



Università degli Studi di Udine

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

ANALISI MOSTI E BIRRE

*Valutazione della correlazione tra i risultati ottenuti
con il CDR BeerLab® e le metodiche ufficiali*



Valutazione correlazione tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e con le metodiche ufficiali EBC (*European Brewery Convention*) sui seguenti parametri:

- Grado alcolico;
- pH;
- colore;
- FAN (*Free Aminoacid Nitrogen*);
- Zuccheri fermentescibili;
- Amaro;
- Acido lattico

CAMPIONI (BIRRE E MOSTI)

Sono stati analizzati ventotto diversi tipi di birre commerciali (Tabella 1). I campioni sono stati scelti di marche diverse e con diverse caratteristiche al fine di coprire l'intervallo di interesse in funzione del parametro testato.

Per poter effettuare le analisi degli zuccheri fermentescibili e andare a valutare la correlazione del risultato analitico ottenuto mediante l'analisi HPLC e quello tramite la strumentazione CDR BeerLab®, sono stati prodotti dodici diversi mosti con temperature di ammostamento e formulazioni differenti (Tabella 2). Sono stati prodotti sia mosti chiari che mosti scuri, per valutare l'incidenza della variabile del colore sui risultati ottenuti con il CDR BeerLab®. Tutti i mosti sono stati prodotti con un rapporto acqua/farine di 3 a 1 (500 g di malto, 1,5 L di acqua), che risulta essere ottimale per una corretta degradazione enzimatica dell'amido. Sono state prodotte quattro diverse tipologie di mosto: un mosto chiaro (composto interamente da malto), un mosto tipo weizen (composto al 40% da malto di frumento e al 60% da malto chiaro), un mosto tipo cara (composto al 10% da malto cara e al 90% da malto chiaro) e un mosto tipo chocolate (composto dal 5% di malto chocolate e dal 95% di malto chiaro). Per ogni tipologia di mosto sono state utilizzate tre diverse temperature di ammostamento (58 °C, 65 °C e 72 °C) mediante l'impiego di un agitatore magnetico con piastra riscaldante (Yellow Line MST BASIC). Le temperature di ammostamento sono state mantenute costanti grazie all'utilizzo di una piastra riscaldante e un'agitazione mediante ancorotta magnetica (2 ore). Finito l'ammostamento è stato eseguito il test dello iodio, per valutare il grado d'idrolisi dell'amido quando l'esito era negativo è stato prolungato l'ammostamento sino ad esito positivo. Una volta convertito tutto



Università degli Studi di Udine

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

l'amido, al fine di inattivare gli enzimi, il mosto è stato portato a 78 °C mantenuti per 15 minuti (mash out). Svoltata questa operazione grazie all'utilizzo di un tino filtro (lauter tun) è stata eseguita la filtrazione. Il mosto ottenuto è stato portato a ebollizione e la temperatura è stata mantenuta per 15 minuti per facilitare l'illimpidimento dello stesso mediante la precipitazione di complessi tannoproteici. Dopo l'ebollizione il mosto è stato posto in contenitori di polietilene (PE) da 100 mL, raffreddato in ghiaccio e conservato in frigorifero (2 °C) sino all'analisi.

Per poter effettuare le analisi dei FAN e valutare la correlazione del risultato analitico ottenuto mediante l'analisi ufficiale e quello tramite il CDR BeerLab[®], sono stati prodotti sei diversi mosti con concentrazioni e formulazioni differenti (Tabella 3). Sono state prodotte due diverse tipologie di mosto: un mosto composto interamente da malto chiaro (tipo Pils) ed un mosto composto al 50% da malto di frumento e al 50% da malto chiaro (tipo Pils). Le quantità di malto impiegate sono state definite al fine di ottenere per ogni tipologia di mosto tre concentrazioni diverse (6, 12 e 18°Plato) e, quindi, contenuti diversi (mg/L) di FAN (Tabella 3). Per ogni tipologia di mosto è stata utilizzata la stessa temperatura di ammostamento (65 °C) mediante l'impiego di un agitatore magnetico con piastra riscaldante (Yellow Line MST BASIC). Il mosto ottenuto è stato portato a ebollizione e la temperatura è stata mantenuta per 15 minuti per facilitare l'illimpidimento dello stesso mediante la precipitazione di complessi tannoproteici. Dopo l'ebollizione il mosto è stato posto in contenitori di polietilene (PE) da 100 mL e raffreddato in ghiaccio, e conservato in frigorifero (2 °C) sino all'analisi.



Tabella 1 Elenco delle birre analizzate.

Birra	Codice campione
Artigianale 1	1
Artigianale 2	2
Artigianale 3	3
Artigianale 4	4
Artigianale 5	5
Artigianale 6	6
Artigianale 7	7
Artigianale 8	8
Artigianale 9	9
Artigianale 10	10
Artigianale 11	11
Industriale 1	12
Industriale 2	13
Industriale 3	14
Industriale 4	15
Industriale 5	16
Industriale 6	17
Industriale 7	18
Industriale 8	19
Industriale 9	20
Industriale 10	21
Industriale 11	22
Industriale 12	23
Industriale 13	24
Industriale 14	25
Industriale 15	26
Industriale 16	27
Industriale 17	28



Tabella 2. Produzione dei mosti per l'analisi degli zuccheri fermentescibili.

Malto	Codice	T (°C) ammostamento	Test Iodio dopo 120 min	Test Iodio dopo 135 min	Densità del mosto (°Plato)
Chiaro	M1	58	negativo	positivo	12,0
Chiaro	M2	65	positivo	-	12,0
Chiaro	M3	72	positivo	-	11,5
<i>Weizen</i>	W1	58	positivo	-	12,5
<i>Weizen</i>	W2	65	positivo	-	11,0
<i>Weizen</i>	W3	72	positivo	-	12,1
Caramello	C1	58	negativo	positivo	11,9
Caramello	C2	65	positivo	-	12,2
Caramello	C3	72	positivo	-	11,8
<i>Chocolate</i>	CH1	58	positivo	-	12,5
<i>Chocolate</i>	CH2	65	positivo	-	11,4
<i>Chocolate</i>	CH3	72	positivo	-	12,0

Tabella 3 Produzione dei mosti per l'analisi dei FAN.

Malto	Codice	Test Iodio (dopo 2 ore)	Densità del mosto (°Plato)
Chiaro	P1	positivo	6,3
Chiaro	P2	positivo	12,2
Chiaro	P3	positivo	17,8
Frumento	F1	positivo	6,5
Frumento	F2	positivo	12,1
Frumento	F3	positivo	17,6



ANALISI STATISTICA

Per verificare la presenza o meno di correlazione sono stati impiegati il coefficiente di correlazione di Pearson (r) e il p-value (program CoStat 6.204, CoHort Software, Monterey Ca, Usa). La correlazione è stata considerata statisticamente significativa con $p < 0,05$.

Grado alcolico

Per questo parametro è stata valutata la correlazione statistica tra i risultati ottenuti dalle analisi eseguite con il CDR BeerLab® e quelli ottenuti mediante l'utilizzo dell'Alcolyzer Beer Analyzing System (Anton Paar). Studi di comparazione dei risultati (gradi alcolici) ottenuti con l'Anton Paar e quelli determinati con la metodica ufficiale (EBC 9.2.1) hanno evidenziato una deviazione non statisticamente significativa tra i valori medi ottenuti con le due metodiche e una deviazione standard dell'Anton Paar di 0,025% vol/vol (Zanker and Benes, 2004).

Tabella 4 Risultati del grado alcolico (% vol/vol) ottenuti con il CDR BeerLab® e con l'Anton Paar su 12 birre (n=3).

Codice	CDR BeerLab®					NIR (Anton Paar)					p-value
	% vol/vol	% vol/vol	% vol/vol	Media	Deviazione standard	% vol/vol	% vol/vol	% vol/vol	Media	Deviazione standard	
1	6,29	6,23	6,20	6,24	0,05	6,47	6,42	6,49	6,46	0,04	< 0,05
2	5,48	5,57	5,49	5,51	0,05	5,63	5,67	5,56	5,62	0,06	
3	5,69	5,60	5,66	5,65	0,05	5,94	5,86	5,84	5,88	0,05	
4	4,59	4,51	4,45	4,52	0,07	4,58	4,48	4,51	4,52	0,05	
5	6,13	5,95	6,18	6,09	0,12	6,14	5,99	6,15	6,09	0,09	
6	6,00	5,99	5,90	5,96	0,06	6,02	5,94	5,92	5,96	0,05	
7	5,93	5,98	5,95	5,95	0,03	5,90	6,00	5,94	5,95	0,05	
8	5,12	5,29	5,26	5,22	0,09	5,10	5,20	5,16	5,15	0,05	
9	6,64	6,52	6,54	6,57	0,06	6,70	6,60	6,64	6,65	0,05	
12	4,61	4,55	4,54	4,57	0,04	4,40	4,44	4,52	4,45	0,06	
13	4,14	4,27	4,23	4,21	0,07	4,00	4,14	4,17	4,10	0,09	
14	2,22	2,15	2,37	2,25	0,11	2,09	2,10	2,25	2,15	0,09	

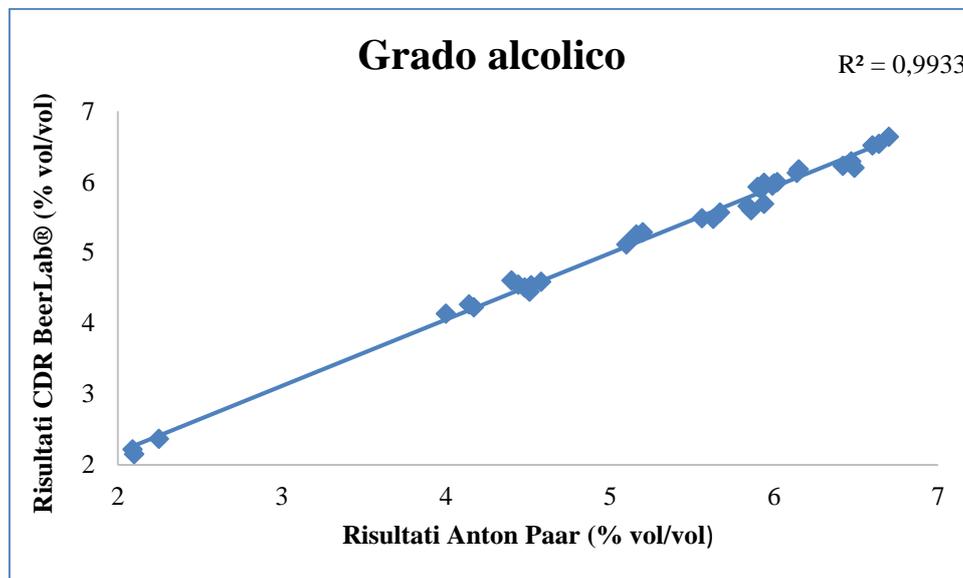


Figura 1 Correlazione dati grado alcolico.

Il confronto è stato eseguito su dodici campioni (birre industriali e artigianali chiare, ambrate, scure; Tabella 1). I campioni sono stati scelti in modo da avere un intervallo di valori da 2 a 7 % vol/vol. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0,05$) e deviazioni standard basse ($0,03 \div 0,12$ per il CDR BeerLab® e $0,04 \div 0,09$ per l'Anton Paar), al di sotto del limite legale di tolleranza compreso nell'intervallo tra 0,5% (birre con contenuto alcolometrico volumico $\leq 5,5$ % vol/vol) e l'1 % (birre con contenuto alcolometrico volumico $> 5,5$ % vol/vol; Art. 12 del D.L. n. 109/92), indice di una buona precisione di entrambi (Tabella 4, Figura 1).



pH

I campioni sono stati analizzati utilizzando il CDR BeerLab® e il metodo di riferimento (EBC 9.35).

Tabella 5 Risultati del pH (20 °C) ottenuti con il CDR BeerLab® e con il metodo EBC 9.35 su 12 birre (n=2).

Codice	CDR BeerLab®				EBC 9.35				p-value
	pH (20°C)	pH (20°C)	Media	Deviazione standard	pH (20°C)	pH (20°C)	Media	Deviazione standard	
12	4,5	4,6	4,6	0,1	4,4	4,5	4,5	0,1	< 0,05
13	3,4	3,4	3,4	0,0	3,2	3,4	3,3	0,1	
14	4,5	4,6	4,6	0,1	4,6	4,6	4,6	0,0	
15	4,4	4,3	4,4	0,1	4,3	4,3	4,3	0,0	
16	4,3	4,2	4,3	0,1	4,2	4,1	4,2	0,1	
17	4,6	4,7	4,7	0,1	4,6	4,7	4,7	0,1	
18	4,5	4,5	4,5	0,0	4,4	4,3	4,4	0,1	
19	4,6	4,7	4,7	0,1	4,5	4,6	4,6	0,1	
20	3,5	3,4	3,5	0,1	3,6	3,4	3,5	0,1	
21	4,4	4,4	4,4	0,0	4,3	4,3	4,3	0,0	
22	4,2	4,2	4,2	0,0	4,2	4,2	4,2	0,0	
23	4,6	4,6	4,6	0,0	4,5	4,7	4,1	0,1	

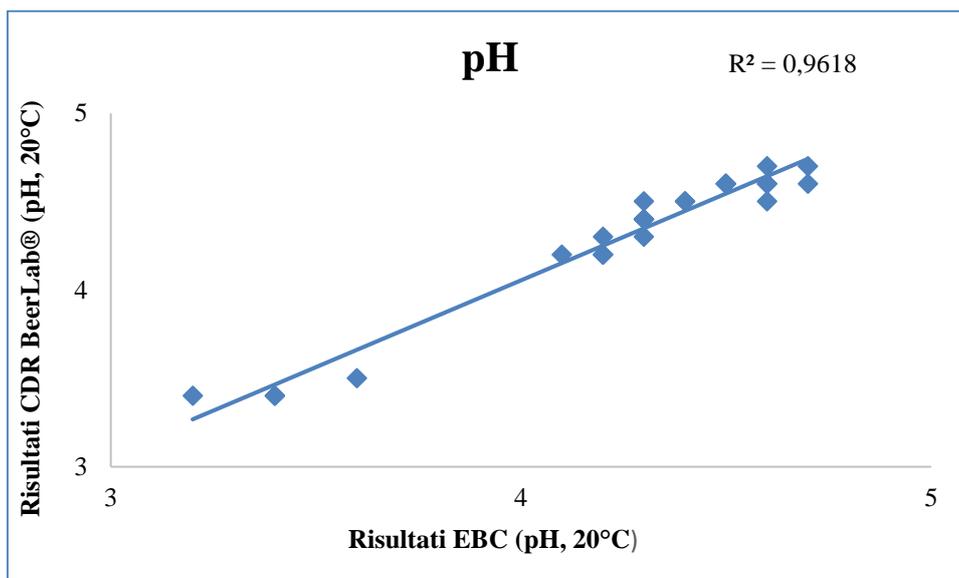


Figura 2 Correlazione dati pH.



Università degli Studi di Udine

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

Il pH è un parametro fondamentale per monitorare un'eventuale proliferazione di microrganismi alteranti nella birra. Per tale parametro è stata determinata la correlazione statistica tra i risultati ottenuti dalle analisi effettuate con il CDR BeerLab® e con il metodo ufficiale. Le analisi sono state eseguite su 12 campioni (birre industriali e artigianali chiare, ambrate, scure; Tabelle 1 e 5) in un intervallo di pH (20°C) da 3 a 5. La verifica della presenza o meno di correlazione è stata eseguita come precedentemente indicato per il parametro del grado alcolico. La correlazione è stata considerata statisticamente significativa con $p < 0.05$. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0.05$) e deviazioni standard molto basse ($0,0 \div 0,1$ sia per il CDR BeerLab® che per la metodica ufficiale) nonostante il ristretto (per le caratteristiche intrinseche del prodotto) intervallo di pH, (Tabella 5, Figura 2).



Colore

Per il colore è stata determinata la correlazione statistica tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con il metodo di analisi ufficiale (EBC 9.6).

Tabella 6 Risultati del colore (unità EBC) ottenuti con il CDR BeerLab® e con il metodo EBC 9.6 su 16 birre (n=2).

Codice	CDR BeerLab®				EBC 9.6				p-value
	Unità EBC	Unità EBC	Media	Deviazione standard	Unità EBC	Unità EBC	Media	Deviazione standard	
1	12	12	12	0	13	13	13	0	
2	31	30	29	1	35	37	36	1	
3	25	27	26	1	28	35	32	5	
4	11	12	12	1	14	13	13	1	
5	110	110	110	0	127	145	135	13	
6	15	16	16	1	15	16	16	1	
7	7	8	8	1	9	8	9	1	
8	110	130	120	14	131	186	158	39	< 0,05
9	20	21	21	1	21	22	22	1	
10	10	9	10	1	10	10	10	0	
11	40	43	42	2	49	49	49	0	
12	8	9	9	1	10	10	10	0	
13	10	11	11	1	12	13	13	1	
14	3	4	4	1	6	7	7	1	
15	10	11	11	1	11	11	11	0	
16	42	45	44	2	50	52	51	1	

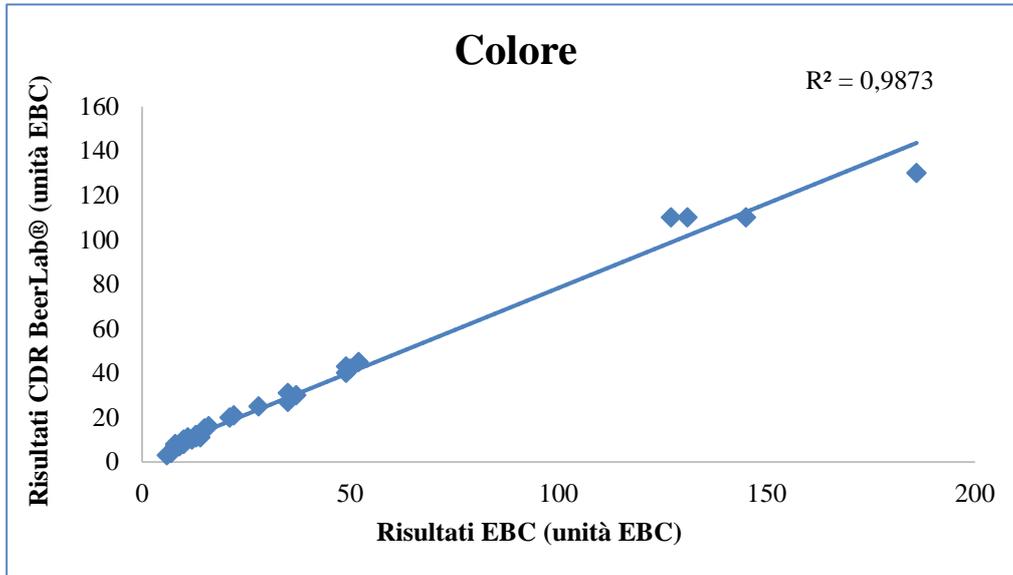


Figura 3 Correlazione dati colore.

Il colore viene determinato per via spettrofotometrica ed è un attributo fondamentale della birra dal momento che incide non solo sull'analisi visiva ma anche sulla percezione del sapore. Il confronto tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con la metodica ufficiale è stato eseguito su 16 campioni (birre industriali e artigianali chiare, ambrate, scure; Tabelle 1 e 6) in un intervallo di colore da 7 EBC a 160 EBC; per questo motivo è stata impiegata una numerosità di campioni più alta, rispetto alle altre metodiche, in modo da coprire un ampio intervallo di colori (Unità EBC). La valutazione della correlazione è stata eseguita come per i metodi precedentemente analizzati.

I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0.05$) e deviazioni standard basse, per la maggior parte dei campioni; le birre con colore più scuro hanno fornito con il CDR BeerLab® deviazioni standard più basse in riferimento alla metodica ufficiale, probabile conseguenza del mantenimento di linearità in un intervallo di assorbanza più ampio rispetto a quello di uno spettrofotometro (Tabella 6 e Figura 3).



FAN (Free Aminoacid Nitrogen)

È stata valutata la correlazione tra i dati forniti dal CDR BeerLab® in termini di azoto organico e quelli forniti dai metodi EBC 8.10 e 9.10 che forniscono i mg/L di azoto amminico libero (presente in amminoacidi, ammoniaca e nei gruppi azotati α -amino terminali dei peptidi e delle proteine) contenuto nei campioni di mosto/birra.

Tabella 7 Risultati dei FAN (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con il metodo EBC 8.10 su 6 mosti (n=2).

CDR BeerLab®					EBC 8.10				
Codice	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	p-value
P1	99	93	96	4	104	91	98	10	< 0,05
P2	189	187	188	1	168	173	171	4	
P3	270	275	273	4	245	252	249	5	
F1	40	41	41	1	34	38	36	3	
F2	88	89	89	1	74	74	74	0	
F3	118	128	123	7	118	111	115	5	

Tabella 8 Risultati dei FAN (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con il metodo EBC 9.10 su 6 birre (n=2).

CDR BeerLab®					EBC 9.10				
Codice	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	p-value
1	63	69	66	4	58	53	56	4	< 0,05
2	52	59	56	5	44	41	43	2	
3	36	29	33	5	25	29	27	3	
12	173	155	164	13	115	116	115	1	
13	43	40	42	2	34	32	33	1	
14	80	79	80	1	72	65	69	5	

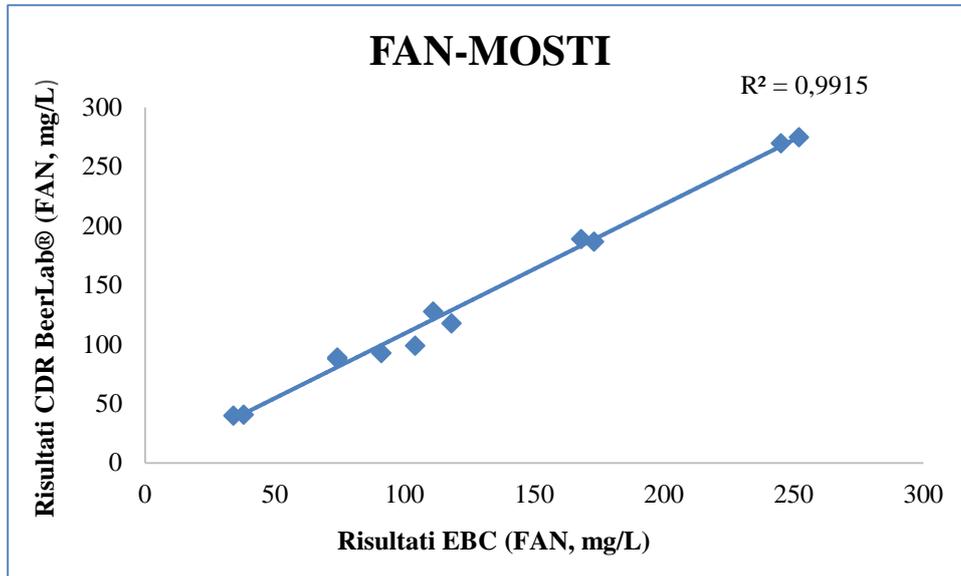


Figura 4 Correlazione dati FAN sui mosti.

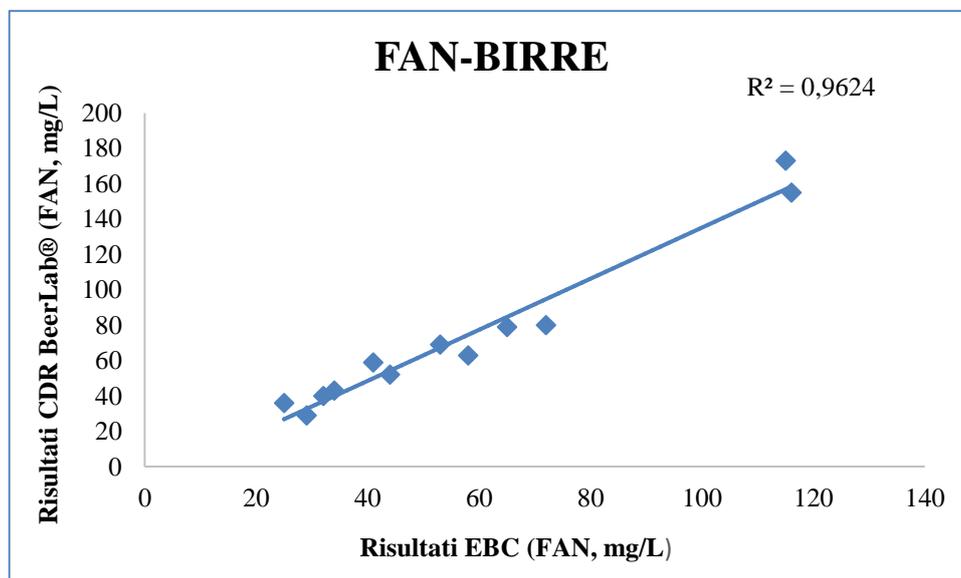


Figura 5 Correlazione dati FAN sulle birre.



Università degli Studi di Udine

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

L'azoto amminoacidico libero viene espresso come FAN (*Free Amino Nitrogen*). Per essere utilizzabili dal lievito, le proteine solubilizzate nel mosto, devono essere state previamente degradate ad amminoacidi durante l'ammostamento. I composti azotati sono fondamentali per definire il colore, il sapore, il corpo e la schiuma della birra. Le birre ottenute con mosti di solo malto hanno un contenuto d'azoto amminico compreso nell'intervallo tra 30 e 45 mg/L (Preedy, 2009).

Per i mosti colorati (superiori a 100 unità EBC) è stata applicata una correzione, nella metodica ufficiale, a causa del colore del campione.

Il confronto tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con la metodica ufficiale è stato eseguito su 6 campioni di mosto e 6 campioni di birra (Tabelle 1, 3, 7 e 8). La valutazione della correlazione è stata eseguita come per i metodi precedentemente analizzati. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0,05$) e deviazioni standard comprese nell'intervallo $1 \div 13$ per il CDR BeerLab®, $0 \div 10$ per il metodo enzimatico. (Tabelle 7 e 8, Figure 4 e 5).



Zuccheri fermentescibili

Per gli zuccheri fermentescibili è stata valutata la correlazione statistica tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con il metodo di analisi ufficiale (EBC 8.7).

Tabella 9 Risultati degli zuccheri fermentescibili (g/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con il metodo EBC 8.7 su 12 mosti (n=2).

Codice	CDR BeerLab®				EBC 8.7				p-value
	g/L	g/L	Media	Deviazione standard	g/L	g/L	Media	Deviazione standard	
M1	79,8	77,4	78,6	1,7	86,1	82,9	84,5	2,3	< 0,05
M2	72,9	71,1	72,0	1,3	86,3	90,5	88,4	3,0	
M3	75,8	76,8	76,3	0,7	58,2	61,5	59,9	2,3	
C1	93,4	94,4	93,9	0,7	96,3	97,5	96,9	0,8	
C2	72,5	65,1	68,8	5,2	76,9	80,2	78,6	2,3	
C3	68,2	67,8	68,0	0,3	70,7	72,8	71,8	1,5	
W1	72,3	72,3	72,3	0,0	76,1	72,3	74,2	2,7	
W2	80,8	77,1	79,0	2,6	86,8	85,6	86,2	0,8	
W3	67,0	65,8	66,4	0,8	62,8	60,3	61,6	1,8	
CH1	71,4	70,6	71,0	0,6	84,9	82,4	83,7	1,8	
CH2	69,8	71,4	70,6	1,1	81,1	79,5	80,3	1,1	
CH3	174,2	169,3	171,8	3,5	128,9	127,1	128,0	1,3	

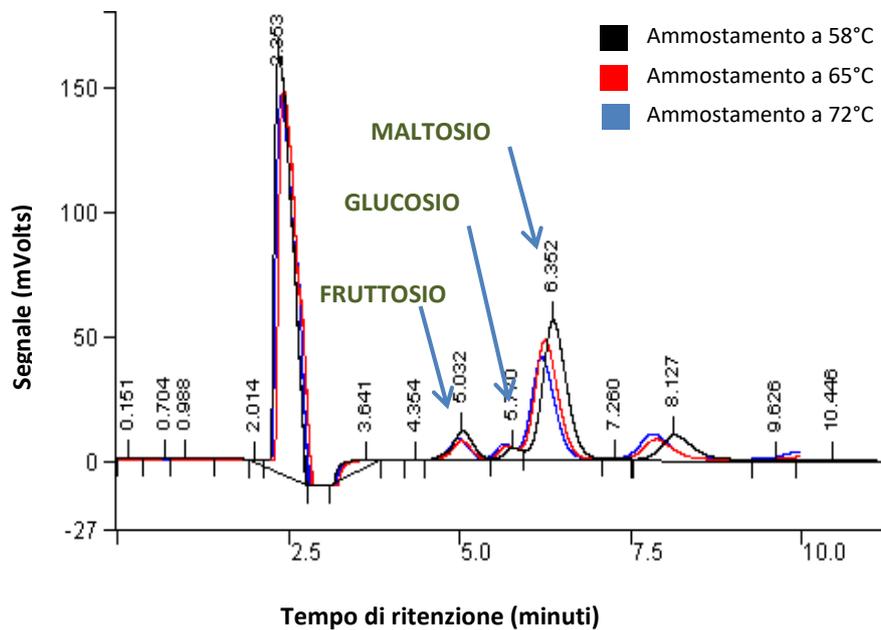


Figura 6 Analisi HPLC degli zuccheri fermentescibili (g di fruttosio, glucosio e maltosio per L di mosto) (metodo EBC 8.7) presenti nei mosti prodotti con il 10% p/p di malto Caramello e con tre diverse temperature di ammostamento.

Gli zuccheri fermentescibili sono fondamentali per il metabolismo del lievito poiché vengono convertiti in etanolo e anidride carbonica durante la fermentazione alcolica. Il lievito fermenta nell'ordine: glucosio, fruttosio e maltosio. Sono state preparate soluzioni dei tre standard con concentrazioni comprese nell'intervallo di 60÷150 g/L. I dati sono stati espressi come somma dei tre zuccheri fermentescibili più rappresentativi (maltosio, glucosio e fruttosio), il maltotriosio non è stato considerato dal momento che i ceppi di lievito con bassa capacità attenuante non sono in grado di fermentarlo (Briggs *et al.* 2004). I mosti prodotti con il ciclo di ammostamento a più alta temperatura (72°C) presentavano un contenuto di zuccheri fermentescibili inferiore rispetto agli altri mosti (con la sola eccezione del mosto CH3); le alte temperature favoriscono l'attività delle alfa-amilasi e, quindi, un attacco casuale dell'amido con la produzione principalmente di destrine (da 5 a 30 unità di glucosio) non fermentescibili (Cabras *and* Martelli, 2004) (Tabella 9 e Figura 6). Inoltre, dai dati raccolti è stato possibile osservare come il maltosio, a prescindere dalle



temperature di ammostamento e dalla formulazione, fosse lo zucchero fermentescibile maggiormente presente in tutti i mosti prodotti in laboratorio (es. Figura 6).

Il confronto tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con la metodica ufficiale è stato eseguito su 12 campioni di mosto che presentavano un contenuto di zuccheri fermentescibili compreso nell'intervallo di 59,9÷128,0 g/L (dati EBC 8.7, Tabella 9). La valutazione della correlazione è stata eseguita come per i metodi precedentemente analizzati. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0,05$) e deviazioni standard basse ($0,0 \div 3,5$ per il CDR BeerLab®, $0,8 \div 3,0$ per l'analisi HPLC) questo indica una buona precisione di entrambi (Tabella 9). L'analisi mediante HPLC, inoltre, non prevede la determinazione del maltotriosio, che invece viene effettuata dalla strumentazione CDR BeerLab®.



Amaro

Per tale parametro è stata determinata la correlazione statistica tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con il metodo di analisi ufficiale (EBC 9.8).

Tabella 10 Risultati del'amaro (IBU) ottenuti con il CDR BeerLab® e con la metodica EBC 9.8 su 12 birre (n=2).

Codice	CDR BeerLab®				EBC 9.8				p-value
	IBU	IBU	Media	Deviazione standard	IBU	IBU	Media	Deviazione standard	
1	40	41	41	1	39	38	39	1	< 0,05
2	61	63	62	1	58	58	58	0	
3	14	13	14	0	12	13	13	1	
4	11	12	12	0	10	12	11	1	
9	18	16	17	1	17	16	17	1	
13	36	36	36	0	34	36	35	1	
15	22	24	24	1	22	21	22	1	
24	17	18	18	1	13	15	14	1	
25	19	19	19	0	16	16	16	0	
26	33	34	34	1	34	34	34	0	
27	52	53	53	1	50	50	50	0	
28	28	30	29	1	25	26	26	1	

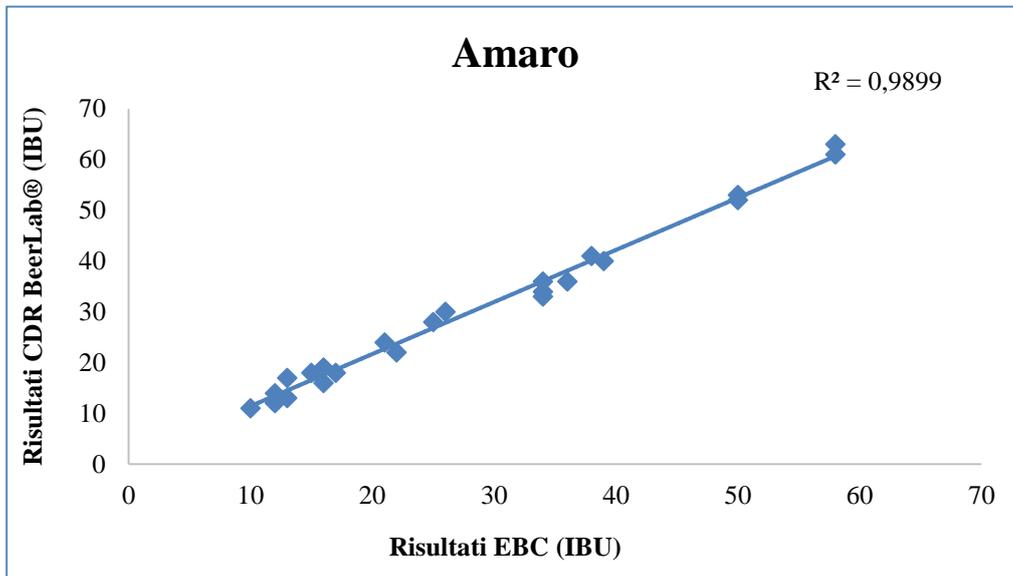


Figura 7 Correlazione dati Amaro.

Le sostanze amare derivano, come detto precedentemente, principalmente dagli α -acidi presenti nel luppolo. Con l'aggiunta del luppolo durante la fase di bollitura gli α -acidi sono solubilizzati e isomerizzati a iso- α -acidi più solubili e amaricanti. La maggior parte delle birre in commercio presenta valori di amaro compresi tra 10 e 50 IBU ma ci sono birre che arrivano a valori anche superiori a 100 IBU (Briggs *et al.*, 2004).

I dati raccolti (su 12 birre industriali/artigianali) con il CDR BeerLab® sono risultati altamente correlati a quelli ottenuti con la metodica ufficiale (Tabella 10 e Figura 7). Le deviazioni standard molto basse ($0 \div 1$ sia per il CDR BeerLab® che per la metodica ufficiale) indicano una buona precisione di entrambi.



Acido lattico

È stata valutata la correlazione tra i dati forniti dal CDR BeerLab® in termini di acido lattico totale (acido D-lattico ed acido L-lattico, mg/L) e quelli forniti dal kit enzimatico D-LACTIC ACID and L-LACTIC ACID della *Megazyme* (metodo EBC 9.34).

Tabella 11 Risultati dell'acido lattico (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con il kit *Megazyme* su 12 birre (n=2).

Codice	CDR BeerLab®				EBC 9.34				p-value
	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	
1	136	138	137	1	136	135	136	1	> 0,05
2	138	129	134	6	131	134	132	2	
12	137	128	133	6	131	133	132	1	
14	152	148	150	3	158	160	159	1	
15	75	69	72	4	80	86	83	4	
16	62	68	65	4	59	68	63	6	
18	150	149	150	1	140	146	145	3	
19	179	168	174	8	170	163	166	5	
20	72	78	75	4	71	74	73	2	
21	57	65	61	6	52	67	60	11	
22	83	94	89	8	92	101	97	7	
23	24	25	25	1	39	39	39	0	

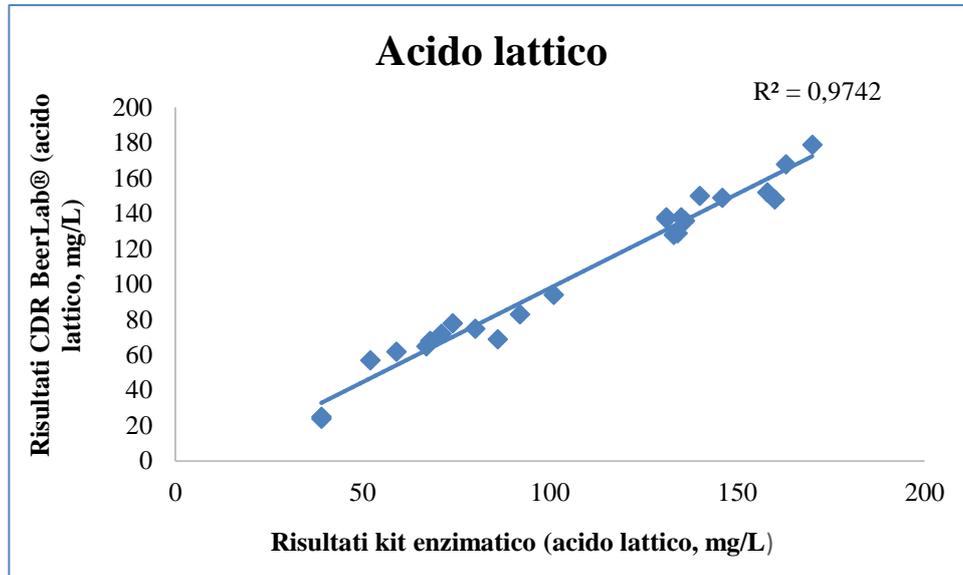


Figura 8 Correlazione dati acido lattico.

La quantità di acido lattico, così come la quantità di altri acidi organici all'interno della birra può indicare la presenza di una contaminazione di microrganismi alteranti.

Il confronto dei risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e con il kit enzimatico è stato eseguito su 12 (birre industriali e artigianali, chiare, rosse e scure; Tabella 1); i valori ottenuti con i due sistemi di misura erano all'interno dell'intervallo indicato dal CDR BeerLab®. I due metodi hanno fornito risultati statisticamente correlati ($p < 0.05$) con bassi valori di deviazione standard ($1\div 8$ per il CDR BeerLab®, $0\div 11$ per l'analisi enzimatica) che indicano una buona precisione di entrambi (Tabella 11 e Figura 8).



Università degli Studi di Udine

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

ANALISI ACQUE

*Valutazione della correlazione tra i risultati ottenuti
con il CDR BeerLab® e le metodiche ufficiali*



Valutazione correlazione tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e con le metodiche ufficiali sui seguenti parametri relativi al controllo qualità dell'acqua impiegata nella filiera di produzione della birra:

- Calcio;
- Magnesio;
- Potassio;
- Cloruri;
- Solfati;
- Bicarbonati

CAMPIONI D'ACQUA ANALIZZATI

Le acque minerali naturali vengono identificate a seconda del residuo fisso, cioè della quantità di sali minerali disciolti in un litro misurati dopo evaporazione a 180°C ed espressi in mg/L:

- minimamente mineralizzate, con residuo fisso inferiore a 50 mg/L;
- oligominerali, con residuo fisso tra 50 e 500 mg/L;
- mediominerali, con residuo fisso tra 500 e 1500 mg/L;
- ricche di sali minerali, con residuo fisso superiore a 1500 mg/L

Sono stati quindi analizzati diciannove diversi tipi di acque (commerciali e di rete) (Tabella 12); i campioni sono stati scelti di marche diverse e con diverso contenuto in sali minerali al fine di coprire l'intervallo di interesse del parametro testato con il CDR BeerLab® (limiti minimi e massimi di misura).



Tabella 12 Elenco delle acque analizzate.

Acqua	Codice campione
Donat	1
Lauretana	2
Goccia di Carnia	3
Fonte Essenziale	4
Ferrarelle	5
San Pellegrino	6
Acqua Panna	7
San Benedetto	8
Lete	9
Sangemini	10
Sant'Anna	11
Radenska	12
Vera Nestlè	13
Norda	14
Eva	15
Pordenone (di rete)	16
Maniago (di rete)	17
Majano (di rete)	18
Dipartimento DI4A (di rete)	19

ANALISI STATISTICA

Per verificare la presenza o meno di correlazione sono stati impiegati il coefficiente di correlazione di Pearson (r) e il p -value (program CoStat 6.204, CoHort Software, Monterey Ca, Usa). La correlazione è stata considerata statisticamente significativa con $p < 0,05$.



Calcio

È stata valutata la correlazione tra i dati forniti dal CDR BeerLab® e quelli forniti metódica spettrofotometrica (Metodo ufficiale) impiegando i reattivi del kit fornito dalla Merck (Spectroquant® Test calcio).

Tabella 13 Risultati del calcio (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con l'analisi spettrofotometrica su sei campioni d'acqua (n=3).

Codice	CDR BeerLab®					Metodo Ufficiale					p-value
	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazion e standard	
1	318,4	329,3	346,6	331,4	14,2	370,2	383,4	386,1	379,9	8,5	< 0,05
3	23,8	24,3	23,6	23,9	0,4	17,3	26,4	20,9	21,5	4,6	
8	55,8	54,8	52,4	54,3	1,7	41,1	48,0	61,9	50,3	10,6	
9	316,2	308,6	322,5	315,8	7,0	320,4	324,2	325,3	323,3	2,6	
17	59,9	58,3	59,1	59,1	0,8	61,8	76,4	69,9	69,4	7,3	
19	55,4	55,2	58,5	56,4	1,9	48,4	58,2	68,5	58,4	10,1	

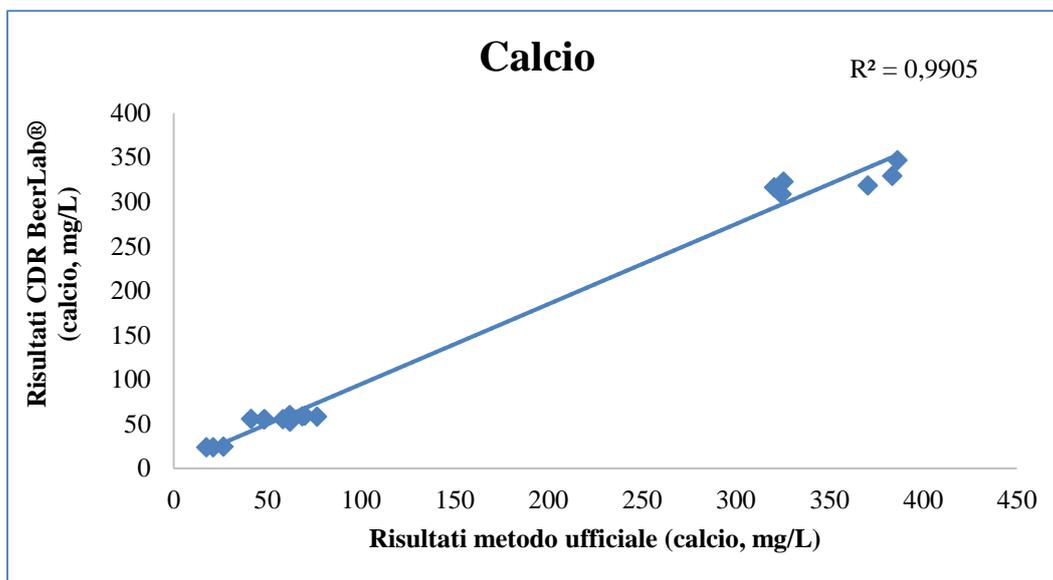


Figura 9 Correlazione dati calcio.



Università degli Studi di Udine

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

Il calcio, pur non avendo influenza diretta sul gusto della birra, esercita numerose importanti funzioni: stimola le attività proteasica e amilasica, contribuisce alla flocculazione del lievito, contribuisce alla diminuzione del pH.

Il confronto è stato eseguito su sei campioni (acque commerciali e di rete, Tabella 12) scelti in modo da avere un intervallo di valori da 20 a 300 mg di calcio per litro, considerando che il limite massimo di calcio per l'acqua impiegata nella filiera di produzione della birra dovrebbe essere inferiore a 90 mg/L (Eumann e Schildbach, 2012). I due metodi hanno fornito risultati correlati ($p < 0,05$) e basse deviazioni standard (Tabella 13 e Figura 9).



Magnesio

Sono stati analizzati sei campioni (vedi Tabella 12) di acque commerciali e di rete (con una concentrazione di magnesio compresa nell'intervallo 4 ÷ 30 mg/L) utilizzando il CDR BeerLab® e, come metodo ufficiale, l'analisi spettrofotometrica (kit Spectroquant® Test magnesio fornito dalla Merck).

Tabella 14 Risultati del magnesio (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con l'analisi spettrofotometrica su sei campioni d'acqua (n=3).

Codice	CDR BeerLab®					Metodo Ufficiale					
	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione e standard	p-value
3	4,4	4,2	4,3	4,3	0,1	3,9	4,6	4,0	4,2	0,4	< 0,05
5	24,0	28,2	26,7	26,3	2,1	22,6	25,1	24,2	24,0	1,3	
10	16,9	17,9	17,2	17,3	0,5	14,4	15,8	15,9	15,4	0,8	
13	13,9	12,9	14,1	13,6	0,6	12,2	12,5	13,2	12,6	0,5	
15	4,5	4,1	3,3	4,0	0,6	4,1	5,1	4,1	4,4	0,6	
16	22,7	22,2	22,0	22,2	0,4	19,8	20,2	20,5	20,2	0,4	

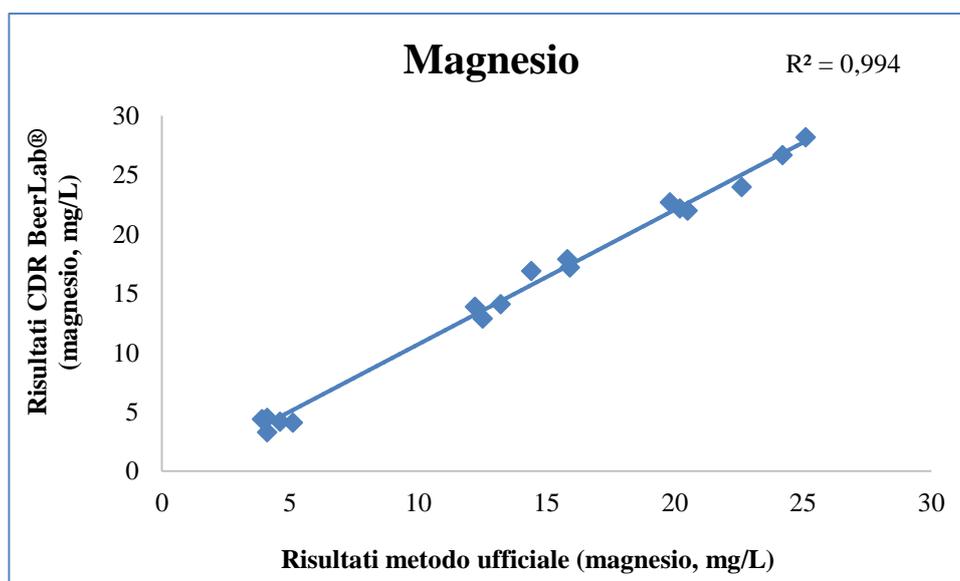


Figura 10 Correlazione dati magnesio.



Università degli Studi di Udine

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

Il magnesio è un cofattore enzimatico essenziale ed un componente fondamentale per regolare l'attività metabolica delle cellule di lievito. Tuttavia, se nell'acqua impiegata per la filiera di produzione, è presente una concentrazione di magnesio superiore a 10 mg/L potrebbero esserci problemi legati all'amaro e all'acidità nel prodotto finito (Eumann e Schildbach, 2012; Tolonen *et al.*, 2015).

La verifica della presenza o meno di correlazione è stata eseguita come precedentemente indicato per il calcio. La correlazione è stata considerata statisticamente significativa con un $p < 0,05$. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0,05$) e deviazioni standard molto basse ($0,1 \div 0,6$ per il CDR BeerLab® e $0,4 \div 1,3$ per la metodica ufficiale) (Tabella 14 e Figura 10).



Potassio

Anche per il potassio è stata valutata la correlazione statistica tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con il metodo ufficiale (analisi spettrofotometrica, kit Spectroquant® Test potassio fornito dalla Merck).

Tabella 15 Risultati del potassio (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con l'analisi spettrofotometrica su sei campioni d'acqua (n=3).

Codice	CDR BeerLab®					Metodo Ufficiale					p-value
	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	
1	<50	<50	<50	/	/	<50	<50	<50	/	/	
2	<50	<50	<50	/	/	<50	<50	<50	/	/	
3	<50	<50	<50	/	/	<50	<50	<50	/	/	
5	58,0	53,0	57,0	56,0	2,6	44,3	47,4	45,3	45,7	1,6	/
17	<50	<50	<50	/	/	<50	<50	<50	/	/	
18	<50	<50	<50	/	/	<50	<50	<50	/	/	

Lo ione potassio se presente nel prodotto finito in concentrazioni superiori a 1.000 mg/L, caratterizza negativamente il gusto della birra, che diventa sensibilmente salato (Fernandes e Rangel, 1997).

Il confronto è stato eseguito su 6 campioni (acque commerciali e di rete Tabella 12). Nessuno dei campioni d'acqua analizzati, con la sola eccezione del campione 5 (Tabella 12), rientrava nell'intervallo di misura dello strumento; il contenuto (mg/L) di potassio era sempre inferiore a 50 mg/L (limite di rivelabilità del CDR BeerLab®) (Tabella 15). Sono stati, quindi, pesati 10 mg, 20 mg, 30 mg, 60 mg e 80 mg di cloruro di potassio; preventivamente essiccati per un'ora in stufa a 110°C e, successivamente, portati a temperatura ambiente mediante essiccatore. Le diverse quantità di cloruro di potassio sono state trasferite in cinque matracci con una capacità di 100 mL e disciolti in acqua deionizzata. I cinque matracci contenevano rispettivamente 100 mg (Sol. 1), 200 mg (Sol. 2), 300 mg (Sol. 3), 600 mg (Sol. 4) e 800 mg (Sol. 5) di cloruro di potassio per litro d'acqua. Le cinque soluzioni sono state sottoposte alle determinazioni dello ione potassio con la strumentazione CDR BeerLab® e con la metodica ufficiale. I dati sono stati riportati nella Tabella 16, insieme ai risultati ottenuti sul campione d'acqua commerciale Ferrarelle (codice 5). È comunque possibile effettuare una customizzazione del CDR BeerLab® al fine di ottimizzare l'intervallo di lettura in funzione delle esigenze.



Tabella 16 Risultati del potassio (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con l'analisi spettrofotometrica su cinque soluzioni di cloruro di potassio e su un campione d'acqua commerciale (n=3).

CDR BeerLab®						Metodo Ufficiale					
Codice	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	p-value
Sol. 1	56,4	58,9	53,2	56,2	2,9	53,1	48,4	55,8	52,4	3,7	< 0,05
Sol. 2	98,7	94,2	91,0	94,6	3,9	104,8	102,9	106,9	104,9	2,0	
Sol. 3	141,4	145,8	149,4	145,5	4,0	151,4	160,8	159,6	157,3	5,1	
Sol. 4	318,4	311,1	317,3	315,6	3,9	312,7	319,6	311,4	314,6	4,4	
Sol. 5	421,1	425,7	419,3	422,0	3,3	422,7	416,8	418,9	419,5	3,0	
5	58,0	53,0	57,0	56,0	2,6	44,3	47,4	45,3	45,7	1,6	

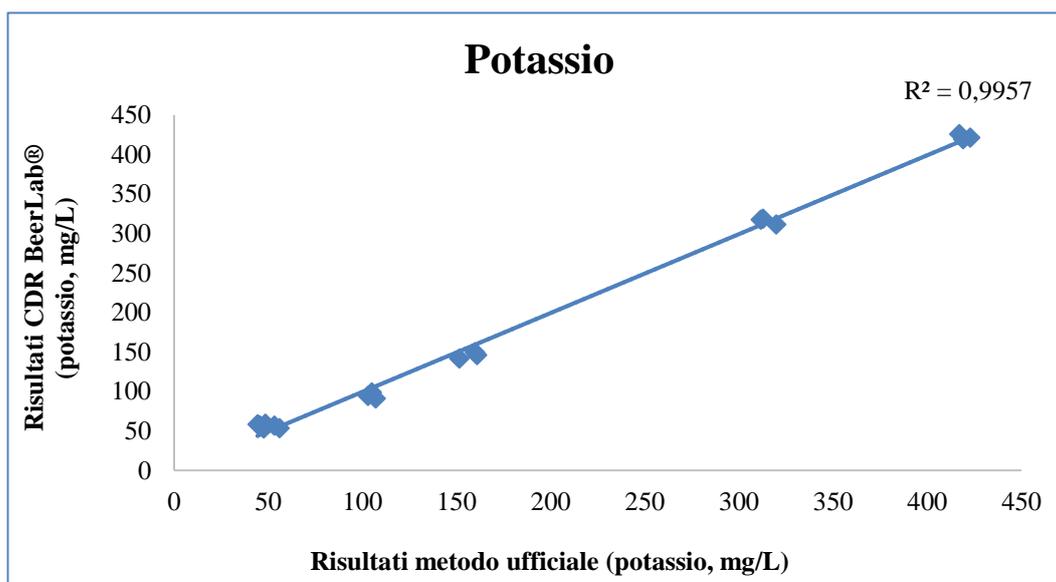


Figura 11 Correlazione dati potassio.

La valutazione della correlazione è stata eseguita come per i parametri precedentemente analizzati. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0,05$) e basse deviazioni standard (Tabella 16 e Figura 11).



Cloruri

Come nel caso dello ione potassio anche per i cloruri la strumentazione del CDR BeerLab® ha fornito per tutti i campioni d'acqua testati, con la sola eccezione del campione 1 (Tabella 12), valori inferiori al limite di rivelabilità dello strumento (100 mg/L) (i risultati non sono stati riportati). Quindi, cinque soluzioni con crescenti concentrazioni di cloruro di potassio, preparate come descritto precedentemente (pag. 28), sono state sottoposte alle determinazioni dei cloruri con la strumentazione CDR BeerLab® e con la metodica ufficiale (titolazione argentometrica, Belli *et al.*, 2003). I dati sono stati riportati nella Tabella 17, insieme ai risultati ottenuti sul campione d'acqua commerciale Donat (codice 1, Tabella 12).

Tabella 17 Risultati dei cloruri (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con la titolazione argentometrica su cinque soluzioni di cloruro di potassio e su un campione d'acqua commerciale (n=3).

Codice	CDR BeerLab®					Metodo Ufficiale					
	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazion e standard	p-value
Sol. 1	61,3	57,5	56,1	58,3	2,7	45,8	44,3	52,6	47,6	4,4	< 0,05
Sol. 2	101,3	111,4	99,7	104,1	6,3	92,4	98,5	94,3	95,1	3,1	
Sol. 3	119,4	127,2	129,5	125,4	5,3	137,8	148,5	141,7	142,7	5,4	
Sol. 4	251,2	250,4	253,2	251,6	1,4	282,2	289,2	284,4	285,3	3,6	
Sol. 5	325,2	312,3	308,7	315,4	8,7	375,3	384,2	381,6	380,4	4,6	
1	76,5	69,7	82,1	76,1	6,2	71,4	75,3	78,2	75,0	3,4	

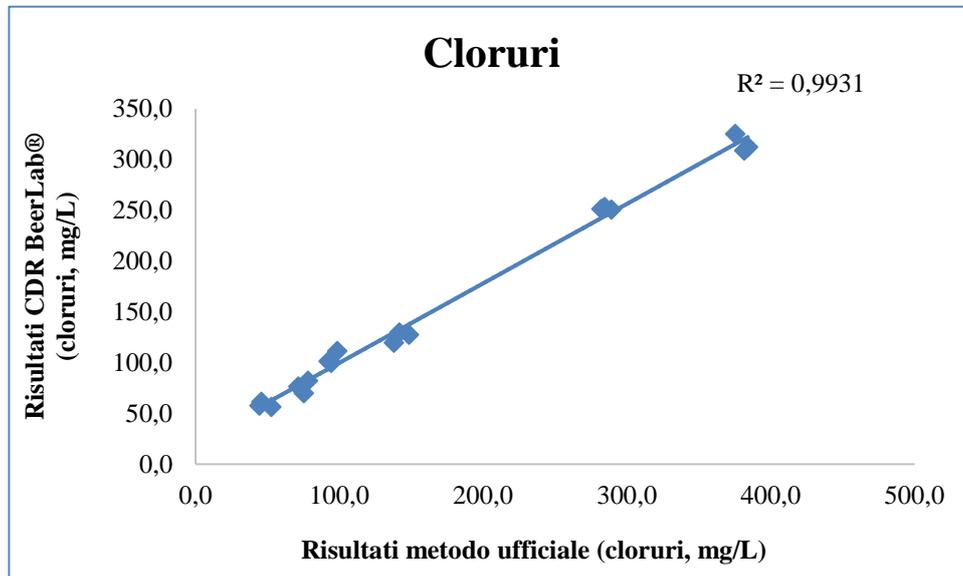


Figura 12 Correlazione dati cloruri.

Il livello di cloruri nell'acqua impiegata nella filiera di produzione della birra dovrebbe essere inferiore a 50 mg/L; acque eccessivamente clorate, ad alte temperature, possono portare alla corrosione dell'acciaio inossidabile (Eumann e Schildbach, 2012).

Le analisi effettuate con la strumentazione CDR BeerLab® sui campioni d'acqua hanno fornito dei risultati molto vicini ai valori attesi (Tabella 17). Inoltre, la valutazione della correlazione è stata eseguita come per i metodi precedentemente analizzati. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0,05$) e deviazioni standard comprese nell'intervallo 1,4÷8,7 per il CDR BeerLab®, 3,1÷5,4 per il metodo argentometrico (Tabella 17 e Figura 12).



Solfati

Anche per i solfati è stata valutata la correlazione statistica tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con il metodo ufficiale (analisi torbidimetrica, Belli *et al.*, 2003).

Per la metodica torbidimetrica dal valore dell'assorbanza del campione, corretto del valore del bianco, è stata calcolata la concentrazione di solfati (mg/L) utilizzando una retta di calibrazione (Figura 13) preparata come indicato dalla medesima metodica (Belli *et al.*, 2003).

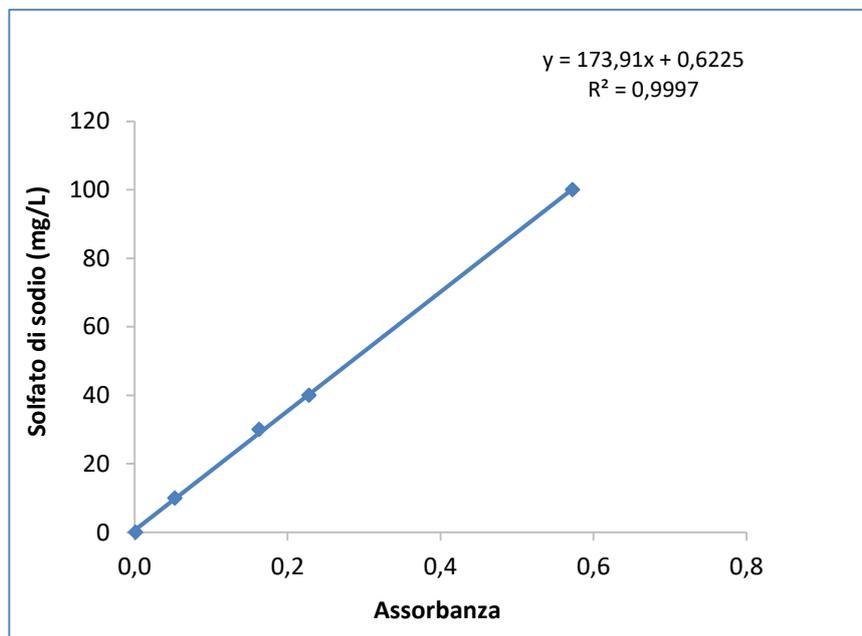


Figura 13 Retta di calibrazione per l'analisi torbidimetrica dei solfati.



Tabella 18 Risultati dei solfati (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con l'analisi torbidimetrica su sei campioni d'acqua (n=3).

Codice	CDR BeerLab®					Metodo Ufficiale					
	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	p-value
4	1.600,4	1.602,2	1.601,3	1.601,3	0,9	1.620,5	1.623,4	1.625,6	1.623,2	2,6	< 0,05
6	415,5	412,8	409,6	412,6	3,0	449,0	452,2	450,1	450,4	1,6	
7	13,5	14,0	13,5	13,7	0,3	20,6	21,2	20,9	20,9	0,3	
10	60,0	54,0	57,1	57,0	3,0	43,3	42,8	42,6	42,9	0,4	
12	115,0	108,1	121,0	114,7	6,5	74,3	74,3	74,3	74,3	0,0	
18	65,1	62,0	63,1	63,4	1,6	62,6	61,7	62,0	62,1	0,4	

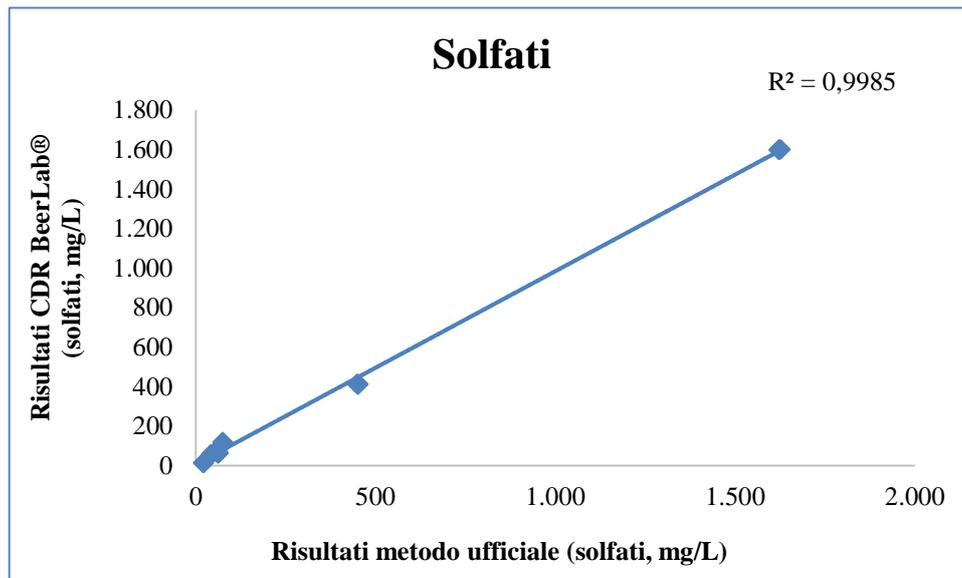


Figura 14 Correlazione dati solfati.



La durezza permanente (durezza non carbonatica) è data principalmente dai solfati e cloruri di calcio e magnesio che non precipitano in seguito a riscaldamento. La durezza è un parametro molto importante poiché nel tempo influenza negativamente non solo il processo produttivo ma anche il funzionamento dei sistemi di riscaldamento (formazione di calcare nelle caldaie a scapito del rendimento termico delle stesse). Nella birra finita i solfati, se presenti in concentrazioni superiori a 100 mg/L, conferiscono astringenza e un gusto amaro particolarmente secco (Cabras e Martelli, 2004; Eumann e Schildbach, 2012). Il confronto è stato eseguito su 6 campioni (acque commerciali e di rete Tabella 12).

Per le acque 4 e 6, che presentavano una concentrazione di solfati molto alta, è stato necessario diluire i campioni 1:10 con acqua deionizzata.

La verifica della presenza o meno di correlazione è stata eseguita come precedentemente indicato per gli altri parametri testati. La correlazione è stata considerata statisticamente significativa con $p < 0,05$. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0,05$) e deviazioni standard molto basse (Tabella 18 e Figura 14).



Bicarbonati

Per i bicarbonati è stata valutata la correlazione statistica tra i risultati ottenuti con il CDR BeerLab® e quelli con il metodo ufficiale (titolazione complessometrica, Belli *et al.*, 2003) su sei campioni d'acqua (Tabella 12).

Tabella 19 Risultati dei bicarbonati (mg/L) ottenuti con il CDR BeerLab® e con l'analisi complessometrica su sei campioni d'acqua (n=3).

CDR BeerLab®						Metodo Ufficiale					p-value
Codice	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazione standard	mg/L	mg/L	mg/L	Media	Deviazion e standard	
11	37,0	33,0	43,0	37,7	5,0	32,5	22,0	27,3	27,3	5,3	< 0,05
13	139,0	137,0	136,0	137,3	1,5	135,1	134,1	136,2	135,1	1,1	
14	130,0	144,0	144,0	139,3	8,1	136,1	138,0	136,5	136,9	1,0	
16	206,0	213,0	209,0	209,3	3,5	205,2	218,2	213,1	212,2	6,6	
17	143,0	142,0	144,0	143,0	1,0	135,1	134,7	135,4	135,1	0,4	
18	199,2	210,0	209,0	206,1	6,0	197,2	220,7	218,7	212,2	13,0	

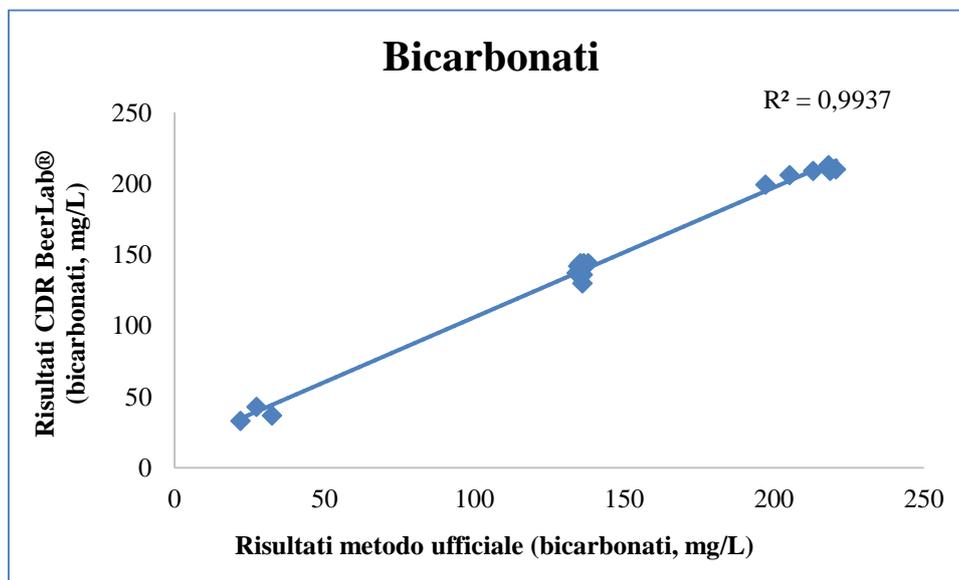


Figura 15 Correlazione dati bicarbonati.



Università degli Studi di Udine

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

Le acque dure, cioè ricche in carbonati e bicarbonati (superiori a 150 mg/L), hanno un effetto alcalinizzante, tendono cioè ad innalzare il valore del pH del mosto che quindi è più alto rispetto al valore ottimale. Ciò comporta delle conseguenze negative perché a pH più alti la degradazione dell'amido e delle proteine è rallentata, la filtrazione del mosto è meno efficiente, la resa in estratto è più bassa e la minore concentrazione di FAN (*Free Amino Nitrogen*) e azoto solubile possono condizionare le successive fasi di fermentazione. Inoltre acque più dure, proprio per il loro effetto alcalinizzante, tendono anche a favorire l'estrazione dei polifenoli (tannini) dalle glumelle del malto con effetti negativi sul gusto della birra (Cabras e Martelli, 2004).

La verifica della presenza o meno di correlazione è stata eseguita come precedentemente indicato per gli altri parametri testati. La correlazione è stata considerata statisticamente significativa con $p < 0,05$. I due metodi hanno fornito risultati altamente correlati ($p < 0,05$) e deviazioni standard basse (Tabella 19 e Figura 15).



Considerazioni finali

Tutte le analisi testate (grado alcolico, pH, colore, FAN, zuccheri fermentescibili, amaro, acido lattico, calcio, magnesio, potassio, cloruri, solfati e bicarbonati) con la nuova strumentazione CDR BeerLab® hanno fornito risultati statisticamente correlati con quelli ottenuti con le metodiche ufficiali.

Per ognuno degli indici testati, nel caso della strumentazione CDR BeerLab®, l'unica preparazione del campione necessaria è il degassamento delle birre/acque e non è necessaria alcuna calibrazione. Inoltre, un altro aspetto di questo strumento che porta ad una obbiettiva facilitazione per l'operatore, sono le dettagliate istruzioni per ogni metodica fornite dal menu *touch screen*; durante lo svolgimento delle analisi l'operatore può fare riferimento ai passaggi di interesse cliccando sul punto interrogativo in alto a destra dello schermo. Cuvette, *vials*, puntali per pipette, reagenti, ecc. necessari per eseguire i test sono tutti forniti in sacchetti sigillati da parte del produttore.

Un potenziale miglioramento potrebbe essere l'aumento della flessibilità nell'impiego dello strumento; l'operatore nel navigare all'interno di un metodo d'analisi, ad oggi, se commette un errore durante il test – come ad esempio la lettura della cuvetta sbagliata - non può ripetere l'operazione di lettura, ma deve replicare l'intero test dal principio, con una notevole perdita di tempo. Infine, nel caso delle determinazioni degli ioni potassio e cloruri sarebbe necessaria una riduzione dei limiti di rivelabilità; i campioni d'acqua hanno fornito per entrambi gli ioni (nella maggior parte dei casi) un contenuto inferiore al minimo di lettura dello strumento.

Con la strumentazione CDR BeerLab® vi è un consumo notevolmente ridotto sia di campione che di reagenti rispetto alle corrispondenti metodiche ufficiali; ad esempio l'analisi dell'amaro nei campioni di birra o dei solfati nelle acque richiedono anche per il CDR BeerLab® l'impiego di solventi, ma i volumi sono significativamente inferiori a quelli richiesti dalle metodiche ufficiali (rispettivamente metodo EBC 9.8 e analisi torbidimetrica), riducendo in tal modo i rischi per la salute ed i costi.

Nel proseguo della valutazione di CDR BeerLab® verranno testati nuovi parametri analitici recentemente sviluppati nonché ulteriori funzionalità software dello strumento.



Bibliografia

Belli M., Centioli D., De Zorzi P., Sansone U., (Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici - APAT), Capri S., Pagnotta R., Pettine M., (Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR-IRSA), Metodi analitici per le acque, Manuali e linee guida, *I.G.E.R. srl* (Roma), 2003, pp. 137-140; 553-556; 602-604.

Briggs D.E., Boulton C.A., Brooks P.A., Stevens R., *Brewing science and practice*, CRC Press (Abington), 2004, pp. 243-260; 417-450.

Cabras P., Martelli A. Birra, Buiatti S., *Chimica degli alimenti*, Piccin (Padova), 2004, pp. 558-597.

Eumann M., Schildbach S., 125th Anniversary Review: Water sources and treatment in brewing. *J. Inst. Brew.*, 2012, 118, pp. 12-21.

European Brewery Convention. *Analytica-EBC*, Fachverlag Hans Carl (Nürnberg), 1998-2007.

Preedy V., *Beer in health and disease prevention*, Accademic Press (London), 2009, 17-43.

Fernandes S.M.V., Rangel A.O.S.S., Flow injection determination of sodium, potassium, calcium, and magnesium in beer by flame emission and atomic absorption spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, pp. 1269-1272.

Tolonen E.T., Rämö J., Lassi U., The effect of magnesium on partial sulphate removal from mine water as gypsum. *J. Environ. Manage*, 2015, 159, pp. 143-146.

Zancker G., Benes R., Analytical device for measuring the ethanol in beer

based on NIR absorption. *Brauwelt Int.*, 2004, 22, pp. 110-113.

Sitografia:

www.analytical-test-kits.com [ultimo accesso 8 marzo 2017];

www.foodlab.it [Ultimo accesso 8 marzo 2017]

www.service-test-kits.com [ultimo accesso 8 marzo 2017]