

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

Technische Universität München

# **Kolloidale Trübungen in untergärigen Bieren – Entstehung, Vorhersage und Stabilisierungsmaßnahmen**

**Marc Kusche**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktor-Ingenieurs**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Roland Meyer-Pittroff

Prüfer: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. agr. habil.

Dr. h.c. (Zonguldak Univ./Türkei) Harun Parlar

3. Prof. Dr.-Ing. Tomas Kurz, Technische Univ. Berlin

Die Dissertation wurde am 14.02.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.05.2005 angenommen

---

„Es ist etwas Faszinierendes mit der Wissenschaft.

Man erhält eine Riesenauswahl von Vermutungen

bei niedrigster Investition von Tatsachen“

Mark Twain

---

## Danke!

Jedem, der mich die letzten Jahre begleitet hat!

Prof. Geiger, mein Doktorvater. Danke, dass ich an Ihrem Lehrstuhl promovieren durfte und Sie immer ein guter Diskussionspartner waren.

Den Herrn Professoren Meyer-Pittroff, Parlar und Kurz, dass sie als Vorsitzender und Prüfer bereitstanden.

Meinen „Doktorandenkollegen“ Christoph Tenge, Andreas Brandl und Urs Wellhoener, mit denen ich die Jahre hinweg viel Spaß hatte.

Andreas Papp, nicht nur mein Vorgänger sondern viel mehr ein guter Freund.

Natürlich meinem Nachfolger Moritz Pöschl, dem ich auf diesem Weg viel Glück wünsche.

Susan Illing, die beste Mitarbeiterin die man sie sich nur wünschen kann.

Jacqueline, sie durfte mich in den letzten Zügen der Arbeit etwas mehr aushalten.

Christl, Hildegard, Ana, Konrad und allen Lehrstuhlmitarbeiter.

„Meinen“ Studenten: Andreas Quendt, Andreas Zacher, Anja Hippe, Björn Hühnlein, Christian Feldmann, Elmar Spieleder, Joachim Kilian, Marconi Januzzelli, José Cardona, Ricardo Espinosa, Sebastian Delgado, Sven Schönenberg und Tobias Thiel

Meinen Freunden, dem VBW, FC Duff und besonders Steffi und Jens, Carolin und Ferdi.

Großen Dank an Eva! Sie hat mich die längste Zeit durch Studium und Dissertation aushalten müssen. Ohne sie hätte die Arbeit sicher länger gedauert. An dieser Stelle möchte ich auch Evas Eltern danken.

Meiner Familie, meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester!! Für die nicht nur finanzielle Unterstützung während der letzten Jahre.

Danke an alle, die ich vergessen habe sollte.

Euer

Marc

---

## Abkürzungsverzeichnis

AW	Ausschlagwürze
BSA	Rinderserumalbumin
DMAZA	Dimethylaminozimtaldehyd
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreit
EBC	European Brewery Convention
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
F	Filtrat
GG%	Gewichts/Gewichtsprozente
HGB	High Gravity Brewing
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hrsg.	Herausgeber
IPG	Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten
kDa	Kilo Dalton
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
SDS	Natriumdodecylsulfat
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichts/Volumenprozent
ZKG	Zylindrokönischer Gärtank

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	SUMMARY .....	5
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
2.1	PROBLEMSTELLUNG .....	8
2.2	KOLLOIDALE TRÜBUNGEN .....	9
2.2.1	<i>Kolloide</i> .....	9
2.2.2	<i>Lichtstreuung</i> .....	9
2.3	TRÜBUNGSRELEVANTE POLYPHENOLE.....	10
2.3.1	<i>Bedeutung der Polyphenole</i> .....	10
2.3.2	<i>Polyphenole im Brauprozess</i> .....	12
2.3.3	<i>Polyphenole und kolloidale Stabilität</i> .....	13
2.4	TRÜBUNGSRELEVANTE PROTEINE .....	14
2.4.1	<i>Klassifizierung nach Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt</i> .....	14
2.4.2	<i>Prolinreiche Proteine</i> .....	15
2.5	THEORIEN DER TRÜBUNGSBILDUNG IN BIER .....	16
2.6	ZIELSETZUNG .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
3.1	PROBENMATERIAL.....	23
3.2	POLYPHENOLANALYTIK MITTELS HPLC .....	23
3.2.1	<i>Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion</i> .....	23
3.2.1.1	<i>Modifizierte Methode nach Papp</i> .....	23
3.2.1.2	<i>Modifizierte Methode nach Galensa</i> .....	24
3.2.2	<i>HPLC-Analytik</i> .....	25
3.3	POLYPHENOLANALYTIK .....	27
3.4	PROTEINANALYTIK.....	27
3.4.1	<i>Aminosäureanalytik</i> .....	27
3.4.2	<i>2-D Elektrophorese</i> .....	28
3.4.3	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i> .....	29
3.5	BIERANALYSEN .....	29
3.6	STATISTISCHE KENNGRÖßEN .....	29
3.7	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	30
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>34</b>
4.1	TECHNOLOGISCHE EINFLUSSMÖGLICHKEITEN AUF TRÜBUNGSRELEVANTE POLYPHENOLE .....	34
4.1.1	<i>Sudhaustechnologie und Würzebehandlung</i> .....	34
4.1.1.1	<i>Maischtechnologie</i> .....	34

---

4.1.1.2	Würzebelüftung .....	40
4.1.1.3	Brauen mit hohen Stammwürzen.....	44
4.1.2	<i>Lagertemperatur</i> .....	48
4.1.3	<i>Stabilisierung</i> .....	52
4.1.3.1	Vergleich Tankstabilisierung und Durchlaufkontaktverfahren.....	52
4.1.3.2	Kontrolle des Stabilisierungseffekts .....	56
4.2	PROTEINE UND KOLLOIDALE STABILITÄT .....	59
4.2.1	<i>Aminosäurezusammensetzung der Bierproteine</i> .....	59
4.2.2	<i>2-D Elektrophorese</i> .....	64
4.3	VORHERSAGEMÖGLICHKEIT DER KOLLOIDALEN STABILITÄT .....	67
4.4	REAKTIONSKINETIK DER TRÜBUNGSBILDUNG.....	70
4.4.1	<i>Flavan-3-ole und Trübungsbildung</i> .....	70
4.4.2	<i>Mechanismen der Trübungsbildung</i> .....	78
4.4.3	<i>Reaktionsmechanismen trübungsrelevanter Polyphenole</i> .....	85
4.4.4	<i>Reaktionsbeschleunigende Substanzen</i> .....	91
4.4.4.1	Aktiver Sauerstoff.....	91
4.4.4.2	Kupfer- und Eisenionen.....	95
5	LITERATURVERZEICHNIS .....	97
6	ANHANG .....	108

## 1 Zusammenfassung

Den Mittelpunkt der Arbeit bildeten die im Bier nachgewiesenen, trübungsrelevanten Polyphenole, die Gruppe der Flavan-3-ole. Dabei lagen die Arbeitsziele sowohl in der Veränderung des Polyphenolspektrums, um somit die kolloidale Stabilität untergäriger Biere, basierend auf technologischen Variationen des Brauprozesses, zu verbessern als auch in der Analyse der Reduktion dieser Stoffgruppe während der Bieralterung. Neben der phenolischen Seite wurden auch die an der Trübungsentstehung beteiligten Proteine betrachtet. Die Ergebnisse der Polyphenol- und der Proteinanalytik wurden in Hypothesen zur Trübungsbildung implementiert, die dadurch entstandenen Modelle auf ihre Richtigkeit untersucht und weitere Einflüsse wie Sauerstoff und verschiedene Metallionen berücksichtigt.

Zur Untersuchung der Einflussmöglichkeiten auf das Polyphenolspektrum wurde zunächst der Flavan-3-ol-Nachweis verbessert. Die weiterentwickelte Polyphenolanalytik resultierte in höheren Wiederfindungsraten und besseren Auftrennungen der Substanzen in der HPLC. Daneben konnten Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> mit Hilfe von Referenzsubstanzen quantifiziert werden. Als ein weiteres Flavan-3-ol wurde Procyanidin B<sub>2</sub> in Würzen und Unfiltrat identifiziert. In filtrierten und stabilisierten Proben konnte dieses Flavan-3-ol bisher allerdings nicht nachgewiesen werden.

Technologisch wurden Möglichkeiten gesucht, die Mengen an Flavan-3-ol gezielt zu verändern. Erstmals wurde die Lösung dieser Stoffgruppe bzw. deren Einzelsubstanzen in Abhängigkeit von Maischtemperatur und -dauer beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Temperaturempfindlichkeit von Catechin über Procyanidin B<sub>3</sub> zum Prodelphinidin B<sub>3</sub> anstieg. Hierfür waren der Grad der Polymerisierung und die Anzahl der Hydroxygruppen verantwortlich. Die Lösung des Monomers und Procyanidins B<sub>3</sub> war unabhängig vom Maischprogramm. Einzig die Werte des Prodelphinidins B<sub>3</sub> zeigten geringe Differenzen. Ein direkter Zusammenhang zwischen Maischprogramm und trübungsrelevanten Polyphenolen konnte nicht beobachtet werden. Epicatechin wurde über den Maischprozess nicht nachgewiesen und bildete sich während der Kochung durch Depolymerisierung höherer Polyphenole.

Des Weiteren wurde die Würzebelüftung als eine Möglichkeit zur oxidativen Schädigung des Bieres während des Produktionsprozesses untersucht. Es zeigte sich, dass durch konventionelle Belüftung und einer alternativen Hefebehandlung mit hohen Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Biere beeinträchtigt wurden. Dieser Effekt stellte sich durch eine verstärkte Abnahme der untersuchten Flavan-3-ole dar. Ob diese Oxidation eine Bildung höherer kondensierter und damit reaktiverer Polyphenole zur Folge hatte, konnte anhand der derzeitigen Analytik nicht geklärt werden. Der Einfluss dieses Verfahrensschritts auf die kolloidale Stabilität wurde gegenüber Filtration und Stabilisierung als gering eingestuft.

Positive Effekte auf die kolloidale Stabilität durch das Brauen mit hohen Stammwürzen wurde in verschiedenen Arbeiten zuvor beobachtet (NARZISS 1995, RINGHOLT 2000, WACKERBAUER 1996). Wie sich dieses Verfahren explizit auf trübungsrelevante Bierinhaltsstoffe auswirkt, wurde

bisher jedoch nicht untersucht. Um eine eventuelle Veränderung der Flavan-3-ol-Zusammensetzung zu erkennen, wurden drei unterschiedliche Stammwürzekonzentrationen während des Brauprozesses analytisch begleitet. Die Verdünnung erfolgte zum einen nach Kochen der Würze, zum andern nach Filtration der Biere. Bei Betrachtung der Flavan-3-ole zeigte sich, dass Monomere und Dimere ein unterschiedliches Verhalten aufwiesen. Während Catechin und Epicatechin durch diese Technologie kaum beeinflusst wurden, reduzierten sich die Mengen an Prodelphinidin B<sub>3</sub> und Procyanidin B<sub>3</sub> signifikant. Diese Substanzen reagierten auf Grund ihres Polymerisationsgrades und der größeren Anzahl an OH-Gruppen bei höheren Stammwürzen stärker als einfache Flavan-3-ole.

Neben der Stammwürzekonzentration galt der Qualität des Ausmischwassers, insbesondere bei einer Verdünnung nach der Filtration, eine erhöhte Aufmerksamkeit. Bei einer Sauerstoffkontamination des Wassers kann es zur Oxidation der Flavan-3-ole kommen. Dabei können sich reaktionsfreudige Intermediärprodukte bilden, die ihrerseits die kolloidale Stabilität eines Bieres herabsetzen.

Die Variation der Lagertemperatur des Bieres hatte keinen direkten Einfluss auf die Zusammensetzung der Polyphenole. Einzig durch fortschreitende Autolyse der Hefe erhöhte sich der pH-Wert bei wärmer gelagerten Bieren. Hierbei kam es zu einer Verschiebung in den nach Siebert für die Komplexbildung zwischen Protein und Polyphenol optimalen Bereich (SIEBERT 1999).

Die technologischen Möglichkeiten, um während Würzebereitung, Gärung und Lagerung Einfluss auf die phenolische Seite der Trübungsbildner zu nehmen, sind also limitiert. Somit kommt besonders der Rohstoffauswahl und als letzter Verfahrensschritt der Filtration und Stabilisierung eine große Bedeutung zu.

Im Bereich Stabilisierung wurde die Tankstabilisierung mit dem Durchlaufkontaktverfahren verglichen. Dabei zeigte die Stabilisierung mit langen Kontaktzeiten, dass sich hier enorme Einsparungspotenziale ergeben könnten. Schon der Einsatz von eiweißseitig wirkendem Xerogel in der Tankstabilisierung konnte die Flavanolkonzentration reduzieren. Diese Verringerung wurde durch Bindung der Polyphenole an das entfernte Eiweiß erklärt (LEIPER et al. 2002, MCMURROUGH et al. 1993, PAPP 2000).

Des Weiteren wurde der Stabilisierungsprozess anhand der HPLC-Methode und zweier nasschemischer Techniken beurteilt. Der Nachweis des Stabilisierungseffekts durch die unterschiedlichen Analysen zeigte, dass die Tannoidbestimmung gegenüber der HPLC ausreichend genau war. Eine Vorhersage der kolloidalen Haltbarkeit der Biere anhand von Globalbestimmungsmethoden ist jedoch nicht möglich (ANGER 1983, PAPP 2000).

Neben den Polyphenolen wurde auch die proteinische Seite der Trübung und Trübungsbildung betrachtet. Eine Differenzierung von stabilen zu instabilen Bieren anhand der Aminosäurezusammensetzung aller Proteine konnte nicht durchgeführt werden. Auch die Auftrennung einzelner Aminosäuren und Auftragung deren Menge sowie der Mol-% über die erreichten Warmtage brach-

te keine Ergebnisse. Verantwortlich hierfür war die zu geringe Menge an Protein (2 mg/l), welche zur Ausbildung einer sichtbaren Trübung benötigt wird gegenüber der im Bier vorliegenden Gesamtmenge an Proteinen (CHAPON 1994).

Der Vergleich von Trübungs- und Bierproteinen zeigte, dass die Aminosäurezusammensetzungen unterschiedlich verteilt waren. Aber auch hier konnten keine Aussagen über den Aufbau trübungsrelevanter Proteine und den erreichten kolloidalen Stabilitäten der Biere getroffen werden. Der Anteil der Aminosäure Prolin trat allerdings in den Trübungsproteinen gegenüber den Bierproteinen in höheren Mengen auf. Die hohen Konzentrationen ließen vermuten, dass Trübungsproteine hauptsächlich aus der Hordeinfraktion der Gerste stammen. Ein Ergebnis, welches durch die Arbeiten anderer Autoren bestätigt wurde (ASANO et al. 1982, LEIPER et al. 2003).

Die 2-D Elektrophorese erlaubte Verschiebungen innerhalb der Proteinzusammensetzung unterschiedlich stabilisierter und forcierter Biere zu erkennen. Die Differenzen waren jedoch marginal und die Verluste bei Proteinen <20 kDa zu groß, um eindeutige Aussagen treffen zu können. Eine weitere Verbesserung dieser Analytik könnte Unterschiede deutlicher erkennen lassen und somit zu einer erhöhten Aussagekraft führen.

Ferner wurde untersucht, ob mit Hilfe der angewendeten Analysen, also dem Nachweis der Flavan-3-ole mittels HPLC und Proteinanalytik, und deren Kombination eine Vorhersage der kolloidalen Stabilität möglich ist. Weder die monomeren noch die dimeren Polyphenole ließen hier eindeutige Aussagen zu. Auch das dem Massenwirkungsgesetz ähnliche Produkt aus der Summe der Flavan-3-ole und der Prolinkonzentration der Proteine korrelierte nur gering mit den erreichten Warmtagen der Biere. Die Problematik bei der Vorhersage der Haltbarkeit lag insbesondere in der nicht nachweisbaren oxidativen Schädigung der Proben und damit einhergehend in der Verschlechterung der chemisch-physikalischen Stabilität des Bieres. Ohne eine Möglichkeit, diese Vorbelastung der Biere analytisch zu erfassen, wird es auch in Zukunft unmöglich sein, die Trübungsneigung vorhersagen zu können.

Erstmals wurde in dieser Arbeit versucht, im Bier Mechanismen der Trübungsbildung und das Verhalten involvierter Substanzen reaktionskinetisch zu beschreiben. Dabei wurde der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die entstehenden Agglomerate untersucht.

Zunächst wurde die Entwicklung der Trübung unter Beteiligung der Flavan-3-ole dargestellt. Die umgesetzte Menge an Flavan-3-olen verschieden stabilisierter Biere wurde zur entstandenen Trübung in Beziehung gesetzt. Es zeigte sich, dass die Agglomeration der Trübungspartikel temperaturabhängig war. Bei kalt gelagerten Bieren wurden mehr Flavan-3-ole benötigt, um eine bei höheren Temperaturen äquivalente Trübung entstehen zu lassen.

Weiterhin kennzeichnend für die Trübungsbildung war die Ausgangskonzentration der Flavan-3-ole. Je geringer diese waren, desto weniger Flavan-3-ole wurden in die Trübung eingebracht. Da die Werte der Trübungsmessung äquivalent waren, mussten die entstandenen Partikel unterschiedlich aufgebaut sein. So könnten hier Proteine und weitere Bierinhaltsstoffe, wie z. B. Kohlen-

hydrate oder Metalle eine bedeutendere Rolle als die Polyphenole gespielt haben.

Die Kinetik der Trübungsbildung stabilisierter Biere stellte sich bei genauerer Betrachtung als eine Reaktion erster Ordnung dar. Dabei wurden zunächst die entstandenen Partikel als eine chemische Substanz betrachtet, die zwar die Konzentration, nicht aber die Zusammensetzung verändert. Während also die Kurven der Trübungszunahme der behandelten Biere verschieden ausgeprägte lag- und darauf folgende log-Phasen besaßen, konnte nicht stabilisiertes Bier keinem Reaktionssystem eindeutig zugeordnet werden. Verantwortlich dafür war der überproportionale Trübungsanstieg innerhalb der ersten Messungen.

Die Abnahme der Flavan-3-ole während der Bieralterung wurde über die Zeit untersucht. Um die Umsetzung der Flavan-3-ole beschreiben zu können, mussten Gleichungen aufgestellt werden, mit denen sich die Reduktion veranschaulichen lässt. Basierend auf Chapons Modell wurden weitere Vereinfachungen getroffen und somit konnte die Gleichung in eine Reaktion erster Ordnung umgeformt werden (CHAPON 1994). Die Ergebnisse der Berechnungen zeigten, dass die Stoffabnahmen temperaturabhängig waren. Je höher die Temperatur gewählt wurde, desto stärker reduzierten sich die analysierten Polyphenole pro Zeiteinheit. Daneben war diese Abnahme abhängig von der Ausgangskonzentration der betrachteten Flavan-3-ole. Da sich die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch nicht proportional zum Polyphenolgehalt der Biere änderte, muss von anderen Reaktionssystemen ausgegangen werden.

Weiter wurden die Auswirkungen von Additiven auf die Trübungsbildung analysiert. Insbesondere aktiver Sauerstoff, zugegeben in Form von  $H_2O_2$ , reduzierte die kolloidale Stabilität gegenüber der Referenzprobe. Eisen- und Kupferionen hatten dagegen nur geringen Einfluss auf die Haltbarkeit des Bieres. Kupfer bildete zunächst Komplexe mit Bierproteinen und erhöhte so zu Beginn die Werte der Trübungsmessungen. Weder Kupfer noch Eisen hatten einen Effekt auf die Zusammensetzung der Flavan-3-ole, obwohl die Additive nach Abtrennen der entstandenen Trübungen in den Überständen nicht mehr nachweisbar waren.

Auf diese Arbeit aufbauend, sollten weitere Untersuchungen folgen, um die Reaktionspartner bei der Trübungsbildung besser zu beschreiben. Neben den hier aufgeführten Flavan-3-olen müssen weitere trübungssensitive Polyphenole identifiziert werden. Ein Schwerpunkt der noch folgenden Arbeiten wird die Analyse der Trübungsproteine sein. Daneben sollten auch weitere Stoffgruppen, wie z.B. Kohlenhydrate, näher betrachtet werden. Erst wenn der Großteil der beteiligten Substanzen bekannt sind, kann die Trübungsentstehung modelliert werden. Darauf basierend können genauere Vorhersagen über die kolloidale Stabilität und zutreffende Stabilisierungsmaßnahmen durchgeführt werden.

## 1.1 Summary

Major field of the thesis was haze active polyphenols (flavan-3-ols). Objectives of this work were to improve colloidal stability of lager beers by technology variations and the investigation of the reduction of flavan-3-ols during beer ageing. Besides the polyphenols, also haze active proteins were analysed. Combining both results, hypothesis for haze formation were developed and verified. Influences of metal ions and oxygen also have been considered.

First of all the existing HPLC analysis of polyphenols was improved. This resulted in a higher coefficient of determination and better chromatographic separation. Procyanidin B<sub>3</sub> and prodelphinidin B<sub>3</sub> were quantified and procyanidin B<sub>2</sub> was identified in wort and unfiltered beer.

The solution of the flavan-3-ols during the mashing process was observed for the first time. It was shown that the sensitivity of heat increased from catechin to procyanidin B<sub>3</sub> to prodelphinidin B<sub>3</sub>. Polymerisation degree and the amount of hydroxy groups were responsible for the behaviour of these substances. The mashing program had no or only slightly influence on the polyphenols. Epicatechin was not detected during this process step. It was formed by depolymerisation during wort boiling.

The oxidative damaging of beer ingredients during wort aeration was observed by the reduction of the analysed polyphenols but the influence of this production step on the colloidal stability was low compared to filtration and stabilisation.

Monomers and dimers showed different reactions during high gravity brewing. Catechin and epicatechin were not affected by this technology compared to procyanidin B<sub>3</sub> and prodelphinidin B<sub>3</sub> which were reduced significantly at higher original gravity. These substances were more reactive because of their degree of polymerisation and amount of hydroxy groups. Beneath the original gravity, the quality of the diluting water had a high influence on the flavan-3-ols. An oxygen contamination of the water led to an oxidation of the beer polyphenols and therefore to a lower colloidal stability of the finished beers.

The variation of storage temperature had no direct influence on the composition of the polyphenols, but the progressing autolysis of the yeast at a higher temperature showed an increasing of the pH. This resulted in a better complexation between proteins and polyphenols and by means of that to a lower chemical-physical stability of the beers.

The technological possibilities to influence haze active polyphenols during wort production, fermentation, maturation and storage are limited. Therefore the selection of raw materials and the last production steps filtration and stabilisation are of high interest for the colloidal stability of the resulting beer.

Tank stabilisation compared to continuous flow dosage showed that the flavanol concentration is reduced more efficiently at an increased contact time also with xerogel.

The comparison between HPLC and two conventional analyses for polyphenols showed that the stabilisation effect can be measured with all of them whereas HPLC analysis was more significant. The prediction of colloidal stability is not possible with each of these methods.

Besides the polyphenols proteins in haze formation and peptides of the caused turbidity were analysed. With the amino acid composition a differentiation between stable and unstable beers was not possible. One reason was the small amount of protein which is necessary for haze formation (2 mg/l beer). The comparison between the protein content of beers and the originating turbidity showed different compositions of amino acids. The proline content in haze proteins was higher than in beer proteins.

2-D electrophoresis indicated differences in the protein consumption of different stabilised and forced beers. The difference was too marginal to get clear results.

The results of the protein and polyphenol analyses were calculated in a formula similar to the law of mass action. The correlation between the products and the corresponding warm days was small. Until now the difficulty of the predictability of colloidal stability led back to the unknown and undetectable oxidative damage of beers. Without the possibility of measuring this product contamination the affinity for haze formation is not predictable.

Mechanisms of haze formation in beer were described for the first time by reaction kinetics. Therefore influence of different temperatures on the formed agglomerations were analysed.

First of all the formation of haze in combination with the flavan-3-ols was described. The amount of reacting flavan-3-ols was correlated to the turbidity in EBC units. The agglomeration of the particles was temperature-sensitive. At lower temperatures more flavan-3-ols were needed to cause a turbidity which was equivalent to the turbidity at higher temperatures. Furthermore the concentration of the flavan-3-ols influenced the haze formation, so that the same amount of haze (same EBC units) had different compositions.

The kinetic of haze formation for stabilised beer was a reaction of first order. Distinctive lag- and log-phases were observed for different treated beers. On the other hand untreated beer did not definitely correlate with a reaction system.

The decrease of haze active polyphenols was analysed during beer ageing. To describe the reduction of the flavan-3-ols an equation based on Chapon's model was developed. With this equation the reduction of these substances could be calculated. It was shown that the decrease of the polyphenols were temperature-sensitive and depended on their concentration in the fresh beer. But the reaction rate did not correlate proportional to the content of the flavan-3-ols, so other reaction systems or substances could be involved.

The influence of additives like active oxygen, iron and copper ions were analysed. Where active oxygen has reacted with flavan-3-ols, iron and copper ions did not affect the polyphenols. The addition of copper ions resulted in a complexation with beer proteins and therefore in a reduced collo-

dal stability of the beers.

As a conclusion of this work, more and differentiated analysis had to be done to describe the mechanism of haze formation more clearly. Besides the flavan-3-ols other haze active polyphenols must be identified and quantified. Also proteins have to be analysed more exactly and other substances need to be recognised. More appropriated models for the haze formation should be created with an improved knowledge of the substances involved. Based on this a higher predictability for colloidal stability and stabilisation treatment can be developed.

## 2 Einleitung

### 2.1 Problemstellung

Die Qualität eines Bieres ist gekennzeichnet durch die Summe seiner wertbestimmenden Eigenschaften. Diese müssen sowohl den Ansprüchen des Konsumenten als auch den Vorgaben der Brauer gerecht werden (PFENNINGER 1987). Die wahrnehmbaren Qualitätseigenschaften dürfen sich während der Aufbewahrung des fertigen Bieres nicht nachteilig verändern, sondern müssen stabil bleiben. Bei der Haltbarkeit der Bierqualität spricht man von der Geruchs-, Geschmacks-, Farb- und Schaumstabilität sowie der mikrobiologischen und kolloidalen Stabilität (SCHUR 1980). Da der Konsument beim Anblick eines trüben Bieres, sofern nicht erwünscht („naturtrübe Kellerbiere“), an eine Qualitätsminderung denkt, stellt die chemisch-physikalische Stabilität eines Bieres ein maßgebliches Qualitätskriterium dar (BAMFORTH 1999, LEEMANS et al. 2003, SCHUR 1980, WACKERBAUER und ANGER 1984).

Um die Glanzfeinheit eines Bieres über einen längeren Zeitraum zu erhalten, kann der Brauer sowohl technologische Maßnahmen einsetzen als auch stabilisieren. Je nachdem für welche Methode er sich entscheidet, versucht er damit trübungsbildende Stoffe aus dem Bier zu entfernen oder von vornherein fern zu halten (NARZISS 1995). Bei diesen „Trübungsbildnern“ handelt es sich hauptsächlich um Polypeptide und Polyphenole, aber auch Kohlenhydrate und Metalle können Einfluss auf die Bildung kolloidaler Trübungen nehmen (WAINWRIGHT 1974). Die Trübungsbildung selbst ist das Ergebnis mehrerer komplexer Vorgänge, deren Einzelheiten nicht völlig geklärt sind (BAMFORTH 1999, BATCHVAROV und CHAPON 1985).

Bei den auftretenden Trübungen unterscheidet man zwei Arten: Kälte- und Dauertrübung (BAMFORTH 1999). Kälte-trübungen entstehen bei Temperaturen zwischen  $-8\text{ °C}$  und  $+5\text{ °C}$  und lösen sich bei Erwärmen wieder auf. Dauertrübungen klären dagegen auch bei Raumtemperatur nicht auf (WAINWRIGHT 1974). Kälte-trübungen gelten als Vorläufer der Dauertrübungen und sind daher für den Brauer von besonderem Interesse (BAMFORTH 1999). Die Kälteempfindlichkeit eines Bieres erlaubt somit, auf die zu erwartende kolloidale Stabilität eines Bieres zu schließen. Dies wird bei verschiedenen Forciertests und dem Alkohol-Kälte-Test nach Chapon genutzt (MEBAK 2000, Bd. II, CHAPON 1993a).

Die Haltbarkeit eines Bieres mit Hilfe dieser Tests zu prognostizieren, ist allerdings zeitaufwendig oder zu wenig aussagekräftig. Je nach Stabilität des Bieres kann der gewählte Forciertest einige Tage bis Wochen dauern. Globalbestimmungsmethoden, wie der Nachweis der Gesamtpolyphenole oder Anthocyanogene, können zur Untersuchung der Stabilisierungswirkung eingesetzter Stabilisatoren verwendet werden, eine Aussage über die zu erwartende Haltbarkeit des Bieres kann durch diese jedoch nicht getroffen werden (ANGER 1983, 1995).

Das Trübungspotential eines Bieres im Unfiltrat vorhersagen zu können, ist eines der großen Ziele der Brauer (PAPP 2000). Eine gezielte Prognose soll dem Produzenten erlauben, das Bier gemäß der erwünschten Mindesthaltbarkeit zu stabilisieren. Zu diesem Zweck müssen jedoch zunächst

trübungsrelevante Stoffe analysiert und Mechanismen der Trübungsbildung verstanden werden.

## 2.2 Kolloidale Trübungen

### 2.2.1 Kolloide

Kolloide sind weder echte molekular-disperse Lösungen noch grobdisperse Suspensionen, deren Teilchen im Mikroskop sichtbar sind. Der kolloid-disperse Zustand ist somit physikalisch-chemisch ein Zwischenbereich, dessen Abgrenzungen zueinander nicht sehr scharf sind. Erkennbar sind solche Systeme durch das opaleszierende Aussehen auf Grund des Tyndall-Effekts.

Kolloide Systeme bestehen aus einer dispersen Phase, die gleichmäßig in fein verteiltem Zustand in einem Dispersionsmittel verstreut ist. Dabei kann die disperse Phase fest, flüssig oder gasförmig sein. Die Teilchengröße eines solchen kolloiddispersen Systems liegt in einem Bereich von 1-500 nm. Beispiele für diese Systeme sind Biokolloide, Makromoleküle, Mizellen und Mikroemulsionen (ANTONETTI et al. 1998, DÖRFLER 2002, EVERETT 1992).

### 2.2.2 Lichtstreuung

Lichtstreuungen durch kolloidale Lösungen wurden erstmals durch Tyndall erwähnt (Faraday-Tyndall-Effekt). Die Streuung des Lichts beruht auf Anregung der Elektronen von Molekülen, indem Licht auf Materie trifft und diese ihrerseits wieder Licht auszusenden vermag. In kolloidalen Dispersionen wird die Strahlung auf Grund der Teilchengröße gestreut.

Diese Lichtstreuung ist abhängig von:

- Teilchengestalt und -größe
- Dispersität des kolloidalen Systems
- Molmasse der Teilchen
- Wechselwirkung zwischen den kolloiden Partikeln

Handelt es sich um Partikelgrößen  $< \lambda/20$  ( $\lambda$  = Wellenlänge des Lichts im umgebenden Medium) der eingestrahnten Lichtwellen und verdünnten Suspensionen, so kommt die Kontinuumstheorie von Rayleigh zu Tragen. Die Form der Partikel spielen in diesem Fall keine Rolle. Unter diesen Voraussetzungen gilt für die ermittelte Trübung  $\tau$  folgende Proportionalität:

$$\tau \propto (v_c) v$$

so dass bei einem konstantem Gesamtvolumen  $v_c$  der Teilchen die Trübung mit der Teilchengröße  $v$  (Volumen eines Teilchens) zunimmt. Dies bedeutet wiederum, dass je größer die Streuintensität in einem Winkel von  $90^\circ$  ist desto größer sind auch die Partikel. Ab einer Teilchengröße von  $d = \lambda$  ( $d$  = Durchmesser eines Teilchens) ist  $\tau$  proportional zum Durchmesser. Ist  $d > \lambda$ , verhält sich die

Trübung umgekehrt proportional zum Durchmesser der Partikel (ANTONETTI et al. 1998, DÖRFLER 2002, EVERETT 1992).

## 2.3 Trübungsrelevante Polyphenole

### 2.3.1 Bedeutung der Polyphenole

Der Begriff Polyphenole umfasst eine große Anzahl von Molekülen. Allen gemeinsam ist das phenolische Grundgerüst. Polyphenole sind Stoffe des sekundären Pflanzenmetabolismus und somit nicht essentiell für das Überleben der Pflanze oder deren Teile. Sie dienen jedoch als Schutzstoffe (FEUCHT und TREUTTER 1989, HASLAM 1998, ROBARDS et al. 1999). Eine Einteilung phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe nahmen Robards et al. vor (ROBARDS und ANTOLOVICH 1997, ROBARDS et al. 1999). Die wichtigsten Vertreter der Polyphenole sind die Flavonoide. Sie leiten sich vom Flavan (Abbildung 1) ab und können wie folgt unterteilt werden: Flavone, Flavonole, Flavanone, Isoflavone, Flavanonole, Chalkone, Dihydrochalkone, Flavanole, Flavan-3,4-diole, Anthocyanidine und Proanthocyanidine (kondensierte Gerbstoffe) (BELITZ und GROSCH 1992, FEUCHT und TREUTTER 1989, ROBARDS und ANTOLOVICH 1997).

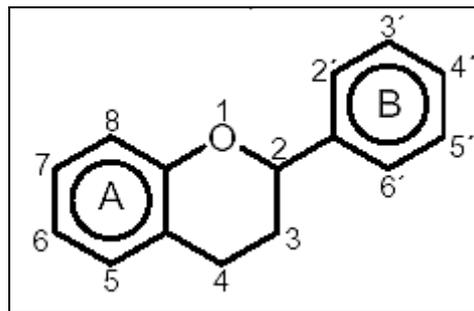


Abbildung 1: Flavan-Grundkörper

Für die Brauindustrie von analytischem und praktischem Interesse sind nach McMurrough Phenole und phenolische Säuren, wie Ferulasäure und ihre Derivate, Flavonole und deren Glykoside, welche hauptsächlich aus dem Hopfen stammen, und flavanoide Polyphenole (MCMURROUGH 1998). Letzt genannte Gruppe hat den größten Einfluss bei der Bierbereitung und wird nach McMurrough und Delcour wie in Tabelle 1 unterteilt (MCMURROUGH und DELCOUR 1994, MCMURROUGH 1998).

Tabelle 1: Einordnung flavanoider Bier- und Würzepolyphenole (MCMURROUGH 1998)

Hauptklasse	Molekülgröße	Alternativer Trivialname	Struktur/ Charakteristika
Freie Polyphenole	Monomer Oligomer	einfache Polyphenole, einfache Flavanole Oxidierbare Polyphenole Tanninogene, Tannin Precursor	Schwache Gerbkraft, welche mit steigendem Molekulargewicht zunimmt
	Polymer	Tannine, Tannoide, oxidierte Polyphenole	Zwischenprodukt zu größeren Molekulargewichten, starke Gerbkraft
Gebundene Polyphenole	Komplex	Lösliche Verbindungen von Polypeptiden und Polyphenolen	Hohes Molekulargewicht, keine Gerbkraft, beginnende Trübung

Flavan-3-ole und deren kondensierte Produkte, die Proanthocyanidine, haben aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit gegenüber anderen Stoffklassen für die Bierherstellung eine große Bedeutung (BELLMER et al. 1995a, BELLMER et al. 1995b, DADIC 1976). In Abbildung 2 sind Strukturen monomerer und dimerer Flavanole zu sehen. Die bekanntesten Vertreter der Flavan-3-ole im Bier sind die Monomere Catechin und Epicatechin und die Dimere Procyanidin B<sub>3</sub> (Catechin(4 $\alpha$ →8)Catechin) und Prodelphinidin B<sub>3</sub> (Gallocatechin(4 $\alpha$ →8)Catechin) (ENGELHARDT und GALENSA 1997, GOUPY et al. 1999, HASLAM 1998, MCMURROUGH 1998, MCMURROUGH et al. 1983).

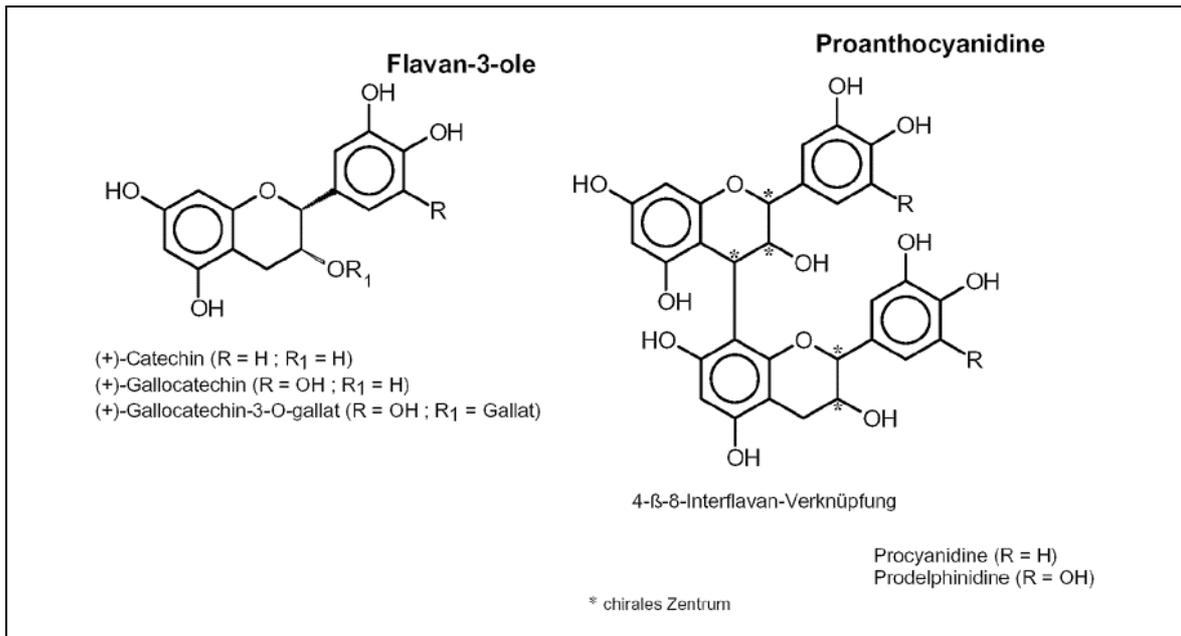


Abbildung 2: Strukturen monomerer und dimerer Flavanole (RECHNER 2000)

### 2.3.2 Polyphenole im Brauprozess

Quantitativ haben Polyphenole keine oder nur geringe Bedeutung in der Bierproduktion. Qualitativ beeinflussen sie jedoch sowohl Prozessparameter als auch Eigenschaften des fertigen Bieres (vgl. Abbildung 3) (MCMURROUGH et al. 1996, SCHUR 1980, 1987).

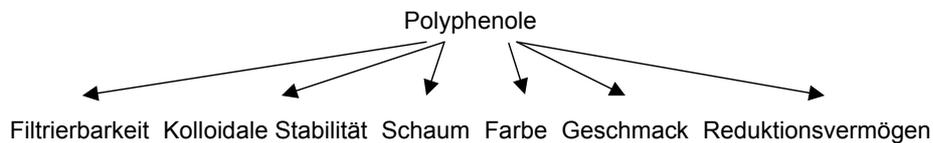


Abbildung 3: Bedeutung der Polyphenole für die Bierqualität (SCHUR 1987)

Die Polyphenole des Bieres leiten sich aus Malz und Hopfen ab (NARZISS 1995, PFENNINGER 1987, SCHUR 1980). Zu 80% stammen die Proanthocyanidine des Bieres aus dem Malz, der Rest aus dem Hopfen (DELCOUR und TUYTENS 1984, JENE-STRID 1988, SCHUR 1987). 0,15-0,22% des Trockengewichts der Gerste stellen Proanthocyanidine dar. Während der Verarbeitung zu Malz verändert sich der Gehalt kaum (HASLAM 1998). Bei der Bierbereitung dagegen kommt es, je nach Verfahrensschritt, zu einer mehr oder weniger starken Veränderung des Polyphenolspektrums oder -gehalts.

McMurrough und Delcour beobachteten, dass der Polyphenolgehalt während des Maischens zunächst zunahm. Dabei verlief die Extraktion des einfachen Flavan-3-ols Catechin schneller, als die der Dimeren. Bei höheren Maischtemperaturen (>65°C) kam es allerdings zu einer Abnahme der höher kondensierten Flavan-3-ole durch Fällung mit Proteinen. Zusätzlich depolymerisierten diese

Proanthocyanidine, und die Konzentrationen von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin stiegen über die aus dem Malz mögliche extrahierbare Menge an (DERDELINCKX und JERUMANIS 1987, MCMURROUGH und DELCOUR 1994, PAPP 2000). Bellmer et al. erkannten dagegen keine oder nur eine geringfügige Zunahme der Proanthocyanidine und der monomeren Flavan-3-ole. Überdies wurde hier auch Epicatechin in der Maische nachgewiesen (BELLMER et al. 1995b). Während des Abläuterns beobachteten alle Autoren eine Erhöhung der Polyphenole. Dies wurde durch die Auslaugung der Treber beim Anschwänzen erklärt.

Bellmer et al., McMurrough und Delcour beobachteten ein unterschiedliches Verhalten monomerer, dimerer und trimerer Flavane bei der Würzekochung. Während es bei Dimeren und Trimeren zu einer starken Abnahme kam, erhöhte sich der Gehalt der Monomere auf das Doppelte. Begründet wurde dies mit Depolymerisierungen höherer Flavan-3-ole, der Reaktivität der Proanthocyanidine und dem Eintrag monomerer Phenole durch den Hopfen (BELLMER et al. 1995b, MCMURROUGH und DELCOUR 1994). Bei Papp dagegen zeigte auch das Dimer Procyanidin B<sub>3</sub> einen höheren Wert in der Ausschlagwürze gegenüber der Pfanne-voll-Würze (PAPP 2000).

Während der Gärung stellten Bellmer und Schunke keine Veränderungen der Flavan-3-ole fest. Erst in der Lagerung nahm die Konzentration dieser Stoffgruppe temperaturabhängig ab. Die Phenolkarbonsäuren veränderten sich indessen nicht (BELLMER et al. 1995b, SCHUNKE 1992). Moll et al. und Papp beobachteten dagegen einen Konzentrationsrückgang der Tannine und Flavan-3-ole während der Gärung. Diese Polyphenole binden sich womöglich an die Proteine der Hefezellwand. Nach längerer Lagerung lösten sich diese Stoffe wieder und es kam zu einer Erhöhung der Tannin- und Flavanolgehalte (MOLL et al. 1974, PAPP 2000). Madigan et al. und Gromus und Lustig erkannten keinen Einfluss der Lagerzeit und -temperatur auf die Zusammensetzung der Polyphenole und der daraus resultierenden kolloidalen Stabilität (GROMUS und LUSTIG 1999, MADIGAN et al. 2000). Die Erfassung der Polyphenole mittels Globalbestimmungsmethoden konnte keine eindeutigen Tendenzen während Gärung, Reifung und Lagerung zeigen. Am stärksten wirkten sich auf den Polyphenolgehalt der Biere jedoch Filtration und Stabilisierung aus. Insbesondere der Einsatz polyphenolseitig wirkender Stabilisierungsmittel reduziert die Konzentration der Gerbstoffe über die Maßen (DE CLERCK 1947, GROMUS 1981, MCFARLANE 1995).

### 2.3.3 Polyphenole und kolloidale Stabilität

Schon früh wurde auf die Beteiligung gerbfähiger Stoffe bei der Trübungsbildung hingewiesen (BENGOUGH und HARRIS 1955). In folgenden Arbeiten wurde versucht, trübungsrelevante Polyphenole anhand von Bestimmungsmethoden wie Anthocyanogen- und Gesamtpolyphenolnachweis zu identifizieren (HALL 1959, HARRIS und RICKETTS 1958, 1959, POSADA 1969). Es zeigte sich, dass der colorimetrische Nachweis bestimmter phenolischer Substanzen keinen Hinweis auf die Trübungsneigung eines Bieres geben konnte. Auch der Polymerisationsindex (Gesamtpolyphenolwert zu Anthocyanogenwert), als Maß für den Anteil polymerisierter Polyphenole, erwies

sich für die Beurteilung der Trübungsneigung als ungeeignet (NARZISS und GROMUS 1982, POSADA 1969, SCHUR 1987, STEINER und STOCKER 1969, WACKERBAUER und ANGER 1984).

Chapon etablierte den Begriff der Tannoide. Es handelt sich dabei um kondensierte phenolische Stoffe, die die Eigenschaft haben, mit Proteinen zu reagieren (CHOLLOT et al. 1969). Diese trübungsaktiven Polyphenole wurden durch Ausfällung mit PVP nachgewiesen (CHAPON 1993b). Das Ergebnis der Fällungsreaktion war jedoch nicht an eine bestimmte Menge phenolischer Substanzen gebunden, sondern bewies lediglich das Gerbvermögen von Polyphenolen, ohne dass diese mengenmäßig erfassbar gewesen wären (BATCHAVAROV und CHAPON 1985).

Polyphenole als Additive dem zuvor stabilisierten und filtrierten Bier zugesetzt, erlaubten spezifischere Aussagen über die Eigenschaften trübungssensitiver phenolischer Stoffe. Papp erkannte hier die konzentrationsabhängige, destabilisierende Wirkung des Catechins und der Ferulasäure (PAPP 2000, PAPP et al. 2000). Durch Zugabe unterschiedlich polymerisierter Polyphenole zu Bier zeigte sich, dass der Polymerisationsgrad phenolischer Substanzen einen großen Einfluss auf deren Trübungsbildungskapazität hatte. Je höher Polyphenole polymerisiert waren desto größer war auch deren Affinität zu anderen Stoffen und damit zur Trübungsbildung. Gleiches wurde auch in Modelllösungen bestätigt. (EASTMOND und GARDNER 1973, GRAMSHAW 1967, OUTTRUP et al. 1987). Nicht nur der Grad der Polymerisation sondern auch die Anzahl der vorhandenen OH-Gruppen ist Ursache für die Trübungsneigung der Polyphenole. Insbesondere Flavan-3-ole wurden als die trübungsrelevante Stoffgruppe der Polyphenole nachgewiesen. (GRAMSHAW 1969, MCGUINNESS et al. 1975, SIEBERT 1999, STEINER und STOCKER 1969).

McMurrough et al. befassten sich speziell mit der Trübungsbildung durch Flavan-3-ole. Als trübungsrelevant stellten sich die dimeren Proanthocyanidine, Prodelphinidin B<sub>3</sub> und Procyanidin B<sub>3</sub> heraus (MCMURROUGH et al. 1992). In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, wie sich eine PVPP-Stabilisierung auf die Zusammensetzung der Bierflavanole und damit auf die kolloidale Stabilität auswirkt (MCMURROUGH 1998, MCMURROUGH et al. 1995, 1997, MCMURROUGH und O'ROURKE 1997). Abnahmen der Flavan-3-ole bei Lagerung des stabilisierten und abgefüllten Bieres konnten beobachtet werden, und es bestätigte sich dabei, dass die Dimere stärkeren Einfluss auf die chemisch-physikalische Stabilität hatten als (+)-Catechin und (+)-Epicatechin. (MCMURROUGH et al. 1993, 1995, 1996, 1997, MCMURROUGH und O'ROURKE 1997).

## **2.4 Trübungsrelevante Proteine**

### **2.4.1 Klassifizierung nach Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt**

Über die Molekulargewichtsverteilung trübungsbildender Eiweißstoffe werden in der Literatur sehr unterschiedliche Werte genannt. Zudem verwendeten die Arbeitsgruppen verschiedene Methoden, diese Proteine nachzuweisen. Dennoch fanden viele der Forschungsgruppen hauptsächlich trübungssensitive Proteine mit einem Molekulargewicht  $\leq 40$  kDa.

Kringstad und Damm entdeckten durch Gelfiltration eine Fraktion, welche bei Zusatz zu kieselgelstabilisiertem Bier trübungsbildend wirkte. Diese proteinische Fraktion hatte ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa (KRINGSTAD und DAMM 1965). Auch Kano und Kumimura fanden durch Forcieren der Biere eine Konzentrationsabnahme der Proteine zwischen 20 und 40 kDa (KANO und KUMIMURA 1993). Ishibashi et al. wiesen anhand von SDS-Gelen in Kältetrübungen Proteine mit einem Molekulargewicht um die 40 kDa nach (ISHIBASHI et al. 1996). Leiper et al. fanden Proteine verschiedener Molekulargewichte kleiner 40 kDa, welche an der Trübungsbildung beteiligt waren: 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 16 kDa und 13 kDa. Proteine mit 20 kDa und 16 kDa hatten dabei den stärksten Einfluss auf die chemisch-physikalische Stabilität (LEIPER et al. 2003).

Die Beteiligung von Proteinen mit kleineren Molekulargewichten an der Trübungsbildung in Bieren zeigten auch andere Autoren. Outtrup entdeckte hier trübungsrelevante Proteine in einem Bereich von 14 bis 19 kDa (OUTTRUP 1989). Bei Sorensen et al. hatte die trübungssensitive Eiweißfraktion eine Größe von 6 bis 19 kDa (SORENSEN et al. 1993). Robinson et al. erkannte proteinische Trübungsbildner mit einem Molekulargewicht von 12 kDa (ROBINSON et al. 2001). Asano et al. fanden trübungssensitives Protein in einem Bereich von 1 bis 10 kDa. Diese Ergebnisse wurden von Dadic und Belleau bestätigt, indem sie Proteine aus Trübungen isolierten und deren Molekulargewicht bestimmten (ASANO et al. 1982, BELLEAU und DADIC 1981).

Andere Autoren entdeckten wiederum an der Trübungsbildung beteiligte Proteine, die Molekulargrößen von mehr als 40 kDa besaßen. Garbar und Daussant wiesen mit Hilfe der Gelfiltration eiweißseitige Trübungsbildner mit Molekulargewichten von 20 kDa und zwischen 30 und 140 kDa nach. Die weite Streuung der Werte wurde durch Aggregatsbildung mit nicht stickstoffhaltigen Substanzen erklärt (GARBAR und DAUSSANT 1965). Ebenfalls Narziß und Röttger, aber auch Mussche beobachteten einen Zusammenhang zwischen Stickstofffraktionen größer 60 kDa und der kolloidalen Stabilität der Biere (NARZISS und RÖTTGER 1973, MUSSCHE 1997).

Eindeutigere Ergebnisse als die Molekülgröße brachte dagegen die Betrachtung der isoelektrischen Punkte der Proteine. Verschiedene Arbeitsgruppen dokumentieren eine Beteiligung saurer Proteine an der Trübungsbildung oder in den isolierten Trübungen. So zeigten Bateson und Leach, dass Proteine mit einem pI von 1,9 involviert waren (BATESON und LEACH 1969). Auch Belleau und Dadic, Matsuzawa und Nagashima, Mussche, Nummi et al., Savage und Thompson entdeckten trübungsbeeinflussende Proteine in einem Bereich von pI <6,5 (BELLEAU und DADIC 1981, MATSUZAWA und NAGASHIMA 1990, MUSSCHE 1997, NUMMI et al. 1969, SAVAGE und THOMPSON 1971, 1972, 1973). Einzig Lublieniecki fand leicht basische Proteine mit einem pI bis 8,2 in den von ihm untersuchten Trübungen (LUBLIENIECKI 1981).

#### 2.4.2 Prolinreiche Proteine

Neben Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt ist vor allem die Aminosäurezusammensetzung der Proteine von Bedeutung. Speziell die Anwesenheit der Aminosäure Prolin ließ einen Zu-

sammenhang mit der Trübungssensibilität von Proteinen erkennen. Oh et al. und Asano et al. fanden in den aus Trübungen isolierten Proteinen einen hohen Anteil an Prolin und Glutaminsäure (ASANO et al. 1982, OH et al. 1980). Outtrup kam zu der Annahme, dass nicht nur die Anwesenheit des Prolins, sondern auch die Stellung in der Sequenz von Bedeutung für die Trübungsbildung sei (OUTTRUP 1989, OUTTRUP et al. 1987).

Siebert et al. konzentrierten sich bei ihren Arbeiten ebenfalls auf prolinreiche Proteine. Je höher der Prolinanteil war, desto stärker war deren Affinität zu Catechin. Fehlte Proteinen die Aminosäure Prolin, so zeigten diese keine Trübungsbildung mit Polyphenolen. Freies Prolin hatte dagegen keinen Effekt auf die Trübungsbildung (SIEBERT 1999, SIEBERT und LYNN 1997, SIEBERT et al. 1996b, SIEBERT et al. 1998).

Die Trübungsrelevanz der Aminosäure Prolin begründet sich auf deren Struktur. So kann der Pyrrolidonring hydrophobe Bindungen mit Polyphenolen ausbilden. Gleichzeitig verursacht Prolin einen Knick in der Aminosäurekette des Proteins, wodurch die Anlagerung der Polyphenole erleichtert wird (BAXTER et al. 1997, BIANCO et al. 1997, CHARLTON et al. 2002, HAGERMAN und BUTLER 1981, LUCK 1994, MURRAY und WILLIAMSON 1994, MURRAY et al. 1994).

## 2.5 Theorien der Trübungsbildung in Bier

Bei der Trübungsbildung handelt es sich um das Zusammenwirken mehrerer komplexer Vorgänge, welche bis heute nicht vollständig geklärt sind (BAMFORTH 1999, BATCHVAROV und CHAPON 1985). Jedoch wurden verschiedene Versuche unternommen, die Entstehung von Trübungen plausibel zu erklären. Eine Möglichkeit, die Trübungsbildung in Bieren zu beschreiben, zeigt Chapon mit Hilfe folgender Gleichung (CHAPON 1994):



Abbildung 4: PT-Gleichgewicht nach Chapon (CHAPON 1994)

P steht hier für den Anteil empfindlicher, fällbarer Proteine, T für kondensierte phenolische Stoffe. Beide Stoffgruppen stehen während der Bierproduktion im Gleichgewicht mit einem PT-Produkt. Aus diesem Gleichgewicht folgt, dass ein Bier nicht gleichzeitig reich an den Komponenten Protein und Tannin sein kann, da es sonst zu einer Gleichgewichtsverschiebung auf die Seite des Komplexes kommt. Ebenso wird die Menge des ausgefällten, löslichen PT-Komplexes durch eine Senkung der Temperatur erhöht. Während der Aufbewahrung eines abgefüllten Bieres werden die Strukturen dieser Protein-Tannin-Verbindungen schließlich immer komplizierter und fester. Damit wird das vorerst lösliche PT-Produkt unlöslich, und folglich kommt es zu Bildungen von Dauertrübungen. (WACKERBAUER und ANGER 1984, BATCHVAROV und CHAPON 1985).

Haslam et al. beschäftigten sich ebenfalls mit Polyphenol-Protein-Interaktionen. In Ihren Arbeiten wurde versucht, die Trübungsbildung in verschiedenen Matrices, unter anderem auch in Geträn-

ken, zu untersuchen und deren unterschiedliches Entstehen zu erklären. Auch hier spielen Gleichgewichtsreaktionen eine Rolle (vgl. Abbildung 5). Als zentrale Stoffgruppe für die Bildung von Trübungen wurden Proanthocyanidine und deren Derivate genannt. Diese Stoffe haben die Eigenschaft, mit anderen Substanzen wie Proteinen, Polysacchariden u.s.w. zu reagieren und zu komplexieren. Für die Entstehung reversibler Komplexe sind zum einen hydrophobe Effekte, hauptsächlich jedoch Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich. Durch vorherige Umwandlung der Polyphenole, z.B. durch Oxidation, kann es schließlich zu kovalenten und damit irreversiblen Bindungen kommen (HASLAM 1974, HASLAM et al. 1994, HASLAM 1995, 1998).

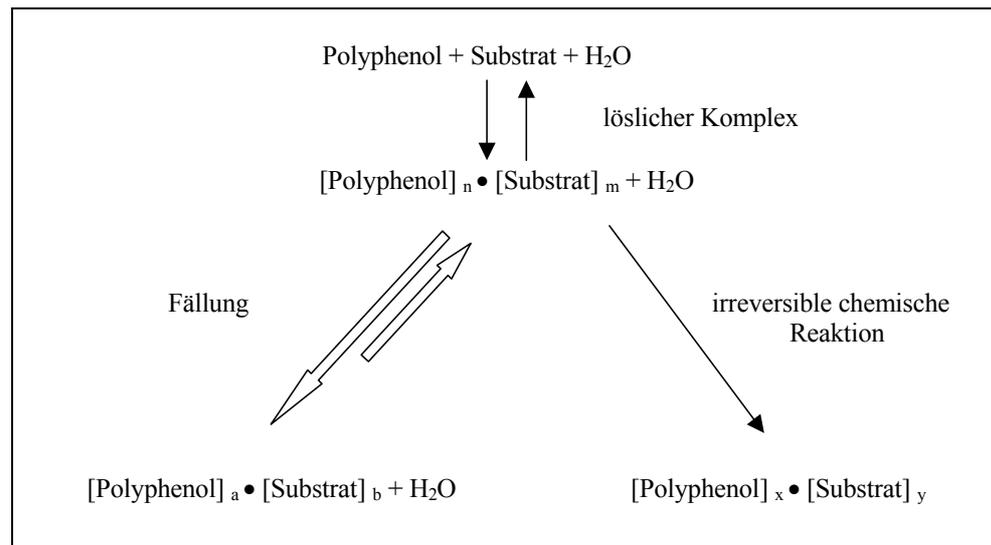
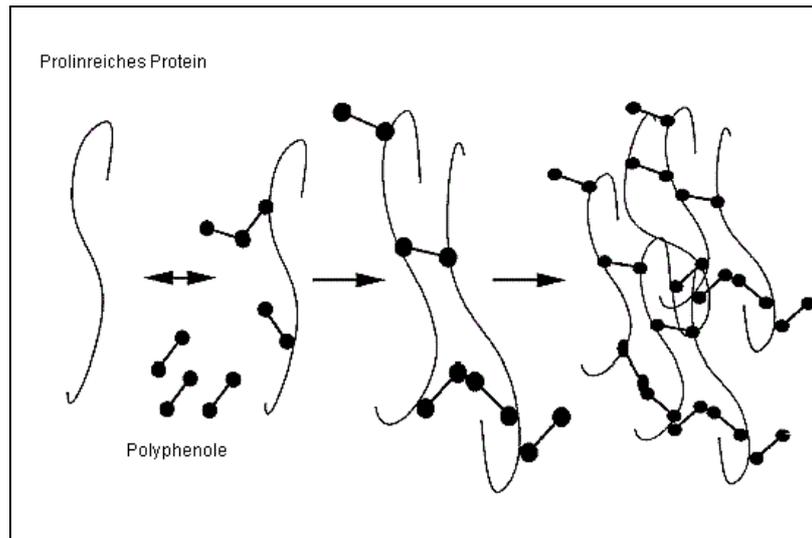


Abbildung 5: Komplexbildung der Polyphenole nach Haslam (HASLAM et al. 1994, HASLAM 1998)

Bei den Polyphenol-Protein-Bindungen zeigt sich, dass insbesondere prolinreiche Proteine einen großen Einfluss auf die Trübungsbildung besitzen. Die Affinität zu Proanthocyanidinen ist bei diesem Typ von Protein besonders hoch. Die Fällungsmechanismen wurden anhand verschiedener Polyphenole und prolinreicher Speichelproteine gezeigt, lassen sich aber auch auf andere Systeme mit Reaktionspartnern gleichen Charakters übertragen. Die Interaktionen zwischen Polyphenolen und Proteinen können in einen dreistufigen Prozess unterteilt werden (vgl. Abbildung 6). Polyphenole binden sich zunächst an ein prolinreiches Peptid. Anschließend dienen diese Polyphenole als Brücken zu einem weiteren Protein. In der dritten Phase kommt es zur weiteren Aggregation und Bildung unlöslicher Verbindungen und deren Ausfällung (CHARLTON et al. 1998a, CHARLTON et al. 1998b, CHARLTON et al. 2002, HAGERMAN und BUTLER 1981, HASLAM 1994, LUCK et al. 1994).



**Abbildung 6: Stufen der Polyphenolbindung und -fällung durch prolinreiche Proteine (CHARLTON 2002)**

Siebert und Mitarbeiter haben sich speziell mit der Trübungsbildung und -vermeidung in Getränken befasst. Auch hier hatten Proanthocyanidine und prolinreiche Proteine den größten Einfluss auf die kolloidale Stabilität. Neben den Eigenschaften der beteiligten Substanzen beeinflusste auch noch deren Mengenverhältnis zueinander die Trübungsbildung (vgl. Abbildung 7). Die größte Bildungswahrscheinlichkeit lag bei einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 von trübungsaktivem Protein zu ebenfalls trübungsaktiven Polyphenolen. Des Weiteren testete Siebert die Wirkung der Medien, in denen sich diese Reaktionen abspielen. Der optimale pH-Bereich für eine Trübungsbildung zwischen Gliadin und Tannin lag zwischen pH 4,0 und 4,5. In diesem Bereich hatte auch die Alkoholmenge der Flüssigkeit einen starken Effekt auf die Reaktivität der beiden Partner. So wirkt sich ein steigender Alkoholgehalt in einem Bereich von 0 bis 6% (v/v) negativ auf die Trübungsbildung aus. Von 6 bis 12% (v/v) Alkohol erhöhte sich die Menge der absolut entstandenen Trübung mit höherer Ethanolkonzentration (SIEBERT et al. 1996a, SIEBERT et al. 1996b, SIEBERT und LYNN 1998, SIEBERT 1999, SIEBERT und LYNN 2000, SIEBERT und LYNN 2001).

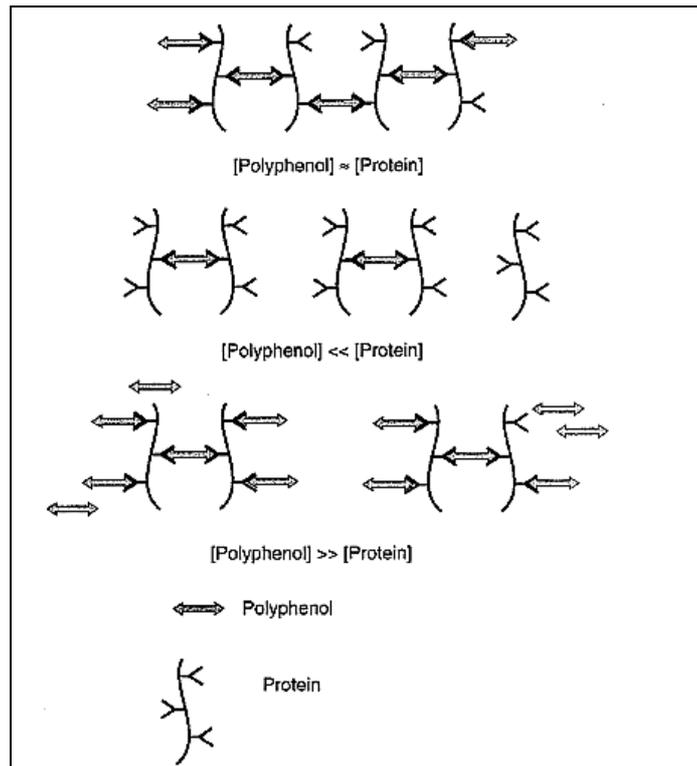


Abbildung 7: Mechanismen der Protein-Polyphenol-Reaktionen (SIEBERT 1999)

McMurrough et al. befassten sich insbesondere mit phenolischen, trübungsrelevanten Bierinhaltsstoffen. Das Verhalten der monomeren und dimeren Flavan-3-ole bei der Trübungsbildung wurde in diesen Arbeiten kontrovers und widersprüchlich diskutiert. Es wurde versucht durch ein Produkt aus trübungssensitivem Protein, nachgewiesen durch Fällung mit Tannin, und den identifizierten Proanthocyanidinen (Prodelphinidin B<sub>3</sub> und Procyanidin B<sub>3</sub>) ein Modell für die Trübungsbildung zu erstellen. Die untersuchten Proben zeigten eine Korrelation von  $r = 0,96486$  zwischen dem errechneten Faktor und der Trübungsbildung. Jedoch war der Probenumfang mit  $N=9$  gering (MCMURROUGH 1998, MCMURROUGH und O'ROURKE 1997, MCMURROUGH et al. 1992, MCMURROUGH et al. 1995, MCMURROUGH et al. 1996, MCMURROUGH et al. 1997).

Neben den bereits erwähnten Proteinen und Polyphenolen konnten auch Kohlenhydrate und anorganische Stoffe in isolierten Trübungen gefunden werden (WAINWRIGHT 1974). Eine exaktere Aufschlüsselung der Kohlenhydrate zeigten Belleau und Dadic. Sie wiesen einfache Kohlenhydrate wie Maltose, Glucose und Fructose so wie Dextrin nach (DADIC und BELLEAU 1980, BELLEAU und DADIC 1981). Die möglichen Reaktionen der Aldehyde und des Acetaldehyds mit Flavan-3-olen in Bier zeigten Delcour und Dondeyne anhand der Bayerkondensation (DELCOUR und DONDEYNE 1982).

Geschwindigkeitsbestimmend für die Trübungsbildung unter Einfluss der Polyphenole ist die „Aktivierung“ dieser Substanzen, d.h., die Oxidation in das reaktive ortho-Chinon (Vgl. Abbildung 8). Diese Umwandlung kann sowohl auf enzymatischem Wege, z. B. beim Maischen, als auch durch nicht enzymatische Oxidation der Polyphenole geschehen. Die entstandenen Intermediärprodukte,

die ortho-Chinone, können anschließend eine Vielzahl von Reaktionen, wie Kondensation, Polyphenol-Protein- und Polyphenol-Polysaccharid-Bindungen, eingehen (HASLAM et al. 1994, HASLAM 1998, RECHNER 2000, ROBARDS et al. 1999).

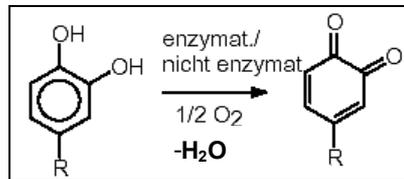


Abbildung 8: ortho-Chinonbildung (RECHNER 2000)

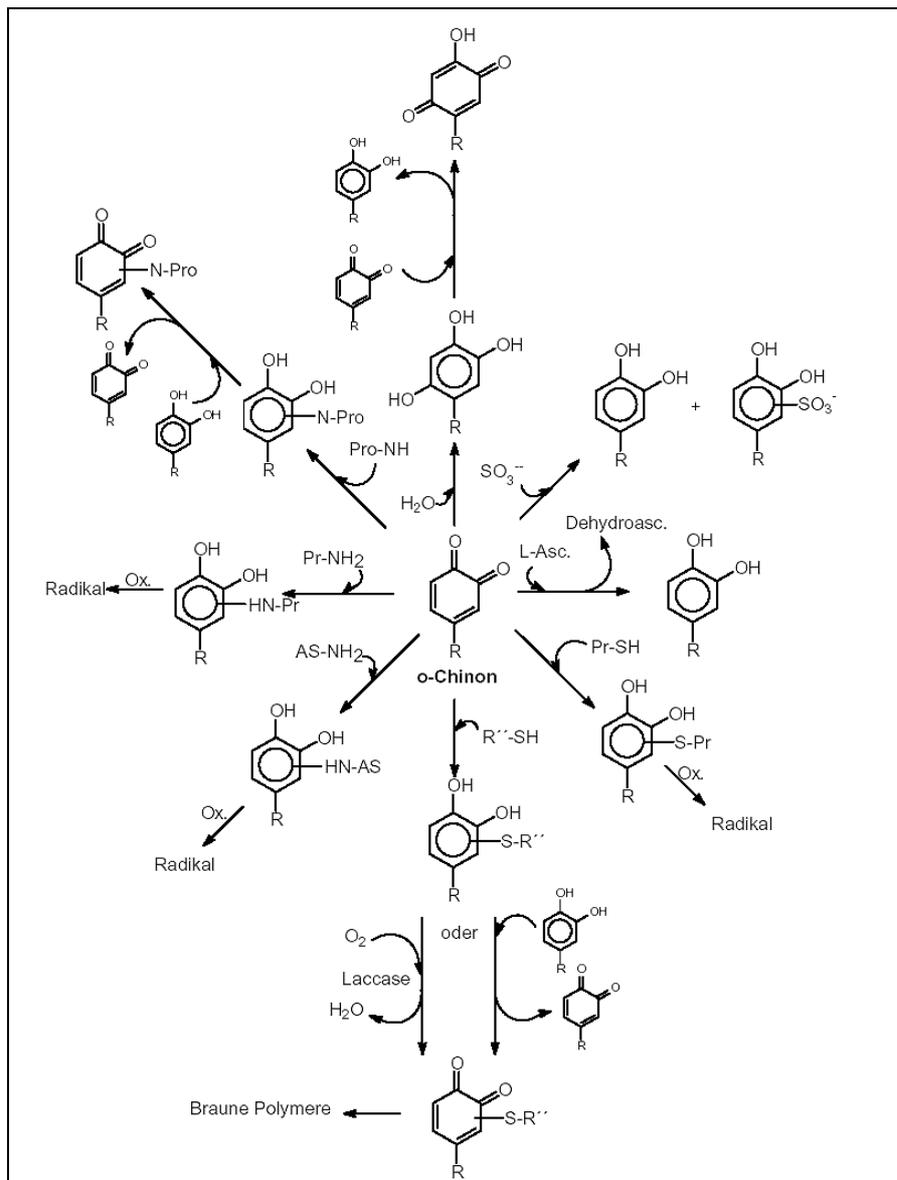


Abbildung 9: Reaktionen von ortho-Chinon mit unterschiedlichen Substanzen (Dehydroasc. = Dehydroascorbinsäure, L-Asc. = Ascorbinsäure, As-NH<sub>2</sub> = Aminosäure, Pr-NH<sub>2</sub> und Pr-SH = Protein, Pr-NH = Prolin, R''-SH = Cystein und Gluthaion) (ROBARDS et al. 1999)

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist u.a. abhängig von der Konzentration des im Bier gelösten Sauerstoffs. Es wurde versucht, den Verbleib des Sauerstoffs mit Hilfe von  $O^{18}$ -Isotopen zu untersuchen. Doch kamen verschiedene Arbeitsgruppen auf widersprüchliche Ergebnisse. Als oxidationskatalytisch können Metallionen wie Kupfer, Eisen und Selen wirken (MCFARLANE 1968, MOCEK und RICHARDSON 1972, NOEL et al 1999, OWADES und JACOVAC 1966).

## 2.6 Zielsetzung

Mechanismen der Entstehung kolloidaler Trübungen sind komplexe Vorgänge, die bis heute nicht vollständig geklärt sind. Es wurden Versuche unternommen, über die Konzentration von Proteinen oder Polyphenolen oder beider Reaktionspartner die Trübungsneigung untergäriger Biere zu bestimmen. Jedoch waren die angewandte Analysen meist zu unspezifisch, so dass keine exakten Bewertungen auf Grund der gewonnen Resultate vorgenommen werden konnten.

Diese Arbeit setzt die Dissertation von Papp fort (PAPP 2000). Eine Aufgabe liegt in der Weiterentwicklung der bestehenden Polyphenolanalytik. Wiederfindungsraten sollen verbessert, noch nicht quantifizierte Substanzen mengenmäßig erfasst und eventuell neue trübungsrelevante phenolische Stoffe identifiziert werden.

Neben der Analyse trübungsbildender Polyphenole sollen Proteine anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung und mit Hilfe der 2-D Elektrophorese untersucht werden. Dabei soll sich die Analytik nicht ausschließlich auf Bierproben beschränken, sondern auch die Proteinzusammensetzung isolierter Trübungen betrachtet werden.

Möglichkeiten, technologisch Einfluss auf die phenolische Zusammensetzung der Biere hinsichtlich ihrer Trübungsneigung zu nehmen, sollen erörtert werden. Hierzu müssen die verschiedenen Verfahrensschritte der Bierproduktion, von der Würzebereitung bis zur Filtration, betrachtet werden. Durch Veränderung der Prozessparameter soll analysiert werden, wie sich die Konzentration trübungsrelevanter Polyphenole mittels Modifikation der Technologie senken lässt.

Ein Teil der Arbeit wird sich mit der Möglichkeit zur Vorhersage der kolloidalen Stabilität beschäftigen. Es soll untersucht werden, ob und in welchem Maße die kolloidale Stabilität eines filtrierten, abgefüllten Bieres durch Analyse der trübungsrelevanten Polyphenole und Proteine im Vergleich zu einem Forciertest vorhergesagt werden kann.

Erste konkrete Untersuchungen bezüglich der Reaktionskinetik der Trübungsbildung müssen einbezogen werden. Mechanismen zur Entstehung kolloidaler Aggregate sollen beschrieben, mögliche Zusammenhänge zu Polyphenolen erkannt und dargestellt sowie Effekte weiterer involvierter Substanzen betrachtet werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Probenmaterial

Versuchsbier und Rohstoffe:

Bei den untersuchten Bieren handelte es sich um Verkaufsbier deutscher Brauereien. Würze, Jungbier oder Unfiltrat wurden jeweils aus der laufenden Produktion einer Brauerei entnommen, um möglichst konstante Prozessparameter zu erhalten.

Bei einigen Versuchsreihen wurden die Bierbereitung bzw. einzelne Verfahrensschritte der Bierproduktion in der Versuchsbrauerei des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II durchgeführt. Die verwendeten Rohstoffe stammten wiederum aus großtechnischen Betrieben. Für jede Versuchsreihe wurden identische Materialien verwendet.

Trübung:

Zur Gewinnung der entstandenen Kälte-trübungen, wurden die Biere bei 0 °C und 13000 U/min für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde je nach Versuch verworfen oder weiteren Analysen zugeführt. Das Sediment wurde zweimal mit 20 ml 5%iger Ethanollösung gewaschen und für 15 min bei 0 °C und 13000 U/min zentrifugiert. Der gewaschene Rückstand wurde in 10 ml bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommen und lyophilisiert. Die so aufbereiteten Proben wurden weiteren Analysen zugeführt oder in Eppendorfgläsern aufbewahrt.

#### 3.2 Polyphenolanalytik mittels HPLC

Im Laufe der Arbeit wurden Probenaufbereitung und HPLC-Methode weiter entwickelt. Die Verbesserungen spiegeln sich insbesondere in besseren Wiederfindungsraten und in einer einfacheren und damit weniger anfälligen Auswertung der Ergebnisse wider. Die beschriebenen Aufbereitungs- und Analyseverfahren sind chronologisch aufgeführt.

##### 3.2.1 Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion

Würzen, Jungbier und Unfiltratproben werden vor Aufgabe auf die Polyamidkartusche bei 9000 U/min und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Bier oder kohlendioxidhaltige Proben werden mittels Ultraschallbad entgast. Alle Proben werden vor der Analyse auf 20 °C temperiert.

##### 3.2.1.1 Modifizierte Methode nach Papp

Die hier beschriebene Methode wurde von Papp in Anlehnung an Bellmer etabliert (BELLMER 1995a, PAPP 2000) und im Rahmen dieser Arbeit modifiziert.

20 ml der zu untersuchenden Lösung werden auf eine zuvor mit 10 ml bidest. H<sub>2</sub>O konditionierte Polyamidkartusche aufgegeben. Anschließend wird mit 10 ml bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen und die Kartusche im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet. Darauf folgt eine Elution mit 80 ml Methanol. Das so gewonnene Eluat wird mittels Vakuumrotationsverdampfer bei 35 °C und 120 U/min bis zur Trockene eingengt. Nachfolgend wird der Rückstand in 10 ml einer 50%igen (v/v) Methanollösung im Ultraschallbad resuspendiert, die erhaltene Lösung membranfiltriert (0,45 µm) und in Rollrandfläschchen abgefüllt. Die so vorbereiteten Proben werden mittels der HPLC-Anlage analysiert.

### 3.2.1.2 Modifizierte Methode nach Galensa

Galensa und Mitarbeiter entwickelten eine Methode, die eine automatisierte Extraktion und Bestimmung von Proanthocyanidinen aus dem Malz erlauben. Das Vorgehen zeichnet sich besonders durch gute Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeit aus (PAPAGIANNOPOULOS et al. 2001, PAPAGIANNOPOULOS et al. 2002). Diese Arbeitsweise wurde für die Matrix Bier (und deren Vorprodukte) und die am Lehrstuhl vorhandenen Geräte abgeändert.

Die Polyamidkartuschen werden mit 10 ml bidest. H<sub>2</sub>O konditioniert und anschließend 40 ml Probe aufgegeben. Im nächsten Schritt wird die Polyamidkartusche mit 10 ml bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Stickstoff getrocknet. Darauf folgend werden die am Polyamid gebundenen Polyphenole mit einer 85%igen DMF-Lösung eluiert. Hierfür wird die Kartusche vier Mal mit 1 ml dieser Lösung gewaschen. Das gewonnene Eluat wird auf 4 ml aufgefüllt, filtriert, in Rollrandfläschchen abgefüllt und in die HPLC eingebracht.

Um eine verbesserte Analyse der Flavan-3-ole zu erzielen, wurde die Methode wiederum abgeändert. Bis zur Elution mit 85%iger DMF-Lösung handelt es sich um dieselbe Probenaufbereitung wie zuvor beschrieben. Anschließend wird jedoch auch die erste, mit 1 ml DMF-Lösung eluierte, Fraktion verworfen. Dadurch können störende phenolische Säuren zum Teil oder ganz entfernt werden. Mit weiteren 2,5 ml DMF-Lösung zu je 0,5 ml wird die Polyamidkartusche gewaschen, und die noch am Polyamid anhaftenden Flavan-3-ole werden gewonnen. Die erhaltene Lösung wird filtriert, abgefüllt und mittels HPLC aufgetrennt.

Die Proben wurden, wenn möglich, sofort weiter verarbeitet. Andernfalls wurden sie bis zur Analyse bei -70 °C aufbewahrt.

### 3.2.2 HPLC-Analytik

Modifizierte Methode nach Papp (PAPP 2000)

HPLC-Anlage: Perkin Elmer Serie 200, Autosampler, quarternäre Pumpe,  
Dioden Array Detektor

Säule: Lichrospher 100-5 RP-18 ec, 250-4, 4 µm

Vorsäule: CC 8/4 Lichrospher 100-5 RP-18 ec

Temperatur: 30 °C

Injektion: 50 µl

Flussrate: 1,0 ml/min

Druck: 100-120 bar

Eluenten: A: 1% Essigsäure

B: 1% Essigsäure in Acetonitril

Gradient (nicht linear):	Zeit [min]	A [%]	B [%]	Curve [-]
	5	95,0	5,0	0
	8	95,0	5,0	0
	15	85,0	15,0	-3
	20	60,0	40,0	2
	10	38,0	62,0	1
	10	29,	71,0	0
	3	95,0	5,0	0

Detektion Spektrum: 200-400 nm

Chromatogramm: 275 nm (±5 nm)

Durch Veränderung der Probenaufbereitung musste auch die HPLC-Analyse den neuen Gegebenheiten angepasst werden. Dadurch konnte eine bessere Auftrennung der Peaks erzielt werden.

HPLC-Anlage:	Perkin Elmer Serie 200, Autosampler, quarternäre Pumpe, Dioden Array Detektor			
Säule:	Lichrospher 100-5 RP-18ec, 250-4, 4 µm			
Vorsäule:	CC 8/4 Lichrospher 100-5 RP-18 ec			
Temperatur:	30 °C			
Injektion:	20 µl			
Flussrate:	0,8 ml/min			
Druck:	60-100 bar			
Eluenten:	A: 1% Essigsäure B: 1% Essigsäure in Acetonitril			
Gradient (nicht linear):	Zeit [min]	A [%]	B [%]	Curve [-]
	5	97,5	2,5	0
	35	92,5	7,5	1
	60	22,0	78,0	4
	5	22,0	78,0	0
Detektion	Spektrum: 200-400 nm Chromatogramm: 275 nm (±5 nm)			

Tabelle 2 zeigt die Wiederfindungsraten der alten und neuen Methode. In der alten Methode standen keine Referenzsubstanzen für Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> zur Verfügung.

**Tabelle 2: Wiederfindung der Flavan-3-ole in Bier**

Substanz	Methode alt	Methode neu
	Wiederfindung [%]	Wiederfindung [%]
(+)-Catechin	85-93	93-97
(+)-Epicatechin	84-92	90-96
Procyanidin B <sub>3</sub>	-	91-96
Prodelphinidin B <sub>3</sub>	-	91-94

Die Kalibrierung der HPLC erfolgte durch Referenzsubstanzen. Für die Berechnung der Konzentrationen dienten Kalibrierkurven aus fünf Punkten.

Abbildung 10 zeigt das Chromatogramm eines stabilisierten Bieres. Die Probe wurde nach der Methode unter 3.2.1.2 aufbereitet und mit der zuvor beschriebenen HPLC-Analytik aufgetrennt.

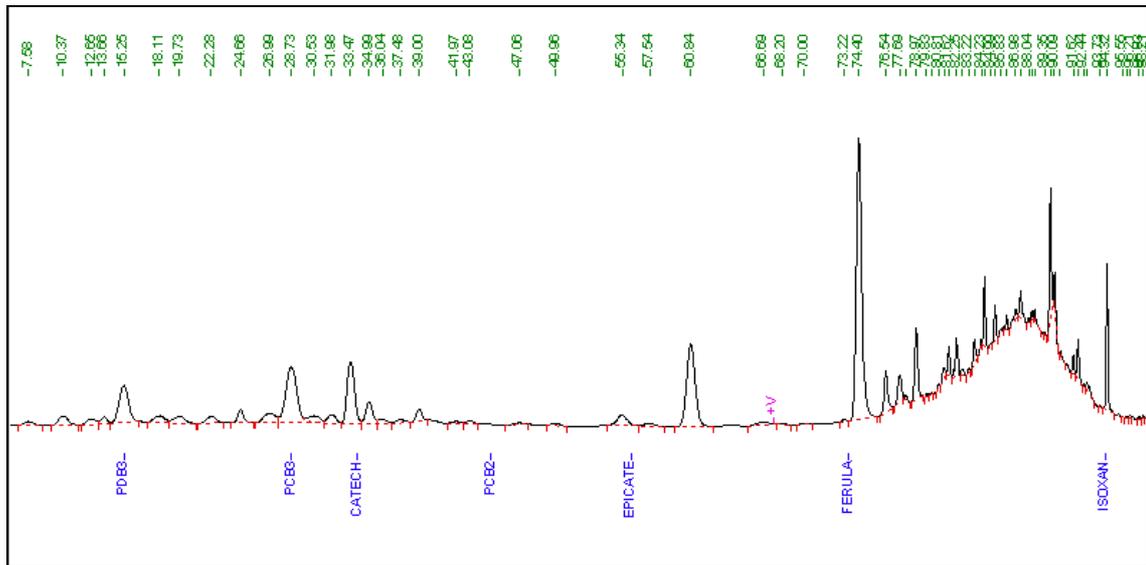


Abbildung 10: Beispielchromatogramm eines stabilisierten Bieres

Neben der Verbesserung der Analytik konnten während dieser Arbeit Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> quantifiziert und in Würzen und Unfiltratproben einiger Biere Procyanidin B<sub>2</sub> identifiziert werden.

### 3.3 Polyphenolanalytik

Flavanoide wurden nach der EBC-Methode „9.12 Flavanoids in Beer by Spectrophotometry“ bestimmt (EBC, Hrsg. 1987).

Tannine analysierte die Staatliche Brautechnische Prüf- und Versuchsanstalt Weihenstephan nach Messmethode PV SON01.

### 3.4 Proteinanalytik

#### 3.4.1 Aminosäureanalytik

Die Aminosäureanalytik wurde extern vergeben. Die Analysen wurden vom Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere und der Arbeitsgruppe Proteinanalytik Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) - Abteilung Biofunktionalität durchgeführt.

Methodenbeschreibung (CONDON 1986, HENLE et al. 1991, KRAUSE et al. 1995):

Unfiltratproben werden bei 9000 U/min und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Bier oder kohlendioxidhaltige Proben werden zuvor durch Schütteln/Rühren entgast.

Freie Aminosäuren:

Die Probe wird mit 0,1 mol/l HCL und 500 µmol/l Norleucin (interner Standard) versetzt. Die so behandelten Biere werden durch Mikro-Ultrafiltration/Zentrifugation an Ultrafree/Biomax 5 Ultrafiltrationseinsätzen bei 2000 U/min für 1 h deproteiniert. Die Bestimmung der freien Aminosäuren erfolgt durch Ionentauscherchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung durch Ninhydrin.

Hydrolyse der Bierproteine und Kältetrübungen:

Bei dieser Methode handelt es sich um eine salzsaure Hydrolyse. Aliquote Mengen an Bier bzw. Kältetrub werden mit 6 mol/l HCL und 400 µmol/l Norleucin versetzt. Die Hydrolysegläser werden mit Stickstoff begast und gasdicht verschlossen. Anschließend wird für 22 h bei 110 °C hydrolysiert. Nach Abkühlen wird das Hydrolysat im Vakuum eingedampft, in 500 µl Startpuffer des Aminosäureanalysators gelöst, membranfiltriert und 40 µl zur Analyse eingesetzt. Die Aminosäureanalyse erfolgt wie zuvor beschrieben.

### 3.4.2 2-D Elektrophorese

Die 2-D Elektrophorese folgte dem Handbuch von Prof. Görg und den Ausführungen Westermeiers (GÖRG et al. 2003, WESTERMEIER 2001).

Unfiltratproben werden bei 9000 U/min und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Bier und kohlendioxidhaltige Proben wurden zuvor im Ultraschallbad entgast.

Bierproteine werden mit Trichloressigsäure (20% w/v) bei 0 °C für 1 h gefällt. Anschließend werden die Proteine bei 13000 U/min und 0 °C für eine 1 h abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 25 ml kaltem (-20 °C) Aceton zwei Mal gewaschen und bei 15 °C, 13000 U/min für 15 min zentrifugiert. Anschließend wird die Probe im Speed Vac bis zur Trockene eingeengt. Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford wird die Probe in bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommen, die gewünschte Proteinmenge (mg/l) in Eppendorfgefäße überführt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird zur 2D-Elektrophorese verwendet.

Die gewonnenen und lyophilisierten Proteine werden in Lösungspuffer aufgenommen und anschließend 1 h bei 40000 U/min zentrifugiert. Der Lösungspuffer besteht aus 8 M Harnstoff, 15 mM DTT, 10 % Glycerin und Spuren Bromphenolblau.

Die zentrifugierte Probenlösung wird in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration auf trockene IPG-Strips gegeben. Die Rehydratisierung erfolgt über Nacht in einem Reswelling Tray.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgt nach den Empfehlungen des Herstellers der IPG-Strips (BERKELMAN and STENSTEDT 1998).

Die Äquilibration der IPG-Strips folgt den Vorgaben von Görg (GÖRG et al. 2003).

Die 2. Dimension (SDS-PAGE) wird auf fertigen Gelen durchgeführt. Die Laufbedingungen sind in

Tabelle 3 beschrieben.

**Tabelle 3: Laufbedingungen für SDS-Elektrophorese**

Zeit [min]	Spannung [V]	Strom [mA]	Leistung [W]	Temperatur [°C]
ca. 45 <sup>1)</sup>	100	20	50	15
Entfernen der IPG-Strips und versetzen des Kathodenpuffers				
ca. 120 <sup>2)</sup>	800	40	50	15

<sup>1)</sup> Bis Bromphenolblau-Front etwa 1 cm über der Probenaufgabe ist

<sup>2)</sup> Bis Bromphenolblau-Front etwa 0,5 cm vor Anodenpuffer ist

Silberfärbung der Proteine erfolgt nach Heukeshoven und Dernick. Die fertigen Gele werden in 3%iger Glycerinlösung konserviert (GÖRG et al. 2003).

### 3.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Analyse nach Bradford durchgeführt (BIO-RAD Hrsg., 2001). Als Standard diente eine BSA-Lösung.

## 3.5 Bieranalysen

Forciertest (0/40 °C) und Messung des Gesamtsauerstoffs wurde nach MEBAK durchgeführt (MEBAK 2000).

Alle weiteren brautechnischen Analysen wurden extern an die Staatliche Brautechnische Prüf- und Versuchsanstalt Weihenstephan vergeben. Die Methoden sind dem Leistungsverzeichnis des Instituts zu entnehmen (STAATLICHE BRAUTECHNISCHE PRÜF- UND VERSUCHSANSTALT WEIHENSTEPHAN, Hrsg. 2002).

## 3.6 Statistische Kenngrößen

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von SPSS 11.0 und SPSS 12.0 erstellt. Die Prüfungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha=0,05$  (P=95%, signifikant) und 2-seitiger Fragestellung durchgeführt. Bei allen Proben wurden Dreifach- bzw. wenn nicht anders möglich Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Nicht aufgeführte Geräte und Verbrauchsmaterialien gehören zur Laborgrundausrüstung. Für alle Fließmittel und Lösungen wurde bidest. Wasser verwendet.

Die Stabilisierungsmittel, Becosorb 1000 und Divergan F/RS, wurden freundlicherweise von den Firmen Begerow E. GmbH & Co. KG und BASF AG zur Verfügung gestellt.

Geräte:

Automated Gel Stainer, Hoefer, Amersham Bioscience, Freiburg

Baker SPE 21 System, J.T. Baker Inc., Grieslau

Chemie-Hybrid-Pumpe, Vacuumbrand, Wertheim

Espectofotometer Ultrospec 3100 pro, Cambridge, England

Flaschenschüttelmaschine, Dr. Thiedig & Co., Berlin

HPLC Autosampler Serie 200, Perkin Elmer, Düsseldorf

HPLC Dioden Array Detektor Serie 200, Perkin Elmer, Düsseldorf

HPLC Turbochrom Auswertesoftware, Perkin Elmer, Düsseldorf

HPLC Totalchrom Auswertesoftware, Perkin Elmer, Düsseldorf

HPLC quarternäre Pumpe Serie 200, Perkin Elmer, Düsseldorf

Immobiline™ strip tray, Amersham Bioscience, Freiburg

Kleinsudanlage mit ZKGs, BAM, Freising

LKB 2297 Macrodrive 5 Power Supply, Amersham Bioscience, Freiburg

LKB Multiphor 2117 Elektrophoresekammer, Amersham Bioscience, Freiburg

Optima™ TL, Ultracentrifuge, Beckman, München

Reswelling Tray, Amersham Bioscience, Freiburg

Rotationsverdampfer VV 2000, Heidolph, Kehlheim

Sauerstoffmessgerät Digox 5, Dr. Thiedig & Co., Berlin

Sauerstoffmessgerät Orbisphere, Modell 3650, Gießen

Sorvall RC-5B Hochleistungskühlzentrifuge, Kendro, München

Sorvall Rotoren SS-34, GSA und GS-3, Kendro, München

Tischzentrifuge 5415, 5402, Eppendorf, Hamburg

Trübungsmessgerät, Monitek, Düsseldorf

Verbrauchsmaterialien:

Alle Chemikalien für die Polyphenolanalytik besaßen HPLC-Reinheit

Aceton, HPLC-Gradient, J.T. Baker INC., Grieslau

Acetonitril, E. Merck, Darmstadt

Bromphenolblau Na-Salz, Serva, Heidelberg

BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V), Roche Diagnostics, Mannheim

Caffesäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

CC 8/4 Lichrospher 100-5 RP-18 ec, Macherey & Nagel, Düren

Chromabond PA 1000 mg, Macherey & Nagel, Düren

(+)-Catechin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

CuSO<sub>4</sub>, E. Merck, Darmstadt

DTT (1, 4 Dithiothreit) Roth, Karlsruhe

(+)-Epicatechin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Essigsäure HPLC-Gradient, E. Merck, Darmstadt

ExcelGel 2-D Homogeneous 12.5, Amersham Bioscience, Freiburg

FeSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O, E. Merck, Darmstadt

Ferulasäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Flavone, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Formaldehyd (37%) , Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Gallussäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Gallocatechin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Glutaraldehyde (25%), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Glycerin (87%), E. Merck, Darmstadt

Glycin, E. Merck, Darmstadt

Harnstoff, E. Merck, Darmstadt

Immobiline™ DryStrip, pH 3-10 NL, 7 cm, Amersham Bioscience, Freiburg

Isoxanthohumol, Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft mbH, Mainburg

Jodacetamide, Sigma -Aldrich, Taufkirchen

Lichrospher 100-5 RP-18 ec, 250-4, 4 µm, Macherey & Nagel, Düren

Methanol, HPLC-Gradient, J.T. Baker INC., Grieslau

Natriumacetat, E. Merck, Darmstadt

Natriumazid, Roth, Karlsruhe

Natriumcarbonat, E. Merck, Darmstadt

Natrium-Thiosulfat-Pentahydrat, E. Merck, Darmstadt

N,N-Dimethylformamid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Paracumarsäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

p-Dimethylaminocinnamaldehyde, Sigma-Aldrich, Steinheim

Procyanidin B<sub>1</sub>, Extrasynthese, Lyon, Frankreich

Procyanidin B<sub>2</sub>, Extrasynthese, Lyon, Frankreich

Procyanidin B<sub>2</sub>, Fachgebiet Obstbau, Technische Universität München

Procyanidin B<sub>3</sub>, Leuven Bioproducts, Leuven, Belgien

Procyanidin B<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Procyanidin C<sub>1</sub>, Fachgebiet Obstbau, Technische Universität München

Prodelphinidin B<sub>3</sub>, Institut für pharmazeutische Chemie, Universität Münster

Prodelphinidin B<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad, München

Salzsäure, J.T. Baker INC., Grieslau

SDS (Natriumdodecylsulfat), Serva, Heidelberg

Silbernitrat, E. Merck, Darmstadt

Sinapinicsäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Syringasäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Trichloressigsäure, J.T. Baker INC., Grieslau

Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), E. Merck, Darmstadt

Vanilinsäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Wasserstoffperoxid, E. Merck, Darmstadt

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Technologische Einflussmöglichkeiten auf trübungsrelevante Polyphenole

#### 4.1.1 Sudhaustechnologie und Würzebehandlung

Die folgenden Kapitel sollen klären, inwieweit die kolloidale Stabilität, bzw. daran beteiligte Polyphenole, durch technologische Variationen der Würzebereitung beeinflusst werden können.

##### 4.1.1.1 Maischtechnologie

Wenige Autoren beschäftigten sich bisher mit dem Verlauf trübungsrelevanter Polyphenole während der Würzebereitung. So standen bei Gromus und Lustig die Summenparameter Gesamtpolyphenole und Tannoide im Mittelpunkt der Untersuchungen und nicht die für die Ausbildung von Trübungspartikeln aussagekräftigeren Flavan-3-ole (GROMUS und LUSTIG 1999).

Bellmer et al. befassten sich eingehender mit der Polyphenolzusammensetzung während der Bierbereitung. Sie untersuchten das Verhalten verschiedener Phenolsäuren, des Catechins, Epicatechins und Procyanidins B<sub>3</sub>. Die Analysen ließen während des Maischprozesses zwei gegenläufige Vorgänge erkennen. Die Mengen an monomeren Flavan-3-olen in der Würze nahmen über die Maischzeit ständig zu, dagegen reduzierte sich der Gehalt des Dimers Procyanidin B<sub>3</sub> gegen Ende des Verfahrenschritts. Während des Abläuterns stiegen die Konzentrationen aller untersuchten, phenolischen Substanzen in der Würze an. Dieses Verhalten wurde mit der Erhöhung des pH-Werts des Anschwänzwassers während der Nachgüsse erklärt. Auf genauere Einzelheiten der Prozessparameter, wie Temperatur und Länge der Rasten, wurde hier nicht eingegangen (BELLMER et al. 1995b).

Bei McMurrough und Delcour lagen die detektierten Flavan-3-ole kurz nach Beginn der Maischarbeit (50 °C-Rast) vollständig gelöst vor. Während der weiteren Maischarbeit fiel die Konzentration höherer Polyphenole ab, gleichzeitig erhöhte sich der Gehalt an Catechin. Diesen gegensätzlichen Verlauf von Monomeren und Dimeren begründeten die Autoren mit der Depolymerisierung der Proanthocyanidine. Epicatechin konnte in der Maische nicht nachgewiesen werden und wurde erst nach Kochen der Würze in den Proben gefunden (MCMURROUGH und DELCOUR 1994).

Keiner der genannten Autoren befasste sich explizit mit der Auswirkung von Dauer und Temperatur der Maischrasten auf die Zusammensetzung des Polyphenolspektrums. Die folgenden Versuche beschäftigten sich mit der Fragestellung, inwieweit sich durch Variation des Maischprogramms die Konzentration trübungsbildender Polyphenole verändern lässt. Hierfür wurden in einer 50 Liter Pilotanlage verschiedene Maischprogramme gefahren und die Konzentration der Flavan-3-ole in der flüssigen Phase der Maische analysiert.

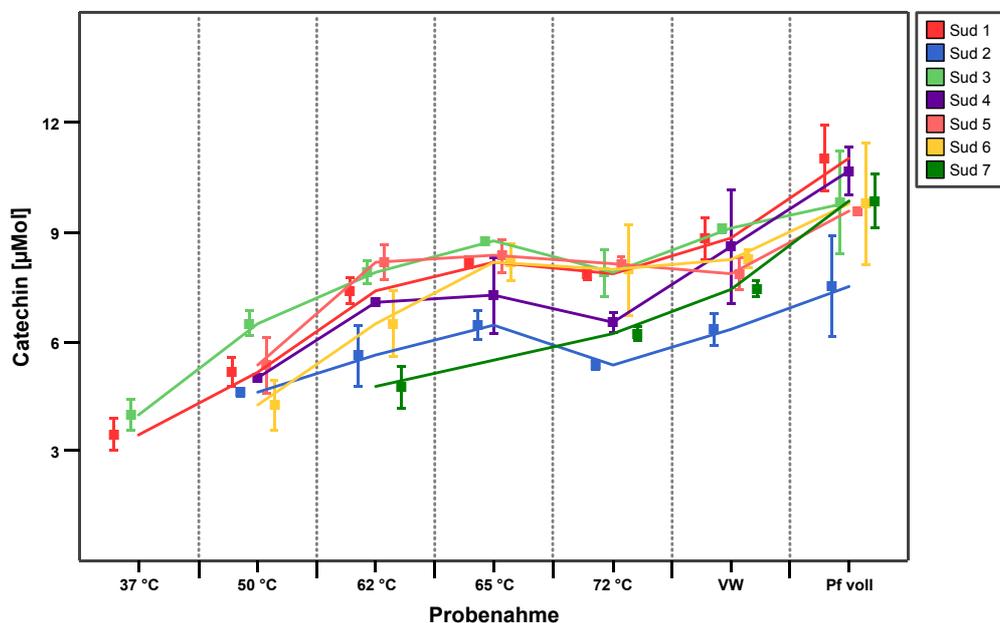
Bei allen Suden wurde das Infusionsmischverfahren angewendet. Die Unterschiede der Programmführung zeigt Tabelle 4. Die Probenahme erfolgte gegen Ende der jeweiligen Rast, unmittelbar vor der Aufheizphase.

**Tabelle 4: Variationen des Infusionsmischverfahrens; Dauer der temperaturzugehörigen Rasten in min; die Rast bei 72 °C wurde bei Sud 1-6 bis zur Jodnormalität gehalten, mindestens jedoch 15 min.**

T/°C	Sud 1	Sud 2	Sud 3	Sud 4	Sud 5	Sud 6	Sud 7	
37	20		60					
50	30	30	30	60	30	30		
62	30	30	30	30	60	30	75	
65	25	25	25	25	25	60		
72			Jodreaktion					70

Das Schüttungsverhältnis betrug bei allen Suden 1:3,5. Die Sude wurden mit Brauwasser gleicher Qualität und dem Malz einer Charge hergestellt. Auch Läuterprozesse und Anschwänzen wurden, so dies technologisch möglich war, identisch durchgeführt.

Die Flavan-3-olgehalte der Maischen wurde auf die gewonnene Vorderwürzekonzentration umgerechnet und zur Gegenüberstellung der einzelnen Sude auf 11 GG-% Stammwürze bemessen.



**Abbildung 11: Catechinverlauf während verschiedener Maischprogramme; Werte auf 11 GG-% Stammwürze berechnet**

Trotz unterschiedlicher Maischprogramme und verschiedener Einmischtemperaturen verlaufen

die Kurven der Catechinkonzentrationen nahezu parallel. Die Differenzen der einzelnen Sude stellten sich als nicht signifikant heraus. Während des Maischens stiegen die Catechingehalte bis zu einer Temperatur von 65 °C kontinuierlich an. In der 72 °C-Rast stagnierte die Lösung des Catechins bzw. reduzierte sich dessen Menge in der Würze geringfügig. Im weiteren Maischprozess und während des Abläuterns erhöhte sich der Gehalt des Monomers wieder und erreichte ein Maximum in der Pfanne-voll-Würze. Ähnliche Ergebnisse erlangten schon andere Autoren (BELLMER et al. 1995b, MCMURROUGH und DELCOUR 1994). Einzig im Hoch-Kurz-Maischverfahren (Sud 7) löste sich Catechin kontinuierlich über alle beobachteten Prozessschritte. Nach dem Abläutern lag der Gehalt des Polyphenols aber auch in diesem Sud im Bereich von 9 µMol, so dass kein Unterschied zu den anderen Proben erkennbar war.

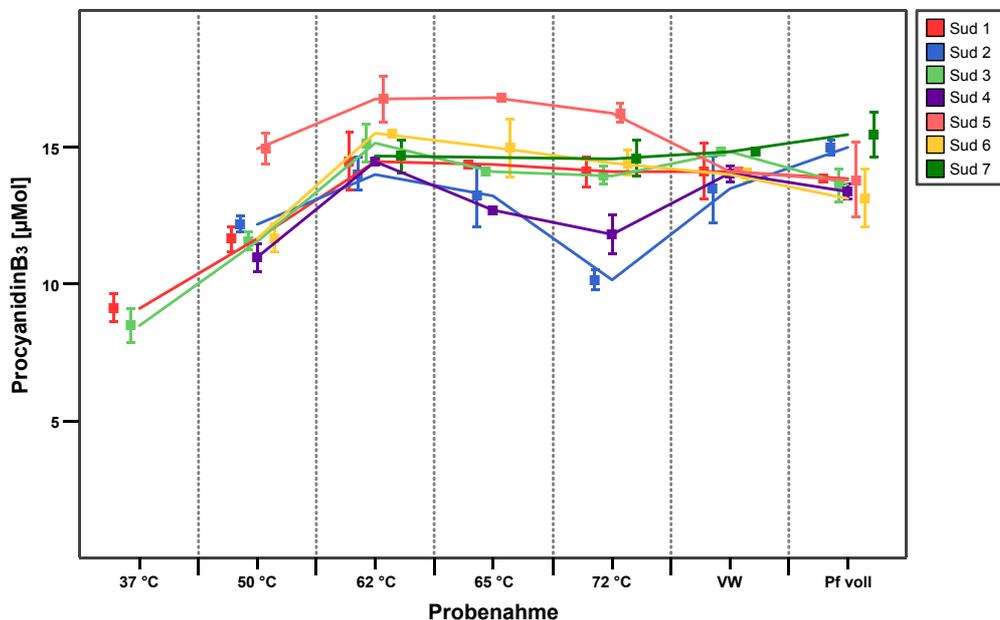


Abbildung 12: Procyanidin B<sub>3</sub>-Verlauf während verschiedener Maischprogramme; Werte auf 11 GG-% Stammwürze berechnet

Procyanidin B<sub>3</sub> erwies sich temperaturempfindlicher als Catechin. Die Substanz löste sich, unabhängig von der Einmischtemperatur, zu Beginn der Maischarbeit sehr rasch. Die höchsten Werte, von ca. 15 µMol, zeigten sich bereits nach Abschluss der 62 °C-Rast. In den darauf folgenden Prozessschritten nahmen die Konzentrationen des Dimers unterschiedlich ausgeprägt ab. Während sich die Menge an Procyanidin B<sub>3</sub> in den Suden 1, 3, 5 und 6 gering, aber kontinuierlich reduzierte, fiel diese bei Sud 2 und 4 rasch ab und erreichte ein relatives Minimum nach der 72 °C-Rast. Anschließend stiegen die Werte jedoch in die Bereiche der anderen Sude an. Die beobachteten Unterschiede konnten nicht durch das Maischprogramm erklärt werden. Gleiches galt für die bis zur Vorderwürze erhöhten Werte des Sud 5.

Eine Sonderstellung nahm auch hier das Hoch-Kurz-Maischverfahren ein. Ähnlich dem Catechin

löste sich das Dimer Procyanidin B<sub>3</sub> über die gesamte Zeit, ohne dass sich die Konzentration in einem Prozessschritt verringerte. Die Freisetzung des Stoffes war zum Zeitpunkt des Abmischens nicht beendet und es kam zu einer weiteren Lösung des Polyphenols während der Nachgüsse. Die resultierende Menge in der Pfanne-voll-Würze lag jedoch im Bereich der anderen Sude, so dass sich keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Die Abnahme bzw. die geringe Veränderung der Konzentration des Procyanidin B<sub>3</sub> nach Erreichen der 62 °C-Rast könnte folgende Ursachen haben. Zum einen könnte das Dimer zu diesem Zeitpunkt schon vollständig aus Malz und Trebern gelöst gewesen sein oder nicht mehr freigesetzt werden. Zum anderen reagierte diese Substanz bei höheren Temperaturen möglicherweise mit weiteren Würzeinhaltsstoffen. Gegen die Theorie der vollständigen Lösung sprechen die Ergebnisse anderer Forschungsarbeiten, die nach Beenden des Läuterns noch Procyanidin B<sub>3</sub> aus den Trebern extrahieren konnten (BELLMER et al. 1995a,b, MCMURROUGH und DELCOUR 1994). Für die zweite Vermutung spricht, dass Procyanidin B<sub>3</sub> eine größere Reaktivität als monomere Flavan-3-ole besitzt und es dadurch bei Temperaturen >62 °C zur Umsetzung des Polyphenols kommen kann (MULKAY und JERUMANIS 1983). Es ist vorstellbar, dass hier enzymatische (Polyphenoloxidasen), bzw. nicht enzymatische Oxidationsprozesse auftreten und diese für die Abnahme des Procyanidin B<sub>3</sub> verantwortlich sind. Auf Grund der reaktiven Intermediärprodukte dieser Reaktionsprozesse lässt sich diese Fragestellung bisher nicht klären (HASLAM 1998, MCMURROUGH und DELCOUR 1994).

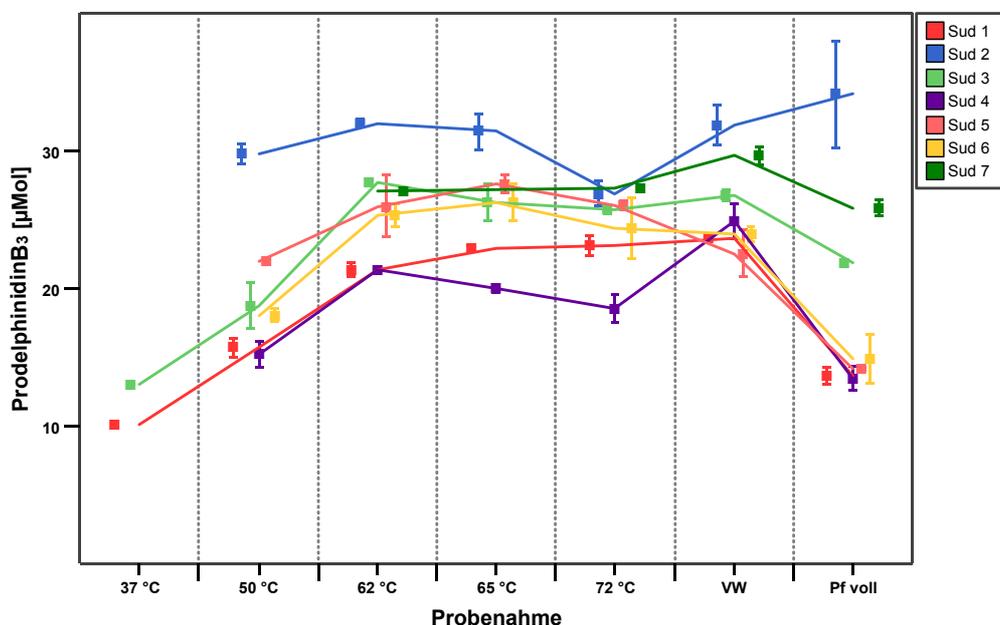


Abbildung 13: Prodelpinidin B<sub>3</sub>-Verlauf während verschiedener Maischprogramme; Werte auf 11 GG-% Stammwürze berechnet

Bis zu einer Temperatur von 62 °C löste sich Prodelpinidin B<sub>3</sub> bei allen untersuchten Proben

rasch. In den darauf folgenden Prozessschritten war der Verlauf der Lösungskurven allerdings weniger einheitlich als zuvor bei Catechin und Procyanidin B<sub>3</sub>. Die Konzentration an Prodelphinidin B<sub>3</sub> nahm während der 65 °C und 72 °C-Rast bei den meisten Suden, wenn auch sehr unterschiedlich ab. Ein leichte Zunahme war bei Sud 5 und 7 zu erkennen. Von der 72 °C-Rast bis zur Vorderwürze erhöhte sich die Prodelphinidinmenge in allen Proben, außer bei Sud 5 und 6. Während des Läuterns nahm der Prodelphinidingehalt nahezu aller Sude ab – eine Ausnahme bildete Sud 2. Bei vier der sieben Sude verringerte sich die Konzentration an Prodelphinidin B<sub>3</sub> um ca. 50%. Der Konzentrationsverlauf von Sud 2 war gegenläufig zu allen anderen Beobachtungen. Der Wert dieser Probe erhöhte sich von der 72 °C-Rast bis zu einem Maximum in der Pfanne-voll-Würze.

Die starke Reduktion während des Läuterns und gleichzeitiger Heißhaltephase der Würze kann wiederum mit der unvollständigen Lösung und der höheren Reaktionsfreude des Prodelphinidin B<sub>3</sub> erklärt werden. Auf Grund des dimeren Charakters und einer zusätzlichen Hydroxygruppe ist das Prodelphinidin B<sub>3</sub> in diesem Fall das reaktivste nachgewiesene Flavan-3-ol. Durch diese Eigenschaften kann es mit anderen Stoffen bei höheren Temperaturen schnell umgesetzt werden. So ergaben sich bei Maischprogrammen mit den geringsten Intensitäten, Sud 2 und 7, auch die höchsten Werte an Prodelphinidin. Eine 100%ige Freisetzung des Dimeres während des Maischens und anschließender Verdünnung durch das Anschwänzen wurde auch hier auf Grund der in der Literatur dargestellten Sachverhalte ausgeschlossen (BELLMER et al. 1995a, HASLAM 1998, MCMURROUGH und DELCOUR 1994, MULKAY UND JERUMANIS 1983, SIEBERT 1999).

Wie bei McMurrough und Delcour konnte auch in diesen Versuchsreihen kein Epicatechin während des Maischprozesses nachgewiesen werden. Diese Substanz scheint sich durch Depolymerisierung beim Kochen der Würze zu bilden bzw. wird durch den Hopfen in das Bier eingebracht (MCMURROUGH und DELCOUR 1994).

Da auf eine Hopfengabe während des Kochens vollständig verzichtet wurde, in der Ausschlagwürze jedoch Epicatechin in einer Konzentration von  $2,25 \pm 0,28 \mu\text{Mol}$  vorlag, musste sich die Substanz gebildet oder soweit aufkonzentriert haben, dass sie nachgewiesen werden konnte. Letzteres wurde auf Grund der geringen Eindampfung ausgeschlossen. Es sollte sich daher um Depolymerisierung höherer kondensierter Flavan-3-ole handeln. Eine Isomerisierung des Catechins konnte gleichfalls ausgeschlossen werden, da auch dieses Monomer nach der Kochung in leicht höheren Mengen vorlag.

Eine genauere Besprechung des Verhaltens der Polyphenole während der Kochung der Würze erfolgt in Kapitel 4.1.1.3. Es soll darauf hingewiesen werden, dass der Kochprozess die Polyphenolzusammensetzung der Würze stark beeinflusst. Durch Ausfällungsreaktionen, Polymerisierung, Depolymerisierung und Einbringen der Hopfengerbstoffe können sich abhängig von Hopfenprodukt, Kochtemperatur, Kochzeit und Kochsystem die Gehalte unterschiedlich und verschieden ausgeprägt verändern (BELLMER et al. 1995a, DELCOUR et al. 1987, GROMUS und LUSTIG 1999, MCMURROUGH und DELCOUR 1994, NARZISS 1994, NARZISS und GROMUS 1982).

Es konnte in diesen Versuchsreihen gezeigt werden, dass die Variation des Maischprozesses keinen oder nur geringen Einfluss auf die Zusammensetzung der trübungsrelevanten, nachgewiesenen Flavan-3-ole hatte. Weder höhere Einmischtemperaturen noch intensives oder extensives (Hoch-Kurz-Maischverfahren) Maischen hatten einen direkten Effekt auf die betrachteten Polyphenole. Geringe Unterschiede stellten sich als nicht signifikant heraus oder egalisierten sich in folgenden Prozessschritten. Da durch die Technologie des Maischens der Gehalt an Flavan-3-olen kaum verändert werden kann, nimmt die Rohstoffauswahl hier eine besondere Stellung ein. Dies bestätigen auch die Arbeiten anderer Forschungsgruppen, in denen gezeigt wurde, wie Malze in ihrem Gehalt an Catechinen variieren und somit stark die Qualität eines Bieres beeinflussen können (BELLMER et al. 1995a, DELCOUR et al. 1987, FRIEDRICH 2000, GROMUS und LUSTIG 1999, MCMURROUGH und DELCOUR 1994).

#### 4.1.1.2 Würzebelüftung

Ein in jüngster Vergangenheit verstärkt diskutierter Verfahrensschritt der Bierbereitung ist die Würzebelüftung. So erörterten Burkert et al. die negativen Einflüsse der Würzebelüftung auf Geschmacksstabilität und Redoxpotential fertiger Biere (BURKERT et al. 2003). In den folgend beschriebenen Experimenten wurde untersucht, wie sich die für die Trübungsbildung verantwortlichen Flavan-3-ole durch Belüftung bzw. Nichtbelüftung der Anstellwürze veränderten. Hierfür wurden mit derselben Würze vier Gärtanks mit gleicher Hefezellzahl und identischer Hefe angestellt. Die Würzen wurden mit Hefe versetzt und entweder ohne oder konventionell mit Belüftung angestellt. Die konventionelle Belüftung entsprach einer Sauerstoffkonzentration in der Anstellwürze von 7-9 mg/l. Zwei der vier Tanks wurden mit Hefe versetzt, die zuvor mit 0,25 bzw. 2,0 mg/l O<sub>2</sub> in Form von Wasserstoffperoxid gewaschen wurde. Diese Vorbehandlung sollte als so genannte Hefebelüftung eine Alternative zur herkömmlichen Belüftung darstellen.

Durch eventuelle Konzentrationsveränderungen der Flavan-3-ole könnte, neben der Auswirkung auf die kolloidale Stabilität, auch die oxidative Schädigung des Bieres durch die Würzebelüftung ermittelt werden. Mit einer ähnlichen Methode wies Dörr die Beeinträchtigung durch Sauerstoff in Kunststoffflaschen nach (DÖRR 2003, DÖRR und WEISSER 2001).

Die Proben für die HPLC-Analysen wurden beim Anstellen, nach dem ersten Gärtag, nach der Reifung und gegen Ende der Lagerung gezogen. Die Gärung verlief isotherm bei 9 °C, gefolgt von einer Reifephase von einer Woche bei 4 °C und einer Lagerung von 14 Tagen bei 0 °C.

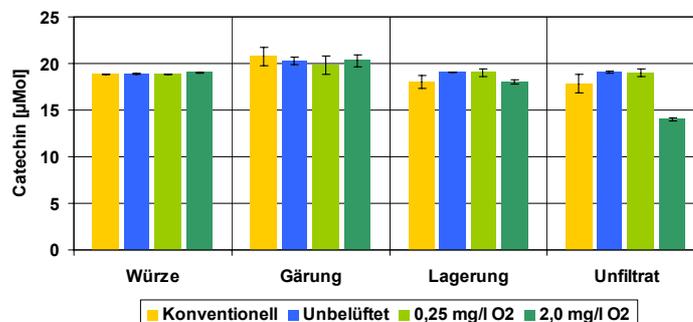


Abbildung 14: Veränderung des Catechins durch Variation der Würzebelüftung

Ausgehend von der selben Konzentration in der Würze veränderte sich der Gehalt an Catechin über den ersten Gärtag minimal. Während der Gärung zeigte sich bei allen Tanks eine leichte Erhöhung der Catechinkonzentration auf etwa 20 µMol. Am Ende der Reifephase stellten sich geringe Unterschiede bei den Catechinwerten ein, die sich um den Ausgangswert der Würze einpendelten. Im Unfiltrat ließen sich größere Differenzen zwischen den Mengen an Catechin erkennen. Der unbelüftete Tank und das Bier, welches mit 0,25 mg/l O<sub>2</sub> vorbehandelter Hefe hergestellt worden war, besaßen die höchsten Gehalte an Catechin. In dem konventionell hergestelltem Bier verringerte sich die Catechinkonzentration nicht signifikant. Der Tank, angestellt mit einer zuvor mit 2,0

mg/l O<sub>2</sub> behandelten Hefe, zeigte dagegen eine starke Verminderung der Catechinmenge. In diesem Fall traten oxidative Schädigungen des resultierenden Bieres auf, welche durch die Reduktion des Monomers deutlich wurden.

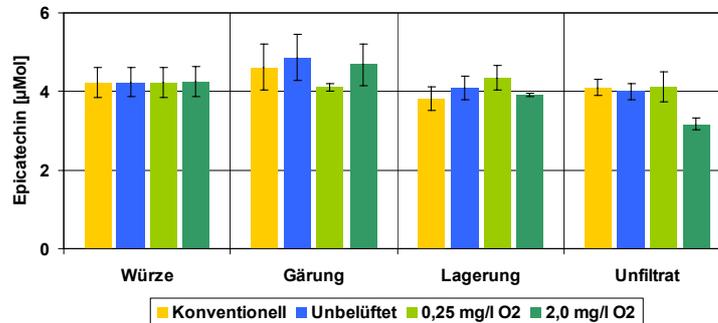


Abbildung 15: Veränderung des Epicatechins durch Variation der Würzebelüftung

Die von vornherein geringe Konzentration an Epicatechin (4,2 µMol) stieg in den beobachteten Tanks während des ersten Gärtages unterschiedlich stark an. Im weiteren Verlauf der Gärung, Reifung und Lagerung reduzierten sich die Gehalte des Monomers bei allen beobachteten Versuchsbieren. Im Unfiltrat konnte lediglich in dem aus mit 2,0 mg/l O<sub>2</sub> behandelter Hefe hergestelltem Bier eine verminderte Epicatechinmenge von 3,2 µMol beobachtet werden. Die anderen Proben lagen auf einem Niveau und im Konzentrationsbereich der Anstellwürze. Somit ließ sich auch hier eine Beeinträchtigung der Bierinhaltsstoffe durch die hohe Wasserstoffperoxidgabe erkennen.

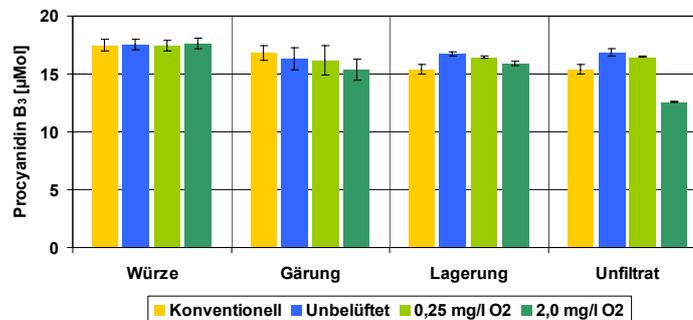


Abbildung 16: Veränderung des Procyanidins B<sub>3</sub> durch Variation der Würzebelüftung

Nach dem ersten Gärtag reduzierte sich der Gehalt an Procyanidin B<sub>3</sub> ungleichmäßig. Deutlich war der Rückgang wiederum bei dem mit intensiv vorbehandelter Hefe produziertem Jungbier. Die Differenzen der Gärtanks stellten sich jedoch als nicht signifikant heraus. Nach der Reifephase hoben sich die Unterschiede zwischen den Proben stärker hervor. Die Menge des Procyanidins war in der unbelüfteten Würze und dem mit 0,25 mg/l O<sub>2</sub> vorbehandelter Hefe gewonnenen Bier am höchsten und im Wertebereich der Anstellwürze. Indes verringerte sich die Konzentration des Dimers in den beiden anderen Tanks gegenüber der ersten Messung. Diese Tendenz verstärkte sich bis ins Unfiltrat. Hier waren deutliche Differenzen zwischen konventioneller Anstelltechnologie

und der Hefebelüftung mit Wasserstoffperoxid zu beobachten. Während die Menge an Procyanidin B<sub>3</sub> im Referenzsud gering abnahm, reduzierte sie sich bei dem mit 2,0 mg/l O<sub>2</sub> vorbehandelter Hefe vergorenem Bier um ein Viertel. Eine Hefebelüftung mit höheren Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beeinträchtigte auch hier die Quantität des Procyanidin B<sub>3</sub> im Unfiltrat.

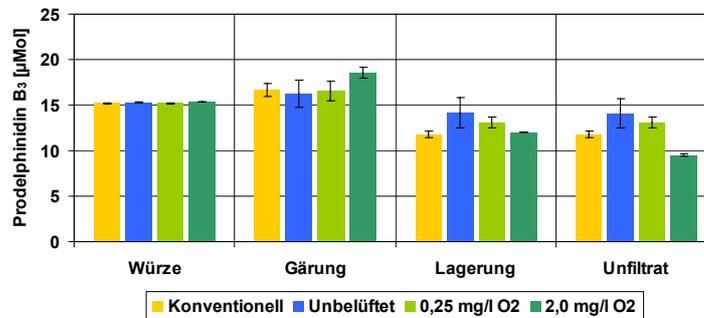


Abbildung 17: Veränderung des Prodelphinidins B<sub>3</sub> durch Variation der Würzebelüftung

Der Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Gehalt stieg in der ersten Gärphase bei allen Proben zunächst leicht an, verminderte sich aber in der folgenden Reifung und Lagerung stark. Die während der Lagerung genommenen Proben bestätigten die Ergebnisse der zuvor betrachteten Substanzen. Auch bei Prodelphinidin B<sub>3</sub> reduzierten sich die Konzentrationen in dem konventionell belüfteten Bier und der Probe mit dem höchsten Wasserstoffperoxidzusatz am deutlichsten. Das Jungbier der unbelüfteten Würze ergab dagegen mit 14,1 µMol den höchsten Wert. Diese Tendenzen setzten sich im Unfiltrat fort, wobei der mit Wasserstoffperoxid vorbehandelter Hefe vergorene Tank eine weitere deutliche Reduktion erfuhr. Im Gegensatz zu den beiden betrachteten Monomeren Catechin und Epicatechin sowie dem Dimer Procyanidin B<sub>3</sub> verringerte sich der Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Gehalt bei allen Bieren.

Die Unterschiede in der Polyphenolzusammensetzung der analysierten Biere durch die Würzebelüftung waren gering. Einzig die Zugabe eines Äquivalents von 2,0 mg/l O<sub>2</sub> an Wasserstoffperoxid zur Hefebelüftung verringerte die Konzentration aller untersuchten Flavan-3-ole signifikant. Eine weniger ausgeprägter, aber erkennbare Reduktion der Polyphenole zeigte die konventionelle Belüftung und damit eine oxidative Schädigung des Produktes. Die Polyphenolwerte der unbehandelten Probe veränderten sich dagegen kaum.

Die Beeinträchtigung konnte in den meisten Fällen erst gegen Ende der Lagerung festgestellt werden. Das wiederum könnte bedeuten, dass zunächst andere Stoffgruppen als die Flavan-3-ole oxidiert wurden und diese mit den untersuchten Substanzen reagierten.

Auf Grund der analytischen Möglichkeiten konnte nicht festgestellt werden, ob durch Reduktion der Flavan-3-ole höhere kondensierte und damit reaktivere Proanthocyanidine gebildet wurden. Ebenso offen ist, ob diese Proanthocyanidine schon im Unfiltrat mit anderen Trübungsbildnern zu Komplexen reagierten und diese durch Filtration entfernt werden könnten. Oder sie gelangen als „aktivierte“ Polyphenole in das fertige Bier und setzten dort die kolloidale Stabilität herab. Das Filtrieren

und Abfüllen der Biere an einer Pilotanlage konnte keine weiteren Aufschlüsse geben. Andere Faktoren, wie die adsorptive Wirkung der Kieselgur und der Filterschichten, hatten hier einen größeren Einfluss auf die Zusammensetzung der Biere als die Würzbelüftung. Dennoch konnten oxidative Schädigungen der Würzeinhaltsstoffe anhand der Abnahme der Flavan-3-ole dokumentiert werden.

#### 4.1.1.3 Brauen mit hohen Stammwürzen

Das Brauen mit hohen Stammwürzen bietet den Brauereien die Möglichkeit, Energiekosten zu sparen und je nach Verfahren Kapazitäten vom Sudhaus bis einschließlich Filtration zu schaffen. Gleichzeitig nutzen die Brauereien durch Blending die Möglichkeit der Stammwürzekorrektur. Die positiven Effekte des High Gravity Brewings (HGB) auf die kolloidale Stabilität der resultierenden Biere wurden bereits beobachtet (NARZISS 1995, RINGHOLT 2000, WACKERBAUER 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Zusammensetzung konventionell hergestellter Biere von Bieren, welche nach dem HGB-Verfahren produziert wurden, unterscheiden. Hierfür wurden Sude unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt und das Verhalten der Flavan-3-ole über den Brauprozess beobachtet. Der Verdünnungsschritt erfolgte zum einen nach Kochung der Würze und zum anderen nach der Filtration. Um die Sude vergleichen zu können, wurden die Konzentrationen der Flavan-3-ole auf 12 GG-% Stammwürze bezogen. Drei unterschiedliche Stammwürzekonzentrationen wurden miteinander verglichen: 12, 13 und 15 GG-%. Alle Sude wurden aus derselben Vorderwürze hergestellt. Steriles, entgastes Brauwasser diente zum Einstellen der Stammwürze im Rahmen des HGB. Die Probenahme erfolgte vor Kochen der Würze, beim Anstellen sowie jeweils nach Gärung, Reifung und Lagerung des Bieres, nach Filtration (ohne Stabilisierung) und in den verdünnten Filtratproben.

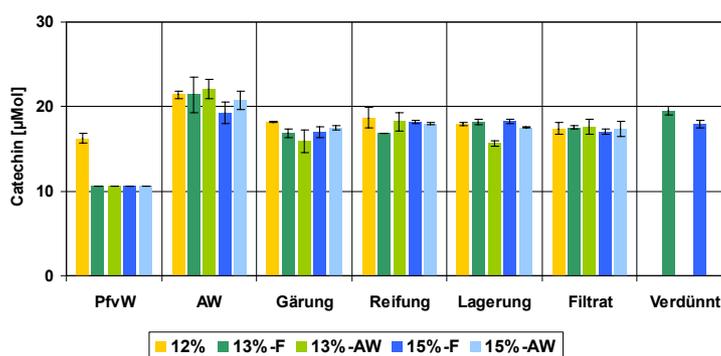
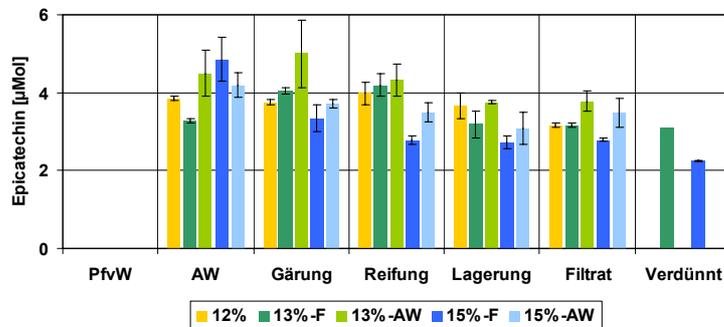


Abbildung 18: Verhalten des Catechins beim Brauen mit hohen Stammwürzen, berechnet auf 12 GG-%, F: Verdünnung im Filtrat, AW: Verdünnung in der Ausschlagwürze

Der Catechinverlauf verhielt sich bei allen Suden gleich. Durch Depolymerisierung und Hopfung der Würze erhöhte sich der Gehalt von der Pfanne-voll- zur Ausschlagwürze. Der Konzentrationsanstieg war in den HGB-Suden stärker als bei dem 12%igem Referenzsud. Die zu Beginn hohe Menge an Catechin im Referenzsud erklärte sich durch die kontinuierliche Lösung des Monomers während des Maischens und insbesondere dem darauf folgenden gegenüber dem HGB intensiveren Abläutern (vgl. Kapitel 4.1.1.1).

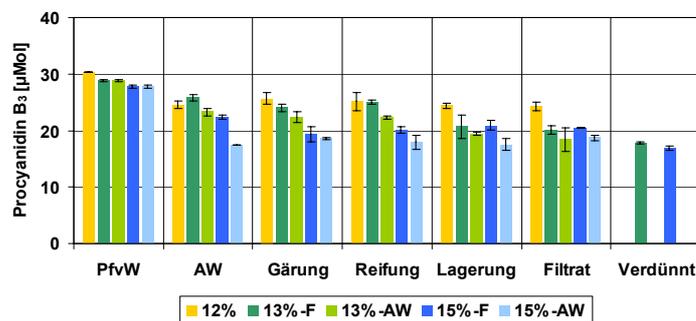
Trotz großer Differenzen zwischen den Catechinkonzentrationen zu Beginn der Kochung glichen sich die Werte der Ausschlagwürze wieder aneinander an, so dass keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren. Im weiteren Verlauf der Bierbereitung nahm die Menge an Catechin gering-

fällig ab. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Suden gestalteten sich als marginal. Das Brauen mit hohen Stammwürzen hatte also keinen Einfluss auf die Menge des im Bier wieder gefundenen Catechins. Der erhoffte positive Effekt des HGB auf dieses Polyphenol trat somit nicht ein.



**Abbildung 19: Verhalten des Epicatechins beim Brauen mit hohen Stammwürzen, berechnet auf 12 GG-%, F: Verdünnung im Filtrat, AW: Verdünnung in der Ausschlagwürze**

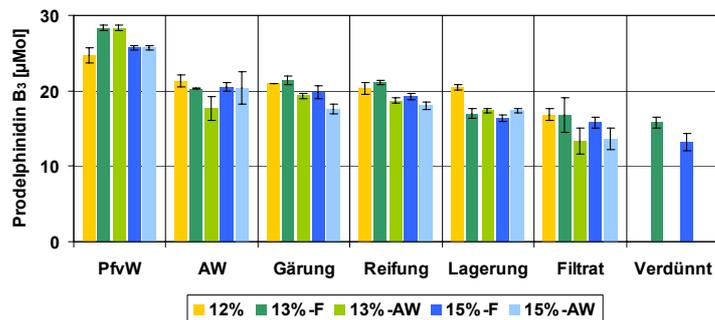
Der Gehalt von Epicatechin schwankte erheblich zwischen den einzelnen Suden. In der Ausschlagwürze erreichte der Sud mit einer Stammwürze von 13% den geringsten Wert. Die Mengen an Epicatechin der anderen Würzen unterschieden sich dagegen nicht signifikant. Deutlich waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Stammwürzekonzentrationen nach der Reifephase. Während die 12- und 13%igen Sude keine Differenzen erkennen ließen, war der Epicatechingehalt der mit 15% Stammwürze hergestellten Sude am geringsten. Nach der Lagerzeit glichen sich die Epicatechinkonzentrationen an, bis diese nicht mehr signifikant zu unterscheiden waren. Das Brauen mit hohen Stammwürzen hatte, auf Grund der geringen Konzentration des Monomers und der stärkeren Einflüsse anderer Prozessparameter, kaum einen Effekt auf die im Bier enthaltene Menge an Epicatechin.



**Abbildung 20: Verhalten des Procyanidins B<sub>3</sub> beim Brauen mit hohen Stammwürzen, berechnet auf 12 GG-%, F: Verdünnung im Filtrat, AW: Verdünnung in der Ausschlagwürze**

Mit abnehmender Stammwürzekonzentration stieg der Gehalt an Procyanidin B<sub>3</sub> in den Pfannevoll-Würzen leicht an. Auch hier kam es also zu einer geringfügigen weiteren Lösung des Polyphen-

nols während des Läuterns, so dass die 12%ige Würze die größte Menge des Dimers aufwies. Durch den Kochprozess reduzierten sich, wenn auch unterschiedlich stark, bei allen Suden die Konzentrationen an Procyanidin B<sub>3</sub>. Am deutlichsten nahm der Procyanidingehalt des in der Würzepfanne rückverdünnten 15%igen Sudes ab. Die Differenzen in den Ausschlagwürzen der restlichen Sude waren zunächst marginal. Während der weiteren Prozessschritte erhöhte sich der Konzentrationsunterschied an Procyanidin B<sub>3</sub> des Referenzsud gegenüber den anderen Suden. Die nach dem High-Gravity-Verfahren hergestellten Biere lagen dagegen auf einem Niveau. Eine erhöhte Stammwürzekonzentration führte somit zu einer Verringerung des Procyanidins B<sub>3</sub> im filtrierten, abgefüllten Bier.



**Abbildung 21: Verhalten des Prodelphinidins B<sub>3</sub> beim Brauen mit hohen Stammwürzen, berechnet auf 12 GG-%, F: Verdünnung im Filtrat, AW: Verdünnung in der Ausschlagwürze**

Bei Prodelphinidin B<sub>3</sub> konnte man die höchsten Werte vor Kochbeginn in den Würzen der 13%igen Sude beobachten, während die anderen Proben auf einem ähnlichen, etwas niedrigeren Niveaubereich lagen. Auch bei dieser Substanz kam es durch den Kochprozess zu starken Veränderungen. Der Prodelphinidingehalt reduzierte sich bei allen untersuchten Würzen auf ca. 20 µMol. Die ohnehin geringen Unterschiede in den Ausschlagwürzen verminderten sich während Gärung, Reifung und Lagerung des Bieres noch weiter. Einzig der Wert des 12%igen Bieres war leicht erhöht. Nach der Filtration waren allerdings Differenzen zwischen den im Sudhaus rückverdünnten Bieren und den restlichen Proben zu erkennen. Diese Abweichungen stellten sich jedoch als nicht signifikant heraus. Die Verdünnung der filtrierten Biere ließ eine weitere Reduktion der Werte erkennen. Diese Verminderung – theoretisch nicht möglich, da alle Proben auf 12 GG-% Stammwürze berechnet wurden – könnte durch Oxidationsvorgänge aufgrund des im Verdünnungswassers enthaltenen Sauerstoffs erklärt werden.

Das Brauen mit hohen Stammwürzen hatte unterschiedlichen Einflüsse auf das Verhalten der untersuchten Flavan-3-ole. Geringe oder keine Auswirkungen zeigte diese technologische Variante auf die Monomeren Catechin und Epicatechin. Dagegen reduzierten sich die Werte des Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> gegenüber dem Referenzsud signifikant. Eine Erhöhung der Stammwürze um ein Prozent ergab geringere Konzentrationen der Dimere in den resultierenden Unfiltraten. Ein Ursache für das unterschiedliche Verhalten monomerer und dimerer Flavan-3-ole könnte die Art der Hopfengabe sein. Durch die Hopfung mit Pellets werden monomere Flavan-3-ole und

geringe Mengen Procyanidin B<sub>3</sub> in die Würze eingebracht, die Konzentration an Prodelphinidin B<sub>3</sub> verändert sich dagegen nicht (BELLMER et al. 1995b, MCMURROUGH und DELCOUR 1994, PAPP 2000). Die für das Brauen mit hohen Stammwürzen angepasste, gesteigerte Hopfung der Würze hatte einen größeren Einfluss auf den Gehalt an Catechin und Epicatechin als auf die dimeren Vertreter der Flavan-3-ole. Somit konnte bei der letztgenannten Stoffgruppe ein stärkerer Rückgang erkannt werden.

Auf die Qualität des Brauwassers ist bei der Verdünnung der Biere besonders zu achten. Hinsichtlich Geschmacks- und Trübungsstabilität muss die Sauerstoffbelastung des Ausmischwassers so gering wie möglich gehalten werden, da es sonst zur Oxidation und folgender Polymerisierung der Polyphenole führen kann, die sich wiederum negativ auf die kolloidale Stabilität auswirkt.

Das HGB könnte neben der Senkung von Energiekosten oder der Kapazitätserhöhung dazu beitragen, den Einsatz von Stabilisierungsmittel zu reduzieren oder die kolloidale Stabilität der Biere zu erhöhen. Weitere Faktoren, wie der Einsatz gerbstofffreier Hopfenprodukte oder unterschiedlicher Stabilisierungsarten, müssen hierfür noch analysiert werden.

#### 4.1.2 Lagertemperatur

Der Einfluss der Lagertemperatur des Jungbieres auf die resultierende Stabilität des fertigen Bieres wird kontrovers diskutiert. Fordert Narziß eine kalte Nachgärung, folgend eine kalte Reifung und schließlich eine Kaltphase von etwa 7 Tagen, um kolloidal stabile Biere zu erhalten, so zeigten Madigan et al., dass kein Unterschied zwischen einer Lagerung bei 0 und 4 °C bestand (MADIGAN et al. 2000, NARZISS 1995). Bei Gromus und Lustig erwiesen sich Anthocyanogen-, Tannoid- und Polyphenolgehalt über die Lagerung als weitestgehend konstant (GROMUS und LUSTIG 1999). Bellmer et al. beobachteten eine geringe Reduktion des Catechins während der Nachreifung und Lagerung, wogegen sich die Konzentration an Epicatechin nicht veränderte (BELLMER et al. 1995b). Bisher wurden jedoch keine Untersuchungen durchgeführt, die sich mit Lagertemperatur, -zeit und den sich eventuell dadurch ergebenden Veränderungen der Flavan-3-ole befassen.

Folgende Lagerversuche sollten zeigen, ob sich die Flavan-3-ole während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich verhalten. Hierfür wurde Jungbier nach dem Schlauchen bei 0, 4 und 11 °C gelagert. Die Probenahme erfolgte jeweils nach einer Lagerzeit von einer, zwei und drei Wochen. Hefen und Trubstoffe wurden abzentrifugiert und der klare Überstand auf phenolische Substanzen analysiert.

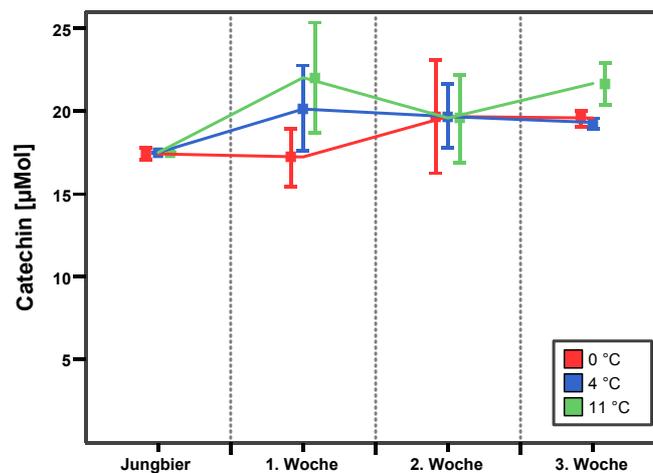


Abbildung 22: Verhalten des Catechins bei unterschiedlichen Lagertemperaturen

Der Konzentrationsverlauf des Catechins erwies sich als relativ temperaturunabhängig. Zwar zeigte sich, dass je höher die Lagertemperatur gewählt worden war, desto ausgeprägter war der Konzentrationsanstieg des Catechins. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In der zweiten Woche pendelten sich die Werte auf einem gegenüber dem Jungbier leicht erhöhtem Niveau ein. Während sich die Catechinmenge der bei 0 und 4 °C gelagerten Biere nicht änderte, stieg der Gehalt des Monomers bei einer 11 °C Lagerung in der dritten Woche nochmals auf 22 µMol geringfügig an. Auch Papp beobachtete ähnliche Konzentrationssteigerungen des Catechins gegenüber dem Jungbier bei einer 0 °C-Lagerung über vier Wochen (PAPP 2000).

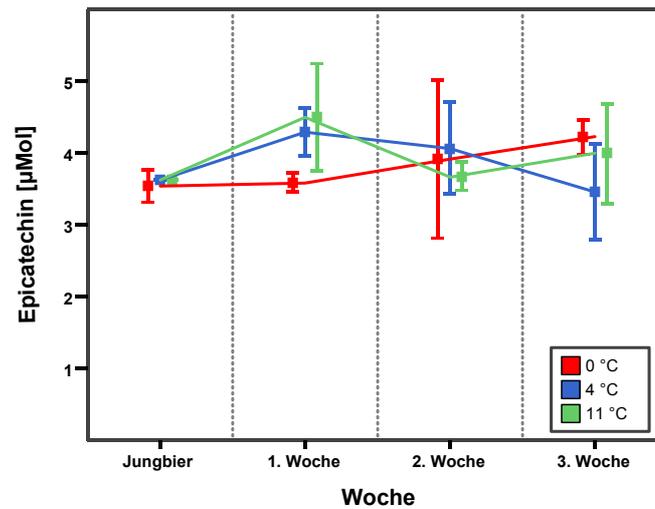


Abbildung 23: Verhalten des Epicatechins bei unterschiedlichen Lagertemperaturen

Während bei 0 °C gelagertem Bier der Verlauf des Epicatechin dem Catechin ähnelte, entwickelten sich die Konzentration des Monomers der Biere bei 4 und 11 °C unterschiedlich. Bei beiden Temperaturen kam es zunächst zu einem Anstieg der Konzentrationen auf 4,3 µMol, bevor sich der Epicatechingehalt in der zweiten Woche reduzierte. Bei einer Lagerkellertemperatur von 0 und 11 °C stiegen die Mengen des Polyphenols in der dritten Woche wieder leicht an, bei 4 °C reduzierte sich die Konzentration wiederum geringfügig. Bei den geringen Mengen an Epicatechin in den untersuchten Proben konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden.

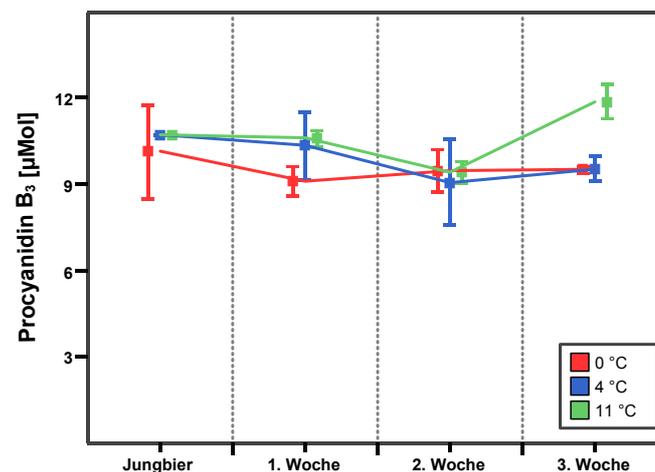


Abbildung 24: Verhalten des Procyanidins B<sub>3</sub> bei unterschiedlichen Lagertemperaturen

Je geringer die Temperatur gewählt worden war, desto stärker nahm, wenn auch nicht signifikant, die in Bier vorhandene Menge an Procyanidin B<sub>3</sub> ab. Bei Lagertemperaturen von 4 und 11 °C reduzierte sich der Gehalt von der ersten zur zweiten Woche, bei 0 °C verminderte sich die Procy-

Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Konzentration bereits nach dem Schlauchen. Die Werte der bei 0 und 4 °C gelagerten Biere veränderten sich im Anschluss an diese Reduktion nicht mehr. Der Procyanidingehalt des bei 11 °C aufbewahrten Bieres stieg dagegen am Ende der Lagerzeit an und erreichte mit 12,1 µMol ein Konzentrationsmaximum aller hier untersuchten Proben. Einzig diese Erhöhung stellte sich als signifikant heraus.

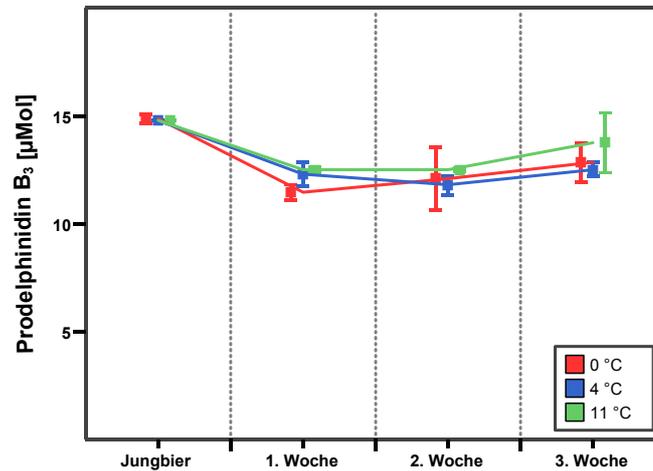


Abbildung 25: Verhalten des Prodelphinidins B<sub>3</sub> bei unterschiedlichen Lagertemperaturen

Vergleicht man die Konzentrationsverläufe des Prodelphinidins B<sub>3</sub>, so ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschieden gelagerten Bieren. Innerhalb der ersten Woche reduzierte sich die im Bier nachgewiesene Menge des Dimers in allen Bieren um etwa 20% auf 12,5 µMol. In der folgenden Zeit stiegen die Prodelphinidingehalte geringfügig an. Längere Lagerzeiten führten zu einer Freisetzung des Polyphenols und dadurch zu einem Anstieg der Konzentrationen in den Bier. Den höchsten Wert erreichte wiederum das bei 11 °C gelagerte Bier.

Ein Einfluss der Lagertemperatur auf die Flavan-3-ol-zusammensetzung konnte nicht nachgewiesen werden. Zwar stiegen die Werte insbesondere des bei 11 °C gelagerten Bieres gegen Ende der Beobachtungszeit an. Diese Erhöhung war allerdings nicht signifikant, allenfalls waren Tendenzen zu erkennen. Anders stellte sich die Auswirkung auf den pH-Wert dar.

Tabelle 5: pH-Wert der Biere in Abhängigkeit von der Temperatur und Lagerzeit

	1. Woche	2. Woche	3. Woche
0 °C	4,09	4,09	4,15
4 °C	4,09	4,13	4,19
11 °C	4,11	4,21	4,26

Einen Effekt auf die Trübungsbildung der resultierenden Biere dürfte der mit längerer Lagerzeit und

---

erhöhte Lagertemperatur zunehmende pH-Wert des Unfiltrats haben (vgl. Tabelle 5). Durch fortschreitende Autolyse der Hefe kann es im Bier zu einer Erhöhung des pH-Wertes kommen. Diese Verschiebung des pH-Optimums hat wiederum Einfluss auf die Komplexbildung zwischen Protein und Polyphenol, deren Maximum bei einem pH-Wert von 4,2 liegt (SIEBERT 1999). D.h. je weniger Trübungsagglomerate sich im Unfiltrat bilden und durch die Filtration entfernt werden können, desto höher ist das Trübungspotential im fertigen Bier.

### 4.1.3 Stabilisierung

Die Stabilisierung sowohl eiweiß- als auch polyphenolseitig ermöglicht dem Brauer eine Korrektur der Konzentration trübungsrelevanter Bierinhaltsstoffe. Trotz der großen Bedeutung für die Menge an Trübungsbildnern im Bier, soll darauf nur kurz eingegangen werden. Zum einen befassten sich mehrere Autoren mit diesem Thema, zum anderen haben eine Vielzahl von Faktoren Einfluss auf die Effektivität der Stabilisierung, wie z.B. die Verfahrenstechnik und Strömungsmechanik der Filtration. Es scheint schwer, allgemeingültige Aussagen oder eine umfassende Bewertung zu treffen. Belegt wird dies durch eine Befragung von 152 Brauereien, bei der 72 unterschiedliche Filtrationssysteme und Stabilisierungsmöglichkeiten auftraten (ANGER 1983, FREEMAN et al. 2003a, 2003b, 2003c, GROMUS und LUSTIG 1999, LEIPER et al. 2002, LEIPER et al. 2003, MCMURROUGH 1998, MCMURROUGH et al. 1992, 1993, 1995, MUSSCHE 1997, NARZISS 1994, NARZISS und GROMUS 1982, PAPP 2000, PAPP et al. 2000, SIEBERT und LYNN 1997, 1998, WEBER 1999).

Die folgenden Versuchsreihen beschäftigen sich mit der Tankstabilisierung als eine Möglichkeit zur Einsparung von Stabilisierungsmittel und deren Einsatz bei alternativen Filtersystemen, wie der Cross-Flow-Filtration. Des Weiteren wird die Kontrolle des Stabilisierungseffekts unter Verwendung der HPLC-Analytik im Vergleich zu zwei konventionellen nasschemischen Methoden betrachtet.

#### *4.1.3.1 Vergleich Tankstabilisierung und Durchlaufkontaktverfahren*

Ein wesentliches verfahrenstechnisches Element, um auf die chemisch-physikalische Stabilität eines Bieres Einfluss zu nehmen, ist die Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Bier und Stabilisierungsmittel. Schon bei einer geringfügiger Verlängerung dieser Zeit beobachtete Meier eine Erhöhung der kolloidalen Stabilität (MEIER 2000).

In diesen Versuchen wurde untersucht, wie sich die Tankstabilisierung auf eine mögliche Reduktion trübungsrelevanter Polyphenole im Vergleich zum Durchlaufkontaktverfahren auswirkt. Die Untersuchungen wurden im Kleinmaßstab (20 l) durchgeführt. Die Lager- und somit Kontaktzeit der Tankstabilisierung lag im Durchschnitt bei 12 Tagen. Neben verworfenem PVPP wurde auch Xerogel zur Stabilisierung eingesetzt. Als Referenz diente ein nicht stabilisiertes Bier.

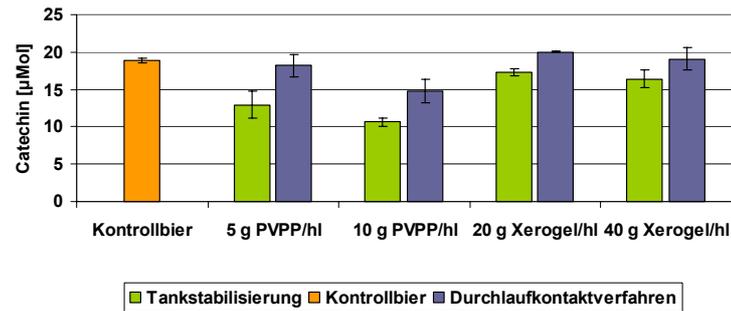


Abbildung 26: Catechingehalt verschieden stabilisierter Biere

Der Vergleich zwischen Durchlaufkontaktverfahren und Tankstabilisierung zeigte unabhängig vom eingesetzten Stabilisierungsmittel eine bessere Reduzierung des Catechins bei längeren Kontaktzeiten. PVPP verringerte auf Grund seiner selektiven Wirkung die Menge des Monomers stärker als das eiweißseitig wirkende Xerogel. Je höher die PVPP-Dosage gewählt worden war, desto stärker verminderte sich auch die im Bier enthaltene Menge an Catechin. Die Verminderung der Catechinkonzentration durch Xerogel bei der Tankstabilisierung war in beiden beobachteten Bieren gleich groß.

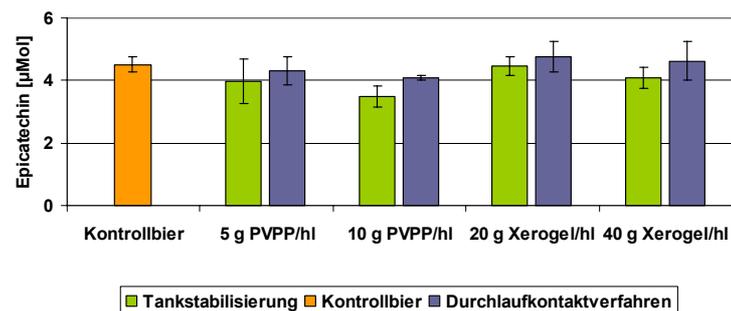


Abbildung 27: Epicatechingehalt verschieden stabilisierter Biere

Keine oder nur geringe Stabilisierungswirkung hatten PVPP und Xerogel auf Epicatechin. Einzig die Reduktion des Monomers durch 10 g/hl PVPP im Tankverfahren war signifikant. Die weiteren Werte zeigten kaum Unterschiede. Allenfalls Tendenzen konnten beobachtet werden, welche den Ergebnissen der Betrachtung des Catechins ähnelten. Ein Grund für die geringen Auswirkungen der Stabilisierungsmaßnahmen lag in der niedrigen Ausgangskonzentration der Substanz in den untersuchten Bieren.

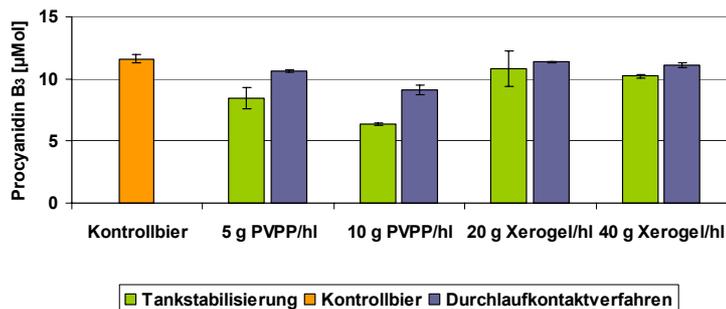


Abbildung 28: Procyanidin B<sub>3</sub>-Gehalt verschieden stabilisierter Biere

Procyanidin B<sub>3</sub> wurde durch PVPP in dessen Konzentration stark verringert. Hier zeigten sich große Differenzen zwischen den unterschiedlichen Verfahren. Eine Gabe von 10 g/hl PVPP und Tankstabilisierung reduzierte die Procyanidinmenge um etwa 50 Prozent. Im Durchlaufkontaktverfahren wurde die Konzentration des Stoffes bei gleicher Stabilisierungsmittelmenge um ca. 30 Prozent verringert. Bei einer Dosage von 5 g PVPP/hl im Lagertank konnte ein Rückgang um 3,11 µmol Procyanidin B<sub>3</sub> pro Liter beobachtet werden. Dies entsprach einer Reduktion um 25 Prozent. Eine PVPP-Dosage von 10 g/hl im Durchlaufkontaktverfahren brachte nur eine unwesentlich stärkere Verminderung des Dimers gegenüber der Tankstabilisierung mit der halben Menge an PVPP.

Die Stabilisierung mit Xerogel beeinflusste den Gehalt an Procyanidin B<sub>3</sub> unwesentlich. Eine geringe Abnahme ließ der mit 40 g/hl versetzte Lagertank erkennen. Die anderen Werte der eiweißseitigen Stabilisierung lagen im Bereich der Kontrollprobe.

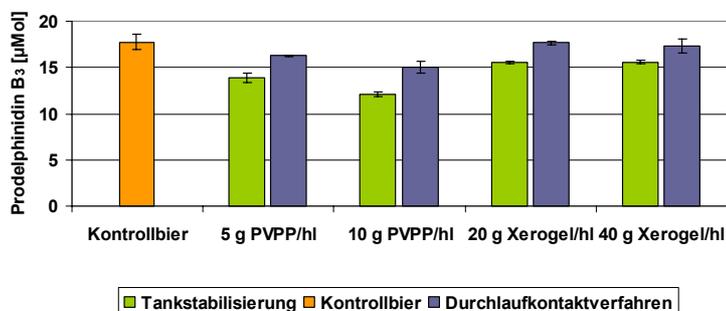


Abbildung 29: Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Gehalt verschieden stabilisierter Biere

Bei der PVPP-Stabilisierung reduzierte sich der Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Gehalt im Vergleich zu Procyanidin B<sub>3</sub> nur gering. Auch die Verringerung bei der Tankstabilisierung gegenüber dem Durchlaufkontaktverfahren war weniger ausgeprägt wie bei Procyanidin B<sub>3</sub>. Allerdings trat bei Prodelphinidin B<sub>3</sub> eine erkennbare Reduktion während der Tankstabilisierung durch den Zusatz von Xerogel auf. Diese erwies sich stärker als bei der 5 g/hl PVPP-Stabilisierung im Durchlaufkontaktverfahren. Die eiweißseitige Stabilisierung in der laufenden Dosage konnte dagegen keine Verminderung des Dimers bewirken.

Es zeigte sich, dass trübungsrelevante Flavan-3-ole durch die Tankstabilisierung stärker als beim

Durchlaufkontaktverfahren reduziert werden. Die längere Kontaktzeit ermöglicht einen Einsatz von weniger Stabilisierungsmittel beziehungsweise eine Verbesserung der kolloidalen Stabilität bei gleicher Menge an Stabilisatoren. Schon geringe Mengen an PVPP (5 und 10 g/hl) wirkten sich positiv auf die Reduktion der Flavan-3-ole aus. Insbesondere Catechin und Procyanidin B<sub>3</sub> wurden hierdurch entfernt.

Partiell konnte das eiweißseitig wirkende Xerogel die Flavan-3-ole entfernen. Diese Reduktion durch Silicagel wurde schon von McMurrough und Papp beobachtet und mit der Bindung der Polyphenole an die zu entfernenden Proteine und damit gleichzeitiger Verringerung der phenolischen Substanzen erklärt (LEIPER et al. 2002, MCMURROUGH et a. 1993, PAPP 2000). Die reduzierende Wirkung auf die Flavan-3-ole des Kieselgels hatte jedoch nur bei der Tanksstabilisierung Erfolg.

#### 4.1.3.2 Kontrolle des Stabilisierungseffekts

Nachfolgend wird die Kontrolle des Stabilisierungseffekts exemplarisch an zwei unterschiedlichen Bieren dargestellt. Neben der HPLC-Analyse der detektierten Flavan-3-ole wurde vergleichend die Abnahme der Tannoide und Flavanoide untersucht. Die Vergleichsmethoden wurden auf Grund ihrer spezifischen Reaktionen mit möglichen Trübungsbildnern ausgesucht.

Chapon erläutert in seinen Arbeiten den Begriff der Tannoide und deren Nachweis durch PVP. In diesen Veröffentlichungen wird immer wieder auf die an der Trübungsbildung beteiligten und durch die nephelometrische Methode erfassten Polyphenole eingegangen (BATCHAVAROV und CHAPON 1985, CHAPON 1993a, 1993b).

Die zum Nachweis der Flavanoide eingesetzte Substanz Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) reagiert dagegen spezifisch mit den für die chemisch-physikalische Stabilität verantwortlichen Flavan-3-olen. (DE PASCUAL-TERESA et al. 1998, DE PASCUAL-TERESA et al. 2000, MCMURROUGH und MCDOWELL 1978).

Zur Kontrolle der Stabilisierungswirkung einer PVPP-Suspension wurden je 200 ml Bier mit unterschiedlichen Konzentrationen an Stabilisierungsmittel versetzt. Die Zugabe erfolgte mit einer 9%igen PVPP-Suspension. Um vergleichbare Proben zu erhalten, wurden jeweils gleiche Mengen an Flüssigkeit zudosiert. D.h., bei 0 g/hl PVPP wurde eine äquivalente Menge entgastes Wasser zugegeben. Nach einer Kontaktzeit von 5 Minuten - hierbei wurden die Proben unter Stickstoffatmosphäre geschüttelt - wurde PVPP mit Hilfe von Membranfiltern (0,65 µm) abfiltriert. Das gewonnene Filtrat wurde umgehend analysiert. Während des ganzen Prozesses wurde auf sauerstofffreies Arbeiten geachtet.

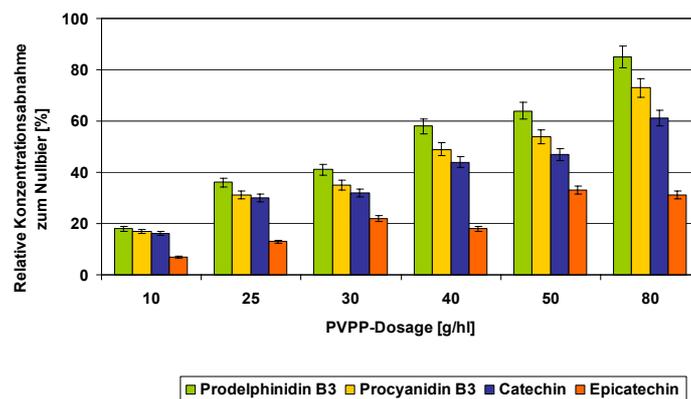


Abbildung 30: Kontrolle des Stabilisierungseffekts durch die Konzentrationsabnahme der Flavan-3-ole

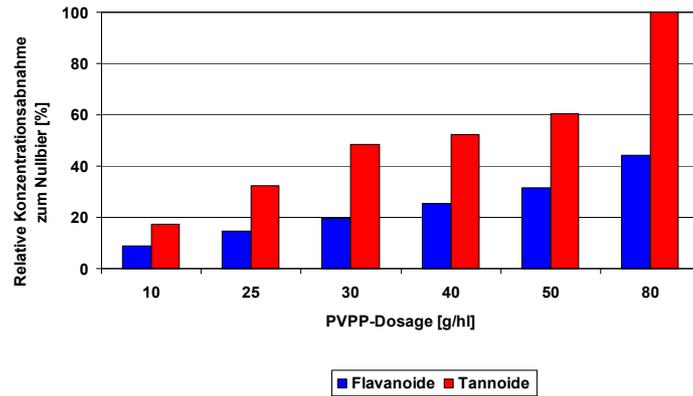


Abbildung 31: Flavanoide und Tannoide in Relation zu nicht stabilisiertem Bier

Die betrachteten Substanzen und Stoffgruppen wurden unterschiedlich stark reduziert. Bei allen Analysen konnte eine lineare Abnahme der Konzentration bei steigender PVPP-Dosage erkannt werden. Die Einzelbetrachtung der Flavan-3-ole zeigte, dass insbesondere die Dimeren Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> durch PVPP vermindert wurden. Auch bei Catechin war eine deutliche Verringerung zu sehen. Die Abnahme an Epicatechin über einer PVPP-Gabe von 30 g/hl erwies sich als gering.

Während die Werte der beiden Stoffgruppen, Flavanoide und Tannoide, mit steigender PVPP-Stabilisierung stärker verkleinert wurden, zeigten sich beim Vergleich der beiden Analysemethoden Unterschiede. Die Tannoide verhielten sich analog zu der Konzentrationsänderung der dimeren Flavan-3-ole. Bis zu einer Dosage von 50 g/hl waren kaum Differenzen zu erkennen. Erst bei einer Gabe von 80 g/hl PVPP reduzierte sich der Wert überproportional, so dass keine Tannoide im Bier nachweisbar waren.

Die Verminderung der Flavanoide erwies sich geringer als die Abnahmen der durch HPLC erfassten Einzelsubstanzen. Eine Stabilisierung mit 80 g/hl PVPP ergab lediglich Verringerung um 45 Prozent. Die höchste Konzentrationsabnahme eines Flavan-3-ols lag bei Prodelphinidin B<sub>3</sub> um die 85 Prozent.

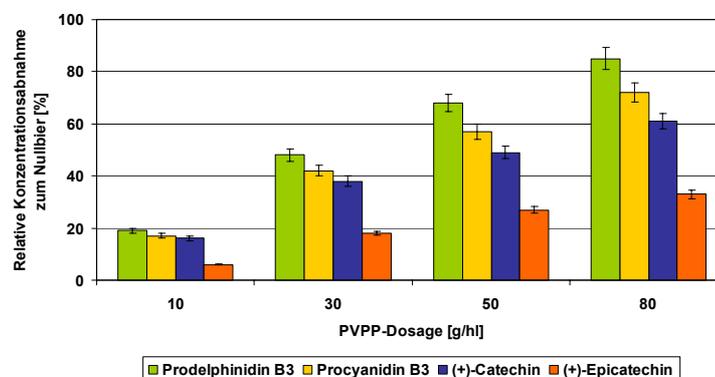


Abbildung 32: Kontrolle des Stabilisierungseffekts durch die Konzentrationsabnahme der Flavan-3-ole

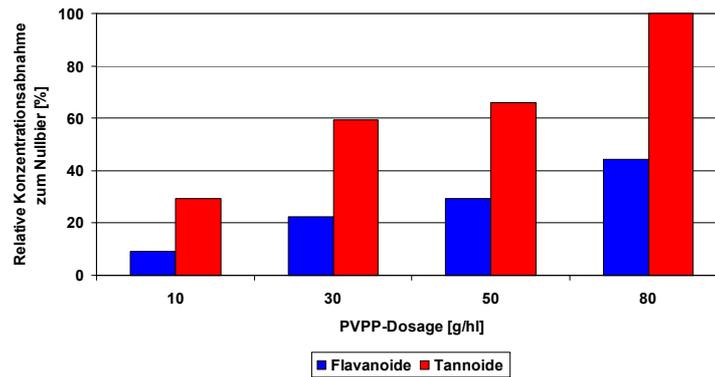


Abbildung 33: Flavanoide und Tannoide in Relation zu nicht stabilisiertem Bier

Die Konzentrationsveränderungen des zweiten Beispiels verliefen ähnlich wie in den zuvor betrachteten Bieren. Auch hatte die Stabilisierung bei der Einzelbetrachtung den größten Einfluss auf das Prodelphinidin B<sub>3</sub> und die geringste Auswirkung auf Epicatechin.

Anders als zuvor, ähnelten die Werte der Tannoidbestimmung hier nicht dem Verlauf der dimeren Flavan-3-ole. Die Reduktion der Tannoide war gegenüber dem Prodelphinidin B<sub>3</sub> und Procyanidin B<sub>3</sub> leicht erhöht. In der mit 80 g/hl PVPP stabilisierten Probe konnten wiederum keine Tannoide festgestellt werden.

Die Flavanoide nach Analytica-EBC veränderten sich durch die Stabilisierungsmaßnahmen am geringsten. Die relative Konzentrationsabnahme zum Nullbier lag bei einer Stabilisierung mit 80 g/hl PVPP bei 45 Prozent. Die Reduktion verlief jedoch auch hier linear mit steigender Zugabe des Stabilisierungsmittels.

Innerhalb der einzelnen Messmethoden konnten kaum Differenzen zwischen den Versuchsreihen erkannt werden. Die Konzentrationsabnahmen stellten sich bei den Versuchsreihen als relativ einheitlich dar. Betrachtete man die Analysemethoden untereinander, so ergaben sich deutliche Unterschiede. Vergleichend zur HPLC-Analytik hatte der Nachweis der Tannoide die größte Aussagekraft. Die hier erlangten Werte korrelierten insbesondere mit den dimeren Flavan-3-olen. Einzig bei einer Stabilisierung mit 80 g/hl PVPP nahmen die Werte überproportional ab. Der Nachweis der Flavanoide erwies sich als zu unspezifisch, um den Stabilisierungseffekt zu beurteilen. Die Differenzen zwischen den Werten verschiedener PVPP-Dosagen waren zu gering.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass diese Art der Evaluierung des Stabilisierungseffekts keine Aussagen über die Stabilität des Bieres treffen kann. Hierzu müssen die Konzentrationen der im filtrierten Bier vorhandenen trübungsrelevanten Substanzen vorliegen. Mit den so genannten Globalbestimmungsmethoden ist eine Vorhersage der kolloidalen Stabilität eines Bieres nicht möglich (ANGER 1983, PAPP 2000).

## 4.2 Proteine und kolloidale Stabilität

### 4.2.1 Aminosäurezusammensetzung der Bierproteine

Wie in Kapitel 2.4 bereits erwähnt, scheinen prolinreiche Proteine bevorzugte Reaktionspartner der Flavan-3-ole zu sein und gelten daher als stark trübungsrelevant. Ein direkter Beweis der Beteiligung dieser Proteine an der Trübungsbildung in Bieren konnte bisher jedoch nicht erbracht werden (ASANO et al. 1982, OUTTRUP et al. 1987, PAPP 2000).

Die Analyse von 50 unterschiedlichen Bier- und Trübungsproben sollte zeigen, ob sich ein Zusammenhang zwischen den Aminosäuren der Bierproteine und der kolloidalen Stabilität erkennen lässt.

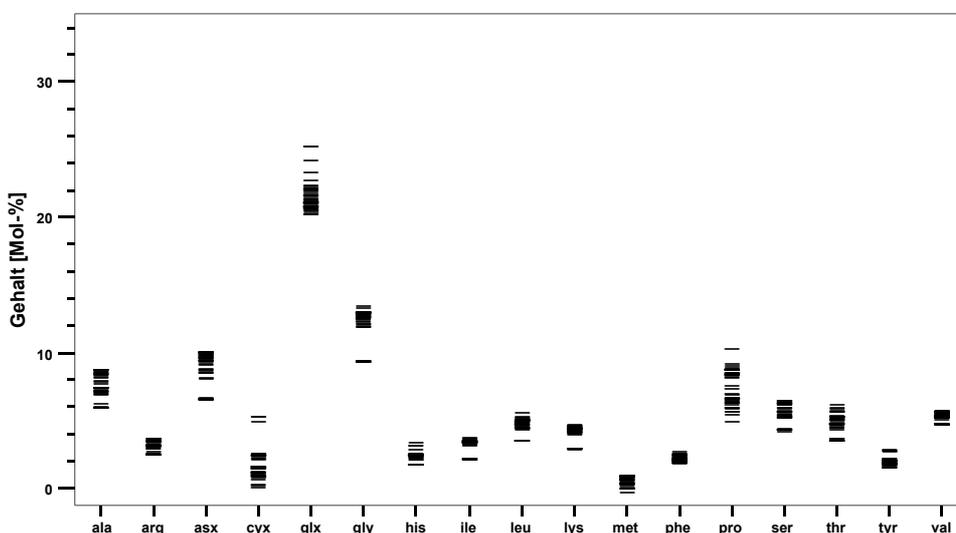
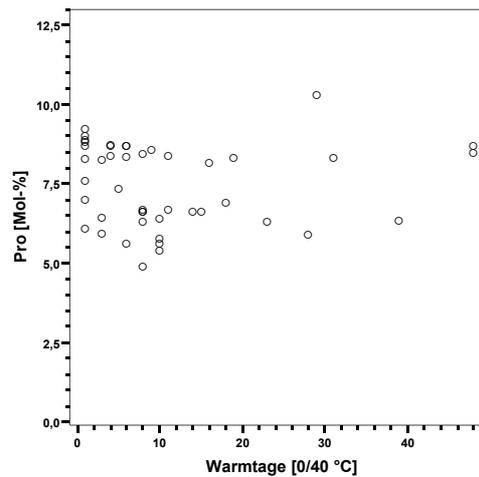


Abbildung 34: Aminosäurezusammensetzung in Mol-% von 50 unterschiedlich stabilen Bieren

Die Gesamtbetrachtung der Aminosäurezusammensetzung der Bierproteine in Mol-% erwies sich als nicht geeignet, trübungsrelevante Proteine zu identifizieren bzw. Differenzen unterschiedlich stabiler Biere zu erkennen. Im Gegenteil, die prozentuale Molverteilung der Proteine stellte sich als relativ einheitlich dar, obwohl die Stabilität der Biere zwischen 1 und 48 Warmtagen lag. Die größten Abweichungen zeigten Prolin (pro) und Glutamin/Glutaminsäure (glx) mit einem Bereich von 6 Mol-%. Dabei war die Unterscheidung zwischen Amid und Säure bei den beiden letzt genannten Aminosäuren ebenso wie bei Asparagin und Asparaginsäure auf Grund der Analytik nicht möglich.

Um eventuell vorhandene Zusammenhänge zwischen den Aminosäuren der Bierproteine und der kolloidalen Stabilität erkennen zu können, wurden, trotz der geringen Unterschiede, die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren gegen die erreichten Warmtage des Bieres aufgetragen. Im folgenden wird exemplarisch die Aminosäure Prolin diskutiert.



**Abbildung 35: Prolingehalt der Proteine von 50 unterschiedlich stabilen Bieren in Mol-%**

Der Prolingehalt der Bierproteine lag im Bereich zwischen 4,5 und 10,5 Mol-%. Jedoch unterschied sich der Prolinanteil von Proteinen stabiler Biere nicht von dem mit einer geringen Anzahl von Warmtagen. So enthielten die Proteine eines Bieres mit 48 Warmtagen den selben prozentualen Anteil an Prolin wie eine Probe mit nur einem Warmtag. Die Molverteilung der anderen Aminosäuren in den Bierproteinen zeigten ein ähnliches Bild. Auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen der kolloidalen Stabilität und dem Gehalt einzelner oder in Gruppen zusammengefügter Aminosäuren gefunden werden. Diese Art der Betrachtung ermöglichte somit keine Differenzierung der Biere bezüglich ihrer Stabilität.

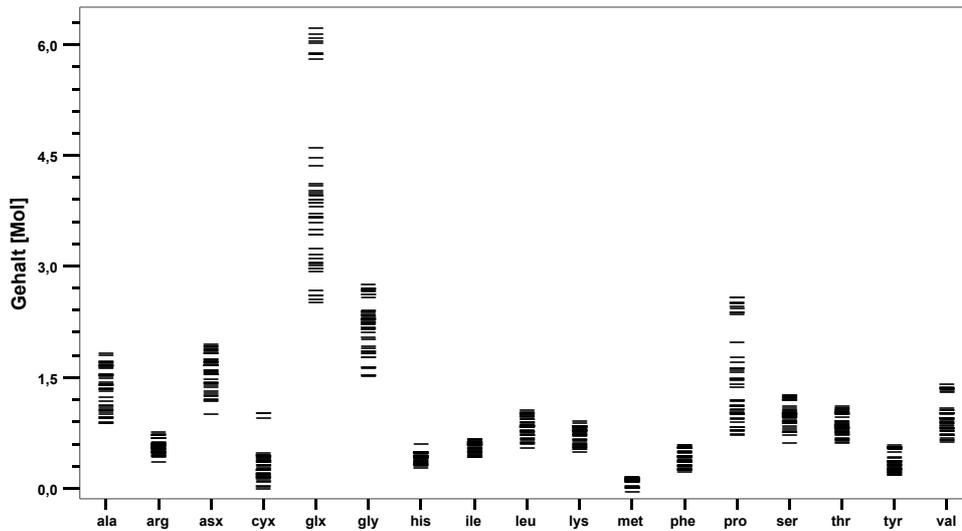


Abbildung 36: Aminosäurezusammensetzung in Mol von 50 unterschiedlich stabilen Bieren

Differenzierter stellte sich die wirkliche Konzentration (Mol) der gebundenen Proteinamino­säuren dar. Insbesondere die Werte der Proteinbausteine Glutamin mit Glutaminsäure, aber auch die des Prolins, waren weiter gestreut als bei Betrachtung der prozentualen Anteile. Andere Aminosäuren, wie Histidin oder Isoleucin, lagen auch hier in relativ konstanten Konzentrationen vor. Auch in diesem Fall wurden die Werte der Aminosäuren über die erreichten Warmtage aufgetragen und untersucht, ob sich Korrelationen zu den kolloidalen Stabilitäten zeigten.

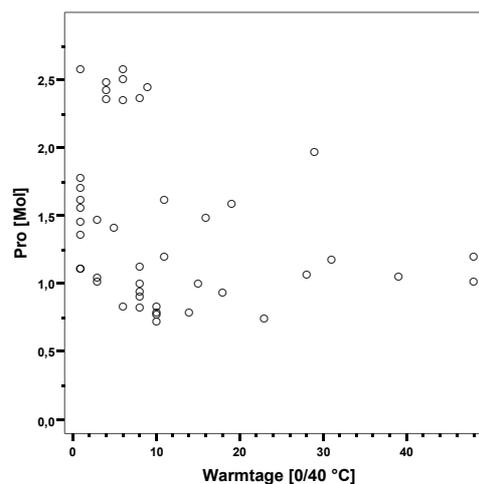
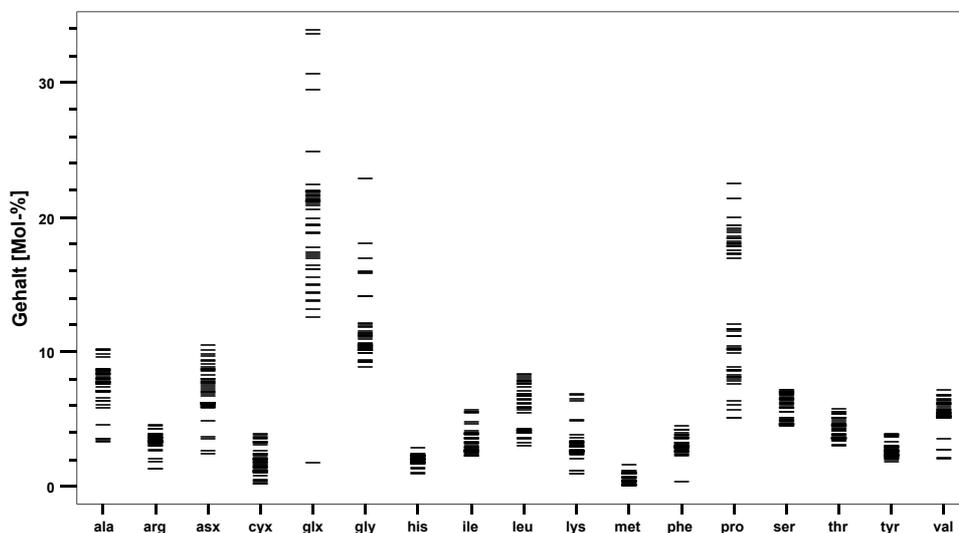


Abbildung 37: Prolingehalt der Proteine 50 unterschiedlich stabiler Biere

Die Menge der Aminosäure Prolin reichte von 0,7 bis 2,6 mol/l Bier. Eine Unterscheidung zwischen

stabilen und instabilen Bieren an Hand der Prolinmenge war wiederum nicht möglich. Zwar erreichten Biere mit den höchsten Prolinkonzentrationen maximal acht Warmtage, jedoch korrelierte ein geringer Gehalt der Aminosäure nicht automatisch mit einer hohen kolloidalen Stabilität. So besaß eine Probe mit 48 Warmtagen 1 mol gebundenes Prolin/l Bier. Der gleiche Wert wurde auch in einem Bier mit vier Warmtagen gefunden. Die weiteren untersuchten Aminosäuren korrelierten ebenfalls nicht mit der kolloidalen Stabilität der Biere.

Da aus den Bierproteinen keine Aussagen bezüglich der Stabilität der Biere getroffen werden konnten, wurden parallel die Zusammensetzungen der proteinischen Fraktion unterschiedlicher Kältetrübungen untersucht. Sollten Proteine gleichen Aufbaus an den Trübungen beteiligt sein, so könnte dies hiermit nachwiesen werden.



**Abbildung 38: Aminosäurezusammensetzung 50 verschiedener Kältetrübungen nach saurer Hydrolyse**

Der Vergleich zu den Bierproteinen (Abbildung 34) zeigt, dass die in Trübungen gefundenen Proteine anders aufgebaut waren. Insgesamt betrachtet, gab es bei den Trübungsproteinen größere Differenzen innerhalb der Aminosäurezusammensetzung. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass ausschließlich ein Protein für die Bildung von Kolloiden verantwortlich war. Auch in den Trübungsproteinen hatten Glutamin, die dazugehörige Säure und Prolin den weitesten Konzentrationsbereich. Daneben streuten auch die Werte des Glycins. Letzt genannte Aminosäure dürfte auf Grund ihres einfachen Aufbaus jedoch keinen Einfluss auf die Trübungsbildung haben. Die hohen Werte der Aminosäuren Glutamin/Glutaminsäure und Prolin lassen vermuten, dass die Trübungsproteine aus der Hordeinfraktion der Gerste stammen. Diese Beobachtungen stimmten mit den Resultaten von Asano et al. und Leiper et al. überein (ASANO et al. 1982, LEIPER et al. 2003).

Auch ein Zusammenhang zwischen den Anteilen der Aminosäuren in den Kältetrübungen und den erreichten Warmtagen konnte nicht erkannt werden. Allerdings waren insbesondere der Anteil des

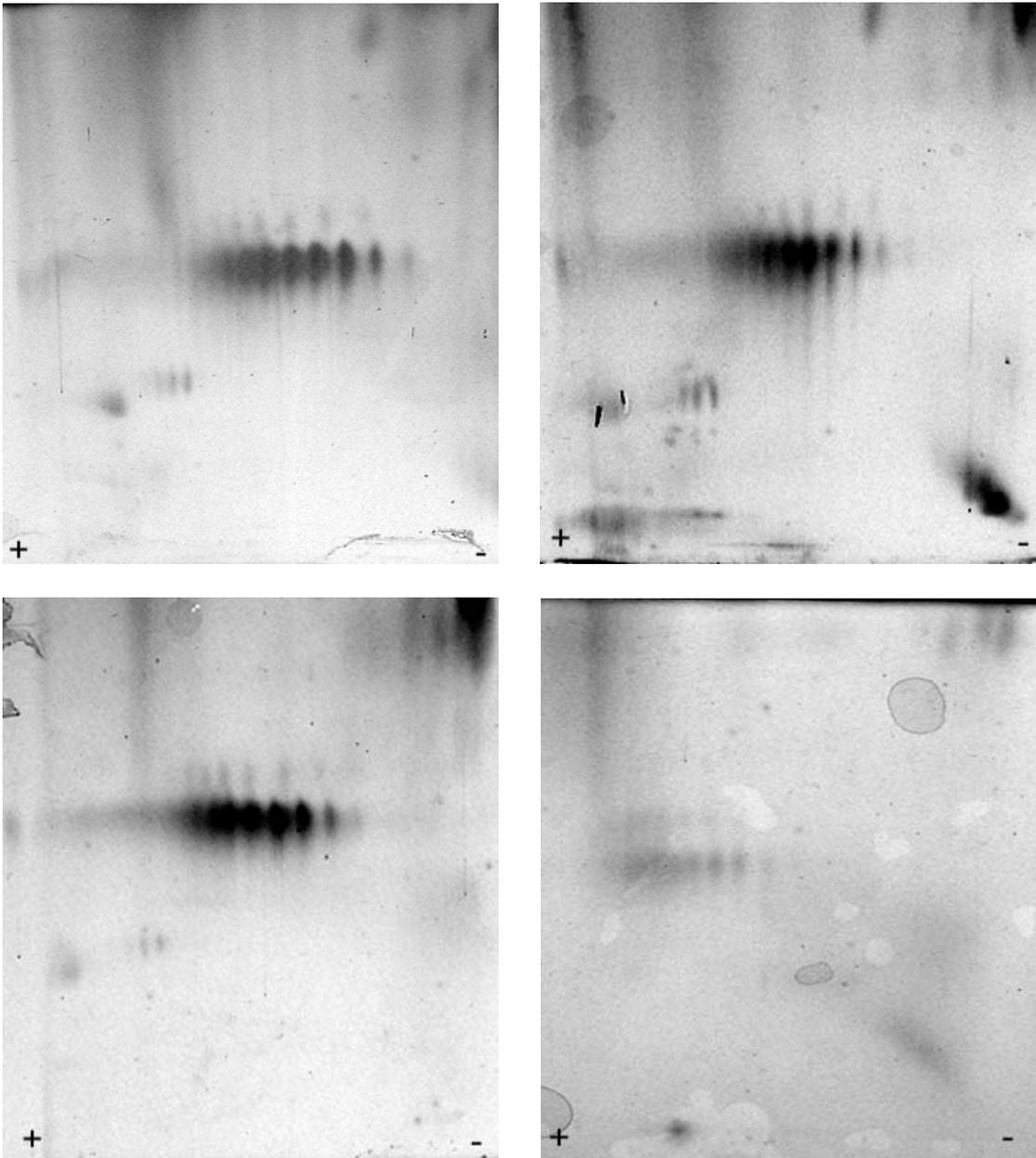
Prolins in den Trübungsproteinen gegenüber dem Gehalt in den Bierproteinen um den Faktor zwei bis drei erhöht. Dies könnte also für eine Beteiligung prolinreicher Proteine an der Bildung von Kolloiden sprechen.

Die geringe Aussagekraft der Proteinbetrachtung liegt darin begründet, dass nur geringe Mengen an Protein für die Bildung von Kolloiden benötigt werden. Nach Chapon bedarf es lediglich 2 mg trübungssensitives Protein pro Liter Bier, um eine Trübung von einem EBC entstehen zu lassen (CHAPON 1994). Somit ist also nur ein geringer Teil der gesamten Bierproteine an der Trübungsbildung beteiligt. Eine Vorhersage der zu erreichenden Stabilität aus den Aminosäurezusammensetzungen aller Bierproteine treffen zu können, scheint folglich nicht möglich. Des Weiteren ist neben der Zusammensetzung auch die Sequenz und die daraus resultierende Konformation der Proteine für die Trübungsneigung von Bedeutung. Eine Betrachtung der Reihenfolge der Aminosäuren in den Trübungsproteinen könnte hier weitere Ergebnisse hervorbringen (OUTTRUP 1989).

#### 4.2.2 2-D Elektrophorese

Über den Einsatz der 2-D Elektrophorese in der Bieranalytik ist bisher wenig bekannt. Einzig Papp sowie Marshall und Williams untersuchten Biere mit Hilfe dieser Analyseverfahren. Papp beobachtete eine Reduktion unterschiedlicher Proteinfractionen bei einer Stabilisierung mit PVPP. Marshall und Williams versuchten drei Biere anhand des Proteinspektrums zu unterscheiden (MARSHALL und WILLIAMS 1987, PAPP 2000).

Die durch Bentonit, Xerogel und forcierter Alterung der Proben entfernten Proteinfractionen sollten mit Hilfe der 2-D Elektrophorese exakter bestimmt werden. Hierfür wurden Untersuchungen an einem Unfiltrat und den dazugehörigen stabilisierten Bieren durchgeführt. Nach dem Forciertest wurden die Proteine der Überstände analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.



**Abbildung 39: Gele der 2-D Elektrophorese unterschiedlich stabilisierter Biere von links oben nach rechts unten: Unfiltrat, 125 g/hl Bentonit, 60 g/hl Xerogel, forcierte Probe nach Abtrennen der Trübung, 10 µg aufgetragene Proteinmenge**

10 µg Protein wurde auf jedes der Gele aufgegeben. Alle Proben besaßen die Hauptbande zwischen 38-45 kDa. Trotz langer Fokussierung und dem Einsatz unterschiedlicher IPG-Strips konnten die Proteine in diesem Bereich nicht weiter aufgetrennt werden. Einzig bei der forcierten Probe ließen sich einzelne Spots erkennen.

Eine Verschiebung innerhalb der Proteinfractionen konnte dennoch erkannt werden. Bei der Bentonitstabilisierung kam es zu einer Zunahme der sauren Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 65 und 95 kDa und somit zu einer gleichzeitigen Abnahme in anderen Bereichen. Im Gegensatz dazu konnten bei einer Behandlung der Biere mit Xerogel im Bereich >70 kDa keine Proteine

detektiert werden und auch die Spots bei 65 kDa waren gegenüber dem Unfiltrat stark verringert.

Unterschiede bei Proteinen <20 kDa konnten nicht dargestellt werden. Der Grund hierfür könnte in der Färbung der Gele liegen, da hier Proteine, insbesondere kleinere Moleküle, in den einzelnen Schritten abgewaschen werden (GÖRG et al. 2003, WESTERMEIER 2001). Gleiches galt auch für die Gele der forcierten Biere. Hier zeigten sich nach Abtrennen der Trübung trotz gleicher Proteinmengen nur schwache Spots.

Abweichungen in der Stabilisierung mit Bentonit und Xerogel konnten festgestellt werden. Diese Unterschiede könnten die unterschiedlichen Auswirkungen der Stabilisatoren auf Schaum und Trübungsbildung erklären. Die Verluste kleiner Proteinmoleküle schließt jedoch eine weitere Diskussion über die Entfernung trübungsrelevanter Proteine aus. Eine verbesserte Analytik könnte zur Differenzierung zwischen schaumpositiven und trübungssensitiven Proteinen beitragen.

### 4.3 Vorhersagemöglichkeit der kolloidalen Stabilität

Die Bedeutung der Polyphenole für die kolloidale Stabilität wurde bereits ausführlich diskutiert. Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob der Ausgangswert der Flavan-3-ole mit der chemisch-physikalischen Stabilität der Biere korreliert. 59 unterschiedliche Verkaufsbiere wurden auf ihren Flavan-3-olgehalt untersucht und forciert. Einzelsubstanzen und Summenparameter wurden zu den erreichten Warmtagen aufgetragen und eventuelle Zusammenhänge herausgearbeitet.

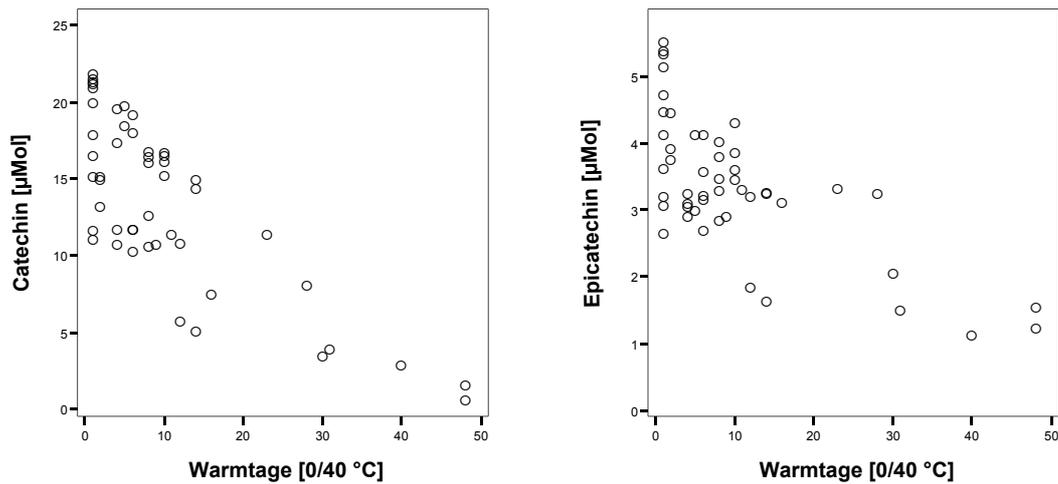


Abbildung 40: Catechin- und Epicatechingehalt unterschiedlich stabiler Bier; N=59

Zwischen den Monomeren Catechin und Epicatechin und den erreichten Warmtagen ließen sich lediglich Tendenzen erkennen. Je höher die Konzentration der Catechine war desto geringer war die kolloidale Stabilität der Biere. Die Werte der Biere mit einer Stabilität <10 Warmtage konnten nicht differenziert werden. Hier konnten Biere mit der selben Catechinkonzentration mindestens 1 und bis zu 10 Warmtage erreichen. Die Unterscheidung der Biere anhand des Epicatechins wurde durch dessen grundsätzlich geringe Konzentration erschwert.

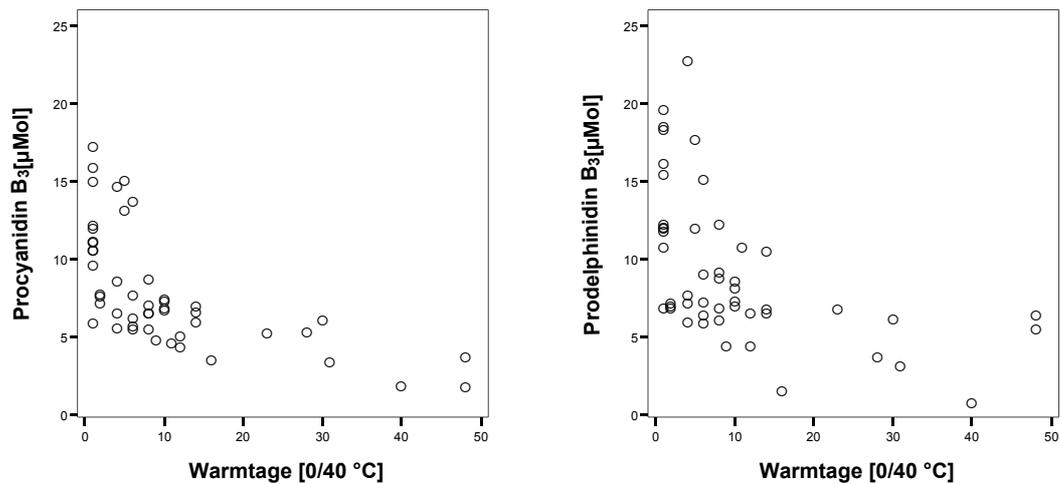


Abbildung 41: Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Gehalt unterschiedlich stabiler Biere; N=59

Die Konzentrationsverläufe des Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> ähnelten denen der Monomeren. Auch hier konnte keine eindeutige Differenzierung zwischen stabilen und instabilen Proben beobachtet werden. Geringe Mengen der dimeren Flavan-3-ole korrelierten nicht immer mit einer verbesserten Stabilität der Biere. So besaß ein Bier mit 48 Warmtagen den selben Prodelphinidin-gehalt wie ein Bier, das 10 Warmtage erreichte. Tendenziell waren jedoch Biere mit größeren Mengen an diesen beiden Dimere instabiler als Biere mit niedrigen Werten. Die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

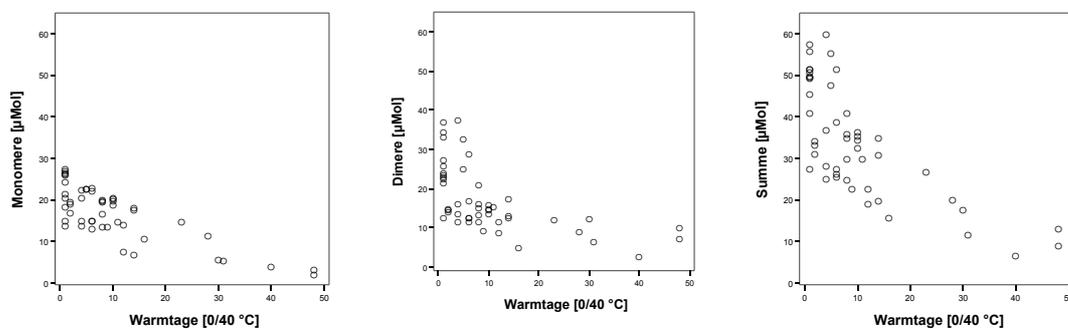
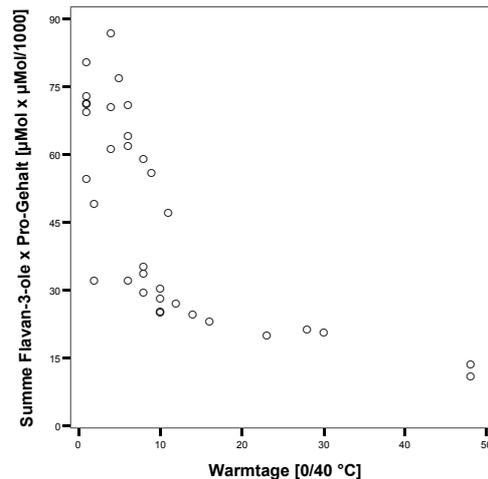


Abbildung 42: Monomere, Dimere und Summe der Flavan-3-ole unterschiedlich stabiler Biere; N=59

Die Summenparameter der Flavan-3-ole ließen zwar Zusammenhänge mit der kolloidalen Stabilität erkennen, signifikante Unterschiede und damit genaue Vorhersagbarkeit über die zu erwartende kolloidale Stabilität traten auch hier nicht ein. Die Differenzen zwischen stabilen und instabilen Proben waren allerdings deutlicher als bei den Einzelsubstanzen. Eine Leitsubstanz als Bewertungsmerkmal für die kolloidale Stabilität war somit nicht zu erkennen. Vielmehr zeigte die Gruppe der Flavan-3-ole als Ganzes einen Zusammenhang zur Haltbarkeit eines Bieres.

Zur Beurteilung der zu erwartenden kolloidalen Stabilität müssen alle beteiligten Reaktanden einbezogen werden. D.h., dass auch die an der Trübungsbildung beteiligten Proteine eingerechnet

werden müssten. Ähnlich dem Massenwirkungsgesetz wurde die Molkonzentration des Prolins der Bierproteine mit der Summe der Flavan-3-ole multipliziert und über die erreichten Warmtage aufgetragen. Modelle gleicher Art wurden von Papp und McMurrough verwendet. In beiden Arbeiten wurden die Flavan-3-ole als die gerbstoffseitigen Trübungsbildner in die Gleichung eingesetzt. Bei McMurrough wurde trübungssensitives Protein durch Fällung mit Tanninsäure nachgewiesen. Papp versuchte trübungsbildendes Eiweiß mit einem ELISA-Test zu ermitteln (MCMURROUGH 1998, PAPP 2000).



**Abbildung 43: Berechneter Faktor aus Summe der Flavan-3-ole und Prolingehalt der Proteine zu den erreichten Warmtagen, N=40**

Diese Art der Berechnung verbesserte die Vorhersagemöglichkeit gegenüber den zuvor betrachteten Stoffen und Summenparametern. Hier zeigte sich, dass höhere Werte in der Faktorberechnung zu geringeren Stabilitäten der Biere korrelierten. Die Unterschiede der Proben waren jedoch wiederum nicht signifikant und konnten somit nur Tendenzen darstellen. Gründe für die nicht eindeutige Aussage waren eventuelle Beeinträchtigungen durch Sauerstoff, bisher noch nicht identifizierte trübungsverursachende Bierinhaltsstoffe und eine eventuelle „Vorbelastung“ der Proben.

Insbesondere die Oxidation durch das Einbringen geringster Mengen an Sauerstoff in das Bier und dessen chemische Umsetzung können die Vorhersagbarkeit der kolloidalen Stabilität stark beeinträchtigen. Die aus diesem Prozess entstandenen reaktiven Intermediärprodukte und der chemisch umgesetzte Sauerstoff sind in der Matrix Bier bisher nicht nachweisbar. Wäre das Bier also oxidativ geschädigt, so ließe sich dies in den Untersuchungen nicht nachweisen.

#### 4.4 Reaktionskinetik der Trübungsbildung

Während der Aufbewahrung filtrierter Biere bilden sich kolloidale Trübungen. Durch Entstehung dieser Trubstoffe nehmen zeitgleich die Konzentrationen der daran beteiligten Bierinhaltsstoffe ab. Diese Konzentrationsänderungen können mit allgemeinen Reaktionssystemen beschrieben werden. Systeme dieser Art werden durch Reaktionsgeschwindigkeiten zu einer bestimmten Zeit  $t$  definiert (WESTPHAL et al 1996). Im Folgenden sollten die Reaktionsgeschwindigkeiten der Trübungsbildung näher betrachtet und die daran beteiligten Substanzen charakterisiert werden.

Die filtrierten und abgefüllten Biere wurden bei 4, 9, 20, 30 und 40 °C gelagert. Zur schnelleren Entstehung der zu messenden Kältetrübung und aufgrund der Vergleichbarkeit wurden die Proben nach dem jeweiligem Versuchstag 24 Stunden auf 0 °C gekühlt. Nach der Trübungsmessung wurden die Proben weiteren Analysen zugeführt.

##### 4.4.1 Flavan-3-ole und Trübungsbildung

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Trübungszunahme während der Aufbewahrung der Biere bei unterschiedlichen Temperaturen auf die Flavan-3-ole auswirkte. In der Literatur (vgl. Kapitel 2.3.3) wird immer wieder auf die Trübungsrelevanz der Flavan-3-ole hingewiesen. Die Arbeitsgruppen beobachteten eine Reduktion der Konzentration dieser Substanzen während der Aufbewahrung der Biere. Jedoch vernachlässigten die Autoren den Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Trübungsbildung und die Abnahme der involvierten Stoffe. D.h., die Entstehung kolloidaler Agglomerate wurde bisher unter der Voraussetzung einer Aufbewahrungstemperatur analysiert. Folgend sollte geklärt werden, wie sich die Flavan-3-ole unterschiedlich stabilisierter Biere während der Lagerung bei 4, 9, 20, 30 und 40 °C verhalten und ob sich daraus Differenzen in der Trübungsbildung ergeben.

Nach Abzentrifugieren der entstandenen Kältetrübungen wurde die absolute Menge der Flavan-3-ole in den Überständen untersucht. Es fanden sich jedoch keine Zusammenhänge zu den zugehörigen, photometrisch erfassten Trübungswerten. Der Grund dafür bestand in den unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der Flavan-3-ole der untersuchten Biere (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Ausgangswerte der Flavan-3-ole der untersuchten Biere in  $\mu\text{Mol}$**

	Ohne Stabilisierung	Xerogel	Xerogel + PVPP
Catechin	21,32	18,70	9,61
Epicatechin	4,93	3,49	3,21
$\Sigma$ Monomere	26,25	22,19	12,82
Procyanidin B <sub>3</sub>	14,24	10,93	9,06
Prodelphinidin B <sub>3</sub>	25,09	23,91	16,78
$\Sigma$ Dimere	39,33	34,84	25,84
$\Sigma$ Flavan-3-ole	65,58	57,03	38,66

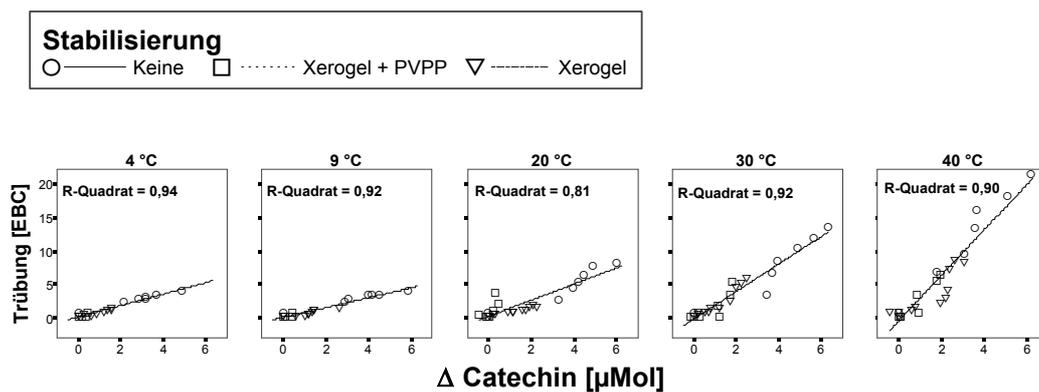
Betrachtet man dagegen die theoretisch in die Trübung eingebrachte Menge der Flavan-3-ole zur Trübungsmessung, so korrelierten diese miteinander. Die bei der Trübungsbildung umgesetzte Stoffmenge ergab sich aus:

$$\Delta c = c_0 - c_t \quad \text{Gleichung 1}$$

Dabei ist  $\Delta c$  die theoretisch in die Trübung eingebrachte Menge der Substanz,  $c_0$  die Konzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $c_t$  die Menge zum Zeitpunkt  $t > 0$ .

Die Abnahme an Flavan-3-olen stellte sich als temperaturabhängig heraus. Ohne Berücksichtigung der Aufbewahrungstemperatur ergab sich kein eindeutiges Bild. Wurden die Daten nach den Temperaturen aufgeteilt, so zeigten sich zwischen Polyphenolmenge und der entstandenen Trübung Zusammenhänge.

Neben der Aufteilung nach der Temperatur wurden die Wertepaare auch nach der Stabilisierungsart getrennt. Die dargestellten Bestimmtheitsmaße galten für die Gesamtgruppe der Wertepaare innerhalb des jeweiligen Diagramms.



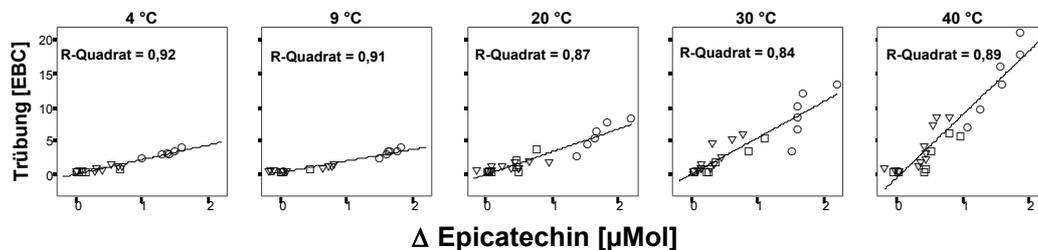
**Abbildung 44: Einfluss der Catechinmenge auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen**

Die umgesetzten Mengen an Catechin zeigten bei allen Temperaturen hohe bis sehr hohe Korrelationen zu den entstandenen Trübungen. Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,94 bei 4 °C korrelierte die Trübungszunahme zur Catechinumsetzung am stärksten. Die Temperaturabhängigkeit der Umsetzung des Monomers ließ sich durch die verschiedenen Steigungen der Regressionsgeraden erkennen. Je niedriger die Aufbewahrungstemperatur gewählt worden war, desto mehr Catechin wurde benötigt, um eine bei höheren Temperaturen äquivalente Trübung zu erzielen.

**Tabelle 7: Bestimmtheitsmaße für  $\Delta$  Catechin im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschiedenen vorbehandelten Bieren**

Temperatur [°C]	Ohne Stabilisierung	Xerogel	Xerogel + PVPP
4	0,98	0,77	0,50
9	0,97	0,77	0,24
20	0,87	0,87	0,48
30	0,64	0,91	0,88
40	0,96	0,73	0,89

Betrachtete man die verschiedenen stabilisierten Biere einzeln, so waren die Ergebnisse unterschiedlich. Während nicht stabilisiertes Bier meist eine hohe Korrelation zur gebildeten Trübung hatte, erreichte die verbrauchte Catechinmenge der stabilisierten Biere nur bei höheren Temperaturen Bestimmtheitsmaße  $>0,8$  zu den entstandenen Kolloiden.



**Abbildung 45: Einfluss der Epicatechinmenge auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen**

Auch auf Grund der zu Catechin geringeren Ausgangskonzentration an Epicatechin waren die Mengen, welche bei der Trübungsbildung umgesetzt wurden, um den Faktor 2 bis 3 niedriger. Ähnlich dem Catechin, korrelierten die Wertepaare bei niedrigeren Temperaturen geringfügig besser als bei höheren. Ebenso sank die Epicatechinmenge, die für die Entstehung des gleichen Trübungswertes benötigt wurde mit steigender Temperatur.

**Tabelle 8: Bestimmtheitsmaße für  $\Delta$  Epicatechin im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschiedenen vorbehandelten Bieren**

Temperatur [°C]	Ohne Stabilisierung	Xerogel	Xerogel + PVPP
4	0,95	0,57	0,96
9	0,90	0,99	0,77
20	0,65	0,82	0,58
30	0,67	0,93	0,79
40	0,90	0,67	0,77

Herausgelöst aus der Gesamtmenge aller untersuchten Proben, variierten die Ergebnisse der unterschiedlich stabilisierten Biere. Die Werte des mit PVPP versetzten Bieres zeigten wiederum geringe Korrelationen zu den entstandenen Trübungen.

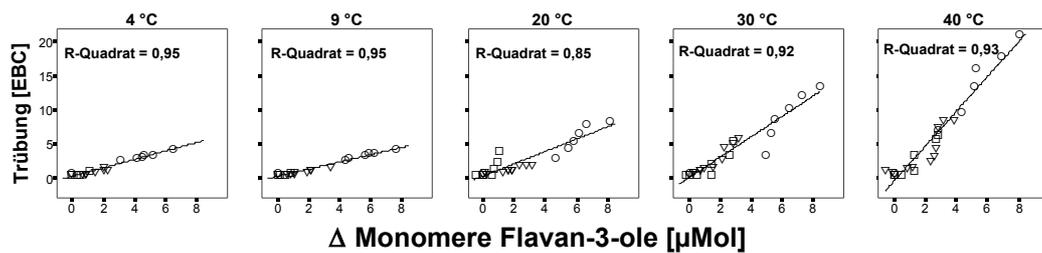


Abbildung 46: Einfluss der Menge an Monomeren auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen

Die Summe aus Catechin und Epicatechin bestätigte die Tendenzen der Einzelsubstanzen. Auch hier erzielten die Werte bei niedrigen Temperaturen höhere Korrelationen. Durch die Addition fiel die temperaturabhängige Steigung der Regressionsgeraden steiler, als dies bei den Einzelsubstanzen der Fall war.

Tabelle 9: Bestimmtheitsmaße für die Menge an monomeren Flavan-3-olen im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschiedenen vorbehandelten Bieren

Temperatur [°C]	Ohne Stabilisierung	Xerogel	Xerogel + PVPP
4	0,99	0,78	0,83
9	0,98	0,93	0,73
20	0,86	0,88	0,63
30	0,77	0,85	0,91
40	0,97	0,74	0,91

Des Weiteren zeigte der Summenparameter sowohl in der Gesamtbetrachtung als auch aufgeteilt nach Stabilisierungsart bessere Korrelationen an als die Einzelsubstanzen. Dies könnte bedeuten, dass die Isomeren Epicatechin und Catechin mit den selben Reaktionspartnern Bindungen eingehen und somit um diese konkurrieren. Bei den Einzelsubstanzen konnte man keine Tendenzen, insbesondere bei dem in geringeren Mengen vorliegendem Epicatechin, erkennen.

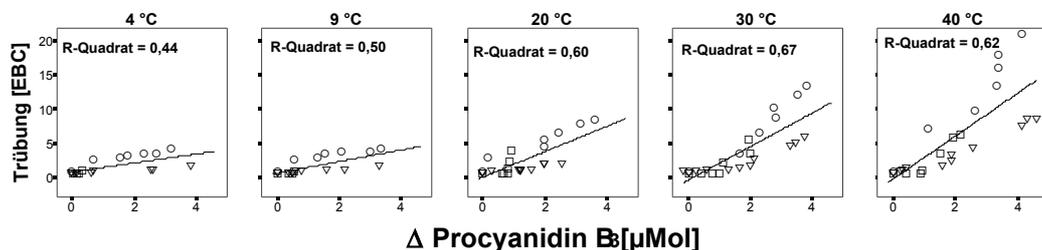


Abbildung 47: Einfluss der Menge an Procyanidin B<sub>3</sub> auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen

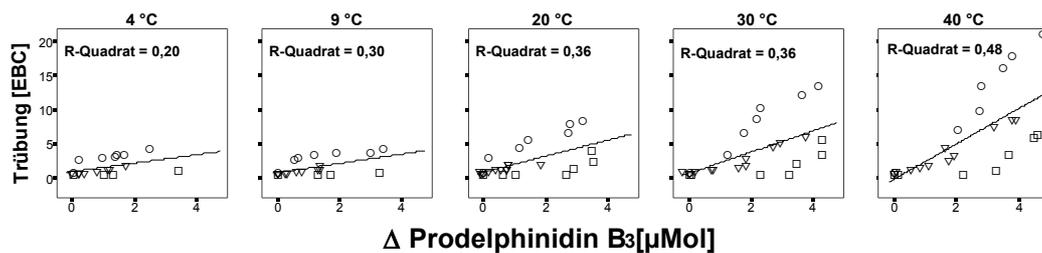
Keine Korrelationen zeigten zunächst die Konzentrationsänderungen des Procyanidin B<sub>3</sub> zur Trübungsbildung. Mit Bestimmtheitsmaßen <0,67 schien kein Zusammenhang zwischen Trübungsentstehung und Abnahme der Substanz zu bestehen. Bei genauerer Untersuchung ließ sich jedoch

feststellen, dass es große Differenzen zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Bieren gab (vgl. Tabelle 10 ).

**Tabelle 10: Bestimmtheitsmaße für die Procyanidinabnahme im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden behandelten Bieren**

Temperatur [°C]	Ohne Stabilisierung	Xerogel	Xerogel +PVPP
4	0,89	0,95	0,66
9	0,77	0,94	0,32
20	0,95	0,85	0,26
30	0,94	0,88	0,74
40	0,92	0,96	0,87

Die Reduktion des Procyanidin B<sub>3</sub> durch die Stabilisierung wirkte sich direkt auf die Trübungszusammensetzung aus. Während die Trübungsbildung der eiweißseitigen und nicht stabilisierten Biere Zusammenhänge zur umgesetzten Procyanidin B<sub>3</sub>-Menge zeigten, konnte dies bei dem gerbstoffseitig behandeltem Bier nicht festgestellt werden. Zwar nahm mit höheren Trübungswerten der reagierende Procyanidin B<sub>3</sub>-Gehalt zu, jedoch nicht proportional zur entstandenen Trübung.



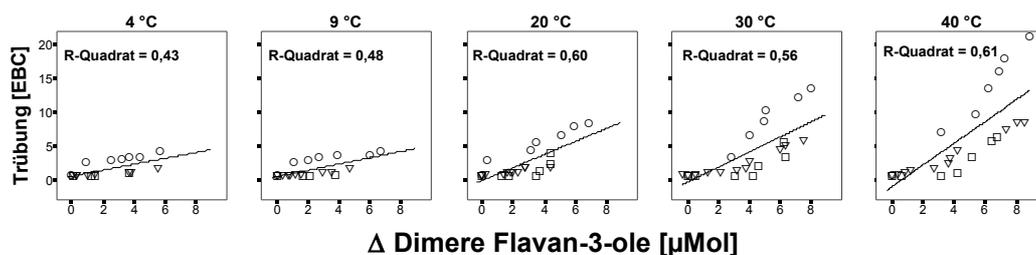
**Abbildung 48: Einfluss der Menge an Prodelphinidin B<sub>3</sub> auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen**

Bei Prodelphinidin B<sub>3</sub> ließ sich ein ähnliches Bild wie bei Procyanidin B<sub>3</sub> erkennen. Die Gesamtgruppen ohne Unterscheidung der Vorbehandlung des Bieres korrelierten nicht mit den Werten der Trübungsmessung. Aufgetrennt nach der Stabilisierungsart stiegen die Bestimmtheitsmaße dagegen stark an. Auch hier hatte das gewählte Stabilisierungsmittel und die damit veränderte Anfangskonzentration Einfluss auf die umgesetzte Menge an Prodelphinidin B<sub>3</sub>.

**Tabelle 11: Bestimmtheitsmaße für die Prodelphinidinabnahme im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden vorbehandelten Bieren**

Temperatur [°C]	Ohne Stabilisierung	Xerogel	Xerogel + PVPP
4	0,81	0,99	0,90
9	0,66	0,92	0,74
20	0,94	0,69	0,54
30	0,94	0,88	0,52
40	0,96	0,94	0,70

Die umgesetzte Prodelphinidinmenge in den Bieren, die gerbstoffseitig nicht stabilisiert waren und daher eine höhere Konzentration des Dimers zeigten, korrelierten besser mit der Trübungsbildung als bei der mit PVPP behandelten Probe. Bei dem mit Xerogel und PVPP behandelten Bier wurden dagegen Prodelphinidin B<sub>3</sub> und dessen potentielle Reaktionspartner soweit entfernt, dass die Trübungsentstehung keine Zusammenhänge mit der Konzentrationsabnahme dieser Substanz erkennen ließ.

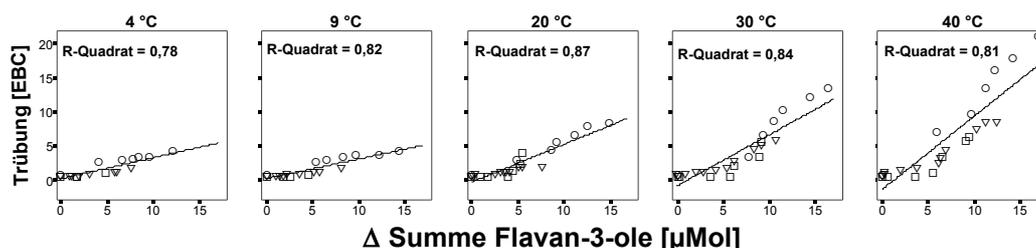


**Abbildung 49: Einfluss der Menge an Dimeren auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen**

Die Summen der dimeren Flavan-3-ole verhielten sich ähnlich den Einzelsubstanzen, jedoch etwas markanter. Die Korrelationen waren niedrig bis mittel. Ähnlich den Verläufen des Procyanidin B<sub>3</sub> und des Prodelphinidin B<sub>3</sub> ergaben sich deutliche Unterschiede bei Differenzierung nach der Stabilisierungsart. Während auch hier das PVPP-behandelte Bier keine Zusammenhänge bei Trübungsbildung erkennen ließ, erzielten die beiden anderen Biere hohe bis sehr hohe Korrelationen. Eine „Konkurrenz“ der Stoffe bei der Trübungsbildung, wie bei den Monomeren, konnte nicht beobachtet werden.

**Tabelle 12: Bestimmtheitsmaße für die Menge an dimeren Flavan-3-olen im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden vorbehandelten Bieren**

Temperatur [°C]	Ohne Stabilisierung	Xerogel	Xerogel + PVPP
4	0,86	0,87	0,88
9	0,72	0,98	0,68
20	0,96	0,83	0,51
30	0,95	0,88	0,60
40	0,96	0,96	0,76



**Abbildung 50:** Einfluss der Menge aller detektierten Flavan-3-ole auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen

Die Summen der analysierten Flavan-3-ole korrelierten allesamt zu den entstandenen Trübungen. Der Unterschied zwischen gerbstoff- und eiweißseitiger bzw. keiner Stabilisierung zeigte sich bei der Summenbetrachtung deutlich. Das PVPP-behandelte Bier erzielte auch in diesem Fall keinen Zusammenhang zwischen Trübungsmenge und Abnahme der Polyphenole. Ausgehend von den geringen Anfangskonzentrationen konnte hier keine lineare Beziehung zwischen der eingebrachten Menge an Flavan-3-olen und der Zunahme der Trübung gefunden werden. Die Korrelationen der beiden anderen Biere zwischen Flavan-3-ol-Abnahme und Agglomerationsbildung erreichten hohe Werte.

**Tabelle 13:** Bestimmtheitsmaße für die Menge aller detektierten Flavan-3-olen im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschiedenen behandelten Bieren

Temperatur [°C]	Ohne Stabilisierung	Xerogel	Xerogel + PVPP
4	0,96	0,96	0,88
9	0,81	0,98	0,71
20	0,98	0,96	0,86
30	0,92	0,90	0,66
40	0,97	0,92	0,82

Zusammenfassend ließ sich feststellen:

- Die Trübungsbildung war bei allen untersuchten Stoffen temperaturabhängig. Die Zusammensetzung der resultierenden Trübung, bei angenommener Beteiligung der Flavan-3-ole, erwies sich als stark different. Je höher die Aufbewahrungstemperatur gewählt worden war, desto weniger Flavan-3-ole waren nötig, um eine bei niedrigerer Temperatur äquivalente Trübung entstehen zu lassen.
- Es darf also nicht von einer Trübung gesprochen werden. Neben den betrachteten Polyphenolen sind auch Proteine, Kohlenhydrate, Metalle in den Trübungen vorhanden. Diese beeinflussen eine temperaturabhängig unterschiedliche Trübungszusammensetzung.
- Die Korrelation zwischen umgesetzter Polyphenolmenge und entstandener Trübung ist abhängig von den Ausgangskonzentrationen der betrachteten Stoffe. Je kleiner die Menge an trübungsrelevanten Polyphenolen im Bier war, desto geringer war der Zusammenhang zu der

entstandenen Trübung. Dies bedeutet, dass wiederum andere Stoffe/Stoffgruppen, die hier nicht untersucht wurden, einen stärkeren Einfluss auf die Trübungsbildung haben müssen als bei hoher Flavan-3-ol-konzentration.

- Die Summenparameter der betrachteten monomeren Flavan-3-ole korrelierten besser zu den Trübungswerten als deren Einzelsubstanzen. Das wies auf ein Konkurrieren um dieselben Reaktionspartner und -stellen hin.

#### 4.4.2 Mechanismen der Trübungsbildung

Es wird darauf hingewiesen, dass die folgenden Versuche allein dem Ziel dienen, die zeitlichen Abläufe während der Trübungsbildung zu beschreiben. Hierfür sind nachstehende Vereinfachungen ausreichend genau und können zur Ablehnung der zu untersuchenden Hypothesen herangezogen werden. Will man jedoch mechanistische Zusammenhänge biiverändernder Prozesse genauer analysieren, so bedeutet dies höhere Anforderungen an die Erfassung beteiligter Inhaltsstoffe. Da es sich bei der Trübungsbildung um ein komplexes System mehrerer Mechanismen handelt und die beteiligten Stoffe nicht ausnahmslos identifiziert sind, ist dies bisher nicht möglich (WESTPHAL et al 1996).

Die Trübungsbildung untergäriger Biere wird meist als ein Zwei-Phasen-Modell dargestellt, welches sich in eine lag- und eine log-Phase aufteilt. Größtenteils wird jede dieser Phasen für sich betrachtet. So konzentrierten sich McMurrough et al. insbesondere auf die Trübungsentwicklung in der log-Phase, während Leemans et al. in der lag-Phase der Trübungsbildung eine Möglichkeit sahen, die kolloidale Stabilität untergäriger Biere vorherzusagen (LEEMANNS et al. 2003, MCMURROUGH et al. 1992, MCMURROUGH und O'ROURKE 1997). In anderen Bereichen der Getränketechnologie konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Mechanismen der Trübungsbildungen um Reaktionen erster und in Einzelfällen nullter Ordnung handelte (CEMEROGLU et al. 1994, IBRAZ et al 1992, RECHNER 2000, TAJCHAKAVIT et al 2001). Im Folgenden sollte die Hypothese „Die Entstehung der Kältetrübung bei untergärigen Bieren folgt einer Reaktionskinetik erster Ordnung“ untersucht werden.

Reaktionen erster Ordnung lassen sich durch folgende allgemeine, einfache stöchiometrische Gleichung beschreiben:



Für die Umsetzung des Stoffs A nach dem Zeitgesetz und anschließender Integration bedeutet dies:

$$a / a_0 = e^{-kt} \quad \text{Gleichung 3}$$

Hierbei ist  $a_0$  die Konzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $a$  die Konzentration zum Zeitpunkt  $t > 0$ .  $k$  ist die temperaturabhängige Geschwindigkeitskonstante.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde die entstandene Trübung als ein chemischer Stoff betrachtet, welcher über die Zeit seine Konzentration ändert, die Zusammensetzung aber gleich bleibt. D.h., es wurde weder auf Edukte noch auf die wirkliche chemische Verbindung der Trübung geachtet. Unter diesen Vereinfachungen sollte gelten:



$$EBC/EBC_0 = e^{k \cdot t}$$

Gleichung 5

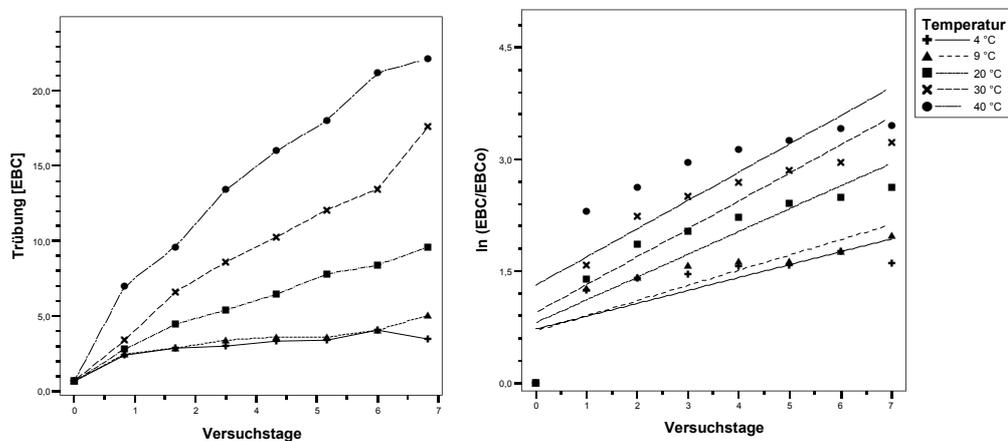
$EBC_0$  entsprach der Trübung, gemessen in Formazineinheiten, zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $EBC$  der Trübung zum Zeitpunkt  $t$  (in Tagen)<sup>1</sup>.

Durch Logarithmierung lässt sich Gleichung 5 in eine lineare Beziehung umformen. Stellt sich die Trübungsbildung als eine Reaktion erster Ordnung dar, so liegen alle Messpunkte auf einer Geraden, die sich wie folgt beschreiben lässt.

$$\ln(EBC/EBC_0) = k \cdot t$$

Gleichung 6

Die erhaltenen Messwerte wurden als Funktionen der Zeit und in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen.



**Abbildung 51: Trübungsbildung (links) und Reaktion erster Ordnung (rechts) eines nicht stabilisierten Bieres als eine Funktion der Zeit**

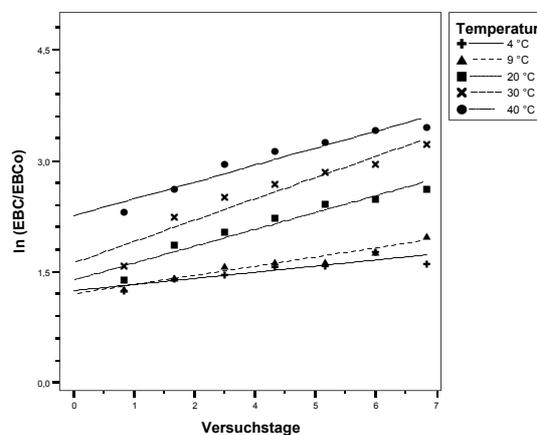
Die Graphen zeigen deutlich die Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Reaktionen. Je höher die Temperaturen lagen, der das Bier ausgesetzt war, desto stärker entwickelte sich auch die Trübung. Ausnahmen waren hier die bei 4 und 9 °C gelagerten Biere. Bei diesen Temperaturen war nach dem ersten Versuchstag nur noch eine geringe und beinahe parallel verlaufende Trübungszunahme festzustellen. Erst gegen Ende der Versuchsreihe stiegen auch hier die Trübungswerte unterschiedlich stark an. Auffallend bei allen Proben zeigte sich ein enormer Trübungsanstieg zwischen der ersten ( $t = 0$ ) und der zweiten Messung ( $t = 1$  d).

Die Kinetik der Trübungsbildung stellt sich hier nicht als eine Reaktion erster Ordnung dar. Dies verdeutlichen die niedrigen Werte der Bestimmtheitsmaße der Regressionsanalyse.

<sup>1</sup> Mit dem ersten Messpunkt einer Versuchsreihe wurde also die Zeit  $t = 0$  festgelegt, obwohl schon zuvor Veränderungen im Bier stattfanden. D.h., durch Festlegen der Trübungs-Zeit-Wertepaare zum Zeitpunkt  $t = 0$  ergab sich ein systematischer Fehler.

$$\begin{aligned}
 4\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 0,72 + 0,17t & r^2 &= 0,57 \\
 9\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 0,70 + 0,20t & r^2 &= 0,67 \\
 20\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 0,81 + 0,31t & r^2 &= 0,77 \\
 30\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 0,95 + 0,37t & r^2 &= 0,78 \\
 40\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 1,31 + 0,19t & r^2 &= 0,67
 \end{aligned}$$

Der überproportionale Anstieg der Trübung zwischen den ersten beiden Messtagen hatte einen großen Einfluss auf die Reaktionskinetik. Bei Nichtberücksichtigung des Nullwertes stimmten die gewonnenen Erkenntnisse mit der zu überprüfenden Hypothese überein (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Trübungsbildung als Reaktion erster Ordnung eines nicht stabilisierten Bieres ohne Berücksichtigung der Trübungszunahme zwischen erster und zweiter Messung**

Die logarithmisierte Auftragung der Trübungsbildung als Funktion der Zeit korrelierte hier vor allem bei höheren Lagertemperaturen.

$$\begin{aligned}
 4\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 1,24 + 0,07t & r^2 &= 0,80 \\
 9\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 1,20 + 0,10t & r^2 &= 0,94 \\
 20\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 1,39 + 0,19t & r^2 &= 0,93 \\
 30\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 1,62 + 0,24t & r^2 &= 0,91 \\
 40\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) &= 2,25 + 0,19t & r^2 &= 0,94
 \end{aligned}$$

Allerdings sollte unter Einbeziehung des ersten Versuchstages die Möglichkeit untersucht werden, ob es sich hier um die Kinetik einer Reaktion nullter Ordnung handelt. D.h., dass der Anstieg der

Trübung linear verläuft und nicht exponentiell zur Zeit. Für die Trübungsbildung kann dieser Mechanismus folgendermaßen beschrieben werden:

$$EBC - EBC_0 = k \cdot t$$

Gleichung 7

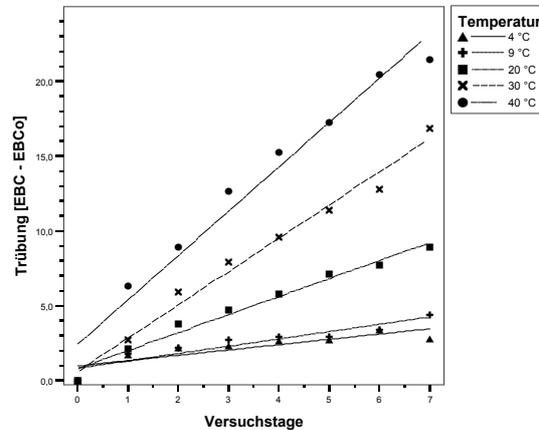


Abbildung 53: Trübungsbildung als Reaktion nullter Ordnung eines nicht stabilisierten Bieres

Die hohen Korrelationen bestätigten die angenommene Reaktion nullter Ordnung. Insbesondere die Werte der Temperaturen bei 20, 30 und 40 °C zeigten den linearen Zusammenhang zwischen Trübungsbildung und Zeit. Die Trübungsentstehung bei 4 und 9 °C konnte wiederum nicht eindeutig diesem Reaktionssystem zugeordnet werden.

$$4 \text{ °C} \quad EBC - EBC_0 = 0,97 + 0,36t \quad r^2 = 0,73$$

$$9 \text{ °C} \quad EBC - EBC_0 = 0,83 + 0,49t \quad r^2 = 0,87$$

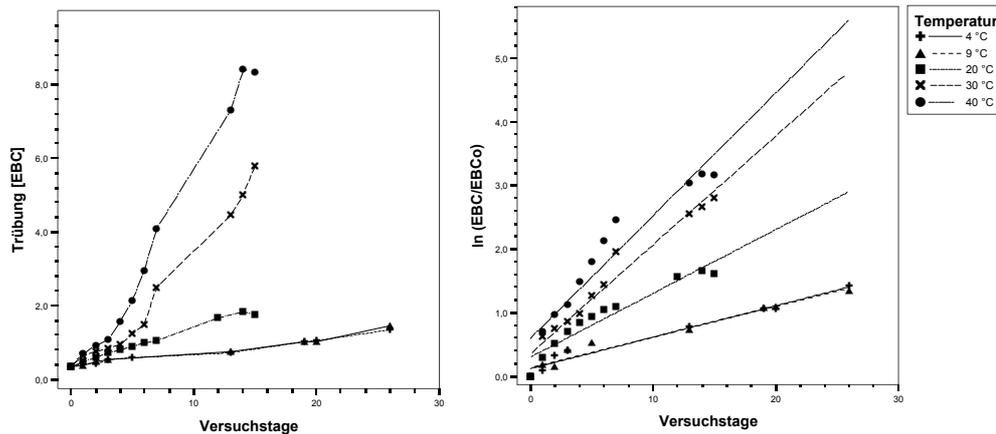
$$20 \text{ °C} \quad EBC - EBC_0 = 0,79 + 1,21t \quad r^2 = 0,98$$

$$30 \text{ °C} \quad EBC - EBC_0 = 0,61 + 2,23t \quad r^2 = 0,98$$

$$40 \text{ °C} \quad EBC - EBC_0 = 2,43 + 2,97t \quad r^2 = 0,97$$

Die Trübungsbildung eines nichtstabilisierten Bieres konnte keiner Reaktionskinetik zugeteilt werden. Bei Berücksichtigung der ersten Wertepaare schien die Reaktion einer Kinetik nullter Ordnung zu folgen. Ignorierte man dagegen diese Messpunkte, aufgrund des überproportionalen Anstiegs, so zeigte sich eine Reaktion erster Ordnung. Eine bessere Differenzierung innerhalb des ersten Versuchstages (stündliche Messung) könnte hier gegebenenfalls Aufschluss bringen.

In der nächsten Versuchsreihe wurde ein mit Xerogel stabilisiertes Bier analysiert. Auch in diesem Fall sollte der Verlauf der Trübung und die Annahme einer Reaktion erster Ordnung untersucht werden. Abbildung 54 zeigt die Trübungsbildung und die Reaktion erster Ordnung als eine Funktion der Zeit.



**Abbildung 54: Trübungsbildung (links) und Reaktion erster Ordnung (rechts) eines mit 100 g/hl Xerogel stabilisierten Bieres als eine Funktion der Zeit**

Auch bei diesem Bier war die Temperaturabhängigkeit der Trübungsbildung ersichtlich. Während das bei 40 °C gelagerte Bier bereits nach 12 Versuchstagen eine Trübung >8 EBC erreichte, lagen die Werte der Trübungen bei 4 und 9 °C nach 26 Tagen unter 2 EBC. Innerhalb der ersten drei Messungen unterschieden sich dagegen alle Proben geringfügig. Nach Übergang von der lag- in die exponentielle Phase wurden die Abweichungen jedoch größer und die Trübungswerte divergierten.

Im Gegensatz zu den nichtstabilisierten Proben konnte man hier eine exponentielle Zunahme der Trübung über die Zeit erkennen. Dies zeigten auch die höheren Bestimmtheitsmaße der Reaktionsgleichungen erster Ordnung.

$$4\text{ °C} \quad \ln(\text{EBC}/\text{EBC}_0) = 0,12 + 0,05t \quad r^2 = 0,97$$

$$9\text{ °C} \quad \ln(\text{EBC}/\text{EBC}_0) = 0,14 + 0,05t \quad r^2 = 0,96$$

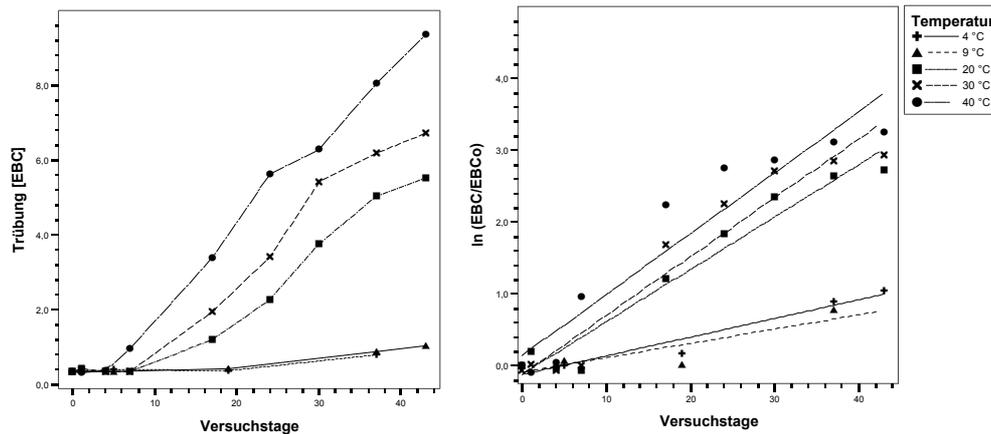
$$20\text{ °C} \quad \ln(\text{EBC}/\text{EBC}_0) = 0,30 + 0,10t \quad r^2 = 0,93$$

$$30\text{ °C} \quad \ln(\text{EBC}/\text{EBC}_0) = 0,36 + 0,17t \quad r^2 = 0,96$$

$$40\text{ °C} \quad \ln(\text{EBC}/\text{EBC}_0) = 0,59 + 0,19t \quad r^2 = 0,92$$

Hier ließen sich die Trübungszunahmen auch bei niedrigeren Temperaturen durch eine exponentielle Darstellung beschreiben. Mit  $r^2 > 0,9$  bei allen Temperaturen konnte man die Hypothese für eiweißseitig stabilisiertes Bier annehmen. Insgesamt fiel die Erhöhung der Trübung geringer als bei dem nichtstabilisierten Bier aus.

Die Verläufe der Trübungswerte eines mit Xerogel und PVPP behandelten Bieres ließen sich durch das Zwei-Phasen-Modell beschreiben. Sowohl die lag- als auch die log-Phase waren in dieser Versuchsreihe deutlich ausgeprägt (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Trübungsbildung (links) und Reaktion erster Ordnung (rechts) eines mit 30 g/hl Xerogel und 20 g/hl PVPP stabilisierten Bieres als eine Funktion der Zeit**

Der Einfluss höherer Temperaturen zeichnete sich wie bei den zuvor untersuchten Bieren deutlich ab. So unterschieden sich auch hier die bei 4 und 9 °C aufbewahrten Biere unwesentlich. Die bei höheren Temperaturen gelagerten Biere zeigten dagegen große Differenzen.

Die Beschreibung der Trübungsbildung mit Hilfe der Reaktion erster Ordnung lieferten folgende Gleichungen:

$$4\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) = -0,12 + 0,02t \quad r^2 = 0,94$$

$$9\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) = -0,08 + 0,02t \quad r^2 = 0,76$$

$$20\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) = -0,01 + 0,07t \quad r^2 = 0,95$$

$$30\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) = -0,11 + 0,08t \quad r^2 = 0,93$$

$$40\text{ °C} \quad \ln(EBC/EBC_0) = 0,15 + 0,08t \quad r^2 = 0,91$$

Die Bestimmtheitsmaße  $>0,9$  belegten, dass die Darstellung der Trübungszunahme als eine exponentielle Funktion und somit als eine Reaktion erster Ordnung gerechtfertigt war. Die Werte für das bei 9 °C gelagerte Bier waren hier eine Ausnahme, die diesem Reaktionssystem nicht zugeordnet werden konnten.

Für alle Versuchsreihen konnte somit eine Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Trübungsbildung nachgewiesen werden. Die bei 20, 30 und 40 °C gelagerten Biere zeigten stark unterschiedlich ausgeprägte Trübungsbildungen. Je höher die Aufbewahrungstemperatur der Biere war, desto mehr Trübung wurde gebildet. Die Trübungswerte der bei 4 und 9 °C aufbewahrten Proben unterschieden sich dagegen kaum voneinander.

Die Trübungsbildung ließ sich bei nichtstabilisiertem Bier mit der Kinetik nullter und bei nicht Be-

achtung des ersten Messpunktes mit einer Reaktion erster Ordnung beschreiben. Die Trübungsentstehung bei stabilisierten Bieren konnten als Prozesse erster Ordnung modelliert werden.

Die Untersuchungen der Trübungsbildung anhand der photometrisch gemessenen Zunahme kolloidal gelöster Stoffe lassen jedoch nur wenige Rückschlüsse auf die wirklichen Mechanismen zu. Sie können lediglich Tendenzen aufzeigen und das Reaktionssystem als Ganzes beschreiben. Um genauere Aussagen treffen zu können, müssen die daran beteiligten Stoffe bekannt sein und reaktionskinetisch betrachtet werden. Erst dann ist es möglich, detaillierte Aussagen über die Trübungsentstehung treffen zu können.

#### 4.4.3 Reaktionsmechanismen trübungsrelevanter Polyphenole

In Kapitel 4.4.1 wurde auf die Zusammenhänge zwischen Trübung und den reagierenden Mengen an Flavan-3-olen eingegangen. In Kapitel 4.4.2 wurde dagegen die Trübungsbildung als eine Funktion der Zeit beschrieben, ohne dabei auf die chemischen Vorgänge genauer einzugehen. In folgendem Abschnitt sollen nun die zeitlichen Verläufe der Flavan-3-ol-Abnahme explizit betrachtet werden.

Zunächst musste eine Gleichung für die theoretische Reduktion trübungsbildender Polyphenole hergeleitet werden. Ausgehend von Chapons Gleichung, dass Proteine und Tannine sich zu einem Protein-Tannin-Komplex verbinden, muss von einer Reaktion zweiter Ordnung gesprochen werden. D.h., die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von den Konzentrationen zweier Reaktanden (CHAPON 1994).



Für diese Gleichung ergibt sich durch Umformen folgendes integrales Zeitgesetz:

$$\ln \frac{T \cdot P_0}{T_0 \cdot P} = (T_0 - P_0) \cdot k \cdot t \quad \text{Gleichung 9}$$

Dabei sind  $T_0$  und  $P_0$  die Protein- bzw. Tanninkonzentrationen zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $T$  und  $P$  die Protein- bzw. Tanninkonzentrationen zum Zeitpunkt  $t > 0$ . Diese Formel kann, wenn eine der folgenden zwei Annahmen zutrifft, stark vereinfacht werden:

- Die Proteinkonzentration ist um ein Vielfaches höher als die Konzentration der trübungsrelevanten Polyphenole und verändert sich während der Trübungsbildung nur gering oder nicht nachweisbar, also  $P_0 \approx P$ .
- Eine Reaktion der Flavan-3-ole, zum Beispiel die o-Chinon-Bildung, ist der Trübungsbildung vorgelagert und geschwindigkeitsbestimmend.

Unter einer dieser Voraussetzungen, kann die Trübungsbildung als eine Reaktion pseudo-erster Ordnung beschrieben werden. In diesem Fall folgt die Abnahme der Polyphenole nach folgender Gleichung:

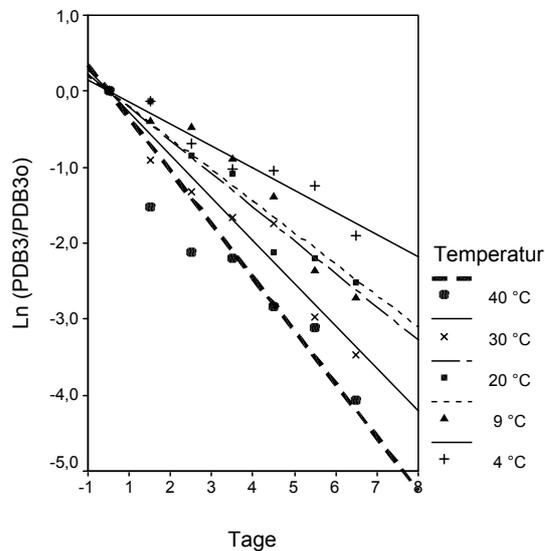
$$\ln \frac{T}{T_0} = -k' \cdot t \quad \text{Gleichung 10}$$

mit

$$k' = k \cdot [P_0] \quad \text{Gleichung 11}$$

$T$  ist dabei die Konzentration der Flavan-3-ole zum Zeitpunkt  $t$  und  $T_0$  die Konzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$ .  $k'$  ist die Geschwindigkeitskonstante, da auch  $k$  und  $[P_0]$  unveränderliche Größen sind.

Anhand der Regressionsanalyse wurden so Zusammenhänge der Werte für  $k'$  berechnet. Abbildung 56 zeigt beispielhaft den temperaturabhängigen Verlauf der Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Abnahme eines nicht stabilisierten Bieres.



**Abbildung 56: Logarithmische Darstellung der relativen Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Abnahme als Funktion der Zeit eines nicht stabilisierten Bieres**

Je steiler die Gerade, desto stärker ist auch die relative Abnahme der Stoffe. Die Steigung der Geraden spiegelt sich im Faktor  $k'$  wider. Sehr deutlich lässt sich aus der Abbildung der Temperatureinfluss erkennen. Je höher die gewählte Temperatur war, desto steiler war wiederum die Gerade und desto größer  $k'$ .

Sollte die Abnahme der Flavan-3-ole temperaturabhängig sein und einer exponentiellen Gleichung pseudo-erster Ordnung folgen, so müssen zwei Bedingungen zutreffen. Die Geschwindigkeitskonstante  $k'$  steigt mit zunehmender Temperatur an und die Bestimmtheitsmaße erreichen Werte  $>0,8$  (WESTPHAL et al 1996).

Die Biere wurden auf Catechin, Epicatechin, Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> untersucht. Auch die Summenparameter, dargestellt als Monomere, Dimere aller detektierten Flavan-3-ole wurden betrachtet.

**Tabelle 14: Kinetische Konstanten für die Reduktion des Catechin, Epicatechin, Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> bei einem nichtstabilisierten Bier**

Temperatur [°C]	Catechin		Epicatechin		Procyanidin B <sub>3</sub>		Prodelphinidin B <sub>3</sub>	
	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>
4	0,044	0,77	0,079	0,44	0,060	0,98	0,029	0,95
9	0,056	0,78	0,096	0,40	0,060	0,98	0,041	0,93
20	0,059	0,64	0,105	0,57	0,067	0,95	0,044	0,95
30	0,063	0,77	0,102	0,35	0,080	0,85	0,056	0,86
40	0,056	0,94	0,094	0,69	0,088	0,92	0,070	0,86

**Tabelle 15: Kinetische Konstanten für die Reduktion der Summenparameter in einem nichtstabilisierten Bier**

Temperatur [°C]	Σ Monomere		Σ Dimere		Σ Summe	
	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>
4	0,051	0,70	0,042	0,98	0,046	0,90
9	0,062	0,65	0,049	0,96	0,055	0,94
20	0,067	0,61	0,052	0,97	0,061	0,92
30	0,071	0,69	0,066	0,93	0,068	0,84
40	0,062	0,72	0,078	0,87	0,070	0,90

Wie aus Tabelle 14 und Tabelle 15 gut zu erkennen ist, gibt es große Differenzen zwischen den monomeren und dimeren Flavan-3-olen bei den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und insbesondere bei den Bestimmtheitsmaßen. Während sich Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> durch hohe Korrelationen in der Abnahme zur Zeit bei allen Temperaturen auszeichneten, zeigten die Monomere dabei keine Zusammenhänge. Bei den dimeren Flavan-3-olen konnte man ebenfalls die erwartete Temperaturabhängigkeit feststellen. Je höher die Temperatur gewählt wurde desto höher war auch die Geschwindigkeitskonstante k'. Gleiches trifft auch für die Summe der Flavan-3-ole zu. Auch hier zeigten die k'-Werte eine mit der Temperatur steigende Tendenz und die Bestimmtheitsmaße mit r<sup>2</sup> > 0,8 eine hohe Korrelation.

Ähnliche Schlüsse ließen die Werte des mit Xerogel stabilisierten Bieres zu. Auch hier zeigten die einfachen Polyphenole keine Übereinstimmung mit der zu überprüfenden Hypothese. Analog zu den oben analysierten Bieren kam es auch hier bei den dimeren Substanzen zu einer größeren Übereinstimmung zwischen angenommener und wirklicher Abnahme über die Zeit.

**Tabelle 16: Kinetische Konstanten für die Reduktion von Catechin, Epicatechin, Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> bei einem xerogelstabilisierten Bier**

Temperatur [°C]	Catechin		Epicatechin		Procyanidin B <sub>3</sub>		Prodelphinidin B <sub>3</sub>	
	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>
4	0,004	0,67	0,008	0,50	0,011	0,90	0,006	0,97
9	0,005	0,41	0,011	0,82	0,010	0,88	0,009	0,93
20	0,010	0,82	0,015	0,62	0,015	0,85	0,012	0,75
30	0,010	0,95	0,013	0,76	0,023	0,97	0,024	0,95
40	0,012	0,79	0,015	0,77	0,029	0,98	0,029	0,98

**Tabelle 17: Kinetische Konstanten für die Reduktion der Summenparameter in einem xerogelstabilisierten Bier**

Temperatur [°C]	Σ Monomere		Σ Dimere		Σ Summe	
	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>
4	0,005	0,68	0,009	0,94	0,007	0,95
9	0,006	0,84	0,012	0,95	0,007	0,94
20	0,011	0,86	0,016	0,86	0,011	0,88
30	0,010	0,94	0,024	0,97	0,017	0,97
40	0,012	0,80	0,029	0,99	0,021	0,97

Die Bestimmtheitsmaße der Summenparameter lagen zum Teil auch hier über denen der Einzelsubstanzen. Im Vergleich zu nichtstabilisiertem Bier waren die Geschwindigkeitskonstanten niedriger, die Bestimmtheitsmaße jedoch höher. D.h., der Abbau der Flavan-3-ole verlief langsamer aber unter der aufgestellten Annahme eines exponentiellen Zusammenhangs eindeutiger.

**Tabelle 18: Kinetische Konstanten für die Reduktion von Catechin, Epicatechin, Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> bei einem xerogel- und PVPP-stabilisierten Bier**

Temperatur [°C]	Catechin		Epicatechin		Procyanidin B <sub>3</sub>		Prodelphinidin B <sub>3</sub>	
	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>
4	0,001	0,36	0,005	0,77	0,002	0,58	0,009	0,92
9	0,001	0,67	0,003	0,67	0,003	0,42	0,010	0,90
20	0,001	0,24	0,008	0,80	0,007	0,73	0,015	0,74
30	0,007	0,66	0,012	0,92	0,015	0,85	0,019	0,69
40	0,008	0,91	0,011	0,81	0,017	0,90	0,021	0,79

**Tabelle 19: Kinetische Konstanten für die Reduktion der Summenparameter in einem xerogel- und PVPP-stabilisierten Bier**

Temperatur [°C]	Σ Monomere		Σ Dimere		Σ Summe	
	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>	k' [Tage <sup>-1</sup> ]	r <sup>2</sup>
4	0,002	0,75	0,007	0,91	0,005	0,88
9	0,002	0,99	0,007	0,87	0,005	0,91
20	0,003	0,83	0,012	0,59	0,008	0,74
30	0,009	0,93	0,018	0,76	0,014	0,84
40	0,009	0,92	0,020	0,82	0,015	0,87

Die relative Abnahme der Polyphenole des mit PVPP und Xerogel stabilisierten Bieres korrelierte bei allen untersuchten Stoffen nur gering zur längeren Lagerzeit. Die Abnahme der Einzelsubstanzen zeigte keine eindeutige Tendenz. Die Summenparameter lieferten dagegen höhere Korrelationen. Auffallend war hier der große Zusammenhang bei der Summe der Monomere mit der untersuchten Hypothese. Alle Werte lagen hier zum Teil deutlich über den erreichten Bestimmtheitsmaßen der anderen Summenparameter. In allen Fällen war eine Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zu erkennen.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k'$  zeigte die erwartete Temperaturabhängigkeit. Je höher die gewählte Temperatur lag, desto größer stellte sich die Reaktionsgeschwindigkeit dar. Neben der Temperatur hatte besonders der Polymerisationsgrad der Polyphenole einen Einfluss auf die Größe der Konstanten. Höher polymerisierte Stoffe besaßen im Vergleich zu den einfachen Flavan-3-olen größere  $k'$ -Werte. D.h., die Dimere reagierten schneller und nahmen somit stärker ab als die Monomeren. Die Werte von Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> korrelierten des Weiteren besser mit der angenommenen exponentiellen Reduktion als Catechin und Epicatechin. Gleiches war bei den Summenparametern der Monomeren und Dimeren zu beobachten. Diese Resultate bestätigen Theorien anderer Arbeiten, die eine mit zunehmendem Polymerisationsgrad höhere Reaktivität der Polyphenole beobachteten (MULKAY und JERUMANIS 1983, SIEBERT 1999).

Beim Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der verschiedenen stabilisierten Biere zeigten sich deutliche Differenzen. Die stärksten Unterschiede lagen zwischen nicht stabilisierten und stabilisierten Bieren. Zum Teil war die Geschwindigkeitskonstante beim unbehandelten Bier um den Faktor vier höher als bei den stabilisierten Bieren. Die niedrigsten Geschwindigkeitsreaktionskonstanten wies das mit PVPP und Xerogel stabilisierte Bier auf. Somit ist die Abnahme der Flavan-3-ole direkt abhängig von deren Ausgangskonzentration im abgefüllten Bier. Je höher die Menge der Flavan-3-ole im Bier war, desto schneller reagierten diese auch. Ein direkter Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit der Trübungsbildung und dem Ausgangswert der Polyphenole konnte nicht festgestellt werden. Somit muss es sich um unterschiedliche Reaktionssysteme handeln, da bei gleichen Reaktionen die Geschwindigkeit der Umsetzung direkt proportional zur Menge des umgesetzten Stoffes ist.

Es soll hier darauf hingewiesen werden, dass hohe Korrelationen nicht ohne weiteres zu Verifizierung einer Hypothese führen, jedoch geringe Zusammenhänge eine Ablehnung der untersuchten These zur Folge haben. Für die hier untersuchten Biere bedeutet dies, dass die Annahme der exponentiellen Reduktion für die Einzelsubstanzen Catechin und Epicatechin bei allen Bieren abgelehnt wurde.

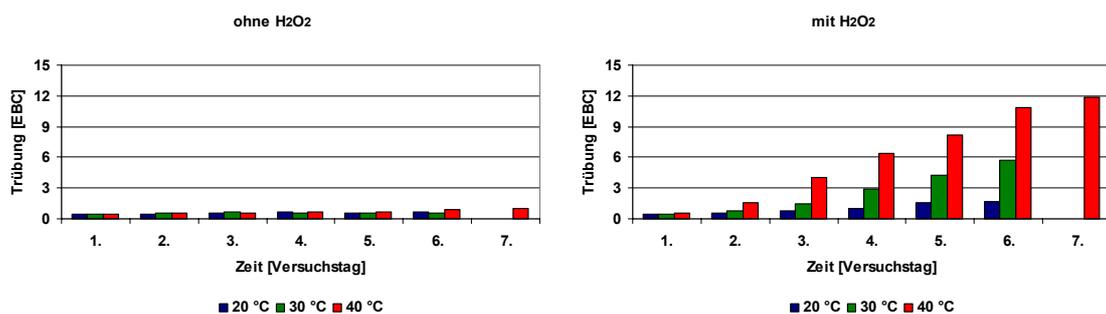
#### 4.4.4 Reaktionsbeschleunigende Substanzen

Es soll vorweggenommen werden, dass es sich bei den betrachteten Substanzen nicht um Katalysatoren handelt. Katalysatoren sind definitionsgemäß Substanzen, die die Geschwindigkeit einer Reaktion erhöhen, ohne dass diese bei der Reaktion verbraucht werden (ATKINS 1993). Stoffe, welche im Bier fälschlicherweise als Katalysatoren oder katalytisch wirkend beschrieben werden, sind in den meisten Fällen nicht mehr nachweisbar oder in ihrer ursprünglichen Form nicht mehr vorhanden. D.h., diese Stoffe wurden chemisch und nicht katalytisch umgesetzt.

In diesem Kapitel wird untersucht wie sich eine definierte Zugabe von Sauerstoff, in Form von Wasserstoffperoxid, Eisen- und Kupfersalzen auf die kolloidale Stabilität und die Flavan-3-ole der Biere auswirkt. Zu diesem Zweck wurde den Bieren die Additive in den Drucktank vor der Abfüllung zugesetzt. Parallel wurde ein Kontrollbier ohne Zusatz abgefüllt. Die kontaminierten und unbehandelten Biere wurden bei 4, 9, 20, 30 und 40 °C gelagert und nach jedem Versuchstag zur Entwicklung der Kältetrübung 24 h bei 0 °C gekühlt. Nach photometrischer Lichtstreuungsmessung der entstandenen Kolloide wurden die Biere, wie unter 4.4.1 beschrieben, untersucht.

##### 4.4.4.1 Aktiver Sauerstoff

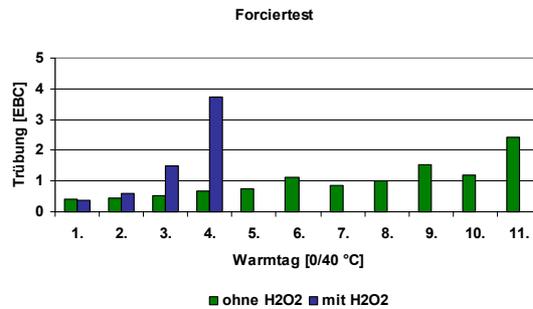
Sauerstoff wurde in aktiver Form von Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Sauerstoffmessung ergab eine Erhöhung des Gesamtsauerstoffs von 0,22 mg/l im Kontrollbier auf 0,94 mg/l im kontaminierten Bier. Nach Abschluss der Tests konnte kein Sauerstoff mehr in den Analysebiere festgestellt werden. Dies bedeutete, dass der gesamte Sauerstoff mit den Bierinhaltsstoffen reagiert haben musste.



**Abbildung 57: Vergleich des Trübungsverlaufs eines unbehandelten Bieres und eines mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzten Bieres bei unterschiedlichen Temperaturen**

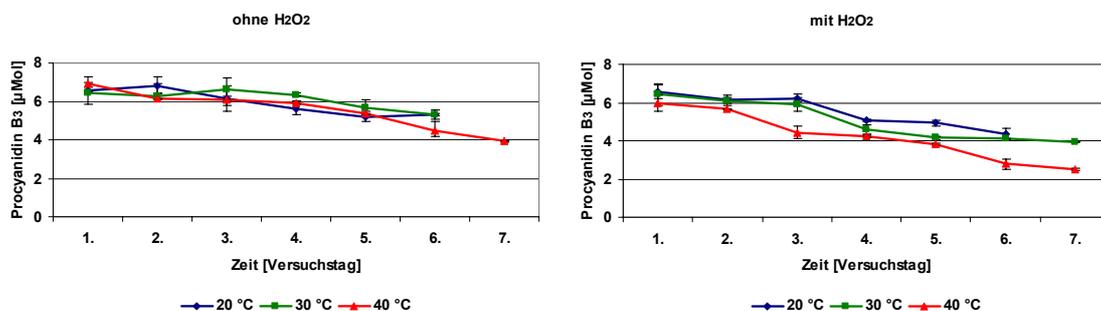
Während die Lagerung der Biere bei 4 und 9 °C kaum Unterschiede hervorbrachte, ließen höhere Temperaturen starke Differenzen erkennen. Die Trübungswerte der unbehandelten Biere stiegen während der Messperiode kaum an, wie dies für ein gerbstoff- und eiweißseitig stabilisiertes Bier zu erwarten war. Dagegen erhöhte sich die Trübung der kontaminierten Biere mit steigender Temperatur überproportional. Bereits nach drei Versuchstagen wurde in dem bei 40 °C gelagerten Bier

eine Trübung von 4 EBC gemessen. Im Durchschnitt lagen die Werte des Sauerstoff-Bieres bei 40 °C nach dem dritten Versuchstag um den Faktor 10 höher als in der Referenzprobe. Bei 20 °C verdreifachten und bei 30 °C versechsfachten sich die Trübungswerte der mit Wasserstoffperoxid vermischten Biere gegen Ende der Messungen. Deutlich werden die Differenzen zwischen behandelter und unbehandelter Probe bei Betrachtung des Forciertests.



**Abbildung 58:** Verlauf der Trübungswerte während des Forciertests [0/40 °C] bei einem unbehandelten und einem mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontaminierten Bier

Während sich keine Unterschiede am ersten Messtag ergaben, erhöhte sich der Trübungswert der kontaminierten Probe am zweiten Warmtag und ging von der lag- in die log-Phase über. Das Referenzbier zeigte erst bei der vierten Messung eine erkennbare Zunahme der Trübung. In der exponentiellen Phase stiegen die Werte unterschiedlich an. Während die Bildung von Agglomeraten im mit Wasserstoffperoxid versetztem Bier rasch voranschritt, stiegen die Trübungswerte des Kontrollbieres kaum an. Dies spiegelte sich auch in den erreichten elf Warmtagen des Kontrollbieres gegenüber den 4 Tagen des kontaminierten Bieres wider.

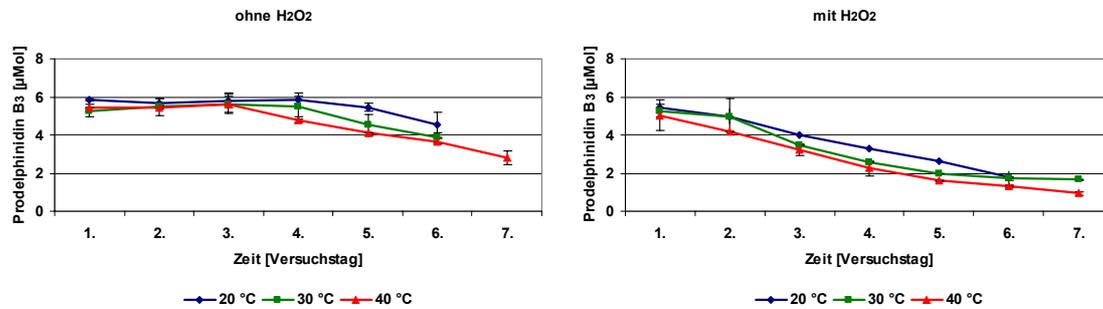


**Abbildung 59:** Veränderung der Abnahme des Procyanidins B<sub>3</sub> über die Zeit durch Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in das stabilisierte und filtrierte Bier

Die Unterschiede der Trübungsmessung ließen sich auch in der Abnahme der dimeren Flvan-3-ole erkennen. Trotz geringer Ausgangswerte reduzierte sich der Gehalt des Procyanidin B<sub>3</sub> um 50% auf eine Konzentration von 2,5 µMol bei dem 40 °C gelagerten und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Bier. Die Abnahme im bei 30 °C aufbewahrten, kontaminierten Bieres erreichte gegen Ende der Untersuchungen den selben Wert wie die bei 40 °C aufgestellte Referenzprobe. Dies bedeutet wiederum, dass die gebildeten Agglomerate unterschiedlich zusammengesetzt sein mussten, da bei gleicher

Procyanidinkonzentration die Trübungen zum einen 1 EBC, zum anderen 5,5 EBC erreichten.

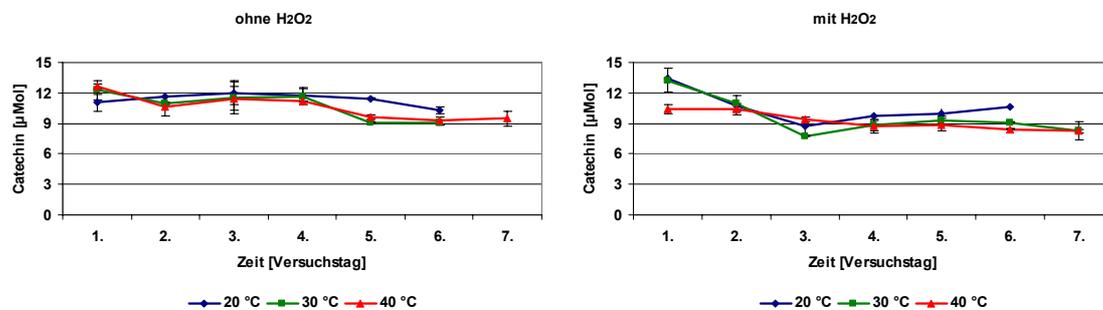
Die Reduktion des Procyanidins B<sub>3</sub> stellte sich als temperaturabhängig heraus. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufbewahrungstemperaturen und der Procyanidinabnahme des Kontrollbieres waren jedoch gering. Gleiches galt auch für die im Untersuchungszeitraum beobachtete Trübungszunahme.



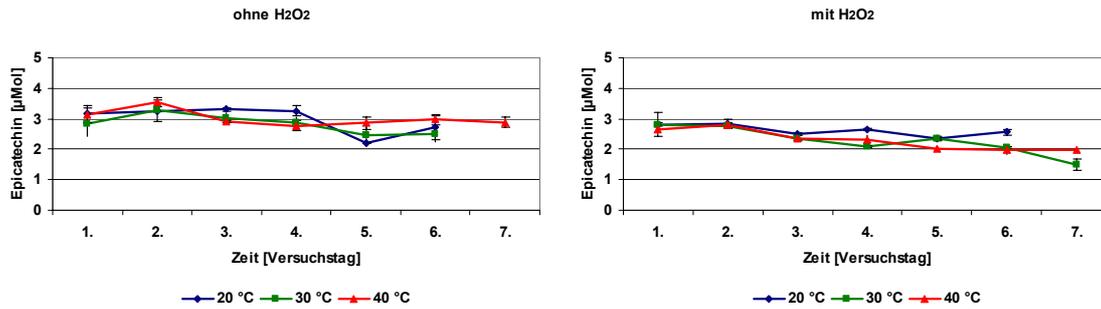
**Abbildung 60: Veränderung der Abnahme des Prodelphinidins B<sub>3</sub> über die Zeit durch Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in das stabilisierte und filtrierte Bier**

Bei Prodelphinidin B<sub>3</sub> konnte unabhängig von der Aufbewahrungstemperatur eine stärkere Reduktion als bei Procyanidin B<sub>3</sub> beobachtet werden. Auch die Unterschiede zwischen unbehandeltem und mit Sauerstoff beaufschlagtem Bier fielen deutlicher aus. Während in den unbehandelten Proben nach dem dritten Tag eine Verminderung des Prodelphinidin B<sub>3</sub>-Gehaltes zu verzeichnen war, reduzierte sich die Konzentration in dem mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzten Bier bei einer Lagertemperatur von 40 °C innerhalb der ersten 24 Stunden merklich. Prodelphinidin B<sub>3</sub> wurde somit bedeutender durch die Oxidation beeinflusst als das zuvor untersuchte Dimer. Diese höhere Empfindlichkeit gegenüber Oxidationsvorgängen lässt sich mit der zusätzlichen Hydroxygruppe erklären (MOCEK und RICHARDSON 1972).

Auch bei dieser Substanz galt, dass die Trübungszunahme und die Konzentrationsabnahme nicht verglichen werden konnte. Eine äquivalente Menge an Prodelphinidin B<sub>3</sub> bildete im Kontrollbier weniger Trübung als in der behandelten Probe. D.h., bei einer starken Oxidation sind neben den dimeren Flavan-3-olen auch noch weitere Stoffe an der Bildung kolloidaler Teilchen beteiligt.



**Abbildung 61: Veränderung der Catechinabnahme über die Zeit durch Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in das stabilisierte und filtrierte Bier**



**Abbildung 62: Veränderung der Epicatechinabnahme über die Zeit durch Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in das stabilisierte und filtrierte Bier**

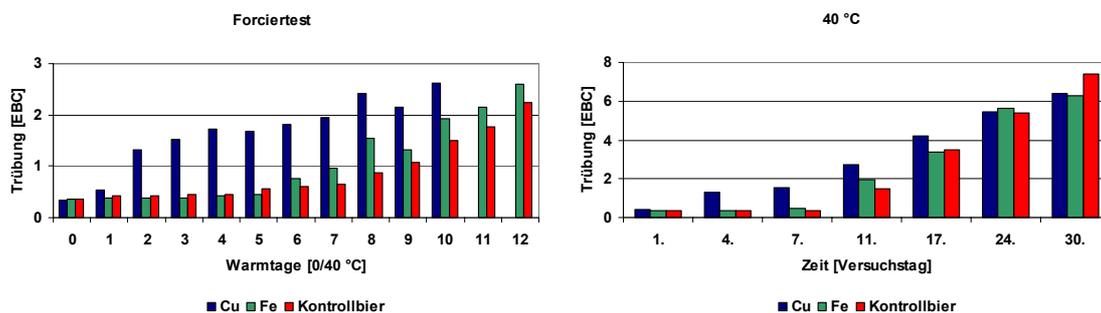
Die untersuchten Monomere Catechin und Epicatechin verhielten sich, trotz unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen, ähnlich. Sowohl bei Catechin als auch bei Epicatechin war in dieser Versuchsreihe keine temperaturabhängige, signifikant unterschiedliche Abnahme der Konzentrationen zu erkennen. Bei dem mit Sauerstoff versetzten Bier reduzierte sich der Gehalt beider Stoffe während der ersten drei Tage. Im Anschluss daran veränderten sich die Mengen der Substanzen nur noch gering. Bei den Referenzbieren nahmen die Konzentrationen an Catechin und Epicatechin erst am vierten Versuchstag leicht ab und veränderten sich bis zum Ende der Versuchstage unbedeutend. Das ähnliche Verhalten der beiden Stoffe lässt sich durch deren Strukturisomerie erklären. Der Sauerstoffeinfluss auf die beiden monomeren Flavan-3-ole war nur im begrenzten Maße vorhanden.

Die Zugabe einer aktiven Form des Sauerstoffs, als Wasserstoffperoxid, zu stabilisiertem Bier, hatte eine deutliche Verringerung der kolloidalen Stabilität zur Folge. Diese Instabilität konnte jedoch nur teilweise mit der verstärkten Reduktion trübungsrelevanter Polyphenole erklärt werden. Insbesondere die beiden untersuchten Dimere, Procyanidin B<sub>3</sub> und Prodelphinidin B<sub>3</sub> wurden durch das Additiv beeinflusst. Die stärkere Verringerung der Flavan-3-ole stand aber in keinem Verhältnis zu der überproportionalen Trübungsbildung in den behandelten Bieren. Der Vergleich mit den Kontrollbieren zeigte, dass bei den unbehandelten Bieren eine größere Menge an Flavan-3-olen benötigt wurde, um eine entsprechende Trübung zu erhalten. Umkehrt bedeutet dies, dass eine äquivalente Menge an Flavan-3-olen eine geringere Trübung erzeugte. Dies besagt wiederum, dass andere Stoffe, die gleichfalls zur Agglomeration benötigt werden, oxidiert wurden und die kolloidale Stabilität herabsetzten.

Dennoch stimmen diese Beobachtungen zum Teil mit dem von Gardner und Mitarbeitern vorgeschlagenen Modell der Polymerisationstheorie überein. Dort wird angenommen, dass Proanthocyanidine nach der Abfüllung durch Oxidation aktiviert werden müssen, bevor sie mit Proteinen zu sichtbaren Kolloiden ausfallen können (GARDNER und MCGUINNESS 1977). Es konnte zwar nicht bestätigt werden, dass eine Oxidation die Voraussetzung für die Trübungsbildung ist. Jedoch wurde die Entstehung kolloidaler Agglomerate bei gleichzeitiger Abnahme der daran beteiligten Flavan-3-ole durch die Zugabe von Sauerstoff beschleunigt.

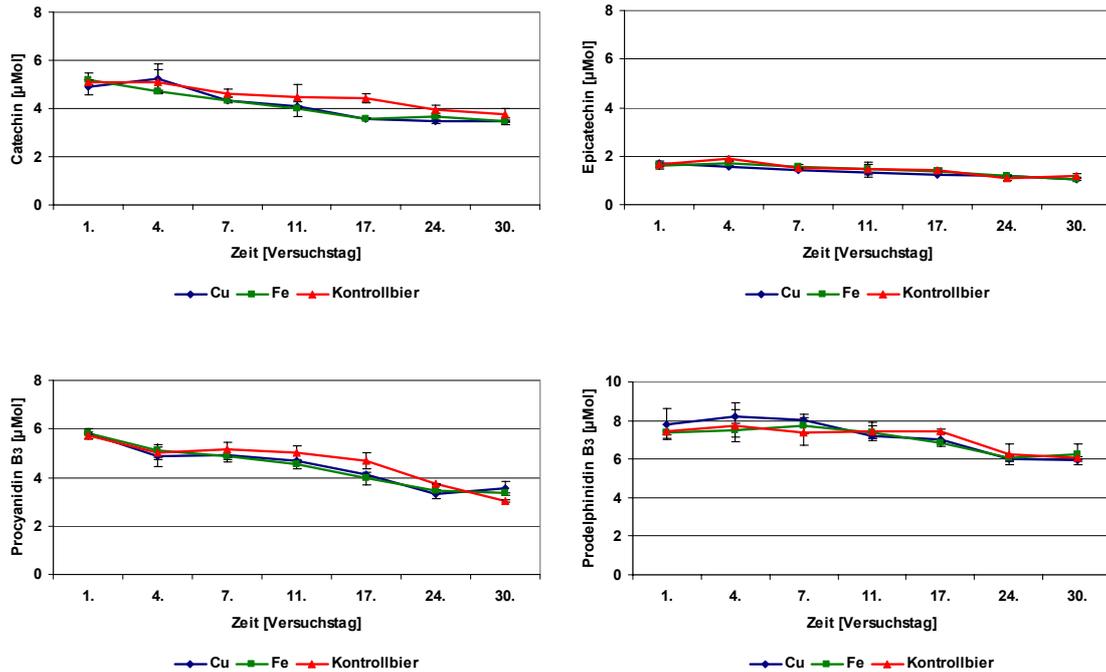
#### 4.4.4.2 Kupfer- und Eisenionen

In weiteren Messreihen wurde der Einfluss von Kupfer- und Eisenionen untersucht. Hierfür wurde dem Bier Kupfersulfat und Eisensulfat vor der Abfüllung zugegeben. Parallel wurde ein Kontrollbier ohne Additive untersucht. Der Kupfergehalt des Bieres erhöhte sich durch die Zugabe von 0,06 mg/l auf 0,93 mg/l, die Eisenkonzentration von 0,10 auf 0,88 mg/l. Der Sauerstoffgehalt betrug bei beiden Proben 0,10 mg/l. Auch bei diesen Untersuchungen wurden die Biere bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert und einem Forciertest unterzogen. Analog wurde das Verhalten der Flavan-3-ole während der Aufbewahrung bei unterschiedlichen Temperaturen analysiert.



**Abbildung 63:** Verlauf der Messwerte während des Forciertests [0/40 °C] (links) und über einen längeren Zeitraum der bei 40 °C aufbewahrten Biere (rechts)

Die Trübungsbildung zeigte unterschiedliche Verläufe. Während das mit Eisen versetzte Bier sich nur geringfügig stärker trübte als das Kontrollbier, stiegen die Werte des „Kupferbieres“ bereits nach kurzer Zeit stark an. Im weiteren Verlauf glichen sich die Trübungen der Biere wieder einander an. Bei längerer Aufbewahrung der Proben reduzierte sich der Unterschied, bis sich alle untersuchten Proben auf ein Niveau einpendelten. Geringe bzw. keine Abweichungen konnten bei dem mit Eisen versetzten Bier festgestellt werden. Die Erhöhung der Trübung während des Forciertests gegenüber der Kontrolle war minimal, so dass die Probe lediglich einen Wärmtag weniger zu verzeichnen hatte als das unbehandelte Bier. Ähnlich gering stellten sich auch die Differenzen der Flavan-3-ol-Analytik dar.



**Abbildung 64:** Verlauf der dimeren Flavan-3-ole, links: Catechin (oben), Procyanidin B<sub>3</sub> (unten); rechts: Epicatechin (oben) und Prodelphinidin B<sub>3</sub> (unten), über die Zeit bei 40 °C in mit Eisen oder Kupfer versetztem Bier und einer Kontrollprobe

Zwischen den analysierten Bieren konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Weder das mit Eisen versetzte Bier noch die Zugabe des Kupfers hatten Auswirkungen auf die Flavan-3-ol-Abnahme (Abbildung 64). Die erhöhten Trübungswerte des „Kupferbieres“ konnten somit nicht durch eine verstärkte Abnahme der Flavan-3-ole bestätigt werden. Die Vermutung lag nahe, dass es sich hier um eine Proteinfällung durch Kupfer handelte. Kupfer forciert die Aggregation und ist an Komplexbildungen mit Peptiden beteiligt. Jedoch konnte die Bildung in dieser Versuchsreihe nicht bewiesen werden.

Nach Abtrennung der Trübungen konnte in den Überständen der forcierten Biere kein Kupfer und Eisen mehr gefunden werden. Dies bedeutet, dass sich die untersuchten Metalle quantitativ in die Trübung eingelagert haben, von denen nur Kupfer einen direkten Einfluss auf die Trübungsbildung hatte.

## 5 Literaturverzeichnis

ANGER, H.-M., 1983: Die Stabilisierung von Bier unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole. TU Berlin, Fachbereich 13 Lebensmitteltechnologie und Biotechnologie, Dissertation.

ANGER, H.-M., 1995: Sicherung der nichtbiologischen Stabilität eines Bieres als wichtiger Baustein zur Garantie der Mindesthaltbarkeitsdauer. – *Brauwelt*, Jg. 135 (10/11), 501-508.

ANTONETTI, M., HORN, D., IDEN, R. MÜLLER-MALL, R., WINKLER, E., 1998: *Kolloide*. – BASF (Hrsg.).

ASANO, K., SHINAGAWA, K, HASHIMOTO, N. 1982: Characterization of Haze-Forming Proteins of Beer and Their Role in Chill Haze Formation. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 40 (4), 147-154.

ATKINS, P., 1993: *Einführung in die Physikalische Chemie* (1. Aufl. 1993). VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

BAMFORTH, C. W., 1999: Beer Haze. – *Journal of The American Society of Brewing Chemists*, Vol. 57 (3), 81-90.

BATCHAVAROV, V. und CHAPON, L., 1985: Vorausbestimmung der kolloidalen Bierhaltbarkeit. – *Monatsschrift für Brauwissenschaft* Jg. 38 (8), 331-341.

BATESON, J. B. und LEACH, A. A., 1969: Nitrogen Studies of Worts in Relationship to Beer Quality. – In: *Proceedings of the 12th EBC Congress, Interlaken, European Brewery Convention* (Hrsg.), 161-171.

BAXTER, N., LILLEY, T., HASLAM, E., WILLIAMSON, M., 1997: Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. – *Biochemistry*, Vol. 36 (18), 5566-5577.

BENGOUDH, W. I. und HARRIS, G, 1955: General Composition of Non-biological Hazes of Beers and some Factors in Their Formation. Part I. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 61, 134-145.

BELITZ ,H. D. und GROSCH, W., 1992: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Aufl., Springer Verlag Berlin Heidelberg.

BELLEAU, G und DADIC, M., 1981: Beer Hazes. II. Further Analyses of Basic Components by High Performance Liquid Chromatography. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 39 (4), 142-146.

BELLMER, H.-G., GALENSA, R., GROMUS, J., 1995a: Bedeutung der Polyphenole für die Bierherstellung. – *Brauwelt*, Jg. 135 (28/29), 1372-1379.

BELLMER, H.-G., GALENSA, R., GROMUS, J., 1995b: Bedeutung der Polyphenole für die Bier-

herstellung. – Brauwelt, Jg. 135 (30), 1477-1496.

BERKELMAN, T. and STENSTEDT, T., 1998: 2-D Electrophoresis – Handbuch, Amersham pharmacia biotech (Hrsg.).

BIANCO, A., CHIACCHIO, U., RESCIFINA, A., ROMEA, G., UCCELLA, N., 1997: Biometric supramolecular biophenol-carbohydrate and biophenol-protein models by NMR experiments. – Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 45, 4281-4285.

BIO-RAD, 2001: Instruction Manual. – Bio-Rad Laboratories.

BURKERT, J.; WITTEK, D.; GEIGER, E.; WABNER, D., 2003: Warum Würzebelüftung? Kritische Untersuchung der Vorgänge bei der Würzebelüftung. – Brauwelt, Jg. 143 (4/5), 109-113.

CMEROGLU, B., VELIOGLU, S., ISIK, S., 1994: Degradation Kinetics of Anthocyanins in Sour Cherry Juice and Concentrate. – Journal of Food Science, Vol. 59 (6), 1216-1218.

CHAPON, L., 1993a: Der Begriff Tannine. – Monatsschrift für Brauwissenschaft, Jg. 46 (7/8), 263-279.

CHAPON, L., 1993b: Nephelometry as a method for studying the relations between polyphenols and proteins. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 99, 49-56.

CHAPON, L., 1994: The mechanics of beer stabilization. – Brewer's Guardian, Vol. 123 (12), 46-50.

CHARLTON, A.J., BAXTER, N. J., HASLAM, E., DAVIES, A. P., WILLIAMSON, M .P., 1998a: Salivary proteins as a defence against dietary tannins. – Cost 916, European Commission Science Research, 179-185.

CHARLTON, A.J., BAXTER, N. J., HASLAM, E., DAVIES, A. P., WILLIAMSON, M .P., 1998b: Salivary proteins-rich as a defence against dietary tannins. – Cost 916, European Commission Science Research, 201-207.

CHARLTON, A.J., BAXTER, N.J., KHAN, M.L., MOIR, J.G., HASLAM, E., DAVIES, A. P., WILLIAMSON, M. P., 2002: Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. – Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50 (6), 1593-1601.

CHOLLOT, B., CHAPON, L. und URION, E., 1962: Polyphenolische und proteinische Vorläufer der Oxydationstrübungen. – Monatsschrift für Brauwissenschaft, Jg. 15 (10), 321-329.

CONDON, G. D., 1986: Amino Acid Analysis. – Theory & Laboratory Techniques Handbook, LKB Biochrom Ltd. (Hrsg.), Cambridge, UK.

DADIC, M., 1976: Current concepts on Polyphenols and Beer Stability. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 13 (3), 182-189.

DADIC, M. und BELLEAU, G., 1980: Beer Hazes. I. Isolation and Preliminary Analysis of Phenolic

and Carbohydrate Components. – Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 38 (4), 154-158.

DE CLERCK, J., 1947: Determinations de Tannin en Brassiere. – In: Proceedings of the 1st EBC Congress, Scheveningen, European Brewery Convention (Hrsg.), 78-82.

DELCOUR, J. A. und DONDEYNE, P., 1982: The reactions between polyphenols and aldehydes and the influence of acetaldehyde on haze formation in beer. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 88, 234-243.

DELCOUR, J. A. und TUYTENS, G. M., 1984: Structure elucidation of three dimeric Proanthocyanidins isolated from a commercial Belgian pilsner beer. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 90, 153-161.

DELCOUR, J. A., VANHAMEL, S., MOERMAN, E., VANCRAENENBROECK, R., 1987: Use of proanthocyanidin-free malt galant and/or physico-chemical stabilisation treatments for the production of chill-proof beers. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 24 (1), 21-27.

DE PASCUAL-TERESA, S., TREUTTER, D., RIVAS-GONZALO, J.C., SANTOS-BUELGA, C., 1998: Analysis of Flavanols in Beverage by High-Performance liquid Chromatography with Chemical Reaction Detection. – Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 46 (10), 4209-4213.

DE PASCUAL-TERESA, S., SANTOS-BUELGA, C., RIVAS-GONZALO, J.C., 2000: Quantitative Analysis of Flavan-3-ols in Spanish Foodstuffs and Beverages. – Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 48 (11), 5331-5337.

DERDELINCKX, G., JERUMANIS, J. 1987: Depolymerization of the proanthocyanidins: identification of intermediate compounds. – In: Proceedings of the 21st EBC Congress, Madrid, European Brewery Convention (Hrsg.), 577-591.

DÖRFLER, H.-D., 2004: Grenzflächen und kolloid-disperse System. – Springer Verlag Berlin Heidelberg.

DÖRR, C., 2003: Untersuchung der Eignung von Kunststoffflaschen für die Bierabfüllung. – TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation.

DÖRR, C., WEISSER, H., 2001: Validation of PET-bottles for the filling of beer. – In: Proceedings of the 28th EBC Congress, Budapest, European Brewery Convention (Hrsg.).

EASTMOND, R. und GARDNER, J., 1973: Effect of various polyphenols on the rate of haze formation in beer. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 80, 192-200.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION (EBC) Analysis Committee, 1987: Analytica-EBC, Verlag Hans Carl, Getränke-Fachverlag.

ENGELHARDT, U. und GALENSA, R., 1997: Analytik und Bedeutung von Polyphenolen in Lebensmitteln. –In: Bahadir, A. M, Danzer, K., Engewald, W., Fresenius, W., Galensa, R., Gänzler, H., Linscheid, M., Schwedt, G., Tölg, G. (Hrsg.): Analytiker Taschenbuch. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

EVERETT, D. H., 1992: Grundzüge der Kolloidwissenschaft. – Steinkopff Verlag Darmstadt.

FREEMAN, G. J., LE GOURRIEREC, X., PATEL, A., DAWOSN, M. K., POWELL-EVANS, M. H. B., SKIPPER, A. J., EVANS, C. T., BOULTON, C. A., GRIMMETT, C. M., BARON, J.M. 2003a: Improving the Effectiveness of Isinglass Finings for Beer Clarification by Optimisation of the Mixing Process. Part 1: Laboratory Scale Experiments. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 109, 309-317.

FREEMAN, G. J., DAWOSN, M. K., BARON, J.M., LE GOURRIEREC, X., PATEL, A., POWELL-EVANS, M. H. B., SKIPPER, A. J., EVANS, C. T., BOULTON, C. A., GRIMMETT, C. M. 2003b: Improving the Effectiveness of Isinglass Finings for Beer Clarification by Optimisation of the Mixing Process. Part 2: Pilot Scale Experiments. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 109, 318-325.

FREEMAN, G. J., POWELL-EVANS, M. H. B., BARON, J.M., PATEL, A., SKIPPER, A. J., DAWOSN, M. K., EVANS, C. T., BOULTON, C. A., GRIMMETT, C. M., LE GOURRIEREC, X. 2003c: Improving the Effectiveness of Isinglass Finings for Beer Clarification by Optimisation of the Mixing Process. Part 3: Full-Size Prototype Evaluation. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 109, 326-331.

FRIEDRICH, W., 2000: Proanthocyanidine in den Braurohstoffen Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Gertenmalz: HPLC-Bestimmung mit UV-und Elektrodenarray-Detektion. – Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Landwirtschaftliche Fakultät, Dissertation.

FEUCHT, W und TREUTTER, D, 1989: Phenolische Naturstoffe – Ihre Bedeutung für Gartenbau, Land- und Forstwirtschaft; Obst- und Gartenbauverlag München

GARBAR, P. und DAUSSANT, J., 1965: Identifizierung der Eiweißbestandteile der Kälte trübung des Bieres. – In: Proceedings of the 10th EBC Congress, Stockholm, European Brewery Convention (Hrsg.), 154-155.

GARDNER, R. J., MCGUINNESS, J. D., 1977: Complex Phenols in Brewing. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 14 (4), 250-261.

GÖRG, A., BOGUTH, G., DREWS, O., KÖPF, A., LÜCK, C., REIL, G., WEISS, W., 2003: Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteom Analysis – A Laboratory Manual. In URL: <http://www.wzw.tum.de/blm/deg/2D-Manual.pdf> (07.06.2004).

GOUPY, P., HUGUES, M., BOIVIN, P., AMIOT, M. J., 1999: Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. – Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 79, 1625-1634.

GRAMSHAW, J.W., 1967: Phenolic constituents of beer and brewing materials. II. The role of Polyphenols in the formation of non-biological haze. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 73, 61-83.

GRAMSHAW, J.W., 1969: Phenolic constituents of beer and brewing materials IV. Further observations on Anthocyanogens and Catechins as haze precursors in beer. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 75, 455-472.

GROMUS, J., 1981: Großtechnische Versuche zur Darstellung von Zusammenhängen zwischen Malz- und Biereigenschaften. TU München, Fachbereich für Brauwesen und Lebensmitteltechnologie, Dissertation.

GROMUS, J. und LUSTIG, S., 1999: Einfluss von Polyphenolen und reduzierenden Verbindungen auf die Bierqualität und ihr Verhalten im Brauprozess. – *Brauwelt*, Jg. 139 (44), 2028-2034.

HAGERMAN, A. E. und BUTLER, L. G., 1981: The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. – *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 256 (9), 4494-4497.

HALL, R.D., HARRIS, G., RICKETTS, R. W., 1959: Studies on Non-biological Hazes of Beers. V. Role of Hop and Malt Tannins. - *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 65, 247-251.

HARRIS, G. und RICKETTS, R. W., 1958: Studies on Non-biological Hazes of Beers. III. Isolation of Polyphenols and Phenolic Acids of Malt Husk. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 64, 22-32.

HARRIS, G. und RICKETTS, R. W., 1959: Studies on Non-biological Hazes of Beers. IX. Effects of Nylon 66 in Delaying Formation of Haze. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 64, 22-32.

HASLAM, E., 1974: Polyphenol-Protein Interactions. – *Biochemistry Journal*, Vol. 139, 285-288.

HASLAM, E., 1995: Complexation and oxidative transformation of polyphenols. – In: Brouillard R.; Jay M.; Scalbert A. (Hrsg.): *Polyphenols 94*. INRA, Paris, 45-55.

HASLAM, E., 1998: *Practical Polyphenolics – From Structure to Molecular Recognition and Physical Action*. Cambridge University Press, Cambridge.

HASLAM, E., LUCK, G., LIAO, H. MURRAY, N. J., GRIMMER, H.R., WARMINSKI, E.E., WILLIAMSON, M.P., LILLEY, T.H., 1994: Polyphenols, astringency and praline-rich proteins. – *Phytochemistry*, Vol. 37, 357-371.

HEGARTY, P.K., HARTLAND, T., 1999: Prediction of colloidal stability. – In: *Proceedings of the 27th EBC Congress, Cannes, European Brewery Convention (Hrsg.)*, 209-216.

HENLE, T., WALTER, H., KRAUSE, I., KLOSTERMEYER, H., 1991: Efficient Determination of Individual Maillard Compound in Heat-Treated Milk Products by Amino Acid Analysis. – *International Dairy Journal*, Vol. 1 (2), 125-135.

IBARZ, A., BELLMUNT, S., BOTA, E., 1992: Unterschiedliche nicht enzymatische Bräunungsprozesse während der Lagerung von Apfelsaftkonzentrat. – *Flüssiges Obst* Jg. 59 (1), 9-11.

ISHIBASHI, Y., TERANO, Y., FUKUI, N., HONBOU, N., KAKUI, T., KAWASAKI, S., NAKATANI, K., 1996: Development of a New Method for Determining Beer Foam and Haze Proteins by Using the Immunochemical Method ELISA. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 54 (3), 177-182.

JENE-STRID, B., 1988: Analysis of Proanthocyanidins and Phenolic acids in barley, malt, hops and beer. – In: Linkens, H. F., Jackson, J. F. (Hrsg.) *Beer Analysis*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

KANO, Y. und KAMIMURA, M., 1993: Simple Methods for Determination of the Molecular Weight Distribution of Beer Proteins and Their Application to Foam and Haze Studies. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 51 (1), 21-28.

KRAUSE, I., BOCKHARDT, A., NECKERMANN, H., HENLE, T., KLOSTERMEYER, H., 1995: Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dansyl derivatives. – *Journal of Chromatography A* 715, 67-79.

KRINGSTAD, H. und DAMM, E., 1965: Separation of Haze-Producing Substances from Beer by Means of Gel Filtration. – In: *Proceedings of the 10th EBC Congress, Stockholm, European Brewery Convention* (Hrsg.), 129-136.

LEEMANS, C., PELLAUD, J., MÉLOTTE, L., DUPIRE, S. 2003 : Opportunities for lag phase prediction: a new tool to assess beer colloidal stability. – In: *Proceedings of the 29th EBC Congress, Dublin, European Brewery Convention* (Hrsg.).

LEIPER, K. A., DUSZANSKYI, R., STEWART, G. G., 2002: Premixing of Isinglass and Silica Gel to Obtain Improved Beer Stability. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 108 (1), 28-31.

LEIPER, K. A., STEWART, G. G., MCKEOWN, I. P., 2003: Beer Polypeptides and Silica gel – Part I. Polypeptides Involved in Haze Formation. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 109 (1), 57-72.

LUBLIENIECKI, J., 1981: *Ultradünnschicht-Isoelektrische Fokussierung und SDS-Elektrophorese Harnstoff- und SDS-extrahierter Proteine bei der Bierherstellung*. TU München, Fachbereich für Brauwesen und Lebensmitteltechnologie, Dissertation.

LUCK, G., LIAO, H., MURRAY, N. J., GRIMMER, H. R., WARMINSKI, E. E., WILLIAMSON, M. P., LILLEY, T. H., HASLAM, E., 1994: Polyphenols, astringency, and proline-rich proteins. – *Phytochemistry*, Vol. 37 (2), 357-371.

MADIGAN, D., BYRNE, H., MATTHEWS, S., KELLY, R., MCENROE, C., HARMEY, D., 2000: Studies on the effect of Common Process Variables on the Colloidal Stability of Beer. – *Journal of The American Society of Brewing Chemists*, Vol. 58 (4), 160-164.

MARSHALL, T. und WILLIAMS, K.M. 1987: High Resolution Two- Dimensional Electrophoresis of the Proteins and Macromolecular Constituents of Beer and Wine. – *Electrophoresis*, Vol. 8, 493-495.

MATSUZAWA, K., NAGASHIMA, T. A., 1990: A new hydrated silica gel for stabilization of beer. – *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 27 (1), 66-72.

MCFARLANE, W. D., WYE, E., GRANT, H. L., 1955: Studies on the flavanoid compounds in beer. – In: *Proceedings of the 5th EBC Congress, Baden-Baden, European Brewery Convention (Hrsg.)*, 289-310.

MCFARLANE, W. D., 1968: Biochemistry of beer oxidation. – *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 5 (1), 87-92.

MCGUINNES, J. D., LAWS, D. R. J., EASTMOND, R., GARDNER, R.J., 1975: The estimation and significance of Catechin and dimeric Catechin in beer. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 81, 237-241.

MCMURROUGH, I., 1998: The colloidal stabilisation of beer by treatment with polyvinylpolypyrrolidone. – *Cerevisia Biotechnology*, Vol. 23 (3), 27-34.

MCMURROUGH, I. und DELCCOUR, J. A., 1994: Wort polyphenols. – *Ferment* Vol. (3), 175-182.

MCMURROUGH, I. und MCDOWELL, J., 1978: Chromatographic Separation and Automated Analysis of Flavan-3-ols. – *Analytical Biochemistry*, Vol. (91), 92-100.

MCMURROUGH, I. und O'ROURKE, T., 1997: New Insight Into the Mechanism of Achieving Colloidal Stability. – *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 34 (1), 271-277.

MCMURROUGH, I., KELLY, R. J., BYRNE, J., O'BRIEN, M. 1992: Effect of the Removal of Sensitive Proteins and Proanthocyanidins on the Colloidal Stability of Lager Beer. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 50 (2), 67-76.

MCMURROUGH, I., KELLY, R. J., MADIGAN, D., 1993: Colloidal stabilization of lager beer. – In: *Proceedings of the 24th EBC Congress, Oslo, European Brewery Convention (Hrsg.)*, 663-672.

MCMURROUGH, I., MADIGAN, D., SMYTH, M. R., 1995: Adsorption by Polyvinylpolypyrrolidone of Catechins and Proanthocyanidins from Beer. – *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 43 (10), 2687-2691.

MCMURROUGH, I., MADIGAN, D., KELLY, R. J., 1996: The Role of Flavanoid Polyphenols in Beer Stability. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 54 (3), 141-148.

MCMURROUGH, I., MADIGAN, D., KELLY, R. J., 1997: Evaluation of Rapid Colloidal Stabilization with Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 55 (2), 38-43.

MCMURROUGH, I., MALCOM, J. LOUGHREY, M. J., HENNIGAN, G. P., 1983: Content of (+)-Catechin and Proanthocyanidins in Barley and Malt Grain. – *Journal of the Science of Food and Agricultural*, Vol. 34, 62-72.

MEIER, J., 2000: Wirtschaftliche Filtration. – In: *Filtrationstechnisches Symposium 2000 Neue Wege und Erkenntnisse*, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie, TU München (Hrsg.), 23-35.

MITTELEUROPÄISCHE BRAUTECHNISCHE ANALYSENKOMMISSION (MEBAK), 2000: *Brautechnische Analysemethoden Band II*, Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weihenstephan.

MOCEK, M., RICHARDSON, P. J., 1972: Kinetics and Mechanism of Quercetin Oxidation. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 78, 459-465.

MOLL, M., DUTEURTRE, B., SCION, G., CHAPON, L., CHAPON, S., 1974 : The Fate of Tannoids During Fermentation. – *MBAA Technical Quarterly* , Vol. 11(4), 220-254.

MULKAY, P. und JERUMANIS, J., 1983: Effects of molecular weight and degree of hydroxylation of proanthocyanidins on the colloidal stability of beer. – *Cerevisia Biotechnology*, Vol. 8, 29-35.

MUSSCHE, R. A., 1997: Treatment of the Protein Fraction with Tannins, Enzymes or Silicagels. – *Cerevisia Biotechnology*, Vol. 22 (2), 44-57.

MURRAY, N. J. und WILLIAMSON, M. P., 1994: Conformational study of a salivary proline-rich protein repeat sequence. – *European Journal of Biochemistry*, Vol. 219 (36), 915-921.

MURRAY, N. J., WILLIAMSON, M. P., LILLEY, T. H., HASLAM, E., 1994: Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. – *European Journal of Biochemistry*, Vol. 219 (37), 923-935.

NARZISS, L., 1994: Chemisch-physikalische Stabilität des Bieres. – *Brauwelt*, Jg.134 (44), 2337-2338.

NARZISS, L., 1995: *Abriss der Bierbrauerei* (1. Aufl. 1937). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

NARZISS, L. und GROMUS J. 1982: Stabilisierungsversuche mit polyphenolreichen Bieren. – *Brauwissenschaft*, Jg. 35 (8), 198-203.

NARZISS, L. und RÖTTGER W. 1973: Zusammenhänge zwischen Eiweißfraktionen und chemisch-physikalischer Stabilität der Biere. – *Brauwissenschaft*, Jg. 26 (11), 325-336.

NÖEL, S., METAIS, N., BONTE, S., BODART, E., PELADAN, F., DUPIRE, S., COLLIN, S., 1999: The use of Oxygen 18 in appraising the impact of oxidation process during beer storage. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 105 (5), 269-274.

NUMMI, M., LOISA, N. ENARI, T.-M., 1969: Fractionation of Haze-Forming Compounds in Beer. – In: *Proceedings of the 12th EBC Congress, Interlaken, European Brewery Convention* (Hrsg.), 349-

356.

OH, H. I., HOFF, J. E., ARMSTRONG, G. S., HAFF, L. A., 1980: Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 28, 394-398

OUTTRUP, H., 1989: Haze active peptides in beer. – In: *Proceedings of the 22nd EBC Congress, Zurich*, European Brewery Convention (Hrsg.).

OUTTRUP, H., FOGH, R., SCHAUMBURG, K., 1987: The interaction between proanthocyanidins and peptides. – In: *Proceedings of the 21st EBC Congress, Madrid*, European Brewery Convention (Hrsg.).

OWADES, J. L. und JKOVAC, J., 1966: Study of Beer Oxidation with  $^{18}\text{O}$ . – *ASBC - Proceedings of American Society of Brewing Chemists*, Vol. 24, 180-186.

PAPAGIANNOPOULOS, M., ZIMMERMANN, B., MELLENTHIN, A. KRAPPE, M., MAIO, G., GALENSA, R., 2001: ASE-ASPEC-HPLC Kopplung – Automatisierte Bestimmung von Proanthocyanidinen. – *GIT*, Jg. 9 (01), 950-952.

PAPAGIANNOPOULOS, M., ZIMMERMANN, B., MELLENTHIN, A. KRAPPE, M., MAIO, G., GALENSA, R., 2002: Online coupling of pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. – *Journal of Chromatography A*, Vol. 958, 9-16.

PAPP, A., 2000: Erarbeitung von Beurteilungskriterien zur Vorhersage der Stabilisierbarkeit und der chemisch-physikalischen Stabilität im unfiltrierten Bier. TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation.

PAPP, A.; WINNEWISSER, W., GEIGER, E.; BRIEM, F., 2000: Influence of (+)-catechin and ferulic acid on formation of beer haze and their removal through different polyvinylpyrrolidone-types. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 107 (1), 55-60.

PFENNINGER, H., 1987: Die kolloidale Stabilität – ein wichtiges Qualitätskriterium von Bier. – *Brauerei-Rundschau*, Jg. 98 (7), 129-136.

POSADA, J., 1969: Anthocyanogenes and head-space air in relation to colloidal stability of beer. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 75, 50-54.

RECHNER, A., 2000: Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und die antioxidative Kapazität von Apfel und Beerenobstsäften. Justus-Liebig-Universität Giessen, Fachbereich 09 Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement, Dissertation.

RINGHOLD, M. 2000: High Gravity Brewing/High Gravity Blending. – *Brauwelt* Jg. 144 (30/31), 1232-1233.

ROBARDS, K. und ANTOLOVICH, M., 1997: Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids: A Review. – *Analyst*, Vol. 122, 11R–34R.

ROBARDS, K., PRENZLER, D., TUCKER, G., SWATSIANG, P., GLOVER, W., 1999: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. – *Food Chemistry*, Vol. 66, 401-436.

ROBINSON, L., SHEEHAN, M., STUART, M., BARR, A., FORD, C., EVANS, E., 2001: The influence of malt quality on the colloidal stability of beer. – *Proceedings of the 10th Australian Technical Symposium*, 1-5.

SAVAGE, D. J., THOMSO, C. C., 1971: The Isoelectric Focusing of Beer Proteins in Polyacrylamide Gel. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 77, 371-375.

SAVAGE, D. J., THOMSO, C. C., 1972: Electrofocusing Studies on the Formation of Beer Haze. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 78, 472-476.

SAVAGE, D. J., THOMSO, C. C., 1973: The Nitrogen Status of Barley and Malt and its Influence on Beer Quality. – In: *Proceedings of the 28th EBC Congress, Budapest, European Brewery Convention (Hrsg.)*.

SCHUNKE, B., 1992: Veränderung der Gehalte an phenolischen Verbindungen während des Brauprozesses. – *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Braunschweig*.

SCHUR, F., 1980a: Stand der Erkenntnisse auf dem Gebiet der Bierstabilisierung 1. Teil. – *Braueri-Journal*, 17, 482-484.

SCHUR, F., 1980b: Stand der Erkenntnisse auf dem Gebiet der Bierstabilisierung 2. Teil. – *Braueri-Journal*, 18, 520-522.

SCHUR, F., 1980c: Stand der Erkenntnisse auf dem Gebiet der Bierstabilisierung 3. Teil. – *Braueri-Journal*, 19, 578-580.

SCHUR, F., 1987: Rolle der Polyphenole beim Brauen. – *Brauerei-Rundschau*, Jg. 98 (3), 37-42

SIEBERT, K. J., 1999: Effects of Protein-Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 47 (2), 353-362.

SIEBERT, K. J., LYNN, P. Y., CARRASCO, A., 1996a: Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 44 (8), 1997-2005.

SIEBERT, K. J., TROUKHANOVA, N. V., LYNN, P. Y., 1996b: Nature of Polyphenol-Protein Interactions. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 44 (8), 80-85.

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y., 1997: Mechanisms of Beer Colloidal Stabilization. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 55 (2), 73-78.

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y., 1998: Comparison of Polyphenol Interactions with PVPP and Haze-Active Protein. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 56 (2), 24-31.

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y. 2000: Effect of Protein-Polyphenol Ratio on the Size of Haze Particles. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 58 (3), 117-123.

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y., 2001: The Effect of pH on protein-polyphenol particle size. – In: Proceedings of the 28th EBC Congress, Budapest, European Brewery Convention (Hrsg.).

SORENSEN, S. B., BECH, L. M., MULDBJERG, M., BEENFELDT, T., BREDDAM, K., 1993: Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation. – *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 30 (3), 136-145.

STAATLICHE BRAUTECHNISCHE PRÜF- UND VERSUCHSANSTALT WEIHENSTEPHAN (Hrsg.), 2002: Leistungsverzeichnis.

STEINER, K. und STOCKER, H.R., 1969: Polyphenole und Kältestabilität des Bieres. – In: Proceedings of the 12th EBC Congress, Interlaken, European Brewery Convention (Hrsg.), 327-337.

TAJCHAKAVIT, S., BOYE, J. I., BÉLANGER, D., COUTURE, R., 2000: Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. – *Food Research International* Vol. 34, 431-440.

WACKERBAUER, K. und ZUFALL, C., 1996: High Gravity Brewing – Möglichkeiten, Grenzen, Risiken. – *Brauwelt*, Jg. 136 (49/50), 2374-2379.

WACKERBAUER, K. und ANGER, H.-M., 1984: Bierstabilisierung unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole. – *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Jg. 37 (4), 153-161.

WAINWRIGHT, T. 1974: Non-Biological Hazes and Precipitates in Beer. – *The Brewers Digest*, Vol. 49 (5), 38-48.

WEBER, D., 1999: Kostenvergleich unterschiedlicher Filtrations- und Stabilisierungsverfahren in der Brauwirtschaft. TU München, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaft, Diplomarbeit.

WESTERMEIER, R., 2001: *Elektrophoresis in practice* (1.Auflage 1990). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

WESTPHAL, G., BUHR, H., OTTO, H., 1996: *Reaktionskinetik in Lebensmitteln*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

## 6 Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flavan-Grundkörper .....	10
Abbildung 2: Strukturen monomerer und dimerer Flavane (RECHNER 2000).....	12
Abbildung 3: Bedeutung der Polyphenole für die Bierqualität (SCHUR 1987) .....	12
Abbildung 4: PT-Gleichgewicht nach Chapon (CHAPON 1994).....	16
Abbildung 5: Komplexbildung der Polyphenole nach Haslam (HASLAM et al. 1994, HASLAM 1998) .....	17
Abbildung 6: Stufen der Polyphenolbindung und -fällung durch prolinreiche Proteine (CHARLTON 2002).....	18
Abbildung 7: Mechanismen der Protein-Polyphenol-Reaktionen (SIEBERT 1999).....	19
Abbildung 8: ortho-Chinonbildung (RECHNER 2000).....	20
Abbildung 9: Reaktionen von ortho-Chinon mit unterschiedlichen Substanzen (Dehydroasc. = Dehydroascorbinsäure, L-Asc. = Ascorbinsäure, As-NH <sub>2</sub> = Aminosäure, Pr-NH <sub>2</sub> und Pr-SH = Protein, Pr-NH = Prolin, R''-SH = Cystein und Gluthaion) (ROBARDS et al. 1999).....	20
Abbildung 10: Beispielchromatogramm eines stabilisierten Bieres .....	27
Abbildung 11: Catechinverlauf während verschiedener Maischprogramme; Werte auf 11 GG-% Stammwürze berechnet.....	35
Abbildung 12: Procyanidin B <sub>3</sub> -Verlauf während verschiedener Maischprogramme; Werte auf 11 GG-% Stammwürze berechnet.....	36
Abbildung 13: Prodelphinidin B <sub>3</sub> -Verlauf während verschiedener Maischprogramme; Werte auf 11 GG-% Stammwürze berechnet.....	37
Abbildung 14: Veränderung des Catechins durch Variation der Würzebelüftung.....	40
Abbildung 15: Veränderung des Epicatechins durch Variation der Würzebelüftung .....	41
Abbildung 16: Veränderung des Procyanidins B <sub>3</sub> durch Variation der Würzebelüftung .....	41
Abbildung 17: Veränderung des Prodelphinidins B <sub>3</sub> durch Variation der Würzebelüftung .....	42
Abbildung 18: Verhalten des Catechins beim Brauen mit hohen Stammwürzen, berechnet auf 12 GG-%, F: Verdünnung im Filtrat, AW: Verdünnung in der Ausschlagwürze .....	44
Abbildung 19: Verhalten des Epicatechins beim Brauen mit hohen Stammwürzen, berechnet auf 12	

GG-%, F: Verdünnung im Filtrat, AW: Verdünnung in der Ausschlagwürze .....	45
Abbildung 20: Verhalten des Procyanidins B <sub>3</sub> beim Brauen mit hohen Stammwürzen, berechnet auf 12 GG-%, F: Verdünnung im Filtrat, AW: Verdünnung in der Ausschlagwürze .....	45
Abbildung 21: Verhalten des Prodelphinidins B <sub>3</sub> beim Brauen mit hohen Stammwürzen, berechnet auf 12 GG-%, F: Verdünnung im Filtrat, AW: Verdünnung in der Ausschlagwürze ...	46
Abbildung 22: Verhalten des Catechins bei unterschiedlichen Lagertemperaturen .....	48
Abbildung 23: Verhalten des Epicatechins bei unterschiedlichen Lagertemperaturen.....	49
Abbildung 24: Verhalten des Procyanidins B <sub>3</sub> bei unterschiedlichen Lagertemperaturen.....	49
Abbildung 25: Verhalten des Prodelphinidins B <sub>3</sub> bei unterschiedlichen Lagertemperaturen.....	50
Abbildung 26: Catechingehalt verschieden stabilisierter Biere .....	53
Abbildung 27: Epicatechingehalt verschieden stabilisierter Biere.....	53
Abbildung 28: Procyanidin B <sub>3</sub> -Gehalt verschieden stabilisierter Biere.....	54
Abbildung 29: Prodelphinidin B <sub>3</sub> -Gehalt verschieden stabilisierter Biere.....	54
Abbildung 30: Kontrolle des Stabilisierungseffekts durch die Konzentrationsabnahme der Flavan-3-ole .....	56
Abbildung 31: Flavanoide und Tannoide in Relation zu nicht stabilisiertem Bier .....	57
Abbildung 32: Kontrolle des Stabilisierungseffekts durch die Konzentrationsabnahme der Flavan-3-ole .....	57
Abbildung 33: Flavanoide und Tannoide in Relation zu nicht stabilisiertem Bier .....	58
Abbildung 34: Aminosäurezusammensetzung in Mol-% von 50 unterschiedlich stabilen Biere.....	59
Abbildung 35: Prolingehalt der Proteine von 50 unterschiedlich stabilen Bieren in Mol-%.....	60
Abbildung 36: Aminosäurezusammensetzung in Mol von 50 unterschiedlich stabilen Bieren .....	61
Abbildung 37: Prolingehalt der Proteine 50 unterschiedlich stabiler Biere .....	61
Abbildung 38: Aminosäurezusammensetzung 50 verschiedener Kältetrübungen nach saurer Hydrolyse .....	62
Abbildung 39: Gele der 2-D Elektrophorese unterschiedlich stabilisierter Biere von links oben nach rechts unten: Unfiltrat, 125 g/hl Bentonit, 60 g/hl Xerogel, forcierte Probe nach Abtrennen der Trübung, 10 µg aufgetragene Proteinmenge.....	65
Abbildung 40: Catechin- und Epicatechingehalt unterschiedlich stabiler Bier; N=59 .....	67
Abbildung 41: Procyanidin B <sub>3</sub> und Prodelphinidin B <sub>3</sub> -Gehalt unterschiedlich stabiler Biere; N=59 .	68

---

Abbildung 42: Monomere, Dimere und Summe der Flavan-3-ole unterschiedlich stabiler Biere; N=59 .....	68
Abbildung 43: Berechneter Faktor aus Summe der Flavan-3-ole und Prolingehalt der Proteine zu den erreichten Warmtagen, N=40 .....	69
Abbildung 44: Einfluss der Catechinmenge auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen .....	71
Abbildung 45: Einfluss der Epicatechinmenge auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen .....	72
Abbildung 46: Einfluss der Menge an Monomeren auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen .....	73
Abbildung 47: Einfluss der Menge an Procyanidin B <sub>3</sub> auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen .....	73
Abbildung 48: Einfluss der Menge an Prodelphinidin B <sub>3</sub> auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen .....	74
Abbildung 49: Einfluss der Menge an Dimeren auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen .....	75
Abbildung 50: Einfluss der Menge aller detektierten Flavan-3-ole auf die Trübungsbildung bei verschiedenen Temperaturen .....	76
Abbildung 51: Trübungsbildung (links) und Reaktion erster Ordnung (rechts) eines nicht stabilisierten Bieres als eine Funktion der Zeit .....	79
Abbildung 52: Trübungsbildung als Reaktion erster Ordnung eines nicht stabilisierten Bieres ohne Berücksichtigung der Trübungszunahme zwischen erster und zweiter Messung.....	80
Abbildung 53: Trübungsbildung als Reaktion nullter Ordnung eines nicht stabilisierten Bieres.....	81
Abbildung 54: Trübungsbildung (links) und Reaktion erster Ordnung (rechts) eines mit 100 g/hl Xerogel stabilisierten Bieres als eine Funktion der Zeit .....	82
Abbildung 55: Trübungsbildung (links) und Reaktion erster Ordnung (rechts) eines mit 30 g/hl Xerogel und 20 g/hl PVPP stabilisierten Bieres als eine Funktion der Zeit.....	83
Abbildung 56: Logarithmische Darstellung der relativen Prodelphinidin B <sub>3</sub> -Abnahme als Funktion der Zeit eines nicht stabilisierten Bieres .....	86
Abbildung 57: Vergleich des Trübungsverlaufs eines unbehandelten Bieres und eines mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> versetzten Bieres bei unterschiedlichen Temperaturen .....	91
Abbildung 58: Verlauf der Trübungswerte während des Forciertests [0/40 °C] bei einem	

---

unbehandelten und einem mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kontaminierten Bier .....	92
Abbildung 59: Veränderung der Abnahme des Procyanidins B <sub>3</sub> über die Zeit durch Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in das stabilisierte und filtrierte Bier .....	92
Abbildung 60: Veränderung der Abnahme des Prodelphinidins B <sub>3</sub> über die Zeit durch Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in das stabilisierte und filtrierte Bier .....	93
Abbildung 61: Veränderung der Catechinabnahme über die Zeit durch Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in das stabilisierte und filtrierte Bier .....	93
Abbildung 62: Veränderung der Epicatechinabnahme über die Zeit durch Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in das stabilisierte und filtrierte Bier .....	94
Abbildung 63: Verlauf der Messwerte während des Forciertests [0/40 °C] (links) und über einen längeren Zeitraum der bei 40 °C aufbewahrten Biere (rechts) .....	95
Abbildung 64: Verlauf der dimeren Flavan-3-ole, links: Catechin (oben), Procyanidin B <sub>3</sub> (unten); rechts: Epicatechin (oben) und Prodelphinidin B <sub>3</sub> (unten), über die Zeit bei 40 °C in mit Eisen oder Kupfer versetztem Bier und einer Kontrollprobe .....	96

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einordnung flavanoider Bier- und Würzepolyphenole (MCMURROUGH 1998).....	11
Tabelle 2: Wiederfindung der Flavan-3-ole in Bier.....	26
Tabelle 3: Laufbedingungen für SDS-Elektrophorese .....	29
Tabelle 4: Variationen des Infusionsmaischverfahrens; Dauer der temperaturzugehörigen Rasten in min; die Rast bei 72 °C wurde bei Sud 1-6 bis zur Jodnormalität gehalten, mindestens jedoch 15 min.....	35
Tabelle 5: pH-Wert der Biere in Abhängigkeit von der Temperatur und Lagerzeit.....	50
Tabelle 6: Ausgangswerte der Flavan-3-ole der untersuchten Biere in $\mu\text{Mol}$ .....	70
Tabelle 7: Bestimmtheitsmaße für $\Delta$ Catechin im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden vorbehandelten Bieren .....	72
Tabelle 8: Bestimmtheitsmaße für $\Delta$ Epicatechin im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden vorbehandelten Bieren .....	72
Tabelle 9: Bestimmtheitsmaße für die Menge an monomeren Flavan-3-olen im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden vorbehandelten Bieren.....	73
Tabelle 10: Bestimmtheitsmaße für die Procyanidinabnahme im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden behandelten Bieren .....	74
Tabelle 11: Bestimmtheitsmaße für die Prodelphinidinabnahme im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden vorbehandelten Bieren .....	75
Tabelle 12: Bestimmtheitsmaße für die Menge an dimeren Flavan-3-olen im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden vorbehandelten Bieren.....	75
Tabelle 13: Bestimmtheitsmaße für die Menge aller detektierten Flavan-3-olen im Zusammenhang mit der Trübungszunahme bei verschieden behandelten Bieren .....	76
Tabelle 14: Kinetische Konstanten für die Reduktion des Catechin, Epicatechin, Procyanidin B <sub>3</sub> und Prodelphinidin B <sub>3</sub> bei einem nichtstabilisierten Bier.....	87
Tabelle 15: Kinetische Konstanten für die Reduktion der Summenparameter in einem nichtstabilisierten Bier .....	87
Tabelle 16: Kinetische Konstanten für die Reduktion von Catechin, Epicatechin, Procyanidin B <sub>3</sub> und Prodelphinidin B <sub>3</sub> bei einem xerogelstabilisierten Bier .....	88
Tabelle 17: Kinetische Konstanten für die Reduktion der Summenparameter in einem xerogelstabilisierten Bier.....	88

---

Tabelle 18: Kinetische Konstanten für die Reduktion von Catechin, Epicatechin, Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 bei einem xerogel- und PVPP-stabilisierten Bier .....	88
Tabelle 19: Kinetische Konstanten für die Reduktion der Summenparameter in einem xerogel- und PVPP-stabilisierten Bier.....	89