

# INGREDIENTI ALIMENTARI

AROMI - ADDITIVI - SEMILAVORATI

Maggio/Giugno 2004

anno 3 - numero 14

ISSN 1594 - 0543

MasterStudio

## Cesarin®

dal 1920

### Grandi novità su tutta la linea.

**PastaFrutta**  
L'alternativa naturale  
agli aromi in pasta



**CremaFrutta**  
Addio creme alcolate: finalmente  
una farcitura di sola frutta



**FarciForno**

Una tenuta al forno che la confettura  
non è in grado di garantire



37030 Montecchia di Crosara (Verona) v. Moschina, 2 - Tel. +39 045 7460000 - [www.cesarin.it](http://www.cesarin.it) - [info@cesarin.it](mailto:info@cesarin.it)

CHIRIOTTI



EDITORI

10064 PINEROLO - Tel. 0121 393127 - Fax 0121 794480 - E-mail: [info@chiriottieditori.it](mailto:info@chiriottieditori.it)

## SUMMARY

Hop is one of the basic raw materials used in brewing. To standardize the production process and to improve its storage, nowadays, hop is essentially produced in form of pellet by extraction with ethanol or application of CO<sub>2</sub> supercritical fluid. In this paper, the hop extracts obtained with several extraction processes – CO<sub>2</sub> supercritical and solid-liquid extractor named Extractor Naviglio – are compared by capillary electrophoresis analysis.

The results achieved during the present research, according to the experimental conditions adopted, showed the best extraction capacity of Extractor Naviglio compared to CO<sub>2</sub> techniques concerning  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids content.

## SOMMARIO

Il luppolo rappresenta un ingrediente fondamentale nel processo di produzione della birra.

Per standardizzare il processo produttivo e per migliorare la sua conservazione, oggi, tale prodotto è sottoposto a processi di pelettizzazione o di estrazione con solventi quali la CO<sub>2</sub> supercritica ed etanolo.

In questo lavoro sono stati messi a confronto, mediante elettroforesi capillare, gli estratti di luppolo ottenuti con diverse tecniche di estrazione: mediante l'impiego della CO<sub>2</sub> supercritica, CO<sub>2</sub> supercritica e coeluente ed infine con un procedimento estrattivo solido-liquido denominato Naviglio Estrattore.

I risultati ottenuti nel corso della presente ricerca, hanno evidenziato, che nelle condizioni sperimentali adottate, il Naviglio Estrattore ha una capacità estrattiva maggiore soprattutto in termini di  $\alpha$ -acidi e di  $\beta$ -acidi.

**D. NAVIGLIO - A. SOMMA - A. TERRA - C. RAIA  
M. RUSSO - I. GARELLA**

Dipartimento di Scienza degli Alimenti - Università degli Studi di Napoli "Federico II" - Via Università 100 - 80055 Portici - Na - Italia

# Sistema estrattore solido-liquido innovativo per il luppolo

## *Hop extraction by an innovative solid-liquid extractor*

Parole chiave: birra, luppolo, estrazione,  $\alpha$ - e  $\beta$ -acidi

Key words: beer, hop, extraction,  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids

## INTRODUZIONE

Da secoli il luppolo (*Humulus lupulus* L.), ed in particolare la sua infiorescenza femminile, viene impiegato in campo alimentare nel processo di birrificazione. Infatti, oltre ad essere il principale responsabile del caratteristico gusto amaro della birra, il luppolo, grazie all'attività antibatterica svolta da alcuni dei suoi principi attivi (iso- $\alpha$ -acidi), contribuisce alla sterilizzazione del mosto e al miglioramento della stabilità della schiuma. Altri composti invece, concorrono alla costituzione del suo profilo aromatico e favoriscono la precipitazione di composti insolubili.

Le infiorescenze del luppolo, a causa della loro scarsa conservabilità dovuta alle ossidazioni a carico degli  $\alpha$  e  $\beta$  acidi, vengono sottoposte a diversi processi chimici e/o fisici, al fine di ottenere un prodotto più omogeneo e che mantenga inalterato nel tempo le proprie caratteristiche sensoriali [1].

Per tale ragione, sul mercato, il luppolo viene venduto principalmente in forma

di pellets o di estratti. I primi sono ottenuti principalmente da trattamenti fisici ed in alcuni casi da trattamenti chimici (iso-pellets). I secondi, invece, sono ottenuti per estrazione dei principi attivi mediante CO<sub>2</sub> o etanolo. Gli estratti ottenuti con le due tecniche danno prodotti con un contenuto in resine molto simile tra loro [2]. Tuttavia, la CO<sub>2</sub>, nello stato supercritico, è un solvente non polare e selettivo [3], particolarmente adatto ad estrarre le "soft resin" e gli aromi del luppolo, escludendo quasi totalmente i componenti polari. Viceversa l'etanolo, a causa delle sue caratteristiche polari, risulta meno selettivo producendo un estratto più eterogeneo e ricco in polifenoli.

Tali estratti si possono trovare anche in forma già isomerizzata, che non richiede pertanto la bollitura, oppure, se trattati con agenti riducenti, in forma di rho-idroso- $\alpha$ -acidi, tetra-idroso  $\alpha$ -acidi ed esa-idroso- $\alpha$ -acidi, che, oltre a non richiedere la cottura, sono resistenti ai processi di ossidazione post-fermentazione [4].

## Impieghi del luppolo

Oltre che per la produzione di birra dove rappresenta un ingrediente fondamentale per le note proprietà amaricanti e per la costituzione dell'inconfondibile aroma, il luppolo è utilizzato anche in altri settori e con diverse modalità. Nel settore erboristico, grazie ai numerosi principi attivi contenuti, il luppolo presenta interessanti proprietà al punto da essere impiegato come pianta medicinale sotto forma di pomata, infuso, tintura madre, tisana, ecc. Innanzitutto, al luppolo vengono attribuite proprietà blandamente sedative sul sistema nervoso centrale, risultando quindi utile nel trattamento degli stati di ansia, insonnia, aggressività e disturbi gastroenterici di origine nervosa (diarrea nervosa). Grazie alle note proprietà amare ( $\alpha$ -acidi) e aromatiche ( $\beta$ -acidi) viene utilizzato come stomachico, per stimolare l'appetito e nella dispepsia di origine nervosa. La presenza di principi antibiotico-simili conferisce al luppolo un'azione battericida (contro Gram+ e Gram-) e antinfiammatoria a livello delle vie urinarie. Altre proprietà attribuite al luppolo sono essenzialmente lassative, vermifughe, antipruriginose e blandamente anestetiche. Inoltre, la presenza di sostanze estrogeno-simili ne permette l'utilizzo nei disturbi di ipereccitabilità e ipersessualità maschile. Applicazioni esterne di infiorescenze calmano i dolori nevralgici, reumatici e artritici. Nella medicina cinese, viene impiegato come rimedio digestivo e per il trattamento della lebbra, tubercolosi, dissenteria e affezioni intestinali. In cosmetica il luppolo viene utilizzato per rivitalizzare e ridare turgore e luminosità alle pelli senescenti, rugose e rilassate. Gli estratti di luppolo sono impiegati nei cosmetici ad azione rassodante (latti, tonici, maschere) e nelle lozioni e shampoo per stimolare le funzioni del cuoio capelluto e favorire la crescita dei capelli.

In campo alimentare, grazie al caratteristico odore forte, aromatico e sapore amaro, le infiorescenze femminili entra-

no nella preparazione di liquori casalinghi (digestivi) e grappe amaro-toniche. In alcune regioni i germogli o i tralci maschili si prestano per la preparazione di varie pietanze (minestre, zuppe, risotti e frittate).

## Caratteristiche chimiche

I componenti principali del luppolo sono le resine e, in particolare, le "soft resin" (frazione solubile in esano) che con la frazione degli  $\alpha$ -acidi (o umoloni) rappresentano i maggiori responsabili delle note proprietà amaricanti del luppolo. In realtà, nella forma nativa gli  $\alpha$ -acidi (humulone, cohumulone e l'adhumulone) non presentano alcun gusto amaro, è solo durante la fase di cottura del mosto, per effetto del calore, tali composti sono isomerizzati nei rispettivi iso- $\alpha$ -acidi, nelle due forme *cis* e *trans*, molto più solubili e dal sapore decisamente amaro (soglia di percezione 6 mg/L). Gli iso- $\alpha$ -acidi, inoltre, mostrano una interessante proprietà antisettica, in particolare contro i batteri Gram-positivi e concorrono alla stabilizzazione della schiuma. La frazione dei  $\beta$ -acidi (o lupoloni), invece, oltre a contribuire alla costituzione dell'aroma, se sottoposti a fenomeni ossidativi, sono in grado di produrre sostanze indesiderate [4].

In aggiunta ai componenti principali sopracitati, il luppolo contiene anche componenti secondarie come gli oli essenziali e i polifenoli. I primi rappresentano una piccola frazione estremamente volatile del luppolo (circa 300 composti) ed in particolare ricordiamo il myrcene (monoterpene),  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humulene e  $\beta$ -farnesene (sesquiterpeni). Altrettanto importanti sono i terpeni ossigenati quali il linalolo ed il geraniolo per le loro note floreali e molti esteri tra cui il 2-metilpropil isobutirrato ed il 2-metilbutil isobutirrato, responsabili delle note fruttate del luppolo.

I polifenoli, se di taglia molecolare bassa, sono antiossidanti naturali che contri-

buiscono alla determinazione del potere riducente del mosto e a migliorare la stabilità aromatica della birra, se di taglia molecolare alta, tendono a precipitare insieme alla frazione proteica durante la fase di ammostatura [5].

## SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del lavoro è quello di mettere a confronto, mediante l'uso della cromatografia elettrocinetica capillare (MECK), gli estratti di luppolo ottenuti con diverse tecniche estrattive al fine di valutare il potere estrattivo della CO<sub>2</sub> supercritica, della CO<sub>2</sub> con cosolvente è un innovativo metodo di estrazione solido-liquido, il Naviglio Estrattore [6-9].

## MATERIALI E METODI

### Campioni

Le estrazioni sono state realizzate su fiori di luppolo (cones) Hallertau (Idaho, USA).

L'estratto isomerizzato usato come standard è stato acquistato dalla Brouwland (Beverlo, Belgio).

Strumentazione:

- Analisi MECK

Le analisi elettroforetiche sono state realizzate utilizzando il sistema BioFocus 3000 (Biorad, USA) seguendo il protocollo di Royle *et al.* [10].

La separazione è stata ottenuta con un capillare non-coated (60 cm inlet to outlet, a 56 cm al detector, 50  $\mu$ m i.d.) utilizzando un tampone di corsa costituito da: 50 mM acido borico in SDS 40 mM, portato a pH 9,3 mediante NaOH. La separazione elettroforetica è stata ottenuta applicando un differenziale di 25Kv, con la rilevazione a 200 nm.

Il capillare alla fine di ogni corsa è stato lavato per 200 sec con metanolo.

I campioni filtrati con i Millex-GS (MCE,

MF 22  $\mu\text{m}$ ) sono stati iniettati ad una pressione di 350 mbar per 0,2 sec.

## PROCEDURE DI ESTRAZIONE

L'estrazione con la  $\text{CO}_2$  in fase supercritica è stata effettuata tramite estrattore supercritico Spe-ed SFE model 7010 della Applied Separation (USA). Le condizioni operative impiegate per l'estrazione con  $\text{CO}_2$  senza cosolvente sono di seguito riportate:

- Peso campione: 7 g;
- $T_{\text{vessel}} = 35^\circ\text{C}$ ;
- $T_{\text{valv}} = 50^\circ\text{C}$ ;
- $P = 350$  bar;
- Durata fase stazionaria: 120 min;
- Durata fase dinamica: 120 min;
- Raccolta campione in 21 mL.

Per l'estrazione con  $\text{CO}_2$  in presenza di etanolo (cosolvente) sono state impiegate le seguenti condizioni operative:

- Peso campione: 7 g;
- $T_{\text{vessel}} = 35^\circ\text{C}$ ;
- $T_{\text{valv}} = 50^\circ\text{C}$ ;
- $P = 218$  bar;
- Durata fase stazionaria: 120 min;
- Durata fase dinamica: 120 min;
- Raccolta campione in 21 mL.

L'estrazione solido-liquido con il "Naviglio Estrattore" (mod. 500 mL, distribuito da Nuova Estrazione S.a.s., Napoli) è stata condotta con le seguenti modalità:

- Peso campione: 21 g;
- Durata fase di statica: 2 min;
- Durata fase di dinamica: 5 cicli con 12 sec di fermo pistone;
- Cicli totali: 360 (24 ore);
- Solvente: alcool etilico;
- Raccolta campione in 500 mL.

Al fine di ottenere lo stesso rapporto soluto/solvente (1:3) adottato per le estrazioni in  $\text{CO}_2$  supercritica, l'estratto etanolico (500 mL) è stato concentrato mediante evaporatore rotante fino a 42 mL. Quest'ultimo è stato diluito 1:2 prima dell'analisi MECK.

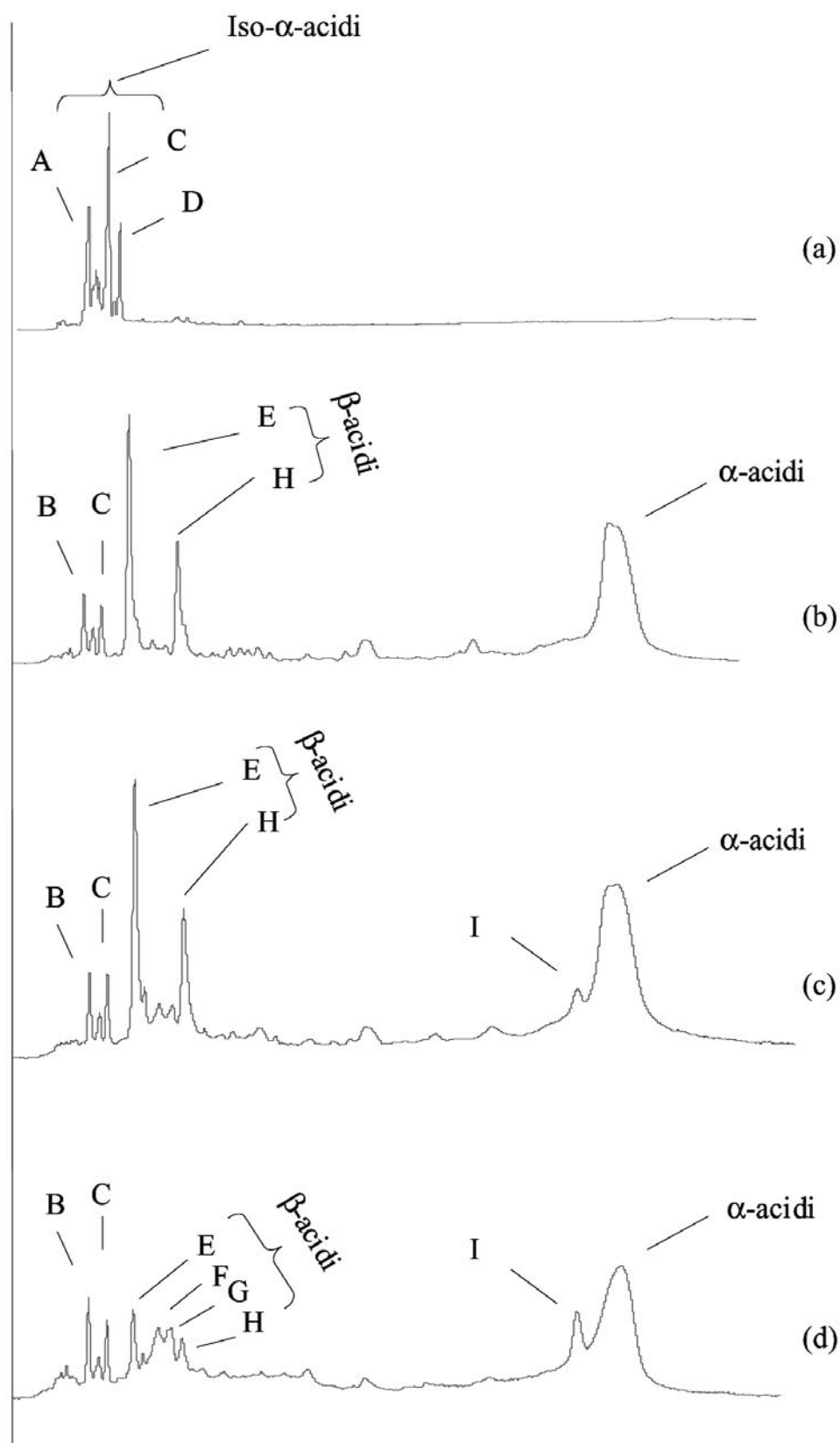


Fig. 1 - Elettroferogrammi MECK di estratti di luppolo: del commercio (a), ottenuti mediante  $\text{CO}_2$  supercritica (b),  $\text{CO}_2$  supercritica con coeluyente (c) ed estrattore solido-liquido (Naviglio) (d).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella **fig. 1** sono riportati gli elettroferogrammi MECK ottenuti dall'analisi di un estratto isomerizzato del commercio (**fig. 1a**) e degli estratti ottenuti con le tre tecniche (**fig. 1b, 1c, 1d**). La caratterizzazione dei profili è stata realizzata secondo quanto riportato da Royle *et al.* [10].

I primi composti ad eluire sono gli iso- $\alpha$ -acidi, immediatamente dopo seguono i  $\beta$ -acidi ed infine eluiscono gli  $\alpha$ -acidi, questi ultimi non mostrano una buona interazione con la colonna.

Dal confronto qualitativo dei profili risulta che gli estratti ottenuti con il Naviglio Estrattore e con la CO<sub>2</sub> supercritica con cosolvente sono più ricchi in componenti sia di  $\alpha$  che di  $\beta$ -acidi con la presenza dei picchi F, G ed I in più. Tale risultato conferma che le tecniche estrattive che prevedono l'impiego dell'etanolo sono meno selettive rispetto a quelle che usano la sola CO<sub>2</sub> supercritica.

Integrando le aree dei picchi è stato possibile eseguire un primo confronto di tipo quantitativo. I risultati ottenuti, riportati in **tab. 1**, evidenziano che l'estratto ottenuto con il Naviglio Estrattore rispetto a quello ottenuto con la CO<sub>2</sub> supercritica contiene quasi il doppio in termini di  $\alpha$ -acidi e circa il 58% in più di  $\beta$ -acidi. La tecnica di estrazione con CO<sub>2</sub> e cosolvente, invece, ha prodotto valori intermedi.

Questo risultato è in contrasto con quanto descritto in letteratura dove non sono riportate grosse differenze in termini di resa tra i due tipi di solventi [2]. Indubbiamente l'utilizzo della pressione nell'estrattore solido-liquido, Naviglio, aumenta la capacità estrattiva dell'etanolo rispetto alla classica tecnica per macerazione (11).

Da un'attenta analisi dei profili relativi ai  $\beta$ -acidi, limitando il confronto quantitativo ai picchi E e H (comuni a tutti gli estratti), si evidenzia che la CO<sub>2</sub> su-

**Tabella 1 - Distribuzione delle soft resin degli estratti di luppolo ottenuti con le tre tecniche impiegate.**

Tecniche Estrattive		$\alpha$ -acidi	$\beta$ -acidi	Iso- $\alpha$ -acidi	Totale soft resin
CO <sub>2</sub> supercritica	area assoluta	8.472	2.997	700	12.169
	% sul totale	69,6	24,6	5,8	100
CO <sub>2</sub> coeluyente	area assoluta	11.178	4.293	801	16.272
	% sul totale	68,7	26,4	4,9	100
Etanolo con Estrattore Solido-Liquido (Naviglio)	area assoluta*	16.615	5.154	2.229	23.998
	% sul totale	69,2	21,5	9,3	100

\* Valore ottenuto dall'area calcolata sperimentalmente e moltiplicata per due, per tenere conto della diluizione.

**Tabella 2 - Distribuzione dei  $\beta$ -acidi degli estratti di luppolo ottenuti con le tre tecniche impiegate.**

Tecniche Estrattive		$\beta$ -acidi picco E	$\beta$ -acidi picco H	Totale $\beta$ -acidi
CO <sub>2</sub> supercritica	area assoluta	1.874	1.463	2.997
	% sul totale	62,5	37,5	
CO <sub>2</sub> coeluyente	area assoluta	1.804	765	4.703
	% sul totale	38,3	16,3	
Etanolo con Estrattore Solido-Liquido (Naviglio)	area assoluta*	594	260	5.154
	% sul totale	11,5	5,1	

\* Valore ottenuto dall'area calcolata sperimentalmente e moltiplicata per due, per tenere conto della diluizione.

percritica è il solvente più indicato per estrarre tali componenti. Infatti in queste condizioni essi sono presenti in quantità nettamente superiori rispetto al Naviglio Estrattore (**tab. 2**).

In **fig. 2** sono riportati i profili dell'estratto isomerizzato del commercio (a), dell'estratto con CO<sub>2</sub> supercritica (b) e della loro miscela al 50% (c), limitatamente ai primi 10 min di analisi per facilitare l'identificazione dei picchi corrispondenti agli iso- $\alpha$ -acidi secondo la stessa tecnica di Royle *et al.* [10].

Dal loro confronto risultata evidente l'esistenza di differenze di tipo quali-quantitativo; in particolare i componenti A e D, probabilmente per differenze legate alla cultivar di partenza, sono assenti in tutti gli estratti realizzati in laboratorio (b). L'estratto di iso- $\alpha$ -acidi del commercio

presenta una distribuzione più completa di isomeri degli  $\alpha$ -acidi che comunque sono presenti in tutti gli estratti ottenuti (**fig. 2**).

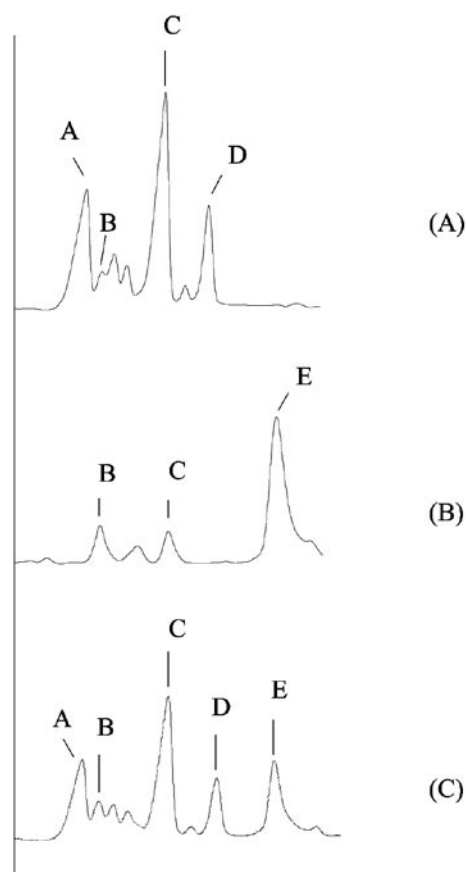
Dall'integrazione di questi picchi (**tab. 1**) risulta che l'estrattore solido-liquido (Naviglio Estrattore), impiegando etanolo come solvente porta all'estrazione di una maggiore quantità di iso- $\alpha$ -acidi. Questi risultati preliminari indicano che la composizione dell'estratto alcolico ottenuto con l'estrattore presenta una distribuzione delle varie componenti di  $\alpha$ -acidi e di  $\beta$ -acidi più bilanciata rispetto agli estratti ottenuti con la CO<sub>2</sub> supercritica. Per tali motivi sarebbe interessante valutare il contributo sensoriale che tale estratto apporterebbe alla birra in riferimento agli altri ottenuti mediante CO<sub>2</sub> supercritica e quelli del commercio.

## CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stata valutata la capacità estrattiva dell'estrattore solido-liquido (Naviglio) che associa all'estrazione chimica con etanolo, un'azione fisica mediante un sistema che impiega la pressione per facilitare l'estrazione dei componenti presenti nella matrice.

Con l'elettroforesi capillare è stato, successivamente, confrontato l'estratto ottenuto con questo sistema innovativo con altri due estratti ottenuti rispettivamente mediante estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica e con CO<sub>2</sub> e coeluyente. Nelle condizioni sperimentali adottate, il Naviglio Estrattore ha mostrato una capacità estrattiva in termini di  $\alpha$ -acidi totali e di  $\beta$ -acidi totali superiore rispetto alle altre metodiche in esame. Le maggiori differenze si hanno rispetto alla CO<sub>2</sub> supercritica dove il contenuto in  $\alpha$ -acidi e  $\beta$ -acidi sono rispettivamente circa il 50 e il 40% in meno rispetto all'estratto alcolico ottenuto con l'estrattore solido-liquido. L'etanolo, come riportato in letteratura, produce un estratto più eterogeneo a causa della sua caratteristica polare. Tuttavia se il confronto viene limitato solo ad alcuni componenti dei  $\beta$ -acidi la tecnica per CO<sub>2</sub> supercritica si è dimostrata la più efficace.

In accordo con l'attuale tendenza, riguardo la scelta del tipo di luppolo da impiegare, orientata prevalentemente



**Fig. 2 - Elettroferogrammi MECK di estratti di luppolo: del commercio (a) ottenuti mediante CO<sub>2</sub> supercritica (b), miscela al 50% di (a) e (b) relativamente ai primi 10' di analisi (c).**

verso luppoli ad alto potenziale amaro (elevati livelli di  $\alpha$ -acidi); la tecnica innovativa, oggetto del presente lavoro, potrebbe essere vantaggiosamente impiegata per produrre estratti di luppolo ad altissima resa.

## BIBLIOGRAFIA

1. Canabas A., Erten H., Ozsahin F., 2001 – The effect of storage temperature on the chemical composition of hop pellets, *Process Biochemistry*, 36, 1053-1058.
2. Forster A., Schmidt R. – About the evaluation of hops and extracts. Technical Publications. John Barth & Sohn, Nürnberg, Germania.
3. Palmer M.V., Ting S.S.T., 1995 – Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chemistry*, 52, 345-352.
4. Donadini G., 2003 – Il Luppolo: qualità e tecnologia - *Rivista Italiana EPPOS*, 35, 13-32.
5. Guillaume L., Liégeois C., Collin S., 2001 – Reducing power of hop cultivars and beer ageing. *Food Chemistry*, 72, 413-418.
6. Naviglio D., Ferrara L., Montesano D., Mele G., Naviglio B., Tomaselli M., Martini F., Pintonello M., Diana S., Saggiomo S., 2001 – Application of a new solid-liquid extraction technology for the production of lemon liqueur: extractor Naviglio. *Italian Food and Beverage Technology*, 26, 19-27.
7. Naviglio D., Raia C., Ferrara L., Montesano D., Saggiomo S., 2002 – Standardizzazione del liquore di mirto col Naviglio Estrattore. *Industrie delle Bevande*, 31, (182), 533-537.
8. Naviglio D., Raia C., Naviglio B., Tomaselli M., Bolognese A., Correale G., Manfra M., 2003 – Organoleptic evaluation of lemon liqueurs deriving from organic agriculture. *Italian Food and Beverage Technology*, 32, 200-208.
9. Naviglio D., Raia C., Russo M., Aceto C., Somma A., Ferrara L., Montesano D., Manfra M., Correale G., Bolognese A., 2003 – Estrazione dell'olio essenziale di bergamotto. *Ingredienti Alimentari*, 2, 13-18.
10. Royle L., Ames J.M., Colin H., Gardner D.S.J., 2001 – Analysis of hop acids by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 74, 225-231.
11. Naviglio D., 2003 – Naviglio's principle and presentation of an innovative solid-liquid extraction technology: extractor Naviglio. *Analytical Letters*, 36 (8), 1645-1657.