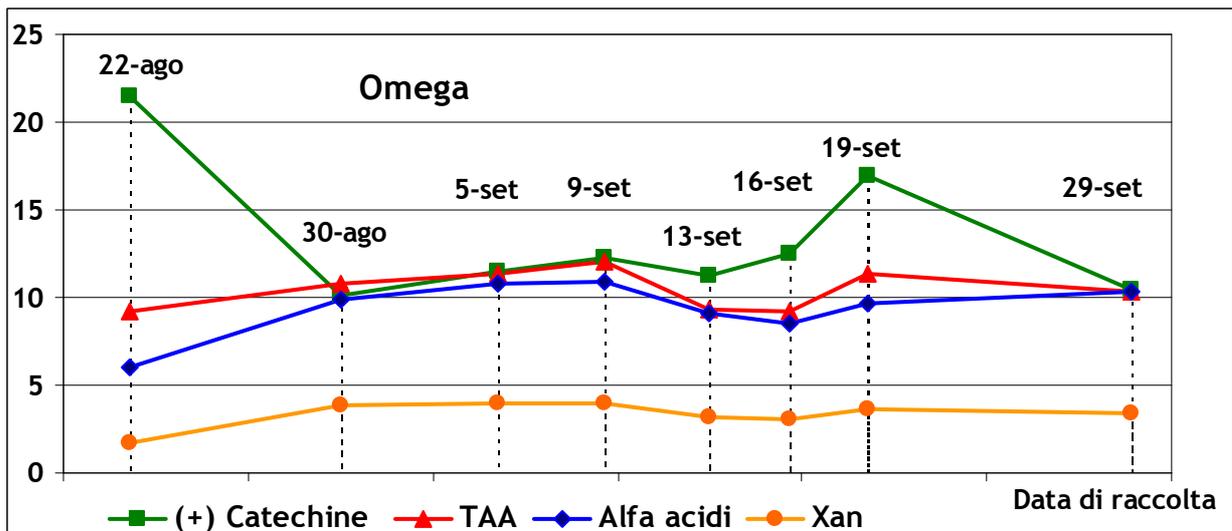
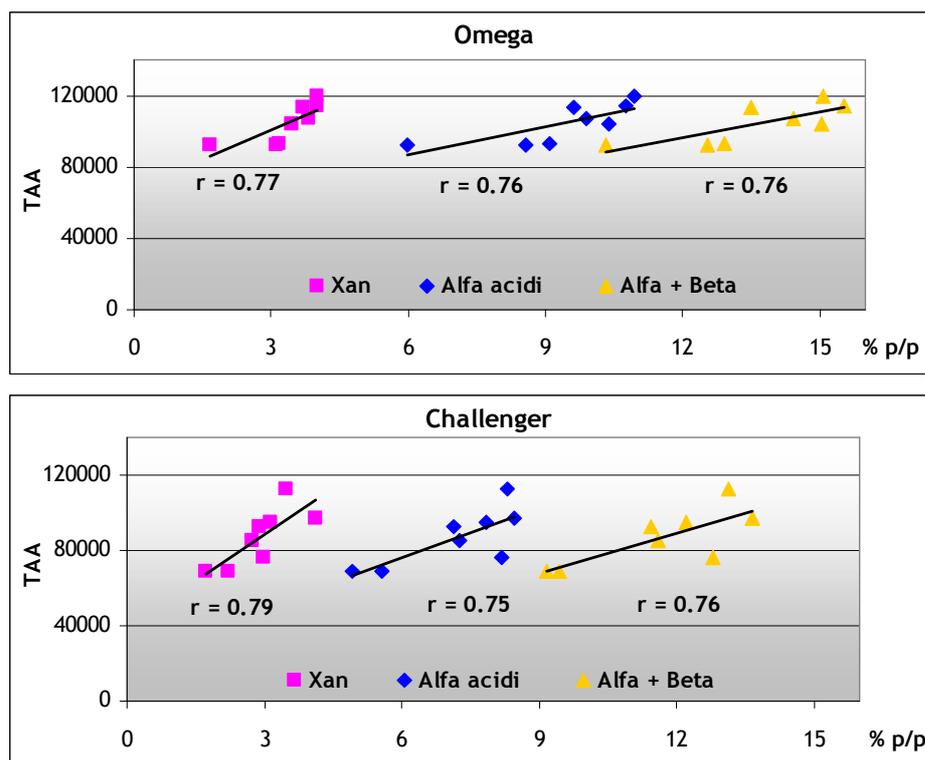


Fig. 39: livelli di catechine, attività antiossidante totale (TAA), alfa acidi e xantoumulone (Xan), determinati nei coni di luppolo raccolti nelle date indicate vicino ai punti, per le cultivar riportate nei rispettivi grafici. Per chiarezza di rappresentazione, le diverse grandezze tracciate nei grafici, sono state riportate come: milligrammi di catechine per 100 grammi di luppolo; 10 x milligrammi equivalenti di acido ascorbico per grammo di luppolo; percentuale (%) peso/peso per gli alfa acidi e percentuale (‰) peso/peso per lo xantoumulone.

La relazione di causalità tra alfa acidi e potere antiossidante, o xantoumulone e potere antiossidante, è risultata evidente applicando il saggio ABTS. Altri test basati su meccanismi diversi potrebbero non confermare quanto trovato in questa sperimentazione: l'aleatorietà delle supposizioni qui esposte è essenzialmente legata ai limiti metodologici intrinseci al saggio ABTS usato per la valutazione del potere antiossidante in vitro.



**Fig. 40:** Grafici che illustrano, per le rispettive varietà, i coefficienti di correlazioni trovati applicando il test di Correlazione di Pearson ( $P < 0.05$ ) tra i livelli di attività antiossidante totale (TAA), espressi in  $\mu\text{g/g}$  di unità equivalenti di acido ascorbico per peso unitario di coni essiccati, vs il contenuto di alfa acidi, xantoumulone e alfa più beta acidi, riportati in ascissa come percentuale peso/peso.

In tabella n. 12, sono riportati i risultati relativi alla determinazione delle catechine; tale, analisi è stata ripetuta in doppio, pertanto i dati sono espressi come la media più o meno la deviazione standard. Dall'esame dei valori assoluti si evince che Challenger mostra un contenuto di catechine più elevato rispetto ad Omega, in ogni fase di raccolta. Al di là dei valori matematici, le due cultivar si caratterizzano per due differenti trend di accumulo delle catechine nel corso della maturazione dei coni. Inizialmente (campioni del 22 agosto), quando i coni sono ancora piccoli e molto verdi, la concentrazione delle catechine è molto alta in entrambe le varietà ( $215.3 \pm 5$  ppm in Omega e  $208 \pm 3$  ppm in Challenger). Dopo questo picco iniziale, il loro livello si stabilizza su valori sempre più bassi, probabilmente per un effetto di diluizione, ossia di variazione della concentrazione relativa, ma non è escluso che possano essere intervenuti fenomeni di degradazione a carico delle catechine stesse. È interessante sottolineare il diverso comportamento varietale nel periodo compreso tra agosto e metà settembre: mentre in Omega le catechine tendono a crescere/decrescere congiuntamente agli altri parametri determinati (TAA, alfa acidi e Xan), in Challenger seguono delle oscillazioni di concentrazione esattamente opposte al trend registrato per l'attività antiossidante, il contenuto degli alfa acidi e dello xantoumulone (Fig. n.39). Dopo il 19 settembre, i campioni seguono

nuovamente un andamento simile, mostrando un contenuto di catechine amplificato rispetto ai precedenti valori medi ( $169.1 \pm 0.9$  ppm in Omega e  $191.3 \pm 2$  ppm in Challenger) che viene subito ridimensionato nello stadio finale.

Nell'elaborazione di questi dati non è stato condotto nessun test di correlazione tra attività antiossidante totale e quantità di catechine, poichè queste ultime sono state estratte con acetone/acqua. Pertanto, si è ritenuto che mettere in relazione il TAA, valutato su estratti di puro metanolo, con una variabile quantificata su differenti matrici di estrazione, sia metodologicamente non corretto. Viste le considerazioni fatte nei precedenti paragrafi circa l'influenza genetico/ambientale sulla sintesi di catechine, si stima di ritenere valide le stesse anche in questo ambito. Tuttavia, è doveroso rimarcare che i risultati sopra esposti necessitano di essere confermati con prove ripetute nel tempo e su una popolazione varietale più ampia.

A conclusione di questo paragrafo, è opportuno spendere qualche parola anche sui limiti della strategia sperimentale adottata, relativamente alle modalità di campionamento dei soggetti. In ogni campionamento sono state scelte, con criteri di assoluta casualità, una pianta di Challenger ed una di Omega per la raccolta di circa 300 grammi di coni. Anche i coni sono stati individuati casualmente, avendo l'accortezza di raccogliarli omogeneamente lungo tutto il fusto della pianta di luppolo. Dopo la raccolta, la pianta, staccata dal proprio sostegno, non poteva essere rimessa nella posizione, in quanto il luppolo era allevato ad Y, tramite corde fissate a tralicci alti 5 metri. Di conseguenza, il campione è stato costituito ogni volta assemblando coni di soggetti diversi. Si ritiene, a ragione, che i rilievi eseguiti su organismi diversi siano poco confrontabili in quanto anche in popolazioni di una stessa cultivar vi sono sempre diversità sia fenotipiche che genotipiche (per mutazioni, interazioni genotipo-ambiente, etc...) che possono molto influire sulla crescita individuale (Milner e Hughes, 1968). Per ovviare a questo limite metodologico sarebbe stato necessario considerare campioni più grandi, ciascuno costituito da più piante diverse. Nel caso specifico, questo non è stato possibile per l'esiguità del campione a disposizione.

Le autocritiche, qui avanzate, potrebbe essere utili per giustificare ed interpretare le oscillazioni "anomale" registrate per alcuni dei composti considerati, delle quali si è sopra esposto.

## 5.5 L'ANALISI ABTS SUL LUPPOLO FRESCO

Durante la raccolta dei campioni nel 2005, per ogni varietà, è stata stoccata, a parte, un'aliquota di coni freschi. Questi non sono stati sottoposti ad essiccamento, ma sono stati depositati direttamente in congelatore a - 18 °C, in sacchetti di plastica sigillati, ed ivi conservati fino al momento dell'analisi. Questo al fine di poter valutare le eventuali differenze esistenti tra il potere antiossidante dei coni freschi e quelli essiccati nelle varie cultivars. In altri termini, il presente studio è stato condotto allo scopo di indagare sugli effetti del trattamento di essiccamento dei coni interi relativamente alla loro capacità antiossidante. La metodica di estrazione e di analisi dei campioni è esattamente quella utilizzata per i luppoli secchi, già descritta dettagliatamente nel capitolo Materiali e Metodi. L'unico accorgimento in più, attuato in questa fase, ha riguardato la preparazione del campione in fase di macinazione e tiene conto dell'alta percentuale di acqua presente nei coni freschi.

Infatti, come si evince dai dati in Tabella n.13 , il contenuto di sostanza secca dei coni, a piena maturità, si aggira intorno al 21% (p/p), mentre con l'essiccamento il DMC passa al 92 % (p/p) circa. L'alta percentuale di acqua, presente nei coni freschi, rende difficoltosa, se non impraticabile, la macinazione di appena 0.5 grammi di campione, come da metodica di estrazione A per il luppolo secco. Il campione veniva, infatti, ridotto a poltiglia, difficile da dosare e da gestire. Per ovviare a questo inconveniente tecnico, si è ricorsi all'uso di azoto in forma solida che, macinato con il campione, è servito per rendere gelato, e quindi temporaneamente pulverulento, il macinato di coni. E' stato così possibile adottare la solita strumentazione di analisi. Dopo una breve pausa per permettere all'azoto di evaporare, si è proceduto pesando il campione e applicando, quindi, il metodo di estrazione A, a cui si rimanda. A conferma che il trattamento con cristalli di azoto non ha influenza sul contenuto d'acqua del campione, è stato determinato, ancora una volta, il contenuto di sostanza secca del macinato, così ottenuto. I risultati, riportati in Tabella n.13, non evidenziano differenze sostanziali tra i DMC dei coni prima e dopo la macinazione con azoto solido. Le misurazioni della sostanza secca sono state eseguite tutte in singolo, poiché ai fini della presente indagine, la conoscenza del contenuto d'acqua dei campioni è stato un mero parametro indicativo del nostro operato per monitorare, ad esempio, la correttezza nell'esecuzione dell'essiccamento, della conservazione dei luppoli in congelatore, etc..

Varietà di luppolo	DMC (% p/p) luppolo secco	DMC (% p/p) luppolo fresco	DMC (% p/p) luppolo fresco dopo macinazione con azoto solido
Omega	90.9	21.3	22.8
OT 48	90.1	20.9	19.8
Admiral	93.4	22.6	23.3
Progress	91.4	21.3	20.6
WGV	92.1	19.3	21.0
Fuggle	92.2	19.0	18.0
Northdown	92.9	21.1	20.3
Phoenix	93.0	21.5	20.7
Yeoman	92.7	22.6	22.3
Challenger	92.5	21.5	20.9
Target	92.8	21.2	22.6
Sovereign	92.6	21.3	22.5
First Gold	92.0	18.3	19.1
Boadicea	92.7	22.1	22.2
Herald	92.6	24.0	24.4
<b>Valori medi</b>	<b>92.3</b>	<b>21.2</b>	<b>21.4</b>

**Tabella 13:** contenuto di sostanza secca (DMC: dry matter content) espresso in percentuale peso/peso, riportato per ogni varietà. I coni erano della campagna di raccolta del 2005. Le prove sono state condotte in singolo.

Al fine di ottenere TAA comparabili tra le due tipologie di campioni (luppolo essiccato e fresco), si è ritenuto opportuno condurre l'estrazione dei campioni freschi sulla stessa quantità di sostanza secca che è stata precedentemente considerata nel caso dei luppoli secchi. Pertanto, la procedura di estrazione degli antiossidanti dai coni freschi è stata effettuata su 2.17 grammi di macinato, invece che su 0.5 g, come da metodica per il luppolo secco. Così operando, in entrambi i casi, si sono di fatto considerati 0.46 grammi di sostanza secca; i TAA sono stati quantificati inserendo, nella relativa formula di calcolo, sia il peso del campione tal quale (2.17 g per i coni freschi e 0.5 g per i coni secchi) sia il contenuto di sostanza secca (0.46 g per entrambe le tipologie di coni). I dati così ottenuti sono illustrati nella Tabella seguente (Tabella n. 14).

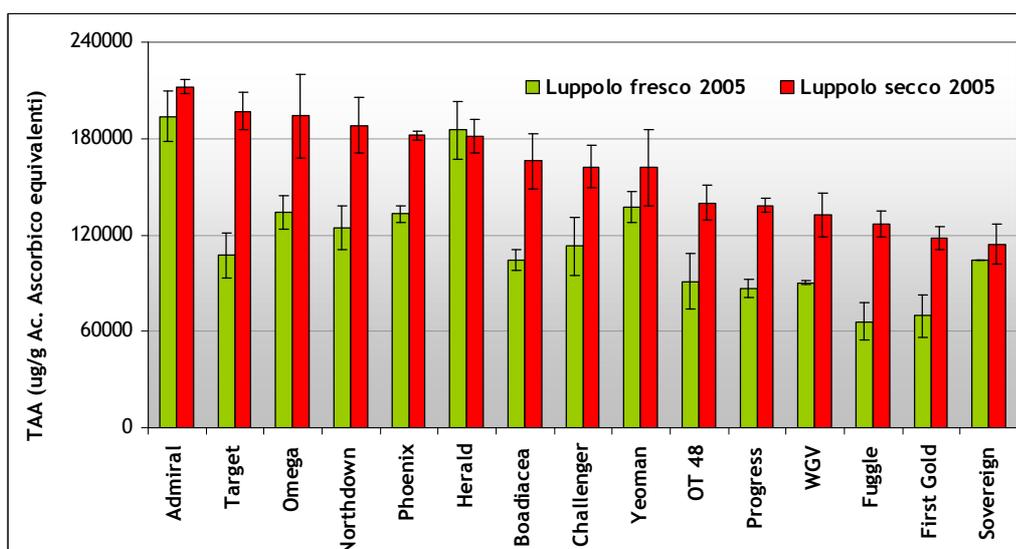
Per tutte le varietà esaminate, la capacità antiossidante del luppolo fresco è risultata inferiore rispetto a quella valutata sugli analoghi campioni sottoposti ad essiccamento. Tale operazione di condizionamento influisce in maniera statisticamente significativa sul potere antiossidante del luppolo (Wilcoxon Signed Rank Test,  $n= 6$ ,  $P<0.001$ ),

aumentandone mediamente il livello del 45%, con incrementi che oscillano, a seconda della varietà, da un +9% (per Admiral e Sovereign essiccati) fino a quasi a raddoppiare nei coni essiccati di Fuggle e Target (incrementi rispettivamente del +92 e +83%).

Varietà	TAA Coni secchi	TAA Coni secchi	TAA Coni freschi	TAA Coni freschi
	( $\mu\text{g}$ Equ. Ac.Asc. / g coni <u>tal quale</u> )	( $\mu\text{g}$ Equ. Ac.Asc. / g <u>sostanza secca</u> )	( $\mu\text{g}$ Equ. Ac.Asc. / g coni <u>tal quale</u> )	( $\mu\text{g}$ Equ. Ac.Asc. / g <u>sostanza secca</u> )
Omega	169.195 $\pm$ 10.850	193.905 $\pm$ 25.931	28.413 $\pm$ 4.335	134.035 $\pm$ 10.499
OT48	127.879 $\pm$ 8.855	139.874 $\pm$ 10.863	19.253 $\pm$ 3.108	90.822 $\pm$ 17.184
Admiral	192.494 $\pm$ 95	212.164 $\pm$ 4.248	41.052 $\pm$ 4.071	193.661 $\pm$ 15.515
Progress	127.957 $\pm$ 2.886	138.400 $\pm$ 4.105	18.394 $\pm$ 8.716	86.773 $\pm$ 5.760
WGV	116.721 $\pm$ 4.994	132.622 $\pm$ 13.561	19.120 $\pm$ 1.480	90.195 $\pm$ 1.234
Fuggle	125.007 $\pm$ 15.124	126.927 $\pm$ 7.731	13.990 $\pm$ 8.736	65.996 $\pm$ 11.510
Northdown	174.146 $\pm$ 17.291	188.074 $\pm$ 17.075	26.354 $\pm$ 1.165	124.323 $\pm$ 13.762
Phoenix	170.757 $\pm$ 6.128	181.913 $\pm$ 2.627	28.165 $\pm$ 5.066	132.863 $\pm$ 5.298
Yeoman	143.964 $\pm$ 14.608	161.850 $\pm$ 23.468	29.124 $\pm$ 9.861	137.389 $\pm$ 9.762
Challenger	138.865 $\pm$ 2.768	162.399 $\pm$ 13.197	23.911 $\pm$ 4.801	112.797 $\pm$ 18.133
Target	179.866 $\pm$ 12.335	196.809 $\pm$ 11.566	32.327 $\pm$ 2.233	107.273 $\pm$ 14.233
Boadiacea	152.824 $\pm$ 16.198	165.935 $\pm$ 17.354	22.740 $\pm$ 163	104.278 $\pm$ 6.501
Sovereign	104.286 $\pm$ 10.374	114.108 $\pm$ 12.506	22.105 $\pm$ 3.216	104.278 $\pm$ 102
First Gold	108.702 $\pm$ 7.020	117.996 $\pm$ 7.596	14.768 $\pm$ 3.656	69.668 $\pm$ 13.087
Herald	164.442 $\pm$ 9.202	181.107 $\pm$ 10.356	39.236 $\pm$ 177	185.093 $\pm$ 18.344

**Tabella 14:** TAA (attività antiossidante totale) di 15 varietà di luppoli, analizzati in forma di coni freschi ed essiccati. I TAA sono stati calcolati con la formula riportata nel precedente capitolo. In questa tabella sono riportati sia i TAA calcolati sulla sostanza secca che sul campione tal quale; entrambi sono espressi in unità equivalenti di acido ascorbico ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ). Tutte le determinazioni sono state effettuate in doppio ed ogni lettura spettrofotometrica è stata ripetuta in triplo per ciascun sub-campione ( $n=6$ ).

L'aumento di TAA registrato nei coni essiccati, rispetto a quelli freschi, non è comunque riconducibile ad un fattore numerico costante, ma varia con la cultivar in esame. Questo è ben evidente nel grafico in Figura n. 41, ottenuto ordinando, in modo decrescente, i TAA, calcolati sulla sostanza secca, in base ai livelli di capacità antiossidante delle cultivar essiccate.



**Fig. 41:** grafico costruito con i dati riportati in tabella n.14, relativamente ai soli TAA (attività antiossidante totale) calcolati sulla sostanza secca. Ogni istogramma rappresenta la media delle capacità antiossidanti, delle varietà sotto indicate, valutate sugli estratti di luppolo fresco (in verde) e secco (in rosso), raccolto nel 2005. Le varietà sono state disposte in ordine decrescente di TAA dei campioni essiccati. La barra di errore rappresenta le deviazioni standard di prove ripetute (n=6). I TAA sono espressi in unità equivalenti di acido ascorbico ( $\mu\text{g/g}$  sostanza secca).

Sarebbe stato necessario isolare e quantificare le singole componenti dei luppoli freschi ed essiccati, per poter trarre delle conclusioni fondate sulle cause che hanno indotto questo fenomeno. A differenza dei molti lavori presenti in letteratura sugli effetti della tostatura del malto d'orzo, sull'essiccamento del luppolo non vi sono studi recenti. Si possono tuttavia elencare una serie di spiegazioni verosimili, di seguito riportate, in attesa di successive conferme sperimentali.

In pratica, il fatto che i TAA del luppolo fresco siano inferiori, rispetto a quelli del secco, può essere ricondotto a:

- Un eccessivo contenuto di acqua, o presenza di acqua in forma tale da non rendere disponibili e/o liberi gli antiossidanti del luppolo, localizzati negli spazi intra- e intercellulari, per l'analisi ABTS.
- Non corretta procedura di preparazione del campione. In questo caso la macinazione con cristalli di azoto solido e la successiva esposizione all'aria dei campioni, se pur breve, potrebbe aver rovinato le componenti antiossidanti influenzando negativamente il risultato.
- Inapplicabilità o non corretto adattamento del metodo ABTS su una matrice di tipo acquoso.

- La procedura di essiccamento potrebbe aver indotto la formazione di sostanze ad azione antiossidante per via diretta (reazioni di sintesi) o indirettamente, per rottura di legami tra strutture chimiche o, per esempio, tramite isomerizzazione di composti endogeni già presenti.

Quest'ultima ipotesi potrebbe sembrare la più veritiera, anche se alcuni autori hanno riscontrato che il processo di condizionamento ed essiccamento del luppolo fresco può condurre alla formazione di composti ad azione pro-ossidante (Van Waesberghe *et al.*, 1994).

## **5.6 MINI SPERIMENTAZIONE SU SCALA DI LABORATORIO: L'INFLUENZA DEL LUPPOLO SUL POTERE ANTIOSSIDANTE DELLA BIRRA.**

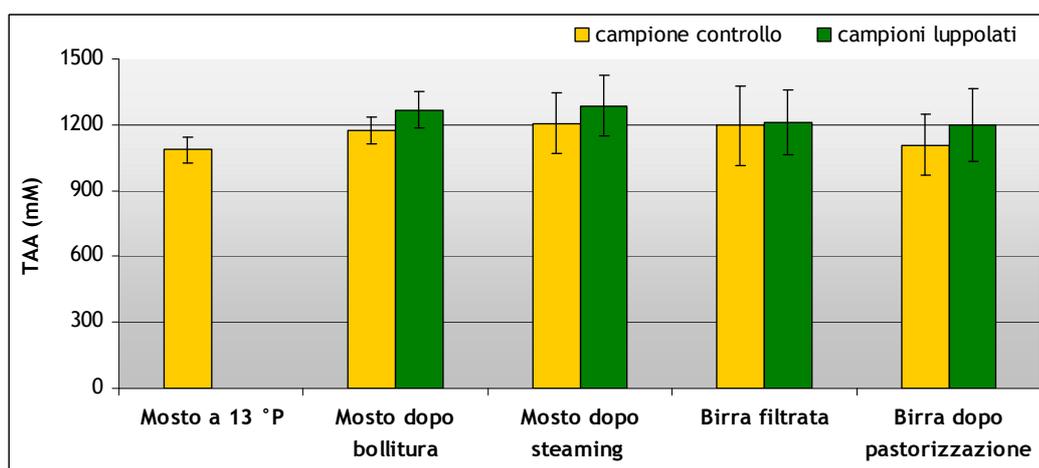
Al fine di valutare l'entità del contributo varietale del luppolo sul potere antiossidante della birra, è stato allestito, su scala di laboratorio, un mini impianto per la fabbricazione della birra, come dettagliatamente descritto nel precedente capitolo. A partire dalla fase di cottura del mosto, sono stati birrificati campioni tra loro differenti per la sola tipologia di luppolo aggiunto ad inizio bollitura. Si ricorda che, in ogni analisi, è stato svolto anche un mosto senza luppolo con la funzione di campione controllo di riferimento. A seconda del potere amaricante delle diverse cultivar, sono state addizionate quantità diverse di luppolo, calcolate per avere un stesso livello di amaro nella birra, pari a circa 20 IBU (si veda capitolo Materiali e Metodi). Oltre alla valutazione del potere antiossidante sulla birra a fine processo, si sono considerate anche le variazioni della capacità antiossidante lungo lo stesso processo produttivo, prelevando altri quattro campioni intermedi nei punti significativi. Il saggio adottato in tutti i casi è stato sempre l'ABTS.

Ogni ciclo produttivo richiedeva circa un mese di tempo (dal mosto alla birra), comprese le analisi spettrofotometriche sui campioni. Sono state testate tutte le 15 varietà di luppoli disponibili, sia del 2004 sia del 2005 (totale 30 campioni). A parte qualche prova ripetuta in doppio per malagevolezze verificatesi in corso d'analisi, quasi tutte le birrificazioni sono state condotte in singolo. Tuttavia, in fase di fermentazione, l'inoculazione è stata effettuata in doppio portando, sino a fine processo, due subcampioni per ogni campione iniziale.

Terminata la fase di raccolta dei dati, si è dapprima considerata la differenza di TAA di ogni campione luppolato con il rispettivo campione controllo, al fine di svincolare tale dato dal contributo della matrice e dell'operazione unitaria a monte del campione in esame.

Non sono state riscontrate differenze significative né tra i contributi alla capacità antiossidante delle singole varietà di luppolo, né tra i campioni derivanti dalle due annate di raccolta (One Way Analysis of Variance,  $n=6$ ,  $P>0.05$ ). Pertanto, accertato che, a parità di quantità-amaricante, le varie tipologie di luppolo non sono distinguibili, sul mosto o sulla birra, dal punto di vista del potere antiossidante, si è provveduto ad indagare se fossero almeno statisticamente percepibili le differenze tra il potere antiossidante dei campioni luppolati e quelli birrificati senza luppolo. Tale analisi è stata condotta considerando la media dei TAA di tutti i campioni luppolati in esame, rispetto al valore medio dei TAA dei campioni controllo.

A tal proposito, nel grafico in figura n. 42, gli istogrammi rappresentano il valore medio dei TAA relativi ai campioni prelevati nelle fasi ivi indicate. Gli istogrammi in giallo sono riferiti ai campioni controllo mentre quelli in verde ai campioni luppolati.



**Fig. 42:** Attività Antiossidante Totale (TAA), espressa come unità equivalenti di acido ascorbico (mM), relativa a campioni di mosto e birra, luppolati e non, prelevati lungo il processo produttivo nei punti indicati sotto gli istogrammi. I valori riportati sono la media dei TAA di 30 campioni tra loro differenti per l'aggiunta delle varie tipologie di luppolo; le barre di errore di ogni istogramma rappresentano le relative deviazioni standard. In ogni prova un campione è stato birrificato senza luppolo (istogrammi in giallo).

Oltre ai TAA, per completezza d'esposizione si riportano, i risultati delle altre determinazioni chimiche effettuate nelle birre così ottenute, relativamente al contenuto d'alcol, pH e grado di amaro. Si precisa che le birre erano Lager, di colore dorato, pochissimo gassate in quanto non è stata effettuata nessuna pratica per incrementare i livelli di CO<sub>2</sub> endogeni. Il contenuto d'alcol, sia nelle birre luppolate che nei controlli, è risultato del  $6.0 \pm 0.5$  % (v/v) ed il pH pari a  $4.5 \pm 0.2$ . Le birre luppolate si sono caratterizzate per un valore medio di unità d'amaro pari a  $26 \pm 4$  IBU, mentre le birre controllo pari a  $1.7 \pm 0.8$  IBU. Rispetto ai 20 IBU desiderati, si sono ottenute birre più

amare per un errore di sovrastima della percentuale di utilizzazione nel calcolo della quantità di luppolo da aggiungere al mosto (per la formula adottata si rimanda al capitolo Materiali e Metodi). Ai fini della nostra indagine tale discrepanza non è comunque rilevante poiché i campioni sono stati trattati in maniera identica e per tutti sono state applicate le medesime formule di calcolo, con una percentuale di utilizzazione pari a 20%.

Dal grafico, si può facilmente notare come le barre di errore vadano sempre più divaricandosi man mano che si passi dal mosto alla birra, rendendo molto imprecise quest'ultime misurazioni. Questo comportamento è dovuto, in parte, a fattori di variabilità non prevedibili e, quindi, non monitorati, con cui si può incorrere lavorando, ad esempio, con lieviti vivi. D'altra parte, tale fenomeno è causato dall'aumento di variabilità intrinseca che si consegue "sdoppiando", in fase di inoculazione, ogni campione in due sub-mosti da fermentare, ciascuno dei quali ulteriormente analizzato alla spettrofotometro in triplo.

Dall'esame visivo del grafico e dei dati grezzi, si coglie un lieve aumento del potere antiossidante lungo il processo produttivo, passando dal mosto, prima della cottura, alla birra filtrata in fase post-fermentazione; dopodiché si registra un leggero decremento con la pastorizzazione e, probabilmente con l'esposizione dei campioni, durante il corso delle ultime analisi, all'aria e alla luce.

In realtà, l'analisi statistica, applicata sui soli campioni controllo, non ha evidenziato differenze significative (Wilcoxon Signed Rank test,  $P > 0.05$ ) tra i TAA dei vari steps (prima e dopo la bollitura del mosto; prima e dopo lo steaming; mosto prima dell'inoculo e birra filtrata a fine fermentazione; prima e dopo la pastorizzazione della birra a 20 PU). Questo può trovare due spiegazioni plausibili: effettivamente il processo non incide, a nessun livello, sulla capacità antiossidante del mosto o della birra non addizionata di luppolo oppure, il metodo ABTS, applicato su un impianto a scala così ridotta, non è adeguato per rivelare le eventuali differenze di TAA tra i campioni. Da quanto noto in letteratura (Moll *et al.*, 1981; Bamforth *et al.*, 1996; Pascoe *et al.*, 2003) e ricordando i limiti analitici del saggio ABTS nella definizione di un valore assoluto di capacità antiossidante, si è propensi ad accettare la seconda ipotesi, consapevoli anche del fatto che l'ampio range di errore registrato nelle misurazioni non consente di avvalorare ulteriormente gli esiti trovati.

Quanto sopra ci induce a sottolineare che il metodo ABTS, unitamente all'allestimento così ridotto dell'impianto birrario su scala di laboratorio (capacità: 0,5 l di mosto prima della cottura), non permette di cogliere, in termini quantitativamente apprezzabili, le variazioni della capacità antiossidante (nessuna differenza tra i TAA dei mosti di riferimento, in tutti i punti di prelievo!). Tuttavia, non si può trascurare l'evidenza sperimentale che, in presenza di luppolo, la bollitura del mosto, causa un aumento significativo (Wilcoxon

Signed Rank test,  $P < 0.001$ ) nell'abilità di radical scavenger dei mosti luppolati rispetto a quelli controllo. Di fatto, a fine cottura, i campioni aggiunti di luppolo hanno mostrato TAA più alti, dei rispettivi campioni non luppolati, di circa l'8%. Un simile comportamento si è accertato anche nelle successive operazioni che prevedevano un trattamento al calore (steaming dei mosti e pastorizzazione della birra). Il colpo di calore (steaming) sui mosti luppolati produce un incremento di TAA di circa il 6,6% rispetto ai campioni controllo, così come la pastorizzazione che influisce positivamente con un +7,8% sull'abilità di radical scavenger delle birre luppolate. Purtroppo, l'ampio range di errore dei TAA, non ha permesso di avvalorare statisticamente le differenze tra i campioni luppolati e non, registrate in queste ultime due fasi (steaming e pastorizzazione), entro un intervallo di confidenza accettabile (90%).

Quanto riscontrato, e sopra esposto, può sembrare un comportamento anomalo se si considera che generalmente le alte temperature riducono, se non annullano, l'attività antiossidante di molti composti, poichè influiscono modificandone e/o separandone i legami chimici. In realtà, diversi studi (Araki *et al.*, 1999; Liegeois *et al.*, 2000) hanno appurato che la bollitura del mosto incrementa i livelli di capacità antiossidante in quanto induce la formazione dei "Prodotti della Reazione di Maillard" (MRP), sia nelle birre Lager che nelle Ales. In particolare, tra i prodotti della reazione di Maillard, le melanoidine hanno ricevuto, negli ultimi decenni, particolare attenzione perché esse sono state individuate come responsabili della spiccata attività antiossidante di alcuni alimenti, nonché della loro abilità chelante nei confronti di alcuni metalli (Wijewickreme e Kitts, 1998; Ames J. M., 2000; Borrelli *et al.*, 2002; Anese e Nicoli, 2003). Inoltre, diversi modelli di studio, in vitro ed in vivo, hanno messo in evidenza gli effetti benefici, derivanti dalle suddette proprietà, sul sistema di difesa dell'organismo umano (Faist e Erbersdobler, 2001; Borrelli *et al.*, 2002). Le melanoidine sono composti colorati, che si formano come intermedi nella reazione di Maillard, che avviene sia durante il maltaggio sia durante la birrificazione. Nella produzione di malti colorati, le alte temperature adottate attivano la reazione di Maillard che conduce alla formazione di colore, aroma e attività antiossidante. Gli MRP del malto, che agiscono come antiossidanti, includono tutte le sostanze che si comportano come riduttori e, ovviamente, le melanoidine prodotte a seguito della tostatura. I componenti che contribuiscono al colore del malto comprendono alcuni MRP a basso peso molecolare, polifenoli ossidati e prodotti derivanti dalla caramellizzazione degli zuccheri (la caramellizzazione degli zuccheri avviene in maniera considerevole solo nei malti scuri e nell'orzo tostato). Woffenden *et al.* (2001) hanno rilevato che lo sviluppo del colore e il potere antiossidante del malto sono strettamente connessi, ossia l'attività antiossidante cresce all'aumentare dell'intensità del colore dei cristalli di malto fino ad un certo punto, oltre il quale l'aumento del colore non ha più effetto o addirittura causa un

decremento dell'attività antiossidante. Nella birra, la maggior parte delle melanoidine derivano dal malto. Mentre è ormai assodata la relazione di causa-effetto tra la capacità antiossidante della birra ed il suo contenuto in polifenoli, principalmente di derivazione dal malto (Lusk *et al.*, 1995; Prucha, 1998; Ghiselli *et al.*, 2000; Lugasi e Hovari, 2003), recentemente, alcuni autori hanno dimostrato che i polifenoli non sono gli unici contribuenti alla capacità antiossidante. Rivero *et al.* (2005) hanno cercato di definire i meccanismi di azione dei polifenoli e delle melanoidine della birra: i primi agiscono cedendo atomi di idrogeno, le seconde chelando i metalli. Altri autori (Pascoe *et al.*, 2003; Chandra, 2002) hanno sottolineato che anche gli MRP del malto svolgono un ruolo importante nel contribuire alla capacità antiossidante nella birra, specialmente in quelle scure.

Considerato quanto appena esposto, nel presente studio, l'aumento significativo del TAA, registrato per i mosti luppolati, rispetto a quelli controllo, a fine cottura, è attribuibile alla formazione di MRP avvenuta a seguito delle alte temperature di bollitura dei mosti. Effettivamente, diversi autori (Prucha, 1998; Araki *et al.*, 1999; Liegeois *et al.*, 2000) hanno già osservato, dopo la bollitura del mosto, un aumento dell'abilità di "radical scavenger" nei confronti dell'ABTS, nella produzione di Lager. Tra le ricerche più recenti, Pascoe *et al.* (2003) hanno confermato, avvalendosi sia del saggio ABTS sia del FRAP, che i livelli di attività antiossidante aumentano dopo la fase di ammortamento e bollitura del mosto, fermentazione, chill-lagering e pastorizzazione della birra. Gli stessi autori hanno stimato che il 45-61% delle variazioni dei livelli di attività antiossidante durante il processo produttivo della birra è dovuto agli acidi: ferulico, vanillico, clorogenico e alle catechine; il contributo degli MRP non è stato quantificato ma ne è stata ribadita l'importanza.

Va comunque sottolineato che la formazione degli MRP giustifica solo in parte il risultato ottenuto nella presente indagine in quanto, i prodotti della reazione di Maillard, nei mosti o nelle birre, derivano quasi esclusivamente dal malto, mentre l'aumento di TAA nei campioni a fine bollitura è stato riscontrato solo nei mosti luppolati, e non nei mosti controllo. Le stesse considerazioni valgono anche per i campioni prelevati negli altri steps in cui è coinvolto calore (steaming e pastorizzazione). Anzi, in queste fasi, attribuire ai soli MRP l'aumento di TAA dei campioni luppolati è ancora più riduttivo, in quanto la quantità minima di zuccheri residui dopo la fermentazione, gli alti livelli di solfiti, nonché le temperature più basse praticate rispetto alla bollitura, possono aver limitato fortemente il tasso di svolgimento della reazione di Maillard (MacLeod, 1977; Ilett, 1995).

E' quindi pertinente supporre che nel mosto vi siano, oltre i polifenoli e gli MRP, dei composti di natura diversa, propri del luppolo, in grado di essere attivi, come antiossidanti, dopo un trattamento al calore. A tal riguardo, si pensi agli isomeri del

luppolo che si originano a seguito della cottura del mosto: iso alfa e beta-acidi, Isoxantoumulone, 8-prenilnaringenina, 6-prenilnaringenina, e così via. Nuove prove sperimentali, su un allestimento simile e su un impianto pilota di dimensioni maggiori, sarebbero auspicabili per dimostrare o meno le supposizioni fatte. Infine, non è da escludere che la presenza del luppolo concorra a far emergere le proprietà antiossidante dei mosti e delle birre per un effetto di sinergia tra i propri composti antiossidanti e quelli derivanti dal malto (polifenoli e MRP); il singolo contributo di quest'ultimi (campioni controllo), non è evidenziabile ricorrendo al saggio ABTS.

Concludendo, quello che si evince dalla presente indagine è che la presenza di luppolo influenza positivamente il livello di attività antiossidante dei campioni quando è coinvolto un trattamento con calore. Restano ancora da definire le modalità con cui questo avviene. La fermentazione dei mosti, luppolati e non, non implica nessun cambiamento a livello di attività antiossidante.

Questi risultati rappresentano una svolta, rispetto a quanto riportato in letteratura, poiché mettono in risalto il ruolo chiave del luppolo nella qualità del mosto e della birra. Infatti, diversi autori (Srogl *et al.*, 1977; Prucha, 1998; Pascoe *et al.*, 2003), avevano sottolineato che l'aggiunta di luppolo non produceva nessun effetto significativo sui livelli di TAA (misurati con saggio ABTS e FRAP) o sui livelli dei composti fenolici. E' comunque doveroso ricordare che il luppolo da loro utilizzato era sotto forma di estratto da CO<sub>2</sub> supercritica, molto povero in polifenoli (Hildebrand, 1979), mentre qui si è adoperato solo luppolo inglese, in forma di coni interi essiccati, provvisti di semi.

## 6. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

### 6.1 IL LUPPOLO

Nell'affrontare lo studio sulla capacità antiossidante del luppolo (*Humulus lupulus* L.), si sono prese in considerazione quindici varietà di luppoli inglesi, allevate con la medesima tecnica, in parcelle dello stesso giardino sperimentale dell'EMR Hop Research (Wye, Kent, United Kingdom).

Per la prima volta si è indagato sulle proprietà antiossidanti di luppoli inglesi, i quali differiscono dalla maggior parte di quelli coltivati nel mondo, per il fatto che le piante sono fertili e quindi, i coni femminili, presentano i semi.

Il saggio scelto per determinazione della capacità antiossidante dei campioni è l'“ABTS” che si basa sulla decolorazione del radicale cationico *2,2'-Azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-acido sulfonico* (ABTS<sup>°+</sup>) in presenza di composti antiossidanti nella matrice in esame. I criteri che hanno determinato la scelta del suddetto metodo sono stati riportati nel capitolo “Risultati e discussione: il luppolo”.

Nella prima fase della ricerca è stato messo a punto il metodo di estrazione per l'analisi dei coni di luppolo, freschi ed essiccati, con saggio ABTS. Il metanolo è risultato essere il miglior solvente estraente nei confronti di agenti “scavenger” del radicale ABTS<sup>+</sup>, da coni interi essiccati.

Tramite un'accurata standardizzazione delle condizioni operative, sia in campo che in laboratorio, è stato possibile ottenere dei valori di “Attività Antiossidante Totale” (TAA) confrontabili, oggettivi e riproducibili. Inoltre, la veloce preparazione dei campioni, con il metodo d'estrazione così messo a punto, unitamente alla semplicità di esecuzione del saggio ABTS, hanno consentito di analizzare, in circa otto ore, anche venti campioni, replicando tre volte, per ognuno, la lettura spettrofotometrica, avvalendoci di attrezzatura di ordinaria dotazione in un laboratorio. La rapidità di analisi è risultata fondamentale per il successo del metodo, poiché i composti antiossidanti, oggetto di studio, sono sostanze facilmente compromettibili.

Nonostante i molteplici accorgimenti seguiti per contenere al minimo tutti i fattori di variabilità, la valutazione quantitativa, in termini assoluti, della capacità antiossidante dei luppoli con saggio ABTS, è risultata poco precisa; tuttavia il saggio ABTS è risultato assolutamente adeguato per fornire una scala relativa di livelli di potere antiossidante tra le cultivars di luppolo.

Una volta messa a punto la metodica di analisi, la seconda parte di questo studio è stata dedicata alla fase applicativa, da cui è emerso quanto segue:

1. Il potere antiossidante del luppolo diminuisce con la sua conservazione e lo stoccaggio a  $-18^{\circ}\text{C}$ , per un anno, non ostacola tale fenomeno, nemmeno su coni essiccati. Tutte le varietà esaminate hanno dato, in questo senso, risposta uniforme.
2. I dati suggeriscono che gli alfa acidi e lo xantoumulone contribuiscono al potere riducente del luppolo, misurato con saggio ABTS. Questa relazione è stata riscontrata sia nelle varietà raccolte a piena maturità, sia nei coni essiccati, collezionati durante il loro sviluppo sulla pianta. Non è da escludere che la via biosintetica dello xantoumulone e degli alfa acidi possa essere la medesima, o per lo meno, possa essere in comune per la maggior parte. Sarebbe necessario condurre ulteriori studi, su varietà a basso contenuto di acidi amari, per quantificare il livello di attività antiossidante, unitamente alla presenza di alcuni metaboliti secondari del luppolo (calconi prenilati, flavanoni, etc.), al fine di poter effettuare dei riscontri incrociati che consentano, o meno, di confermare quanto sopra esposto, su una popolazione di campioni più ampia.
3. Poiché le catechine sono dotate di elevato potere antiossidante ed il profilo delle proantocianidine del luppolo è variabile-dipendente dalle cultivar e dall'origine geografica delle stesse, è stata studiata la distribuzione delle catechine monomere nelle diverse varietà di luppolo. Per la prima volta è stato affrontato, in maniera sistematica, uno studio sui livelli di (+)-catechine monomere di cultivar inglesi, allevate nella stessa area con gli stessi accorgimenti tecnico-agronomici. L'analisi statistica ha confermato che la componente genetica influenza fortemente i livelli di catechine monomere dei luppoli. Questo è stato evidenziato sia nei luppoli essiccati, raccolti a maturità nel 2004 e nel 2005, sia nei coni collezionati in fase di sviluppo sulla pianta.
4. Sono state tracciate le curve di accumulo degli alfa e beta-acidi, dello xantoumulone e delle catechine, in due varietà, durante lo sviluppo dei loro coni. E' stato quindi esaminato l'andamento del relativo potere antiossidante. A prescindere dal valore assoluto dei dati, tutti gli acidi amari e lo xantoumulone, sono già presenti nel luppolo, fin dalle prime fasi di crescita dei coni. In attesa di successive conferme (ulteriori prove su popolazioni più ampie e su varietà diverse), si ritiene di poter suggerire di anticipare i tempi di raccolta di qualche giorno, piuttosto che avanzare eccessivamente con la maturazione, per disporre di luppolo con un'alto potere antiossidante.
5. La capacità antiossidante del luppolo fresco è risultata inferiore rispetto a quella valutata sugli analoghi campioni sottoposti ad essiccamento. La procedura di

essiccamento potrebbe aver indotto la formazione di antiossidanti per via diretta (reazioni di sintesi) o indiretta, per rottura di legami tra strutture chimiche o, per esempio, tramite isomerizzazione di composti endogeni già presenti. Ulteriori studi sono necessari al riguardo per confermare tale ipotesi.

6. L'impianto pilota, allestito su scala di laboratorio, ha consentito di studiare, in prima istanza, l'influenza varietale del luppolo sul potere antiossidante nella birra, lungo il relativo processo di fabbricazione della stessa. Non è stata riscontrata nessun differenza tra le cultivars di luppolo impiegate, in termini di contributo alla capacità antiossidante sul mosto e sulla birra. Probabilmente, il metodo ABTS, unitamente ad un impianto birrario così ridotto, non è adeguato per cogliere, in termini quantitativi apprezzabili, le variazioni della capacità antiossidante del processo produttivo. Tuttavia, dalla presente indagine è emerso che la presenza di luppolo influenza positivamente il livello di attività antiossidante dei mosti, quando è coinvolto un trattamento con calore. Restano ancora da definire le modalità con cui questo avviene; sarebbe necessario condurre queste prove in un vero e proprio impianto pilota. La fermentazione dei mosti, luppolati e non, non implica nessun cambiamento a livello di attività antiossidante.

Poiché, dai risultati del presente lavoro, è emerso che la misurazione del potere antiossidante in una matrice, è fortemente influenzata dal saggio adottato (l'ABTS), si ritiene che la valutazione della capacità antiossidante totale debba essere eseguita ricorrendo a saggi multipli, in grado di generare un "profilo antiossidante" derivante da una reattività verso radicali sia idrofili sia lipofili, tramite meccanismi diretti, di radical quenching e di riduzione radicalica, e indiretti, per complessamento dei metalli. Non è comunque possibile differenziare le varietà sulla base di una sola sostanza marker; per questo scopo dovrebbero essere considerati contemporaneamente più composti.

Nel panorama scientifico attuale, relativo allo studio degli effetti antiossidanti di taluni composti sull'organismo umano, questa tesi si profila come un valido suggerimento per impostare ulteriori indagini sul potere antiossidante del luppolo, quale ingrediente birrario. Inoltre, poiché l'areale di crescita ne caratterizza più o meno fortemente la presenza di alcuni composti e, visti i risultati ottenuti in questa sperimentazione, soprattutto per quanto riguarda l'accumulo delle catechine, si ritiene che i tecnici birrai possano considerare anche l'origine del luppolo, come un ulteriore elemento di supporto nelle scelte di acquisto delle varietà. Se verranno confermate le proprietà antiossidanti in vivo dell'*Humulus lupulus* L., l'auspicio per il futuro è quello di poter discriminare le varietà di luppolo anche in base a questa caratteristica, forti del fatto che la qualità degli alimenti presenti nelle nostre tavole inizia dalla qualità delle colture nei campi.

## 6.2 LE PROSPETTIVE FUTURE

A conclusione del presente lavoro, si riportano di seguito alcuni spunti tematici che, ad oggi, sembrano essere tra i principali ambiti operativi della ricerca nel campo degli antiossidanti. Ciò al fine di evidenziare alcuni possibili settori di interesse, verso cui poter orientare ed applicare le conoscenze emerse da questo lavoro di dottorato, nonché esortare a continuare la ricerca sugli antiossidanti nel mondo birrario.

### 6.2.1 BIODISPONIBILITÀ DEI COMPOSTI ANTIOSSIDANTI: IL RUOLO DEGLI ALIMENTI FUNZIONALI

Le proprietà biologiche dei composti antiossidanti, introdotti con la dieta, dipendono dalla loro biodisponibilità. La struttura chimica ne influenza la velocità ed il grado di assorbimento intestinale, oltre alla natura dei metaboliti presenti nel circolo sanguigno. Molti antiossidanti, per essere assorbiti, devono essere idrolizzati; l'attività idrolitica è operata sia dagli enzimi presenti sulle mucose intestinali e sulle membrane cellulari, sia dalla microflora presente nel colon.

La valutazione della biodisponibilità dei composti antiossidanti è, ad oggi, una delle determinazioni più critiche e laboriose, essenzialmente per la difficoltà di monitorare contemporaneamente tutte le variabili che influenzano i saggi clinici. Di fatto, si sono prodotti negli anni, diversi lavori con esiti discordanti.

A titolo di esempio, si riporta quanto noto in letteratura circa la biodisponibilità dei composti fenolici.

I polifenoli assorbiti, una volta metabolizzati nel fegato, vengono escreti nella bile o direttamente nel lume intestinale dagli enterociti, raggiungendo il colon sotto forma di differenti forme chimiche. Nel colon, la microflora batterica dotata di un alto potenziale idrolitico e catalitico, catalizza la rottura delle molecole dei flavonoidi in molecole più semplici come gli acidi fenolici che vengono assorbiti come tali. È stato ipotizzato che le cellule di tessuti infiammati siano in grado di deconiugare i metaboliti fenolici metilati, solforati e glucuronati, in modo da ottenere composti con il massimo potenziale ossidante. La coniugazione sull'anello catecolico B, come la 3'-metossilazione, sembra diminuire il potenziale effetto tossico dei composti fenolici dovuto alla formazione di composti chinonici.

Questo spiega perché la quercetina ha evidenziato un'azione mutagenica *in vitro* che non è stata riscontrata nella valutazione *in vivo*.

In letteratura è spesso riportato che i flavonoidi presenti negli alimenti non possono essere assorbiti dall'intestino perché sono legati alle molecole di zucchero come glucosidi.

Tuttavia la cinetica dell'assorbimento e la biodisponibilità sono probabilmente regolate dal tipo di glucoside. Infatti, Hollman *et al.* (1997) evidenziarono che la quercetina glucoside, introdotta con la dieta, è assorbita, in percentuali variabili a seconda dello zucchero legante, ed è in grado di provocare conseguentemente un aumento significativo della capacità antiossidante del plasma sanguigno.

Le procianidine oligomere hanno un assorbimento intestinale molto limitato però, nello stomaco, subiscono una rottura, con la conseguente formazione di composti monomeri e dimeri, facilmente assorbibili dall'intestino (Spencer J.P. *et al.*, 2001). Diversi studi confermano che la quercetina (Gugler *et al.*, 1975; Hollmann *et al.*, 1993) e la catechina (Hackett e Griffiths, 1985) sono assorbite nell'uomo; resta non stimata l'entità di tale assorbimento.

In merito all'interazione tra polifenoli e minerali, alcuni autori (Henning *et al.*, 2003; Rodriguez de Sotillo e Hadley, 2002; Gao *et al.*, 2003; Gaetke e Chow, 2003) hanno evidenziato un effetto antinutrizionale, da parte dei polifenoli, poiché limitano l'assorbimento, a livello enterico, di ioni ferro e calcio, mentre sono protettivi nei confronti di ossidazioni mediate da metalli di transizione.

Studi condotti su cavie hanno evidenziato che lo xantoumulone è assorbito a livello del tratto digestivo dei ratti, tuttavia, altre indagini devono ancora essere condotte sulla popolazione umana per valutare la biodisponibilità di Xan in vivo.

Parallelamente agli studi sulla biodisponibilità degli antiossidanti in vivo, negli ultimi anni si è sviluppato un nuovo concetto nutrizionale secondo il quale i prodotti alimentari, oltre che soddisfare le normali aspettative organolettiche e nutrizionali, possono apportare benefici, sulla salute umana, grazie a componenti, endogene o meno all'alimento, particolarmente attive dal punto di vista fisiologico.

Tali alimenti vengono identificati come "*alimenti funzionali*". Spesso tale denominazione viene sostituita con il termine "*nutraceutical*", nato in America dalla fusione di "*nutrition*" e "*farmaceutical*", per evidenziare le potenzialità terapeutiche di questi prodotti.

Attualmente, i prodotti funzionali, leader nel mercato, sono soprattutto quelli fortificati con fibre, acidi grassi omega-3 ed antiossidanti.

I prodotti a base di cereali possono essere considerati gli alimenti ideali da trasformare in *funzionali*, essendo pane, pasta e prodotti da forno, alimenti di consumo quotidiano. Sono già stati fatti molti tentativi di "biofortificazione" di questi cibi, soprattutto per quanto riguarda il contenuto di microelementi, quali vitamine e minerali. Le strategie messe in atto da vari ricercatori hanno riguardato sia l'aggiunta di micronutrienti durante il

processo produttivo, sia la selezione genetica convenzionale e l'ingegneria genetica, al fine di accumulare la sostanza desiderata direttamente in campo. Altri autori hanno sottolineato che, da un punto di vista nutrizionale, è preferibile non rimuovere le componenti bioattive dai cibi piuttosto che isolarle e reincorporarle negli alimenti (Calixto, 1998). Per molti micronutrienti la fortificazione durante il processo produttivo è tecnicamente difficile. Ad esempio il ferro è molto suscettibile all'ossidazione e anche l'uso di ferro incapsulato non limita il fenomeno ossidativo. Più semplice è risultata l'aggiunta negli alimenti di ossido di zinco (Rosado, 2003) e vitamine A e C; queste ultime, tra l'altro agiscono anche favorendo l'assorbimento del ferro a livello intestinale (García-Casal *et al.*, 2003).

Soddisfacenti esiti sono stati ottenuti a livello di ricerca per aggiungere pro-vitamina A nel riso essendo, quest'ultimo, fonte quasi esclusiva di nutrimento per molti paesi la cui popolazione soffre di malattie connesse alla deficienza di vari micronutrienti. Tramite l'ingegneria genetica, sono stati migliorati notevolmente i livelli di carotenoidi nelle varietà Indica, riuscendo a preservarne il quantitativo anche durante la cottura, con una perdita minima solo di alcune xantofille (Datta *et al.*, 2003).

Buoni progressi si sono compiuti per la vitamina E: la "sovra-espressione" dei geni dell'orzo, per l'acido omogentisico per la geranyl-geranyl transferasi del mais, ha portato ad un accumulo sei volte superiore dei tocotrienoli e tocoferoli (Cahoon *et al.*, 2003).

Alla luce di quanto sopra esposto, è palese sottolineare che si assiste ad una duplice realtà, quella della ricerca scientifica e quella del *Food market*, che procedono con tempistiche alquanto diverse. Di fatto, se da un lato si hanno ancora scarse conoscenze circa l'effettiva biodisponibilità e ruolo fisiologico degli antiossidanti nell'organismo umano, d'altra parte è diventato ormai consuetudine quotidiana disporre di alimenti arricchiti e/o funzionali.

Pertanto, a conclusione di quanto detto, si ritiene utile ribadire la necessità di condurre ulteriori ricerche in questo settore, prima della fabbricazione su larga scala di alimenti funzionali.

Discorso a parte spetta per gli antiossidanti utilizzati come integratori alimentari. Anche in questo ambito si è registrato, nell'arco di un decennio, un proliferare di preparati commerciali principalmente a base di vitamine, sali minerali, acidi grassi polinsaturi ed altre sostanze ad azione antiossidante per combattere l'invecchiamento da radicali liberi. Gli integratori sono assunti per introdurre, in modo concentrato, delle sostanze, spesso già contenute nei cibi e/o nel nostro organismo, senza ingerire anche le relative quantità di grassi, colesterolo, carboidrati, etc. Oltre che per via sistemica (per via orale e poi distribuiti in tutto l'organismo), le ultime generazioni di integratori consistono in

formulazioni per uso topico. Senza entrare nel merito di questo argomento che esula dalla presente trattazione, si evidenzia come, anche in questo ambito, la ricerca possa ancora lavorare molto, soprattutto per quanto concerne il grado di sicurezza degli antiossidanti usati come integratori nelle diete. A titolo di esempio si vedano i risultati delle ricerche del Prof. Martyn Smith, ordinario di tossicologia all'Università di Berkeley (University of California), che hanno evidenziato addirittura che alte dosi di assunzione dello xantoumulone e di altri flavonoidi possono produrre effetti contrari a quelli desiderati.

#### **6.2.2. L'IMPIEGO DEGLI ANTIOSSIDANTI DELLE MATERIE PRIME BIRRARIE E BIRRE ARRICCHITE**

Diversi ricercatori hanno condotto gli studi più disparati per cercare di sfruttare le proprietà antiossidanti delle materie prime birrarie: alcune indagini si sono limitate al mondo birrario (birre arricchite), altre hanno riguardato ambiti farmaceutici.

In questo senso i campi di ricerca che si aprono sono molteplici. Un esempio è quello dei tocotrienoli, concentrati soprattutto nell'endosperma e nella crusca delle cariossidi di orzo; il germe contiene essenzialmente  $\alpha$ -tocoferolo ed una quantità significativa di  $\beta$ -tocotrienolo. I tocoli rimangono inalterati durante il maltaggio e la birrificazione e si ritrovano, in alte concentrazioni, nei semi esausti dopo birrificazione (152,9 mg/kg), più dei carboidrati e delle proteine che vengono rimosse. Per sfruttare questa caratteristica, una potenzialità che si offre è quella di recuperare tali scarti di lavorazione per impiegarli come integratori o prodotti alimentari per soggetti che tentano di ridurre i livelli di colesterolo sierico attraverso modificazioni della dieta.

Tuttavia, rispetto alle componenti cerealicole, il luppolo ha attirato, negli ultimi anni, l'attenzione di molti ricercatori, non solo appartenenti al mondo birrario. A titolo di esempio si può menzionare la formulazione di estratti di luppolo arricchiti in 8-prenilnaringenina che sono risultati efficaci nel trattamento dei disturbi legati alla menopausa (Heyerick *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda la birra arricchita, uno dei lavori di maggior rilievo è stato quello condotto nel 2004 dal team di ricerca del Prof. Back (Technical University Munich-Weihenstephan, Institute for brewing technologies). Per incrementare il livello di xantoumulone nella birra, questi autori hanno lavorato con estratti di luppolo arricchiti in Xan, raggiungendo così una concentrazione di Xan pari a 10 mg/l di birra. Questo campo offre numerosi spunti di ricerca, sia in collaborazione con istituti o laboratori medici, sia dal punto di vista tecnologico, poiché la birra così ottenuta sembra dare buone performance di tenuta della schiuma e di stabilità microbica, anche se va monitorata la performance dei lieviti in fermentazione (Pietercelie e Dauchol, 2005). Le ultime ricerche

hanno mostrato che i composti ad alto peso molecolare presenti nei malti tostati sono in grado di formare complessi con lo Xan. Aggiungendo Xan, dissolto negli estratti di malto tostato, è stato possibile ottenere birre con più del 10 mg/l di Xan. Su scala industriale si è riusciti ad ottenere una birra di frumento con circa 1 mg/l di Xan (Wunderlich *et al.*, 2005).

Con questo breve elenco di curiosità e di suggerimenti di studio, si è voluto solamente mettere in evidenza come gli ambiti applicativi della ricerca nel campo degli antiossidanti siano molteplici e richiedano, di fatto, un approccio interdisciplinare tra l'area agronomica, tecnologica, chimica, medica ed economica, per poter offrire risultati rilevanti e spendibili dal punto di vista commerciale.

## 7. BIBLIOGRAFIA

### 7.1 FONTI BIBLIOGRAFICHE CARTACEE

- AA.VV. (1994) The Hop Atlas. The history and geography of the cultivated plants. *Joh Barth & Sohn Publication, Nuremberg, Germany, 237-242.*
- Adom K.K., Liu R.H. (2002) Antioxidant Activity of Grains. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6182-6187.
- Åman P. e Newman C.W. (1986) Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, U.S.A. *J. Cereal Sci.*, 4: 133-141.
- Ames B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, 221: 1256-1264.
- Ames B.N., Shigenaga M.K. (1992) Oxidants are a major contributor to aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 85-96.
- Ames J.M. (2000) Melanoidins as pro- or antioxidants. *Training course: Jean De Clerck Chair IX., Louvain-de-Neure, Belgium.*
- Analytica EBC (1998) Determinazione degli alfa acidi, beta acidi e xantoumulone (xan), capitolo 7.7; Determinazione del contenuto di alcol e di amaro nella birra, capitoli 9.2, 9.4 e 9.8, vol aggiornato nel luglio 2005.
- Anderson J.W., Gustafson N.J. (1988) Hypocholesterolemic effects of oat and bean products. *Am. J. Clin. Nutr.*, 48: 749-753.
- Andreasen M.F., Kroon P.A., Williamson G., Garcia-Conesa M.T. (2001) Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 31:304-314.
- Anese M., Nicoli M.C. (2003) Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* 51 (4): 942-946.
- Arnao M.B., Cano A., Acosta M. (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, 73:239-244.
- Asano K., Kowaka M., Hashimoto N. (1981) Haze index of hop: an attempt to predict the effect of hop polyphenols on colloidal stability of beer. *Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co. Ltd.* 24: 1-6.
- Awika J.M., Rooney L.W., Wu X., Prior R.L., Cisneros-Zevallos L. (2003) Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. and Food Chem.* 51: 6657-6662.
- Bacic A., Stone B.A. (1981) Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 8: 475-495.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S. and Pruess H.G. (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidins extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148: 187-197.
- Bamforth C.W., Hughes P.S., Muller R.E., Walters M.T., Antrobus C.J., Large P.J. (1996) Oxidation in malting and brewing: Assessment, implication and elimination. *Proc. Int. Brew. Tech. Conf.*, 6: 267-276.
- Bastasin P. e Ceresa L. (1991) Industrie Agroalimentari. *Ed. Franco Lucisano, Napoli.*
- Benzie I.F. (2000) Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* 39: 53-61.

- Benzie I.F.F., Strain J.J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* 299:15-27.
- Beretta G., Aldini G., Maffei Facino R., Russell R.M., Krinsky N.I., Yeum K-J. (2006) Total antioxidant performance: A validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Analytical Biochemistry* 354: 290-298.
- Berliner J.A., Heinecke J.W. (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, 20: 770-777.
- Blanco C.A., Rojas A., Caballero P.A., Ronda F., Gomez M., Caballero I. (2006) A better control of beer properties by predicting acidity of hop iso- $\alpha$ -acids. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 373-377.
- Block G., Jensen C., Dietrich M., Norkus E.P., Hudes M., Packer L. (2004). Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: Influence of antioxidant supplementation. *Journal of the American College of Nutrition* 23(2): 141-147.
- Böhm F., Edge R., Lange L., Truscott T.G. (1998b) Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 44: 211-215.
- Böhm, F., Edge, R., McGarvey D.J., Truscott, T.G. (1998a) Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. *FEBS Lett.* 436: 387-389.
- Bonnely S., Peyrat-Maillard M.N., Rondini L., Masy D., Berset C. (2000) Antioxidant activity of malt rootlet extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2785-2792.
- Bonoli M., Marconi E., Caboni M. F.(2004) Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum Vulgare* L.) flours. Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid method by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *J. Chromatogr., A*, 1057:1-12.
- Borrelli R.C., Visconti A., Mennella C., Anese M., Fogliano V. (2002) Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 50 (22): 6527-6533.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30.
- Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56: 317-333.
- Briggs D.E., Hough J.S., Stevens R., Young T.W. (1981) Malting and brewing science. Malt and sweet wort. *Chapman & Hall*, vol. 1.
- Buliga G.S., Brant D.A., Fincher G.B. (1986) The sequence statistics and solution configuration of barley (1-3), (1-4)-beta-D-glucan. *Carbohydr. Res.*, 157:139-156.
- Bunzel M., Ralph J., Martia J.M., Hatfield R.D., Steinhart H. (2001) Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.*, 81(7): 653-660.
- Cahoon E.B., Hall S.E., Ripp K.G., Ganzke T.S., Hitz W.D., Coughlan S.J. (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat. Biotechnol.* 21:1082-1087.
- Calixto S. (1998) Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4303-4306.

- Callemien D., Jerkovic V., Rozenberg R. and Collin S. (2005) Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: optimization of the extraction and quantitative study by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 424-429.
- Cano A., Acosta M., Arnao M. B. (2000) A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5: 635-370.
- Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14: 303-311.
- Casey G.P. *et al.* (1983) High gravity brewing: Influence of pitching rate and wort gravity on early yeast viability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 41: 148-152.
- Cassidy A. (1996) Physiological effects of phytoestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Symp. On Physiologically Active Substances in Plant Foods (Non-Nutrive Nutrient)*; Cambridge University Press: London.
- Castellucio C., Paganga G., Melikian N., Bhaktiar C., Bolwell G.P., Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C.A. (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenyl-propanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters* 368: 188-192.
- Cestaro B. (1994) Per una vita inossidabile. *Etas Libri-RCS Medicina*.
- Chandra S.G. (2002) Antioxidant activity during beer production. Melanoidins in food and health. *European Communities: Brussels, vol. 3: 137-142*.
- Chen Q., Fischer A., Reagan J.D., Yan L.J., Ames B.N. (1995) Oxidative damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 4337-4341.
- Coldham N.G. e Sauer M.J. (2001) Identification, quantification and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement. *Food Chem. Toxicol.*, 39: 1211-1224.
- Collins F.W. (1989) Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *J. Agric. Food Chem.*, 37: 60-66.
- Connor A.M., Luby J.J., Tong C.B.S. (2002) Variability in antioxidant activity in blueberry and correlations among different antioxidant activity assays. *J. of the American Soc. for Horticultural Sci.* 127: 238-244.
- Cook N.C., Samman S. (1996) Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76.
- Cuvelier E. (1997) Molécules antioxydantes relations structure-activité. *Publiée lors des 16èmes Journées Internationales Huiles Essentielles de DIGNE les BAINS*, 201-211.
- Czeczot H. (2000) Biological activities of flavonoids—A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 950(4): 3-13.
- Datta K., Baisakh N., Oliva N., Torrizo L., Abrigo E., Tan J., Rai M., Rehana S., Al-Babili S., Beyer P. *et al.* (2003) Bioengineering 'golden' indica rice cultivars with b-carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems. *Plant Biotechnol J.* 1:81-90.
- Davey M. W., van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N. *et al.* (2000) Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 825-860.
- De Keukeleire D. (2003) Beer, hops, and health benefits. *Scandinavian Brewers's Review*, 60 (2): 10-17.

- De Keukeleire D., Milligan S.R., De Cooman L., Heyerick A. (1997) The oestrogenic activity of hops (*Humulus lupulus* L.) revisited. *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 7: 83-86.
- De Keukeleire J., Ooms G., Heyerick A., Roldan-Ruiz I., Van Bockstaele E., De Keukeleire D. (2003) Formation and accumulation of  $\alpha$ -acids,  $\beta$ -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4436-4441.
- De Stefano A. e Montanari L. (1996) Minor components of beer: a review. *Alcologia*, 8 (1): 43-45.
- Decker E. A., Warner K., Richards M., Shahidi F. (2005) Measuring antioxidant effectiveness in food. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4303-4310.
- Del Pozo-Insfran D., Brenes C.H., Serna Saldivar S.O., Talcott T.T. (2006) Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research International*, 39: 696-703.
- Devreux A. (1986) Il valore alimentare della birra. *Birra e Malto*, 29: 4-21.
- Duh P.-D., Yen G.-C., Yen W.-J., Chang L.-W. (2001) Antioxidant Effects of Water Extracts from Barley (*Hordeum vulgare* L.) Prepared under Different Roasting Temperatures. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1455-1463.
- Edney M.J., Marchylo B.A., MacGregor A.W. (1991) Structure of total barley  $\beta$ -glucan. *J. Inst. Brew.* 97: 39-44.
- Emmons C.L., Peterson D. M. (1999) Antioxidant activity and phenolic content of oat groats and hulls. *Cereal Chem.*, 76: 902-906.
- Erdal K., Outtrup H., Ahrenst-Larsen B. (1985) Barley and hop proanthocyanidins and the colloidal stability of beer. In *Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress, Oxford press*, 459-466.
- Escarpa A., Gonzales M.C. (2001) An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical reviews in Analytical Chemistry*, 31: 57-139.
- European Brewery Convention (1997) Hops and Hop Products, Manual of Good Practice. *Hans Carl Verlag, Nürnberg*.
- Faist V., Erbersdobler H.F. (2001) Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Ann. Nutr. Metab.* 45:1-12.
- Fine A.M. (2000) Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern. Med. Rev.*, 5: 144-151.
- Forster A., Beck B., Schmidt R., Jansen C., Mellenthin A. (2002) The composition of low-molecular polyphenols in different hop varieties and two different hop growing regions. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 55 (5/6): 98-108.
- Forster A., Simon K., Schmidt R., Kaltner D. (2001) What is it about antioxidant characteristics of hops? 28<sup>th</sup> EBC-Congress, Budapest.
- Frankel E.N., Kanner J., German J.B., Parks E., e Kinsella J.E. (1993) Inhibition of oxidation of human low density lipoproteins by phenolic substances in red wine. *Lancet* 43: 454-457.
- Gaetke L.M., Chow C.K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189: 147-163.
- Gao Z., Xu H., Chen X., Chen H. (2003) Antioxidant status and mineral contents in tissue of rutin and baicalin fed rats. *Life Sciences*, 73: 1599-1607.

- Garcia-Casal M.N., Layrisse M, Peña-Rosas J.P., Ramírez J., Leets I., Matus P. (2003) Iron absorption from elemental iron-fortified corn flakes in humans. Role of vitamins A and C1-3. *Nutr. Res.* 23:451-463.
- Garoglio P.G. (1981) Nuova Enologia. *AEB Editrice, Brescia*.
- Geletii Y.V., Balavoine G.G.A., Efimov O.N., Kulikova V.S. (2002) The Determination of Total Concentration and Activity of Antioxidants in Foodstuffs. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 28 (6): 501-514.
- Gerhauser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H.-R., Frank N., Bartsch H., Becker H. (2002) Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.*, 1: 959-969.
- Geyer S. (2006) Extraction with supercritical CO<sub>2</sub>-state of the art and outlook. Innovations in food technology. Hop Science Newsletter, 30 febbraio 2006.
- Ghiselli A., Natella F., Guidi A, Montanari L., Fantozzi P., Scaccini C. (2000) Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 11: 76-80.
- Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., Ferro-Luzzi A. (1995) A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.*, 18: 29-36.
- Gil M.I., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Kader A.A. (2002) Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J. of Agric. and Food Chem.* 50: 4976-4982.
- Gliszczynska-Swiglo A. (2006) Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*, 96: 131-136.
- Goupy P., Hugues M., Boivin P., Amiot M.J. (1999) Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1625-1634.
- Guo C., Yang J., Wei J., Li Y., Xu J., Jiang Y. (2003) Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr. Research* 23: 1719-1726.
- Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfield P.W., Riechel T.L. (1998) High molecular weight plant polyphenolic tannins as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 46:1887-1892.
- Halliwel B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 16: 33-50.
- Halliwel B., Gutteridge J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
- Harborne J.B. (1989) Plant phenolics in Methods in plant biochemistry. *Academic Press Harcourt Brace Jovanovich, vol. 1, XII, London*.
- Hashimoto N. (1972) Oxidation of higher alcohols by melanoidins in beer. *J. Inst. Brew.* 78: 43-51.
- Haslam E. (1998) Practical Polyphenolics. *Cambridge University, Press: Cambridge U.K.*
- Havsteen B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96: 67-202.
- Heim K., Tagliaferro A.R. e Bobilya D.J. (2002) Flavonoid antioxidant: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 572-584.

- Henning S.M., Ingles S., Mahmoud M., Go V.L.W., Caulfield M., Nelson J.C., Heber D. (2003) Multivitamin and mineral supplement did not alter the antioxidant capacity in plasma of healthy young men and women. *Nutrition research*, 20: 167-176.
- Hernanz D., Nunez V., Sancho A.I., Faulds C.B., Williamson G., Bartolome´ B., Gomez-Cordoves C. (2001) Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *J. Agric. Food Chem.*, 49:, 4884-4888.
- Heyerick A., Vervarcke S., et al. (2005) A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of standardized hop extract to alleviate menopausal discomfort. *Maturitas*, Nov 28.
- Hidalgo A., Brandolini A., Pompei C., Piscozzi R. (2006) Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *J. of Cereal Science* 44:182-193.
- Hildebrand R.P. (1979) Manufactured products from hops and their use in brewing. In: *Brewing Science*. J.R.A. Pollok, Ed. Academic Press, London, vol. 1, 325-450.
- Hollman P.C.H., Hertog M.G.L., Katan M.B. (1996) Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry* 57(1): 43-46.
- Hollman P.C.H., van Trijp J.M.P., Mengelers M.J.B., de Vries J.H.M., Katan M.B. (1997) Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Letters*, 114: 139-140.
- Home S., Stenholm K., Wilhelmson A., Autio K. (1999) Properties of Starch and Cell Wall Components and their Effects on Processing. *Proceeding of the 9<sup>th</sup> Australian Barley Technical Symposium*.
- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., Deemer E. (2002) Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1815-1821.
- Ilett D.R. (1995) Aspects of the analysis, role, and fate of sulphur dioxide in beer-A review. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 32:213-221.
- Ioku K., Tsushida T., Takei Y., Nakatani N., Terao J. (1995) Antioxidant activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1234: 99-104.
- Ishige K., Schubert D., Sagara Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidant stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biol. Med.*, 30: 433-446.
- JeanDET P., Bessis R., Shaghi M., Meunier P. (1995) Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to botrytis attack under natural conditions. *J. Phytopathol.*, 143: 135-139.
- Jimenez-Escrig A., Rincon M., Pulido R., Saura-Calixto F. (2001) Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. and Food Chem.* 49: 5489-5493.
- Kammhuber K., Zeidler C., Seigner E., Engelhard B. (1998) Research status on the hop component xanthohumol. *Lecture held at the General Meeting of the German Society for Hop Research (DGfH), Aschheim*.
- Kitaoka M., Kadokawa H., Sugano M., Ichikawa K., Taki M., Takaishi S., Iijima Y., Tsutsumi S., Boriboon M., Akiyama T. (1998) Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogens (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med.*, 64: 511-515.
- Kovačević M., Kač M. (2002) Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. *Food Chemistry* 77: 489 -494.

- Kuntz S., Wenzel U., Daniel H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* 38(3):133-142.
- Lampi A.-M., Kamal-Eldin A., Piironen V. (2002) Tocopherols and tocotrienols from oil and cereal grains. In: J. Shi, G. Mazza, M. LeMaguer, (Eds.) *Functional food—Biochemical and processing aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- Langcake P. e Pryce R.J. (1976) The production of resveratrol by *vitis vinifera* and other members of the vitacea as a reponse to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, 9:77-86.
- Leong L.P., Shui G. (2002) An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry* 76: 69-75.
- Lermusieau G., Liegeois C., Collin S. (2001) Reducing power of hop cultivars and beer ageing. *Food Chem.* 72: 413-418.
- Li H., Deinzer M.L. (2006) Structural identification and distribution of proanthocyanidins in 13 different hops. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 4048-4056.
- Liegeois C., Lermusieau G., Collin S. (2000) Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2'2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride- induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1129-1134.
- Lloyd B.J., Siebenmorgen T.J., Beers K.W. (2000) Effect of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chem.*, 77: 551-555.
- Lotito S.B., Actis-Goretta L., Renart M.L., Caligiuri M., Rein D., Schmitz H.H., Steinber F.M., Keen C.L., Fraga C.G. (2000) Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276: 945-951.
- Lotti (1985) *Principi di chimica e biochimica vegetale*. ETS Editrice, Pisa.
- Lu F.J., Hsu C.T. (1996) Studies on the Free Radical Scavenging Activity of Fermented Barley. *Food Sci.*, 23: 10-19.
- Lugasi A., Hovari J. (2003) Antioxidant properties of commercial alcoholic and alcoholic-free beverages. *Food* . 47 (2): 79-86.
- Lusk L.T., Goldstein H., Ryder D. (1995) Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 53: 93-103.
- MacGregor A.W., Fincher G.B. (1993) Carbohydrates of the barley grain, In: Barley: chemistry and technology. MacGregor A.W., Bhatti R.S., eds. *Am. Assoc. Cereal Chem.*, St. Paul, MN, 73-130.
- MacLeod A.M. (1977) The impact of science on malting technology. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 16:63-76.
- Maillard M N., Berset C. (1995) Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.*, 43:1789-1793.
- Mayer D.H., Bernhardt J., Heinrich F., Biesalski H.K. (2001) *European Journal of Medical Research*, 6: 1-8.
- Mayne S.T. (1996) Beta-carotenoids, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.* 10: 690-701.
- McMurrough I., Madigan D. (1996) Semipreparative chromatographic procedures for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1731-1735.

- Merken H.M., Beecher G.R., (2000) Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem*, 48, 3: 577-599.
- Miller D. (1994) Hop Utilization, Keg Carbonation, and Diacetyl Rests in Lager Fermentations. *Brewing Techniques, January/February*.
- Miller H.E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M. (2000) Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition* 19:312S-319S.
- Miller N.J., Diplock A.T., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84: 407-412.
- Miller N.J., Diplock A.T., Rice-Evans C.A. (1995) Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1794-1801.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A. (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTSd+ radical cation assay. *Free Radical Research* 26: 195-199.
- Milligan S.R., Kalita J., Heyerick A., Rong H., De Cooman L., De Keukeleire D. (1999) Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83: 2249-2252.
- Milligan S.R., Kalita J., Pocock V., Heyerick A., De Cooman L., Rong H., De Keukeleire D. (2002) Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*, 123: 235-242.
- Milligan S.R., Kalita J., Pocock V., Van De Kauter V., Rong H., De Keukeleire D., Stevens J.F., Deinzer M. (2000) The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85: 4916-4920.
- Milner C. e Hughes R.E. (1968) Methods for the measurements of primary production of grassland. *IBP Handbook n. 6 Blackwell Sci. Pubb., Oxford*.
- Miranda C.L., Stevens J.F., Helmrich A., Henderson M.C., Rodriguez R.J., Yang Y-H., Deinzer M.L., Barnes D.W., Buhler D.R. (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human cancer cell lines. *Food Chem. Tox.*, 37: 271-285.
- Miranda C.L., Stevens J.F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M.L., Buhler D.R. (2000b) Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3876-3884.
- Miranda C.L., Yang Y.H., Henderson M.C., Stevens J.F., Santana-Rios G., Deinzer M.L., Buhler D.R. (2000a) Prenyated flavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metab. Dispos.*, 28: 1297-1302.
- Mitscher L.A., Young M., Shankel D., Dou j.H., Steele L., Pillai S.P. (1997) Chemoprotection: A review of the Potential Therapeutic Antioxidant Properties of Green Tea (*Camelia sinensis*) and Certain its Constituents. *Med. Res. Rev.*, 17: 327-365.
- Mizobuchi S., Sato Y. (1984) A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 2771-2775.
- Mizobuchi S., Sato Y. (1985) Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agric. Biol. Chem.*, 49: 399-403.
- Moir M. (2000) Hops - A millennium review. *J. Am. Soc. Brew.Chem.*, 58 (4): 131-146.

- Moll M., Flayeux R., Muller P. (1981) Relationship between beer flavour and the composition of barley and malt. *MBAA Tech.Q.* 18: 31-35.
- Moll M., Fonknechten G., Carnielo M., Flayeux R. (1984) Changes in polyphenols from raw materials to finished beer. *MBAA Tech.Q.* 21: 79-87.
- Mortensen A., Skibsted L.H., Truscott T.G. (2001) The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species. *Arch. Biochem. Biophys.* 385:13-19.
- Naczka M., Shahidi F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, 1054: 95-111.
- Nardini M., Ghiselli A. (2004) Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*, 84: 137-143.
- Neve R.A. (1991) Hops. *Chapman and Hall, London*, 43-45, 219-226.
- Neve R.A., Darby P. (1983) Wye College Annual Report of Hop Research, pag. 39.
- Newman R.K., McGuire C.F. (1985) Nutritional quality of barley, In: Barley. *Rasmusson D.C., ed. American Society of Agronomy, Medison, WI*, 403-456.
- Newman R.K., Newman C.W. (1991) Barley as food grain. *Cereal Food World* 36, 9: 800-805.
- Nicoli M.C., Anese M., Parpinel M. (1999) Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.*, 10: 94-100.
- Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H., Gotoh N. (1995) Interaction among vitamin C., vitamin E., and beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1322S-1326S.
- Nikolic D., Yongmei L., Chadwick L. R., Grubjesic S., Schwab P., Metz P., van Breemen R.B. (2004) Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 32 (2): 272-279.
- Noruma T., Kikuchi M., Kawakami Y. (1997) Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42: 361-370.
- Okada Y., Yamazaki Y., Su D.-Y., Sankawa U., Ito K. (2001) Bifunctional activities of valerophenone synthase in hop (*Humulus lupulus* L.). *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 59: 163-166.
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. and Food Chem.* 49: 4619-4626.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. and Food Chem.* 50: 3122-3128.
- Ozgen M., Reese R.N., Tulio A.Z.Jr., Scheerens J.C., Miller R.A. (2006) Modified 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1151-1157.
- Packer L. (1995) Nutrition and biochemistry of the lipophilic antioxidants; vitamin E and carotenoids. In *Nutrition, Lipids, Health, and Disease*; Ong A. S. H., Niki E., Packer L., Eds.; American Oil Chemists' Society: Champaign IL, 8-35.

- Packer L., Rimbach G., Virgili F. (1999) Antioxidant activity and biological properties of a procyanidin- rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biol. Med.*, 27: 704-724.
- Palozza P. (1998) Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutr. Rev.*, 56: 257-265.
- Panfili G., Fratianni A., Irano M. (2003) Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3940-3944.
- Papetti A., Daglia M., Aceti C., Quaglia M., Gregotti C., Gazzani G. (2006) Isolation of an in Vitro and ex Vivo Antiradical Melanoidin from Roasted Barley. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 1209-1216.
- Pascoe H.M., Ames J.M., Chandra S. (2003) Critical stages of the brewing process for changes in antioxidant activity and levels of phenolic compounds in Ale. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 61 (4):203-209.
- Pepper M.S., Hazel S.J., Humpel M., Schleuning W.-D. (2004) 8-Prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J. of Cellular Physiology*, 199: 98-107.
- Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F. (2006) Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39: 791-800.
- Peterson D.M. (2001) Oat Antioxidants. *J. of Cereal Science*, 33: 115-129.
- Peterson D.M., Hahn M.J., Emmons C.L. (2002) Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro. *Food Chem.*, 79: 473-478.
- Petrini A., Piccinini M., Fuselli D., Antonelli M., Valoti P., Angeletti G. (2005) Granturco. *Pubblicazione realizzata e distribuita a cura del Centro Ricerche e Sperimentazione per il Miglioramento Vegetale "N. Strampelli" (Cermis) di Tolentino, Macerata.*
- Pietercelie A., Dauchol C. (2005) Investigation into the effects of hop compounds on yeast behaviour with a new micro-scale fermentation method. *Proceeding of the 30<sup>th</sup> EBC Congress*, 41, Prague.
- Pischetsrieder M., Rinaldi F., Gross U., Severin T. (1998) Assessment of the antioxidative and pro-oxidative activities of two amino-reductones formed during the Maillard reaction: Effects on the oxidation of  $\beta$ -carotene, NR-acetylhistidine and cis-alkenes. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2945-2950.
- Plumb G., De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Cheynier V., Williamson G. (1998) Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Res.*, 29: 351-358.
- Prior R.L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R. (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. and Food Chem.* 51: 3273-3279.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10): 4290-4302.
- Prucha P. (1998) The study on the total antioxidant capacity of beers. *Proc. Aviemore Conf. Curr. Dev. Malting Brew. Distill.*, 5: 351-355.
- Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3396-3402.

- Ragaee S., Abdel-Aal E.-S., Noaman M. (2006) Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*, 98: 32-38.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*, 26: 1231-1237.
- Recommended Methods of Hop Analysis (1964) *J. Inst. Brew.*, 70:156.
- Renaud S.C., Gueguen R., Schenker J., d'Houtaud A. (1998) Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* 9: 184-188.
- Rice-Evans C., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.* 22: 375-383.
- Rice-Evans C., Sampson J., Bramley P. M., Holloway D.E. (1997) Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo. *Free Radical Research* 26: 381-398.
- Rivero D., Perez-Magarino S., Gonzales-Sanjose L., Valls-Belles V., Codoner P., Muniz P. (2005) Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 3637-3642.
- Robards K. e Antolovich M. (1997) Analytical chemistry of fruits bioflavonoids A review. *Analyst* 122: 11R-34R.
- Rodriguez de Sotillo D.V. e Hadley M. (2002) Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentration of: cholesterol, triacylglycerol and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 717-726.
- Rong H., Boterberg T., Maubach J., Depypere H., Van Slambrouck S., Serreyn R., De Keukeleire D., Mareel M., Bracke M. (2001) 8-Prenylnaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 80: 580-585.
- Rosado J.L. (2003) Zinc and copper: proposed fortification levels and recommended zinc compounds. *Journal of Nutrition* 133:2985S-2989S.
- Salah N., Miller N.J., Paganga G.G., Tijburg L., Rice-Evans C.A. (1995) Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 322: 339-346.
- Sanbongi C., Suzuki N., Sakane T. (1997) Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell. Immunol.*, 177: 129-136.
- Shahidi F., Naczki M. (1995) Food Phenolics, sources chemistry effects applications. *Technomic Publishing Company, USA*, 109-114, 171-191, 235-273, 281-313.
- Shrestha AK., Arcot J., Paterson J.L. (2003) Edible coating materials –their properties and use in the fortification of rice with folic acid. *Food Res. Int.*, 36: 921-928.
- Siebert K.J. (1999) Effects of protein-polyphenol interaction on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47: 353-362.
- Sies H., Stahl W. (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1315S - 1321S.
- Sosulski F., Krygier K., Hogge L. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 337-340.

- Srogl J., Kosar K., Mikyska A., Bousura P. (1977) Changes occurring in polyphenol substances content during wort production. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 26: 275-282.
- Stahl W., Sies H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24: 345-351.
- Stahl W., Sies H. (2001) Protection against solar radiation-protective properties of antioxidants. In: *Giacomoni, P.U. (Ed.), Sun Protection in Man. Elsevier Science BV*, 561-572.
- Stampfer M.J., Rimm, E.B. (1995) Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 62: 1365-1369.
- Stevens J.F. e Page J.E. (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. *Phytochemistry*, 65: 1317-1330.
- Stevens J.F., Miranda C.L., Buhler D.R. (1998) Chemistry and biology of hop flavonoids. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 56 (4): 136-145.
- Stevens J.F., Miranda C.L., Frei B., Buhler D.R. (2003) Inhibition of peroxynitrite-mediate LDL oxidation by prenylated flavonoids: the alpha, beta-unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. *Chem. Res. Toxicol.*, 16: 1277-1286.
- Stevens J.F., Miranda C.L., Wolthers K.R., Schimerlik M., Deinzer M.L. e Buhler D.R. (2002) Identification and in vitro biological activities of hop proanthocyanidins: inhibition of nNOS activity and scavenging of reactive nitrogen species. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3435-3443.
- Stevens J.F., Taylor A.W., Deinzer M.L. (1999) Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatography*, 832 (1/2): 97-107.
- Stocker R. (1999) Dietary and pharmacological antioxidants in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 10: 589-597.
- Sunier J. (1988) La fabbricazione del Malto e della Birra. *Ed. Italiana, Roma*.
- Tabata N., Ito M., Tomoda H., Omura S. (1997) Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 28: 1776-1777.
- Tageshira M., Watanabe M., Uemitsu N. (1995) *Biosci Biotech. Biochem.*, 59 (4): 740-742.
- Taylor A.W., Barofsky E., Kennedy J.A., Deinzer M.L. (2003) Hop (*Humulus lupulus* L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4101-4110.
- Temple N.J. (2000) Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research* 20: 449-459.
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Hawkins Byrne D. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. of Food Composition and Analysis* 19: 669-675.
- Theriault A., Chao J.T., Wang Q., Gapor A., Adeli K. (1999) Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clinical Biochemistry* 32: 309-319.
- Tobe H., Muraki Y., Kitamura K., Komiyama O., Sato Y., Sugioka T., et al. (1997) Bone resorption inhibitors from hop extract. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61: 158-159.
- Truscott T.G. (1990) The photophysics and photochemistry of the carotenoids. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 6: 359-371.

- Van den Berg R., Haenen G. R. M. M., Van den Berg H., Bast A. (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for the evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.*, 66: 511-517.
- Van Waesberghe J. (1996) *MBAA Technical Quarterly Volume 33 (2): 96-101.*
- Van Waesberghe J., Van Waesberghe W., Snelting H. (1994) Pro- and antioxidants in extracts of herb leaves and hop product. *Monogr. Eur. Brew. Conv.* 22:276-280.
- Varnam A.H. e Sutherland J.P. (1994) *Alcoholic Beverages: 1. Beer. Beverages. Technology, chemistry and microbiology, vol. 2, Chapman & Hall.*
- Vaughan A. e Martini A. (1998) *Saccharomyces Meyen ex Reess. In De Yeasts, A Taxonomy Study, C.P. Kurtzman e J.W. Fell, Elsevier, IV<sup>e</sup> ed., 358-373.*
- Verzele M., De Keukeleire D. (1991) *Chemistry and analysis of hops and beer bitter acids. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 223-309.*
- Vinson J.A., Mandarano M., Hirst M., Trevithick J.R., Bose P. (2003) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *J. Agric. Food. Chem.*, 51: 5528-5533.
- Vis R.B., Lorenz K. (1997) Beta-glucans: importance in brewing and methods of analysis. *Lebens.-Wiss. U. -Technol.*, 30: 331-337.
- Vis R.B., Lorenz K. (1998) Malting and Brewing with a high beta-glucan barley. *Lebens.-Wiss. U. - Technol.*, 31: 20-26.
- Wegmüller R., Zimmermann M.B., Hurrell R.F. (2003) Dual fortification of salt with iodine and encapsulated iron compounds: stability and acceptability testing in Morocco and Cote d'Ivoire. *Journal of Food Science* 68:2129-2135.
- Wijewickreme A.N., Kitts D. (1998) Metal chelating and antioxidant activity of model Maillard reaction products. *Adv. Exp. Med. Biol.* 434: 245-254.
- Wiseman H., Halliwell B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progressive to cancer. *Biochem. J.*, 313: 17-29.
- Woffenden H.M., Ames J.M., Chandra S. (2001) Relationships between antioxidant activity, color, and flavor compounds of crystal malt extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 5524-5530.
- Woffenden H.M., Ames J.M., Chandra S., Anese M., Nicoli C. (2002) Effect of Kilning on the Antioxidant and Pro-oxidant Activities of Pale Malts. *J. Agric. Food Chem.*, 50:4925-4933.
- Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G.A. (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 1173-1183.
- Wu X., Gu L., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S.E., Beecher G., Prior R.L. (2004) Factors in the development of a database of food total antioxidant capacity using lipophilic and hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL): a preliminary study of 28 foods. *J. Food Compos. Anal.*, 17: 407-422.
- Wunderlich S. et al. (2005) Enrichment of xanthohumulon in the brewing process. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49/9: 847-881.
- Yamamoto K., Wang J., Yamamoto S., Tobe H. (2000) Suppression of cyclooxygenase-2 gene transcription by humulone of beer hop extract studied with reference to glucocorticoid. *FEBS Lett.*, 465: 103-106.

- Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H. (1997) Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 45:30-34.
- Yoshida Y., Niki E., Noguchi N. (2003) Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids* 123: 63-75.
- Young A.J., Lowe G.M. (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 20-27.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., (2002b). Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. *Food Chemistry*, 78: 457-461.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M. (2002) Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1619-1624.
- Yu L., Perret J., Harris M., Wilson J., Haley S. (2003) Antioxidant properties of bran extracts from Akron wheat grown at different locations. *J. Agric. Food Chem.*, 51:1566-1570.
- Zasio G., Cardone C. e Maturano G. (1997) Sapere di birra. Storia, produzione, qualità, legislazione e spillatura. Ed. Birra Peroni, Roma.
- Zdunczyk Z., Flis M., Zielinski H., Wroblewska M., Antoszkiewicz Z., Juszkiewicz J. (2006) In vitro antioxidant activities of barley, husked oat, naked oat, triticale, and buckwheat wastes and their influence on the growth and biomarkers of antioxidant status in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 4168-4175.
- Zhou K., Yu L. (2004) Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, 37: 717-721.
- Zhu Q.Y., Huang Y., Chen Z.-Y. (2000) Interaction between flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol in human low density lipoprotein. *Journal of Nutritional Biochemistry* 11: 14-21.
- Zienlinski H. e Kozłowska H. (2000) Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1118-1123.
- Zierau O., Gester S., Schwab P., Metz P., Kolba S., Wulf M., Vollmer G. (2002) Estrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl) naringenin and 8- prenylnaringenin. *Planta Med.*, 68: 449-451.
- Zile M.H. (1998) Vitamin A and embryonic development: an overview. *The Journal of Nutrition* 128: 455S-458S.
- Zuurbier K., Fung S.-Y, Scheffer J.J.C., Verpoorte R. (1998) In vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 49: 2315-2322.

## 7.2 FONTI BIBLIOGRAFICHE ELETTRONICHE

- Barth-Haas Group (2006)  
<http://www.BarthHassGroup.com>
- Beer and Health symposium (2006)  
<http://www.brewersofeurope.org>
- Botanix (2006)  
<http://www.botanix.co.uk/>

Brewing techniques (2005)

<http://www.brewingtechniques.com/library/backissues/issue2.1/miller.html>

Just Hops (2006)

<http://www.justhops.com/descriptions.htm>

HRI HortiTechTM (2006)

<http://www.aplus-hops.co.uk/index.htm>

Hops from England (2006)

<http://www.hopsfromengland.com/Varieties.htm>

Newsletter of Camra (Campaigning for Real Ale, Pubs and Drinkers' rights since 1971)(2006)

<http://www.leeds-camra.com/Newsletter/04.shtml>

Hops from England (2006)

<http://www.hopsfromengland.com/Varieties.htm>