

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN

TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

“ASPETTI GENERALI DELLA BIRRA E RUOLO DEGLI ENZIMI IDROLITICI NEL
PROCESSO DI BIRRIFICAZIONE”

Tesi in

82296 - ENZIMI NELLE TECNOLOGIE ALIMENTARI

Relatore:

Prof. Romana Fato

Candidato: Gianmaria Fabbri

Matricola N° 839773

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE STORICA	1
1.1 LA SCOPERTA DELL'ALCOL	1
1.2 I SUMERI	2
1.3 GLI EGIZI	3
1.4 I BABILONESI	4
1.5 I GRECI	5
1.6 GLI ETRUSCHI	5
1.7 I ROMANI	6
1.8 I CELTI	6
1.9 IL MEDIOEVO E I MONASTERI	7
1.10 LA RIVOLUZIONE INDUSTRIALE	9
1.11 LE MICROBIRRERIE	10
1.12 LA BIRRA OGGI: PRODUZIONE E CONSUMI	11
2. LE MATERIE PRIME	13
2.1 DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE	13
2.2 LE MATERIE PRIME	14
2.3 L'ACQUA	15
2.4 I CEREALI	22
2.5 IL LUPPOLO	25
2.6 IL LIEVITO	30
3. GLI ENZIMI	33
3.1 NOMENCLATURA E CLASSIFICAZIONE	34
3.2 CARATTERISTICHE PRINCIPALI	37
3.3 CINETICA ENZIMATICA	40
3.4 ENZIMI IDROLITICI COINVOLTI NEL PROCESSO DI BIRRIFICAZIONE: AMILASI E PROTEASI	60

4. PROCESSO PRODUTTIVO	64
4.1 LA MALTAZIONE (FASE PRELIMINARE)	64
4.2 DAL MALTO AL MOSTO: AMMOSTAMENTO	72
4.3 FILTRAZIONE	84
4.4 BOLLITURA E LUPPOLAMENTO	88
4.5 ELIMINAZIONE DEL TORBIDO	94
4.6 RAFFREDDAMENTO E OSSIGENAZIONE	95
4.7 FERMENTAZIONE	97
4.8 FERMENTAZIONE SECONDARIA O MATURAZIONE	102
4.9 CONFEZIONAMENTO	103
4.10 COMPOSIZIONE DELLA BIRRA FINITA	104
5. CONCLUSIONI	105
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	107
7. RIGNRAZIAMENTI	123

1. INTRODUZIONE: LA STORIA DELLA BIRRA

1.1 La scoperta dell'alcool

Fu solo nel corso dell'Ottocento che Pasteur scoprì il lievito che converte lo zucchero in etanolo (o alcool etilico) e anidride carbonica, nel processo noto a tutti come fermentazione alcolica che si trova alla base della produzione di ogni bevanda alcolica¹¹⁵; nonostante ciò, si pensa che l'uomo avrebbe scoperto le potenzialità dell'alcol circa 250.000 anni fa. Secondo l'archeologo biomolecolare dell'università della Pennsylvania Patrick Edward McGovern, alcune proprietà dell'alcol e dei prodotti fermentati in genere avrebbero giocato un ruolo fondamentale nell'evoluzione della cultura umana, non solo per la proprietà dell'etanolo di portare all'ubriachezza. I primi a notare l'esistenza della frutta fermentata, e quindi alcolica furono alcuni primati antenati dell'homo sapiens, infatti i frutti sottoposti a questo processo possedevano un odore molto più marcato e intenso rispetto ai frutti normali ed erano quindi più facili da trovare. I primati si accorsero inoltre che tali frutti possedevano un forte potere antisettico ed erano più semplici da digerire; da questo momento gli ominidi avrebbero iniziato a consumare frutta fermentata in quantità sempre maggiori, dando il via così al rapporto unico che unisce specie umana e alcol. Una svolta avvenne intorno al 9000 a.C. quando l'uomo si accorse che l'alcol ricavato dalla raccolta di erbe e frutta spontanee era insufficiente. Sarebbe questo, secondo McGovern e altri studiosi, uno dei motivi principali che hanno spinto l'umanità a interrompere la propria esistenza nomade per iniziare a crescere e addomesticare piante dalle quali ottenere nutrimento e alcol. Tale ipotesi è in contrasto rispetto alle idee di molti altri esperti che sostengono che l'etanolo è considerato una felice conseguenza dello stanzialismo prima e dell'agricoltura poi; secondo lo scienziato americano ne è invece la causa. Il rapido aumento di consumi della frutta fermentata può essere attribuito al benessere che questi provocavano nel consumatore; una spiegazione scientifica di questo generico 'stare meglio' si può ricercare nel fatto che qualsiasi prodotto fermentato, oltre all'alcol, produce anche vitamine del gruppo B, presenti in natura in quantità limitate¹⁰⁵.

1.2 I Sumeri

La bevanda oggetto di studio di questa tesi ha una storia estremamente antica e complessa da datare infatti le prime testimonianze di essa vengono collocate intorno al IV millennio a.C. e sono relative alle popolazioni sumere ed egizie. Tale scoperta venne favorita, presumibilmente, quando le popolazioni della mezzaluna fertile abbandonarono lo stile di vita nomade e si approcciarono a una vita più sedentaria e gettando le basi della moderna agricoltura e sviluppando coltivazioni di cereali e frumento¹¹⁵. I sumeri, infatti, furono i primi a sviluppare una civiltà che sorgeva sorretta da dense città ricche di popolazioni che basavano il loro sostentamento su pratiche agricole di un certo successo, infatti Ur (la loro città più importante) che contava circa 35000 abitanti, raggiunse il suo picco con circa 500000 individui. I sumeri, oltre che essere abili contadini erano anche ottimi vasai, forgiatori, architetti, e osservatori del cielo tant'è che loro furono i primi ad aver capito che era il sole il centro di quel che loro ritenevano essere l'universo. Tra l'altro i sumeri erano anche ottimi birrai e producevano una svariata gamma di birre:

- Bi-se-bar: era una birra d'orzo molto leggera e veniva anche utilizzata come parte del salario
- Bi-a-sud: anche questa, come, la Bi-se-bar era una birra d'orzo ma di più alta qualità
- Se-bar-bi-sang: al contrario delle prime due, questa è una birra con un tenore alcolico maggiore paragonabile alle moderne birre doppio malto.
- Se-bar-bi-gig: birra scura di scarsa qualità derivante da malto abbrustolito.
- Se-bar-bi-gig-dug-ga: birra scura di alta qualità
- Bi-tin-babbar: birra di media qualità prodotta dalla spelta
- Bi-tin-gig: birra scura di spelta abbrustolita
- Bi-si: birra rossa derivante dalla spelta che veniva blandamente tostata garantendo la tipica colorazione
- Bi-Kal: birra molto forte di ottima qualità alla quale veniva aggiunto orzo
- Bi-as-a-an-mach: birra di altissima qualità composta da spelta e orzo aromatizzata con miele o datteri, estremamente corposa e densa¹²⁹.



Figura 1: Tavoletta monumento Blau

Illustrata in figura 1 vi è una delle più antiche testimonianze relative alla birra; rappresenta alcuni uomini che offrono doni propiziatori alla dea della fertilità Nin-Harra, tra cui la birra che era nota con il nome «Se-bar-bi-sang» o «l'acqua che fa vedere chiaro».

1.3 Gli Egizi

Il culto della birra era già noto al popolo egizio che riuscì a migliorarne la tecnica e di conseguenza il gusto tant'è che la birra divenne una delle bevande più diffuse dell'antico Egitto. Difatti gli egizi furono i primi a creare e introdurre la figura del “Mastro birraio” che si occupava della produzione di ben tre tipologie di birra «zythum» (chiara), «curmy» (scura), «sa» quest'ultima era una birra ad alta concentrazione che poteva essere aromatizzata con malto ma anche con datteri, cannella, salvia, rosmarino; ed era riservata esclusivamente per il faraone. A differenza dei babilonesi e dei sumeri, la birra non aveva solo un'importante valenza culturale, ma era considerata a tutti gli effetti un'importante industria a livello economico tant'è che i faraoni stessi possedevano svariate fabbriche che si occupavano della produzione di birra che veniva poi venduta ed esportata. La birra era dunque una bevanda per sovrani, regine e dei, ma anche di operai che lavoravano alla

costruzione dei complessi monumentali. Per costoro la birra era una voce importante del proprio salario; persino gli schiavi avevano diritto alla loro razione giornaliera di due boccali⁶⁹. La birra, dunque, era onnipresente nella vita degli antichi egizi, sia a livello culturale, ma soprattutto si trovava alla base della loro forte economia. Sfortunatamente questa tradizione si arrestò quando l'Egitto, nel VII secolo d.C., divenne dominio musulmano e poiché l'Islam proibisce il consumo di alcolici la produzione di birra declinò per non riprendersi più; nonostante ciò, ancora oggi certe popolazioni del Nilo (Fellahs) producono la birra secondo la più antica tradizione.

1.4 I Babilonesi

Dopo la caduta dell'impero sumero, intorno al 2000 a.C., succedettero gli assiro-babilonesi che portarono avanti la tradizione sumera e inoltre emanarono le prime leggi che regolavano il commercio e la produzione di birra all'interno dell'impero e oltre. Alcune tracce di esse le possiamo trovare nel codice di Hammurabi illustrato in figura 2. Riguardo il procedimento del metodo di produzione della birra babilonese, possiamo dire che a grandi linee è quello di adesso, anche se più spartano e grezzo. Inizialmente veniva raccolto il cereale di interesse che era l'orzo o il grano, successivamente lo si bagnava per

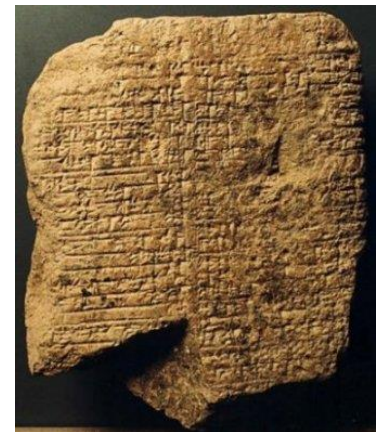


Figura 2: codice di Hammurabi

poi lasciarlo seccare al sole. A questo punto il cereale veniva macinato ed impastato con l'acqua, questo procedimento dava vita a un pane che in seguito alla lievitazione veniva cotto al forno. Infine, avveniva la macinazione di questo pane per poi farlo cuocere nell'acqua. Una volta cotto lo si filtrava ed infine lo si aromatizzava. Al termine del processo si otteneva una bevanda torbida e poco filtrata, perciò veniva bevuta con la cannuccia, per evitare che i residui molto amari si depositassero sulle labbra.

1.5 I Greci

La birra nacque in Medio Oriente, ma divenne popolare anche nella cultura occidentale.

Inizialmente era disprezzata perché veniva considerata la bevanda dei barbari e prendeva il nome sarcastico di “Vino d’orzo” contrapposto al suo rivale più popolare e gradito che era il vino. Essa però diventò popolare anche in questi territori, soprattutto in Grecia dove, nelle feste popolari e nelle manifestazioni sportive l’uso del vino era vietato, per cui gli antichi greci iniziarono ad importare la birra dall’Egitto e dalla Mesopotamia. L’uso della birra divenne comune soprattutto in occasione delle feste in onore di Demetra, dea delle messi. E’, invece, diverso invece il caso dei cretesi che infatti, molto influenzati dalla cultura egizia, bevevano e producevano birra d’orzo e miglio ancor prima di bere vino. Ipotesi sostenuta da Sir Arthur Evans, uno dei più importanti archeologi dei Minoici; Questa idea era basata sul rinvenimento di reperti di orzo e miglio, oltre a due piccole brocche a becco alto che avevano raffigurazioni di tre spighe d’orzo in altorilievo¹¹⁵.

1.6 Gli Etruschi

Per quanto riguarda la penisola italiana, il primo popolo che entrò in contatto con la birra fu il popolo etrusco. Non sappiamo con certezza se gli etruschi producessero la birra, perché nulla in tal senso ci hanno testimoniato, ma è quasi sicuro la conoscessero e la consumassero. Fra i reperti ritrovati in una tomba di Tarquinia spicca un vaso a bocca larga con impresso il nome di un faraone, vaso che in Egitto era destinato all’uso della Zythum e della Kurmy, e ciò fa ben pensare che, se non birra prodotta in loco, almeno birra di importazione quella famiglia consumava in qualche misura.

L’imperatore romano Claudio è stato il primo studioso della civiltà etrusca, ne conosceva usi e costumi, leggi, stile di vita e convinzioni sulla morte, sapeva cosa mangiavano e bevevano. Vino, certamente, ma forse anche birra dal momento che, oltre che abili vignaioli, erano anche abili agricoltori di frumento e di orzo. La loro focaccia, oggi “stiacca” fiorentina, fatta con pasta lievitata ci fa capire che il popolo etrusco ben conosceva il fenomeno della lievitazione.

Considerando, quindi, le loro abilità nell’agricoltura dei cereali e le loro conoscenze del processo di

lievitazione, il passo fino alla preparazione di una bevanda ricavata da un impasto di cereali fermentati è relativamente breve¹²⁹.

1.7 I Romani

I primi approcci dei romani nei confronti della birra avvennero in seguito alle campagne d'Egitto di Cesare prima e Antonio poi, che passarono per la reggia di Cleopatra e successivamente si fecero divulgatori della bevanda nella loro Roma. Quando Plinio, tra il 23 e il 79 d.C., scrisse il suo «Naturalis Historia», si premurò di precisare - nel XXXVII libro - che la birra a Roma era conosciuta ma poco consumata (per lo più impiegata nella cosmesi femminile), mentre era molto apprezzata e largamente diffusa nelle Province dell'Impero: dalla penisola iberica alla Francia all'Egitto¹⁰⁶. Abbiamo quindi appreso, in seguito alle testimonianze rinvenute, che la birra a Roma era nota, ma in linea generale poco apprezzata tant'è che veniva sarcasticamente e dispregiativamente chiamata “vino d'orzo” ed era considerata una bevanda barbara e plebea unicamente degna del rude palato dei gladiatori. Ciò nonostante, alcuni personaggi storici, al contrario, la amavano. Uno di questi era Nerone che si sa per certo facesse largo uso di birra. Egli ne riceveva spesso in dono da Silvio Ottone (marito di Poppea), che aveva spedito in Portogallo per potersi incontrare con Poppea senza la presenza ingombrante del marito. L'imperatore riceveva costantemente birra dalla penisola iberica, che prendeva il nome di *cerevisia* ed era così apprezzata che il sovrano stesso volle accanto a sé uno schiavo lusitano, abile mastro birraio, addetto alla preparazione di suddetta bevanda. Nonostante qualche sporadico amante della birra Sia i Romani che i Greci non avevano delle opinioni positive su di essa e per cambiare il loro giudizio dovettero infatti giungere alla conoscenza della birra celta, intorno al I secolo d.C.¹²⁹.

1.8 I Celti

I Celti vivevano tra Gallia, Britannia ed Irlanda e furono da sempre grandi amanti e produttori di birra, sappiamo che già all'epoca ne producevano addirittura sei tipi diversi; infatti, sono stati

trovati, in una villa galloromanica, dei reperti relativi a un'antica birreria datata III e IV secolo D.C. A quel tempo la birra veniva prodotta e fabbricata in famiglia dalle donne che introdussero l'utilizzo di barili di legno, al posto degli obsoleti recipienti in terracotta. All'interno di questi barili avveniva la fermentazione del malto che a quel tempo prendeva il nome di "brace" da cui derivano le parole "brassin, brasseur" (birraio). Le principali tipologie di birra prodotte erano l' *alica* che era una bevanda che derivava dalla spelta, un cereale antico simile al grano tenero, molto leggera e anche dalle caratteristiche depurative; un' altro noto tipo di birra era la *celia* che era composta da frumento e farro; il *bryton* era invece una bevanda fatta con l' orzo e la scandella (un particolare tipo di orzo) e sappiamo che aveva una media gradazione alcolica; la *cervesia* invece era una birra fatta con l' orzo tostato, di colore rosso; il *camum* era una birra di colore bruno prodotta con miglio e melata (una secrezione zuccherina presa da dei particolari insetti che si nutrono della linfa delle piante); infine vi era la *curmi*, un mix di birra e miele molto particolare e aromatico, estremamente diffusa tra i Celti. Questi erano dunque i tipi di birra che usavano i Celti³⁸. Nonostante ciò Tacito ci ha lasciato una vivace e non proprio positiva testimonianza rivolgendosi ai popoli germanici e alla loro bevanda "...*usano bere un liquore d'orzo e di grano, corrotto a guisa di vino...*" quindi, nonostante l'ampia gamma di birre con particolari sapori e aromi, secondo Tacito non era altro che una bevanda grossolana e dal sapore sgradevole. Tacito era un grande e accanito estimatore del vino, che consumava in svariate quantità e quindi si può capire come il suo giudizio non fosse propriamente parziale. Al contrario, suo suocero Giulio Agricola, che era stato governatore della Britannia per otto anni, preferiva di gran lunga la birra al vino tant'è che quando tornò a Roma, lo fece in compagnia di tre esperti mastri birrai di Glevum (oggi Gloucester), località in cui la bevanda bionda per eccellenza riscuoteva un grande successo già da tanto tempo, e aprì un locale dove la si poteva gustare in molti modi diversi e a prezzi modici, dando quindi vita al primo pub di Roma.

1.9 Il Medioevo e i monasteri

In seguito alle invasioni delle tribù germaniche e allo sfaldamento dell'Impero Romano, in Europa si creò un clima estremamente teso e turbolento in cui la chiesa acquisì una posizione di

predominanza e fortunatamente riuscì a conservare un po' dell'immensa conoscenza e tecnologia sviluppata in epoca romana. Questo valeva anche per la produzione di birra. I cristiani, nella tradizione ellenistico / giudaica, disprezzavano notevolmente la birra e chi ne faceva uso. In Irlanda, tuttavia, che non fu mai sotto il dominio romano, si era sviluppata una tipologia particolare di chiesa e monachesimo indipendenti dalla tradizione romana e dal disprezzo che avevano per questa bevanda, infatti gli irlandesi e i celti in generale hanno avuto un ruolo determinante all'interno dello sviluppo della birra. L'atteggiamento della chiesa verso la birra mutò solamente intorno al VI e il VII secolo in seguito al continuo sviluppo e, successivamente, all'affermato predominio delle tradizioni germaniche e celte. Il documentato riconoscimento della birra da parte della chiesa avvenne precisamente nell'anno 816 al sinodo di Aquisgrana dove è stato deliberato un legame standardizzato relativo all'ordine di vita del monastero. È stato deciso che un monaco dovrebbe ricevere giornalmente un bicchiere di vino o, dove non era disponibile vino, due volte tanto di "buona birra"⁶². L'ulteriore e più importante passo in avanti nello sviluppo della birra avvenne tra le mura delle abbazie e conventi, più precisamente, all'interno delle loro cantine in cui muffe e spore davano un ottimo contributo al processo di fermentazione⁵. Inizialmente, la maggior parte dei monasteri si trovava nell'Europa meridionale, dove il clima permetteva ai monaci di coltivare l'uva e di vinificare per sé e per i propri ospiti. Tuttavia, quando i successivi monasteri furono istituiti nelle regioni settentrionali dell'Europa, dove il clima più fresco rendeva più facile la coltivazione dell'orzo al posto dell'uva, i monaci (in particolare degli ordini dei Benedettini, Cistercensi e Francescani) cominciarono a produrre birra invece che vino. Inizialmente, la birra prodotta dai monaci veniva utilizzata esclusivamente per il proprio consumo oppure veniva data agli ospiti, ai pellegrini e ai poveri. Successivamente, i monaci iniziarono a preparare la birra anche per altre persone, come i nobili e vendevano la loro birra nei cosiddetti "Pub del monastero". C'erano anche le cosiddette "birre da chiesa" che erano celebrazioni e feste della chiesa dove i contadini potevano bere birra gratuitamente, riducendo la domanda di produzione di birra commerciale⁵⁶. Una delle innovazioni più significative nella storia della birra avvenne proprio nel medioevo e fu l'introduzione del luppolo come nuovo ingrediente. Tale riforma portò alla scomparsa del *gruit* che era una miscela di svariate erbe, essenze e spezie, ingrediente ritenuto indispensabile prima dell'avvento del luppolo; I governanti dell'epoca: re, vescovi, conti e duchi avevano il monopolio del *gruit*, infatti chiunque lo volesse doveva comprarlo dal *gruiter* nel *gruithuis* e, il suo prezzo era fissato a un livello molto superiore rispetto al costo della produzione. A livello pratico non era altro che una tassa sulla birra¹⁴². Il luppolo divenne, dunque, un ingrediente fondamentale non tanto per la sua capacità di aromatizzare il prodotto, ma soprattutto per il notevole contributo che dà alla sua stabilità, infatti le resine estratte

durante la fase di boiling aiutano a prevenire infezioni del mosto da parte di numerosi batteri, aumentando quindi la conservazione del prodotto finale facendo sì che essa potesse percorrere lunghe tratte senza problemi¹⁴⁰. La conseguenza inevitabile di questa diffusione fu la necessità di stabilire delle leggi che ne regolamentavano la produzione e la commercializzazione; in merito a ciò, nel 1516 venne emanato da parte di Guglielmo IV il *Reinheitsgebot* o «Editto di Purezza» in cui si imponeva espressamente che la birra fosse composta unicamente da acqua, orzo, lievito e luppolo, oltre che a tutte le leggi che regolavano la sfera economico-commerciale¹³⁹. Ovviamente in seguito alle attuali leggi europee l'editto non è più obbligatorio, tuttavia, ancora oggi ci sono delle birre prodotte in Germania che hanno riportato all'interno dell'etichetta la scritta «prodotta secondo la Legge della purezza tedesca» o «la Legge della purezza bavarese del 1516».



Figura 3 Etichetta di una birra prodotta secondo l'editto di purezza

1.10 La rivoluzione industriale

Dopo l'introduzione del luppolo, consolidato intorno al XIII secolo, il successivo passo in avanti nello sviluppo della birra avvenne in corrispondenza della rivoluzione industriale. Proprio in questo periodo abbiamo la trasformazione della produzione birraia in una vera e propria attività industriale, grazie alle numerose innovazioni tecnologiche che sono state introdotte a partire dal XVII secolo e che hanno permesso un incremento dell'efficienza e dell'automazione delle varie industrie, tra cui, appunto, quella birraia. Tra le più importanti troviamo il termometro a mercurio ideato da Fahrenheit nel 1714, sulle basi del lavoro di Galileo, che, già nel 1500 aveva costruito una sorta di strumento per misurare il calore⁶⁶. Un'altra scoperta che ha segnato lo sviluppo dell'industria birraria è stata sicuramente l'idrometro di Marin nel 1768 seguito dal densimetro di Ballino nel 1843 che ha aiutato i mastri birrai a calcolare la produzione e a sperimentare nuovi stili. In seguito all'invenzione del tostacaffè nel 1817 si poté anche perfezionare i livelli di tostatura e affumicatura creando aromi e sapori sempre più ricercati. In generale, il XVIII e il XIX furono secoli ricchi di innovazioni tecnologiche dal punto di vista meccanico e siderurgico che incrementarono e ampliarono il

mercato della produzione birraria, ma il vero punto di svolta arrivò in corrispondenza di una delle più grandi scoperte in ambito microbiologico; infatti nel 1876 Louis Pasteur capì il ruolo dei lieviti nella fermentazione alcolica e riuscì anche a determinare le temperature di inattivazione di tali microrganismi che nel caso della birra fissò a circa 212° F¹³¹. Mise, così, le basi degli odierni trattamenti termici, ovvero, utilizzare il calore per inattivare gli ipotetici microrganismi che si possono trovare in determinati alimenti. Infatti, uno di essi prende il nome di pastorizzazione in onore dello scienziato Louis Pasteur. Pochi anni dopo Emil Christian Hansen riuscì a isolare la prima coltura pura di lieviti per la produzione di birra che successivamente divenne noto come *Saccharomyces Carlsbergensis*. Nonostante i notevoli vantaggi economici, tuttavia, la tecnica della coltura di lievito puro non è stata immediatamente adottata da tutti i produttori di birra; infatti, in Germania, la teoria di Hansen ha ricevuto sia la sua più alta lode ma anche le sue critiche più dure. Tale metodo venne comunque accettato dalla maggior parte dei birrai tedeschi durante il corso del XX secolo³⁴. In seguito agli studi di Pasteur e Hansen, nacque e si diffuse rapidamente la produzione di birra a bassa fermentazione, conosciuta come birra Lager, basata su temperature più lievi e sull'utilizzo del lievito *Saccharomyces Carlsbergensis*. La Lager è un gruppo di birre composto per lo più da pale chiare, hanno la caratteristica di essere molto limpide e con un tenore alcolico tra il 3 e il 5%. Tali innovazioni portarono l'industria birraia ad una notevole espansione sul mercato; infatti, ad oggi, la grande industria si è appropriata della quasi totalità delle quote di produzione del mercato della birra.

1.11 Le Microbirrerie

Il fatto che l'industria birraia ebbe una crescita così esponenziale è estremamente positivo, tuttavia, si svilupparono alcune problematiche legate al gusto e agli aromi; infatti, le grandi industrie spingono verso una standardizzazione e omologazione del prodotto cercando sempre più l'incremento di produzione trascurando un po' gli aspetti qualitativi di questa bevanda. Di conseguenza, all'interno della popolazione, si è sviluppato sempre più il desiderio di riscoprire gli "antichi sapori" che si manifestò fisicamente nello sviluppo di piccole fabbriche indipendenti con pub annesso per la degustazione delle loro birre con caratteristiche aromatiche molto particolari.

Tali fabbriche prendono il nome di Microbirrerie e ancora oggi sono molto apprezzate dai veri amanti di questa bevanda.

1.12 La birra oggi: produzione e consumi



Figura 4 aumento della produzione di birra in Italia

IL MERCATO DELLA BIRRA IN ITALIA 2010-2019					
Anno	Produzione milioni hl	Import milioni hl	Export milioni hl	Consumi milioni hl	Pro-capite litri
2010	12,814	6,304	1,869	17,249	28,6
2011	13,410	6,391	2,086	17,715	29,8
2012	13,312	6,155	1,990	17,477	29,3
2013	13,256	6,175	1,927	17,504	29,2
2014	13,521	6,203	1,995	17,729	29,2
2015	14,015	6,987	2,286	18,726	30,8
2016	14,516	7,095	2,582	19,029	31,4
2017	15,673	6,867	2,856	19,684	32,5
2018	16,421	6,954	3,051	20,324	33,6
2019	17,247	7,062	3,448	20,861	34,6

Fonte: Elaborazioni Beverfood.com su dati Assobirra

Figura 5 consumi birra in Italia 2010-2019

Dopo circa 6000 anni di storia, il mercato della birra in Italia ha raggiunto numeri impressionanti che aumentano costantemente. In soli vent'anni la produzione è passata da 12,1 mln di HL nel 1998 a 17,2 mln di HL nel 2019 con un incremento del 36% circa; la birra, insomma, è sempre più presente nella vita e nelle abitudini degli italiani, ormai lontani dallo scetticismo che avevano i nostri antenati romani per questa bevanda. Tale tesi è anche supportata dai dati relativi al consumo pro-capite annuo di birra, infatti si conta che un italiano in un anno arrivi a consumare 34,6 litri di birra, 6 in più rispetto al 2010. Certo siamo ben lontani dai leader europei come repubblica ceca con

138 litri, Austria 105 e Germania 101, ma l'Italia è in costante ascesa e ha appena raggiunto il suo massimo storico radicando sempre più questa particolare bevanda all'interno della sua cultura.

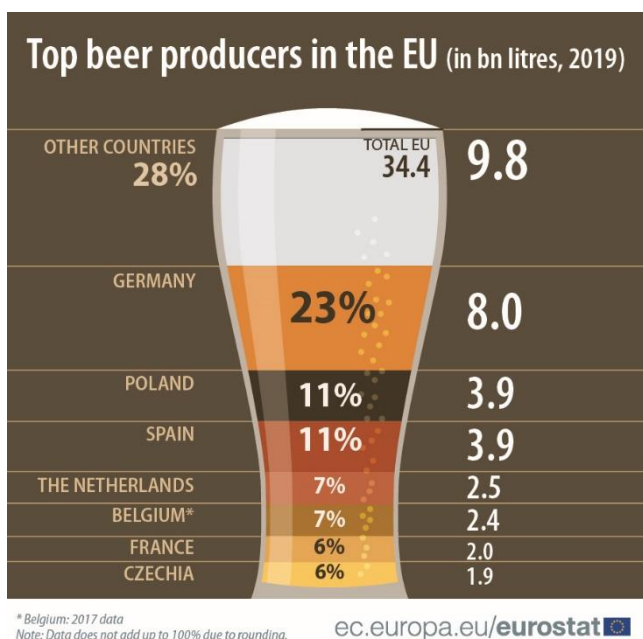


Figura 6 produzione europea di birra

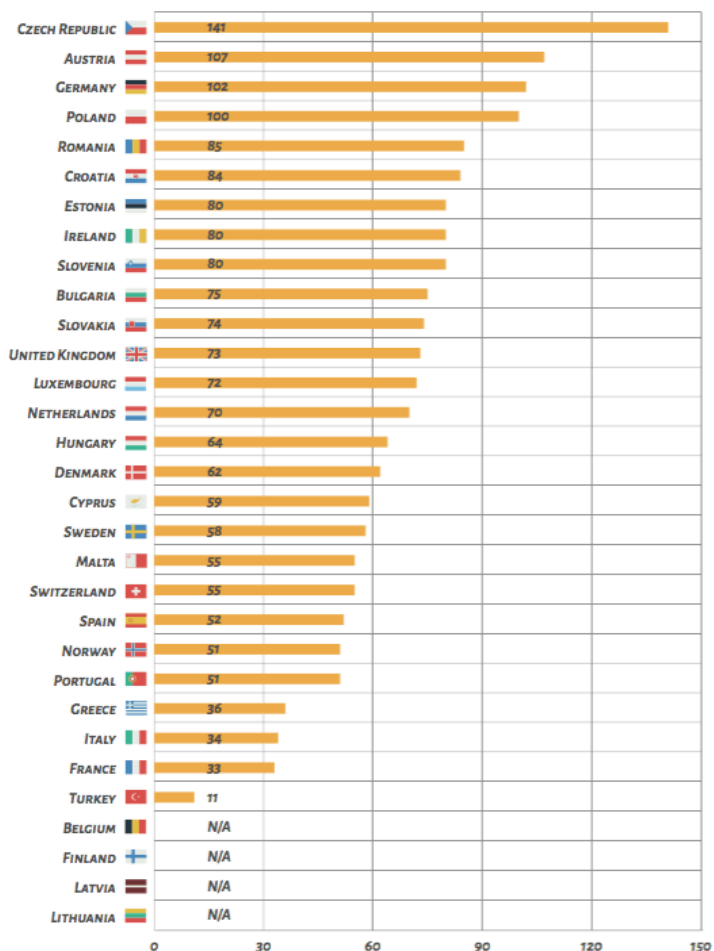


Figura 7 consumo pro capite europeo 2019

Per quanto riguarda il panorama europeo, come già detto in precedenza, il primato del consumo di birra pro-capite è detenuto dalla Repubblica Ceca, che con i suoi 141 litri per anno stacca notevolmente Austria e Germania con, rispettivamente, 107 e 102 litri annui. Mentre, a livello produttivo, il paese più attivo è la Germania che nel 2019 ha prodotto ben 8 miliardi di litri di birra, equivalenti a circa il 25% della totale produzione europea (34,4 miliardi di litri).

2. LE MATERIE PRIME

2.1 Definizione e classificazione

"Art. 1. - 1. La denominazione "birra" è riservata al prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi di *saccharomyces carlsbergensis* o di *saccharomyces cerevisiae* di un mosto preparato con malto, anche torrefatto, di orzo o di frumento o di loro miscele ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o con entrambi.

2. La fermentazione alcolica del mosto può essere integrata con una fermentazione lattica.

3. Nella produzione della birra è consentito l'impiego di estratti di malto torrefatto e degli additivi alimentari consentiti dal decreto del Ministro della sanità 27 febbraio 1996, n. 209.

4. Il malto di orzo o di frumento può essere sostituito con altri cereali, anche rotti o macinati o sotto forma di fiocchi, nonché con materie prime amidacee e zuccherine nella misura massima del 40% calcolato sull'estratto secco del mosto." 1. L'articolo 2 della legge 16 agosto 1962, n. 1354, come sostituito dall'articolo 2 della legge 17 aprile 1989, n. 241, e dall'articolo 19 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109, è sostituito dal seguente:

"Art. 2. - 1. La denominazione "birra analcolica" è riservata al prodotto con grado Plato non inferiore a 3 e non superiore a 8 e con titolo alcolometrico volumico non superiore a 1,2%.

2. La denominazione "birra leggera" o "birra light" è riservata al prodotto con grado Plato non inferiore a 5 e non superiore a 10,5 e con titolo alcolometrico volumico superiore a 1,2% e non superiore a 3,5%.

3. La denominazione "birra" è riservata al prodotto con grado Plato superiore a 10,5 e con titolo alcolometrico volumico superiore a 3,5%; tale prodotto può essere denominato "birra speciale" se il grado Plato non è inferiore a 12,5 e "birra doppio malto" se il grado Plato non è inferiore a 14,5.

4. Quando alla birra sono aggiunti frutta, succhi di frutta, aromi, o altri ingredienti alimentari caratterizzanti, la denominazione di vendita è completata con il nome della sostanza caratterizzante."

1, DPR N.272 del 30/06/1998, GU n. 185 del 10/08/1998

Quindi, già in seguito alle definizioni di legge si può esprimere una prima classificazione in relazione a grado plato e grado alcolico.

	GRADO PLATO	GRADO ALCOLICO
BIRRA ANALCOLICA	$3 \leq GP \leq 8$	$GA < 1,2\%$
BIRRA LIGHT	$5 \leq GP \leq 10,5$	$1,2\% \leq GA \leq 3,5\%$
BIRRA	$GP > 10,5$	$GA > 3,5\%$
BIRRA SPECIALE	$GP \geq 12,5$	$GA > 3,5\%$
BIRRA DOPPIO MALTO	$GP \geq 14,5$	$GA > 3,5\%$

*Definizione italiana GRADO PLATO O SACCHARIMETRICO: grammi di sostanze secche disciolte in 100g di mosto dalla cui fermentazione è ottenuta la birra, espresso in % (p/p)

Art. 2, DPR N.272 del 30/06/1998, GU n. 185 del 10/08/1998

2.2 Le materie prime

Come appurato in precedenza dalla definizione di legge, la birra è una bevanda a base di acqua orzo/frumento, lievito e luppolo che può essere ulteriormente aromatizzata con qualsiasi altro ingrediente alimentare. Il rapporto tra essi è fondamentale ed estremamente delicato, ogni ingrediente fornisce il suo importantissimo contributo all'aroma finale e anche alle caratteristiche visive e texture, proprio per questo motivo abbiamo un'infinita gamma di birre, ognuna con le sue particolari caratteristiche e con il suo aroma inconfondibile¹⁰⁴. Proprio qui entrano in gioco le doti del mastro birraio, ovvero riuscire a trovare la giusta composizione di ingredienti per ottenere i migliori sapori e aromi; ma non solo, infatti ogni ingrediente aggiunto può apportare modifiche

sensibili a livello sensoriale e può anche modificare la composizione della bevanda incrementando la presenza di composti bioattivi (sostanze che possono influenzare positivamente l'organismo determinando un beneficio fisiologico e/o una riduzione del rischio di sviluppare alcune patologie). Questo è il caso di uno studio effettuato sulla birra *ale* arricchita con lignani di frutti di *Schisandra chinensis Baillon* (omija), tali lignani hanno avuto un effetto estremamente positivo sul prodotto finale infatti, in seguito a determinati esami, gli scienziati hanno osservato un incremento di polifenoli e flavonoidi (composti bioattivi con elevata capacità antiossidante) nella composizione della bevanda rispetto alla classica *ale* di partenza⁴⁸.

2.3 L'Acqua

Come detto in precedenza ogni ingrediente è fondamentale nella produzione della birra, però l'acqua è sicuramente il più importante dato che rappresenta tra l'85% e il 92% del prodotto finale e viene utilizzata in quasi tutte le fasi produttive. Per comprendere al meglio il notevole contributo che fornisce questo ingrediente bisogna analizzare la struttura, la composizione e le sue caratteristiche principali.

STRUTTURA

La molecola di acqua è composta da un atomo di ossigeno legato a due atomi di idrogeno tramite legami covalenti polari; quest'ultimi condividono due coppie di elettroni formando un composto con struttura non lineare ma "piegata" e con caratteristiche nettamente polari, chiave delle proprietà di questa molecola.

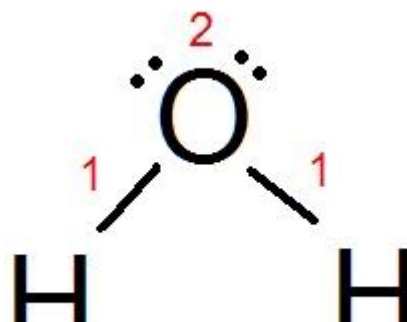


Figura 8 struttura della molecola H₂O

Inoltre, questa particolare conformazione conferisce alla molecola la capacità di formare quattro nuovi legami idrogeno (legame a idrogeno o ponte a idrogeno è un caso particolare di forza intermolecolare in cui è implicato un atomo di idrogeno coinvolto in un legame covalente con elementi molto elettronegativi come fluoro (F), ossigeno (O), azoto (N) i quali attraggono a sé gli elettroni di valenza, acquisendo una parziale carica negativa (δ^-) lasciando l'idrogeno con una parziale carica positiva (δ^+). Contemporaneamente l'idrogeno viene attratto da un atomo elettronegativo di una molecola vicina con molecole di H₂O vicine. Nel caso del ghiaccio i legami idrogeno formano una particolare struttura tridimensionale a rete in grado di occupare tutto lo spazio, organizzata tramite legami lineari e direzionali molto forti che determinano una sorta di

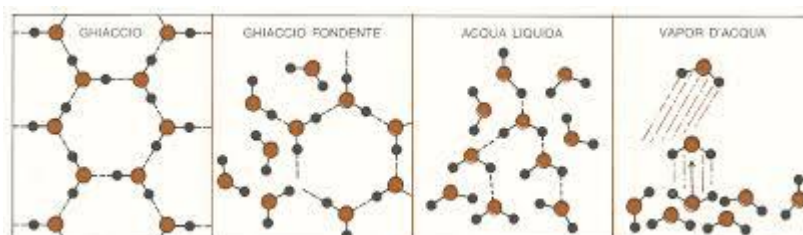


Figura 9 struttura chimica dell'acqua nei suoi stati fisici

apertura rispetto alla conformazione dell'acqua allo stato liquido. Di conseguenza la densità dell'acqua allo stato solido diminuirà passando da 0,9998 g/cm a 0,917 a 0,917 g/cm ed è per questo motivo che il ghiaccio galleggia¹³⁸.

Tornando al discorso della birra, le caratteristiche chimico-fisiche più importanti e da considerare durante una ipotetica produzione sono: pH, Durezza e la speciazione delle sostanze minerali disciolte all'interno.

1) pH

Per poter parlare di pH bisogna introdurre il concetto di acidi e basi. Una delle più importanti capacità, dal punto di vista chimico, dell'acqua è quella di poter trasferire uno ione idrogeno (H^+) da una molecola/ione a un'altra/o; questo processo può influire su tutte le specie cariche che si trovano in soluzione e quindi cambiarne il comportamento. Le molecole di acqua hanno la capacità di accettare ioni H^+ ma possono anche fornire tale ione. Dal punto di vista pratico uno ione H^+ non è altro che un atomo di idrogeno che ha perso il suo elettrone di valenza e considerando che un atomo di idrogeno ha solo un elettrone, quando questo viene perso il rimane semplicemente il nucleo di idrogeno che prende il nome di ione H^+ o protone. Tornando al discorso iniziale, un acido è una sostanza in grado di donare H^+ mentre la base è una sostanza in grado di accettare H^+ .

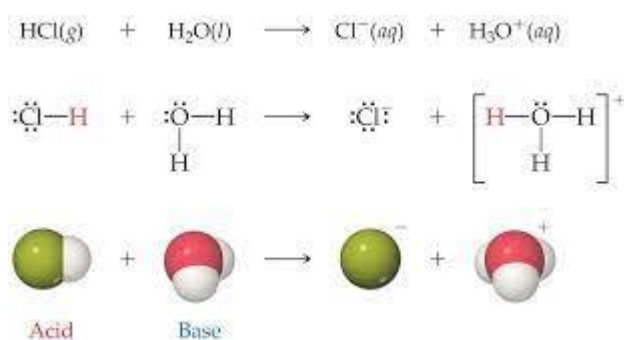


Figura 10 Comportamento basico dell'acqua

Nella reazione in evidenza nella figura 10 osserviamo il comportamento basico dell'acqua che accetta uno ione idrogeno dall'acido HCl caricandosi positivamente e trasformandosi in H_3O^+ . Possiamo notare che quando il legame tra idrogeno e cloro si rompe la coppia di elettroni rimane sul cloro lasciando libero il nucleo di idrogeno di formare un nuovo legame con gli elettroni di valenza relativi alla base H_2O che si trasforma in ione idronio (H_3O^+). In conclusione, abbiamo dimostrato il caso in cui HCL si comporti da acido e l'acqua si comporti da base. La presenza degli ioni H_3O^+ ci indica l'acidità della soluzione.

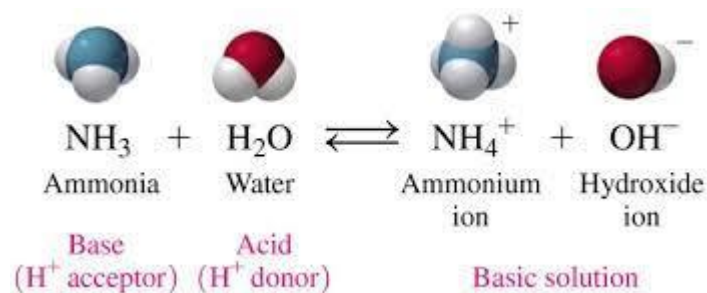


Figura 11 comportamento acido dell'acqua

Nella figura 11 viene, invece, analizzato il caso in cui l'acqua si comporti da acido donando uno ione H⁺ all'ammoniaca (NH₃) trasformandosi rispettivamente in OH⁻ (ione ossidrile) e NH₄⁺ (ione ammonio). In questa situazione l'ammoniaca si comporta da base e l'acqua da acido. La presenza dello ione ossidrile in acqua ci indica la presenza di una base.

In conclusione, abbiamo visto che nel primo caso l'acqua agisce da base ricevendo uno ione dal composto HCl e nel secondo caso l'acqua svolge il ruolo di acido donando uno ione alla base NH₃, di conseguenza, possiamo affermare che l'acqua in soluzione può comportarsi sia da base che da acido. In seguito a ciò, la domanda che sorge spontanea è: "può l'acqua donare uno ione a un'altra molecola d'acqua e viceversa?". La risposta è sì e la reazione tematica che spiega tale comportamento prende il nome di "Reazione di autoprotolisi dell'acqua" (figura 12)

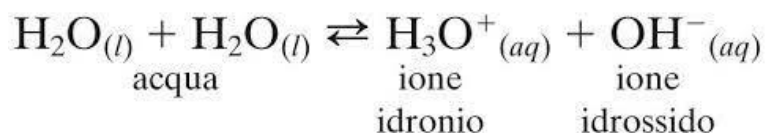


Figura 12 Reazione di autoprotolisi dell'acqua

Dopo aver introdotto il concetto di acidi e basi possiamo definire il pH come una grandezza fisica che determina la basicità o l'acidità di una soluzione e può essere determinato attraverso l'uso di un semplice strumento elettronico detto piaccmetro o mediante l'utilizzo di alcuni materiali detti indicatori che, se immersi, modificano il loro colore al variare del pH della soluzione. Dal punto di vista chimico il pH è una scala logaritmica che va da 0 a 14 dove 0 indica la massima acidità e 14 indica la massima alcalinità o basicità¹⁴. Il valore di pH è strettamente dipendente dalla concentrazione degli ioni H₃O⁺ e OH⁻ che sono anch'essi in relazione ,infatti, quando uno cresce l'altro si abbassa; quando il rapporto della concentrazione degli ioni H₃O⁺ e OH⁻ sarà uguale

avremo una soluzione neutra a $\text{pH}=7$ mentre se tale rapporto si sbilancia verso gli ioni H_3O^+ otterremo una soluzione più acida con $\text{pH}<7$; infine nel caso contrario, ovvero sbilanciamento del rapporto a favore degli ioni OH^- saremo in presenza di un'acqua alcalina con $\text{pH}>7$. Il valore di pH viene espresso matematicamente come il logaritmo negativo della concentrazione degli ioni H_3O^+ $\text{pH}=-\log[\text{H}_3\text{O}^+]$. Oppure può anche essere ricavato dalla relazione con il $\text{pOH} \rightarrow \text{pH}= 14-\text{pOH}$, in cui $\text{pOH} = -\log[\text{OH}^-]$.

DUREZZA DELL'ACQUA

La durezza dell'acqua è una delle caratteristiche da considerare maggiormente in ottica produttiva ed è composta da durezza temporanea e durezza permanente; la durezza temporanea, detta anche alcalinità totale è rappresentata dagli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} che derivano dai bicarbonati di calcio e magnesio $[\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2]$ essa è definita temporanea perché, in seguito ad un ipotetico riscaldamento con $T>80^\circ\text{C}$ i bicarbonati (solubili) si trasformano in carbonati (insolubili) precipitando sotto forma di calcare. La durezza permanente deriva invece dai solfati e cloruri di calcio e magnesio o $[\text{CaSO}_4, \text{MgSO}_4, \text{CaCl}_2$ e $\text{MgCl}_2]$ e, al contrario della durezza temporanea, non precipitano in seguito a riscaldamento. La durezza può essere espressa in mg/l , in parti per milione (ppm) di carbonato di calcio CaCO_3 oppure in gradi francesi, in cui 1°F corrisponde a 10 ppm di CaCO_3 e in base a questo parametro si può effettuare una classificazione delle acque presenti:

- molto dolci (0-7 °F),
- dolci (7-15 °F),
- dure (16-22 °F),
- molto dure (22-40 °F).

Come appena descritto, la durezza è una caratteristica da non sottovalutare durante la scelta dell'acqua di produzione infatti un'acqua dura, ricca di carbonati e bicarbonati, può influenzare direttamente il processo produttivo andando a innalzare il pH del mosto spostandolo dal valore ottimale 5,2-5,4, valore in cui si ha la massima attività enzimatica; di conseguenza avremo dei rallentamenti relativi alla fase di degradazione di amidi e proteine da parte degli enzimi. Inoltre, il valore di pH , in seguito a cottura del mosto, ci indica quale sarà il pH a fine fermentazione poiché è

noto che il pH decresca di circa un'unità durante il processo fermentativo; quindi, con un pH del mosto, prima dell'inoculo del lievito, pari a 5,4 in seguito al processo fermentativo esso scenderà fino a circa 4,4. Il pH sub-acido della birra è fondamentale rispetto alla sua stabilità aromatica e alla sicurezza microbiologica del prodotto, quindi, è consigliabile utilizzare acque con un grado di durezza inferiore a 20 mg/l per non rischiare di alterare il pH finale della bevanda¹⁰⁴

ALTRE SOSTANZE DISCIOLTE

Oltre alla durezza, descritta precedentemente, il mastro birraio deve conoscere anche la concentrazione degli altri Sali disciolti in acqua poiché anch'essi giocano un ruolo fondamentale nel processo produttivo e nello sviluppo dell'aroma. Attualmente, in relazione alla fornitura di acqua, un birrificio può reperire l'acqua di produzione da un'autorità competente che la preleva da diverse fonti e la modifica in base alla disponibilità e all'esigenze del cliente; un problema che molti mastri birrai affrontano è che l'acqua comprata potrebbe cambiare il suo contenuto di Sali minerali anche il giorno dopo andando a compromettere tutto il processo produttivo; alcuni birrai trovano questo problema così grande da rimuovere tutti i sali dall'acqua e aggiungere ciò di cui hanno bisogno piuttosto che cercare di regolare le quantità che sono naturalmente presenti di giorno in giorno. Per quanto riguarda le riserve idriche naturali, la loro composizione in Sali minerali dipende dal percorso dell'acqua e dagli strati geologici che essa attraversa andando a disciogliere le sostanze minerali e portandosele dietro. Oltre a Burton-on-Trent, altre città sono famose per le loro acque: Monaco, in Germania, ha un'acqua povera di solfati e cloruri ma contiene bicarbonati, poco adatti per birre chiare ma ideali per produrre *lager* più scure e morbide. I carbonati aumentano il pH durante l'ammestramento, producendo un mosto con un rapporto destrina / maltosio più elevato. L'acqua di Vienna (Austria) è più mineralizzata di quella di Monaco. La città ceca boema di Plzen (Pilsen in tedesco), dove questo famoso stile classico fu prodotto per la prima volta nel 1842, ha un'acqua molto dolce e produce birre rinomate per il loro carattere complesso con un aroma floreale di luppolo e un finale secco. L'acqua di Dortmund (Germania) contiene quantità notevoli sia di bicarbonato che di cloruro che aiutano nella produzione di *lager* maltate e corpose, meno aromatiche di una Pilsner. I principali ioni presenti nella maggior parte dei liquori di birra sono calcio, magnesio, sodio, potassio, solfato, cloruro, bicarbonato, carbonato e nitrato. Altri elementi sono presenti ma solo in piccole quantità e sono noti come oligoelementi. Va ricordato che anche i

materiali per la produzione di birra sono una fonte di alcuni di questi ioni; la maggior parte del magnesio, del potassio e del fosfato nel mosto proviene da questa fonte¹⁶.

City	Calcium	Magnesium	Na ⁺¹	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻¹	Bicarbonate	Beer Style
Burton	352	24	44	820	16	320	India Pale Ale
Dortmund	225	40	60	120	60	220	Export Lager
Dublin	118	4	12	54	19	319	Dry Stout
Edinburgh	100	18	20	105	45	160	Scottish Ale
London	52	32	86	32	34	104	British Bitter
Munich	109	21	2	79	36	171	Oktoberfest
Pilsen	10	3	3	4	4	3	Pilsener
Vienna	163	68	8	216	39	243	Vienna Lager

Figura 13 Valori di durezza delle acque di produzione più famose

Alcuni ioni possono anche precipitare durante il processo di fermentazione, più precisamente durante la pausa e altri possono essere assorbiti dal lievito; ciò significa che i sali inorganici presenti nella birra sono molto diversi da quelli presenti nell'acqua di fermentazione utilizzata. La presenza di alcuni minerali (es. Ferro) viene evitata dai birrai perché può avere un'azione negativa come pro-ossidante accelerando così il raffinamento della birra e di conseguenza il suo deterioramento. D'altra parte, il ferro è stato utilizzato come stabilizzatore della schiuma, ma la sua aggiunta alla birra non è molto comune. Tracce di molti metalli sono essenziali per la crescita del lievito, mentre quantità maggiori possono essere tossiche e / o limitate dalle normative. Quando non è indicato il limite specifico per la birra, di solito vengono applicati i limiti per la birra potabile. La birra è citata come un'importante fonte alimentare di selenio e l'elevato rapporto potassio: sodio (4: 1) è coerente con una dieta a basso contenuto di sodio. Il lievito è una fonte di enzimi. Ciò a sua volta aumenterà la saccarificazione e la proteolisi, portando ad un aumento della resa dell'estratto e ad un aumento dell'azoto solubile. L'abbassamento del pH può ridurre sufficientemente la viscosità del mosto per una filtrazione più rapida. Inoltre, i polifenoli (i cosiddetti tannini) vengono estratti in misura minore a un pH più basso, producendo birre meno astringenti con meno colore. Il calcio

durante la filtrazione del mosto favorisce una filtrazione rapida e brillante che diminuisce l'estrazione di sostanze astringenti e coloranti. Durante il processo di ebollizione gli ioni di calcio sono essenziali per avere una buona formazione di rotture poiché aiutano la precipitazione di proteine e altre sostanze che potrebbero altrimenti causare la formazione di foschia della birra. Il calcio favorisce la flocculazione e la sedimentazione del lievito durante la fermentazione primaria e, durante la maturazione, migliora la chiarificazione, la stabilità e il sapore del prodotto finale. Gli ioni calcio iniziano la precipitazione dell'ossalato derivato dal malto che continua a precipitare durante il processo di fermentazione. Quando questi ioni non sono sufficienti, la precipitazione dell'ossalato potrebbe essere ritardata e, in alcuni casi, causare problemi di foschia e schiuma nella birra finita. Di solito si consiglia un rapporto Ca: ossalato di 4: 1, ma alcuni produttori di birra sostengono il rapporto 10: 1 per prevenire la formazione di foschia. Troppo calcio, tuttavia, può portare a un'intensa precipitazione di fosfati che causano un mosto povero di un nutriente vitale per il lievito. L'alto contenuto di calcio tende anche a diminuire l'estrazione delle resine del luppolo e ritardare l'isomerizzazione degli acidi.

2.4 I cereali

In seguito alla definizione di legge descritta precedentemente abbiamo appurato che la birra è una bevanda alcolica che deriva dalla fermentazione degli zuccheri contenuti negli amidi dei cereali che, durante il processo fermentativo, si trasformano in alcool etilico e anidride carbonica per mano del lievito. Il cereale più sfruttato e utilizzato per la birrificazione è l'orzo e viene impiegato nella fase di maltaggio, in cui si produce mosto adatto alla fermentazione da parte del lievito; può, però, essere sostituito da altri cereali come il frumento, il mais, il riso, l'avena e il miglio classificati come "sucedanei", ossia materie prime sostitutive dell'orzo maltato. Come ingrediente principale nella produzione della birra, ad eccezione dell'acqua, l'orzo maltato svolge un ruolo cruciale nel determinare il modo in cui procede la fermentazione. Un mosto adatto per la fermentazione contiene non solo gli zuccheri fermentescibili (glucosio, fruttosio, saccarosio, maltosio e maltotriosio) necessari per la produzione di etanolo, ma anche un adeguato apporto di nutrienti, tra cui FAN e lipidi, per supportare la crescita dei lieviti e l'attività metabolica. I componenti derivati dall'orzo influenzano la qualità della birra attraverso gli effetti sulla fisiologia del lievito e anche direttamente attraverso la loro influenza sul gusto, la sensazione in bocca, la stabilità del sapore e la

stabilità fisica. Per quanto riguarda l'apporto di macronutrienti al prodotto finale, l'orzo, essendo l'ingrediente principale dopo l'acqua, fornisce la maggioranza delle proteine contenute nel prodotto finale, al contrario del luppolo e lievito che ne forniscono una quantità irrisoria e trascurabile. Le proteine hanno un'influenza relativamente minore sulle prestazioni di fermentazione del lievito a causa del basso livello di attività della proteasi extracellulare delle cellule di lievito, ma è di fondamentale importanza nel determinare gli attributi di qualità della birra, inclusa la stabilità della schiuma, formazione di foschia, colore e sapore. Il contenuto proteico dell'orzo è influenzato da diversi fattori, tra cui il genotipo e l'ambiente in cui cresce. Questo problema è ben conosciuto dai produttori di orzo che, nel tempo, hanno selezionato cultivar con un ridotto contenuto di proteine totali. In particolare, è stato osservato che le cultivar di malto d'orzo di oltre 50 anni fa che sebbene avessero lo stesso contenuto di proteine delle cultivar nordamericane presentavano un aumentato rapporto tra le proteine solubili e quelle totali. L'ottimizzazione del contenuto di proteine del grano dell'orzo è fondamentale, poiché livelli troppo alti possono ridurre l'estratto di malto, mentre livelli troppo bassi possono ridurre il potere diastatico. Il contenuto proteico è ulteriormente influenzato dalla maltazione e dipende anche dalle condizioni di processo. Le proteine dell'orzo e dell'orzo maltato sono composizionalmente diverse e la comprensione di questa diversità è una questione chiave, poiché è noto che diversi tipi di proteine influenzano in modo differenziato la qualità della birra. Ad esempio, hanno identificato 81 diverse proteine dell'orzo nella birra mediante elettroforesi 2-D e spettrometria di massa e hanno dimostrato che la composizione delle proteine della birra influenza in modo significativo la formazione di schiuma. Le proteine dell'orzo, oltre alla loro influenza diretta sulla qualità della birra, sono di fondamentale importanza come fonti di azoto liberamente disponibile sotto forma di amminoacidi. Mentre il mosto di birra contiene una serie di altre fonti di azoto assimilabili, inclusi oligopeptidi a catena corta, acidi nucleici, ammoniaca e ammine, la fonte di azoto meglio compresa e più abbondante disponibile per il lievito è sotto forma di amminoacidi, con tutti gli amminoacidi fisiologici presenti. Gli amminoacidi sono resi disponibili sia durante il maltaggio che durante l'ammestamento e diversi fattori influenzano la loro concentrazione e composizione nel mosto. Questi includono la varietà dell'orzo, la fertilizzazione, l'attività della proteasi durante il maltaggio, l'ammestamento e le fasi del processo come l'ebollizione e la separazione del mosto. Questi amminoacidi vengono assorbiti in sequenza dal lievito durante la fermentazione, infatti, sono stati raggruppati in quattro classi in base alla loro velocità di assorbimento. Questi sono costituiti dal gruppo A (inclusi arginina, asparagina, aspartato, glutammato, lisina, serina e treonina), che vengono assorbiti più facilmente; i gruppi B e C ripresi successivamente; e il gruppo D, che consiste solo di prolina e tipicamente non è utilizzato durante la fermentazione anaerobica a causa del fabbisogno di ossigeno della prolina ossidasi¹⁶⁷. Sia

la composizione dell'amminoacido totale libero (FAN) che quella degli amminoacidi sono determinanti importanti delle prestazioni di fermentazione e della qualità del prodotto. L'uso ormai comune di aggiunte ricche di zuccheri e poveri di sostanze nutritive nella produzione della birra ha portato a una situazione in cui i mosti hanno comunemente un basso rapporto N-C, che può portare a una fermentazione incompleta a causa della carenza di azoto del lievito. In tali condizioni, la carenza nutrizionale può essere corretta fornendo una fonte esogena di aminoacidi come un "lievito alimentare" commerciale. Potrebbero essere introdotti anche singoli integratori di aminoacidi, sebbene la loro efficacia dipenda dall'amminoacido scelto. Infatti, è stato riportato un miglioramento nelle fermentazioni del mosto di frumento quando è stato introdotto l'acido glutammico (3 g / L), mentre non è stato osservato alcun miglioramento con la glicina e una fermentazione relativamente scarsa è stata osservata quando è stato utilizzato un integratore di lisina. È improbabile che un mosto di malto richieda tale integrazione, poiché i livelli di FAN sono normalmente adeguati (> 150 ppm)¹⁴⁷.

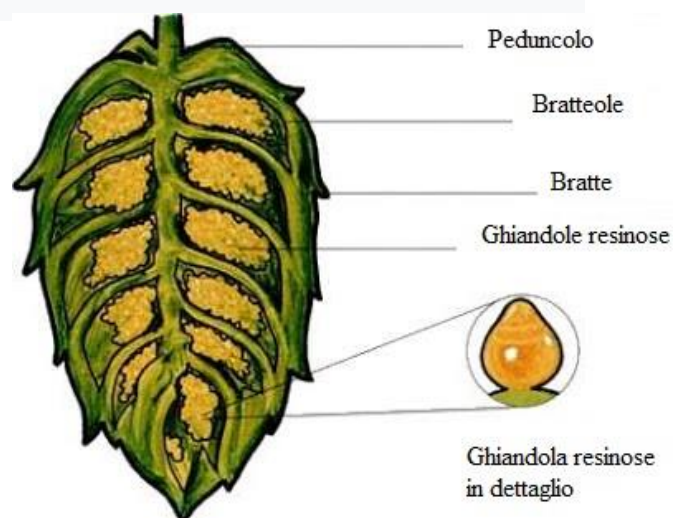
Per un birraio, spesso, ciò che è di rilievo è la resa dell'estratto, il colore potenziale, la chiarezza e il sapore. Dal punto di vista dell'agricoltore ciò che è di rilievo è la certezza che un raccolto crescerà bene e sarà versatile in diverse condizioni climatiche stagionali. I maltatori necessitano di varietà in grado di garantire la disponibilità di materie prime di buona qualità, prive di malattie e che richiedono il minimo input di lavorazione. I produttori di birra hanno anche bisogno che tali materie prime e malto non diano luogo a problemi di lavorazione o contaminazione negativa fornendo al contempo una buona nutrizione del lievito e contribuendo al colore e / o al sapore. Per molti anni, i coltivatori hanno utilizzato la loro vasta conoscenza dei fenotipi delle piante per determinare quelli migliori per la selezione da incroci che possono contenere 30.000 piante singole. Negli ultimi anni sono stati aiutati dalla selezione assistita da marker o dalla genomica. In alcuni casi è stato possibile collegare sequenze genetiche con attributi specifici di orzo o malto e quindi selezionare o promuovere l'effetto di quelle sequenze in nuove varietà²⁴.

2.5 Il luppolo

Il genere *Humulus* appartiene alla famiglia delle *Cannabaceae*, come sono il genere *Cannabis* e generi classificati nella famiglia *Celtidaceae*. Il genere *Humulus* è rappresentato da tre specie principali: *H. lupulus* L., *H. scandens* E *H. yunnanensis* Hu¹⁰⁸. Questa pianta rampicante dioica, nota come luppolo comune, si sviluppa spontaneamente in siepi e bordi di regioni temperate dell'Europa, dell'Asia e del Nord America. Questa specie può essere classificata in cinque varietà: var. *lupulus* in Europa e Asia occidentale, var. *cordifolius* in Asia orientale, var. *lupuloides*, *neomexicanus* e *pubescens* in Nord America¹²³. Il fusto erbaceo del luppolo può così raggiungere 10 metri di altezza avvolgendo un supporto, che può essere anche un'altra pianta; ed è proprio questa caratteristica che ne fornisce l'epiteto "lupulus" che significa "piccolo lupo" riferita alla sua abitudine vagante su altre piante. Da un punto di vista botanico, le infiorescenze femminili sono composte da brattee fogliacee incastonate in coni (chiamate anche strobila), mentre le piante di luppolo maschio portano piccoli fiori organizzati in grappoli. Alla base dei coni femminili si trovano dei tricomi ghiandolari situati nelle ghiandole lupoliniche, dove vengono biosintetizzati alcuni metaboliti secondari, compresi i terpenoidi (costituenti del

olio essenziale) e composti fenolici, tra cui acilfloroglucinololi prenilati (acidi e b) e flavonoidi prenilati. Questi composti sono presenti sin dalla formazione di coni, e poi si accumulano durante tutta la loro maturazione, ad eccezione del b-acidi che raggiungono il loro contenuto massimo nella seconda fase di sviluppo (da metà a fine agosto)⁴⁶. Il luppolo è una pianta di interesse economico e sociale, infatti, le sue infiorescenze femminili (luppolo) vengono impiegate nella

produzione di birra ed è per questa motivazione che essa è coltivata in tutto il mondo. L'evoluzione del mercato della birra ha contemporaneamente influenzato la produzione e coltivazione del luppolo. Attualmente e in tutto il mondo c'è un rinnovato interesse per le birre artigianali con una tendenza per le birre luppolate e il dry hopping (luppolatura a freddo). Ciò ha permesso quindi l'incremento delle aree destinate al luppolo, in particolare, le cultivar di amarezza che stanno prevaricando sulle cultivar aromatiche e più ricche di oli essenziali (USDA, United States Department of Agriculture ,2017, National hop report). Da un punto di vista paleobotanico, il



luppolo trovò habitat favorevoli a crescere dopo l'apertura delle foreste naturali nella metà dell'Olocene (epoca storica relativa a circa 12.000 anni fa)¹⁷. I primi aumenti di siti dedicati alla coltivazione del luppolo avvennero all'inizio del Medioevo, in corrispondenza dall'incremento della produzione birraia e dal ruolo che il luppolo ricopriva in qualità di ingrediente; infatti, dopo l'introduzione del luppolo nel processo di birrificazione caddero in disuso tutte le altre specie aromatiche vegetali che andavano a costituire il *gruit*, già definito in precedenza. Questo cambiamento è stato dovuto all'economia e ragioni politiche, ma anche per una migliore conservazione delle birre prodotte con questa Cannabaceae⁷⁸. L'utilità del luppolo nella birra è stata evidenziata tra l'undicesimo e il dodicesimo secolo da Hildegarde de Bingen, una badessa benedettina considerata la fondatrice della storia naturale scientifica in Germania: "la sua amarezza respinge la decomposizione delle bevande e aumenta la *shelf-life* del prodotto"¹⁶¹. Queste proprietà sono principalmente attribuite a derivati del fluoroglucolino, chiamati acidi amari, in particolare α -acidi. Oggi, le principali aree di coltivazione si trovano in Europa (Germania, Repubblica Ceca, Polonia, Slovenia e Regno Unito), nell'emisfero settentrionale (Stati Uniti), nonché in Australia e nell'emisfero meridionale (Nuova Zelanda)⁶⁰. La produzione mondiale di luppolo varia da 80.000 a 100.000 tonnellate per anno (circa 50.000 tonnellate in Europa), che corrisponde a una produzione di 8000-10.000 tonnellate di α -acidi.

Le cultivar vengono selezionate in base al loro contenuto in acidi. Durante la fase di "boiling" (bollitura dopo l'aggiunta del luppolo), questi α -acidi vengono convertiti in solubili in acqua iso- α -acidi. Rimarranno nella birra fino alla fine del processo di produzione (Simpson WJ, Smith AR, 1992, Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. J Appl Bacteriol 72(4):327-334)¹⁹.

COMPOSIZIONE

Ora, in seguito all'introduzione, affrontiamo il tema più importante dal punto di vista tecnologico e di impiego, ovvero la composizione. Il luppolo è formato principalmente da quattro composti:

- 1) Proteine (20%): apparentemente molto presenti, ma è noto che solo il 30-50% passa in soluzione e quindi poco importanti a livello aromatico.

2) Polifenoli (4%): sono composti formati per l'80% da tannini, flavonoidi, catechine e proantocianidine, molto importanti per la loro qualità di antiossidante, capacità astringente e per l'influenza che hanno sulla texture finale del prodotto (colore e aspetto). Essi danno composti di colore rosso/bruno (flobafeni) e possono anche formare composti di colore nero se combinati con il ferro.

3) Resine: le resine sono definite come sostanze amare composte da

- α -acidi o umuloni (3-17%) sono composti da umulone, coumulone e adumulone. Sono debolmente acidi e di per sè poco amari e molto poco solubili in acqua o nel mosto; grazie però ad una reazione detta isomerizzazione gli α -acidi si possono trasformare in iso- α -acidi che hanno stessa composizione, ma struttura diversa. Tale reazione viene fortemente favorita dal calore ed è proprio per questo che il luppolo viene inserito nella fase di bollitura. In questa nuova forma gli α -acidi sono

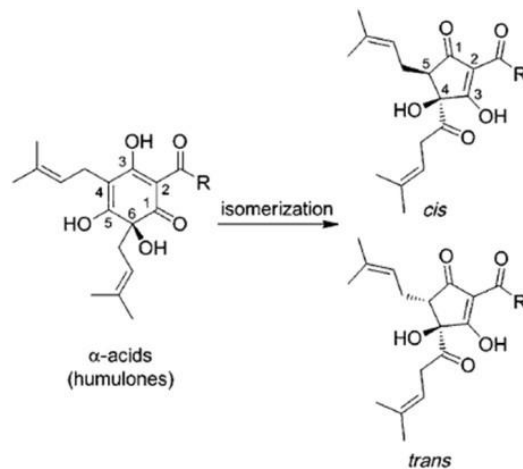


Figura 14 Reazione di isomerizzazione degli alfa acidi

facilmente solubili e possono apportare il classico gusto di amaro circa dieci volte più amaricante rispetto ai β -acidi.

Il concetto di potere amaricante e di amaro è sempre più considerato tant'è che è stata anche sviluppata una formula che definisca questo parametro basata appunto sulla concentrazione percentuale degli iso- α -acidi. Questo nuovo acronimo birrario nasce in conseguenza al successo sempre maggiore delle birre luppolate e non è altro che una scala internazionale per misurare l'amaro di una birra (Figura 14).

$$\begin{array}{c}
 \text{WEIGHT OF THE HOPS} \\
 | \\
 W_h \\
 \\
 \text{ALPHA ACID PERCENTAGE} \\
 | \\
 AA\% \\
 \\
 \text{QUANTITY OF ALPHA USED DURING BOILING PROCESS} \\
 | \\
 U_{aa} \\
 \\
 \hline
 \\
 \text{VOLUME OF WORT IN GALLONS} \\
 | \\
 V_w \\
 \\
 \text{ADJUSTMENT FOR U.S. CUSTOMARY UNITS} \\
 | \\
 1.34 \\
 \\
 \hline
 \\
 \text{IBUs} \\
 \text{International Bitterness Units} \\
 \\
 \text{IPA.BEER.COM}
 \end{array}
 =$$

Figura 15 Formula per calcolare l'amaro di una birra

- β -acidi o lupuloni (2-7%) sono composti da lupulone, colupulone e adlupulone, il destino di questi composti è quello di trasformarsi in seguito a maturazione, in α -acidi molto più amaricanti.

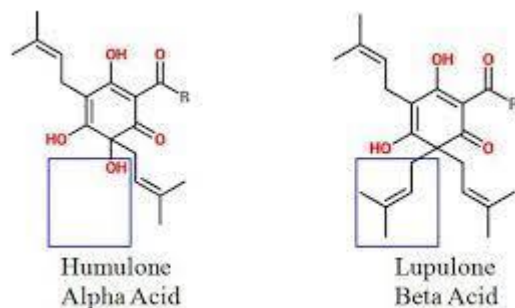


Figura 16 Confronto struttura di un alfa acido (Humulone) e un beta acido (Lupulone)

- 4) Per oli essenziali intendiamo una miscela complessa formata da oltre 250 sostanze aromatiche prodotte dalle ghiandole lupoliniche, presenti dallo 0,5% al 3%. Sono sostanze estremamente volatili e molto sensibili alla bollitura, infatti, una parte del luppolo viene aggiunta anche dopo questo processo a discapito dell'isomerizzazione degli acidi per poter garantire una conservazione maggiore degli oli essenziali. Possono essere classificati in:

- Monoterpeni (mircene, β -farnesene)
- Sesquiterpeni (α -umulene, β -cariofillene)
- Alcoli (linalolo)
- Esteri (2- metilpropilisobutirrato)
- Acidi carbossilici (acido 2-metil-butirrico)
- Sulfidi (1,2 epitioumulene)

In base al rapporto tra questi oli otterremo un diverso e particolare aroma. Data questa enorme diversità il luppolo può apportare una svariata gamma di aromi alla birra: aroma floreale tipico dei luppoli inglesi. Si ottiene quando il rapporto tra mircene e umulene è simile, al contrario dell'aroma agrumato tipico dei luppoli americani derivante da una maggioranza di mircene rispetto all'umulene. Il luppolo europeo ha un aroma erbaceo e speziato dato dalla maggioranza del mircene rispetto all'umulene e dalla maggioranza di farnesene nei confronti del cariofillene. Infine, il luppolo proveniente dalla Nuova Zelanda produce un aroma con uno spiccato senso di frutta tropicale.

2.6 Il lievito

Il lievito è la parte più importante del processo di fermentazione della birra. Il lievito converte lo zucchero in alcol, anidride carbonica e altri composti che influenzano il sapore e l'aroma della birra. Il lievito di birra è un eucariota e appartiene al regno dei funghi. Secondo alcune classificazioni scientifiche, tutti i ceppi di lievito per la produzione di birra sono collocati nel genere *Saccharomyces* (fungo dello zucchero) e specie *cerevisiae*¹⁶³. Tuttavia, l'industria della birra utilizza una classificazione che divide il lievito in due tipi: lievito di birra *Ale* (*S. cerevisiae*) e lievito di birra *Lager* (*S. carlsbergensis*)²⁶. La maggior parte degli organismi nel regno dei funghi sono multicellulari; tuttavia, il lievito è un organismo unicellulare. Una singola cellula di lievito misura circa 5-10 μm di diametro ed è solitamente di forma sferica, cilindrica o ovale²¹. Il lievito si presenta in singole, coppie, catene e grappoli. La Figura

16 è un diagramma semplificato della struttura delle cellule di lievito. La parete cellulare è una barriera composta principalmente da carboidrati che circondano la cellula con una struttura rigida spessa circa 250 nm e costituisce il 25% del peso a secco della cellula¹⁵³. Ci sono tre strati reticolati che compongono la parete cellulare: lo strato interno è uno strato di chitina (un polimero a catena lunga di un N-acetilglucosamina), composto principalmente da glucani; lo strato esterno è composto principalmente da mannoproteine, mentre lo strato intermedio è una miscela sia dello strato interno che di quello esterno¹⁶⁷. Durante la riproduzione asessuata, in cui una cellula di lievito si clona creando così una nuova cellula figlia, la parete cellulare ha la capacità di separare i suoi strati per permettere la separazione cellulare, lasciando la cicatrice del germoglio sulla cellula madre e la cicatrice del parto sulla cellula figlia. La cicatrice del germoglio è composta principalmente da chitina. La cellula di lievito di birra media non germoglierà più di 30 volte durante la sua vita, mentre il lievito di birra germoglierà solo 20 volte prima di non poter germogliare ulteriormente. A separare l'interno della cellula dall'ambiente esterno vi è anche un'ulteriore membrana, detta membrana plasmatica, composta da un doppio strato lipidico

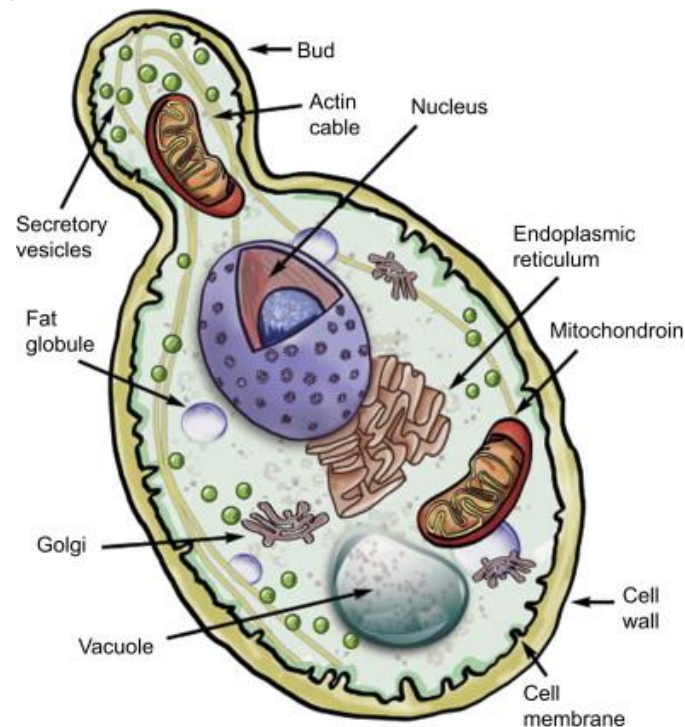


Figura 17 caratteristiche principali di una cellula di lievito

semipermeabile che svolge numerosi ruoli, come fornire una barriera alla libera diffusione dei soluti, catalizzare specifiche reazioni di scambio, immagazzinare la dissipazione di energia, fornire siti per legare molecole specifiche coinvolte nelle vie di segnalazione metabolica e fornire una matrice di supporto organizzata per il sito delle vie enzimatiche coinvolte nella biosintesi di altri componenti cellulari⁷¹. La membrana plasmatica è abbastanza fluida e flessibile grazie ai suoi costituenti: lipidi, steroli e proteine. La fluidità della membrana è una caratteristica fondamentale e necessaria per il corretto funzionamento della membrana. I doppi strati lipidici sono per loro natura fluidi e tale fluidità è determinata dalla misura in cui i lipidi si legano l'uno all'altro. La formazione di doppi legami negli acidi grassi controlla il loro livello di saturazione. Il livello di saturazione determina la facilità e l'entità dell'interazione idrofobica che può verificarsi tra gli acidi grassi; controllando il livello di saturazione nelle loro membrane lipidiche, le cellule di lievito sono in grado di mantenere la corretta fluidità della membrana a diverse temperature, che è importante durante la fermentazione. Senza un'adeguata aerazione, le cellule di lievito non sono in grado di controllare la fluidità della membrana fino alla fine della fermentazione, il che porta all'arresto delle fermentazioni e ai sapori sgradevoli del prodotto finale¹⁶⁸. Il citoplasma è quella porzione della cellula racchiusa dalla membrana plasmatica che isola altri organelli legati alla membrana; è un liquido colloidale acquoso contenente una moltitudine di metaboliti²⁶. Il citoplasma contiene fluido intercellulare noto come citosol dentro il quale si trovano enzimi coinvolti nella fermentazione anaerobica che consentono alla cellula di convertire il glucosio in energia immediatamente dopo che è entrato nella cellula, al contrario della respirazione aerobica che avviene all'interno del mitocondrio: organello formato da una doppia membrana, luogo della conversione del piruvato (un composto metabolico) e del ciclo dell'acido tricarbossilico. Il nucleo immagazzina il DNA cellulare ed è delimitato da una membrana lipidica che lo avvolge, simile alla membrana plasmatica. La cellula utilizza l'mRNA per trasferire le informazioni nel citoplasma per l'uso nella sintesi proteica. Il vacuolo è una struttura legata alla membrana che immagazzina i nutrienti ed è anche il luogo in cui la cellula scompone le proteine, processo che prende il nome di proteolisi. Gran parte della regolazione della proteolisi sia specifica che aspecifica coinvolge il sequestro di proteine bersaglio in vacuoli dove sono esposte a proteinasi e, successivamente, degradate²⁶. Infine, il reticolo endoplasmatico è una rete di membrane ed è solitamente il luogo in cui la cellula produce proteine, lipidi e carboidrati per membrane e secrezione.

SACCHAROMYCES CEREVISIAE, SACCHAROMYCES CARLSBERGIS E LIEVITI NATURALI

Lo scopo della fermentazione è produrre birra attraverso l'idrolisi dell'amido dal malto d'orzo, insieme a grano, mais, riso, sorgo, orzo non maltato, zucchero / sciroppi e incorporazione di luppolo. Queste materie prime vengono schiacciate in un liquido fermentabile azotato zuccherino chiamato mosto. Questo mezzo viene convertito in una bevanda alcolica gassata dal lievito. Il processo di produzione della birra è essenzialmente una serie di reazioni microbiologiche / biochimiche. Sono state identificate oltre 1500 specie di lievito. Si tratta di microrganismi fungini prevalentemente unicellulari in grado di crescere sia in presenza che in assenza di ossigeno. Di questi, ci sono fondamentalmente due ceppi principali utilizzati nella produzione della birra: *Saccharomyces cerevisiae* (*ale*) e *Saccharomyces Carlsbergis* (*lager*), un ibrido di *S. cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus*.

Le differenze tra il lievito utilizzato nella produzione di birra *Lager* e birra *Ale* sono piccole. Tradizionalmente, il lievito relativo alla birra *Ale* era considerato come fermentatore di alta qualità che sviluppa una schiuma di lievito sulla superficie della birra in fermentazione, che veniva scremata per essere utilizzata per le successive birre, mentre i lieviti *Lager* erano fermentatori di fondo che formavano una piccola schiuma superficiale e venivano recuperati dal fondo del fermentatore. Oggi, questa è una distinzione meno utile in quanto molti tipi di lievito di birra ora hanno la capacità di cadere dalla soluzione e depositarsi sul fondo del fermentatore. Invece, una valida distinzione è quella relativa alle temperature di attività e crescita delle due specie su cui sono basati i due processi di produzione. Le fermentazioni *lager* avvengono tra gli 8 e 15 ° C, e per le fermentazioni *Ale*, 18-22 ° C¹. I lieviti *Lager* e *Ale* possono anche essere distinti dalla capacità dei ceppi di fermentare il disaccaride melibiosio, ciò è possibile nei ceppi *Lager* perché hanno attività α -d-galattosidasi, che idrolizza il melibio in galattosio e glucosio mentre i ceppi *Ale* non possono. Tuttavia, questo non ha alcuna importanza pratica poiché lo zucchero non si trova nel mosto²⁵. Infine, dopo aver visto le fermentazioni relative ai lieviti *lager* e *ale*, vi è un ultimo caso ed è quello relativo alle birre *Lambic*, ovvero tutte quelle birre che si producono in base a una fermentazione spontanea da parte di lieviti di origine naturale che potranno fornire aromi e sapori unici. Il processo è estremamente lungo, infatti, può durare anche diversi anni in cui i lieviti naturalmente presenti svolgono le loro attività metaboliche caratterizzando i bouquet e le note aromatiche della birra così come la spuma e la ricchezza del corpo.

3. GLI ENZIMI

La presenza di enzimi in natura è nota da oltre un secolo. Tuttavia, il primo enzima ureasi fu isolato in forma cristallina dal “Jack bean” da James B. Sumner nel 1926¹⁵⁵. Gli enzimi, noti anche come biocatalizzatori, sono una sostanza biologica che avvia o accelera la velocità di una reazione biochimica in un organismo vivente, senza che essa stessa venga consumata nella reazione. Sebbene gli enzimi siano prodotti all'interno delle cellule viventi, possono lavorare attivamente in vitro e quindi risultare utili nei processi industriali. Gli enzimi sono molecole proteiche complesse e sono i biocatalizzatori naturali prodotti dagli organismi viventi per catalizzare le reazioni biochimiche necessarie per sostenere la vita. Per lo più gli enzimi sono proteine, ma non tutti. RNA e anticorpi possono anche agire come catalizzatori noti rispettivamente come ribozimi e abzimi. La letteratura ha suggerito che più di 5000 tipi di reazioni biochimiche sono catalizzate dagli enzimi¹⁴⁴.

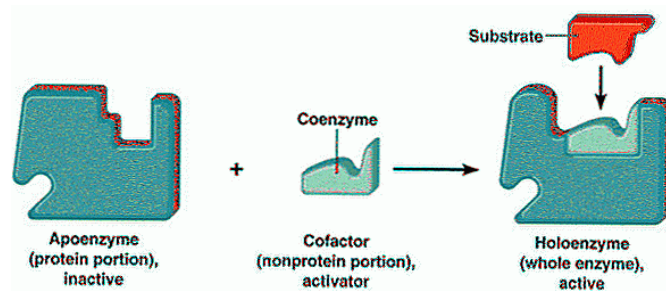


Figura 18 Formazione dell'oloenzima

Analogamente ad altri catalizzatori chimici, gli enzimi sono anche molto efficaci nell'aumentare la velocità delle reazioni biochimiche che altrimenti procedono molto lentamente, o in alcuni casi, per niente. Un esempio comune è la scomposizione degli alimenti, che comprende principalmente proteine, carboidrati e grassi, nei loro costituenti di base. Normalmente la si ottiene entro 3–6 ore, a seconda del tipo e della quantità di cibo. Tuttavia, in assenza di enzimi, questa scomposizione dei prodotti alimentari richiederebbe > 30 anni. Rispetto ai catalizzatori chimici, gli enzimi hanno un'azione più specifica e possiedono elevate proprietà catalitiche. Inoltre, gli enzimi possono essere immobilizzati su materiale di supporto inerte, senza perdita di attività, che ne facilita il riutilizzo e il riciclaggio. La maggior parte degli enzimi, ma non tutti, richiede una piccola molecola per svolgere la loro attività di catalizzatore. Queste molecole sono note come cofattori o coenzimi. I cofattori sono composti chimici non proteici che si legano a una parte proteica inattiva dell'enzima (apoenzima) al fine di aumentare l'attività biologica dell'enzima necessario per la sua funzione. Il

complesso attivo dell'apoenzima (parte proteica) insieme al cofattore (coenzima o gruppo protesico) è indicato come oloenzima (Fig. 18).

Il cofattore è anche considerata una "molecola aiutante" perché aiuta nelle trasformazioni biochimiche. Esistono due tipi di cofattori: coenzimi e gruppi prostetici. I coenzimi sono un tipo specifico di cofattore e sono molecole organiche che si legano agli enzimi e aiutano nelle loro funzioni. Le molecole organiche sono semplicemente le molecole che contengono carbonio. Queste molecole spesso si attaccano al sito attivo di un enzima aiutando il trasporto di un substrato o prodotto, inoltre, possono anche trasferire gruppi chimici da un enzima a un altro. È importante sottolineare che i coenzimi si legano liberamente all'enzima ma un altro gruppo di cofattori no. I gruppi prostetici (molecole organiche o ioni metallici) sono anche cofattori che spesso si legano strettamente a proteine o enzimi mediante un legame covalente. Una delle caratteristiche significative degli enzimi è la loro specificità per i substrati o le reazioni che catalizzano, il che li rende così importanti come strumento di ricerca e industriale. La specificità degli enzimi può essere di diversi tipi, come assoluta (enzima che interagisce solo con un substrato), di gruppo (che agisce solo su molecole che hanno gruppi funzionali specifici), di legame (enzima che agisce su un particolare tipo di legame chimico) o stereo- chimica (enzima che agisce su un particolare enantiomero)⁵⁷.

3.1 Nomenclatura e classificazione

Ad oggi sono noti migliaia di enzimi e i loro nomi comunemente usati si basano sul tipo di reazione che catalizzano seguito dal suffisso - ase. Ad esempio, l'idrolisi delle proteine è catalizzata dalle proteasi. Ci sono anche alcuni nomi banali per gli enzimi studiati inizialmente come tripsina, pepsina, renina, ecc. Tuttavia, sono appellativi banali che non danno alcuna indicazione della fonte, della funzione o della reazione catalizzata dall'enzima. Così, prima della odierna classificazione, si erano dati agli enzimi una varietà di nomi diversi che non faceva altro che confondere. Quindi, a causa della mancanza di coerenza nella nomenclatura e della rapida crescita nella scoperta degli enzimi, era necessario un modo sistematico per denominare e classificare gli enzimi. L'International Union of Biochemists (IUB) ha sviluppato un sistema univoco di nomenclatura enzimatica in cui ogni enzima ha un nome univoco e un numero di codice a quattro cifre, preceduto da CE e separato

da punti che identificano il substrato su cui esso agisce e il tipo di reazione catalizzata. Questi numeri di codice a quattro cifre, preceduti da CE, forniscono le seguenti informazioni: (1) il primo numero di codice CE indica l'appartenenza a una delle sei classi principali dell'enzima, (2) il secondo numero di codice CE denota una sottoclasse, (3) la terza numero indica un'ulteriore sottoclasse e (4) il quarto numero del codice CE è il numero di serie dell'enzima nella sua sottoclasse. Gli enzimi sono classificati in sei classi principali in base al tipo di reazione chimica catalizzata⁵⁷.

CLASSE 1: OSSIDOREDUTTASI (EC 1)

Gli enzimi di questa classe sono coinvolti nelle reazioni redox in cui gli atomi di idrogeno o di ossigeno o gli elettroni vengono trasferiti tra le molecole. Gli enzimi inclusi in questa classe sono le deidrogenasi, che sono coinvolte nel trasferimento di idruro, ossidasi responsabili del trasferimento di elettroni all'ossigeno molecolare, ossigenasi coinvolte nel trasferimento di ossigeno dall'ossigeno molecolare e perossidasi che facilitano il trasferimento di elettroni al perossido. Ad esempio: glucosio ossidasi (EC 1.1.3.4).

CLASSE 2: TRASFERIMENTI (EC 2)

Gli enzimi di questa classe catalizzano il trasferimento di gruppi funzionali specifici (es. Alchil-, glicosil-, ecc.) tra due molecole, ma escludendo ossidoreduttasi e idrolasi, ad esempio, aspartato aminotransferasi (EC 2.6 .1.1).

CLASSE 3: IDROLASI (EC 3)

Gli enzimi di questa classe sono noti anche come enzimi idrolitici e sono coinvolti nelle reazioni idrolitiche e nella loro inversione (viene usata l'acqua per scindere i legami chimici). Esempi di

idrolasi comuni includono proteasi, glicosidasi, esterasi, nucleosidasi e lipasi, ad esempio fosfatasi alcalina (EC 3.1. 3.1).

CLASSE 4: LIASI (EC 4)

Gli enzimi di questa classe sono coinvolti nelle reazioni di eliminazione. Questa è la rimozione non idrolitica di un gruppo di atomi dal substrato. Gli enzimi di questa classe sono decarbossilasi, aldolasi, disidratasi e alcune pectinasi, ma non includono idrolasi; un esempio può essere istidina carbossi-liasi (EC 4.1.1.22).

CLASSE 5: ISOMERASI (EC5)

Gli enzimi di questa classe catalizzano l'isomerizzazione molecolare (trasferimento di gruppi all'interno delle molecole). Esempi di isomerasi includono epimerasi, racemasi e transferasi intramolecolari, ad esempio: xilosio isomerasi (EC 5.3.1.5).

CLASSE 6: LIGASI (EC 6)

Gli enzimi di questa classe sono noti anche come sintetasi e sono coinvolti nella reazione di condensazione. L'unione di due molecole comporta la formazione di legami covalenti, insieme all'idrolisi di un nucleoside trifosfato, ad esempio, glutatione sintasi (EC 6.3.2.3)⁵⁷.

UNITA' ENZIMATICHE

La quantità di un enzima in una specifica reazione biochimica viene solitamente determinata misurando la velocità della reazione. L'attività di un enzima è espressa in unità enzimatiche. La

Commissione Enzimatica dell'Unione Internazionale di Biochimica raccomanda di esprimerlo in Unità Internazionali (UI) che è l'unità di attività enzimatica più utilizzata. Una UI è definita come la quantità di enzima che catalizza la conversione di una micromole di substrato al minuto in condizioni standard di temperatura, pH ottimale e concentrazione ottimale del substrato. Inoltre, al fine di aderire alle unità SI, la Commissione sulla nomenclatura biochimica ha raccomandato che le velocità di reazione fossero espresse in moli al secondo e ha proposto un'altra unità di attività enzimatica nota come katal (kat). Un katal è definito come la quantità di enzima che catalizza la conversione di una mole di substrato al secondo. La grandezza del katal è pari a $1 \text{ UI} = 16,7 \text{ katal}$; dal punto di vista pratico, però, c'è una riluttanza a usarlo. La precedente UI è l'unità di misura più utilizzata nel descrivere e misurare la maggior parte dei preparati enzimatici⁸⁰. L'attività specifica di un enzima è il numero di unità enzimatiche per milligrammo di proteine. Pertanto, il valore dell'attività specifica è indicato come unità / mg ed è una misura importante della valutazione della purezza dell'enzima.

3.2 Caratteristiche principali

Gli enzimi rappresentano la classe di proteine più numerosa; il loro numero, infatti, è assai elevato e sembra destinato ad aumentare. Queste macromolecole possiedono la specifica capacità di rendere più veloci le innumerevoli reazioni chimiche che si sviluppano all'interno o all'esterno delle cellule dell'organismo, senza consumarsi o alterarsi in modo irreversibile nel corso delle stesse; vengono infatti definiti catalizzatori biologici. Essi sono costituiti da proteine globulari idrosolubili, con peso molecolare variabile da circa 10 000 a oltre 1 000 000 di Dalton. Possono essere costituiti da una sola catena polipeptidica o da più catene unite fra loro da legami generalmente deboli. Alcuni enzimi sono proteine semplici, altri invece sono proteine coniugate (lipoproteine, glicoproteine, metalloproteine ecc.). Gli enzimi sono localizzati in aree ben precise all'interno delle cellule in base alla loro funzione; per esempio, alcuni sono liberi nel citoplasma, altri sono situati nei mitocondri o costituiscono parte integrante delle membrane cellulari. Negli organismi pluricellulari può avvenire che certi enzimi vengano sintetizzati in tessuti diversi da quelli sui quali poi opereranno, ad esempio, gli enzimi digestivi prodotti come proenzimi nel pancreas e utilizzati successivamente a livello intestinale. Alcuni enzimi, oltre alla normale funzione catalitica, possono anche essere impiegati a livello, strutturale, come nel caso della ATPasi miosinica, che è presente nelle miofibrille del tessuto muscolare e consente la contrazione dei tessuti muscolari in presenza di ATP.

Quindi, riassumendo brevemente le principali caratteristiche degli enzimi possiamo concludere dicendo che essi:

- 1) devono essere presenti ed efficaci anche se in piccole quantità.
- 2) Alla fine della reazione non devono risultare modificati e, quindi, devono essere pronti per essere riutilizzati.
- 3) Non devono influenzare l'equilibrio di una reazione chimica reversibile; la loro funzione, infatti, è solo quella di rendere più veloce (talora fino a 10¹⁶ volte) il processo in entrambe le direzioni, modificando il tempo necessario per il raggiungimento dell'equilibrio chimico che può, infatti, essere raggiunto in presenza o in assenza di catalizzatori, siano essi sostanze organiche o inorganiche.
- 4) Devono mostrare un certo grado di specificità, a volte assoluta, altre volte relativa, a seconda che si leghino con un solo tipo di molecola oppure con un numero di composti limitato, ma non unico.

SITO ATTIVO E INTERAZIONE CON IL SUBSTRATO

Il sito attivo è l'area sulla superficie dell'enzima in cui si lega il substrato per effettuare la catalisi a prodotto. Questa zona, spesso paragonata a una tasca, è in genere di dimensioni assai limitate. Tale area occupa una parte relativamente piccola rispetto al volume totale della molecola enzimatica ed è costituito tridimensionalmente da gruppi chimici di aminoacidi appartenenti a parti diverse della proteina globulare. A seguito del *folding* della proteina (processo di ripiegamento molecolare attraverso il quale le proteine ottengono la loro struttura tridimensionale), questi residui vengono quindi a trovarsi fisicamente vicini, pur essendo situati in posizioni anche molto distanti nella struttura primaria. Il legame con il substrato avviene mediante una serie di attrazioni deboli che permettono la formazione del complesso enzima-substrato (ES). I siti attivi sono costituiti da una specie di cavità o fenditura di natura apolare che favorisce il legame con il substrato; in particolari condizioni, tuttavia, anche residui polari possono contribuire alla formazione del sito

attivo. La specificità del legame che avviene fra l'enzima e il substrato dipende dalla precisa disposizione degli atomi del sito attivo. Ne consegue che, per adattarsi a tale sito, il substrato deve possedere una forma appropriata e complementare. Nel 1890 il chimico tedesco Emil Fischer (1852-1919) conì la metafora della «chiave e serratura» per spiegare in modo semplice, ma lineare, le relazioni strutturali fra substrato ed enzima. In realtà, come già postulò il biochimico statunitense Daniel E. Koshland (1920-2007) nel 1958, oggi sappiamo che la forma del sito attivo di alcuni enzimi si modifica profondamente quando viene legato il substrato. In questo caso, i siti attivi degli enzimi presentano forme complementari al substrato solamente dopo che il legame si è verificato. Questo procedimento di riconoscimento dinamico è chiamato dell'adattamento indotto (figura 19).

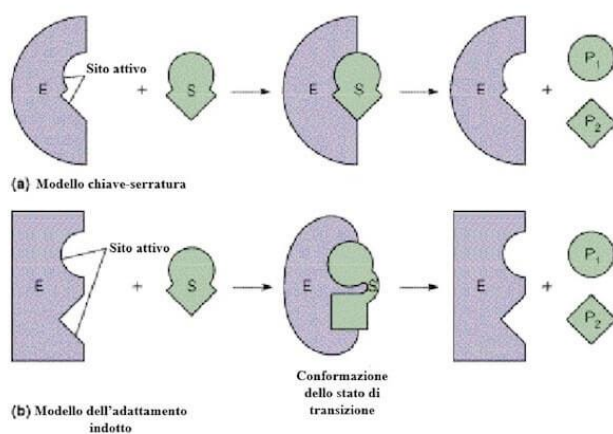


Figura 19 Formazione del complesso ES

SPECIFICITA'

La differenza principale fra la catalisi inorganica e la catalisi enzimatica è data dalla specificità degli enzimi. Gli enzimi hanno sempre una specificità di substrato, che può essere estremamente elevata, infatti, essi sono in grado di riconoscere solo un particolare isomero tra quelli di una molecola (per esempio l' α -glucosio o il β -glucosio). In altri casi la specificità può essere minore, come avviene nel caso della pepsina che agisce su tutti i legami peptidici; in generale, però, la specificità di un enzima è sempre nettamente superiore a quella di un catalizzatore inorganico. Gli enzimi, inoltre, hanno sempre una specificità di reazione, infatti, una volta legati al substrato,

possono catalizzarne solo un tipo di trasformazione (per esempio solo l'idrolisi o solo l'isomerizzazione di un substrato)¹³⁸.

EQUILIBRIO CHIMICO

Una reazione si definisce completa quando tutti i reagenti si trasformano interamente nei prodotti. Se i prodotti possono riconvertirsi nei reagenti si parla di reazione reversibile, in caso contrario si ha una reazione irreversibile. Poiché le reazioni reversibili tendono a ridare sempre i reagenti dai prodotti e viceversa, esse non vanno mai a completamento. Quando però la velocità di reazione diretta e quella inversa si eguagliano, esse si assestano su un equilibrio di reazione dinamico dove i reagenti e i prodotti sono contemporaneamente presenti in concentrazioni costanti, spesso dipendenti da condizioni ambientali come la temperatura. Tali reazioni sono rappresentate da una doppia freccia (\leftrightarrow). Il chimico francese Claude Louis Berthollet (1748- 1822) formulò la reazione generica che definisce l'equilibrio chimico: $aA + bB \leftrightarrow cC + dD$ dove: a, b, c e d rappresentano il coefficiente stechiometrico; A e B rappresentano i reagenti, mentre C e D rappresentano i prodotti. Quando la velocità di reazione netta è pari a zero siamo all'equilibrio e, a temperatura costante, si può ricavare la costante di equilibrio K che indica il rapporto fra le concentrazioni di prodotti e reagenti, ognuna elevata al proprio coefficiente stechiometrico:

$$K = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

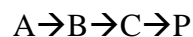
Ogni reazione ha una K specifica e misurabile per ogni temperatura. L'equilibrio della reazione, però, può essere influenzato da fattori esterni, come la variazione di temperatura, di pressione o di concentrazione di reagenti e prodotti; la reazione può quindi spostarsi verso destra o verso sinistra. Il principio di Le Châtelier, formulato nel 1884 dal chimico francese Henri Louis Le Châtelier (1850-1936) è valido per i sistemi in equilibrio, afferma che ogni sistema tende a reagire a una modifica impostagli dall'esterno diminuendone gli effetti.

3.3 Cinetica enzimatica

Come accennato in precedenza gli enzimi influiscono enormemente sulla velocità di una determinata reazione, oggetto di studio della cinetica enzimatica che si basa sulla cinetica chimica. Ora, per comprendere al meglio i prossimi passaggi, è necessario introdurre il concetto di velocità di reazione. Consideriamo una reazione



Nonostante trattiamo questa semplice reazione che descrive la trasformazione di A in P è probabile che si completi attraverso una serie di passaggi in cui B e C rappresentano gli intermedi di reazione.



Supponiamo, ora, che tale reazione sia spontanea e sostanzialmente irreversibile. Per spontanea è intesa una reazione con $\Delta G < 0$ (variazione di energia libera di gibbs, espressa in J) in cui $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$, può anche prendere il nome di reazione esoergonica, ovvero che libera energia sotto forma di calore.

- ΔH è la variazione di entalpia, espressa in J;
- T è la temperatura assoluta, espressa in K;
- ΔS è la variazione di entropia, espressa in J/K;

Ciò è valido in tutti i processi a temperatura e pressione costante; quindi se

$\Delta G = 0$, la reazione è all'equilibrio

$\Delta G < 0$, la reazione procede come scritta

$\Delta G > 0$, la reazione è sfavorita e viene definita endoergonica; cioè, necessita energia

L'irreversibilità della reazione può essere data dalla velocità insufficiente della conversione di P in A, oppure può dipendere dalla concentrazione di P (espressa come [P]) considerata trascurabile. La velocità v di una reazione è definita, quindi, come la quantità formata di P o la quantità consumata di A in un determinato arco temporale t .

$$v = d[P]/dt \quad \text{o} \quad v = -d[A]/dt$$

Dopo aver assimilato il concetto di velocità di reazione è importante capire come gli enzimi possano aumentare tale velocità. In una reazione chimica la conversione di A in P si verifica perché,

in ogni istante, una molecola di A possiede l'energia necessaria per raggiungere una condizione reattiva nota come stato di transizione. Questo stato è rappresentato da un intermedio ad altissima energia che non è considerato né prodotto né substrato e la probabilità che si verifichi il particolare riarrangiamento che accompagna la trasformazione $A \rightarrow P$ è molto alta.

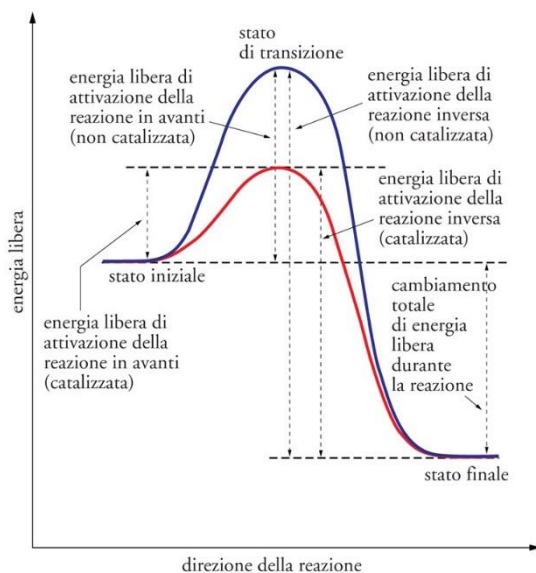
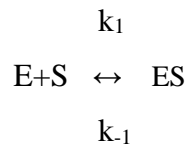


Figura 20 Reazione catalizzata vs reazione non catalizzata

In figura 20 è rappresentato lo schema di come gli enzimi influiscano sul processo di una reazione chimica, in particolare sul ΔG^\ddagger che rappresenta l'energia richiesta per aumentare l'energia di una mole di reagente fino all'energia dello stato di transizione; ed è rappresentato nel grafico come l'altezza tra lo stato iniziale e l'apice della curva dello stato di transizione (R.H. Garret, C.M. Grisham, Biochemistry V Editions, Brooks/Cole a cengage learning company, 2013,).

Come descritto in precedenza ogni enzima possiede un particolare sito che interagisce con il suo specifico substrato. Una molecola enzimatica è, spesso, molto più grande rispetto al substrato con cui interagisce. Il sito attivo è solo una parte della struttura dell'enzima; esso è strutturato per formare una speciale tasca o fenditura la cui struttura è perfettamente complementare al suo substrato specifico. È proprio grazie a questa particolare complementarità che l'enzima e il suo substrato si "riconoscono". Una volta avvenuto il riconoscimento, il substrato si lega all'enzima mediante interazioni deboli, ovvero legami a idrogeno, legami ionici ed interazioni di Van der Waals tra gruppi di atomi stericamente complementari. Per essere considerato buono, un enzima deve essere complementare all'intermedio che si forma durante lo stato di transizione, affinché diminuisca la barriera dell'energia di attivazione. Questo particolare meccanismo viene descritto da

Leonor Michaelis e Maud L. Menten, quando nel 1913 proposero una teoria d'azione generale degli enzimi, basata sull'assunzione che l'enzima [E] ed il suo substrato[S] si associano reversibilmente formando un complesso enzima-substrato [ES].

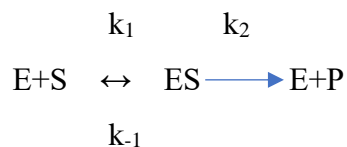


si tratta di un semplice equilibrio associazione/dissociazione in cui k_1 è la costante di equilibrio della reazione diretta mentre k_{-1} è la costante della reazione inversa. La costante della reazione all'equilibrio K_s si può esprimere come

$$K_{-1}[ES]=K_1[E][S]$$

$$K_s=[E][S]/[ES]=K_{-1}/K_1$$

Il prodotto si forma nel passaggio successivo, in cui il complesso ES si rompe per portare alla formazione di E+P.



E, ora è libero di interagire con un'altra molecola di substrato. Come detto in precedenza gli enzimi catalizzano sia la reazione diretta che quella inversa che è data dalla relazione $v= k_{-2}[E][P]$. Assumiamo, ora, che la misurazione di velocità di reazione viene eseguita immediatamente dopo che E ed S sono stati miscelati, quindi in totale assenza di P che assume il valore pari a 0; di conseguenza, l'espressione della velocità della reazione inversa potrà essere trascurabile. Con quest'altra semplificazione analizziamo il sistema descritto dall'equazione e descriviamo la velocità iniziale in funzione della quantità totale dell'enzima e della concentrazione di substrato.

Enzima totale, $[E_t]=[E]+[ES]$

In cui $[E]$ è l'enzima libero, mentre $[ES]$ è la quantità di enzima legato al substrato; quindi, la velocità di formazione di $[ES]$ sarà uguale a

$$v_f=k_1([E_t]-[ES])[S]$$

La velocità di scomparsa di $[ES]$ può essere definita come:

$$v_s=k_{-1}[ES]+k_2[ES]=(k_{-1}+k_2)[ES]$$

Allo stato stazionario $d[ES]/dt=0$ e $v_f=v_s$ quindi:

$$k_1([E_t]-[ES])[S]=(k_{-1}+k_2)[ES]$$

e il riarrangiamento è dato dalla relazione

$$([E_t]-[ES])[S]/[ES]=(k_{-1}+k_2)/k_1$$

Il rapporto tra le costanti k_1 , k_{-1} e k_2 definisce la costante k_m che prende il nome di costante di Michaelis e può essere descritta come:

$$K_m=(k_{-1}+k_2)/k_1$$

Sostituendo la definizione di k_m nell'equazione precedente otterremo

$$([E_t]-[ES])[S]/[ES]=k_m$$

Che si riarrangia in

$$[ES] = [E_t][S]/k_m + [S]$$

Indipendentemente da ciò, il parametro più importante nella cinetica di una qualsiasi reazione è la velocità di formazione del prodotto P che è data dalla relazione

$$v = d[P]/dt$$

E dall'equazione

$$v = k_2[ES]$$

Sostituendo la definizione di [ES] dall'equazione precedente si ottiene

$$v = k_2[E_t][S]/k_m + [S]$$

In questa equazione il prodotto $k_2[E_t]$ assume un significato particolare. Quando [S] è abbastanza alta da saturare tutto l'enzima, la velocità v della reazione è massima. Infatti, a saturazione, la quantità del complesso [ES] è equivalente alla concentrazione totale dell'enzima E_t ; cioè al suo valore massimo possibile. Dall'equazione precedente si può definire la variabile V_{max} come $V_{max} = k_2[E_t]$.

Infine, la sostituzione di questa relazione nell'espressione per v da l'equazione di Michaelis-Menten:

$$v = V_{max}[S]/k_m + [S]$$

Quindi, questa equazione afferma che la velocità iniziale v di una reazione catalizzata enzimaticamente dipende da due costanti k_m e V_{max} , e dalla concentrazione iniziale di substrato S.

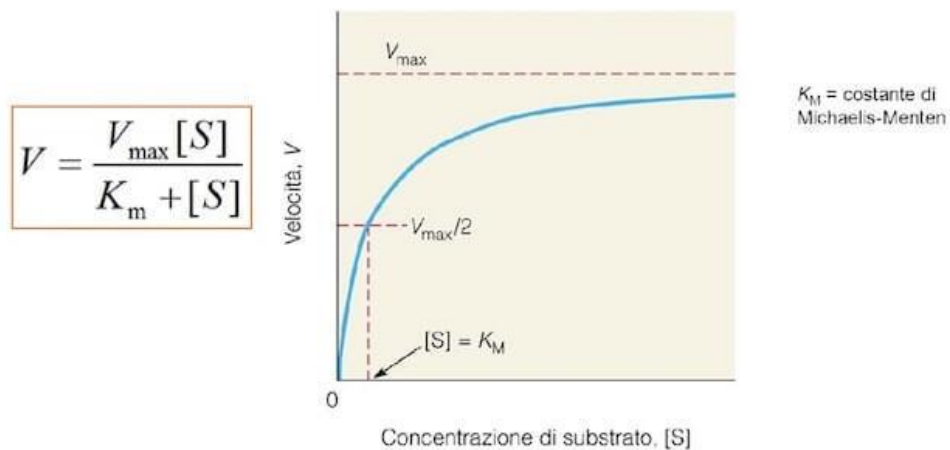


Figura 21 grafico dell'equazione di Michaelis-Menten

FATTORI CHE INFLUENZANO L'ATTIVITA' ENZIMATICA: pH E TEMPERATURA

Gli enzimi reagiscono in modo molto sensibile ai cambiamenti di pH. Se l'attività di un enzima viene testata in base al pH, si ottiene principalmente una curva a campana (Figura 21). Il suo massimo (pH ottimale) coincide frequentemente con il valore di pH fisiologico (pH 7,4 circa). L'attività diminuisce in modo significativo e scende infine a zero verso gli intervalli di pH acido e alcalino più estremi. Almeno due effetti determinano questo comportamento: partecipazione di gruppi ionici nel meccanismo catalitico e coinvolgimento di gruppi carichi per la stabilizzazione della struttura proteica. Per determinare la dipendenza dal pH di una reazione enzimatica, è necessario considerare alcuni aspetti sperimentali. Sono richieste condizioni di saturazione rispetto a tutti i componenti come substrati o cofattori. Poiché la saturazione può essere raggiunta solo a concentrazioni infinite, le misurazioni vengono eseguite a una concentrazione di substrato elevata (ma non completamente saturante) e, pertanto, si può ottenere solo un'apparente velocità massima V invece della reale V (che può essere determinata solo per estrapolazione). Per variare il pH in un dosaggio enzimatico, il pH del tampone verrà modificato. Tuttavia, si deve considerare che i componenti nella miscela di analisi possono influenzare sensibilmente il pH. Difatti, distinte reazioni enzimatiche, come lipasi e colinesterasi, provocano una variazione del pH a causa del rilascio di componenti acidi. Pertanto, il pH deve essere esaminato nella miscela di analisi prima e alla fine della reazione. La capacità dei sistemi tampone dipende da vari fattori come la forza ionica e la concentrazione, ma è generalmente limitata. I sistemi tampone sono efficienti solo in un intervallo ristretto, al massimo un'unità di pH al di sotto e una al di sopra del suo valore. Pertanto, la

dipendenza dal pH di un enzima non può essere determinata con un unico sistema tampone. Diversi sistemi tampone possono essere combinati per coprire l'intero intervallo di pH, ma questa è una procedura insoddisfacente, perché l'attività enzimatica dipende anche dal tipo di tampone, dalla natura e dalla forza degli ioni coinvolti. Questo può essere stabilito confrontando diversi tamponi in regioni sovrapposte. L'uso di tamponi universali, che coprono un ampio intervallo di pH, come il tampone Teorell–Stenhagen o il tampone Britton–Robinson, sono fortemente raccomandati. Si deve inoltre considerare che i componenti essenziali nel dosaggio del test, i substrati, i coenzimi (NAD) o gli enzimi “aiutanti” nei test accoppiati possiedono le proprie dipendenze dal pH, che possono deviare da quello dell'enzima e possono generare interpretazioni errate. I gruppi ionici sono spesso coinvolti nella catalisi enzimatica, ad esempio, come catalizzatori acido-base, e il loro stato di protonazione è essenziale per la reazione. Un esempio importante è la triade catalitica della serina proteasi, come la chimotripsina, dove il gruppo idrossi della serina, il gruppo imidazolico dell'istidina e il gruppo carbossilico dell'aspartato agiscono insieme e il trasferimento di un protone dal gruppo idrossi della serina all'azoto imidazolico; passaggio essenziale per la scissione del legame peptidico. Una variazione del pH influenza, quindi, lo stato protonato e influenza il meccanismo catalitico¹⁸. Oltre agli effetti specifici dei gruppi direttamente coinvolti nel meccanismo catalitico, l'enzima possiede un gran numero di gruppi carichi all'interno e sulla sua superficie, importanti per la funzione enzimatica, per l'equilibrio tra flessibilità significativa per il meccanismo catalitico, come la formazione dello stato di transizione e rigidità per mantenere la struttura tridimensionale o per eseguire cambiamenti conformazionali controllati. Mentre la protonazione dei residui essenziali nel centro attivo è prevalentemente un processo reversibile, i cambiamenti nella carica di gruppi strutturalmente importanti possono produrre danni irreversibili alla struttura nativa. Per distinguere tra effetti del pH reversibili e irreversibili, la curva di stabilità del pH deve essere confrontata con la curva del pH ottimale. Per produrre una curva ottimale, il rispettivo pH viene regolato direttamente nel test di prova e l'attività viene misurata immediatamente dopo l'aggiunta dell'enzima. Per una curva di stabilità del pH, l'enzima viene preincubato da solo (o in combinazione con componenti distinti) al rispettivo pH per un intervallo di tempo definito (ad esempio 1 h) e successivamente testato al pH ottimale nel normale dosaggio enzimatico. I processi reversibili non dovrebbero influenzare l'attività enzimatica. Pertanto, la curva di stabilità mostra spesso un ampio plateau nell'intervallo ottimale e la diminuzione dell'attività si verifica maggiormente a valori di pH estremi rispetto alla curva ottimale (Figura 21). Poiché anche altri componenti nel dosaggio enzimatico possono essere sensibili a valori di pH estremi, come NADH, è necessario eseguire anche un test di stabilità con tali componenti. Il punto isoelettrico p I

è il valore di pH al quale le cariche in eccesso positive e negative della molecola enzimatica sono appena bilanciate. A questo punto, la solubilità dell'enzima e la sua stabilità si riducono fortemente.

L'attività enzimatica dipende dal pH

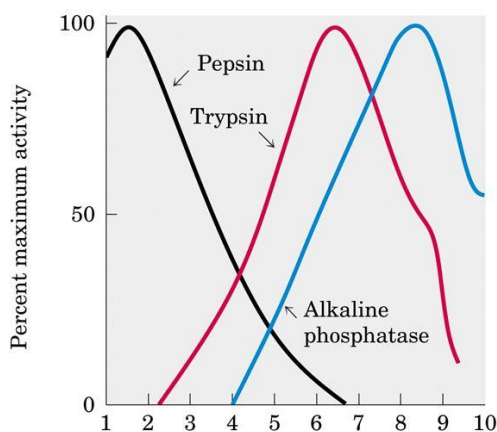


Figura 22 Esempio di pH ottimale di pepsina, tripsina e fosfatasi alcalina

TEMPERATURA

L'attività degli enzimi dipende essenzialmente dalla temperatura. Simile alle reazioni chimiche ordinarie, la velocità delle reazioni catalizzate da enzimi aumenta esponenzialmente per ogni 10 ° C. Teoricamente, non esiste un limite superiore per questo aumento, ma al di sopra di una temperatura distinta l'aumento cessa e alla fine la velocità di reazione si avvicina a zero. Questa diminuzione è dovuta alla limitata stabilità termica, caratteristica generale di qualsiasi proteina. Pertanto, il comportamento dipendente dalla temperatura degli enzimi è determinato da due processi diversi e indipendenti. Se l'attività enzimatica viene testata in funzione della temperatura, si otterrà una curva simile alle curve ottimali del pH a campana, ma deve essere interpretata in modo del tutto diverso: il continuo aumento iniziale viene contrastato dal processo di denaturazione. La velocità di reazione supera il massimo con l'attività massima, ma, a differenza della dipendenza dal pH, questo non è un ottimo dell'attività enzimatica, in quanto il massimo indica l'inizio di un processo di denaturazione irreversibile. Pertanto, il termine "temperatura ottimale" per questo massimo dovrebbe essere evitato. Le temperature ottimali non sono quelle con la massima attività, piuttosto devono essere chiaramente al di sotto del range di inattivazione. Inoltre, la denaturazione delle proteine non è solo un processo dipendente dalla temperatura, ma anche dal tempo. L'incubazione dell'enzima ad alta temperatura per un tempo più lungo provocherà una maggiore inattivazione e la

temperatura massima si sposterà verso temperature più basse. A differenza del pH ottimale, la temperatura massima di un enzima distinto non può essere considerata come un valore costante. La maggior parte degli enzimi rimane attiva fino alla temperatura fisiologica (37 ° C), ma solo a pochi gradi sopra di essa, tra i 40 e 50 ° C, diventano instabili. Gli enzimi molto sensibili alla temperatura subiscono l'inattivazione anche a temperature più basse, come l'alcol deidrogenasi, che diventa instabile già sopra i 30 ° C, mentre la lattato- deidrogenasi è stabile fino a 50 ° C. I microrganismi termofili che vivono nelle sorgenti termali sopravvivono anche in acqua bollente e si può presumere che tutti i loro enzimi possano resistere a temperature così elevate. Questo è effettivamente il caso di molti ma non di tutti questi enzimi; alcuni si inattivano notevolmente al di sotto della temperatura di crescita dell'organismo. Ovviamente, questi enzimi sono stabilizzati da componenti cellulari distinti, in particolare la soluzione proteica altamente concentrata. È un fatto interessante che gli enzimi degli organismi termofili siano strutturalmente strettamente correlati a quelli degli organismi mesofili. Nessuna differenza essenziale può essere rilevata anche nella composizione degli amminoacidi, oltre ad un aumento dei residui idrofobici e carichi, che determinano una maggiore rigidità delle proteine. In realtà, la sensibilità alla temperatura non è una caratteristica inevitabile delle proteine. Considerando la calda atmosfera primordiale in cui si sono evoluti i primi organismi, si può presumere che gli enzimi degli organismi mesofili, compresi quelli con una temperatura corporea costante, abbiano perso la loro stabilità termica perché non ce n'è più bisogno. D'altra parte, i primi enzimi nei primi tempi dell'evoluzione, i ribozimi, consistevano nell'RNA più stabile alla temperatura. Il comportamento dipendente dalla temperatura degli enzimi può essere studiato mediante due diverse procedure. L'enzima può essere testato direttamente in un saggio regolato alle rispettive temperature, oppure può essere preincubato alle rispettive temperature per diversi intervalli di tempo e successivamente testato alla temperatura normale del saggio. Mentre la prima procedura considera direttamente la dipendenza dalla temperatura dell'attività, la seconda procedura osserva la dipendenza dal tempo e quindi la stabilità a lungo termine dell'enzima. Nel primo caso, la reazione viene testata immediatamente dopo l'aggiunta dell'enzima; preincubazioni più lunghe dovrebbero essere evitate per escludere l'aspetto dipendente dal tempo, che dovrebbe essere studiato separatamente. Nell'intervallo di temperatura inferiore, l'enzima dovrebbe rimanere stabile per un tempo più lungo. Questo fatto viene utilizzato come controllo per i test di stabilità enzimatica, poiché anche altri processi, come l'attacco proteolitico o l'ossidazione, possono causare perdite di attività. È inoltre necessario considerare la possibile instabilità termica di altri composti, substrati, coenzimi o enzimi helper nei saggi accoppiati. Dopo la preincubazione a una temperatura

moderatamente elevata, l'enzima subisce una lenta perdita di attività, mentre ad alta temperatura l'attività diminuisce più rapidamente.

Enzimi

Andamento dell'attività enzimatica in funzione della temperatura.

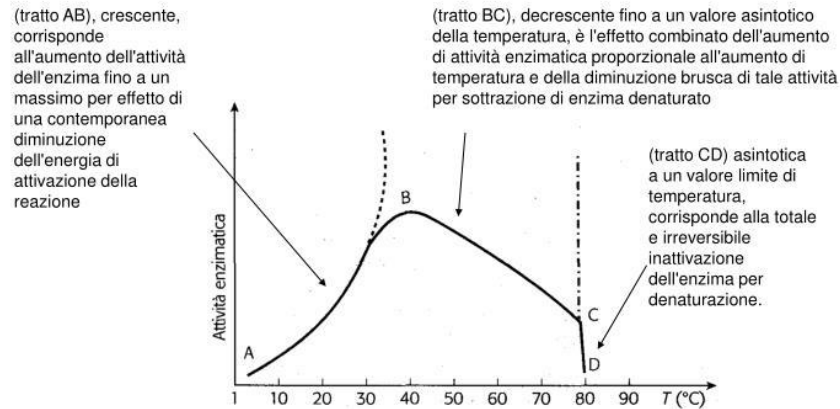


Figura 23 Relazione tra attività enzimatica e temperatura

REGOLAZIONE ATTIVITA' ENZIMATICA: INIBIZIONE ENZIMATICA

Quando una certa sostanza aggiunta a un dosaggio enzimatico diminuisce la velocità di reazione, questo processo sarà considerato come inibizione enzimatica e la sostanza aggiunta come inibitore, sebbene non sia necessario. L'inibizione enzimatica, in senso stretto, è definita come una riduzione dell'attività enzimatica causata dal legame specifico di un ligando (inibitore) a un sito di legame definito nell'enzima, come un centro catalitico o di regolazione. Come appena visto, anche altri fattori possono ridurre l'attività enzimatica: La diminuzione della temperatura, la variazione del valore del pH, la forza ionica o la polarità del solvente hanno la capacità di influenzare l'attività enzimatica. Di solito, tali effetti possono essere evitati in condizioni di dosaggio controllate, ma possono anche essere causati dalla sostanza aggiunta. Se questa sostanza viene applicata in una forma acida o alcalina, preraffreddata, disciolta in un solvente organico o contiene additivi stabilizzanti, si può osservare una diminuzione della velocità di reazione dopo l'aggiunta. La quantità di diminuzione è in relazione lineare con la concentrazione della sostanza aggiunta, cioè, quantità maggiori producono effetti maggiori, e quindi “fingono” una specifica inibizione, sebbene l'effetto sia completamente indipendente dalla rispettiva sostanza. Anche se la sostanza reagisce

direttamente con l'enzima, l'interazione non è per forza considerata specifica; piuttosto può essere dovuto a effetti superficiali aspecifici, che intaccano la struttura enzimatica nativa. I composti carichi, come gli ioni metallici o i componenti tampone, spostano gli ioni opposti dei gruppi carichi sulla superficie dell'enzima. I composti idrofobici, e in particolare i detergenti come il dodecil-solfato, reagiscono con le regioni proteiche idrofobe. Tali effetti non possono essere considerati come inibizioni specifiche. A livello sperimentale, possono essere riconosciuti e differenziati dall'inibizione specifica per le seguenti caratteristiche:

- Nessun livello di saturazione definito.
- Nessuna competizione diretta con sostanze analoghe.
- Sono richieste alte concentrazioni ($<1 \text{ mM}$)¹⁸.

INIBIZIONE REVERSIBILE E IRREVERSIBILE A CONFRONTO

Di solito, si presume che l'inibizione enzimatica sia reversibile: una sostanza, ad esempio, un analogo strutturale del substrato, si lega a un sito distinto, come il sito attivo, in modo reversibile e si dissocia con la diluizione oppure viene spostato da quantità elevate del “vero” substrato. Tuttavia, molte sostanze si legano irreversibilmente all'enzima e non si dissociano spontaneamente. Principalmente, il legame irreversibile può essere aspecifico o per un sito specifico. Soprattutto per quest'ultimo caso, devono essere differenziati due tipi di legame irreversibile:

- Legame covalente
- Legame estremamente stretto, non covalente.

Non è sempre ovvio se una particolare sostanza reagisce in modo covalente o non covalente, sebbene, dal punto di vista chimico, questo dovrebbe essere facile da differenziare. Ad esempio, i derivati alogeni vengono spesso applicati come analoghi per i ligandi, come i substrati, poiché le modifiche con cloruro o fluoruro non producono alcun cambiamento grave nella struttura complessiva. L'analogo sarà ancora accettato dall'enzima ma spesso perde la sua funzione di substrato. Inoltre, i derivati alogeni sono composti reattivi, che possono reagire con gruppi

funzionali, come i gruppi amminici. Questa reazione può verificarsi nello specifico sito di legame, quando la sostanza agisce come un analogo del ligando e inibisce la rispettiva funzione enzimatica. D'altra parte, l'alogeno può reagire con qualsiasi gruppo reattivo accessibile sulla superficie della proteina in modo aspecifico influenzando indirettamente l'attività enzimatica.

L'inibizione irreversibile e reversibile deve essere trattata in modo diverso. Pertanto, il rispettivo tipo di inibizione deve essere chiaro prima di intraprendere studi di inibizione dettagliati. I ligandi reversibili possono essere rimossi dall'enzima mediante un metodo di separazione appropriato, come dialisi, ultrafiltrazione o filtrazione su gel, ripristinando così l'attività enzimatica originale. Tuttavia, si deve tenere presente che le perdite di attività possono anche essere causate dal metodo di separazione e non sarà sempre chiaro se tali perdite debbano essere attribuite all'influenza del metodo o dell'inibitore. Un test facile e rapido per il legame irreversibile è la diluizione dell'enzima. L'attività enzimatica diminuisce in base al fattore di diluizione sia per l'inibizione reversibile che irreversibile, ma un inibitore reversibile si dissocerà dall'enzima e quindi si avrà un'attività enzimatica superiore a quella prevista dalla semplice diluizione. Un test conveniente e affidabile è la determinazione della dipendenza dal tempo dell'inibizione. A causa del rapido equilibrio di legame, un inibitore reversibile si lega e inibisce immediatamente l'enzima. Successivamente, il grado di inibizione rimarrà costante come può essere stabilito da test durante un periodo di tempo distinto, ad esempio 1 h (a condizione che l'enzima rimanga generalmente stabile durante questo periodo). Con un inibitore irreversibile, l'attività enzimatica diminuisce in modo esponenziale. Questo perché la reazione è intrinsecamente dipendente dalla concentrazione dei reagenti, dell'enzima e dell'inibitore. Per visualizzare questo effetto, la concentrazione dell'inibitore deve essere molto bassa. Per un inibitore irreversibile efficiente, una molecola è sufficiente per reagire e inattivare una molecola di enzima, quindi la quantità stechiometrica della concentrazione dell'enzima sarebbe sufficiente per inattivare completamente l'enzima.

Esistono due tipi essenziali di inibizione irreversibile specifica:

- Substrati suicidi
- Analoghi dello stato di transizione¹⁸.

SUBSTRATI SUICIDI

I substrati suicidi sono analoghi del substrato che simulano il meccanismo catalitico. Invece di essere convertiti in prodotto e rilasciati, formano un legame covalente con il sito catalitico che blocca l'enzima in modo irreversibile. L'enzima si uccide accettando questi inibitori. Poiché l'enzima deve attivarsi e unirsi al legame covalente, questi inibitori aiutano a chiarire il meccanismo catalitico. Esempi lampanti sono gli inibitori delle serine proteasi, che vengono utilizzati per inattivarli al fine di evitare la degradazione degli enzimi, ad esempio mediante procedure di isolamento. Un reagente più efficiente, ma molto tossico è il diisopropil fosforofluoridato (DFP), che inibisce anche l'acetilcolina esterasi ed è stato utilizzato come agente bellico. Un altro importante inibitore suicida è il fluorouracile, che viene convertito nella cellula in 5-fluorodeossiridilato e reagisce in modo covalente sia con la timidilato sintasi che con il cofattore metilene tetraidrofolato. Poiché inibisce la sintesi del DNA, il fluorouracile viene applicato come farmaco nella terapia del cancro¹⁸.

ANALOGHI DELLO STATO DI TRANSIZIONE

Nel corso del meccanismo catalitico, il substrato passa uno stato di transizione, dove è strettamente legato. Interagisce intensamente con i gruppi del centro catalitico per ridurre l'energia di attivazione. La configurazione della molecola è forzata nella direzione del prodotto e in condizioni di reazione normali, il tempo di vita dello stato di transizione è molto breve (l'intervallo di picosecondi). Gli analoghi, che imitano lo stato di transizione, si legano anch'essi estremamente strettamente. Anche se il legame non è covalente, l'analogo rimane saldamente legato e non può essere rimosso facilmente con metodi di separazione come la dialisi o la filtrazione su gel³.

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA: ENZIMI ALLOSTERICI

In biochimica la regolazione allosterica è la regolazione di un enzima o di una proteina mediata da una molecola detta effettore, che svolge tale funzione legandosi presso il sito allosterico. Un enzima dotato di siti allosterici è detto enzima allosterico e il legame che lo unisce all'effettore (o modulatore allosterico) è reversibile, non covalente: esso consente all'enzima di passare dalla forma inattiva a quella attiva. Gli enzimi allosterici generalmente sono più grandi e complessi rispetto agli enzimi non regolatori e, solitamente, nei sistemi multienzimatici, il primo enzima della via metabolica è proprio un enzima allosterico. Per distinzione, nel caso in cui l'effettore sia lo stesso substrato, sono indicati come effetti omotropici, mentre le influenze degli effettori diversi dal substrato sono chiamate effetti eterotropici. Queste influenze possono essere positive o negative e il rispettivo effettore agisce, corrispondentemente, come attivatore o inibitore. Gli effettori non agiscono per interazione diretta con il primo ligando, ad esempio, per spostamento dal suo sito di legame (competizione); piuttosto, occupano un sito di legame spazialmente separato. Questo è chiamato centro allosterico. Il centro allosterico separato consente la regolazione dell'enzima da parte dei metaboliti, che sono completamente diversi dai ligandi fisiologici dell'enzima, come substrati, cofattori o coenzimi. Un importante principio normativo è l'inibizione del feedback. Le vie metaboliche sono spesso controllate dai loro prodotti finali, che inibiscono la prima fase della via in modo che gli intermedi non si accumulino. Il prodotto finale del percorso è abbastanza diverso dal substrato o prodotto dell'enzima che catalizza la fase iniziale e non sarà riconosciuto dal suo sito catalitico. Si lega quindi ad un centro allosterico, dal quale influenza, ad esempio, per cambiamento conformazionale, l'efficienza catalitica dell'enzima. Gli effettori allosterici influenzano in modo caratteristico la funzione di saturazione sigmoidale del substrato. Gli inibitori, pur riducendo l'efficienza catalitica, aumentano l'effetto omotropico, mentre gli attivatori aumentano l'efficienza catalitica indebolendo l'effetto omotropico. Gli approcci teorici per spiegare gli effetti cooperativi con enzimi e proteine correlate devono, quindi, includere anche effetti eterotropi. Va sottolineato che la cooperatività, cioè l'aumento dell'affinità dello stesso ligando in seguito a legami consecutivi, e l'allosteria, cioè il legame a siti spazialmente separati, sono principalmente due fenomeni indipendenti, che possono anche verificarsi separatamente in enzimi distinti. Tuttavia, è un'osservazione empirica che entrambe le caratteristiche sono solitamente combinate nello stesso sistema enzimatico o proteico, poiché entrambe si completano a vicenda e il potere regolatorio può essere pienamente espresso solo da una combinazione di entrambi i fenomeni. Pertanto, è giustificato intendere gli enzimi allosterici come una notazione per enzimi che rivelano sia la cooperatività che l'allosteria³

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA: REGOLAZIONE A FEEDBACK

Gli enzimi sono i responsabili principali del metabolismo cellulare, lavorando da soli o a gruppi per portare a termine specifici processi metabolici. Quando più enzimi lavorano in modo sequenziale, si possono creare delle catene di reazioni o vie metaboliche in cui il prodotto del primo enzima diventa substrato per il secondo e così via. Ne risulta che, in molti sistemi multienzimatici, i primi enzimi della catena sono in grado di regolare l'intera via metabolica in funzione delle necessità cellulari. Tali enzimi regolatori, quindi, possono aumentare o diminuire la loro velocità in risposta a determinati input, permettendo alla cellula di adeguarsi alle richieste di energia (processi catabolici) o di biomolecole necessarie per la crescita e la riparazione (processi anabolici). In genere, gli enzimi regolatori sono estremamente complessi, sono formati da diverse subunità e spesso allosterici. In presenza di reazioni concatenate e sequenziali, un tipo molto comune di regolazione enzimatica è quella del feedback. Se il prodotto finale di una via metabolica è un inibitore dell'enzima coinvolto nelle prime tappe della catena di reazioni, si ha una regolazione a feedback negativo; se invece il prodotto agisce da attivatore, si parla di feedback positivo. Un esempio di feedback negativo è la sintesi in vitro dell'amminoacido isoleucina, la cui presenza nel liquido di coltura è in grado di inibire un'ulteriore sintesi di questo amminoacido da parte dei microrganismi coinvolti. Un esempio più complesso di regolazione a feedback è quello dell'enzima allosterico fosfofruttochinasi che è coinvolto nella terza reazione della glicolisi (la via metabolica che porta alla produzione di energia sotto forma di ATP a partire dall'AMP). Sia l'AMP sia l'ATP possiedono dei siti di regolazione allosterica su questo importante enzima regolatore, ma, mentre l'AMP è un attivatore, l'ATP funge da inibitore, arrestando la catena di reazioni seguenti. Tale regolazione trova significato nel fatto che, in presenza di alti livelli di ATP, non è necessario per la cellula produrne di nuovo.

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA: MODIFICAZIONE COVALENTE

L'attività degli enzimi può anche venire regolata dall'interazione con altre proteine e da modificazioni covalenti, ad esempio, l'aggiunta di gruppi fosfato a residui di serina, treonina e tirosina. La fosforilazione è un meccanismo molto comune di regolazione dell'attività enzimatica, infatti il 30-50% delle proteine di una cellula eucariote si trova nello stato fosforilato. In genere, l'aggiunta di gruppi fosfato a opera di determinati enzimi, detti chinasi, stimola l'attività enzimatica, mentre la loro rimozione, attuata dalle fosfatasi, ne causa l'inibizione. Un esempio possono essere le cellule muscolari che rispondono all'adrenalina demolendo il glicogeno a glucosio per fornire una fonte di energia all'attività muscolare. La demolizione del glicogeno è catalizzata dall'enzima glicogeno fosforilasi, che viene attivato per fosforilazione in risposta al legame dell'adrenalina con un recettore sulla superficie delle cellule muscolari. La fosforilazione delle proteine riveste un ruolo di fondamentale importanza, non solo nel controllo delle reazioni metaboliche, ma anche nel controllo di molte funzioni cellulari, come il differenziamento e la crescita cellulare. Un altro esempio di regolazione per fosforilazione è quello dell'importante proteina p53, un oncosoppressore che, possiede ben 18 siti di fosforilazione e se attivo, porta all'inibizione del ciclo cellulare, fino a indurre l'apoptosi (morte cellulare programmata) in casi estremi. Quando la cellula subisce seri danni, come gravi mutazioni genetiche, p53 viene attivata per fosforilazione, mentre al termine della sua attività viene defosforilata diventando, quindi, inattiva.

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA: ATTIVAZIONE DEGLI ZIMOGENI

Un altro meccanismo di regolazione degli enzimi è noto con il termine attivazione degli zimogeni. Esso è relativo a numerosi enzimi proteolitici, come la pepsina, che catalizzano l'idrolisi di legami peptidici e vengono sintetizzati sotto forma di precursori inattivi detti appunto zimogeni. La conversione nella forma attiva viene catalizzata, di volta in volta, da altri enzimi e consiste nella rimozione di un frammento peptidico. Sono molti i casi in cui agisce questo meccanismo, tuttavia gli esempi più noti sono quelli che riguardano i quattro zimogeni pancreatici: tripsinogeno, chimotripsinogeno, proelastasi e carbossipeptidasi. Gli zimogeni sono sintetizzati in cellule

specializzate localizzate nel pancreas e in seguito liberati nell'intestino tenue per svolgere le loro azioni digestive. Se le cellule li producessero in forma attiva, rischierebbero l'autodigestione, poiché le sostanze di gran lunga più importanti nel contesto cellulare sono proprio le proteine. Il tripsinogeno è costituito da una singola catena polipeptidica ad alto peso molecolare, viene attivato in seguito al taglio proteolitico ad opera dell'enzima enterochinasi. Quest'ultimo enzima provoca la scissione del legame peptidico fra una lisina e l'adiacente isoleucina nella molecola di tripsinogeno, causando il rilascio della sequenza N terminale. L'isoleucina coinvolta nel taglio proteolitico diventa, quindi, l'amminoacido N terminale. A seguito di tale processo, la molecola assume la configurazione terziaria che la rende attiva e prende il nome di tripsina. Questa, poi, induce la formazione di altra tripsina, agendo sempre sul tripsinogeno con un meccanismo autocatalitico. Anche il chimotripsinogeno è costituito da una sola catena polipeptidica e può essere attivato dalla tripsina, sempre mediante la rottura di un legame peptidico, questa volta tra arginina e isoleucina. Come nel caso precedente, l'attivazione è accompagnata da modificazioni conformazionali che si riflettono in una variazione di attività. Tripsina, chimotripsina, carbossipeptidasi ed elastasi sono quindi prodotti inizialmente come zimogeni e poi attivati successivamente mediante la rottura dei legami peptidici.

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA: COMPARTIMENTAZIONE DEGLI ENZIMI

Le strategie regolatorie appena descritte modificano l'attività enzimatica a livello del sito attivo della molecola. La cellula può, tuttavia, regolare l'azione degli enzimi localizzandoli in specifici distretti cellulari, dove il rilascio del substrato o l'uscita del prodotto possono essere controllati. Per svolgere la loro funzione, poi, alcuni enzimi devono lavorare insieme, quindi vengono posti dalla cellula negli stessi compartimenti per assicurarne la massima efficienza. La compartimentazione degli enzimi, inoltre, garantisce anche che reazioni competitive possano avvenire contemporaneamente all'interno della cellula. In molti casi, i compartimenti che raccolgono determinati enzimi sono organelli come i mitocondri, i nuclei o i lisosomi. Un esempio è quello degli enzimi della via metabolica nota come ciclo di Krebs, che permettono la produzione di energia all'interno dei mitocondri. Spesso però determinate molecole rimangono confinate in un distretto cellulare per meccanismi di affinità molecolare, come avviene nel caso delle proteine contenute all'interno dei lipid rafts (zattere lipidiche). In queste aree più dense della membrana

vengono attratte specifiche proteine, tra cui enzimi responsabili della segnalazione intracellulare dei messaggi chimici esterni. Per poter operare, questi enzimi collaborano rendendo il proprio prodotto un substrato per l'enzima adiacente. Se fossero sparsi per la cellula, l'incontro tra queste molecole sarebbe casuale e probabilmente richiederebbe tempi anche molto più lunghi, rendendo inefficiente la trasmissione del segnale. La compartimentazione degli enzimi di segnalazione nelle zattere lipidiche, invece, ottimizza le interazioni all'interno della cellula, garantendo una trasmissione del segnale straordinariamente efficiente.

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA: GLI ISOENZIMI

Gli isoenzimi o isozimi sono enzimi che catalizzano una stessa reazione, ma che differiscono gli uni dagli altri dal punto di vista strutturale. Lo stesso enzima, quindi, può presentare varie forme molecolari, diverse per piccole variazioni nella sequenza degli aminoacidi. Spesso gli isoenzimi sono composti da monomeri chimicamente simili, ma non uguali. L'arrangiamento dei monomeri, in una forma chimica piuttosto che nell'altra, determina l'identità chimica complessiva della proteina enzimatica. Il nostro organismo, quindi, si serve di molecole leggermente diverse per raggiungere gli stessi scopi. Questo trova spiegazione nel fatto che ogni organo, tessuto o compartimento cellulare ha necessità metaboliche diverse e richiede, quindi, la forma dell'enzima che meglio si adatti alle proprie esigenze. L'esempio più noto è rappresentato dal lattico deidrogenasi (LDH), enzima ubiquitario deputato all'interconversione del lattato in piruvato. L'LDH è una proteina tetrameric, le cui subunità possono essere di due tipi diversi, detti H e M. L'arrangiamento delle quattro subunità permette la formazione di cinque isoenzimi, caratterizzati dalle seguenti combinazioni: H₄, H₃M, H₂M₂, HM₃ e M₄. Questi isoenzimi sono presenti in svariati organi e tessuti, ad esempio cuore, reni, cervello, fegato, muscoli, globuli rossi e bianchi. Il riconoscimento delle forme molecolari presenti nel sangue di un individuo è di grande importanza diagnostica, poiché l'aumento dei livelli di una di queste forme nel sangue è indice di una situazione di sofferenza a carico dell'organo in cui tale forma prevale.

Per quanto riguarda l'inibizione reversibile si possono distinguere tre principali classi di inibitori:

1) INIBITORI COMPETITIVI

Come si può evincere dalla definizione, gli inibitori competitivi sono caratterizzati dal fatto che competono con il substrato per lo stesso sito sull'enzima, il cosiddetto sito attivo o sito di legame. La concentrazione di S incide positivamente sulla possibilità che sia S a legarsi con l'enzima, piuttosto che l'inibitore; al contrario delle altre due categorie di inibitori in cui la maggiore concentrazione di S non può sopraffare gli effetti degli inibitori. In altri termini, per spiegare meglio questo meccanismo si consideri un sistema in cui un inibitore I si lega reversibilmente all'enzima nello stesso sito di S. Come descritto in precedenza, il legame ad S e il legame a I da parte dell'enzima, è un processo mutuamente esclusivo; ciò implica che il complesso ternario IES non è fisicamente possibile. Questa condizione ci fa capire che esiste una sorta di somiglianza strutturale tra I ed S.)

2) INIBITORI NON COMPETITIVI

Gli inibitori non competitivi sono in grado di interagire sia con E che con ES (o con S ed ES, ma questo è un caso molto particolare e specifico). Come detto in precedenza l'inibitore non competitivo non si lega al sito attivo e quindi non può essere influenzato dalla concentrazione di S. Vi sono due tipologie di inibizione non competitiva: pura e mista.

3) INIBITORI INCOMPETITIVI

L'ultima classe di inibitori conosciuta è quella degli inibitori incompetitivi. A differenza dell'inibizione competitiva (I si combina esclusivamente con E) e dell'inibizione non competitiva (I si combina con E e con ES), nelle inibizioni incompetitive I si combina solamente con ES. Nonostante sia possibile per gli inibitori incompetitivi legarsi al sito attivo, questo tipo di inibizione risulta generalmente dall'effetto allosterico, in cui l'inibitore si lega ad un sito differente dell'enzima e produce una modificazione allosterica dell'enzima. La modificazione

di conformazione (ad esempio della struttura terziaria o forma tridimensionale) dell'enzima riduce così l'affinità del substrato col sito attivo e l'efficienza dell'enzima.

3.4 Enzimi idrolitici coinvolti nel processo di birrifcazione: amilasi e proteasi

L'AMILASI

L'amilasi è stata tra i primi enzimi scoperti e isolati, e nell'ultimo millennio i suoi vari ruoli sono stati ampiamente studiati e discussi^{65,146,150}. Alcuni di questi enzimi esistono in forme multimeriche; ad esempio, la β -amilasi della patata dolce è un tetramero^{37,43}. L' α -amilasi pancreatica suina è apparentemente sintetizzata come una singola catena di 56.000 dalton, ma subisce una certa proteolisi per dare frammenti associati più piccoli con ritenzione di attività²⁸. Le amilasi di diversi tessuti di una singola specie animale sono molto simili, apparentemente come conseguenza della duplicazione e della mutazione genica, nonché della regolazione e dell'espressione tessuto-specifica⁶⁷. Al contrario, le α -amilasi di vari batteri, specialmente estremofili, ad esempio *Bacillus subtilis*^{70,76}, sono sorprendentemente simili nella loro specificità di prodotto alle α -amilasi dei cereali in germinazione². Inoltre, le α -amilasi animali danno un insieme di oligosaccaridi ramificati essenzialmente identici a quelli ottenuti dall'azione delle α -amilasi fungine, ad esempio, Taka amilasi¹¹⁴. Carpenter e collaboratori³¹ hanno discusso in dettaglio la diversità espressa in termini di Copy Number Variation (CNV) che misura il vero range di variazione, in particolare, dal cluster genico produttore di amilasi umana AMY1 così come dai cluster genici dell'amilasi pancreatica AMY2A e AMY2B. I loro risultati suggeriscono che l'allele di delezione di AMY2A ha una frequenza di circa il 7% negli europei, quindi circa 1 persona su 200 mancherà completamente di questo prodotto genico, aprendo la strada a ulteriori studi che indagano su intuizioni per scoprire nuovi modelli nella variazione dell'amilasi umana e implicando un ruolo potenziale per AMY2 CNV nelle associazioni funzionali e nelle sue conseguenze fenotipiche. In precedenza, Perry e collaboratori¹³² hanno riferito che numeri di copie AMY1 e livelli di proteine più alti probabilmente migliorano la digestione dei cibi amidacei e possono tamponare gli effetti della forma fisica delle malattie intestinali. È interessante sottolineare che più copie di AMY1 sono state trovate nell'*Homo sapiens sapiens* rispetto nel nostro parente vivente più prossimo, gli scimpanzé. Prima che iniziasse

l'espansione dell'agricoltura e dell'addomesticamento degli animali, le parti di piante selvatiche e animali selvatici rappresentavano i componenti principali della dieta preagricola degli ominidi⁴¹.

MECCANISMO D'AZIONE

Esiste un gran numero di revisioni che trattano in dettaglio la modalità di azione delle amilasi, e in particolare delle α -amilasi. L' α -amilasi lavora in un intervallo di temperatura ottimale compreso tra i 65 e i 75 °C e in condizioni di acidità del sistema pari a un pH tra 5,4 e 5,6 ; il suo compito è quello di accelerare il processo biochimico di scomposizione degli amidi, dividendolo in zuccheri più complessi, ovvero destrine e maltodestrine: non commestibili da parte del lievito e dunque destinati a persistere nel prodotto finito, il cui assaggio ne rileverà la presenza in termini di fattori d'incremento delle percezioni riguardanti il corpo e la dolcezza della birra. Data la sua alta temperatura ottimale di azione, nella produzione birraia, questo enzima è più attivo durante la fase di ammostamento, in cui, grazie alla temperatura, l'amido subisce il fenomeno di gelatinizzazione diventando più vulnerabile agli attacchi degli enzimi. L' α -amilasi interagisce con il suo substrato, l'amido, attraverso uno specifico meccanismo, che coinvolge residui di glucosio legati mediante legame α (1-4)²⁹. L' amilasi di questo gruppo agisce tramite il meccanismo di inversione anomerica dove il residuo si comporta come un acido generale e l'altro come una base generale. Le amilasi possono essere ulteriormente suddivise in due categorie in base al loro meccanismo d'azione, endo-amilasi ed eso-amilasi. Le endo-amilasi catalizzano l'idrolisi in modo casuale all'interno della molecola di amido. Questa azione causa la formazione di oligosaccaridi lineari e ramificati con lunghezza di catena variabile. Le esoamilasi idrolizzano dall'estremità non riducente, formando un prodotto intermedio a corta catena¹¹⁶.

le β -amilasi lavorano in un intervallo di temperatura ottimale compreso tra i 55 e i 65 °C (e in condizioni di acidità del sistema pari a un pH tra 5,4 e 5,6) agiscono solo sulla catena non riducente e staccando due unità di glucosio alla volta portano alla formazione di β -maltosio, zucchero semplice altamente e rapidamente fermentabile, destinato a essere metabolizzato dal lievito, che ne ricaverà alcol etilico. Sia α - che β -amilasi esibire attacchi multipli (ripetitivi); cioè, dopo la scissione catalitica iniziale, l'enzima può rimanere attaccato al substrato e portare a molte altre fenditure prima della dissociazione del complesso del substrato enzimatico. I due meccanismi differiscono in quanto le glicosidasi inverse operano tramite uno spostamento diretto della lasciando il gruppo uscente dall'acqua, mentre la ritenzione delle glicosidasi utilizza un meccanismo a doppio spostamento che coinvolge un intermedio glicosilenzima. Nonostante queste differenze, è

interessante notare che entrambe le classi impiegano una coppia di acidi carbossilici al livello del sito attivo. Sia gli enzimi invertenti che quelli di ritenzione catalizzano l'idrolisi dei glicosidi attraverso stati di transizione con sostanziale carattere di ione ossocarbonio⁶⁴. I glicosidi che si possono trovare in un mosto di birra sono: monosaccaridi quali glucosio, fruttosio, mannosio e galattosio); disaccaridi, come il maltosio (che è il prodotto principale della fase dell'ammontamento e che altro non è se non l'unione di due molecole di glucosio), oltre a isomaltosio, melibiosio, lattosio; infine anche trisaccaridi come il maltotriosio, che è sì metabolizzabile, ma lo è molto lentamente, e che, per tale sua tenacia, è capace di resistere fin oltre la fermentazione primaria, in modo tale da poter sostenere il lievito durante la lagerizzazione.

PROTEASI

Il termine "proteasi" definisce gli enzimi che digeriscono le proteine ed è stato inventato da S.H. Vines, professore di botanica all'Università di Oxford nel 1903^{137,160}. Inoltre, il termine "peptidasi" fu introdotto alcuni anni dopo da Petersen e Short¹³³. In generale, le peptidasi sono enzimi che scindono i peptidi in amminoacidi. Le proteasi (o proteinasi) sono enzimi che scompongono sia le proteine che i peptidi. Questi enzimi avviano il processo di catabolismo proteico mediante l'idrolisi dei legami peptidici che collegano insieme gli amminoacidi. Quasi tutti gli organismi richiedono enzimi proteolitici per funzionare. La proteolisi si accompagna al rilascio di un amminoacido o di un peptide da una proteina o da un peptide più grande. È una delle fasi finali dell'elaborazione post-traduzionale per molte proteine ed è unidirezionale¹³⁷. La maggior parte delle proteasi presenti in natura viene inizialmente prodotta come precursori inattivi chiamati zimogeni. L'attivazione dello zimogeno implica l'espressione della proteasi fusa a un segmento di attivazione che impedisce l'attività proteolitica fino a quando non viene scissa. I segmenti di attivazione più comuni sono sequenze N-terminali che bloccano stericamente il sito attivo¹⁰². Oltre al ruolo di ostacolare stericamente il sito attivo, i segmenti di attivazione sono spesso importanti per il ripiegamento, la stabilità e lo smistamento della proteasi precursore⁹¹. Secondo la classificazione della Commissione Enzimatica (CE), le proteasi appartengono al gruppo 3 (idrolasi) e al sottogruppo 4 (che idrolizzano i legami peptidici)¹⁵⁴. In generale, le peptidasi possono agire sui legami peptidici all'interno della molecola proteica (endopeptidasi) o possono scindere i legami peptidici in corrispondenza di un terminale libero (esopectidasi). La distinzione tra endo ed esopeptidasi non si applica a livello di famiglia delle proteasi. Le endopeptidasi possono essere di qualsiasi tipo catalitico. Le esopeptidasi

possono essere ulteriormente suddivise a seconda che agiscano all'estremità N o C e in base al numero di amminoacidi rilasciati durante una scissione. Ad esempio, una esopeptidasi che rilascia un amminoacido N-terminale è un'aminopeptidasi. Un'esopeptidasi che rilascia un singolo amminoacido dal C-terminale è una carbossipeptidasi.

PROTEASI NEL PROCESSO DI BIRRIFICAZIONE

Le due fasi più importanti nella preparazione della birra sono l'ammestamento (produzione di zuccheri fermentescibili) e la fermentazione (produzione di alcol da parte dei lieviti). Vari enzimi, tra cui le proteasi, derivanti dal malto (orzo) sono attivi durante il processo di ammostamento⁴⁷. Mentre circa il 95% dell'amido del malto viene solubilizzato entro la fine dell'ammestamento, solo il 30% - 40% circa delle proteine del malto viene solubilizzato. I principali gruppi di enzimi coinvolti nella scomposizione delle proteine del malto sono le endoproteasi e le esopeptidasi⁹⁷. Le proteine e i prodotti di decomposizione della proteolisi (aminoacidi liberi, peptidi e proteine degradate) sono i componenti principali di tutte le birre. Le proteine svolgono un ruolo chiave nella formazione e nella stabilizzazione della schiuma di una birra; hanno un'influenza positiva sul sapore del prodotto finito e sono necessarie per un'adeguata nutrizione del lievito. Gli amminoacidi e i di/tri-peptidi svolgono un ruolo chiave nel metabolismo del lievito, avendo così un'influenza indiretta sui sapori sviluppati durante la fermentazione. Esse, infatti, interagiscono con i polifenoli derivati dal chicco formando la foschia nella birra finale se non fosse per la proteolisi. La funzione degli enzimi proteolitici durante l'ammestamento è quella di idrolizzare le molecole proteiche a catena larga, di rendere le molecole di amido più accessibili all'attacco enzimatico e di produrre livelli sufficienti di amminoacidi e di/tri peptidi per una fermentazione ottimale. La maggior parte della proteolisi però si verifica durante la maltazione⁹⁷. Per quanto riguarda la "shelf-life" del prodotto, la tendenza attuale è quella di rimuovere i componenti che sviluppano il problema della foschia (proteine e polifenoli) mediante l'utilizzo di alcuni enzimi; ad esempio, la papaina è un enzima proteolitico estratto dalla papaya, il frutto dell'albero della papaia e viene applicato per prevenire i problemi di instabilità colloidale impartiti dalle proteine e quindi prolungare la durata di conservazione della birra. A tale scopo può essere utilizzata anche una miscela di cisteina proteinasi con ampia specificità. Può essere aggiunto durante il trasferimento tra fermentazione e maturazione o direttamente nella vasca di maturazione stessa. Se la birra viene pastorizzata a temperature pari o superiori a 70 C, tale enzima viene inattivato⁹⁷.

4. PROCESSO PRODUTTIVO

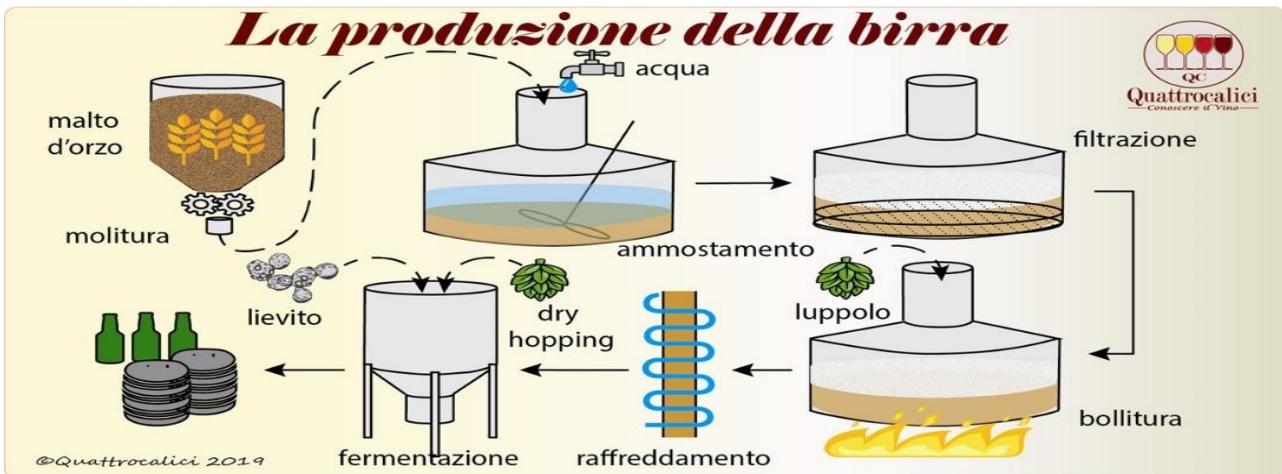


Figura 24 Schema della produzione di birra

4.1 La maltazione (fase preliminare)

Il malto principale utilizzato nei birrifici è quello derivante dall'orzo. Ogni spiga d'orzo è formata da una serie di nodi (detti anche rachidi), ciascuno dei quali sostiene sei fiori potenziali. Si dice quindi orzo distico o esastico a seconda che due o sei fiori vengano resi fertili, sviluppando un pari numero di chicchi sulle rachidi. Nel caso in cui si sviluppino due fiori, essi saranno più grandi e uniformi ed è per questo motivo che l'orzo distico è preferito dai mastri birrai, oltre che per la maggior resa e per il contenuto proteico inferiore. Il processo di maltazione è suddiviso in tre fasi, macerazione, germinazione ed essiccazione. Il processo di maltazione ha il ruolo di prendere un seme insapore, non friabile (difficile da rompere durante la macinazione) fermentabile, sigillato in una matrice di proteine e gomme e trasformarlo in un chicco facilmente macinabile e convertibile, con il classico aroma maltato. Durante la maltazione, i materiali di riserva nel chicco vengono sbloccati dai sistemi biologici che il grano utilizza per crescere in una pianta d'orzo. Il chicco viene quindi essiccato per consentire la stabilità nello stoccaggio e l'economia nel trasporto. L'orzo è un prodotto naturale. La sua composizione varia a seconda della varietà, dell'area di coltivazione, del clima, delle condizioni di raccolta, della preselezione e così via. L'orzo è raramente consegnato direttamente dai campi al luogo di maltazione. I commercianti di cereali normalmente agiscono come intermediari responsabili della pulizia preliminare del raccolto e dell'analisi dei campioni in laboratorio. A inizio processo il maltatore esegue una semplice valutazione visiva del raccolto in questione che però richiede una notevole esperienza ed è spesso decisiva in termini di accettazione o rifiuto di un lotto. La valutazione visiva valuta l'odore, il colore, l'omogeneità, la brillantezza e la

qualità della buccia. Inoltre, fornisce il conteggio di mezzi cereali, semi di erbe infestanti ed elementi esterni che possono ridurre il prezzo. I raccolti con infestazione da parassiti, come il tonchio del grano o la tignola del grano, dovrebbero essere definitivamente rifiutati. La valutazione visiva può anche scoprire difetti del grano che derivano principalmente da condizioni meteorologiche avverse prima del raccolto. Un tale difetto è, ad esempio, la germinazione che si verifica solo dopo stagioni con clima caldo durante la maturazione. Accelera la fine della dormienza. Le precipitazioni considerevoli provocano la germinazione anticipata e tali chicchi sono spesso morti e mostrano un aumento del tasso di infezione microbica. Altri criteri importanti e fondamentali che un buon chicco deve avere al fine dell'ottenimento di un buon malto sono: la capacità germinativa, il contenuto di acqua e il contenuto di proteine e vengono determinati alla consegna malto mediante test rapidi. La capacità germinativa è la percentuale di cereali da "vivi" rispetto a quelli che "muoiono" e dovrebbe essere compresa tra il 95% nei test rapidi e 96% dopo la pulizia e lo smistamento in magazzino per essere accettabile. I chicchi non germinati e conservati crudi, durante la maltazione possono essere infettati da muffe e batteri. Inoltre, potrebbe esserci una carenza di FAN (azoto amminico libero); ciò può causare una fermentazione insufficiente e una concomitante riduzione della qualità della birra. Ulteriori chicchi non germinanti mostrano una saccarificazione inferiore. Quindi, possono essere registrate solo attenuazioni finali basse. Il contenuto di acqua non deve essere superiore al 13%, maggiore è il contenuto di acqua, maggiori sono le perdite respiratorie. Il risultato potrebbe essere un'infezione da muffa. I chicchi con un contenuto d'acqua più elevato devono subire un processo di essiccazione affinché tale parametro rientri nei limiti previsti. Il contenuto di proteine dovrebbe essere compreso tra il 9,5% e il 10% (senza acqua), in modo che possa essere prodotta una birra stabile e sicura dal punto di vista microbiologico. Un contenuto proteico inferiore determina una riduzione della stabilità della schiuma, del corpo o del sapore; inoltre, la nutrizione del lievito può essere ridotta in azoto assimilabile che può causare sottoprodotti di fermentazione sgradevoli. Il contenuto di proteine varia tra il 10% e l'11% (nel caso di birre molto brillanti del tipo Pilsener). Un contenuto proteico compreso tra l'11% e l'11,5% è sufficiente per le birre convenzionali, mentre i contenuti proteici compresi tra l'11 e il 12% sono adatti per birre di malto scuro contenenti malto Münchner. L'orzo che ha un contenuto proteico più elevato, come appena descritto, può essere la causa dell'instabilità colloidale nella birra; Quest'ultimo richiede una maltazione intensiva e pesante con maggiori perdite in termini di resa e quindi perdite economiche. Un altro parametro da considerare è la grandezza dell'orzo che viene determinato dopo la pulizia e l'ordinamento. I chicchi dovrebbero avere diametri di circa 2,2 mm, meglio 2,5 mm (orzo intero). Il malto prodotto da chicchi di diverse dimensioni è eterogeneo perché i chicchi piccoli hanno un contenuto proteico maggiore e

germinano più velocemente rispetto a quelli più grandi. In un birrificio, il malto eterogeneo causa problemi durante la lavorazione e riduce la qualità della birra^{27,125,73,8}. Quindi, riassumendo quanto detto, la maltazione è la germinazione artificiale di una coltura. Lo scopo del malto è la dissoluzione controllata del grano mediante la produzione e attivazione di enzimi che trasformeranno l'amido in zucchero. La maltazione è un processo composto da germinazione, macerazione e infine torrefazione; per le prime due fasi è necessaria calore, umidità e ossigeno abbastanza alti per poter evitare problematiche a livello germinativo.

-MACERAZIONE

L'orzo, dopo essere stato pulito e calibrato (selezione in base alla grandezza del chicco), viene messo a bagno all'interno di particolari vasche per tre o quattro giorni a temperatura controllata compresa tra i 10 e i 15°C, in cui riceve acqua e ossigeno necessari per un completo sviluppo germinativo. Al termine di questa prima fase di macerazione si otterranno chicchi d'orzo con una percentuale di umidità pari al 42-44% per i malti chiari e 44-47% per i malti scuri.

-GERMINAZIONE

La germinazione è un processo estremamente delicato in cui si ha la produzione e lo sviluppo degli enzimi necessari alle trasformazioni biochimiche durante la seconda fase di maltaggio e durante l'ammollamento, ovvero, disgregazione del chicco, formazione di zuccheri e di sostanze azotate. Dopo che le cariossidi hanno raggiunto un'umidità compresa tra il 42 e il 47%, vengono messe all'interno di particolari camere per 2-4 giorni con una temperatura di circa 16-20°C, migliore range per ottenere una germinazione lenta e regolare. In questa fase ossigeno e temperatura svolgono un ruolo fondamentale, infatti, è necessario assicurare una sufficiente aerazione in modo da evitare l'asfissia dell'orzo da parte della CO₂ prodotta in seguito alla respirazione. L'ossigeno è essenziale per la respirazione, altrimenti l'embrione muore. In un primo momento, lo sviluppo dell'embrione è visibile a livello del germe e della radichetta. La radice principale sfonda il chicco ed emerge dalla buccia, successivamente, emergono ulteriori radici laterali. La radichetta cresce tra il pericarpo, la testa e la buccia del dorso. Durante questa fase di germinazione le sostanze di riserva vengono degradate dagli enzimi e trasferite in forme solubili nell'endosperma. Altre sostanze vengono prodotte per l'approvvigionamento energetico e per i tessuti. I processi in soluzione aumentano, quindi il chicco diventa sempre più fragile e friabile. Dal punto di vista biochimico, durante la maltazione avviene la regolazione e degradazione dei tre gruppi principali di sostanze da tener più

monitorate durante il processo di maltazione e fermentazione. Questi gruppi sono l'amido (amilolisi), le proteine (proteolisi) e le sostanze strutturali (citolisi). Ulteriori processi di degradazione sono la degradazione dei lipidi e dei fosfati¹⁶.

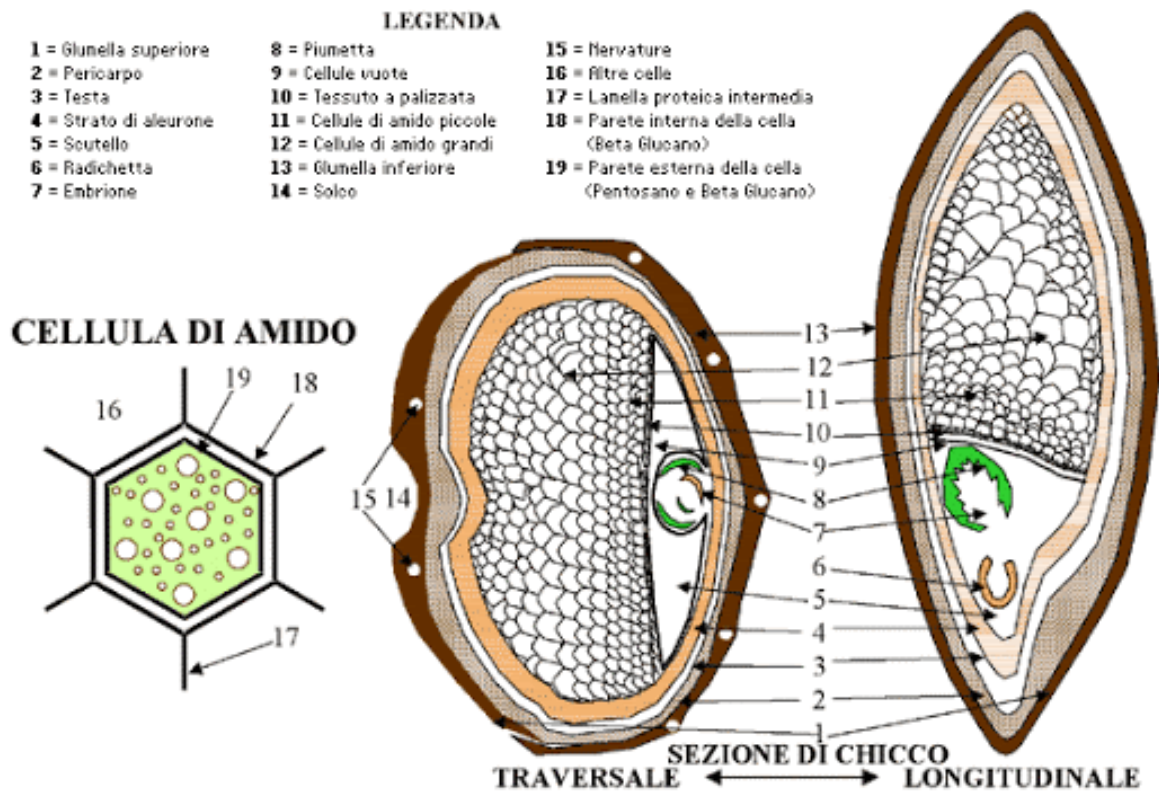


Figura 25 Schema cariosside di orzo

MECCANISMO DI GERMINAZIONE : RUOLO DEGLI ENZIMI IDROLITICI

Dal punto di vista biochimico, prima di poter parlare dell'azione degli enzimi, è necessario introdurre la definizione di amido. L'AMIDO è il costituente principale dell'orzo (circa 63% della sostanza secca) ed è formato da amilosio (16-24% dell'amido) ed amilopectina (76-84% dell'amido). L'amilosio è un polisaccaride che deriva dall'unione di centinaia di molecole di α -D(+)-glucosio mediante legame tra il carbonio 1 e

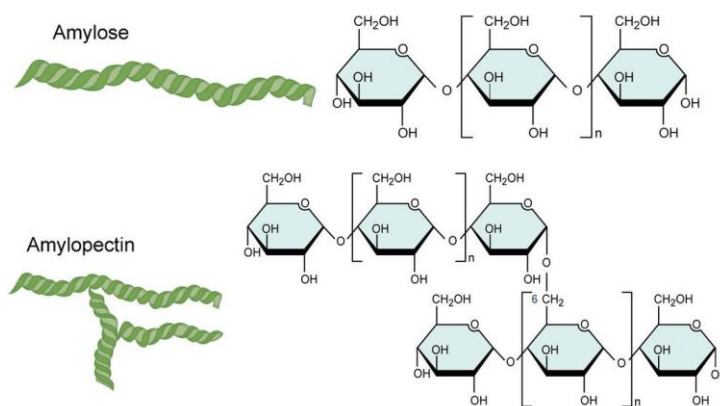


Figura 26 Struttura e composizione dell'amido

il 4 ($\alpha(1 \rightarrow 4)$) con eliminazione di una molecola d'acqua; l'amilosio ha quindi struttura lineare.

L'amilopectina è un polisaccaride, polimero del glucosio, altamente ramificato, dove i monosaccaridi sono legati in modo lineare tra loro con legami $\alpha(1 \rightarrow 4)$, mentre le ramificazioni avvengono con legami $\alpha(1 \rightarrow 6)$, ogni 24-30 unità di glucosio. Ora, dopo aver brevemente definito che cos'è l'amido e com'è composto, si può introdurre il meccanismo di azione degli enzimi che entrano in gioco durante la fase di germinazione. Lo sviluppo della radichetta stimola la produzione di acido gibberellico, il quale induce l'attivazione di enzimi idrolitici, che iniziano a demolire le sostanze di riserva, quali amido e proteine. Durante la germinazione le principali classi di enzimi che agiscono sono gli enzimi amilolitici (α -amilasi, β -amilasi, destrinasi limite) la loro attività è più spinta a temperature elevate quindi in fase di germinazione l'amido si modifica solo in minima parte, mentre viene completamente trasformato in fase di ammostamento. La capacità degli enzimi amilolitici di scindere l'amido in zuccheri semplici prende il nome di potere diastatico (parametro importante nella valutazione di un malto); enzimi proteolitici (proteasi e peptidasi) che agiscono a temperature più basse e quindi la solubilizzazione dell'azoto è il fenomeno principale che avviene in questa fase. Infine, gli enzimi citolitici (endo-/eso-glucanasi) in grado di scindere i β -glucani.

-ESSICCAZIONE O TORREFAZIONE

La fase finale della maltazione consiste in un trattamento termico dei grani, detto anche torrefazione. Le fasi di lavorazione termica hanno il maggiore impatto sul colore e sul sapore del malto, a seconda della temperatura del decorso temporale e del contenuto di umidità. Questo passaggio mira principalmente alla riduzione del contenuto di umidità del malto verde portandolo a

una condizione che ne garantisca la stabilità per le fasi di trasporto e stoccaggio (circa 5%). La rimozione dell'acqua implica l'arresto del processo di germinazione e modifica dei chicchi da parte degli enzimi ottenendo quindi un prodotto più stabile. Inoltre, in seguito a tale processo si ottengono chicchi più friabili, già predisposti alla macinazione. Il trattamento termico prevede due fasi distinte. Nel primo step il malto viene esposto all'aria a 25 °C, ciò determina un cambiamento del contenuto d'acqua del malto che passa dal 44% al 12% circa. La seconda fase di essiccazione è molto più lenta e prevede il passaggio del malto essiccato dal 12% al 4%. Al termine del processo di essiccazione la temperatura del forno viene ulteriormente aumentata entrando quindi in una fase di "stagionatura", responsabile del gusto, dell'aroma e della stabilità del malto. Questo è seguito da un periodo di raffreddamento per garantire una temperatura ottimale per lo scarico e lo stoccaggio.

MODIFICAZIONI DURANTE LA FASE DI MALTAZIONE ED ESSICCAZIONE

Il malto non solo contribuisce al colore della birra e alle caratteristiche organolettiche, ma anche alla sua stabilità ossidativa, fisica e chimica grazie al suo contenuto di antiossidanti¹⁵⁸. Circa l'80% dei composti fenolici identificati nella birra derivano dal malto, mentre il restante 20% provengono dal luppolo⁴⁵. Infatti, il contributo del malto alla capacità antiossidante della birra è stato stimato di circa il 95% nelle birre scure e circa l'86% nelle birre chiare³⁵. Di conseguenza, il malto può essere descritto come la principale fonte di antiossidanti nella birra. Tuttavia, l'orzo e il malto "verde" (malto non ancora utilizzabile) possono subire alterazioni chimiche diverse durante il trattamento termico con un grande impatto a livello compositivo, tant'è che la cottura e la tostatura portano a cambiamenti nel contenuto fenolico inducendo un imbrunimento non enzimatico con un impatto significativo sulle proprietà antiossidanti complessive del malto. Sono stati identificati diversi composti fenolici in orzo e malto come flavan-3-oli, oligomeri proantocianidinici, acid idrossicinnamiciderivati e basse quantità di flavonoli. Possono essere trovati come liberi e solubili, nonché forme legate insolubili, quest'ultimi forniscono il contributo principale al contenuto fenolico totale (forma libera + forma legata)⁵⁴. La maggior parte dei fenoli liberi identificati nell'orzo e nel malto sono flavan-3-oli mentre i fenoli legati includono principalmente acidi fenolici come la catechina e l'acido ferulico.

La maltazione è responsabile di una forte diminuzione dei livelli di catechina, prodelfinidina B3, procianidina B3 e acido ferulico dall'orzo. Tuttavia, l'acido ferulico ha mostrato una migliore capacità di resistere al processo di maltazione ed è stato segnalato come composto fenolico più abbondante nel malto^{100,143,53}. Inoltre, durante la maltazione è stata osservata una diminuzione di

fenoli legati e un aumento della frazione esterificata solubile. Questi cambiamenti sono stati attribuiti al rilascio enzimatico legato ai composti fenolici dell'orzo, nonché alle reazioni di glicosilazione durante la maltazione, portando a livelli più elevati gli acidi fenolici liberi e a una più facile estraibilità a causa dei cambiamenti nella matrice durante la prima essiccazione^{82,82}. Le fasi di lavorazione termica sono responsabili di importanti cambiamenti relativi al contenuto fenolico del malto. Ad esempio, i composti fenolici possono venire parzialmente degradati (es. acidi fenolici) o diventare parte di polimeri (es. proantocianidine). Ciò può anche essere ricondotto alla formazione di MLD (melanoidine) durante la cottura, presenti principalmente nei malti scuri, che possono intrappolare i polifenoli all'interno della sua struttura abbassando quindi la disponibilità di questi composti fenolici (Maillard, M.-N. and Berset, C., Evolution of Antioxidant Activity during Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1995) 43(7): 1789-1793.). Inoltre, il degrado termico dell'enzima esterasi dell'acido ferulico e gli enzimi correlati, che sono responsabili del rilascio di fenoli legati dalle pareti cellulari, può favorire una diminuzione complessiva di acidi fenolici all'aumentare della temperatura di essiccazione.

PRODOTTI DELLA REAZIONE DI MAILLARD

Il trattamento termico del malto può provocare un imbrunimento non enzimatico noto anche come Reazione di Maillard^{39,171}. I prodotti di reazione di Maillard (MRP) derivano dalla reazione tra zuccheri riducenti, aminoacidi, gruppi di peptidi o proteine e coinvolgono una cascata di prodotti intermedi e reazioni parallele che formano una miscela complessa di composti^{121,166}. La formazione di MRP dipende in gran parte dal tempo e dalla temperatura applicati durante la cottura e l'essiccazione. È stato dimostrato che le condizioni di contenuto di umidità intermedio e le temperature moderate hanno favorito le reazioni di Maillard in fase acquosa mentre con umidità minore (inferiore al 2%) e alte temperature (200 °C) si è verificata una pirolisi estesa e la generazione di composti come maltolo e metilpirazina¹⁷¹. Dal punto di vista cromatico lo sviluppo del colore è stato più rapido utilizzando la tostatura intensiva rispetto alla tostatura delicata, mentre una tostatura lunga e intensa (utilizzando temperature intorno ai 160-170 °C) ha portato ad un veloce sviluppo di composti di colore marrone ad alto peso molecolare (HMW)⁴⁰. La formazione di composti HMW avviene durante le fasi finali della reazione di Maillard e deriva dalla

polimerizzazione di intermedi altamente reattivi³⁰. La tostatura del malto induce la polimerizzazione delle prime forme a basso peso molecolare (LMW, <10 kDa) in composti marroni (HMW > 300 kDa), motivo per cui il contenuto di LMW nei malti torrefatti è inferiore a quello nei malti chiari^{39,33}. Pertanto, i malti chiari e caramellati sono caratterizzati da LMW che si riflettono in un colore un marrone chiaro, mentre i malti tostati sono caratterizzati da HMW con colore marrone intenso e peso compreso tra 60 e 300 dalton^{111,59}. I composti bruni HMW formati negli ultimi stadi della reazione di Maillard sono spesso denominati melonoidine (MLD) e possono essere definiti come composti azotati polimerici di HMW, hanno alto potenziale riducente e sono caratterizzati da un colore bruno intenso, responsabile del colore sviluppato nei malti tostati⁵⁵.

CLASSIFICAZIONE MALTI

In base al colore, i malti d'orzo possono essere classificati in malti chiari (lager) e scuri (speciali). I malti chiari sono utilizzati come ingredienti principali per la produzione di birra e vengono leggermente riscaldati a temperature comprese tra 60°C e 95 °C. Di solito, il malto chiaro viene essiccato in forni convenzionali a temperature inferiori a 100 °C per raggiungere un basso contenuto di umidità (circa 4-5%) e garantire stabilità durante lo stoccaggio e il trasporto. I malti scuri sono classificati in malti colorati, malti caramello e malti torrefatti. I malti colorati vengono prodotti utilizzando temperature fino a 105 °C, mentre i malti caramello e tostati sono prodotti dalla tostatura del malto verde (germinato ma non cotto) o del malto chiaro (cotto) fino a 160 °C e 220-250 °C per 2-2,5 ore, rispettivamente. I malti caramello sono caratterizzati da un colore da 90 a 360 EBC e da un sapore maltato, simile al caffè e caramello. D'altra parte, i malti tostati (“chocolate malt”) hanno un colore da 1200 a 1400 EBC (european brewing convention), mentre il malto nero ha un colore comprese tra 1400-1680 EBC e un sapore molto astringente, affumicato e bruciato. Il chocolate malt è molto simile al malto nero ma viene tostato per periodi più lunghi e temperature più basse, portando a sapori meno pronunciati e colore più chiaro. Recentemente sono stati prodotti malti speciali arricchiti in melanoidine (MLD) utilizzando un processo di germinazione specifica e una lenta essiccazione fino a 130 °C. Queste condizioni portano alla formazione di MLD come parte del processo di essiccazione e migliorano il sapore e il colore del malto. I malti speciali sono prodotti non per il loro contenuto di enzimi ma per fornire colore e sapore extra alla birra; sono usati in quantità relativamente piccole (di solito <5%) rispetto ai malti chiari (> 95%) perché l'uso di malti

speciali determina livelli inferiori di zuccheri fermentescibili e amminoacidi nel mosto. Infatti, il trattamento termico dei malti è responsabile di un imbrunimento non enzimatico, con consumo di zuccheri e aminoacidi, che contribuiscono al colore del malto. I malti non sono tutti uguali e la loro composizione chimica dipende in gran parte dal tempo e dalle temperature del processo (essiccazione e torrefazione)³².

4.2 Dal malto al mosto: ammostamento

Prima di iniziare la vera fase di ammostamento vi è un'operazione preliminare fondamentale che influenza direttamente il rendimento e la filtrazione del mosto. L'operazione in questione è la macinatura del malto e ha come scopo aumentare i punti di contatto del malto con l'acqua per favorire l'estrazione di componenti solubili e l'azione degli enzimi. La macinatura è un processo delicato che ha la funzione di rompere la parte interna del chicco trasformandola in semola e farina, lasciando, il più possibile, intatte le scorze. La macinatura può essere svolta in maniera fine o grossolana. Nel primo caso si ottiene un miglior rendimento ma una difficile estrazione, mentre, avviene il contrario nel secondo caso, ovvero, un peggior rendimento ma una miglior filtrazione. Tale processo può essere svolto "a umido" mediante la miscelazione del malto con acqua; oppure si può eseguire "a secco", in cui il malto viene parzialmente umidificato con acqua o vapore in modo da rendere le glume più elastiche e resistenti. Questa operazione preliminare è influenzata da numerosi parametri: Tipo di mulino (numero di passaggi, dimensioni cilindri etc.), regolazione del mulino (velocità, scarto etc...), umidità del malto (malto umido scorze più integre, l'umidità non deve penetrare nelle scorze ma solo renderle più elastiche), disgregazione del malto (un malto mal disgregato si separa più difficilmente dalle scorze) e infine natura delle scorze (se sono dure e spesse facilitano la filtrazione).

AMMOSTAMENTO

L'ammostamento è il processo di miscelazione che coinvolge il malto appena macinato con acqua riscaldata al fine di “rompere” i componenti chiave del malto (proteine e amidi) che non sono stati trasformati durante il processo di maltazione e, quindi, generare un mosto contenente tutti gli ingredienti necessari per la fermentazione desiderata e per incrementare gli aspetti della qualità della birra. Questo complicato processo è svolto dagli enzimi presenti e sviluppati nel corso della germinazione che verranno attivati a determinate temperature. Una delle fasi principali è quella relativa alla scomposizione dell'amido. L'amido nei granuli ha una struttura molto ordinata, il che tende a rendere i granuli difficili da digerire e poco vulnerabili agli attacchi degli enzimi. Quando i granuli vengono riscaldati (nel caso dell'amido d'orzo oltre 55-65 ° C), l'amido subisce un processo che prende il nome di gelatinizzazione che procura lo sfaldamento e l'indebolimento della struttura fornendo all'amido le caratteristiche di un gel.

Esistono diversi tipi di ammostamento e possono essere generalmente classificati come ammostamento per infusione, ammostamento per decozione e ammostamento a temperatura programmata. Qualunque sia il tipo di ammostamento utilizzato, le caldaie della sala di cottura, oggi giorno, sono quasi esclusivamente fabbricate in acciaio inossidabile (una volta erano di rame); ciò che l'acciaio inossidabile perde nelle proprietà di trasferimento del calore viene compensato dalla sua durezza e capacità di essere pulito a fondo con detergenti caustici e acidi.

Indipendentemente dalla tipologia, la maggior parte dei sistemi di ammostamento (a parte le operazioni di macinazione a umido) incorporano un dispositivo per miscelare la farina macinata con l'acqua (che alcuni birrai chiamano "liquore"). Questo dispositivo, detto "pre-schiacciatore", può essere di vari design, quello classico è lo schiacciatore Steel, che è stato sviluppato per il tradizionale ammostamento ad infusione, chiamato anche “sistema inglese”. L'ammostamento per infusione è relativamente raro, ma ancora sostenuto dai produttori di birra tradizionali; è stato progettato in Inghilterra per trattare malti di birra *ale* ben modificati che non richiedevano un inizio di ammostamento a bassa temperatura per trattare il materiale residuo della parete cellulare (β -glucani). In questo caso il macinato viene miscelato con acqua (un rapporto tipico sarebbe tre parti solide per una parte di acqua) in una caldaia che viene portata a 65°C per effettuare un preriscaldamento del mosto. Questa temperatura facilita la gelatinizzazione dell'amido e la conseguente azione amilolitica. Al termine di questa "conversione", il mosto viene separato dalle trebbie nello stesso recipiente, che incorpora un falso fondo e una struttura per regolare la pressione idrostatica nel letto dei chicchi.

L'ammestamento per decozione, invece, è stato progettato nel continente europeo per trattare i malti *lager* meno modificati rispetto ai malti *ale*. Essenzialmente fornisce la possibilità di iniziare l'ammestamento a una temperatura relativamente bassa, consentendo così l'idrolisi dei β -glucani presenti nel malto, seguita da un aumento della temperatura a un livello sufficiente per consentire la gelatinizzazione dell'amido e la sua successiva idrolisi enzimatica. Il modo in cui viene ottenuto l'aumento della temperatura è il trasferimento di una porzione del mosto iniziale in un recipiente separato dove è all'ebollizione e successivamente riportato nel mosto principale innalzando, così, la temperatura. Si tratta di una versione piuttosto semplificata del processo, che tradizionalmente prevede diverse fasi di aumento progressivo della temperatura; infatti, in genere si fa una bollitura di 10-15 min per le birre chiare e 20-30 min per le scure e si ripete 1-2 volte (max 3). Questa particolare tipologia di ammostamento, dal punto di vista biochimico, può apportare numerosi effetti sul prodotto finito che comprendono, nessuna proteolisi nella parte bollita, maggiore gelatinizzazione e liquefazione dell'amido, maggiore formazione di melanoidine (ricco sapore alle *lager* maltate), maggiore rimozione del DMS (dimetil-solfuro, composto volatile che fornisce sapore e aroma di mais cotto) e infine, maggiore disattivazione di enzimi. L'ultima tipologia di ammostamento utilizzata è quella a temperatura programmata. Sebbene ci siano alcuni birrai aderenti al protocollo di ammostamento per decozione, la maggior parte dei birrai oggi giorno utilizza l'ammestamento correlato ma più semplice a temperatura programmata. Il processo è simile all'ammestamento per decozione, tranne che per il fatto che i successivi aumenti di temperatura avvengono nello stesso recipiente impiegando camicie riscaldate a vapore attorno al recipiente per aumentare la temperatura del contenuto, che viene accuratamente miscelato per garantire trasferimento di calore. L'ammestamento può iniziare a 45–50 ° C, seguito da un aumento della temperatura di 1°C al minuto fino a raggiungere la temperatura di conversione 63– 68 ° C. In questa fase il mosto viene mantenuto dai 50 minuti fino a 1 ora, prima di aumentare nuovamente la temperatura fino ad arrivare alla temperatura di sparging (lavaggio delle trebbie) a 76-78 ° C. Al termine del processo vengono impiegate temperature elevate per arrestare l'attività enzimatica, facilitare la solubilizzazione dei materiali e ridurre la viscosità, consentendo così una più rapida separazione liquido-solido¹².

REAZIONI ENZIMATICHE DURANTE L'AMMOSTAMENTO

-IDROLISI DELL'AMIDO

L'amido è la principale fonte di zuccheri fermentescibili nel malto d'orzo. Durante l'ammostamento, l'amido viene idrolizzato in zuccheri fermentescibili e oligosaccaridi (destrine). Sia la concentrazione che la qualità dell'amido sono importanti rispetto alla resa in zucchero fermentabile. Il contenuto di amido dipende sia dalla varietà dell'orzo che dall'ambiente di crescita⁴. È noto che temperature superiori al normale durante il riempimento del chicco riducono l'accumulo di amido¹⁵⁶, portando a rese inferiori di zucchero fermentabile. La qualità dell'amido può essere descritta dal rapporto tra amilosio e amilopectina, dal rapporto tra grandi granuli di amido e piccoli granuli di amido e dalla temperatura di gelatinizzazione. Di questi parametri di qualità, la temperatura di gelatinizzazione è la più importante dal punto di vista dell'ammostamento. La gelatinizzazione comprende il rigonfiamento dei granuli, il disordine termico multilineare della struttura cristallina e la lisciviazione del polisaccaride solubile; il che implica una maggiore vulnerabilità nei confronti degli enzimi⁷. La temperatura di ammostamento dovrebbe essere abbastanza alta da garantire la gelatinizzazione dell'amido, affinché gli enzimi lo possano degradare in modo più efficiente^{162,98}, ma abbastanza bassa da consentire l'attività della β -amilasi che opera a temperature inferiori. La temperatura di gelatinizzazione può essere definita come la temperatura alla quale la maggior parte dei granuli gelatinizza, in realtà, la gelatinizzazione avviene in un intervallo di temperatura di diversi gradi Celsius. Per l'orzo sono state riportate temperature di gelatinizzazione comprese tra 52 e 68 ° C, più comunemente la temperatura di gelatinizzazione si trova tra i 59 e i 63 ° C¹². La temperatura di gelatinizzazione varia in base alla temperatura ambiente durante il riempimento del chicco, quindi una temperatura superiore al normale aumenta la temperatura di gelatinizzazione dell'amido che implica una perdita di zuccheri fermentescibili¹⁵²; è di fondamentale importanza monitorare la temperatura di gelatinizzazione dell'amido di una coltura di orzo su base annua. È stato dimostrato che i piccoli granuli di amido gelatinizzano a una temperatura più alta¹²⁸ e in un intervallo di temperature più ampio rispetto ai grandi granuli di amido¹²⁴ e sono, quindi, meno predisposti a essere idrolizzati durante l'ammostamento¹⁵. Non ci sono, però, prove evidenti che piccole variazioni nel rapporto tra granuli grandi e piccoli avrebbero un impatto sulle rese dell'estratto fermentescibile ottenuto durante l'ammostamento; di conseguenza questo parametro è relativamente trascurabile nell'ottica qualitativa. Inoltre, borem e

collaboratori²⁰ non hanno trovato alcuna indicazione di una relazione genetica tra la distribuzione delle dimensioni dei granuli di amido e la qualità del malto.

Gli enzimi più importanti nell'idrolisi dell'amido sono α -amilasi (1 \rightarrow 4), β -amilasi (1 \rightarrow 4), destrinasi limite e α -glucosidasi. La termostabilità della β -amilasi è stata ampiamente studiata, poiché è essenziale per la produzione di maltosio dall'amido, infatti viene definita anche come amilasi maltogenica. Anche differenze relativamente piccole nella stabilità termica della β -amilasi sono importanti poiché la β -amilasi attacca solo l'amido gelatinizzato e, all'interno del tipico intervallo di temperatura di gelatinizzazione dell'amido, l'attività della β -amilasi può subire forti oscillazioni; infatti, la sua attività dopo 5 min a 65 °C, è meno della metà rispetto a 55 °C. In combinazione con il fatto che l'amido d'orzo normalmente gelatinizza a 59–63 °C¹², significa che la "finestra di opportunità" per la degradazione dell'amido da parte della β -amilasi è piccola e delicata. Utilizzando l'analisi di regressione di prove di ammostamento in aggiunta di riso e malto intero a 65 °C, Evans⁵⁸ ha dimostrato che l'attività totale e la termostabilità della β -amilasi (ma anche l'attività dell' α -amilasi, l'attività della destrinasi limite totale e l'indice di Kolbach) erano importanti predittori della qualità del malto e fermentabilità del mosto. L' α -Amilasi è l'enzima più stabile al calore, infatti la sua temperatura ottimale di attività si trova intorno ai 65-74°C (diventa inattivo a 80°C) e in questo intervallo di temperatura catalizza l'idrolisi casuale interna dei legami α - (1 \rightarrow 4) -glicosidici nell'amilosio e nell'amilopectina, ottenendo prodotti come glucosio, maltosio, maltotriosio partendo dall'amilosio, mentre, dall'amilopectina si ottengono una serie di oligosaccaridi ramificati di diversa lunghezza detti anche destrine limite (eritrodestrine con peso molecolare elevato e acrodestrine con peso molecolare più basso). Pertanto, l' α -amilasi fornisce il primo stadio nella degradazione dell'amido in zuccheri. La β -Amilasi stacca dalle catene di amilosio ed amilopectina unità di maltosio in maniera sequenziale a partire dall'estremità riducente.

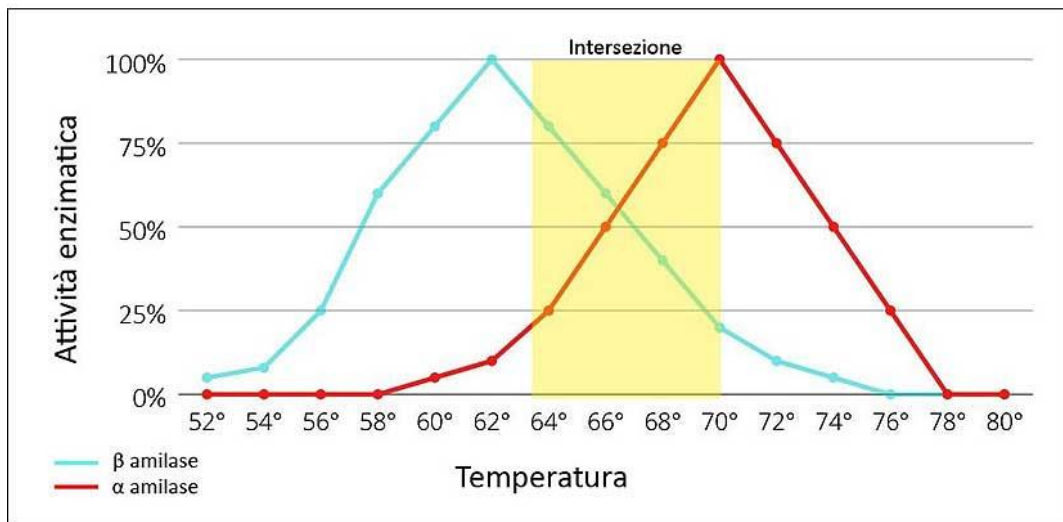


Figura 27 Attività enzimatica di alfa e beta amilasi in relazione alla temperatura

La β -Amilasi agisce a temperature più basse dell' α -Amilasi ed è completamente denaturata a 70° C. tuttavia, per poter essere attaccato, l'amido deve essere liberato dalla sua struttura cristallina. Le catene di amilosio ed amilopectina sono avvolte su sé stesse e sono tenute assieme in parallelo da ponti di idrogeno a formare strutture altamente compatte ed impenetrabili. L'amido deve dunque essere gelatinizzato per permettere agli enzimi amilolitici di svolgere la loro funzione. La gelatinizzazione consiste nella rottura di questi ponti ad idrogeno per mezzo di acqua e calore. L'amido all'interno del chicco d'orzo è presente in granuli di due grandezze diverse. I granuli più grossi hanno dimensioni comprese tra 15 e 20 μm , quelli più piccoli meno di 6 μm . Nonostante quelli più piccoli siano di gran lunga più numerosi, quelli più grossi costituiscono circa 85-90% dell'amido totale. I granuli più grossi iniziano a gelatinizzare a temperature comprese tra i 58 e i 62°C. Quelli più piccoli invece hanno bisogno di temperature superiori a 68°C. Quindi normalmente per rendere l'amido attaccabile alla β -Amilasi è necessario portarlo alla temperatura di 65°C che lo gelatinizza quasi immediatamente e poi abbassare leggermente la temperatura a 62-63°C consentendo alla β -Amilasi di sopravvivere più a lungo e di funzionare bene. Il meccanismo d'azione delle β -amilasi coinvolge un meccanismo a spostamento singolo con inversione della configurazione. Un residuo di carbossilato agisce da base ed attacca una molecola d'acqua; il secondo residuo carbossilico agisce come acido ed attacca il legame glicosidico; si ha la formazione di un intermedio con una carica positiva sul C1 del legame glicosidico che lega l'OH della molecola d'acqua.

La destrinasi limite è prodotta solo nell'ultima fase della maltazione quindi può essere presente in piccolissime quantità nei malti meno modificati. Essa è in grado di tagliare gli zuccheri che compongono l'amilopectina in prossimità delle ramificazioni. Inoltre, nel malto si trova unita ad

altre molecole che ne limitano ulteriormente la sua attività, detti anche inibitori^{110,109}. L' α -glucoamilasi ha una struttura composta da 6 α -eliche parallele, circondate da altre 6 α -eliche, parallele tra loro ma antiparallele rispetto alle prime, collegate anch'esse da regioni loop di varia lunghezza. Tale enzima idrolizza i legami α -1,3, α -1,4 e α -1,6 ma è meno efficiente dell' α -amilasi. Il suo ruolo principale è quello di rompere i legami crociati dell'amilopectina (ramificazioni) portando alla completa degradazione in glucosio. Generalmente è usata per ridurre il contenuto di CHO (contenuto in carboidrati) delle birre.

Il controllo del pH dell'ammostamento ha qualche effetto sugli enzimi amilolitici, infatti, è stato dimostrato che un leggero abbassamento del pH dell'ammostamento ha un effetto positivo sull'attività della destrinasi limite¹⁵¹. Quando il pH del mosto è stato abbassato da 5,8 a 5,4, l'attività della destrinasi limite è aumentata¹⁵², tuttavia, l'effetto della diminuzione del pH dell'ammostamento sulle attività di α -amilasi e β -amilasi era opposto all'effetto sulla destrinasi limite. Durante l'ammostamento, l'attività α -amilasica più alta è stata misurata a pH 5,4–5,8 e l'attività β -amilasica più alta a pH 5,6–5,8. La diminuzione dell'attività della β -amilasi è stata particolarmente marcata con la diminuzione del pH, sebbene sia stato riportato che la β -amilasi ha un ampio intervallo di pH ottimale¹⁰⁷. Il pH ottimale degli enzimi amilolitici si rifletteva nella fermentabilità del mosto, difatti un abbassamento del pH dell'ammostamento da 5,8 a 5,4 ha aumentato la quantità di zuccheri fermentescibili, mentre un ulteriore abbassamento al di sotto di 5,4 ha diminuito la fermentabilità del mosto¹⁵². Ciò suggerisce che la destrinasi limite può essere limitante se il pH del mosto non viene regolato, mentre l'aumento dell'attività limite della destrinasi è contrastato dalla diminuzione delle attività dell' α -e β -amilasi quando il pH scende al di sotto di 5,4.

-IDROLISI DELLE PROTEINE

La proteolisi iniziata nel chicco in germinazione e continua durante l'ammostamento. Le proteasi si dividono in endopeptidasi ed esopeptidasi. Le endoproteasi catalizzano l'idrolisi interna delle proteine, dando luogo alla formazione di peptidi. Zhang e collaboratori¹⁷⁴ hanno rilevato 42 diverse attività della proteinasi nel malto verde con pH ottimale compreso tra 3,8 e 8,5. Le proteasi sono classificate, in base al loro meccanismo di azione enzimatica, in metalloproteasi e proteinasi di

cisteina, serina e aspartiche. Secondo Jones e Budde⁸⁵, le metalloproteinasi e le proteinasi di cisteina giocano probabilmente il ruolo più importante nella solubilizzazione delle proteine durante l'ammestamento. Le proteinasi della cisteina sono in grado di idrolizzare le principali proteine di immagazzinamento nell'orzo, cioè le ordeine; sono una classe di enzimi più attiva a pH acido, cioè, compreso tra 3,8 e 5,0^{92,135}; anche le metalloproteinasi sono in grado di idrolizzare l'ordeina, in particolare l'ordeina D⁶¹, però, a differenza delle proteinasi della cisteina hanno un pH ottimale compreso tra 4,7 e 6,5¹⁷⁰, al contrario delle proteinasi aspartiche che nell'orzo germinato idrolizzano proteine come l'inibitore della tripsina/ α -amilasi ma non l'ordeina¹⁷⁵.

Le esopeptidasi catalizzano l'idrolisi delle proteine rimuovendo i singoli aminoacidi dalla catena contribuendo, quindi, alla fase finale dell'idrolisi delle proteine. Si ritiene che le carbossipeptidasi, che attaccano i peptidi dal C-terminale (carbonio-terminale), siano le esopeptidasi più importanti coinvolte nell'idrolisi delle proteine di immagazzinamento dell'orzo. Il loro pH ottimale è compreso tra 4,8 e 5,7¹¹⁹. Le aminopeptidasi neutre e alcaline hanno un pH ottimale più elevato rispetto alle carbossipeptidasi. È improbabile che siano coinvolti nell'idrolisi delle proteine di conservazione durante la maltazione, ma, nell'ammestamento possono contribuire alla liberazione di aminoacidi liberi¹¹⁹. Ci sono pochi dati pubblicati sulla stabilità termica dei singoli enzimi proteolitici, ma, con poche eccezioni, sono considerati relativamente labili al calore dell'ammestamento. Jones e collaboratori⁸⁸ hanno dimostrato che le proteasi sono stabili nella fase di riposo proteico (fase dell'ammestamento a 38°C per 55 minuti, funzionale alla degradazione delle proteine in aminoacidi, nutrienti indispensabili per la corretta crescita del lievito), ma si inattivano rapidamente quando la temperatura viene innalzata a 72 ° C per la conversione dell'amido. La misurazione delle attività enzimatiche con l'elettroforesi su gel bidimensionale ha rivelato che le attività di tutte le proteinasi rilevate sono diminuite all'incirca alla stessa velocità durante la conversione dell'amido, solo un piccolo numero di presunte proteinasi della classe delle serine mostrava ancora una bassa attività anche dopo 16 min a 72 ° C. Inoltre, Moll e Flayeux¹²⁰ trovarono che le carbossipeptidasi sono attive a 55 ° C ma diventano rapidamente inattive a 60 ° C. La stabilità al calore degli enzimi proteolitici è stata spesso studiata indirettamente, misurando la liberazione di composti azotati o aminoacidi nel mosto. Ad esempio, Morimoto¹²² ha studiato l'effetto della temperatura e del tempo, relativi all'ammestamento, sulla liberazione degli aminoacidi durante l'ammestamento isotermico a 45-70 ° C. Le massime rese di composti azotati, inclusi gli aminoacidi liberi, sono state ottenute con temperature di ammestamento da 45 a 50 ° C; a temperature più elevate la quantità di azoto amminico diminuiva. Altro parametro da considerare dal punto di vista biochimico durante la produzione birraia è lo spessore del mosto che può

influenzare l'attività di alcune proteasi; difatti, in seguito a numerosi studi, è emerso che le carbossipeptidasi sono risultate particolarmente sensibili allo spessore del mosto, cioè erano più facilmente inattivate in un mosto diluito che in un mosto con un alto rapporto malto / acqua. In seguito a numerosi studi, è stato la maggior parte della proteina finale del mosto era solubilizzato durante il maltaggio e rispetto alla fase di ammostamento. Pertanto, rispetto alla maltazione, il processo di ammostamento ha un effetto minore, ma non trascurabile, sulla quantità totale di proteine solubili e amminoacidi nel mosto. Quindi, dal punto di vista pratico, Il mastro birraio ha la possibilità e le informazioni necessarie per controllare la composizione e la qualità delle proteine del mosto e degli amminoacidi liberi, modificando le condizioni di ammostamento. Sulla base della termostabilità degli enzimi proteolitici e di ricerche precedenti¹²², l'ammostamento a 65 ° C dovrebbe comportare una proteolisi minima o nulla; tuttavia, poco si sa su come una temperatura di ammostamento più alta influenzi la qualità delle proteine solubili o la composizione degli amminoacidi, cioè se le proteine e i peptidi solubilizzati nell'ammostamento siano diversi da quelli solubilizzati durante la fase di maltazione. Secondo⁸⁹, alanina, valina, leucina e lisina sono tutte prodotte in quantità significative dalla proteolisi durante l'ammostamento, mentre tale processo ha un effetto minore sulle concentrazioni di acido aspartico e prolina del mosto. Riis¹⁴¹ ha scoperto che l'ammostamento aumenta le concentrazioni di lisina, leucina e arginina, ma non quelle di acido glutammico, glutammina e prolina. Moll¹²⁰ e collaboratori hanno eseguito esperimenti di ammostamento isotermico a temperature comprese tra 40 e 70 ° C e hanno effettivamente notato alcune differenze nella composizione degli amminoacidi tra le diverse temperature di ammostamento. Come previsto, una temperatura di ammostamento di 70 ° C ha portato a concentrazioni inferiori della maggior parte degli amminoacidi rispetto all'ammostamento a 40 ° C. Un'eccezione era l'acido glutammico, la cui concentrazione era maggiore a 70 ° C che a 40 ° C. Le concentrazioni di prolina e leucina erano più alte dopo 1 ora a 40 ° C, mentre le concentrazioni di acido aspartico, valina, tirosina e lisina erano più alte a 50 ° C che a 40 ° C.

Un altro modo per controllare la proteolisi del mosto durante l'ammostamento è attraverso il pH. Pöyri¹³⁶ ha scoperto che la formazione di proteine "gel" durante l'ammostamento diminuiva con la diminuzione del pH fino a pH 4,8. Questi autori hanno ipotizzato che le ordeine B e D fossero più ampiamente idrolizzate a pH più basso dalle proteinasi della cisteina con un pH ottimale di 3,8-4,5. Si ritiene che questa tipologia di proteine comprometta il deflusso del mosto. Jones e⁸⁶ hanno scoperto che un aumento del pH del mosto da 5,1 a 6,6 ha portato a un calo di cinque volte dell'attività delle proteinasi complessive, accompagnato da una diminuzione delle proteine solubili e del FAN. Inoltre, diverse proteinasi hanno coprivano un ampio intervallo di diversi valori di pH: le metalloproteinasi e la serina erano attive a pH più elevato e le proteinasi aspartiche e cisteina a pH

più basso. Il calo dell'attività totale che ha accompagnato l'aumento del pH era dovuto al fatto che le proteinasi cisteina dominanti non erano più attive. Pertanto, una variazione del pH ha il potenziale per regolare sia il livello totale di proteolisi che le attività relative delle diverse proteinasi.

-IDROLISI DEI BETA GLUCANI

I chicchi d'orzo hanno un contenuto di β -glucani notevolmente elevato che va dal 2,5 all'11,3% ed è di circa il 4% nel malto Barke, generalmente considerato una varietà da malto di buona qualità⁸³. Questo tratto è determinato dal genotipo, dall'ambiente e dalle loro interazioni ed è stato suggerito di prestare maggiore attenzione alla selezione delle cultivar rispetto ai livelli di β -glucano, per avere una maggiore qualità nel prodotto finito^{173,86}. I β -glucani dell'orzo differiscono strutturalmente da quelli dell'avena e del grano, infatti, le reazioni che coinvolgono i β -glucani dell'orzo durante il processo di birrificazione rilasciano oligosaccaridi con un rapporto cellotriosio-cellobiosio più elevato rispetto a quelli dell'avena e un rapporto inferiore a quelli del frumento^{86,165}; Wang e Zhang hanno studiato otto diverse cultivar di orzo coltivate in sette diverse località e hanno dimostrato che, in media, l'80% del β -glucani nei chicchi veniva degradato durante la maltazione, tuttavia, la solubilizzazione dei restanti glucani ad alto peso molecolare si traduce in una maggiore viscosità del mosto (aspetto negativo dal punto di vista pratico). L'influenza dei β -glucani sulla viscosità del mosto è stata descritta da una correlazione lineare quando la concentrazione di β -glucani è compresa tra 50 e 1.000 mg / L. L'alta viscosità del mosto è vista come controproducente per molte operazioni di birrificio come la miscelazione e l'agitazione del malto e il pompaggio e la separazione del mosto, quindi livelli minimi di β -glucani sono desiderabili a questo riguardo. Nei casi peggiori, l'elevata viscosità causata da alti livelli di β -glucani può rallentare la separazione del mosto così tanto che l'attrezzatura viene occupata più a lungo del previsto e le miscele non vengono completate in tempo⁸⁵. D'altra parte, i β -glucani sono accettati come ingredienti funzionali e bioattivi con benefici per la salute^{23,99}. Le endo- (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) - β -D-glucanasi idrolizzano il β -glucano durante il maltaggio e l'ammontamento, tuttavia, questi enzimi sono molto termolabili, cosa che deve essere presa in considerazione quando si progetta il programma di ammontamento. Barber¹³ e collaboratori hanno riportato che solo il 50% dell'attività si conservava dopo 10 minuti di ammontamento a 45 ° C. Loi¹⁰³ ha riportato che il 20% dell'attività rimaneva costante dopo 10 min a 55 ° C e meno del 5% dopo 10 min a 65 ° C. Sono state riportate alcune differenze varietali nell'attività della β -glucanasi, il che suggerisce che è possibile aumentare l'attività e possibilmente

anche la stabilità al calore della β -glucanasi mediante qualche apposito incrocio varietale^{72,13,68}. Uno dei primi obiettivi dell'ingegneria genetica dell'orzo era quello di integrare lo spettro enzimatico del malto con un enzima batterico β -glucanasi termostabile¹⁰¹. Anche se i risultati ottenuti erano promettenti^{84,127}, questa strategia è stata sospesa a causa di complicate questioni normative e della percezione pubblica relativa alle colture geneticamente modificate e alle operazioni in pieno campo. Aggiungendo β -glucanasi batteriche eterologhe al mosto, McCarthy e collaboratori¹¹⁷, ad esempio, così come Celestino³⁶, sono stati in grado di ridurre in modo efficiente la viscosità del mosto e migliorare il tempo di filtrazione richiesto. Recentemente è stata clonata una nuova famiglia candidata di β -glucanasi batteriche termostabili con potenziali applicazioni nella produzione di birra¹⁰. Tuttavia, se l'uso di enzimi microbici non è un'opzione per il birrifico, le uniche opzioni che rimangono sono l'uso di una bassa temperatura di ammostamento e di malti molto ben modificati. La modifica del malto ha un impatto importante sul rilascio di β -glucano durante l'ammostamento⁹³.

LIPIDI

I lipidi più abbondanti nel malto sono l'acido linoleico polinsaturo (C18: 2) e linolenico (C18: 3)⁹⁵. Durante l'ammostamento, possono essere rilasciati più acidi grassi liberi attraverso l'azione delle lipasi, che hanno dimostrato di rimanere attive anche a 67 ° C¹⁴⁵. L'acido linoleico e, in particolare, linolenico, che contengono rispettivamente due e tre doppi legami, sono soggetti all'ossidazione. L'ossidazione porta alla formazione di idroperossidi reattivi che si degradano facilmente in acidi grassi monoidrossilici, fitoprostani, carbonili, aldeidi e chetoni⁶.

L'ammostamento è un passaggio vulnerabile per quanto riguarda l'ossidazione dei lipidi attraverso l'autoossidazione o l'ossidazione enzimatica. La miscela è esposta all'ossigeno atmosferico, che promuove il danno ossidativo. Si dice che l'orzo contenga due enzimi lipossigenasi (LOX): LOX1, che catalizza la formazione di 9-idroperossido, e LOX2, che catalizza la formazione di 13-idroperossido^{157,51,77}. Entrambi i prodotti sono stati rilevati durante l'ammostamento¹⁶⁴. La concentrazione di 9-idroperossido era 10 volte superiore a quella di 13-idroperossidi, il che indica che l'attività LOX1 è più significativa nell'ammostamento rispetto a LOX2. I 9 e 13-idroperossidi vengono ulteriormente convertiti rispettivamente in trans-2-nonenali ed esanale, che danno origine al sapore stantio nella birra. Kuroda e collaboratori⁹⁶ hanno mostrato che questa fase di conversione finale può coinvolgere un'attività simile a quella della liasi, che è attiva anche a 70 ° C durante l'ammostamento. Tuttavia, i LOX sono relativamente labili al calore e la formazione di

idroperossidi può essere significativamente limitata mediante l'ammestamento a 63 ° C invece che a 45 ° C. Inoltre, Malfliet e De buck¹¹³ hanno dimostrato che l'uso della macinazione grossolana invece della macinazione fine e la regolazione del pH a 5,2 (da 5,6) riduce l'attività di LOX nell'ammestamento. Un altro approccio per ridurre al minimo l'impatto ossidativo sulla birra è lo sviluppo di varietà di orzo prive di uno o entrambi gli enzimi LOX. Hirota⁷⁵ ha sviluppato una varietà di orzo priva dell'enzima LOX1 incrociando una varietà autoctona d'orzo mutante LOX1- con la varietà autoctona giapponese Taisyomugi. La birra prodotta a partire da questo malto ha mostrato livelli ridotti di trans -2-nonenale. Allo stesso modo, Skadhaug¹⁴⁹ ha sviluppato varietà di orzo che non sono in grado di produrre enzimi funzionali LOX1 o LOX2. Le nuove varietà di orzo dovrebbero produrre birra con un sapore migliore e una maggiore stabilità dell'aroma.

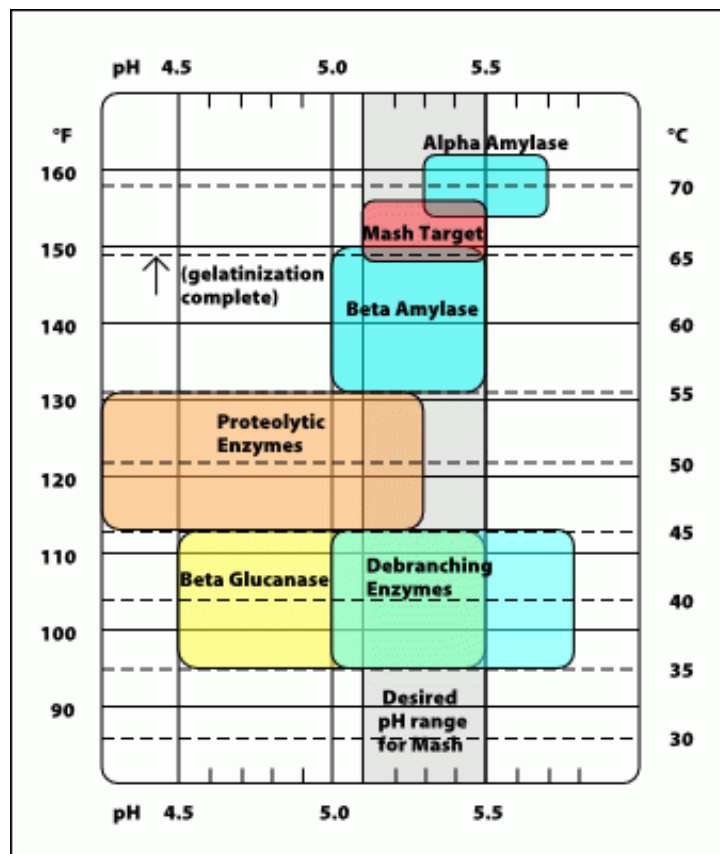


Figura 28 schema degli intervalli di attività ottimali degli enzimi durante l'ammestamento

4.3 Filtrazione

Quando il processo di ammostamento è completo, il mosto che è stato prodotto dal malto deve essere isolato dal materiale insolubile detto "trebbie". Lo scopo e l'obiettivo generale della filtrazione è quello di separare e recuperare quanto più estratto liquido residuo dai chicchi esausti (trebbie) in modo efficiente (nel senso sia del tempo che del recupero dell'estratto), mantenendo la qualità del mosto desiderata. All'inizio della fase di filtrazione, è comune ricircolare il mosto sopra il "letto di ammostamento" in un processo che prende il nome di "vorlaufing". Lo scopo di questo passaggio è duplice. Uno è quello di "impostare" il letto di chicchi su cui stabilire una pressione differenziale che porterà a un deflusso regolare ed efficiente senza rompere il letto o incollarlo contro il falso fondo, complicando quindi la fase di run-off. L'altro motivo principale relativo alla fase di vorlauf è quello di stabilire il letto di grano nel recipiente come letto filtrante per la raccolta del mosto. Una volta iniziata la raccolta del mosto, nel bollitore o in un serbatoio separato, il "primo mosto" sarà della massima densità o gravità, tipicamente misurata in gravità specifica o gradi Plato. Con il progredire del deflusso, il volume del liquido nel recipiente di filtrazione diminuirà, lasciando alla fine esposta la parte superiore del letto di trebbie. A questo punto, o appena prima che la parte superiore del letto di grano venga esposta, dovrebbe iniziare la fase di sparging, ovvero il lavaggio delle trebbie con acqua calda. Ci sono diverse filosofie che definiscono quando dovrebbe iniziare lo sparging; subito prima, o dopo che il letto di grano è stato esposto all'atmosfera all'interno del recipiente di filtrazione? Alcuni birrai, però, non sono convinti della validità di questa fase; infatti, alcuni birrai ritengono che lo sparging sul letto di grano esposto porterà all'inaccettabile ingresso di ossigeno nel mosto, e altri, invece, ritengono che vi sarà un aumento del recupero dell'estratto.

Nella maggior parte dei birrifici di tutto il mondo, il processo di separazione del mosto prevede l'uso di un recipiente chiamato "Lauter Tun". Si tratta di un tino circolare con un fondo a fessure o una serie di schermi, chiamato falso fondo, che si trova appena sopra il fondo duro del recipiente. Questa configurazione consente di trattenere le trebbie, mentre il mosto dolce viene estratto e raccolto per l'ebollizione. Un'altra tipologia di recipiente è il Mash Tun (recipiente combinato per ammostamento e filtrazione). Questo tipo di contenitore è più spesso impiegato da piccole birrerie e / o birrerie di pub dove lo spazio fisico per un kit di produzione di birra esteso può essere limitato, così come le risorse di capitale. Oltre a queste considerazioni c'è l'accettazione generale che i principi della separazione del mosto in un Mash Tun rispetto a un Lauter Tun non differiscono molto. Entrambi i tipi di tino funzionano secondo principi simili. Entrambi i recipienti incluserono

come parte del progetto fondamentale un “falso fondo ” o una serie di schermi a fessura sul fondo del contenitore, su cui si trova la miscela di mosto dopo il trasferimento dal recipiente di ammostamento (operazione Lauter Tun), o direttamente al mashing-in (operazione Mash Tun). Inoltre, entrambi i tipi di recipiente inclusero una pompa per il trasferimento del mosto al recipiente di raccolta. Un'eccezione può essere in un progetto di birreria in cui i tini sono disposti in un disegno verticale e la forza di gravità è impiegata per spostare il mosto da recipiente a recipiente, sebbene questo sia molto raro. Un Lauter Tun ha più attrezzature e / o parti mobili di un Mash Tun come un set di bracci rastrellatori con rastrelli, o “coltelli”, che aiutano a mantenere la porosità ottimale del letto del mosto ruotandolo e spostandolo continuamente. Una combinazione di Mash Tun può avere anche questi componenti, ma i contenitori molto piccoli (capacità di lotto inferiore a 10 hL) vengono solitamente progettati senza tale apparato.

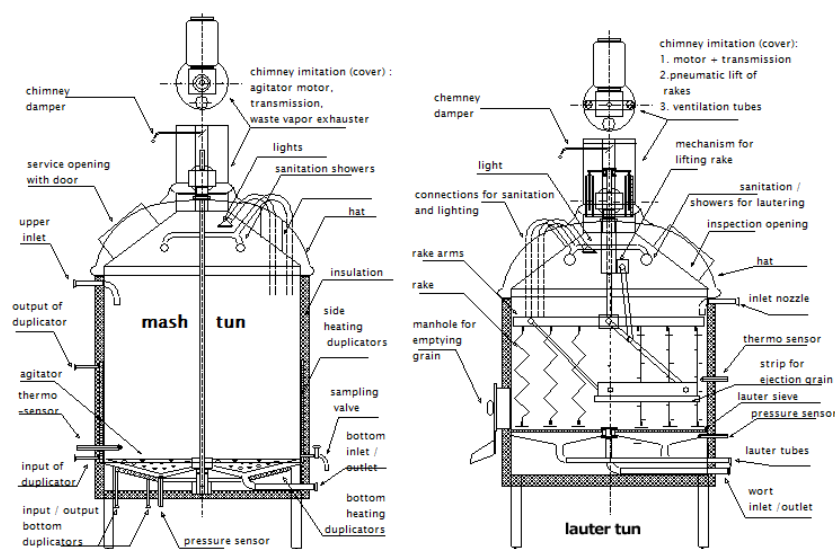


Figura 29 Mash Tun e Lauter Tun a confronto

Nel pensare al principio della separazione del mosto, stiamo davvero discutendo un tipo di processo di filtrazione che trova fondamento teorica nella legge di Darcy. In questo contesto, il falso fondo funge da piastre filtranti su cui poggia il mezzo filtrante (poltiglia e trebbie). Prima dell'effettiva raccolta del mosto, viene impiegata la pratica del “vorlaufing” già descritta in precedenza. Questa pratica aiuta a stabilire e impostare il mosto come mezzo di filtraggio e stabilizza la pressione differenziale. Il processo che prende il nome di Vorlaufing aiuta anche a iniziare a filtrare le particelle solide più grandi e ad aumentare la limpidezza del mosto. Ridurre la quantità di solidi trasferiti nel bollitore del mosto può avere un effetto positivo sulla sua qualità complessiva dal punto di vista della stabilità del sapore e della stabilità fisica. È necessario ripetere che l'importanza della macinazione poiché la dimensione delle particelle macinate influisce direttamente sulle

prestazioni del processo di filtrazione. Una dimensione delle particelle troppo piccola può comportare un processo di filtrazione lungo e difficile, mentre una dimensione delle particelle troppo grande consentirà un deflusso troppo rapido. In entrambi i casi, la resa dell'estratto ne risentirà. Dopo aver completato la fase di vorlaufing, in base a un limite di tempo impostato o dopo aver raggiunto un obiettivo di limpidezza del mosto desiderato, inizia la raccolta del mosto. La raccolta del mosto in un recipiente separato, o in serbatoio apposito, più comune nei birrifici più grandi dove una delle funzioni critiche è mantenere un'elevata efficienza di produzione. Il deflusso del primo mosto, o dei primi versamenti, dovrebbe iniziare a una velocità relativamente bassa in modo da non causare un grande differenza tra la pressione superiore sul letto di ammostamento e la pressione sul fondo del recipiente in cui viene aspirato il mosto lavorato. Per questo motivo, può essere consigliabile eseguire il deflusso della prima parte del filtrato utilizzando solo la gravità, se possibile, per garantire un inizio dolce al processo di separazione del mosto. Quando il mosto viene raccolto nel bollitore, il processo di riscaldamento del mosto può iniziare non appena l'elemento riscaldante nel bollitore è completamente coperto di mosto, sia che si tratti del fondo di un bollitore a fuoco diretto, degli elementi di un bollitore elettrico, o le camicie di vapore inferiori (vedere anche la Sezione 3.4, Bollitura del mosto). Mentre il run-off (prima raccolta del mosto) continua, è importante controllare la parte superiore del letto di ammostamento, per garantire che l'ingresso di ossigeno nel letto di mosto sia ridotto al minimo e a questo proposito si consiglia di non far scorrere il primo mosto ricco di estratto sotto la superficie del letto di ammostamento. Quando la superficie del mosto nel Tun è all'incirca pari alla superficie del mosto, o appena prima che il mosto visibile in piedi nella parte superiore del letto di mosto scompaia nel letto, può iniziare la fase successiva del processo di filtrazione. Il primo mosto raccolto è essenzialmente il mosto della più alta densità (gravità specifica) e con la maggior parte dei componenti di malto desiderati disciolti (e inevitabilmente alcuni componenti indesiderati). Tuttavia, se il processo di filtrazione dovesse includere solo il deflusso del primo mosto, gran parte dell'estratto disponibile rimarrebbe trascinato nelle trebbie. Per questo motivo vi è una fase successiva di "sparging", ovvero l'applicazione di acqua calda ad una temperatura massima di 78 ° C sulla sommità del letto di ammostamento e "risciacquo" delle trebbie consentendo così l'ulteriore recupero dell'estratto. Man mano che si procede con questa fase, il peso specifico del mosto filtrato diminuisce gradualmente. L'acqua di spargimento può essere applicata mediante un processo batch o un processo in un processo continuo. In un processo di sparging continuo, il flusso dell'acqua di spargimento corrisponderà o sarà leggermente superiore alla velocità di flusso del mosto che fuoriesce dal filtratore. In un processo di spargimento in batch (cioè 2-4 piccoli sparging di acqua calda distribuiti sul letto di ammostamento). In entrambi i casi, il monitoraggio del processo per prevenire lo sparging

eccessivo, così come lo sparging insufficiente, aiuterà a mantenere una differenza di pressione costante, un deflusso e una raccolta continui e regolari del mosto. Un'altra conseguenza dello sparging è il graduale riscaldamento del letto di ammostamento, che quando combinato con il graduale indebolimento della concentrazione del mosto, influisce su una riduzione della viscosità del mosto. Ciò dovrebbe consentire al birraio di aumentare gradualmente la velocità del flusso di mosto dal filtratore. Man mano che il deflusso progredisce e la forza del mosto continua a diminuire, è necessario monitorare o per lo meno avere la consapevolezza della qualità del mosto. Con la diminuzione della concentrazione dell'estratto fermentescibile e di altri componenti desiderabili nel mosto, si verifica l'aumento dei componenti indesiderabili. In particolare, i composti polifenolici e i lipidi delle trebbie vengono lisciviati nelle colate più deboli verso la fine del deflusso, con conseguenze deleterie per la foschia e la qualità del sapore della birra. Per questo motivo, il deflusso dovrebbe essere interrotto quando la gravità del mosto raggiunge un minimo di 2,5 ° Plato o quando il pH sale a 5,8. Se si prepara un mosto a bassa gravità (e / o una birra a bassa gradazione alcolica), è possibile che il deflusso debba essere interrotto per questi motivi prima che il bollitore sia pieno. Non è necessario gettare via i chicchi finali o "mosto debole", infatti, questo liquido può essere recuperato e riciclato come parte del liquore di ammostamento del lotto successivo o come parte del liquore di spargimento del lotto successivo. È necessario riflettere sulla durata di tempo in cui il mosto debole dovrebbe essere conservato prima di riutilizzarlo. La stabilità microbiologica è probabilmente il principale problema, quindi se si vuole conservare tale liquido per più di poche ore, è necessario prendere in considerazione la sterilizzazione di qualche tipo e la conservazione in un contenitore microbiologicamente pulito a una temperatura relativamente bassa. Dopo che il deflusso è completo e il bollitore del mosto è pieno, due processi ora avvengono simultaneamente: l'inizio dell'ebollizione del mosto e la fine del processo di filtrazione, che comporta la rimozione delle trebbie. La rimozione dei cereali esausti e il lavaggio del Lauter o Mash Tun è una parte del processo di filtrazione che dovrebbe iniziare immediatamente dopo aver drenato il mosto debole rimanente. In tini come il Mash Tun molto piccoli che non hanno un meccanismo di rastrellatura, le trebbie vengono tipicamente rimosse manualmente, attraverso una porta alla base del recipiente (situata appena sopra gli elementi del falso fondo), o semplicemente fuori dalla parte superiore. Con contenitori più grandi (Lauter Tuns) dove il volume delle trebbie rende impraticabile la rimozione manuale, una lama "aratro" è solitamente incorporata come parte dell'attrezzatura di rastrellatura e un portello o una porta sul fondo reale del recipiente può essere aperta per facilitare rimozione delle trebbie. Quando la rimozione delle trebbie è pronta per iniziare, la lama dell'aratro può essere sbloccata dai bracci di rastrellatura e il meccanismo può essere ruotato attorno al recipiente, mentre le lame dell'aratro continueranno a scendere. Una volta che i chicchi

esausti vengono espulsi, devono essere raccolti in un recipiente di qualche tipo che consenta la rimozione e il loro trasporto dal birrificio. In un birrificio molto piccolo, questo potrebbe essere un fusto di plastica vuoto o più fusti, in base al requisito del volume di grano speso. In un birrificio più grande, con un volume di grano speso più elevato, i chicchi potrebbero essere raccolti mediante una tramoggia di scarico con carrello elevatore che consente un facile trasporto e rimozione. Uno sbocco comune per i cereali esauriti è il bestiame o le operazioni di allevamento in cui i tali cereali possono essere somministrati agli animali poiché questo materiale contiene ancora un'elevata quantità di nutrienti (in alcuni paesi questo deve essere fatto in conformità con determinati programmi di sicurezza alimentare). È, inoltre, possibile anche il compostaggio, così come lo smaltimento in discarica, ma in alcune aree questi possono essere sbocchi più costosi e dispendiosi. In ogni caso, successivamente, il Mash / Lauter Tun dovrebbe essere lavato e i chicchi esausti dovrebbero essere rimossi dalle aree di produzione del mosto e della birra del birrificio il prima possibile, poiché sono ricchi di microrganismi che possono compromettere il prodotto finito⁴²

4.4 Bollitura e luppolamento

Dopo la separazione dalle trebbie, il mosto viene bollito in un recipiente apposito che prende il nome di bollitore, insieme al luppolo⁹⁵. Diversi sistemi di bollitura del mosto sono stati confrontati da Kattein e Hermann⁹⁰ e spiegati in dettaglio da Kunze⁹⁵. Per esempio, alcuni bollitori sono dotati di un dispositivo chiamato Calandria che può essere situata all'esterno del bollitore, nel caso in cui il mosto venga agitato e ricircolato mediante un sistema di pompaggio¹⁴. Gli obiettivi della fase del processo di ebollizione sono molteplici e tutti fondamentali alla riuscita del prodotto finito.

- **STERILIZZARE IL MOSTO**

da un punto di vista microbiologico, possiamo considerare il mosto come una matrice ancora molto “sporca”, ovvero ricca di microrganismi alteranti degradativi. Le temperature del processo fino a questo punto hanno molto probabilmente raggiunto solo circa 76 ° C in un piccolo sistema di infusione. Se lasciato così e non bollito, il mosto non sarebbe idoneo alla fermentazione mediante la produzione di ceppi di lievito (*S. cerevisiae*) a causa del pesante carico microbico costituito in gran parte da ceppi di *Lactobacillus*, nonché da specie fungine e lievito selvatico. Questi microrganismi, presenti in quantità così elevate nel mosto non bollito, interferirebbero sicuramente con l'attività del

lievito di birra, determinando caratteristiche di sapore indesiderate e problemi di torbidità nella birra. L'ebollizione del mosto comporta una significativa riduzione dei microrganismi che alterano la birra, come la specie *Lactobacillus*, consentendo la fase fermentativa senza ostacoli. L'abbassamento del carico microbico viene anche favorito da altre trasformazioni durante la bollitura come la riduzione del pH e l'aggiunta di acidi del luppolo che hanno proprietà antimicrobiche, aiuteranno anche a scoraggiare la futura crescita di organismi che alterano la birra nel mosto.

- INATTIVARE GLI ENZIMI

Questo concetto si riferisce all'inattivazione dei limitati enzimi del malto che possono essere ancora attivi nel mosto. Il mosto bollente distrugge completamente qualsiasi attività enzimatica residua e "blocca" efficacemente la composizione dei carboidrati e la fermentabilità del mosto. Questo concetto potrebbe essere applicato anche ai composti proteici, in particolare ai polipeptidi che richiedono la denaturazione per essere efficaci nel loro ruolo di proteine stabilizzatrici della schiuma.

- ISOMERIZZAZIONE

Durante il processo di ebollizione, nel mosto si verificano molti e complessi cambiamenti chimici. In parole povere, il concetto di isomerizzazione si riferisce ai cambiamenti chimici degli α -acidi del luppolo nella loro forma più solubile, gli iso- α -acidi, che forniscono l'amaro del luppolo alla birra e bilanciando la dolcezza nella birra derivata dal malto. Come descritto in precedenza, gli α -acidi, fanno parte di un gruppo più ampio di acidi amari nel luppolo e sono noti anche come umuloni e sono composti da umulone, co-umulone e ad-umulone. Gli umuloni possono anche ossidarsi a determinati livelli durante l'ebollizione del mosto per diventare umulinoni. I beta-acidi, o lupulone, sebbene non siano in grado di isomerizzare durante l'ebollizione del mosto, possono anche subire ossidazione e convertirsi in uluponi. È importante menzionare questi concetti e prodotti di reazione perché tutti questi vari composti influenzano la percezione dell'amaro nella birra in modo diverso, poiché hanno proprietà attive del sapore e soglie di percezione dell'amaro differenti. Ci sono una serie di fattori che influenzano la reazione e l'efficienza di isomerizzazione del luppolo:

- pH: l'efficienza di isomerizzazione del luppolo (% di utilizzo) aumenterà a un pH del mosto più alto, ma per una serie di ragioni, inclusa la qualità dell'amaro del luppolo nel gusto della birra; un buon pH a cui mirare durante la fase di bollitura, per massimizzare l'efficienza di isomerizzazione, è compreso tra 5,2 e 5,4.
- Tempo di ebollizione: all'aumentare della durata dell'ebollizione, più umulone può essere estratto dal luppolo o dai prodotti del luppolo e isomerizzato. Tuttavia, lo stress termico del processo di ebollizione può avere effetti negativi sulla qualità della birra, quindi non sono raccomandati tempi di ebollizione eccessivamente lunghi ai fini dell'isomerizzazione dell'acido del luppolo.
- Temperatura di ebollizione: gli umuloni si isomerizzano in modo più efficiente a temperature di ebollizione del mosto più elevate. I produttori di birra che operano a temperature più alte, avranno in genere un tasso di utilizzo del luppolo inferiore nel processo di ebollizione a causa della temperatura di ebollizione del mosto inferiore; al contrario, se è in uso un sistema di ebollizione pressurizzato che aiuta ad aumentare la temperatura di ebollizione del mosto, è possibile aumentare i tassi di utilizzo del luppolo.
- Concentrazione dell'umulone: i tassi di isomerizzazione più efficienti si verificheranno con il primo luppolo che verrà aggiunto all'ebollizione, di solito a inizio fase. Più luppolo viene aggiunto all'ebollizione, minori saranno i tassi di isomerizzazione successivi.
- Prodotto a base di luppolo: dal luppolo crudo, intero, agli estratti di luppolo appositamente prodotti, il tipo di prodotto di luppolo utilizzato per l'amaro può avere un impatto significativo sulla qualità dell'amaro e sul sapore della birra. Il luppolo grezzo avrà la più bassa efficienza di isomerizzazione (a volte indicata come utilizzo), poiché semplicemente impiega più tempo al mosto per estrarre le ghiandole luppoliniche all'interno del cono di luppolo. Per lo stesso motivo, i pellet di luppolo avranno una maggiore efficienza di utilizzo, con tipi di pellet prodotti appositamente come il Tipo 45, aventi un'efficienza maggiore del Tipo 90. La miglior efficienza di utilizzo appartiene, però, all'estratto di luppolo rispetto a prodotti di luppolo grezzi o pellettizzati, in quanto consente una solubilità rapida ed efficiente dei composti del luppolo nel mosto. Inoltre, pellet o estratti di luppolo appositamente prodotti possono essere combinati con il sale di magnesio nel processo di luppolatura per catalizzare la reazione di isomerizzazione. Questi tipi di prodotti derivati dal luppolo sono pellet o estratti "pre-isomerizzati" e offrono un tasso di utilizzo molto elevato durante l'ebollizione del mosto poiché gli iso-umuloni già convertiti vengono prontamente solubilizzati nel

mosto. Inutile dire che i luppoli più vecchi perderanno la loro concentrazione di acido α nel corso di un lungo periodo di conservazione e non forniranno lo stesso valore amaro di quando erano freschi.

- PROVOCARE REAZIONE DI MAILLARD

Quando il luppolo viene aggiunto al mosto bollente, gli α - acidi del luppolo vengono convertiti termicamente in iso - α - acidi dal sapore amaro tramite una reazione di isomerizzazione durante l'ebollizione del mosto; contemporaneamente gli amminoacidi reagiscono con gli zuccheri per formare melanoidine rosso-marroni dall'aroma intenso, sebbene la tostatura del malto sia la fase del processo in cui viene prodotta la maggior parte dei prodotti Maillard⁹⁵; tuttavia i prodotti derivanti dalla reazione di Maillard possono avere un impatto negativo sulla stabilità ossidativa della birra¹²⁶. La velocità di riscaldamento e il tempo di ebollizione influenzano la formazione di radicali nel mosto e quindi la stabilità del sapore della birra¹⁶⁹. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nella formazione di prodotti della reazione di Maillard proossidativi e nella decomposizione di polifenoli (fondamentali nell'eliminazione dei radicali liberi); oppure, un aumento del contenuto di radicali liberi può derivare dall'inattivazione al calore degli enzimi derivati dall'orzo catalasi e superossido dismutasi, che sono in grado di inibire la formazione di radicali^{49,63}. La formazione di aldeidi di Strecker (altro composto che si forma nella reazione di Maillard) aumenta con il tempo di ebollizione⁵⁰, tuttavia, è stato dimostrato che i componenti antiossidanti del luppolo sono in grado di ridurre significativamente la formazione di aldeidi di Strecker durante l'ebollizione del mosto. Altri componenti indesiderati derivanti dalla reazione di Maillard, come gli aldeidi volatili e il dimetil solfuro (DMS) evaporano durante l'ebollizione del mosto. Il DMS conferisce alla birra un dolce sapore di mais cremoso¹¹⁸, che è desiderato in alcuni prodotti e indesiderato in altri. Il DMS è formato da S - metilmetionina (SMM) o dimetilsolfossido (DMSO), entrambi presenti nel malto¹⁷². L'attività dell'enzima dell'orzo L -metionina-S-metiltransferasi (MMT) è risultata correlata con SMM e DMSO nel malto. Knudsen²² ha quindi sviluppato un orzo mutante che non è in grado di produrre MMT funzionalmente attivo, per consentire l'essiccazione e l'ebollizione del mosto per un tempo più breve o a una temperatura inferiore⁴².

- PRECIPITARE LE PROTEINE

Questo concetto definisce il destino delle proteine ad alto peso molecolare e dei complessi proteina-polifenolo durante l'ebollizione del mosto. Durante la bollitura del mosto, le proteine derivate dal malto avranno una grande tendenza a legarsi e formare complessi con i polifenoli derivati sia dal malto che dal luppolo. I composti formati non sono solubili nel mosto e precipitano in soluzione man mano che il peso molecolare combinato aumenta. Questi composti flocculeranno fuori dal mosto e potranno essere rimossi prima del raffreddamento e dell'inoculo del lievito. Ci sono alcuni fattori che influenzano la rottura delle proteine, tra cui:

- Tempo e temperatura di ebollizione: più lungo è il tempo di ebollizione del mosto, maggiore sarà la coagulazione delle proteine e la formazione di complessi proteina-polifenolo. Lo stesso vale per la temperatura di ebollizione. Una bollitura più lunga del mosto indica anche il tempo prolungato in cui il mosto subisce la naturale agitazione prodotta dall'azione dell'ebollizione, che porta anche all'aumentata aggregazione dei complessi proteici e polifenolic; tuttavia, tempi di ebollizione più lunghi del necessario possono avere altri impatti potenzialmente indesiderati sulla qualità del mosto e della birra.

- pH: un pH basso del mosto si traduce in una rottura più efficiente delle proteine. Un pH di 5,2-5,4 è generalmente accettato come intervallo ottimale per il maggior sviluppo di rotture proteiche. Il pH del mosto diminuisce naturalmente durante il processo di ebollizione e può essere ulteriormente influenzato mediante l'aggiunta al bollitore (a inizio ebollizione) di composti come acido lattico o mosto biologicamente acidificato. Inoltre, la presenza di calcio nel mosto influisce positivamente sulla rottura delle proteine^{94,42}.

- EVAPORAZIONE E VOLATILIZZAZIONE

Il dogma di vecchia data dell'ebollizione del mosto impone che l'ebollizione sia di lunga durata e il più vigorosa possibile. Ciò naturalmente si traduce in un elevato consumo di energia e acqua e uno stress termico potenzialmente inutile sul mosto. Negli ultimi 20 anni circa, il pensiero in questo settore è cambiato e i sistemi di ebollizione più moderni tendono a concentrarsi su un riscaldamento delicato, un uso efficiente dell'energia e tassi di evaporazione inferiori. Inoltre, alcuni composti aromatici indesiderati presenti nel mosto, come il DMS (già trattato precedentemente) vengono eliminati durante l'ebollizione.

LUPPOLAMENTO

L'aroma nella birra generato dall'aggiunta di luppolo in vari punti durante il processo di produzione può essere attribuito alla frazione di olio essenziale di qualsiasi varietà di luppolo, che si trova principalmente nelle ghiandole luppoliniche. Questi oli sono molto delicati e sensibili al processo, infatti vengono rimossi e volatilizzati per azione del calore intenso del mosto bollente. Tuttavia, è del tutto possibile mantenere l'aroma nella birra dall'aggiunta di luppolo attraverso un'attenta considerazione dei tempi di aggiunta e della varietà di luppolo selezionato. Entrambe queste considerazioni dipendono dagli obiettivi che ha in mente il mastro birraio e dal tipo o lo stile di birra che vuole produrre. Il luppolo aggiunto per conferire aromi specifici alla birra finita viene spesso aggiunto tardi nell'ebollizione per evitare che composti volatili desiderabili vengano rimossi. Composti come linalolo, geraniolo e citronellolo (alcoli terpenici) possono essere solubilizzati nel mosto caldo del luppolo e portati avanti in fermentazione dove, in presenza di lievito, possono subire biotrasformazione da un terpene all'altro o essere ridotti, come nel caso dell'aglicone (terpene aromatico) in cui un composto terpenico viene liberato nella sua forma aromatica da una molecola di glucosio⁷⁴. Alcune varietà di luppolo europee tradizionali, come Saaz, Hallertau Mittelfruh o Tettnang vengono definite con il termine "Noble". Queste varietà di luppolo possono essere ricche di oli noti come Sesquiterpeni, in particolare umulene, cariofillene e farnesene. Questa frazione di olio è spesso responsabile delle caratteristiche aromatiche legnose, erbacee e speziate a cui sono spesso associate le varietà di luppolo Noble o europee. Attraverso l'aggiunta di luppolo alla fine del processo di ebollizione, negli ultimi 5-20 minuti, a seconda della varietà, quantità, ecc., I composti sesquiterpenici possono essere convertiti nei loro derivati ossidati (ossido di cariofillene, epossidi di umulene), sopravvivendo alla fermentazione e rimanendo nel prodotto finito, conferendo caratteristiche di luppolo di tipo "nobile". Oltre a questo punto si sta realizzando un effetto simile con una classe di precursori aromatici a base di zolfo, noti come coniugati tiolici (cisteina, glutatione). Questi composti coniugati precursori possono essere solubilizzati nel mosto caldo da varietà di luppolo ricche di tiolo, con l'introduzione del mosto il più vicino possibile all'inizio della fermentazione che è più efficace. Il raffreddamento del mosto caldo dall'ebollizione fino a 80 ° C - 90 ° C consente la solubilizzazione dei composti aromatici e dei precursori, oltre che questa piccola

diminuzione della temperatura può migliorare notevolmente la sopravvivenza dei composti chiave nella fermentazione e nella birra (questa pratica può anche avere altri vantaggi come la riduzione del tasso di conversione da SMM a DMS). Questo li porterà alla fermentazione dove i coniugati tiolici possono essere ridotti a tioli liberi e ai loro derivati esterificati come 4-mercapto-4methylpentan-2-one (4MMP), 3-mercaptohexan-1-olo (3MH) e 3- acetato di mercaptoesile (3MHA). Si tratta di composti estremamente potenti in quanto possono avere valori di soglia aromatici dell'ordine di parti per trilione⁴⁴. Questi sono composti molto sensibili e volatili, quindi, è importante garantire che le migliori pratiche di processo a valle siano seguite, in particolare per quanto riguarda il mantenimento dell'ossigeno disciolto al minimo assoluto⁴².

4.5 Eliminazione del torbido

Durante il processo di ebollizione del mosto si forma un precipitato flocculante costituito principalmente da proteine coagulate, solidi di luppolo, composti amari, e in misura minore da lipidi e minerali; questa sorta di precipitato è noto anche come Trub. L'obiettivo della chiarificazione è quello di rimuovere il Trub dal prodotto prima che inizi la fermentazione. La chiarezza è uno dei parametri principali per comprendere il carico dei solidi e per la misura della qualità nel mosto. Questo può essere fatto raccogliendo un campione di mosto caldo a intervalli regolari durante il processo di eliminazione (trasferimento al raffreddamento e alla fermentazione del mosto) e utilizzando una serie di coni Imhoff (Il cono Imhoff è un contenitore graduato con pareti coniche trasparenti, con una capacità di 1 litro. Viene utilizzato nei test per valutare la qualità della birra), riempiendoli con mosto e valutando la quantità di solidi che si depositano nel cono. Per i birrifici con livelli più elevati di strumentazione, la chiarezza può essere monitorata con un sensore in linea, che consente di valutare la raccolta di dati da più lotti e di agire più prontamente sulle opportunità di miglioramento. Come accennato in precedenza, i requisiti di chiarezza del mosto possono essere diversi da birrificio a birrificio, o anche da ricetta a ricetta, oppure a seconda del ceppo di lievito e dei requisiti di qualità della birra. Ci sono opinioni molto contrastanti per quanto riguarda l'invio dell'intero carico di trub alla fermentazione con il mosto (se il refrigeratore del mosto è in grado di gestire il carico di solidi). Alcuni esperti birrai sostengono che il trub aiuterà le performance di fermentazione diventando una fonte di nutrimento per il lievito che utilizza lipidi, minerali e

amminoacidi; mentre il particolato può servire come siti di nucleazione per la rimozione più efficace dell'anidride carbonica generata durante la fermentazione. Al contrario, alcuni birrai ritengono che il mosto molto brillante sia il migliore per la fermentazione, in cui gli acidi amari non possono interferire con i requisiti di ioni inorganici intracellulari del lievito. Inoltre, lipidi sono ridotti, il che si ritiene migliori la stabilità del sapore ossidativo della birra finita.

4.6 Raffreddamento e ossigenazione

Ormai è assodato che il lievito non è in grado di sopravvivere all'ebollizione, o anche al mosto caldo. Infatti, la maggior parte dei lieviti di birra avrà grandi difficoltà a sopravvivere e ad effettuare la fermentazione in un mosto superiore a 37 ° C. Per questo motivo, il mosto deve essere raffreddato, solitamente tra 10 ° C e 20 ° C, a seconda del lievito e delle esigenze di fermentazione (es. *Lager* vs. *Ale*). Più precisamente, per un'alta fermentazione è consigliato il range di 12-24°C, mentre per la bassa fermentazione è preferibile una temperatura compresa tra i 6 e i 12°C.

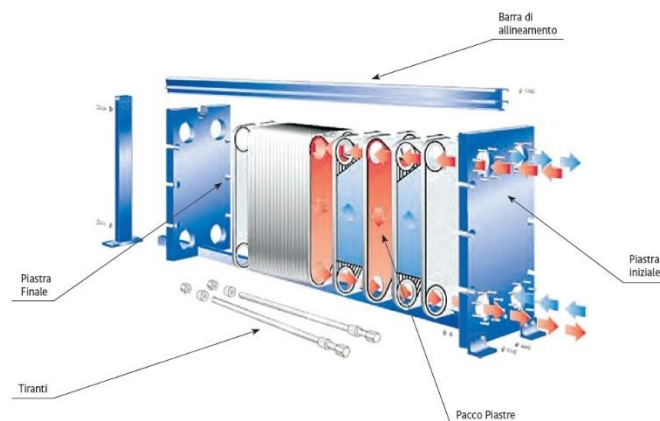


Figura 30 Struttura di un classico scambiatore di calore a piastre

Il metodo per raffreddare il mosto nella stragrande maggioranza dei birrifici, grandi e piccoli, in tutto il mondo è uno scambiatore di calore a piastre (Figura 30). Questi dispositivi di raffreddamento funzionano impilando insieme una serie di piastre in acciaio inossidabile, separate e sigillate da guarnizioni in gomma. Facendo scorrere il flusso di mosto caldo nello scambiatore di calore e fornendo un flusso controcorrente di acqua fredda o refrigerante (solitamente glicole

propilenico), l'energia termica del mosto viene trasferita attraverso le piastre di acciaio inossidabile e scambiata con la temperatura fredda del mezzo di raffreddamento. Al contrario, il mezzo di raffreddamento esce dal lato opposto dello scambiatore di calore notevolmente più caldo. Se il mezzo di raffreddamento impiegato è l'acqua, questa acqua riscaldata può essere raccolta nel recipiente di stoccaggio e riutilizzata per scopi di preparazione o pulizia. Se il mezzo di raffreddamento utilizzato è il glicole propilenico è necessario essere consapevoli dell'impatto che questo glicole, ora caldo, potrebbe avere sul sistema di refrigerazione e su altri dispositivi che si basano su questo sistema di refrigerazione per il controllo della temperatura (fermentazione e serbatoi di birra). Negli scambiatori di calore più grandi, può essere comune utilizzare sia l'acqua fredda che un refrigerante per il raffreddamento del mosto, dove l'acqua fredda raffredda il mosto fino al 90% della temperatura target e il glicole riduce la temperatura del mosto in modo più preciso e rapido fino alla temperatura prefissata. E', inoltre, possibile controllare la temperatura del mosto, variando la temperatura o la portata in ingresso del mezzo di raffreddamento. Ciò può essere ottenuto anche variando la portata del mosto fornito allo scambiatore di calore⁴²

OSSIGENAZIONE

La fase di ossigenazione è l'ultimo step prima di affrontare la fermentazione. In questo processo lo scopo principale è quello di raggiungere la concentrazione necessaria di ossigeno per avviare la fermentazione andando a disciogliere tra i 5mg e i 12mg di O₂. L'aria sterile o l'ossigeno sterile possono essere utilizzati per l'aerazione del mosto, ma poiché l'aria è composta solo da 20 -21% di ossigeno, l'ossigeno puro è più efficiente per aerare il mosto, in particolare per i mosti ad alta gravità dove la concentrazione di ossigeno richiesta è alta e la solubilità del gas è intrinsecamente inferiore (a causa dell'elevata densità). L'aria sterile o l'ossigeno sterile vengono spesso introdotti in linea dopo lo scambiatore di calore (mosto freddo), facendo gorgogliare direttamente nel flusso del mosto, o attraverso una "pietra" di acciaio inossidabile sinterizzato che riduce la dimensione delle bolle di gas, aumentando l'esposizione del gas al mosto e il potenziale di solubilità del gas. È inoltre necessario installare una valvola di prevenzione del riflusso tra il punto di iniezione e la linea di alimentazione del gas per impedire qualsiasi riflusso di mosto nella linea di alimentazione del gas, mantenendo la sterilità e riducendo il rischio di infezione microbica. A questo punto del processo si dovrebbe notare che con il mosto raffreddato e aerato, ora c'è un mezzo nutritivo liquido disponibile in grandi quantità, l'ambiente perfetto in cui il lievito può prosperare⁴².

4.7 Fermentazione

La produzione di birra è tipicamente un processo in cui, attraverso una serie di singole fasi, le materie prime vengono convertite in birra finita. Un risultato positivo dipende dal corretto svolgimento di tutte le singole fasi. La produzione di birra è fondamentalmente un processo divisibile in tre macro-fasi:

- 1) Nel birrifico avviene la produzione di un estratto liquido delle materie prime comunemente chiamato mosto, che consiste in un mezzo in grado di supportare la crescita del lievito di birra (e di qualsiasi altro microrganismo deliberatamente introdotto nel mosto).
- 2) Fermentazione, in cui a seguito della crescita di cellule di lievito e possibilmente di altri microrganismi, il mosto viene trasformato in “birra verde” (birra giovane).
- 3) Finitura, i vari passaggi necessari per trasformare la birra verde in una forma adatta al confezionamento e all'eventuale consumo.

Cosa sta realmente accadendo in ciascuna di queste fasi? Può sembrare strano ma è importante guardarlo dal punto di vista della cellula di lievito. Le cellule di lievito sono organismi viventi microscopici unicellulari e, come con qualsiasi altra forma di vita, tutto ciò che fanno è per i loro motivi del tutto egoistici. Ciò significa che crescono e si moltiplicano fin quando le condizioni lo consentono. Durante la fermentazione, si verifica un aumento da quattro a cinque volte del numero di cellule di lievito presenti. Poiché in natura ci sono molte altre specie microbiche in competizione per gli alimenti disponibili, è utile che il lievito sia in grado di consumare i nutrienti molto rapidamente. Inoltre, aiuta molto se, come risultato della crescita, il lievito può cambiare le condizioni esterne in modo che i potenziali concorrenti vengano uccisi o non siano in grado di crescere. Una volta che tutti i nutrienti sono stati esauriti, le cellule di lievito muoiono di fame e quindi devono adattarsi per sopravvivere fino a quando non saranno disponibili ulteriori nutrienti. La fermentazione può essere definita come la conversione controllata del mosto da parte del lievito in birra verde. Dal punto di vista del lievito, lo scopo del birrifico è quello di produrre un mezzo su cui il lievito possa crescere. Quando il lievito ha finito di crescere, ciò che resta è la birra verde. L'arte del birraio è quella di gestire l'attività del lievito in modo che il tempo impiegato per produrre birra verde e la sua composizione siano controllati e coerenti.

CHIMICA DELLA FERMENTAZIONE

Il mosto di birra è tipicamente prodotto con una serie di procedure che coinvolgono malto d'orzo (o altri cereali) che può anche essere integrato con zuccheri di vario tipo; e l'acqua, il liquore di fermentazione, che viene solitamente trattata per fornire un contenuto definito di vari sali in base allo stile di birra da produrre. Durante la fermentazione, gli zuccheri prodotti nella fase di ammostamento vengono consumati dal lievito e convertiti in alcool (più propriamente etanolo) e anidride carbonica. Gli zuccheri nel mosto derivano principalmente dalle riserve di amido dei chicchi di malto.

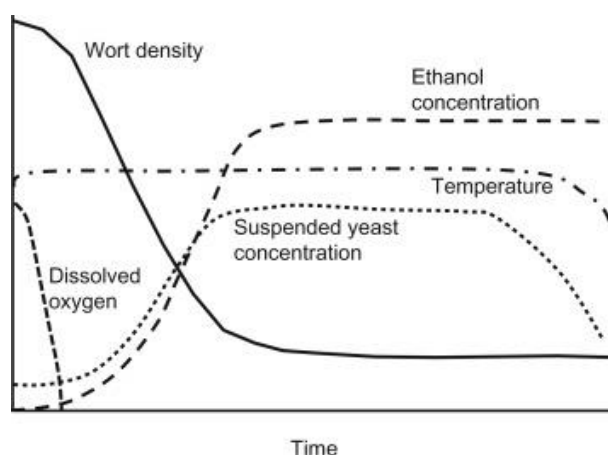


Figura 31 Profilo di una tipica fermentazione birraia

Durante l'ammostamento una parte degli amidi viene scomposta per formare zuccheri semplici, principalmente maltosio e una serie di altri tra carboidrati semplici, come glucosio, maltotriosio e maltotetrosio; ma anche componenti più complessi come le destrine. La miscela precisa è controllata dalle condizioni utilizzate nell'ammostamento. Oltre agli zuccheri, dalle materie prime vengono estratti una moltitudine di altri composti solubili e simili amidi eventualmente modificati nel processo. Questi includono fonti di azoto, fosforo, zolfo, vari metalli e fattori di crescita come le vitamine, elementi preziosi per la crescita del lievito. Il profilo di una fermentazione tipica è mostrato in Figura 30. La fermentazione inizia quando il lievito viene aggiunto al mosto.

Questa fase prende il nome di pitching e la quantità di lievito aggiunta viene definita "pitching rate". L'andamento della fermentazione viene monitorato rimuovendo periodicamente i campioni e determinando la densità del mosto. Man mano che il lievito cresce, consuma gli

zuccheri semplici e li converte in quantità più o meno uguali di etanolo e anidride carbonica. La relazione nella fermentazione alcolica tra consumo di zucchero e alcol e anidride carbonica è stata stabilita da uno scienziato francese del XVIII secolo di nome Gay-Lussac ed è mostrata nella seguente equazione:



Il maltosio è lo zucchero più abbondante nel mosto ed è composto da due molecole di glucosio unite insieme; quindi, quando ogni molecola di maltosio viene utilizzata dal lievito libera quattro molecole di etanolo e anidride carbonica. La concentrazione di etanolo aumenta con il procedere della fermentazione così come quella dell'anidride carbonica. Naturalmente, quest'ultimo è un gas e dopo che il liquido raggiunge il punto di saturazione, l'eccesso viene perso nell'atmosfera. Il gas disciolto rimane nella birra dove dà carbonatazione alla birra. La proporzione persa genera una schiuma che implica necessariamente l'ausilio di uno spazio di testa sufficiente all'interno dei fermentatori. Sebbene la maggior parte dei birrai artigianali non possa giustificare il costo, i birrai commerciali più grandi raccolgono l'anidride carbonica in eccesso e la usano per regolare i livelli di carbonatazione della birra finita. La scomparsa dello zucchero e la formazione di etanolo fa diminuire la densità. La quantità di etanolo che si forma è direttamente correlata alla concentrazione di zucchero fermentabile presente nel mosto e questa viene controllata nel birrifico. Dal punto di vista del lievito, il processo di lancio significa che le cellule sono improvvisamente esposte a un apporto di sostanze nutritive.

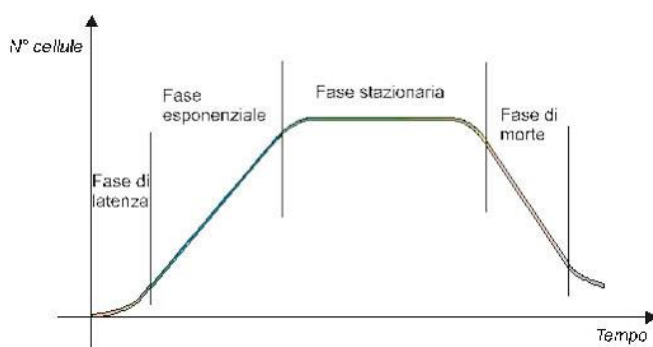


Figura 32 Curva di crescita del lievito

Per trarne vantaggio, devono sottoporsi a un breve periodo di riadattamento prima che possa iniziare la crescita. Questa è vista come una breve fase di latenza durante la quale le cellule iniziano lentamente a crescere e utilizzano i nutrienti del mosto. Dopo la fase di latenza la crescita accelera gradualmente fino a raggiungere una velocità massima. Questa è chiamata fase esponenziale o logaritmica durante la quale i tassi di diminuzione della densità del mosto, aumento della concentrazione cellulare e formazione di etanolo e anidride carbonica sono tutti al massimo. La formazione di anidride carbonica può essere molto vigorosa e questo aiuta a mantenere ben amalgamato il tino di fermentazione. Nei fermentatori aperti, l'uscita del gas tende a ridurre il rischio dell'invasione di potenziali organismi degradativi che possono entrare dall'atmosfera. Inoltre, poiché l'anidride carbonica è più densa dell'aria, tende a formare una coltre protettiva che si adagia sulla birra e impedisce l'ingresso di aria. La velocità di fermentazione è strettamente correlata alla temperatura; infatti, maggiore è la temperatura, più veloce è la fermentazione. In genere, questa sarà relativamente bassa per le birre *lager*, intorno agli 8-15 ° C, ma più alto per le birre *ale* 18-22 ° C. La temperatura di fermentazione ha un grande effetto sui composti aromatici della birra derivati dal lievito e questo spiega perché vengono scelti valori diversi per i singoli stili di birra. Il lievito genera molto calore a causa della sua crescita sul mosto e, a patto di iniziare alla temperatura corretta, è sufficiente applicare il raffreddamento per mantenere la temperatura desiderata. Ciò che segna la fine della fermentazione è l'esaurimento di un componente del mosto essenziale per la crescita del lievito; di conseguenza la sua moltiplicazione rallenta e infine si arresta. Questo processo può essere visto anche come una diminuzione del tasso densità del mosto fino a raggiungere un valore basso costante. Questo segna la fine della fermentazione. Per la maggior parte delle birre, la cessazione della crescita del lievito indica che tutto lo zucchero fermentabile è stato consumato. Nelle ultime fasi della fermentazione, le cellule di lievito si aggregano in un processo chiamato flocculazione. A seconda del tipo di lievito utilizzato, questi grumi saliranno sulla superficie del mosto in fermentazione o affonderanno sul fondo. Il risultato è che la concentrazione di cellule effettivamente sospese nella birra verde inizia a diminuire. Il processo di separazione è qualcosa che il birraio vuole che avvenga e può essere incoraggiato raffreddando il contenuto del fermentatore quando si ritiene che sia stato raggiunto il punto finale^{79,42,24}.

FERMENTAZIONE ALTA E BASSA

Ora, dopo aver definito con precisione le dinamiche biochimiche della fermentazione, è necessario introdurre la definizione di fermentazione alta e bassa che sta alla base della grande differenza tra birra *lager* e birra *ale*. Il concetto stesso di stile parte dal tipo di fermentazione adottata: una birra può essere *lager* o *ale* non esistono vie di mezzo. C'è una differenza sostanziale tra le due tipologie di processo come temperatura di fermentazione, lievito utilizzato, ma soprattutto c'è un'enorme differenza sul carattere del prodotto finito. Per le birre ad alta fermentazione note anche come *ale*, si utilizzano ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* che lavora in maniera ottimale tra 16-23°C; questo particolare ceppo ha un metabolismo molto rapido, infatti, esegue una fermentazione piuttosto veloce che può durare 3-4 giorni. La caratteristica principale di questo lievito è la sua enorme potenza nello sprigionare aromi molto intensi e caratteristici formando una schiuma molto compatta con particolare sapore fruttato. Il terzo-quarto giorno: i lieviti salgono in superficie e vengono raccolti per scrematura o suzione (Skimming system) o togliendo la birra da sotto e lasciando i lieviti direttamente nel tino (Dropping system). Il metodo ad alta fermentazione è tipico degli stili Ale, Bitter, Scotch Ale, Stout, India Pale Ale, Barley Wine, Alt, Kolsch, Weizen, Dubble e Triple. Per quanto riguarda il metodo a bassa fermentazione, viene utilizzato il ceppo di *Saccharomyces calrsbergensis* (o *pastorianus*) che al contrario di *saccharomyces cerevisiae*, opera a una temperatura molto più bassa (5-10°C) e ha un metabolismo molto più lento, infatti la sua fermentazione dura circa 7-10 giorni. Con questo tipo di birrificazione si producono la quasi totalità delle birre più consumate al mondo. Si tratta di una tecnologia di recente introduzione, diffusa a partire da inizio Ottocento, in quanto richiede il controllo della temperatura di fermentazione, mediante raffreddamento dei tank. Le birre prodotte in questo modo, dette *Lager*, hanno generalmente un gusto pulito e sono leggere e fragranti; tipiche degli stili Lager, Pilsner, Helles, Dortmunter, Bock, Monaco, Vienna, Marzen e Dunkel. Questo particolare ceppo di lievito ha la caratteristica di formare, a fine fermentazione, flocculi di grosse dimensioni, chiamati anche Krausen che si depositano sul fondo del tino. Infatti, verso il terzo giorno di fermentazione si ha la formazione di Krausen che successivamente collassa e viene rimosso per suzione o scrematura. Questo prodotto ricco in lieviti, zuccheri e sostanze azotate viene ri-aggiunto alla birra utilizzato come substrato della fermentazione secondaria¹⁰⁵.

4.8 Fermentazione secondaria o maturazione

Quando il 90 % del processo di fermentazione degli zuccheri è stato realizzato, ossia dopo 3/7 giorni (a seconda del ceppo di lievito e della temperatura di fermentazione) la birra giovane (birra verde) passa a serbatoi di maturazione (grossi tini in acciaio), questa fase è detta anche fermentazione secondaria. È svolta in genere dal medesimo lievito che ha attuato la precedente trasformazione ed è condotta a temperature comprese tra 0-2 °C (condizionamento in un serbatoio a tenuta ermetica determinando, in cui si determina la presa di spuma. Questa fermentazione ha durata variabile, compresa fra le quattro e le sei settimane e permette la “maturazione” della bevanda in modo ottimale. Anche in questo caso non bisogna commettere errori relative alle tempistiche di maturazione, in quanto, una maturazione troppo breve sviluppa una birra poco chiarificata e sgradevole, mentre una maturazione troppo lunga provoca una perdita di aromi e fragranza. Le *ale* non traggono giovamento da lunghe fasi di maturazione come le *lager*: con l’invecchiamento gli aromi desiderati si affievoliscono nelle *ale*, perciò è raccomandato il condizionamento più breve possibile prima del confezionamento. Durante la fermentazione secondaria avviene il riassorbimento e la riduzione del diacetile da parte dei lieviti. Il diacetile è un sottoprodotto della fermentazione alcolica dal caratteristico odore “burroso”, che in alcuni casi come le *Ale* e le *Stout* viene ricercato, sulle *Pilsner* è ammesso a bassi livelli, mentre sulle *Lager* è considerato un difetto. La cosiddetta “pausa diacetilica” consiste nel prolungare la fermentazione secondaria per 1-2 giorni a 22-23°C, per consentire la riduzione completa del composto. Se al termine della fermentazione secondaria la birra non è sufficientemente gasata, allora si ricorre alla saturazione artificiale a mezzo di saturatori appositi che possono essere posti prima della spillatrice o nel tank di deposito o nel tragitto compiuto dal prodotto nel corso del travaso. Questa fase avviene al raggiungimento della densità finale con il raffreddamento del serbatoio fino a 0 - 3°C (condizionamento). Durante questa fase il lievito continua a flocculare e depositarsi; anch’esso condiziona la birra riducendo vari composti aromatici indesiderati.

4.9 Confezionamento

Terminata la maturazione, la birra viene servita o confezionata (in fusto o bottiglia) per il consumo. Il processo di confezionamento espone la birra a una serie di nuove superfici con cui può entrare in contatto. Il potenziale di contaminazione è molto elevato, in questa fase che rappresenta uno dei punti più comuni per l'ingresso di microrganismi degradativi e alteranti, e come tale dovrebbe essere prestata la massima attenzione dal punto di vista igienico. Una serie di batteri e lieviti può essere presente nei biofilm delle superfici, come le specie *Pseudomonas*, *Enterobacteria*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e muffe, tra cui *Geotrichum* e *Aureobasidium*⁹. Tuttavia, gli organismi alteranti più significativi per i birrai sono *Pectinatus* e *Megasphaera*; i miglioramenti nel confezionamento per ridurre l'ossigeno nello spazio di testa delle birre in bottiglia hanno portato ad un aumento dell'incidenza dei batteri anaerobici che alterano la birra e che sono in grado di sopravvivere all'interno delle teste di riempimento e dei sistemi di recupero della CO₂.

Una strategia di confezionamento dedicata è essenziale per mantenere un sapore di birra stabile e di alta qualità¹³⁰. La birra è prevalentemente immagazzinata in calici, bottiglie di vetro, lattine di alluminio e bottiglie in PET. Poiché le aspettative e le preferenze dei consumatori differiscono, il tipo di imballaggio varia in modo significativo tra i paesi. I paesi europei, ad esempio, utilizzano principalmente bottiglie di vetro, mentre i consumatori negli Stati Uniti preferiscono l'uso di lattine di alluminio. La commerciabilità e l'attrattiva del prodotto sono fattori importanti nel determinare la strategia di confezionamento. Negli ultimi anni, gli sforzi dei paesi sono stati intensificati per ridurre l'impatto ambientale degli imballaggi ponendo tasse maggiori sugli imballaggi più dannosi. L'uso dei diversi contenitori di birra può anche essere segmentato in base alla distanza di trasporto. A causa della sua logistica di riciclaggio, i fusti non vengono trasportati in paesi stranieri con lunghe distanze di trasporto. Pertanto, la birra in fusti è utilizzata prevalentemente per il consumo domestico. Bottiglie e lattine di metallo, invece, vengono utilizzate sul mercato interno ed esportate anche all'estero. Le bottiglie di vetro "monouso" sono utilizzate principalmente per l'esportazione. Le bottiglie di vetro restituibili o riutilizzabili sono più pesanti per renderle più durevoli poiché ogni bottiglia può essere utilizzata più volte in un processo di riciclaggio. Un imballaggio secondario viene utilizzato per il trasporto di bottiglie e lattine di metallo. Le bottiglie di vetro utilizzate per il consumo domestico sono per lo più trasportate in casse di plastica dura, mentre durante l'esportazione in altri paesi, bottiglie e lattine vengono imballate utilizzando cartone (cassa o supporto di cartone) e pellicola di plastica⁵².

4.10 Composizione della birra fiita

Dal punto di vista dei macro-costituenti (acqua, alcol etilico, CO₂) tutte le birre sono molto simili dal punto di vista compositivo; La differenza è data dalle le sostanze presenti in bassissime concentrazioni che, infatti, determinano l'enorme varietà di stili che si conoscono, esercitando una notevole influenza sul gusto, aroma e colore. Gli unici composti, oltre all'acqua, presenti con concentrazioni superiori a 1 g/l sono alcuni carboidrati, sostanze azotate, anidride carbonica, alcol etilico e glicerolo. Vi sono poi tantissime altre sostanze (circa 1000) le cui concentrazioni possono variare da meno di un microgrammo ad alcune centinaia di milligrammi. Come detto in precedenza l'acqua l'ingrediente principale ed è compresa tra l'85% (birre ad alto contenuto alcolico) fino a oltre il 93% (birre analcoliche o a basso tenore alcolico). La concentrazione di alcol etilico è mediamente di 4- 6% vol. (40-60 ml pari a circa 30-50 g/l) sebbene alcune birre (es. barley wines, strong ales, ecc.) possano raggiungere anche i 12° e oltre. L'anidride carbonica di trova compresa tra 4-5 g/l (0,5%), mentre il glicerolo ha una concentrazione di 1.5-2 g/l. L'estratto reale (residuo della birra privata di acqua e alcol) è pari a circa il 4-5% ovvero 40-50 g/l composto principalmente da carboidrati come le destrine (circa 14-18 g/l) e zuccheri più semplici come glucosio, maltosio, maltotriosio, maltotetraoso, saccarosio, ecc. (10-14 g/l). Le sostanze azotate (proteine, peptidi, amminoacidi, acidi nucleici, ammidi, composti eterociclici) sono presenti con concentrazioni minori, di circa 3-5 g/l di cui la maggioranza sono proteine a basso peso molecolare (PM < 2600 dalton) L'estratto consiste, quindi, principalmente di carboidrati (75-80%), composti azotati, (5-10%), glicerolo (4-5%), più numerose altre sostanze. Dei numerosissimi altri composti vengono indicate le principali classi di appartenenza e le relative concentrazioni medie: alcoli superiori (es. n-propanolo, isobutanolo, 2-3-butandiololo, 3-metil-1-butanolo, ecc.): 100-300 mg/l; esteri (es. etilacetato): 20-50 mg/l; sostanze polifenoliche (es. catechine): 50-200 mg/l; acidi (grassi, idrossilici e fenolici): 100-500 mg/l; aldeidi (es. acetaldeide): 30-50 mg/l; chetoni (es. diacetile, idrossiacetone): 10-30 mg/l; composti derivati dal luppolo (es. iso- α -acidi): 20-60 mg/l; composti solforati (es. DMS, anidride solforosa): 1-20 mg/l; sali minerali (cloruri, calcio, magnesio, sodio, solfati, ecc.): 1200-1500 mg/l. La birra contiene anche molte vitamine, in particolare del gruppo B (acido nicotinico, piridossina, riboflavina, tiamina, ecc.)

5. CONCLUSIONI

La bevanda nota come birra è un prodotto estremamente straordinario sotto una moltitudine di aspetti ed è per questo motivo che ho deciso di analizzarla profondamente e sviluppare un elaborato prettamente bibliografico che potesse chiarire al meglio la complessità di questa bevanda, ponendo uno sguardo particolare sugli aspetti biochimici ed enzimatici. A livello storico, la birra è sempre stata presente nella società umana, tant'è che le sue radici risalgono a circa 6000 anni fa. Questa particolare bevanda ha segnato ogni epoca storica fin da quando fu "scoperto" l'alcool 250'000 anni fa dai primi ominidi, che si accorsero delle proprietà benefiche della frutta fermentata. È proprio in questo momento che iniziò un rapido sviluppo fino ad arrivare alla creazione di bevande che ricordano la moderna birra, da parte di popolazioni relative alla mezzaluna fertile. Sin da subito questa bevanda ebbe un forte impatto sociale tant'è che la popolazione egizia, già 4000 anni fa, produceva birra a livello industriale per venderla alle popolazioni limitrofe e generare un tornaconto economico. La vera svolta a livello storico, che permise il "boom" di sviluppo della birra, avvenne quando cadde l'Impero Romano nel V secolo, in seguito agli attacchi dei barbari. I romani, Infatti, erano l'unico popolo europeo che disdegnava profondamente questa bevanda, più volte definita come un'imitazione del vino riuscita male e rappresentavano, quindi, un ostacolo allo sviluppo di tale bevanda. È proprio in concomitanza della caduta dell'impero, che la tradizione celtica e barbara si diffuse ed espanse in Europa, facendo conoscere a tutti i segreti della birra. Un'altra fase storica che, senza dubbio, ha cambiato il destino e lo sviluppo della birra è l'epoca della rivoluzione industriale; caratterizzata da una fiorente economia che ha permesso importanti scoperte, soprattutto in ambito microbiologico, e che ha incrementato lo sviluppo di strumenti di misura e controllo. Tali strumenti hanno creato le basi di un impennante aumento di efficienza ed automazione fino al punto in cui si è avuta la conversione della produzione birraia in una vera e propria attività industriale. Nella prima sezione, di introduzione storica, ho voluto, quindi, esaminare e valutare meglio il percorso evolutivistico di questa bevanda, una delle più importanti e conosciute dei giorni nostri e in seguito ai dati riportati, posso affermare che, non solo il progresso della birra non si è fermato, ma stiamo attraversando un momento in cui lo sviluppo aumenta esponenzialmente di anno in anno e la birra entra sempre più a far parte della nostra quotidianità e nella cultura mondiale. Nel capitolo successivo ho eseguito un'analisi relativa alle classiche materie prime di produzione cercando di estrapolare il contributo che ogni ingrediente fornisce al prodotto finito. In questa sezione si comincia a capire la reale complessità della birra dato che ogni minimo cambiamento negli ingredienti produce poi un enorme effetto nel prodotto finale; infatti, è proprio qui che entrano in

gioco le capacità del mastro birraio nello scegliere i corretti ingredienti e lavorarli indirizzandoli verso lo stile e l'aroma voluto. Successivamente, ho dedicato un capitolo relativo agli enzimi; nonostante l'argomento sia estremamente vasto ho cercato di evidenziare il concetto di attività enzimatica e di capire come realmente il ruolo di queste particolari proteine potesse influire sulla velocità di reazione. L'importanza di questi peptidi è incredibile, infatti, senza di essi, molti processi di digestione e scomposizione durerebbero anni al posto di poche ore. Anche da questo punto di vista posso affermare che l'evoluzione della produzione birraia non fa altro che crescere; grazie all'ingegneria genetica, le industrie e le grandi aziende sono arrivate al punto di poter modificare anche il pool enzimatico presente all'interno dell'orzo che andrà a costituire il malto e che influirà sul prodotto finale. Infine, l'ultimo capitolo è stato dedicato interamente al processo di birrificazione. Processo lungo, complesso e ricco di fasi da rispettare in cui non sono contemplati errori o imprecisioni. Dal mio punto di vista il processo può essere suddiviso in due macrofasi; la prima fase può essere considerata una sorta di preparazione del substrato che poi sarà attaccato dal lievito, comprende le operazioni che vanno dalla maltazione fino al raffreddamento e ossigenazione. La seconda fase, secondo me, va considerata come la vera e propria birrificazione condotta e "capitanata" dal lievito. Come abbiamo visto, è proprio in questa fase che i microrganismi noti come *Saccharomyces cereviae* e *Saccharomyces carlsbergensis* esprimono la loro massima attività fornendo sapori e aromi che contraddistinguono i due principali stili di birra (*ale* e *lager*).

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Adams, M. R., & Moss, M. O. 2008, Food microbiology 3rd ed., Cambridge, GBR: The Royal Society of Chemistry
- 2) Akazawa T, Miyata S. Biosynthesis and secretion of alpha-amylase and other hydrolases in germinating cereal seeds. *Essays Biochem* 1982;18:40.
- 3) Alan Fersht, Enzyme structure and mechanism (second edition), zanichelli, 1990
- 4) Åman, P., Hesselman, K., and Tillya, A.- C. 1985. The variation in chemical composition of Swedish barleys. *J. Cereal Sci.* 3:71- 77., Savin, R., and Nicolas, M. E. 1996. Effects of short periods of drought and high temperature on grain growth and starch accumulation of two malting barley cultivars. *Aust. J. Plant Physiol.* 23:201- 210
- 5) Arsenale Editore, Renzo Zanoni, Fare la birra, Arsenale Editore, 2010
- 6) Arts, M. J. T. J., Grun, C., De Jong, R. L., Voss, H.-P., Bast, A., Mueller, M. J., and Haenen, G. R. M. M. 2007. Oxidative degradation of lipids during malting. *J. Agric. Food Chem.* 55:7010- 7014
- 7) Atwell, W. A., Hood, L. F., and Lineback, D. R. 1988. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Foods World* 33:306- 311
- 8) Back, W. (ed.) (2005a). *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie* . Fachverlag Hans Carl, Nürnberg
- 9) Back, W., 2003. Biofilme in der Brauerei und getrankeindustrie. *Brauwelt* 24/25, 766 e 777
- 10) Bai, Y., Wang, J., Zhang, Z., Shi, P., Luo, H., Huang, H., Luo, C., and Yao, B. 2010. A novel family 9 beta- 1,3(4)- glucanase from thermoacidophilic Alicyclobacillus sp. A4 with potential applications in the brewing industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:251- 259
- 11) Bamforth, Charles W.. *Food, Fermentation and Micro-Organisms*, John Wiley & Sons, Incorporated, 2005
- 12) Bamforth, C. W. 2003. Barley and malt starch in brewing: A general review. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 40:89- 97

- 13) Barber, M. G., Jackson, E. A., and Smith, D. B. 1994. Total and individual barley (1-3), (1-4)- β -D-glucanase activities in some green and kilned malts. *J. Inst. Brew.* 100:91-97
- 14) Barth, Roger. *The Chemistry of Beer : The Science in the Suds*, John Wiley & Sons, Incorporated, 2013. *ProQuest Ebook Central*
- 15) Bathgate, G. N., and Palmer, G. H. 1973. The in vivo and in vitro degradation of barley and malt starch granules. *J. Inst. Brew.* 79:402-406
- 16) *Beer in Health and Disease Prevention*, edited by Victor R. Preedy, Elsevier Science & Technology, 2008
- 17) Behre KE, 1999, The history of beer additives in Europe a review, *Veget Hist Archaeobot* 8:35–48
- 18) Bisswanger, Hans. *Enzyme Kinetics : Principles and Methods*, John Wiley & Sons, Incorporated, 2017
- 19) Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J.L. *et al. Humulus lupulus L.*, a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochem Rev* 17, 1047–1090 2018
- 20) Borém, A., Mather, D. E., Rasmusson, D. C., Fulcher, R. G., and Hayes, P. M. 1999. Mapping quantitative trait loci for starch granule traits in barley. *J Cereal Sci.* 29:153-160
- 21) Boulton, C., & Quain, D. 2001. *Brewing yeast & fermentation*. Oxford, GBR: Blackwell Science Ltd.
- 22) Breed. 118:453-455. Knudsen, S., Hambraeus, G., Bech, L. M., Sorensen, S. B., Skadhauge, B., Breddam, K., and Olsen, O. 2010. Barley and malt-derived beverages with low DMS level. *Int. patent coop. treaty appl. WO 2010063288 A2*
- 23) Brennan, C. S., and Clearly, L. J. 2005. The potential use of cereal (1-3,1-4)- β -D-glucans as functional food ingredients. *J. Cereal Sci.* 42:1-13
- 24) *Brewing Materials and Processes : A Practical Approach to Beer Excellence*, edited by Julie Kellersohn, Elsevier Science & Technology, 2016

- 25) *Brewing Microbiology : Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*, edited by Annie Hill, Elsevier Science & Technology, 2015
- 26) Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brooks, P. A., & Stevens, R. (2004)
- 27) Briggs, D.E. 1998. *Malts and Maltings* . Blackie, London
- 28) Buisson G, Duee E, Haser R, Payan F. Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J* 1987;6(13):3909
- 29) Butterworth PJ, Warren FJ, Grassby T, Patel H, Ellis PR. Analysis of starch amylolysis using plots for first-order kinetics, *Carbohydr Polym* 2012;87(3):218997
- 30) Cammerer, B., Jalyschko, W. and Kroh, L.W., Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50(7): 2083-7
- 31) Carpenter D, Dhar S, Mitchell LM, Fu B, Tyson J, Shwan NA, et al. Obesity, starch digestion and amylase: association between copy number variants at human salivary (AMY1) and pancreatic (AMY2) amylase genes. *Hum Mol Genet* 2015;24(12): 3472 À 80.
- 32) Carvalho, Daniel Oliveira, *Beneficial effects of xanthohumol in beer: Industrial and biochemical studies*, 2016, Ann Arbor, Universidade do Porto
- 33) Carvalho, D.O., Correia, E., Lopes, L. and Guido, L.F., Further insights into the role of melanoidins on the antioxidant potential of barley malt. *Food Chemistry* (2014) 160: 127-133
- 34) Ceccatti, John Simmons, *Science in the brewery: Pure yeast culture and the transformation of brewing practices in Germany at the end of the 19th century*, The University of Chicago, 2001, pp 13-16
- 35) Čechovská, L., Konečný, M., Velišek, J. and Cejpek, K., Effect of maillard reaction on reducing power of malts and beers. *Czech Journal of Food Sciences* (2012) 30(6): 548-556.

- 36) Celestino, K. R., Cunha, R. B., and Felix, C. R. 2006. Characterization of a beta- glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *micro sporus* , and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochem.* 7:23
- 37) Cheong CG, Eom SH, Chang C, Shin DH, Song HK, Min K, et al. Crystallization, molecular replacement solution, and refinement of tetrameric β -amylase from sweet potato. *Proteins* 1995;21(2):105 À 17
- 38) Chiara Callegari, *La storia della birra:dalle origini ai giorni nostri*, Università Ca Foscari,2011
- 39) Coghe, S., Adriaenssens, B., Leonard, S. and Delvaux, F.R., Fractionation of colored Maillard reaction products from dark specialty malts. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* (2004) 62(2): 79-86
- 40) Coghe, S., Gheeraert, B., Michiels, A. and Delvaux, F.R., Development of Maillard Reaction Related Characteristics During Malt Roasting. *Journal of the Institute of Brewing* (2006) 112(2): 148-156
- 41) Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA. Origins and evolution of the western diet: health implications for the 21st century. *American J Clin Nutr* 2005;81(2):341 À 54
- 42) Chris Smart ,*The Craft Brewing Handbook : A Practical Guide to Running a Successful Craft Brewery*, Elsevier Science & Technology, 2019
- 43) Cudney R, McPherson A. Preliminary crystallographic analysis of sweet potato beta amylase. *J Molec Biol* 1993;229(1):253 À 4
- 44) Dagan, L., Roland, A., Viel, C., Reillon, F., Delpech, S., Schneider, R., 2016. Hops provide important sources of thiol precursors, a key ingredient to obtain fruity beers. In: *Proceedings of the 2016 World Brewing Congress.* 13 À 17 August 2016, Denver, CO
- 45) De Keukeleire, D., *Fundamentals of beer and hop chemistry.* *Química Nova* (2000) 23: 108-112
- 46) De Keukeleire J, Janssens I, Heyerick A et al (2007) Relevance of organic farming and effect of climatological conditions on the formation of a-acids, b-acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol in hop (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* 55(1):61–66

- 47) Dekker RFH. Enzymes in food and beverage processing 1. Food Australia 1994;46 (3):136-149
- 48) Deng, Y., Lim, J., Nguyen, T., Mok, I. K., Piao, M., & Kim, D. (2019). Composition and biochemical properties of ale beer enriched with lignans from *Schisandra chinensis* Baillon (omija) fruits. *Food science and biotechnology*, 29(5), 609–617
- 49) Derdelinckx, G. 2008. Polyphenols in wort and beer: State of 2008: Where and why? *Cerevisiae* 4:174- 187
- 50) De Schutter, D. P., Saison, D., Delvaux, F., Derderlinckxs, G., and Delvaux, F. R. 2008. The chemistry of beer aging. Pages 357- 381 in: *Beer in Health and Disease Prevention*. V. Preedy, Ed. Elsevier, London
- 51) Doderer, A., Kokkelink, I., Van de Veen, S., Valk, B., Schram, A., and Douma, A. 1992. Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley. *Biochim. Biophys. Acta* 1120:97-104
- 52) Donoghue, C., Jackson, G., Koop, J. H., & Heuven, A. J. M. (2012). The environmental performance of the European Brewing Sector
- 53) Dvořáková, M., Douanier, M., Jurková, M., Kellner, V. and Dostálek, P., Comparison of antioxidant activity of barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt extracts with the content of free phenolic compounds measured by high performance liquid chromatography coupled with CoulArray detector. *Journal of the Institute of Brewing* (2008) 114(2): 150-159
- 54) Dvořáková, M., Guido, L.F., Dostálek, P., Skulilová, Z., Moreira, M.M. and Barros, A.A., Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *Journal of the Institute of Brewing* (2008) 114(1): 27-33
- 55) Echavarría, A.P., Pagán, J. and Ibarz, A., Melanoidins Formed by Maillard Reaction in Food and Their Biological Activity. *Food Engineering Reviews* (2012) 4(4): 203-223
- 56) Eline Poelmans and Johan F.M. Swinnen, From Monasteries to Multinationals (and Back): A Historical Review of the Beer Economy, Katholieke Universiteit Leuven, 2011, pp 1-4

- 57) *Enzymes in Food Biotechnology : Production, Applications, and Future Prospects*, edited by Mohammed Kuddus, Elsevier Science & Technology, 2018
- 58) Evans, D. E., Collins, H., Eglinton, J., and Wilhelmson, A. 2005. Assessing the impact of the level of diastatic power enzymes and their thermostability on the hydrolysis of starch during wort production to predict wort fermentability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 63:185-198
- 59) Faist, V., Lindenmeier, M., Geisler, C., Erbersdobler, H.F. and Hofmann, T., Influence of molecular weight fractions isolated from roasted malt on the enzyme activities of NADPH-cytochrome c-reductase and glutathione-S-transferase in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50(3): 602-6.
- 60) Faivre C, Ghedira K, Goetz P , 2007, *Humulus lupulus L. Phytothérapie* 5(2):86–89
- 61) Fontanini, D., and Jones, B. L. 2001. Study of metallopeptidase isozyme from malted barley (*Hordeum vulgare* cv. Morex). *J. Agric. Food Chem.* 49:4903- 4911
- 62) Franz G. Meussdoerffer, *A Comprehensive History of Beer Brewing*, 2009, pp 8-11
- 63) Frederiksen, A. M., Festersen, R. M., and Andersen, M. L. 2008. Oxidative reactions during early stages of beer brewing studied by electron spin resonance and spin trapping. *J. Agric Food Chem.* 56:8514-8520
- 64) French D. Amylases: enzymatic mechanisms. *Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals*. New York, NY: Springer; 1981. p. 15182
- 65) Friedberg F. The remarkable amylases. *Biochemistry* 1985;13:105
- 66) General Interest Periodicals-United States, *The Thermometer's Invention*, Los Angeles Times Communications LLC, 1902
- 67) Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, Segerman B, Nishikubo N, Takahashi J, et al. Poplar carbohydrate-active enzymes: gene identification and expression analyses. *Plant Physiol* 2006;140(3):946–62
- 68) Georg-Kraemer, J. E., Caierão, E., Minella, E., Barbosa-Neto, J. F., and Cavalli, S. S. 2004. The (1-3,1-4)- β -glucanases in malting barley: Enzyme survival and genetic and environmental effects. *J. Inst. Brew.* 110:303- 308

- 69) Giuseppe Vaccarini, *Il Manuale della birra*, Hoepli Milano, 2015 pp 15-16
- 70) Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 2003;38(11):1599-616,
- 71) Hazel, J. R., & Williams, E. E. 1990, The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research*, 29, 167-227
- 72) Henry, R. J. 1990. Quantitative analysis of barley (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -glucanase isoenzymes by high-performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.* 12:187-192.)
- 73) Heyse, K.-U. (ed.) (2000) *Praxishandbuch der Brauerei*, Behr's Verlag, Hamburg
- 74) Hieronymus, S., 2012. Chapter 1, The hop & its aroma. *For the Love of Hops*. p. 26
- 75) Hirota, N., Kuroda, H., Takoi, K., Kaneko, T., Kaneda, H., Yoshida, I., Takashio, M., Ito, K., and Takeda, K. 2006a. Brewing performance of malted lipoxygenase-1 null barley and effect on the flavor stability of beer. *Cereal Chem.* 83:250-254. Hirota, N., Kuroda, H., Takoi, K., Kaneko, T., Kaneda, H., Yoshida, I., Takashio, M., Ito, K., and Takeda, K. 2006b. Development of novel barley with improved beer foam and flavour stability—The impact of lipoxygenase-1-less barley in the brewing industry. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 43:131-135.
- 76) Hiteshi K, Gupta R. Thermal adaptation of α -amylases: a review. *Extremophiles* 2014;18(6):937-44.
- 77) Holtman, W. L., Vredenburg-Heistek, J. C., Schmitt, N. F., and Feussner, I. 1997. Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley. *Eur. J. Biochem.* 248:452-458
- 78) Hornsey IS, 2003, *A history of beer and brewing*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- 79) Hutkins, Robert W.. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, John Wiley & Sons, Incorporated, 2006. *ProQuest Ebook Central*
- 80) Illanes, A., 1999. Stability of biocatalysts. *Electron. J. Biotechnol.* 2 (1), 7-15

- 81) Inns, E.L., Buggey, L.A., Booer, C., Nursten, H.E. and Ames, J.M., Effect of modification of the kilning regimen on levels of free ferulic acid and antioxidant activity in malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2011) 59(17): 9335- 9343.
- 82) Inns, E.L., Buggey, L.A., Booer, C., Nursten, H.E. and Ames, J.M., Effect of heat treatment on the antioxidant activity, color, and free phenolic acid profile of malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2007) 55(16): 6539-6546
- 83) Izydorczyk, M. S., and Dexter, J. E. 2008. Barley β - glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products— A review. *Food Res. Int.* 41:850- 868., Panfili, G., Fratianni, A., Di Criscio, T., and Marconi, E. 2008. Tocol and beta- glucan levels in barley varieties and in pearling by- products. *Food Chem.* 107:84- 91
- 84) Jensen, L. G., Olsen, O., Kopst, O., Wolft, N., Thomsen, K. K., and von Wettstein, D. 1996. Transgenic barley expressing a protein- engineered, thermostable (1,3- 1,4)- β - glucanase during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:3487- 3491
- 85) Jin, Y.- L ., Speers, A., Paulson, A. T., and Stewart, R. J. 2004. Effects of β -glucans and environmental factors on the viscosities of wort and beer. *J. Inst. Brew.* 110:104- 116
- 86) Jones, B. L., and Budde, A. D. 2003. Effect of reducing and oxidizing agents and pH on malt endoproteolytic activities and brewing mashes. *J. Agric. Food Chem.* 51:7504- 7512
- 87) Jones, B. L., and Budde, A. D. 2005. How various malt endoproteinase classes affect wort soluble protein levels. *J. Cereal Sci.* 41:95- 106
- 88) Jones, B. L., and Marinac, L. 2002. The effect of mashing on malt endoproteolytic activities. *J. Agric. Food Chem.* 50:858- 864
- 89) Jones, M., and Pierce, J. 1964. Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* 70:307- 315
- 90) Kattein, U., and Herrmann, M. 2008. Comparison of different wort- boiling systems and the quality of their worts and resulting beers. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* <http://dx.doi.org/10.1094/ TQ-46-4-1012-01>
- 91) Khan AR, James MN. Molecular mechanism for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* 1998;7:815 À 36

- 92) Koehler, S., and Ho, T.- H. D. 1988. Purification and characterization of gibberellic acid-induced cysteine endoproteinases in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 87:93- 103
- 93) Kühbeck, F., Dickel, T., Krottenthaler, M., Back, W., Mitzscherling, M., Delgado, A., and Becker, T. 2005. Effects of mashing parameters on mash β - glucan, FAN and soluble extract levels. *J. Inst. Brew.* 111:316-327
- 94) Kunze, W. (2004). Chapter 3, Wort production, Section 3.4.1.2. *Technology Brewing & Malting, 3rd International Edition.* p. 283.
- 95) Kunze, W. 2010. *Technology Brewing and Malting.* 4th updated ed. VLB, Berlin
- 96) Kuroda, H., Furusho, S., Maeba, H., and Takashio, M. 2003. Characterization of factors involved in the production of 2(E)- nonenal during mashing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:691- 697
- 97) Lalor E, Gode D. *Brewing with enzymes.* In: Whitehorst, Ort, editors. *Enzymes in food technology.* secnd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010. p. 163 À 93
- 98) Lauro, M., Suortti, T., Autio, K., Linko, P., and Poutanen, K. 1993. of barley starch granules to α - a mylase during differAccessibility ent phases of gelatinization. *J. Cereal Sci.* 17:125-136
- 99) Lazaridou, A., and Biliaderis, C. G. 2007 Molecular aspects of cereal β - glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *J. Cereal Sci.* 46:101- 118
- 100) Leitao, C., Marchioni, E., Bergaentzlé, M., Zhao, M., Didierjean, L., Miesch, L., Holder, E., Miesch, M. and Ennahar, S., Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *Journal of Cereal Science* (2012) 55(3): 318-322
- 101) Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., and Penttilä, M. 1998. Recent advances in themalting and brewing industry. *J. Biotechnol.* 65:85-98
- 102) Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL. Commercial proteases: present and future. *FEBS Lett* 2013;587:1155 À 63

- 103) Loi, L., Barton, P. A., and Fincher, G. B. 1987. Survival of barley (1-3,1-4)- β -glucanase isoenzymes during kilning and mashing. *J. Cereal Sci.* 5:45-50
- 104) Luca Giaccone, Eugenio Signoroni, *Il piacere della birra, viaggio nel mondo della bevanda più antica*, Slow food editore, 2017, pp 12-14
- 105) Luca Giaccone, Eugenio Signoroni, *Il Piacere della birra, viaggio nel mondo della bevanda più antica*, Slow Food Editore, 2017 pp 64-67
- 106) Luca Zanini, *La Birra Di Nerone E Il Gusto Dei Romani Per Le Bionde Artigianali*, corriere della sera, 2013
- 107) Lundgard, R., and Svensson, B. 1987. The four major forms of barley α -amylase. Purification, characterization and structural relationship. *Carlsberg Res. Commun.* 52:313-326.
- 108) Mabberley 2008; *The Plant List* 2013
- 109) MacGregor, A. W., Bazin, S. L., Macri, L. J., and Babb, J. C. 1999. Modelling the contribution of α -amylase, β -amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing. *J. Cereal Sci.* 29:161-169
- 110) MacGregor, A. W., Macri, L. J., Schroeder, S. W., and Bazin, S. L. 1994b. Limit dextrinase from malted barley: Extraction, purification and characterization. *Cereal Chem.* 71:610-617
- 111) Magalhães, P.J., Almeida, S.M., Carvalho, A.M., Gonçalves, L.M., Pacheco, J.G., Cruz, J.M., Guido, L.F. and Barros, A.A., Influence of malt on the xanthohumol and isoxanthohumol behavior in pale and dark beers: A microscale approach. *Food Research International* (2011) 44(1): 351-359
- 112) Maillard, M.-N. and Berset, C., Evolution of Antioxidant Activity during Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1995) 43(7): 1789-1793
- 113) Malfliet, S., De Buck, A., van Waesberghe, J., and Aerts, G. 2009. Critical factors at mashing-in influencing lipid oxidation. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 32nd.
- 114) Matsuura Y, Kusunoki M, Harada W, Kakudo M. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem* 1984;95(3):697-702.

- 115) Max Nelson, *The Barbarian's Beverage, a history of beer in ancient Europe*, Routledge, Oxon 2005, pp. 9-11
- 116) McCarter JD, Withers GS. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* 1994;4(6):885-92
- 117) McCarthy, T. C., Lalor, E., Hanniffy, O., Savage, A. V., and Tuohy, M. G. 2005. Comparison of wild-type and UV-mutant beta-glucanase-producing strains of *Talaromyces emersonii* with potential in brewing applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*
- 118) Meilgaard, M. C. 1975. Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 12:151-158
- 119) Mikola, L., and Kolehmainen, L. 1972. Localization and activity of various peptidases in germinating barley. *Planta* 104:167- 177
- 120) Moll, M., Flayeux, R., Lipus, G., and Marc, A. 1981. Biochemistry of mashing. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 18:166- 173
- 121) Morales, F.J., Fernández-Fraguas, C. and Jiménez-Pérez, S., Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chemistry* (2005) 90(4): 821-827
- 122) Morimoto, K., and Kataoka, J. 1988. Fundamental studies on wort preparation (mashing) technology. Part 1. Mashing conditions and behaviour of nitrogen components in malt and wort. *Monatsschr. Brauwiss.* 41:472-478.
- 123) Murakami A, Darby P, Javornik B, 2006 Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus*. *Heredity* 97:66–74)
- 124) Myllärinen, P., Schulman, A. H., Salovaara, H., and Poutanen, K. 1998. The effect of growth temperature on gelatinization properties of barley starch. *Acta. Agric. Scand.* 48:85- 90.
- 125) Narziss, L. ,1999, *Die Bierbrauerei, Band I: Die Technologie der Malzbereitung* , 7th edn. Enke Verlag, Stuttgart
- 126) Nøddekær, T. V., and Andersen, M. L. 2007. Effects of Maillard and caramelization products on oxidative reactions in lager beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 65:15- 20

- 127) Nuutila, A. M., Ritala, A., Skadsen, R., Mannonen, L., and Kauppinen, V. 1999. Expression of thermotolerant endo- (1,4)- beta- glucanase in transgenic barley seeds during germination *Plant Mol. Biol.* 41:777- 783
- 128) Palmer, G. H. 1989. Cereals in malting and brewing. Pages 61- 242 in: *Cereal Science and Technology*. G. H. Palmer, Ed. The University Press, Aberdeen, U.K.
- 129) Paolo Del Vecchio, *Storia della birra: dai sumeri ai giorni nostri*, Il Fiorino, 2014, pp23-27
- 130) Paradh, A.D., Mitchell, W.J., Hill, A.E., 2011. Occurrence of *Pectinatus* and *Megasphaera* in the major UK breweries. *Journal of the Institute of Brewing* 117 (4), 498 e 506
- 131) Pasteur M., *On fermentation*, *American Periodicals Series II*, 1858
- 132) Perry GH, Tchinda J, McGrath SD, Zhang JJ, Picker SR, Caceres AM, et al. Hotspots for copy number variation in chimpanzees and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:8006 À 11
- 133) Petersen W, Short CA. On the relation of the serum ereptase (peptidase) titer to the clinical course in pneumonia. *J Infect Dis* 1918;191:147 À 53
- 134) Phillips, H. A., and Wallace, W. 1989. A cysteine endopeptidase from barley malt which degrades hordein. *Phytochemistry* 28:3285-3290.
- 135) Poulle, M., and Jones, B. L. 1988. A proteinase from germinating barley. *Plant Physiol.* 88:1454- 1460
- 136) Pöyri, S., Mikola, M., Sontag- Strohm, T., Kaukovirta- Norja, A., and Home, S. 2002. The formation and hydrolysis of barley malt gel- protein under different mashing conditions. *J. Inst. Brew.* 108:261-267
- 137) Rawlings ND. Protease families, evolution and mechanism of action. In: Brix K, Stoecker W, editors. *Proteases: structure and function*. Vienna: Springer Verlag; 2013. p. 1 À 36
- 138) R.H. Garret, C.M. Grisham, *Biochemistry V Editions*, Brooks/Cole a cengage learning company, 2013
- 139) Richard W. Unger, *Beer in the middle age and renaissance*, University Pennsylvania press, 2007, pp 53-55

- 140) Richard W. Unger, Beer in the middle age and renaissance, University Pennsylvania press, 2007, pp 109-110
- 141) Riis, P. 2003. Proteolytic activity during mashing. Pages 867- 876 in: Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 29th)
- 142) Roel Mulder, Further notes on the essence of gruit: an alternative view, Brewery History, 2017
- 143) Samaras, T.S., Camburn, P.A., Chandra, S.X., Gordon, M.H. and Ames, J.M., Antioxidant properties of kilned and roasted malts. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2005) 53(20): 8068-74. 23
- 144) Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Sohngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M., Schomburg, D., 2013. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. Nucleic Acids Res. 41 (Database issue), D764– 72
- 145) Schwarz, P., Stabley, P., and Solberg, S. 2002. Activity of lipase during mashing. J. Am. Soc. Brew. Chem. 60:107- 109
- 146) Seetharaman K, Bertoft E. Perspectives on the history of research on starch Part II: on the discovery of the constitution of diastase. Starke 2012;64:765 À 9
- 147) Shewry, Peter R., and Steven E. Ullrich. *Barley : Chemistry and Technology, Second Edition*, Elsevier Science & Technology, 2014
- 148) Simpson WJ, Smith AR, 1992, Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. J Appl Bacteriol 72(4):327–334
- 149) Skadhauge, B., Lok, F., Breddam, K., Olsen, O., Bech, L. M., and Knudsen, S. 2010. Int. patent coop. treaty appl. WO 2010075860 A2
- 150) Steinberg W, DeVries JH, Wadden TA, Jensen CB, Svendsen CB, Rosenstock J. Tu1502 longitudinal monitoring of lipase and amylase in adults with type 2 diabetes and obesity: evidence from two phase 3 randomized clinical trials with the oncedaily GLP-1 analog Liraglutide. Gastroenterology 2012;142:S850 À 1

- 151) Stenholm, K., and Home, S. 1999. A new approach to limit dextrinase and its role in mashing. *J. Inst. Brew.* 105:205- 210
- 152) Stenholm, K. 1997. Malt limit dextrinase and its importance in brewing. Doctoral thesis, Helsinki University of Technology; VTT Publications 323. VTT, Espoo, Finland
- 153) Stewart, G. G., & Russell, I. (1998). An introduction to brewing science & technology series III. *Journal of the Institute of Brewing* ,1– 6
- 154) Sumantha A, Larroche C, Ashok P. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *J Chem Technol Biotechnol* 2006;44(2):211 À 20
- 155) Sumner, J.B., 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. *J. Biol. Chem.* 69, 435– 441
- 156) Tester, R. F., South, J. B., Morrison, W. R., and Ellis, R. P. 1991. The effects of ambient temperature during grain- filling period on the composition and properties of starch from four barley genotypes. *J. Cereal Sci.* 13:113- 127
- 157) Van Aarle, P. G. M., de Barse, M. M. J., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. G. 1991. Purification of a lipoxygenase from ungerminated barley. Characterization and product formation. *FEBS Lett.* 280:159-162
- 158) Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H. and Derdelinckx, G., The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry* (2006) 95(3): 357- 381
- 159) Victor R. Preedy , *Beer in Health and Disease Prevention*, Elsevier Science & Technology, 2008
- 160) Vines SH. Proteolytic enzymes in plants. *Ann Bot* 1903;17(1):237 À 64.
- 161) von Bingen H , 2005, Heilkraft der Natur “Physica”. Das Buch von dem inneren Wesen der verschiedenen Naturen der Gescho“pfe. Stein am Rhein: Basler Hildegard-Gesellschaft
- 162) Walker, G. J., and Hope, P. M. 1963. The action of some α -amylases on starch granules. *Biochem. J.* 86:452- 462.

- 163) Walker, G. M. 1998, *Yeast: physiology and biotechnology*, West Sussex, GBR: John Wiley & Sons, Ltd
- 164) Walker, M. D., Hughes, P. S., and Simpson, W. J. 1996. Use of chemiluminescence HPLC for measurement of positional isomers of hydroperoxy fatty acids in malting and the protein rest stage in mashing. *J. Sci. Food Agric.* 70:341- 346
- 165) Wang, J., Zhang, G., Chen, J., and Wu, F. 2004. The changes of β -glucan content and β -glucanase activity in barley before and after malting and their relationships to malt qualities. *Food Chem.* 86:223-228
- 166) Wang, H.-Y., Qian, H. and Yao, W.-R., Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry* (2011) 128(3): 573- 584
- 167) Wang, S. S., and Brandriss, M. C. 1987. Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae* : Analysis of the cloned PUT1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 6:2638-2645
- 168) White, C., & Zainasheff, J. (2010). *Yeast: the practical guide to beer fermentation* . Boulder, CO: Brewers Publication.
- 169) Wietstock, P., Kunz, T., Shellhammer, T., Schön, T., and Methner, F.- J. 2010. Behaviour of antioxidants derived from hops during wort boiling. *J. Inst. Brew.* 116:157- 166
- 170) Wrobel, R., and Jones, B. L. 1993. Identification and partial characterization of high Mr neutral proteinases from 4- day germinated barley seed. *J. Cereal. Sci.* 18:225- 237
- 171) Yahya, H., Linforth, R.S.T. and Cook, D.J., Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study. *Food Chemistry* (2014) 145: 378-387
- 172) Yang, B., Schwartz, P., and Horsley, R. 1998. Factors involved in the formation of two precursors of dimethylsulfide during malting. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56:85- 92
- 173) Zhang, G., Wang, J., and Chen, J. 2002. Analysis of beta- glucan content in barley cultivars from different locations of China. *Food Chem.* 79:251-254., Izydorczyk, M. S., and Dexter, J. E. 2008. Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products— A review. *Food Res. Int.* 41:850- 868
- 174) Zhang, N., and Jones, B. L. 1995. Characterization of germinated barley endoproteolytic enzymes by two- dimensional gel electrophoresis. *J. Cereal Sci.* 21:145- 153.

175) Zhang, N., and Jones, B. L. 1999. Polymorphism of aspartic proteinases in resting and germinating barley seeds. *Cereal Chem.* 76:134-138.).

7. RINGRAZIAMENTI

Dedico questo lavoro, soprattutto, ai miei genitori che devo ringraziare per il loro amore incommensurato e per tutto il sostegno che mi hanno dato nel portare a termine questo percorso. Ringrazio anche tutti gli amici, fonte di ispirazione e forza, che durante lo studio mi hanno alleggerito la fatica facendomi divertire e svagare. Infine, un pensiero speciale va a Salga che non può essere qui insieme a me a festeggiare, ma che porterò sempre nei miei pensieri e nel mio cuore.