



# Birra

-

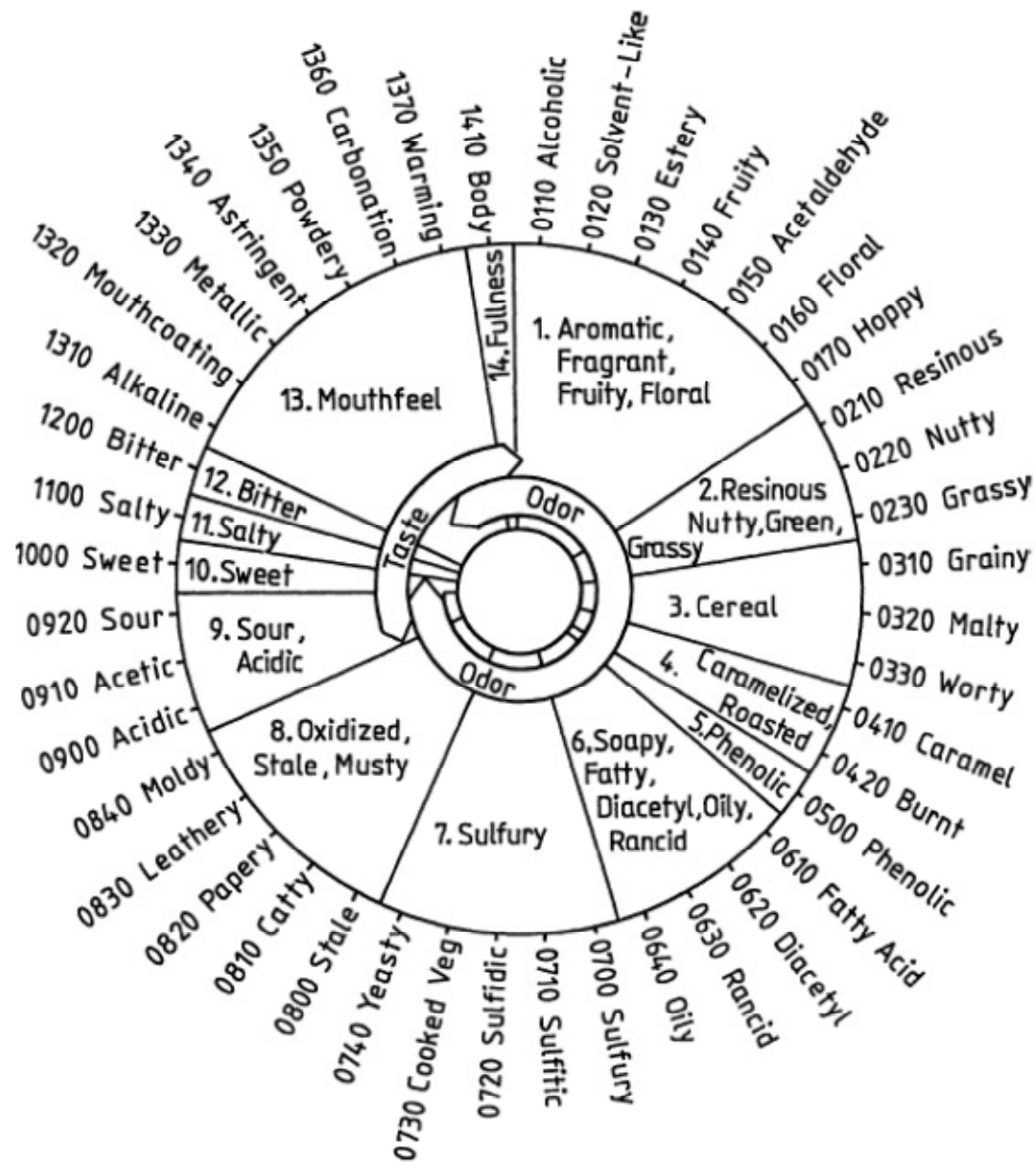
## La produzione e il consumo di birra

Country	Production (10 <sup>6</sup> hl) ettolitri			Consumption (l/capita)		
	1980	1997	2004	1980	1997	2004
Belgium	14.3	14.0	15.4	131	101	93
Denmark	8.1	9.2	8.4	131	117	90
Germany	92.3 <sup>a</sup>	114.8	106.0	146 <sup>a</sup>	131	116
Finland	2.8	4.8	4.6	54	67	84
France	21.7	19.5	18.1	57		33
Greece	4.1 <sup>b</sup>	3.9	4.4	41 <sup>b</sup>	39	
Ireland	6.0	8.1	8.0	122	124	108
Italy	8.6	11.5	13.7	17	25	30
Luxembourg	0.7	0.5	0.4	116	115	
Holland	15.7	24.7	25.1	86	86	78
Austria	7.6	9.4	8.9	102	113	109
Portugal	3.6	6.6	7.3	35	64	62
Sweden	3.7	4.9	4.0	47	62	52
Spain	20.0	24.9	30.6	54	67	
United Kingdom	64.8	59.1	58.0	118	104	101
Czech Rep.			18.5			161

<sup>a</sup>Without GDR.

<sup>b</sup>1990.

# Odori e sapori della birra



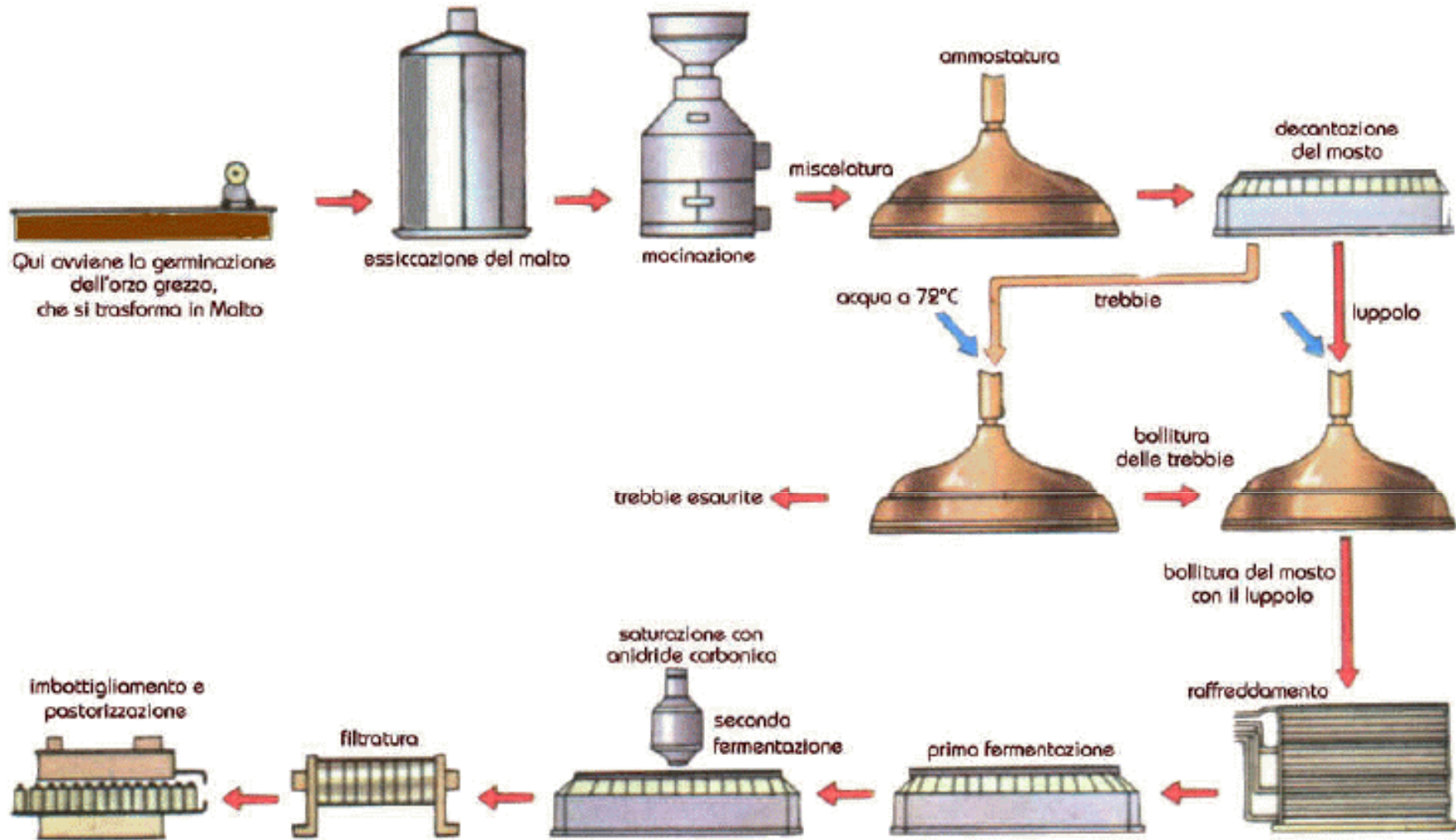
La preparazione della birra prevede le  
seguenti operazioni.

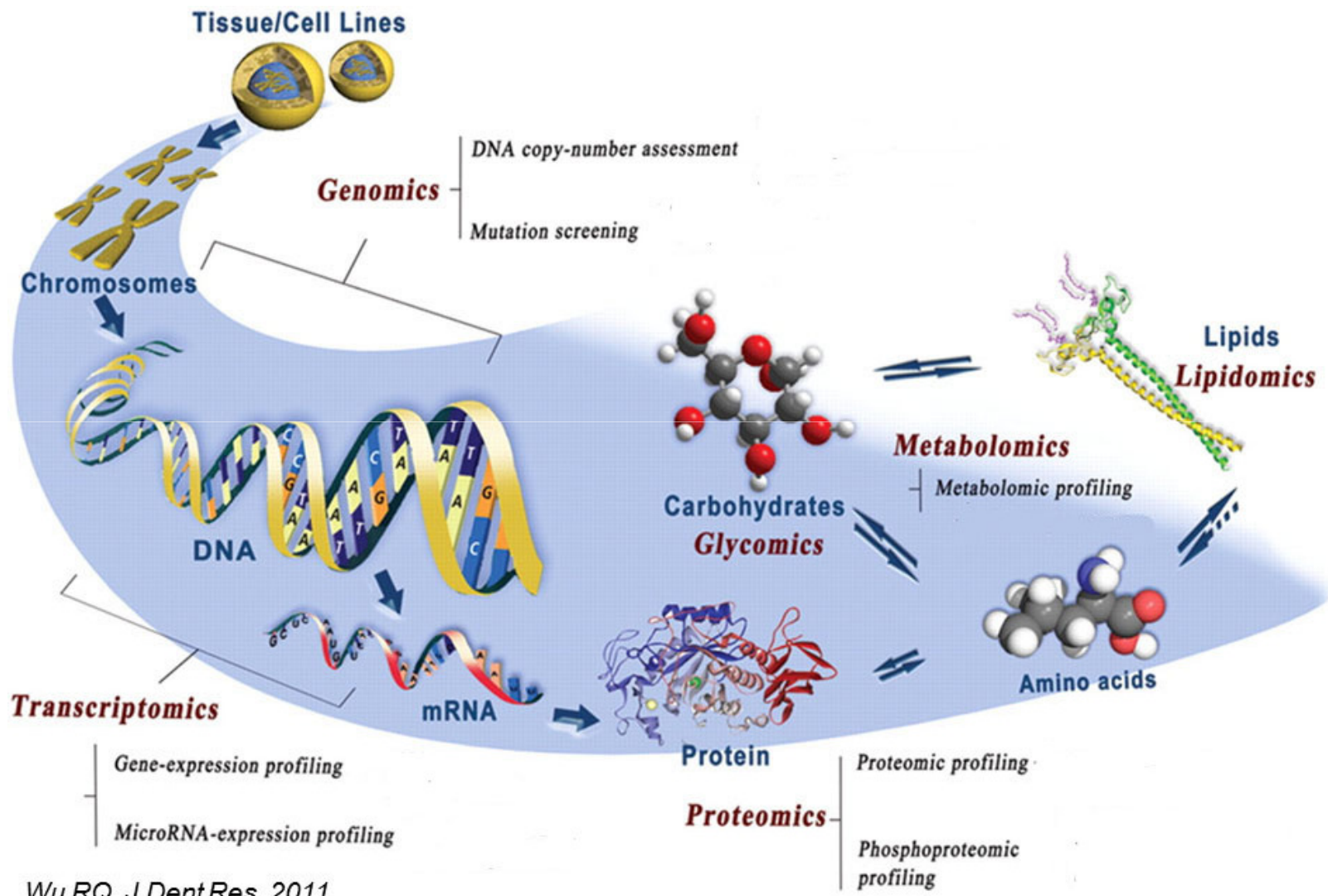
Preparazione del malto

Preparazione del mosto

Aggiunta del luppolo

Fermentazione





Wu RQ, J Dent Res. 2011



# Metaboloma

Corredo completo dei metaboliti presenti in una cellula, tessuto, ecc. (formati durante tutti i processi metabolici, durante la conservazione e lavorazione).

# Metabolomica

Identificazione e quantificazione di tutti i metaboliti (metaboloma) di un sistema biologico

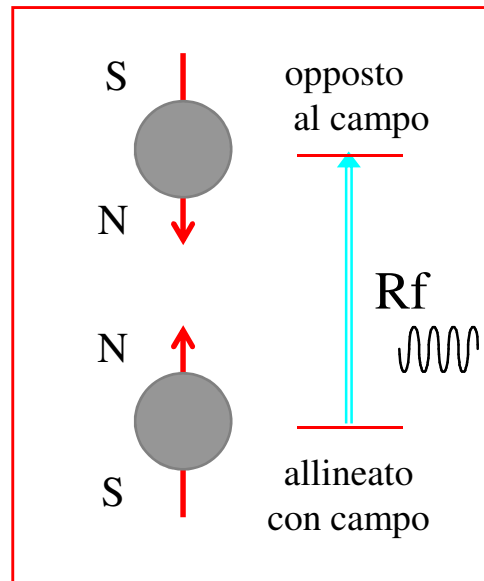
# Vantaggi e svantaggi del metodo NMR in metabolomica

- **Universale e imparziale (non è specifico solo per un classe di metaboliti)**
- **Separazione delle miscele, purificazione o derivatizzazione non sono necessari**
- **Differenza fino a  $10^5$  tra la più alta e la più bassa concentrazione in una stessa misura**
- **Identificazione dei composti sconosciuti o inaspettati**

**Sensibilità**



# Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)



“inversione”

Isotopo	spin	Abbondanza Naturale [%]
---------	------	-------------------------

$^1\text{H}$	$1/2$	99.98
--------------	-------	-------

$^2\text{H}$	1	0.016
--------------	---	-------

$^{13}\text{C}$	$1/2$	1.108
-----------------	-------	-------

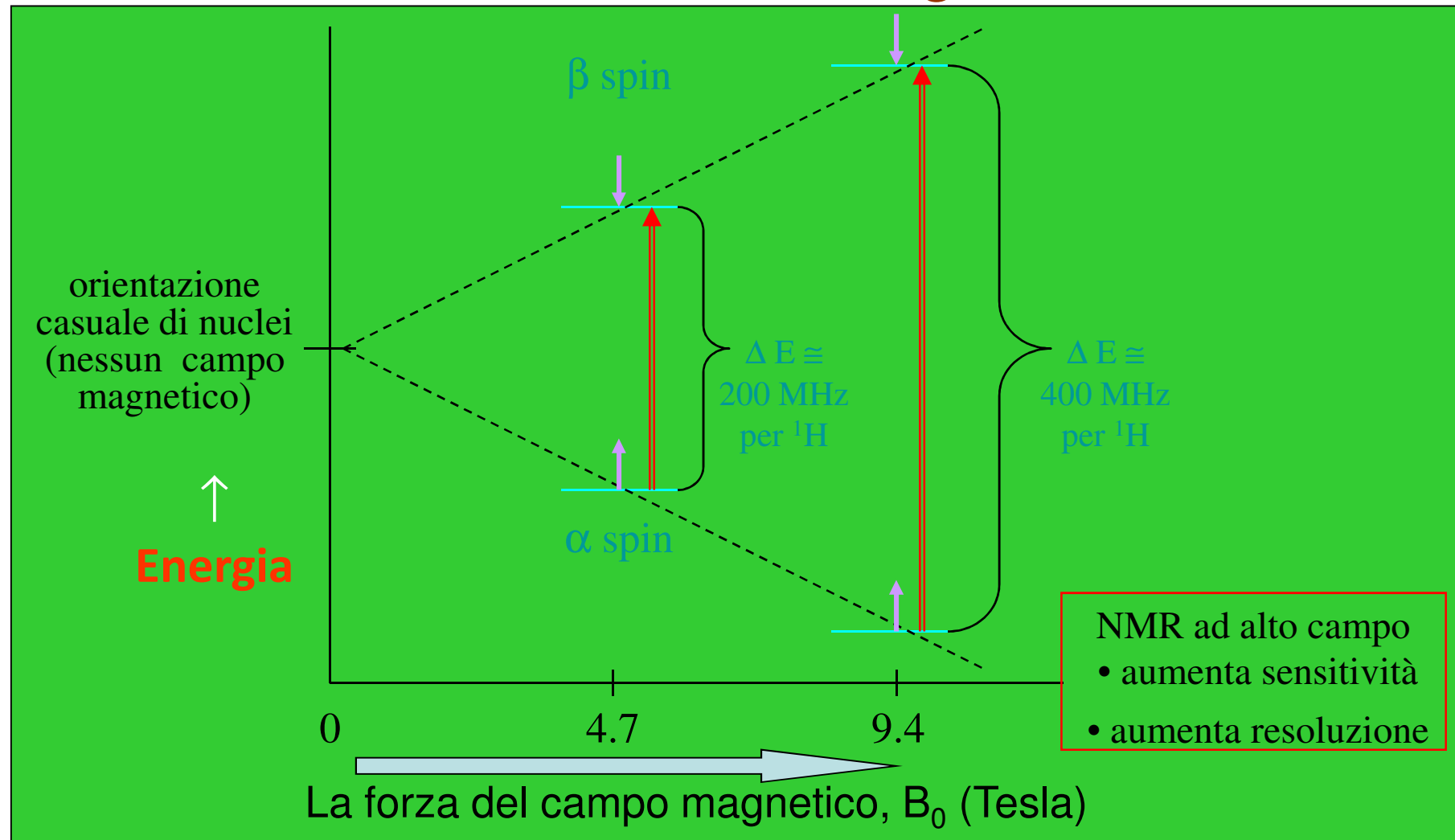
$^{14}\text{N}$	1	99.63
-----------------	---	-------

$^{15}\text{N}$	$1/2$	0.37
-----------------	-------	------

$^{17}\text{O}$	$5/2$	0.037
-----------------	-------	-------

$^{31}\text{P}$	$1/2$	100
-----------------	-------	-----

# Differenze dell' energia di spin vs. la forza del campo magnetico



## Chemical shift

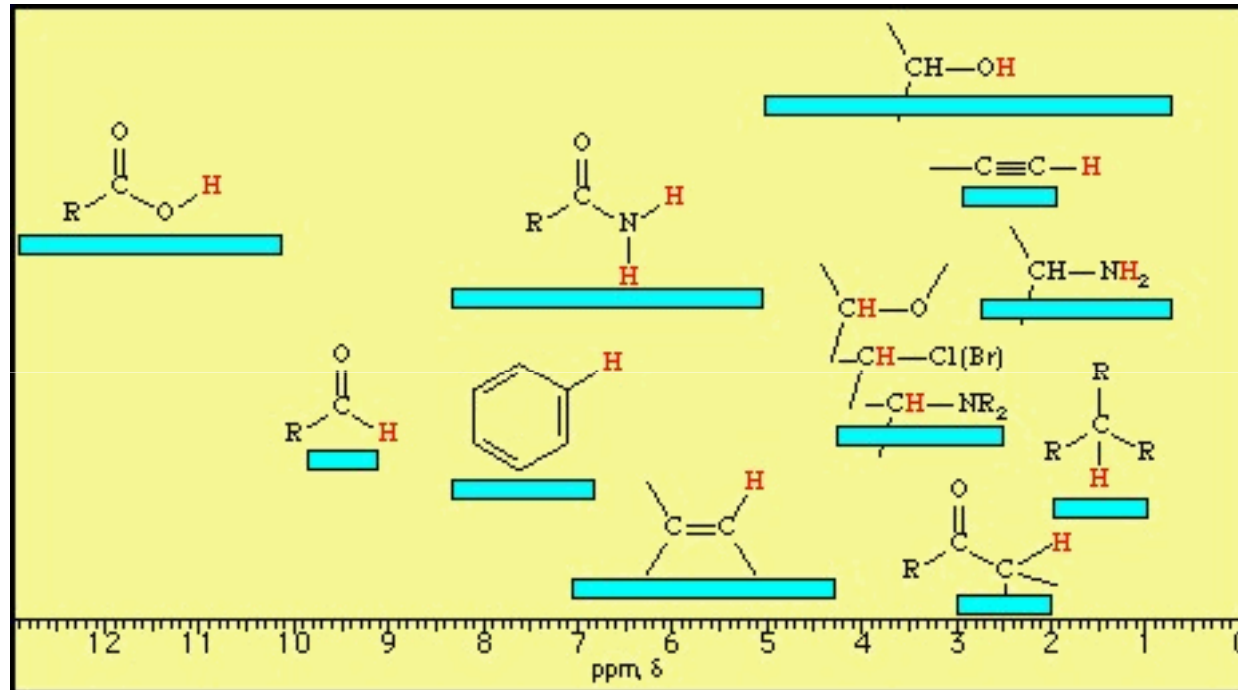
**La frequenza di risonanza di un nucleo dipende dal suo intorno chimico. Infatti gli elettroni immersi in un campo magnetico generano essi stessi un piccolo campo magnetico opposto al campo magnetico applicato che scherma il nucleo. Tanto maggiore è la densità elettronica tanto maggiore è la schermatura**

**Schermo elettronico**

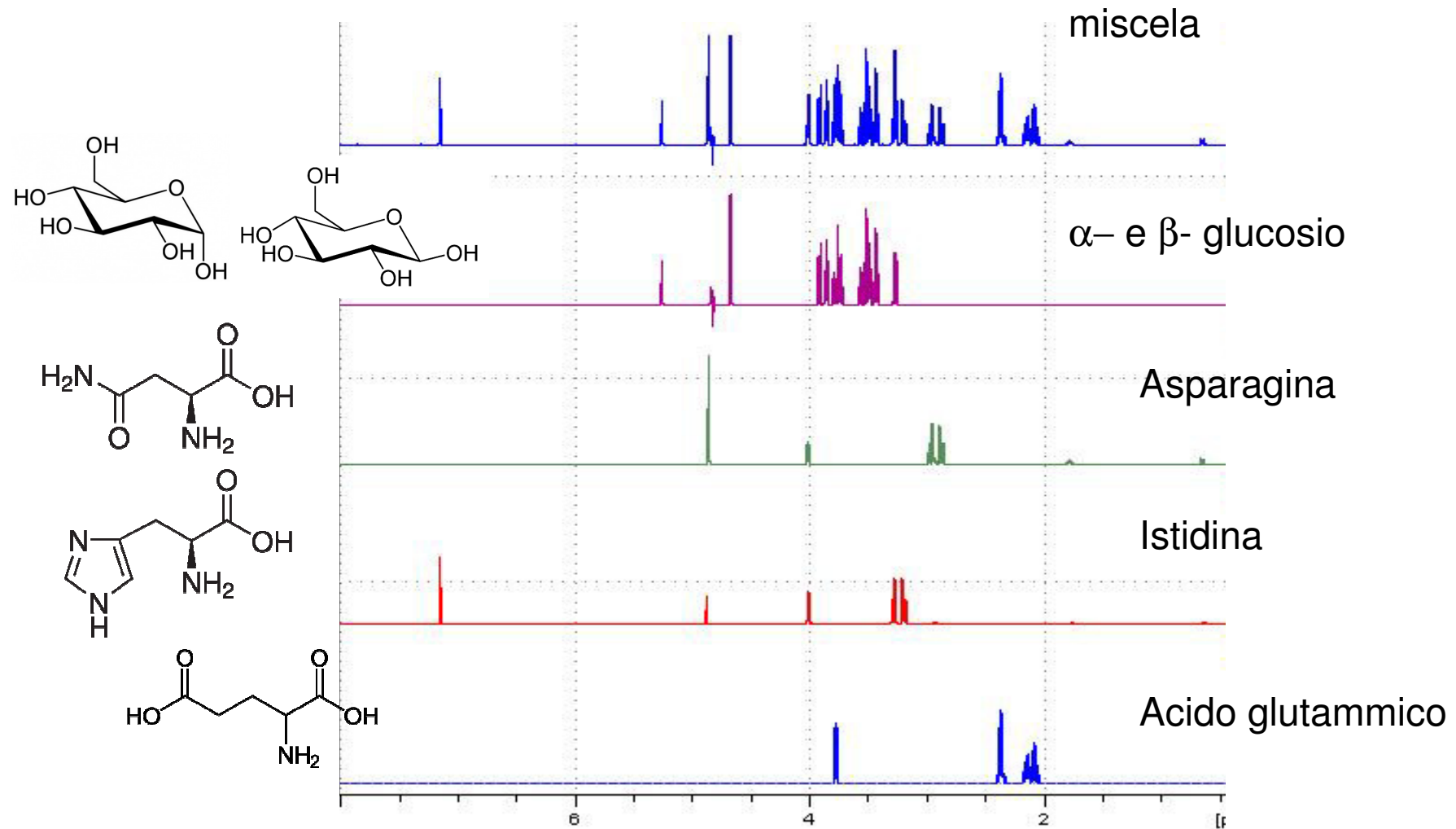
**campo magnetico indotto**

# Chemical shift è sensibile alla struttura chimica

$^1\text{H}$

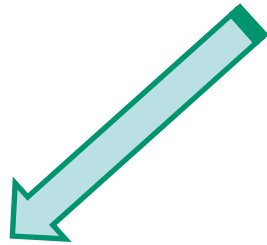


# Spettri NMR come gli impronti



# CARATTERIZZAZIONE DI BIRRE TRAMITE RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

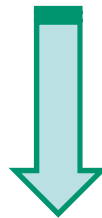
233 campioni analizzati in due periodi  
diversi



110



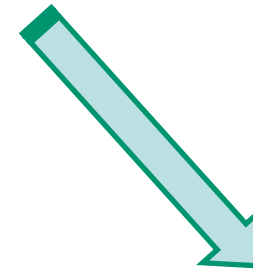
Non trappiste



76



Trappiste



47

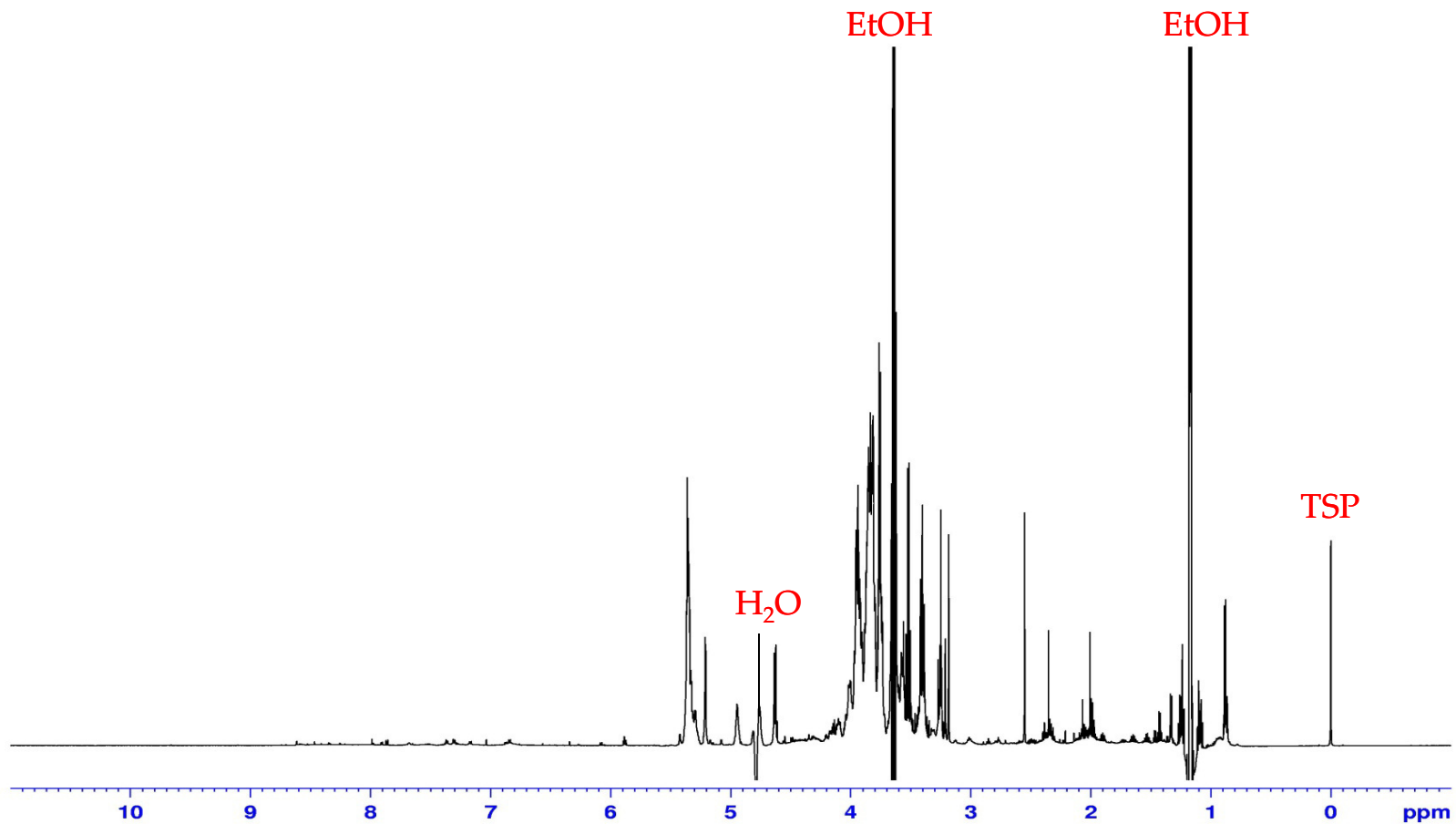


Rochefort 8

# Spettro $^1\text{H-NMR}$ (600MHz) di birra

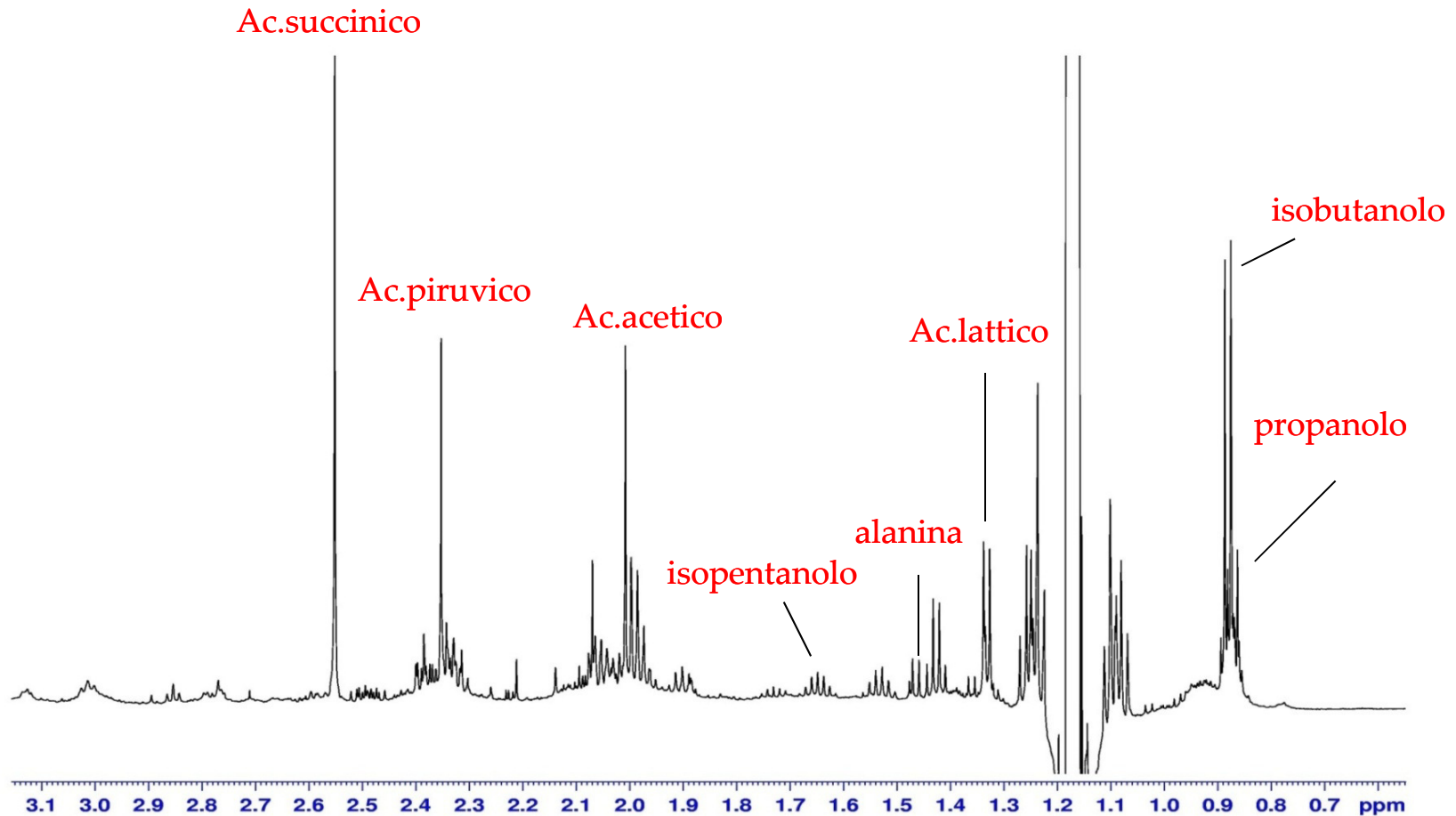
$\text{D}_2\text{O}/(\text{trimetilsilil})\text{propionato sodico}$  (5 mM)  $T=300$  K

Tutta l'impronta metabolica in un singolo esperimento

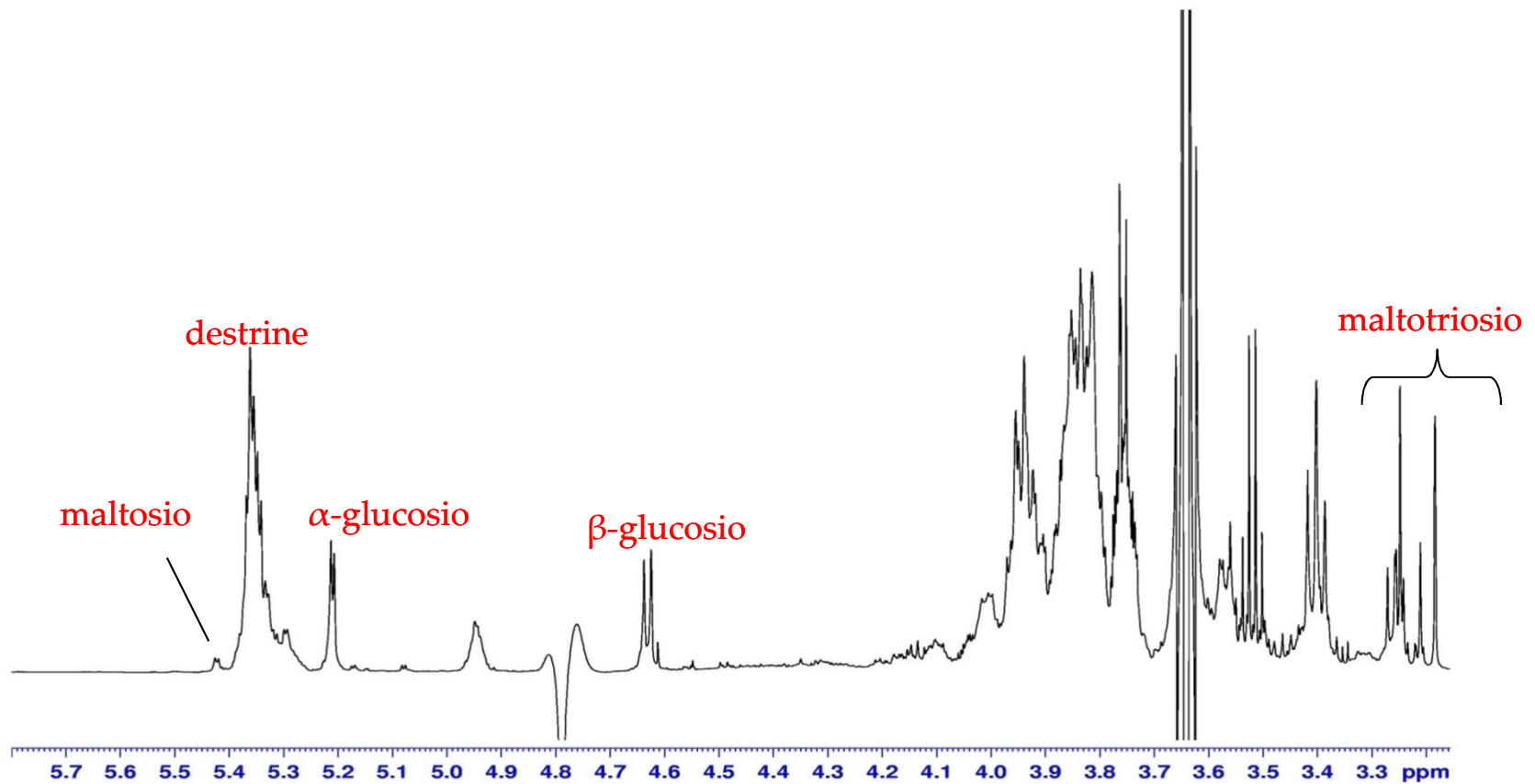




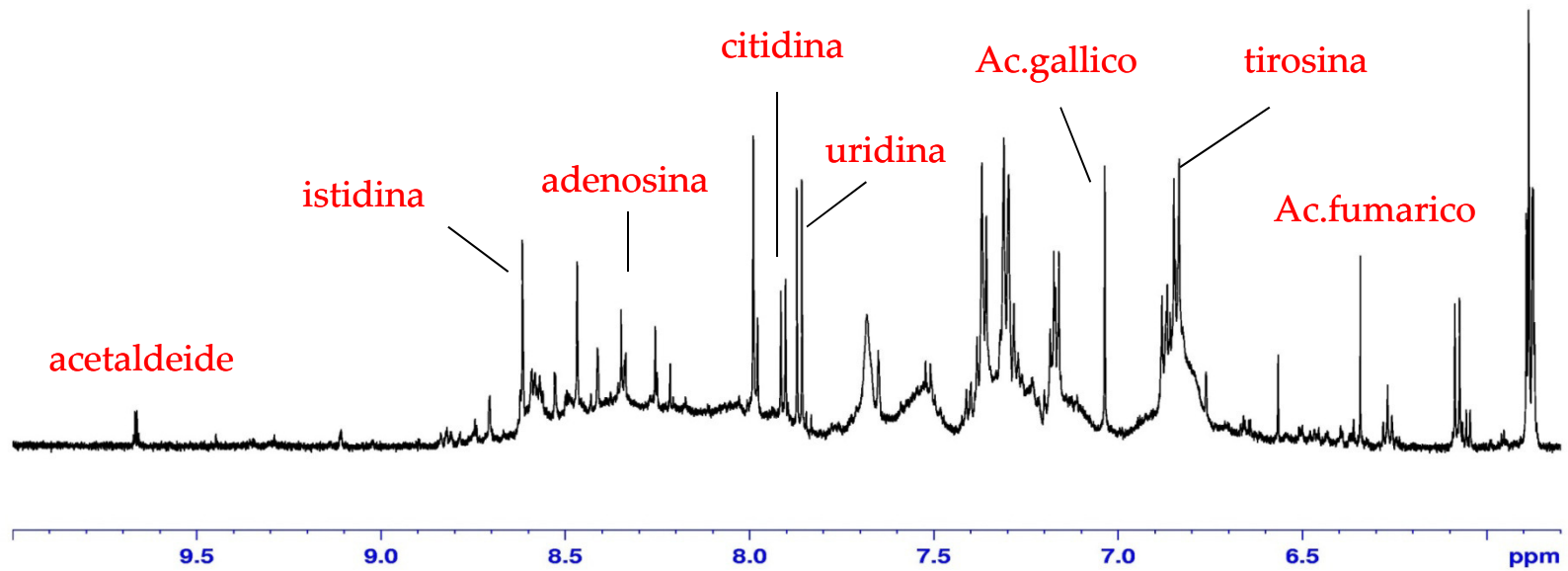
**REGIONE DELLO SPETTRO A CAMPI ALTI (0.8-3.0 ppm).**  
**ACIDI ORGANICI, ALCOLI E AMMINOACIDI**



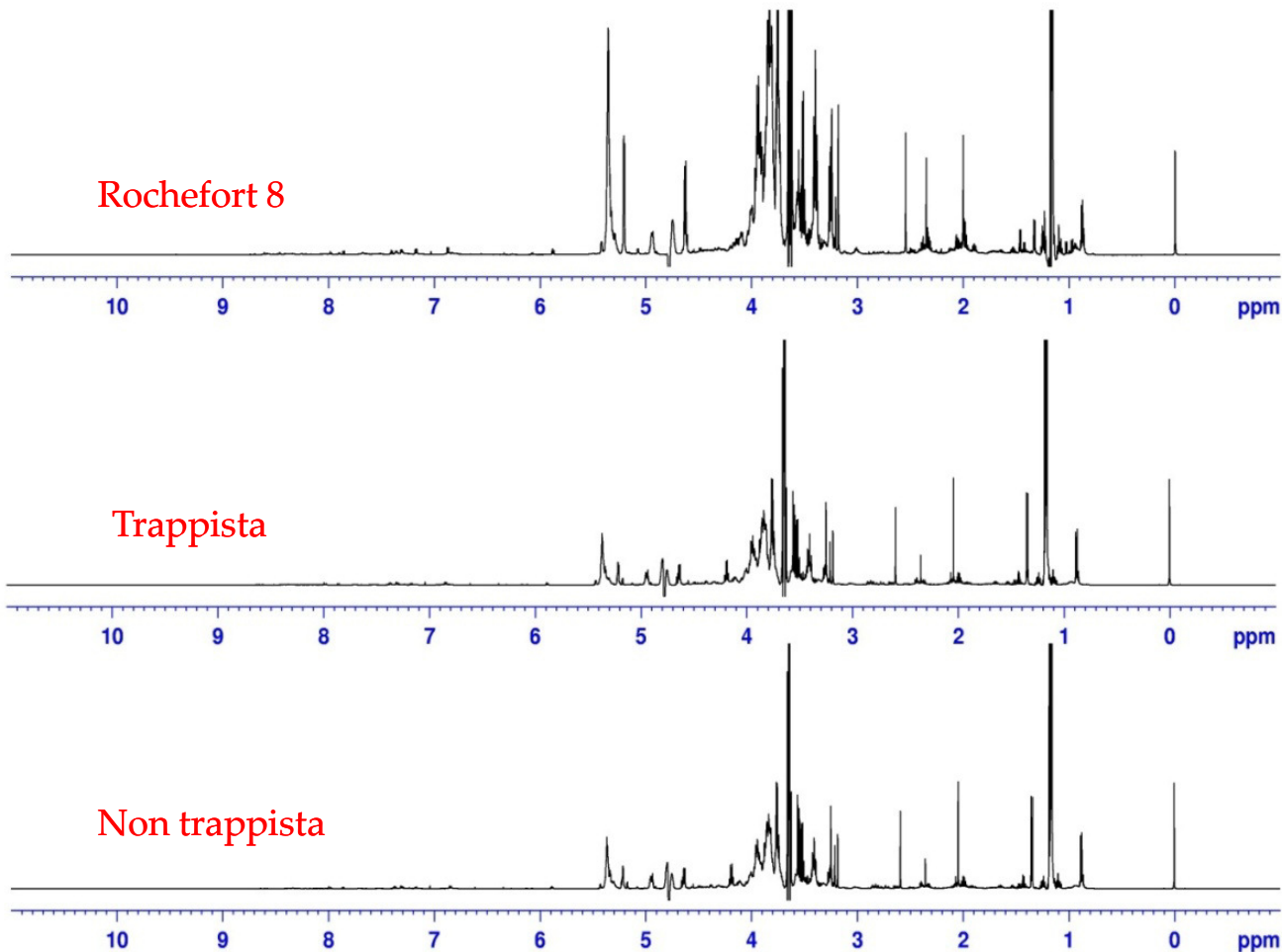
# REGIONE DELLO SPETTRO tra 3.2-5.5 ppm. ZUCCHERI



**REGIONE DELLO SPETTRO A CAMPI BASSI (6.5-10 ppm)**  
**AMMINOACIDI AROMATICI, NUCLEOSIDI**



# Confronto tra spettri di campioni di birra Rocheфор 8, trappista e non trappista



**Spettri  
qualitativamente  
uguali ma**

**Spettri  
quantitativamente  
differenti**

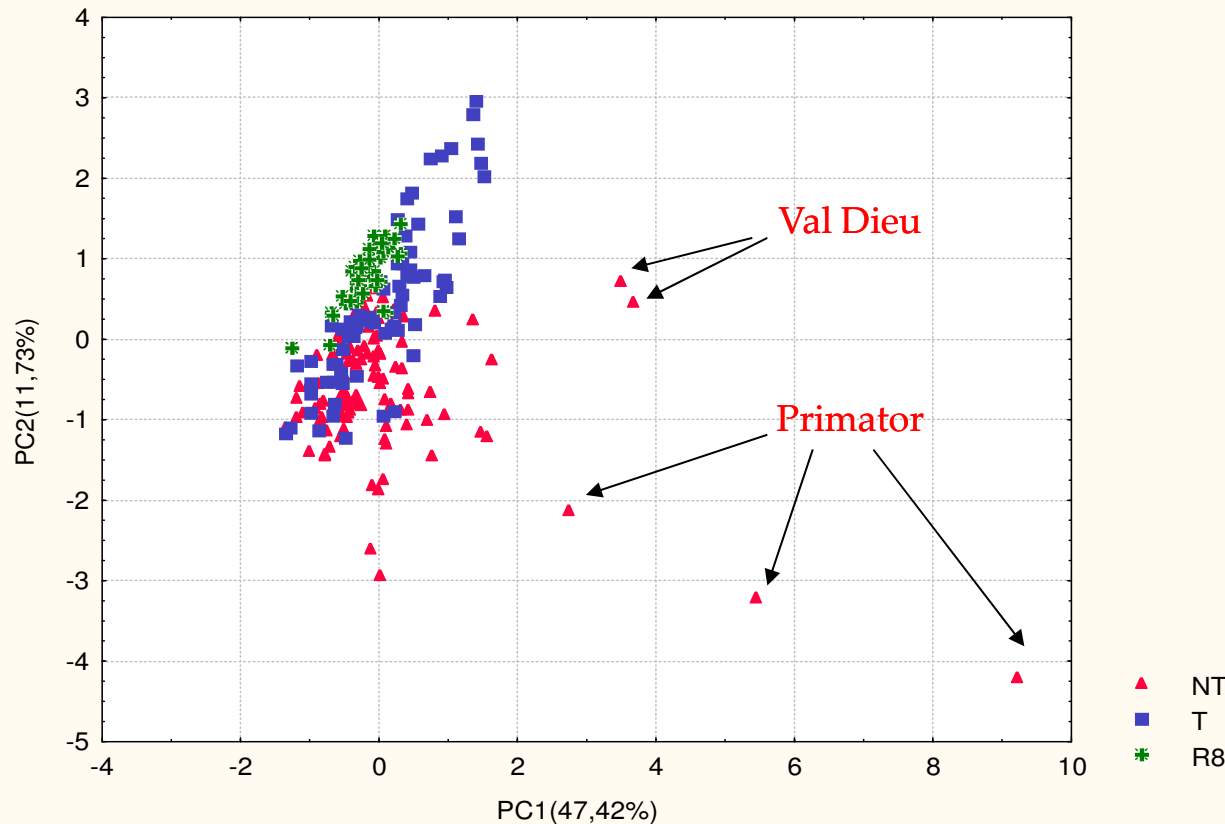
# Misura delle intensità e normalizzazione dei segnali NMR

è stata misurata l'intensità di 51 segnali rispetto ad un riferimento interno (TSP)

## Analisi statistica multivariata applicata ai dati NMR

- Analisi delle componenti principali (PCA)  
evidenzia la presenza di raggruppamenti naturali tra i campioni senza ipotesi a priori
- Analisi della varianza (ANOVA)  
seleziona le variabili con il maggior potere discriminante
- Analisi Discriminante tramite Regressione ai minimi quadrati parziali (PLS-DA) Metodo statistico di classificazione dei campioni

# Analisi delle componenti principali (PCA) effettuata su tutti i campioni (233) e tutte le variabili (51)



Cinque campioni di birra non trappista si separano nettamente dal resto dei campioni

I campioni presentano livelli di acido lattico, glucosio e maltotriosio molto più elevati rispetto a tutti gli altri campioni

▼ Non trappista    ■ Trappista    \* Rocheport 8

# Analisi della varianza (ANOVA)

L'ANOVA ha selezionato 31 variabili dal potere più discriminante rispetto alle 51 utilizzate inizialmente.

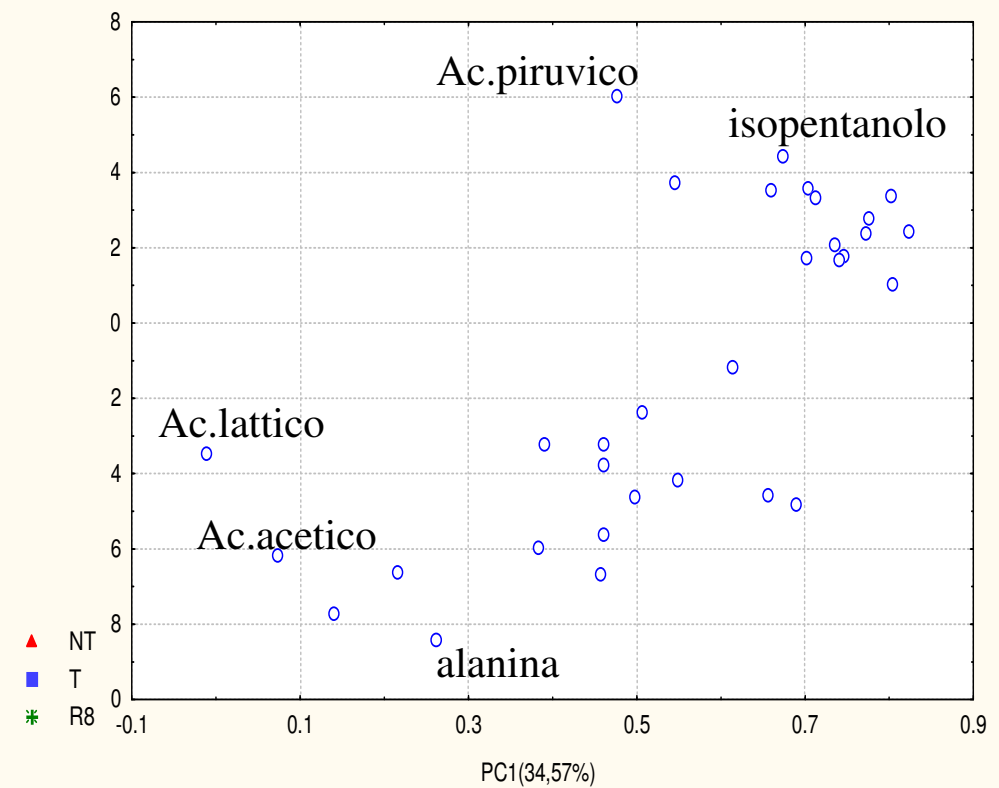
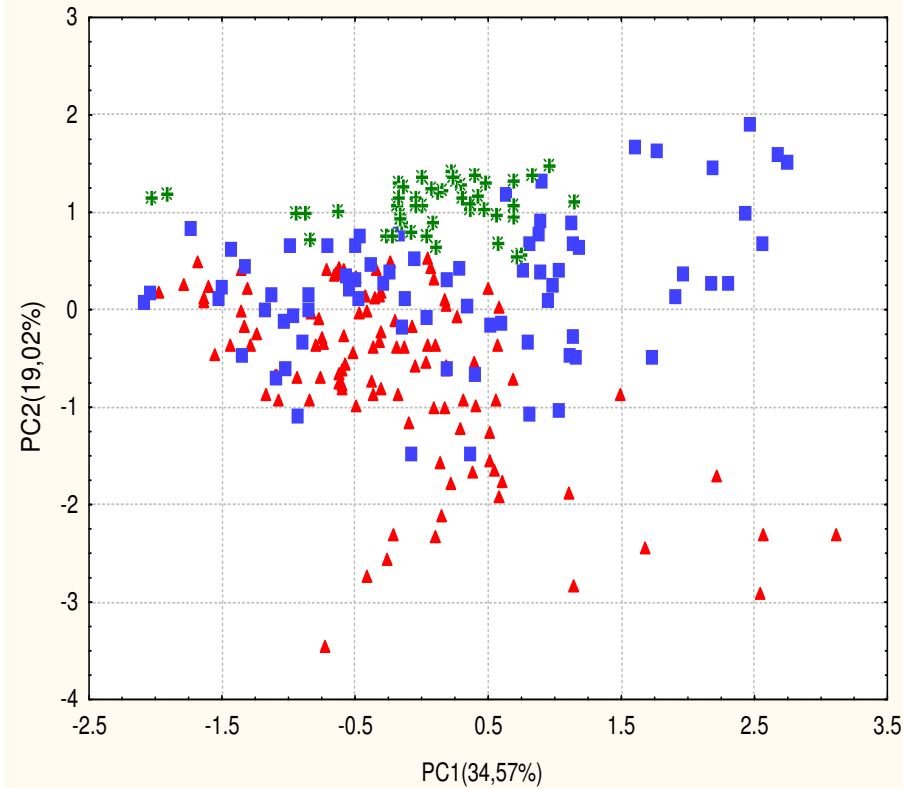
## Esclusione dei 5 campioni “outliers”

Sono stati esclusi dall'analisi statistica i cinque campioni di birra non trappista che sono risultati molto separati dal resto dei campioni dalla prima PCA

PCA effettuata quindi su 228 campioni e 31 variabili

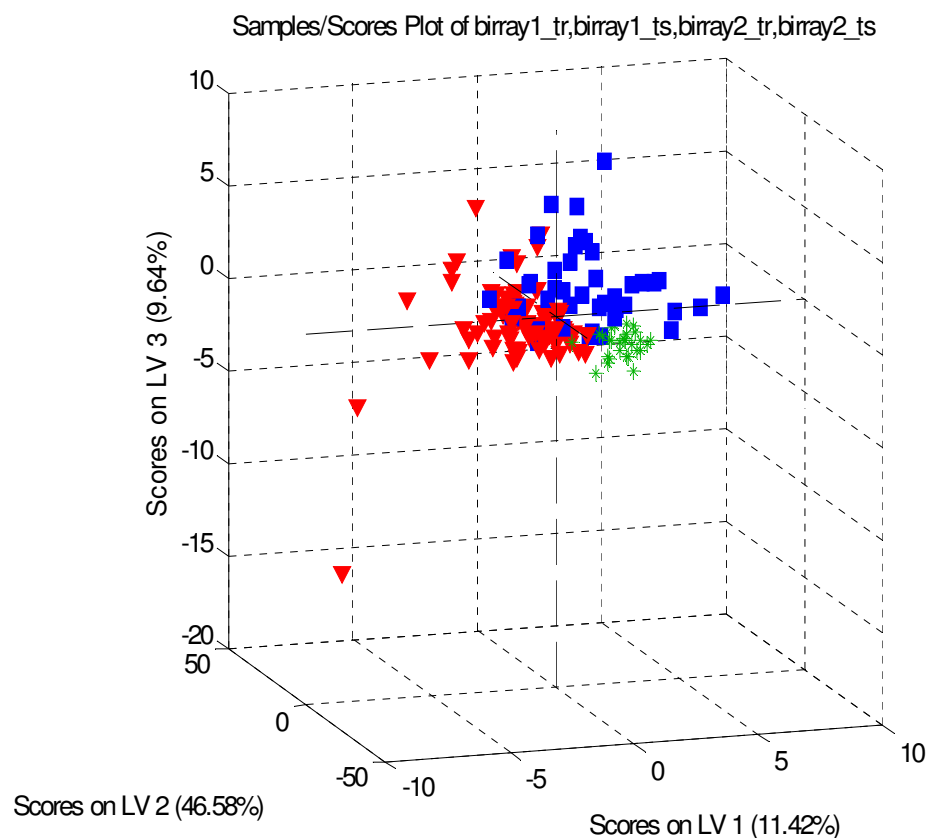


# Analisi delle componenti principali (PCA) effettuata su 228 campioni e 31 variabili



▼ Non trappista   ■ Trappista   \* Rochefort 8

# PLS-DA come metodo di classificazione dei campioni



▼ Non trappista

■ Trappista

✱ Rochefort 8

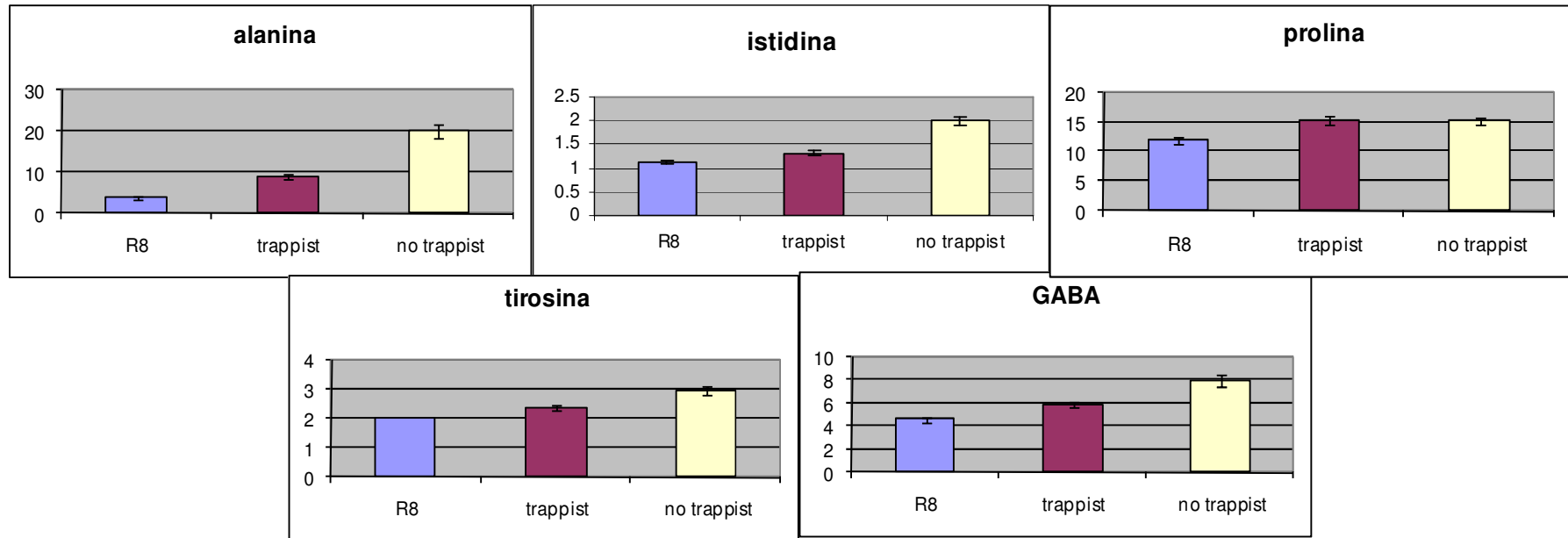
## Risultati in cross-validation sul training set

		Predetti		
		NT	R8	T
Osservati	NT	80 (94.1%)	1 (1.2%)	4 (4.7%)
	R8	1 (3.4%)	28 (96.6%)	0
	T	15 (34.9%)	4 (9.3%)	24 (55.8%)

## Previsioni sul test set

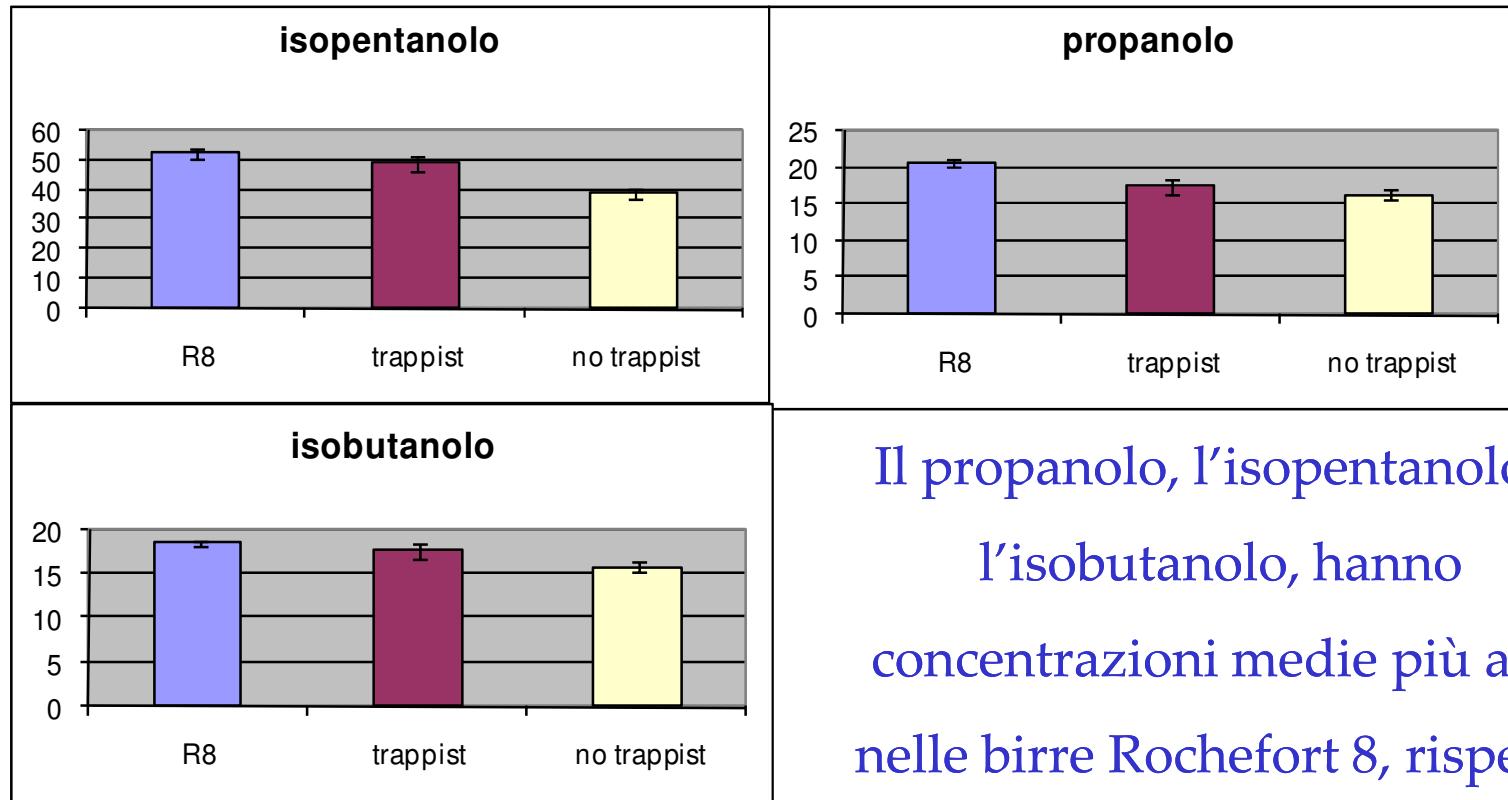
		Predetti		
		NT	R8	T
Osservati	NT	23 (92%)	0	2 (8%)
	R8	2 (11.1%)	15 (83.3%)	1 (5.6%)
	T	13 (39.4%)	3 (9.1%)	17 (51.5%)

## Analisi dei metaboliti: Amminoacidi



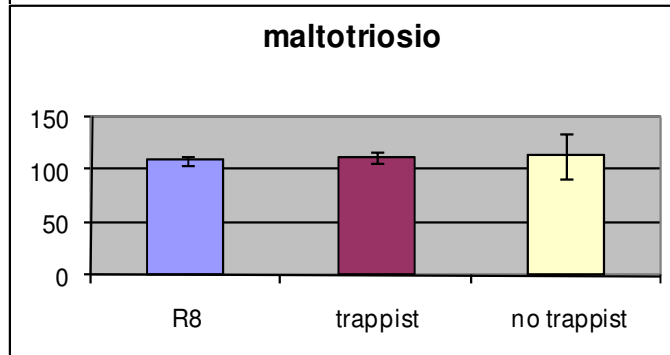
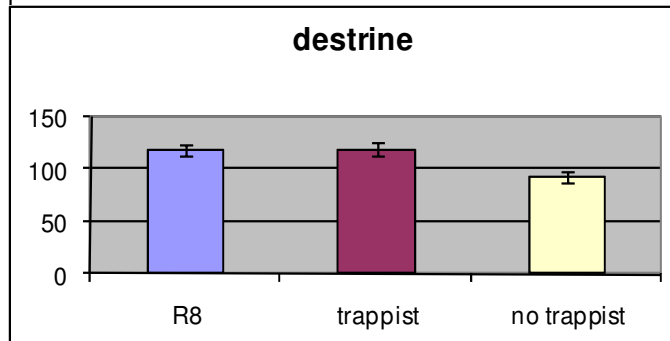
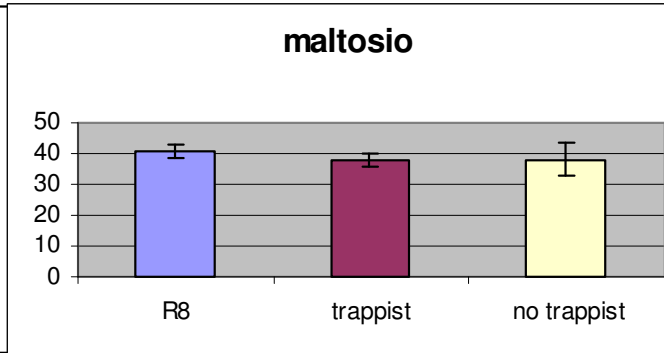
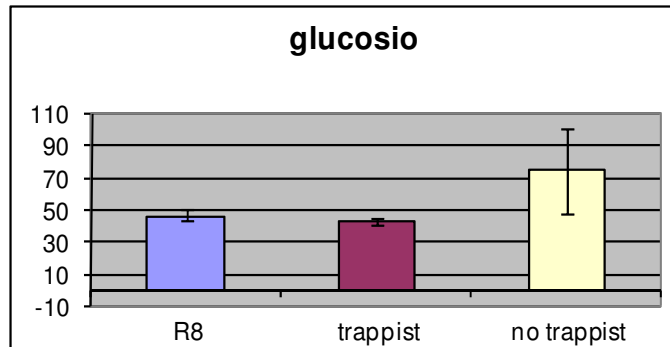
Gli amminoacidi alanina, istidina, tirosina, prolina e GABA, hanno concentrazioni medie più basse nelle birre Rochefort 8, specialmente rispetto alle birre non trappiste. Le differenze più significative si osservano per l'amminoacido ALANINA.

# Analisi dei metaboliti: Alcoli



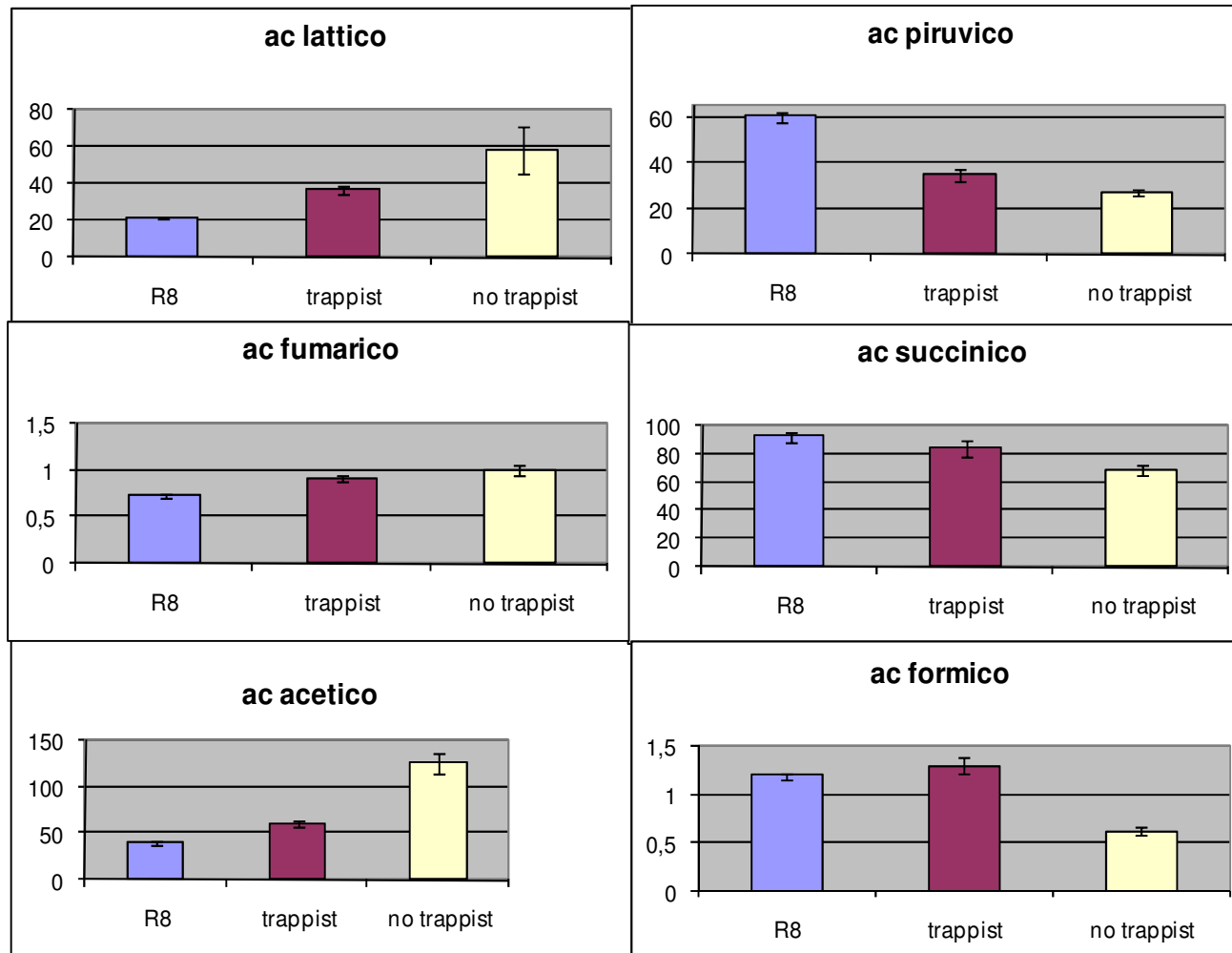
Il propanolo, l'isopentanol e l'isobutanolo, hanno concentrazioni medie più alte nelle birre Rochefort 8, rispetto al resto dei campioni, specialmente alle non trappiste

# Analisi dei metaboliti: Carboidrati



Le birre Rochefort 8 e le altre trappiste, presentano concentrazioni medie di glucosio più basse rispetto alle non trappiste, mentre hanno valori più alti di destrine.

# Analisi dei metaboliti: Acidi organici



Le birre Rochefort 8 e le altre trappiste, presentano concentrazioni medie di acido lattico, acido acetico e acido fumarico più basse degli altri campioni ma concentrazioni di acido piruvico e succinico e formico più alte



# Conclusioni

- ✓ La Risonanza Magnetica Nucleare si è dimostrata uno strumento importante per lo studio del profilo metabolico dell'alimento.
- ✓ L'analisi statistica dei profili metabolici di birre diverse fornisce un metodo di certificazione dell'origine del prodotto e quindi un metodo per rilevare eventuali frodi.
- ✓ I metaboliti più discriminati sono legati ai processi fermentativi (ac.piruvico, ac.lattico, alanina). L'elevata concentrazione di acido piruvico e la bassa concentrazione di acido lattico nelle birre Rochefort 8 è associata all'utilizzo di ceppi di lieviti (*Saccaromices Cerevisiae*) selezionati di più vecchia generazione, che hanno un metabolismo caratterizzato dalla bassa attività dell'enzima lattico deidrogenasi.