

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

Untersuchungen zu den strukturellen Ursachen von Primärem Gushing

Beate Burkert

Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des Akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Karl Sommer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudolf F. Vogel

Die Dissertation wurde am 01.12.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.02.2006 angenommen.

Für den kleinen und den großen Jo

1	EINLEITUNG.....	9
2	ZUSAMMENFASSUNG	10
3	WISSENSSTAND	18
3.1	Primäres und Sekundäres Gushing.....	18
3.2	Mechanismus der Gasentbindung.....	19
3.3	Fusarien	21
3.4	Paenibacillus macerans.....	22
3.5	Braugetreide und Standortfaktoren.....	22
3.6	Beurteilung der Getreidequalität.....	23
3.7	Molekularbiologische Grundlagen für die Mizellbildung	25
3.7.1	Schaumproteine.....	28
3.7.2	Hydrophobine.....	29
3.7.3	Polare Lipide	33
3.7.4	Cyclodextrine	34
3.8	Zielsetzung.....	34
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	36
4.1	Fusarienkulturen in mineralischem Minimalmedium mit C-Quelle	36
4.1.1	Gushingneigung.....	37
4.1.2	Trennung der extrazellulären Fusarienproteine nach dem isoelektrischen Punkt.....	38
4.1.3	Trennung der extrazellulären Fusarienproteine nach dem Molekulargewicht.....	39
4.1.4	Hydrophilisierung von hydrophoben Materialien.....	40
4.1.5	Fusarienlipide.....	43
4.1.5.1	Dünnschichtchromatographie.....	43
4.1.5.2	Gaschromatographie.....	46
4.2	Heisswasserauszüge aus Fusarien-infiziertem Treber	53
4.2.1	Optimierung des Ausgangsmaterials (frischer Nasstreber).....	53
4.2.2	Gushingverhalten von Heisswasserauszügen und Auszugsprodukten	55
4.2.3	Trübungsmessungen.....	58
4.2.4	Analytik nach chemischen Stoffgruppen	60
4.2.5	Anionenaustausch-Chromatographie von Treber-Heisswasserauszügen (<i>F. culmorum</i>)	60
4.2.6	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) des Treber-Heisswasserauszugs.....	65
4.2.7	Trennung der Proteine im Treberauszug (<i>F.culm.</i>) nach dem Molekulargewicht.....	67
4.2.8	Lipidanalytik	69
4.2.8.1	Vergleich der Extraktionsmethoden.....	69
4.2.8.2	Gushingverhalten der Lipide von <i>F. culmorum</i>	69
4.3	Gerste.....	71
4.4	Malz	72
4.4.1	Mykologische Analyse.....	72
4.4.2	Mykotoxine	74
4.4.3	Malzlipide	75

4.5	Würzen	76
4.5.1	Allgemeine Analysenergebnisse.....	77
4.5.2	Gushingverhalten.....	77
4.5.2.1	Primäres oder sekundäres Gushing? Zugabe von Calciumionen.....	78
4.5.2.2	Primäres oder sekundäres Gushing? Zugabe eines Komplexbildners (EDTA-Na ₂).....	82
4.5.2.3	Primäres oder sekundäres Gushing? Adsorption an hydrophobe Materialien.....	86
4.5.2.4	Primäres oder sekundäres Gushing? Zugabe eines kommerziellen Gushing-Inhibitors..	89
4.5.2.5	Primäres oder sekundäres Gushing? Mechanische Behandlung.....	91
4.5.2.6	Vorschlag für einen modifizierten Gushingtest	93
4.5.3	Isoelektrische Fokussierung.....	94
4.5.4	Trennung nach Molekulargewicht	95
4.5.5	Würzelipide	98
4.6	Biere	100
4.6.1	Selbstgebrautes Gushingbier.....	100
4.6.2	Zerschäumung.....	105
4.6.3	Isoelektrische Fokussierung.....	107
4.6.4	Trennung der Bierproteine nach Molekulargewicht	109
4.6.5	Gelfiltrations-Chromatographie (GFC).....	111
4.6.6	Bierlipide.....	112
4.7	Rückmischung isolierter Stoffgruppen zur Prüfung der Gushingrelevanz	115
4.7.1	Isolierte Stoffgruppen aus Treber-Heisswasserauszügen (<i>F.culmorum</i>).....	115
4.7.1.1	Ungeladene oder kationische Substanzen (IEC-Fraktion bei pH 8,5) und Lipide.....	115
4.7.1.2	Anionische Substanzen (IEC-Fraktion bei pH 8,5) und Lipide.....	117
4.7.2	Zusätze angereicherter grenzflächenaktiver Proteine aus Bier.....	118
4.7.2.1	Zugabe der Spumate nicht gushender Biere zu Bieren / Würze.....	118
4.7.2.2	Zugabe der Spumate primärgushendem Bier zu Bieren / Würze	119
4.7.2.3	Zugabe der Spumate von nicht gushendem Bier zu Fusarienkulturfiltraten.....	120
4.7.2.4	Zugabe der Spumate von primärgushendem Bier zu Fusarienkulturen.....	120
4.7.3	Zusatz der polaren Lipidfraktionen von Fusarienkulturfiltraten.....	121
4.7.3.1	Zusatz der polaren Lipidfraktion von zu Gushing führenden Fusarien	121
4.7.3.2	Zusatz der polaren Lipidextrakte von nicht zu Gushing führenden Fusarien	123
4.7.4	Zusatz von Fusarienkulturfiltraten.....	126
4.7.5	Einfluss von <i>Paenibacillus macerans</i> / Cyclodextrinen.....	127
5	GESAMTDISKUSSION.....	128
6	AUSBLICK.....	143
7	MATERIAL UND METHODEN.....	144
7.1	Geräte.....	144
7.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	145
7.3	Untersuchungsmaterial	146
7.4	Puffer, Medien, Lösungen.....	148
7.5	Allgemeine Methoden	150
7.5.1	Gushingtest nach Donhauser et al.....	150
7.5.2	Forciertest	151
7.5.3	Quantifizierung von Calcium-, Eisen- und Aluminiumionen.....	151

7.5.4	Oxalsäure-Bestimmung	152
7.5.5	Bestimmung der Gesamtkohlenhydrat-Konzentration (Phenolmethode).....	152
7.5.6	Gesamtphenole (EBC)	153
7.6	Spezielle Arbeitsmethoden.....	154
7.6.1	Varianten des Gushingtests nach Donhauser et al.....	154
7.6.2	Gushingtest für eine Stoffgruppe	155
7.6.3	Beimischung von Fusarienlipiden	155
7.6.4	Handhabung der Fusariendauerkulturen.....	155
7.6.5	Fusarienkulturen (flüssig)	155
7.6.5.1	Aufbereitung der Fusarienkulturen für SDS-PAGE und IEF	156
7.6.5.2	Aufbereitung der Fusarienkulturen zur Lipidextraktion.....	156
7.6.6	Hydrophilisierungspotenziale von Fusarien.....	156
7.6.7	Zugabe von Cyclodextrinen zu Weißbierwürze.....	157
7.6.7.1	Unvergorene Weißbierwürze	157
7.6.7.2	Vergorene Weißbierwürze	157
7.7	Proteine	158
7.7.1	Quantitative Photometrie (Bradford)	158
7.7.2	Ionenaustausch-Chromatographie.....	159
7.7.3	Hydrophobe Interaktion	159
7.7.4	Gelfiltration	160
7.7.5	Zerschäumung.....	160
7.7.6	SDS-PAGE	161
7.7.7	Coomassie-Färbung nach Weber & Osborn für SDS-PAGE.....	163
7.7.8	Native isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel	163
7.7.9	Coomassie-Ampholytfärbung für IEF.....	164
7.8	Lipide.....	165
7.8.1	Soxhlet-Extraktion.....	165
7.8.2	Festphasenextraktion SPE (solid phase extraction)	165
7.8.3	Kalte Lipidextraktion	166
7.8.4	Weitere Lipid-Extraktionsmethoden.....	166
7.8.5	Dünnschichtchromatographie für polare Lipide nach Powalla.....	167
7.8.6	Aufbereitung polarer Lipide für die Gaschromatographie.....	167
7.8.7	Gaschromatographische Untersuchung der Methylester von Fettsäuren	167
7.9	Kleinmälzung	168
7.9.1	Vermälzung Fusarien-befallener Gerste.....	168
7.10	Kleinsud	168
7.10.1	Herstellung von obergärigem gushendem Kristallweißbier	168
7.10.1.1	Sud I.....	169
7.10.1.2	Sud II.....	171
8	LITERATUR	172
9	ANHANG.....	178
9.1	Abbildungsverzeichnis	178
9.2	Tabellenverzeichnis	180
9.3	Densitometrische DC-Auswertung von Fusarienlipiden	181

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden in der Zeit vom Februar 2000 bis Juli 2003 am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II an der Technischen Universität München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. E. Geiger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmittel und für sein Interesse am Fortgang der Arbeiten. Hinzu kommt sein stetiger Einsatz für ein tadelloses Arbeitsklima sowie seine Unterstützung, die mir besonders während meiner Schwangerschaft zukam.

Herrn Dr. W. Winnewisser danke ich für seine Ratschläge und kritischen Beobachtungen. Sein großer theoretischer und praktischer Erfahrungsschatz brachte immer wieder neue Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen für die freundliche Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und für jegliche Art der Unterstützung bedanken. Insbesondere seien hier Herr Dr.-Ing. M. Zepf sowie alle Kollegen erwähnt, die mir bereitwillig theoretische, technische und technologische Fragen zur Bierbereitung beantworteten, mir nicht selten in praktischen Dingen zur Hand gingen und mir das Produkt Bier im Laufe der Zeit immer näher brachten. Meinem Mann Dr.-Ing. Johannes Burkert danke ich zusätzlich für zwei Sude gemeinsam gebräutes Gushingbier. Dank Herrn Dipl.-Ing. A. Kollers großem Bekanntenkreis im Brauermilieu war stets ausreichend Vergleichsmaterial gushingnegativer Malze und Biere für analytische und sensorische Zwecke vorhanden. Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau S. Illing, die während meiner Schwangerschaft Arbeiten mit gesundheitsgefährdenden Stoffen übernahm.

Bei Herrn Dr. F. Jacob und Frau G. Schegerer (Staatliche Brautechnische Prüf- und Versuchsanstalt Weihenstephan) möchte ich mich für das umfangreiche Probenmaterial bedanken, das sie mir zur Verfügung stellten. Durch ihre engagierte Zusammenarbeit gelangte ich an größere Chargen an Fusarien-belastetem Malz sowie an Gushingbier aus der Praxis.

Außerdem gilt mein Dank den Herren Dr. Glas, Dipl.-Brmst. Bromig und Dipl.-Brmst. König, die bereitwillig zahlreiche Proben auf diverse Ionen untersuchten.

Dann danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. M. L. Niessen (Technische Mikrobiologie, Weihenstephan) für seine Unterstützung in mikrobiologischen Fragen, Herrn Dr.-Ing. S. Kreis (Technologie der Brauerei I) für die Kleinmälzung einer Fusarien-belasteten Probe und Herrn Dr.-Ing. O. Falk (Energie und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie, Weihenstephan) für die gaschromatographische Bestimmung von Fettsäuremethylestern.

Schließlich gilt mein besonderer Dank der Wissenschaftsförderung des Deutschen Brauerbundes, durch deren finanzielle Unterstützung die vorliegende Arbeit ermöglicht wurde. Allen Mitgliedern des Forschungsgremiums „Gushing“ danke ich für die fruchtbaren Diskussionen im Rahmen der regelmäßigen Berichterstattungen.

Abkürzungsverzeichnis

A	Aprotenin
Abb.	Abbildung
BSA	Bovine Serum Albumin
CMC	Carboxymethylcellulose
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DON	Desoxynivalenol
DTT	(1,4)-Dithiothreitol
EBC	European Brewery Convention
EDTA-Na ₂	EthylenDiaminTetraAcetat, Dinatriumsalz
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>F. culm.</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>gram., oxy., tric.,</i>	<i>graminearum, oxysporum, tricinctum,</i>
<i>equi., samb., aven.,</i>	<i>equiseti, sambucinum, avenaceum,</i>
<i>sporo.</i>	<i>sporo-trichoides</i>
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FKF	Fusarienkulturfiltrat
Fus-	nicht zu Gushing führende Fusarienart
Fus+	zu Gushing führende Fusarienart
G (+)	Gerste
<i>G. cand.</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
GB (+/-)	untergäriges Bier (gushing-aktiv / gushing-inaktiv)
GC	Gas-Chromatographie
GFC	Gelfiltrations-Chromatographie
GM (+/-)	Gerstenmalz (gushing-aktiv / gushing-inaktiv)
GW (+/-)	Gerstenmalzwürze (gushing-aktiv / gushing-inaktiv)
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
HWA	Heisswasserauszug aus Fusarien-infiz. Treber
ICP-OES	Inductively-Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

IEC	Ion Exchange Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa / Da	Kilodalton / Dalton
KH	Kohlenhydrate
LTPs	Lipotransferproteine
M	Marker
Min.	Minimalmedium (SNA ohne Agar)
mRNA	messenger – RNA (Ribo Nucleic Acid)
MTBE	tertiärer Butyl-Methyl-Ether
MWCO	Maximum Weight Cut Off
NIV	Nivalenol
ns-LTPs	nicht spezifische Lipotransferproteine
o.g.	obergärig
OTA	Ochratoxin A
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PER	Ammoniumperoxodisulfat
Prot.	Protein
Rf (-Wert)	Retention Factor
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNA	Synthetischer Nährstoffarmer Agar
SPE	Solid Phase Extraction
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoressigsäure
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TRIS	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
u.g.	untergärig
ÜSV	Überschäumvolumen
WB (+/-)	Weißbier (gushing-aktiv / gushing-inaktiv)
WM (+/-)	Weizenmalz (gushing-aktiv / gushing-inaktiv)
WW (+/-)	Weizenmalzwürze (gushing-aktiv / gushing-inaktiv)

1 Einleitung

Das Thema Gushing wird seit nunmehr über 100 Jahren in Brauerkreisen wieder und wieder diskutiert. Sekundäre Ursachen können inzwischen mit Hilfe einiger präventiver Maßnahmen erfolgreich bekämpft werden^{1,2,3}. Zur Risikominimierung können beim epidemisch auftretenden, primären Gushing bislang nur Malzchargen unterschiedlicher Herkunft miteinander verschnitten werden.

Die Grundlagenforschung der letzten Jahre führte zu dem Ergebnis, dass stabilisierte Mikrobläschen in der verschlossenen Flasche die physikalische Ursache primären Gushings sind^{4,5}. Bekannt ist sowohl der kritische Durchmesser für gushingrelevante Bläschen (abhängig von CO₂-Konzentration und Grenzflächenspannung) sowie ihr prinzipieller Aufbau: Bläschen mit der kritischen Größe von ca. 450 nm Durchmesser, die nach Öffnen der Flasche als Entbindungskeime fungieren, werden vor Flaschenöffnung von den Gushing-Initiatoren und eventuell –Promotoren stabilisiert⁶. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Überschäumen sämtlicher Biere nur durch die Anwesenheit von Gushing-Inhibitoren in nicht gushenden Bieren verhindert wird. Die chemische Stoffklasse und der Aufbau der beteiligten Stoffe ist unbekannt. Vermutlich handelt es sich um grenzflächenaktive Substanzen, die unter den gegebenen Druckverhältnissen spontan zu gasdichten Filmen aggregieren. Bisher gelang es niemandem, Gushingfaktoren aus Bier oder seinen Rohstoffen zu isolieren. Es kursiert eine Reihe Postulate über eventuelle Gushing-Promotoren und -Inhibitoren.

Schließlich wurde die Vielschichtigkeit des Problems in der Vergangenheit schon des öfteren zum Verhängnis: Es wurden primäre Gushingfaktoren in sekundär gushenden Proben gesucht.

Diese Arbeit soll nun – nach konsequentem Ausschluss von Rohstoffen und Produkten mit sekundären Gushingursachen – substanzielle Eigenheiten primär gushender Proben genau untersuchen. Dabei wird das Fernziel verfolgt, primär gushing-gefährdete Rohstoffe möglichst frühzeitig zu erkennen und Präventionsmaßnahmen zu entwickeln.

¹ BRENNER, M.W.: In: Proc. EBC Congr.- Copenhagen (1957), 349-362

² GARDNER, R.J.: In: J. Inst. Brew. **79** (1973), 275-283

³ ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

⁴ KRAUSE, B.: In: Svenska Bryggareföringens Manadsblad **51** (1936), 221-236

⁵ YOUNT, D.E. et al.: J. Acoustical. Soc. of Am. **76** (1974), 1511-1521

⁶ FISCHER, S.: Diss. TU München 2001

2 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit war darauf ausgelegt, strukturchemische Elemente von primären Gushingfaktoren zu erschließen. Dabei wurden präexistente Mischmyzellen in der verschlossenen Flasche als Entbindungskeime postuliert.

Es waren weitgreifende Analysen notwendig, um alle theoretisch denkbaren, primär gushingaktiven Substanzen zu erfassen. Die Ergebnisse beziehen sich – soweit nicht anders beschrieben – auf eine Versuchsdauer von acht Tagen. Aus diesem Grund kann ein positives Gushingpotenzial bei als gushing-negativ bezeichneten Proben zu einem späteren Zeitpunkt nicht absolut ausgeschlossen werden.

Zunächst wurden Proben mit eindeutig primären Gushingursachen benötigt. Dazu stand zum einen das Modellsystem „Fusarien-infizierter Treber“ zur Verfügung. Zum anderen wurden Kriterien erschlossen, um bei Praxisware primäre Gushingursachen von sekundären oder gemischten Ursachen zu unterscheiden.

Zwingend notwendig für primäres Gushing ist der Befall des Korns mit Fusarien. Kann im Getreide oder auf Malz kein Myzel gushingverursachender Fusarien nachgewiesen werden, kann die Gushingursache nicht primär sein. Schwieriger wird dieser Rückschluss bei den Produkten Würze oder Bier, die kein Pilzmyzel mehr enthalten und in denen Mykotoxine äußerst selten nachweisbar sind. Diese Arbeit zeigt eine Methode zum Nachweis von Pilzlipiden in Würzen und Bieren, insbesondere aus Malzen mit einem niedrigen Infektionsgrad.

Bei der Einordnung gushender Würzen in primäre oder sekundäre Gushingfälle führten Zusätze von Calciumsalzen oder EDTA zum Erfolg. Mit Calciumionen als Hilfsmittel konnte das aus Malz stammende Oxalat nach der Kaltlagerung abgetrennt werden, bevor es mit Calciumionen aus dem Malz in der abgefüllten Flasche Calciumoxalat-Kristalle bildete. Als noch raffinierter entpuppte sich die Zugabe des Komplexbildners EDTA, der sowohl Eisen- als auch Calciumionen aus Malz quantitativ maskiert. Eisenionen, die bei der Bierherstellung im Gärprozess von der Hefe aufgenommen werden, müssen im Gushingtest nämlich andersweitig entzogen werden. So führte die Untersuchung von Unterscheidungsmerkmalen primärer und sekundärer Gushingursachen bei Würzen zu den folgenden Verbesserungsvorschlägen für den Gushingtest nach Donhauser et al.:

- Die Tests sollten künftig unter Zugabe von EDTA nach dem Abläutern durchgeführt werden.
- Weiterhin wäre es hilfreich, parallel zu jedem Test die Calcium-, Oxalsäure- und Eisenkonzentration in der Würze zu kontrollieren.

Mit diesen Maßnahmen kann eine Vielzahl falsch-positiver Ergebnisse verhindert werden.

Nachdem nun eindeutig primär gushendes Material zur Verfügung stand, wurde dieses mit nicht gushendem verglichen. Im Zentrum des strukturchemischen Interesses standen natürliche, grenzflächenaktive Stoffgruppen pflanzlichen wie pilzlichen Ursprungs: Proteine mit hydrophoben und hydrophilen Molekülbereichen sowie polare Lipide.

Die Beteiligung von Proteinen als Mizellbausteine an der Gushingentstehung wurde bestätigt: Gushing-initiiierende Substanzen verhielten sich als Ladungsträger und besaßen ein molekulares Gewicht von ca. 10 kDa, da in Dialyseschläuchen mit einer maximalen Ausschlussgrenze von 10 kDa nur ein Teil der gushingaktiven Substanz zurückgehalten wurde. Lipide, die ein weit geringeres molekulares Gewicht besitzen, werden bei einer erschöpfenden Dialyse nahezu vollständig entfernt.

Weiterhin konnten den Gushing-Initiatoren bei der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie hydrophobe Molekülabschnitte nachgewiesen werden. Die Wechselwirkungen waren so stark, dass sich ein Großteil der Gushinginitiatoren gar nicht mehr von dem hydrophoben Polymer löste. Gushinginitiatoren müssen aufgrund dieser hydrophober Bereiche und ihrer Wasserlöslichkeit amphiphil sein; der Nachweis grenzflächenaktiver Stoffe mit Gushingrelevanz untermauert die Theorie, dass die präexistenten Mizellen in der verschlossenen Flasche, die für das primäre Gushingphänomen verantwortlich sind, von einer grenzflächenaktiven Schicht umgeben sind.

Die Untersuchung des Hydrophilisierungspotenzials verschiedener Fusarienarten an hydrophoben Oberflächen bestätigte eine umfangreiche Produktion amphiphiler Substanzen (Hydrophobine oder ähnliche Proteine) bei allen untersuchten Fusarienarten. Hier war keine Unterscheidung zwischen zu Gushing führenden und nicht zu Gushing führenden Fusarien möglich, sodass eigentlich alle Fusarien zu

Gushing führen müssten. Allerdings schäumte keines der carbonisierten Fusarienkulturfiltrate über.

Gushing-initiiierende Proteine sind anscheinend mit den klassischen Methoden der Proteinchemie nicht nachweisbar. Ein Grund dafür könnte das Aggregationsverhalten dieser Proteine (Hydrophobine oder ähnliche Proteine) sein. Ihre Isolierung ist dann nur über die Expression der entsprechenden Gene oder über sehr spezielle Isolierungsvorschriften möglich. Während der Entstehung dieser Arbeit ist es in Finnland gelungen, sowohl in carbonisiertem Wasser als auch in Bier Gushing auszulösen, indem Hydrophobine von *Fusarium poae* in einer Konzentration von 100 µg / l zugefügt wurden. Damit sind Hydrophobine sehr wahrscheinlich Gushing-Initiatoren.

Die als Gushing-Initiatoren verdächtigten α -, β - und γ -Cyclodextrine wurden nach Zugabe zu Würze oder Bier (selbst im g-Maßstab) als gushing-irrelevant beurteilt. Die Wirt-Gast-Komplexe, unter anderem mit eingelagertem Kohlendioxid, konnten kein Gushing auslösen. Auch die Inokulation von Würze oder speziellem Nährmedium von *Paenibacillus macerans* mit anschließender Filtration zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile initiierte in den stabilen, carbonisierten Flüssigkeiten kein Übersäumen.

Potenzielle Gushing-Promotoren sollten aus Bieren mit Hilfe einer Zerschäumung schonend angereichert werden. Damit wurden als Hauptkomponente die schaumaktiven, nicht spezifischen Lipotransferproteine aus gushenden und nicht gushenden Bieren in den Spumaten konzentriert. Diese Proteine waren jedoch nicht in der Lage, in Basisproben vorhandenes Gushingpotenzial zu verstärken. Ebenso wenig gushten mit diesem Spumat versetzte Fusarienkulturfiltrate. Eine Beteiligung amphiphiler Moleküle, die auch nach Grenzflächenkontakt wasserlöslich bleiben, an der Mizellformation bei der Gushingentstehung ist somit sehr unwahrscheinlich. Damit werden die präexistenten Bläschen in der verschlossenen Flasche eher nicht durch heterogene Mizellhäute aus Gushinginitiatoren und amphiphilen Moleküle, die auch nach Grenzflächenkontakt wasserlöslich bleiben, als Gushingpromotoren stabilisiert.

Die von den Fusarien produzierten, polaren Lipide verhielten sich nicht als Gushing-Initiatoren oder -Promotoren: Weder die von nicht zu Gushing führenden Fusarien

noch die von zu Gushing führenden Fusarien produzierten Lipide konnten ein Überschäumen de novo auslösen, geschweige denn die Überschäumvolumina gushender Basisproben erhöhen. Diese Substanzen können hier noch einmal als Promotoren in Form von Mischmizell-Bausteinen ausgeschlossen werden.

Die Zumischung der Lipide von nicht zu Gushing führenden Fusarienarten führte dann jedoch zu einer großen Überraschung: Diese Lipidextrakte unterdrückten das Gushingpotenzial aller zuvor primärgushing-aktiver Basisproben. Basisproben ohne Gushingaktivität blieben unbeeinflusst. Lipide von zu Gushing führenden Fusarien hatten dagegen keinen Einfluss. Auffällig war, dass die polaren Lipide der beiden Fusarientypen keine schaumnegative Wirkung besaßen.

Auch den polaren Lipiden von *Geotrichum candidum* ließ sich im Kombinationstest eine gushing-inhibitorische Wirkung nachweisen.

Die strukturchemische Erklärung lieferte der gaschromatographische Vergleich des Fettsäurespektrums. Polare Lipide mit veresterten ungesättigten Fettsäuren sind offensichtlich dazu in der Lage, Mizellbildung und –stabilität der Gushing-Initiatoren zu beeinträchtigen: Sie lagern sich vermutlich in den monomolekularen Proteinfilm ein und unterbrechen den gasundurchlässigen Film bzw. geraten ins Mizellinnere, wodurch sie die Kohlendioxidmoleküle verdrängen. Die gaschromatographische Trennung der methylierten Fettsäuren aus der polaren Lipidfraktion bestätigte die Vermutung, dass bei zu Gushing führenden Fusarien das Verhältnis gesättigter zu ungesättigten Fettsäuren bei weitem höher liegt als bei nicht zu Gushing führenden Fusarien.

Den Ergebnissen zufolge produzieren alle Fusarien gushing-initiiierende Proteine (wobei es sich dem chemischen und physikalischen Verhalten zufolge um Hydrophobine o.ä. handeln könnte). Deshalb müsste jedes Fusarien-belastete Malz überschäumen. Mischmizellen aus pilzlichen und pflanzlichen Proteinen bzw. aus Proteinen und Lipiden konnten als Gushingursache nicht bestätigt werden, da weder amphiphile pflanzliche Proteine noch pilzliche polare Lipide vorhandenes Gushingpotential verstärkten. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zu klären, warum trotzdem nicht jedes Bier überschäumt: Inhibitoren für primäres Gushing, die nur in nicht gushendem Bier aus Fusarien-belastetem Malz vorkommen, konnten

angereichert werden. Es handelt sich dabei um polare, schaumverträgliche Lipide, die überwiegend ungesättigte veresterte Fettsäuren enthalten und die von nicht zu Gushing führenden Fusarien produziert werden.

Summary

This work aimed at exploring some facts about structural chemistry of primary gushing. A special illustration of gushing mechanism – the hypothesis of mixed micelles – was used as theoretical base.

Extensive analytical examinations were therefore required to guarantee the inclusion of all gushing-active substances. However, all experiences – as far as not described otherwise – refer to a period of eight days. This is why one cannot exclude the occurrence of any gushing activity in a gushing-negative sample at a later stage absolutely.

Some samples with evident primary gushing causes were required first. On the one hand “Fusaria-inoculated draff” was an always available model system. On the other hand some criterions were selected to distinguish between primary and secondary, respectively mixed gushing samples in practice.

Cereals infected by *Fusaria* are indispensable for primary gushing. If there is no mycelium in cereals or malt primary gushing can be excluded. However, in wort and beer there is no more cell material and mycotoxins can be found very rarely. This work shows how to prove *Fusarium* lipids in wort and beer, especially made of malts with a low infection degree.

Working out different properties of worts with primary or secondary gushing factors, the addition of calcium salts or EDTA proved successful. The added calcium salts were suitable to divide calcium oxalate crystals after keeping cold. Added EDTA masks iron ions as well as calcium ions coming from malt. Iron ions are incorporated by yeast during fermentation in beer production. In gushing tests these ions are to be eliminated otherwise.

Here are some proposals of how to improve the gushing test of Donhauser et al.:

- EDTA should be added to all tests after hot filtration.
- Controlling the concentrations of calcium, oxalate and iron in wort is recommended

By applying these measures a high number of false-positive samples can be eliminated.

In samples with evident primary gushing natural surface-active substances of herbal or fungal origine were of special interest: These include proteins with hydrophobic and hydrophilic molecular areas and polar lipids.

Proteins were confirmed to be constituents of micelles which are responsible for gushing development: Gushing-initiating substances were characterized as ions with molecular weights about 10 kDa: Some gushing-active molecules were held back by dialysing hoses with a molecular weight cut-off of 10 kDa. If a sample was dialysed exhaustively lipids which are of much lower molecular size would have gone lost almost completely.

Moreover gushing initiators have hydrophobic molecular areas as proved by hydrophobic interaction chromatography. These molecules must be amphiphilic because they are also soluble in water. At sufficient concentrations amphiphilic molecules build micelles in aqueous solution spontaneously. This fact confirms the theoretical assumption that there are micelles surrounded with amphiphilic substances preexisting in unopened bottles stabilising gas bubbles which are responsible for primary gushing.

The examination of the hydrophilizing potential of Fusaria species on hydrophobic surfaces could ascertain an extensive production of amphiphilic substances of all examined Fusaria. It was not possible, however, to distinguish between Fusaria leading to gushing and Fusaria not leading to gushing. That is why all Fusaria should actually lead to gushing. However, filtered Fusaria cultures did not foam over at all.

Gushing-initiating proteins were not conspicuous in protein spectra. Neither a separation due to isoelectric point nor due to molecular weight revealed any peculiarity. Maybe these proteins (like hydrophobins or similar proteins) cannot be

examined using methods of established protein chemistry because of their physical and chemical properties. They seem to be isolatable only by gene expression or by using special recipes for isolation. While this work was in progress a research team in Finland succeeded in initiating gushing in carbonated water as well as in beer by adding hydrophobins of *Fusarium poae* (approx. 100 µg/l). Therefore hydrophobins are likely to be gushing initiators.

Neither α - nor β - nor γ -cyclodextrins which were added to wort or beer (even in g-amounts) were able to induce gushing. These host-guest-complexes were not relevant for gushing.

Inoculating wort or a special medium with *Paenibacillus macerans* (after filtration and carbonisation) did not initiate gushing either.

Potential Gushing promoters were to be gently concentrated from different kinds of beer by foam analysis. Foam-active non-specific lipotransfer proteins could be concentrated as main ingredients in crumbled foam. However, these proteins were unable to support gushing basic samples in a synergistic way. Crumbled foam added to not-gushing filtered *Fusaria* cultures did not stimulate them to gushing either. This is why non-specific lipotransfer proteins as well as other amphiphilic substances which are still watersoluble after surface contact are not likely to participate in micelle formation responsible for primary gushing.

Polar lipids produced by *Fusaria* do not react as gushing initiators or promoters either. Neither *Fusaria* leading to gushing nor *Fusaria* not leading to gushing produced lipids which could initiate overfoaming de novo or could support gushing basic samples in a synergistic way.

Addition of lipids from *Fusaria* not leading to gushing revealed a big surprise: These lipid extracts were able to fully prevent gushing of all former gushing-active basic samples. Lipids from *Fusaria* leading to gushing showed no reduction of gushing. Polar lipids from both types of *Fusaria* had no foam negative effect.

Polar lipids of *Geotrichum candidum* behaved in combination tests as gushing inhibitors, too.

The explanation of structural chemistry was given by a gas chromatographic comparison of fatty acid spectra. Polar lipids mainly esterified with unsaturated fatty

acids seem to damage demonstrably micelle formation and stability of gushing initiators: The gas impermeable protein film built by gushing initiators might be intermitted. These polar lipids displace carbon dioxide molecules from the inside of micelles respectively. Gas chromatographic separation of methylized fatty acids from polar lipids confirmed the assumption that Fusaria leading to gushing are built of lipids esterified with a much higher share of saturated fatty acids than Fusaria not leading to gushing.

Concluding these results all Fusaria produce gushing initiating proteins (hydrophobins or similar proteins, according to their chemical and physical characteristics). That is why every Fusaria-infected malt should show gushing. This work shows why not: Gushing inhibitors were enriched successfully. These lipids only occurred in not-gushing beers made of Fusaria-infected malt. The Gushing inhibitors produced by Fusaria not leading to gushing were characterized as polar lipids which are compatible with foam. They are predominantly esterified with unsaturated fatty acids.

Mixed micelles consisting of fungal or plant proteins or consisting of proteins and lipids could not be confirmed because neither amphiphilic plant proteins nor polar fungal lipids enforced gushing potential.

3 Wissensstand

3.1 Primäres und Sekundäres Gushing

Primäres Gushing konnte schon Mitte des vergangenen Jahrhunderts aufgrund des epidemieartigen Auftretens mit feuchten Sommern (besonders bei hohen Niederschlagswerten während der Getreide-Blütezeit) und mit Fusarien in Zusammenhang gebracht werden¹. Das Phänomen tritt auf infolge von Befall des Getreidekorns auf dem Feld mit bestimmten Fusarienarten (Lagerpilzinfektionen mit Schimmelpilzen wie Aspergillen und Penicillien sind durch trockene Lagerungsbedingungen von Getreide bzw. Malz technologisch vermeidbar und damit den sekundären Gushingursachen zuzuordnen)^{1,2,3}.

Dennoch konnten trotz zahlreicher Arbeiten auf diesem Gebiet bisher keine primär gushing-aktiven Substanzen reproduzierbar in Getreide, Malz, Würze oder Bier nachgewiesen oder daraus isoliert werden.

Unter den sekundären Gushingfaktoren sind alle Gushingverursacher zusammengefasst, die sich momentan durch technologische Maßnahmen vermeiden lassen. So lässt sich beispielsweise die Kohlendioxid-Entbindung an Calciumoxalat-Ausfällungen verhindern, indem lösliche Calciumsalze über das Brauwasser zudosiert werden. Während der Kaltlagerungsphase des Jungbieres wird das schwerlösliche Calciumoxalat gezielt vor der Filtration ausgefällt, sodass die Kristalle bei einer anschließenden Filtration in den Filterschichten zurückgehalten werden^{4,5,6}. Auch Eisenionen können mit technologischen Maßnahmen als Gushingursache ausgeschlossen werden⁷: Malzeigene Eisenionen sind als Gushingverursacher irrelevant, da sie während der Vergärung von den Hefezellen bis auf zu vernachlässigende Konzentrationen aufgenommen werden⁸. Das Filterhilfsmittel Kieselgur kann jedoch bei der Filtration wieder bedenklich hohe Konzentrationen an

¹ GJERTSEN, P. et al.: Proc. EBC Congr. - Stockholm (1963), 428-438

² NIESSEN, L.: In: Brauwelt **37** (1991), 1556-1562

³ HAIKARA, A.: In: Proc. EBC Congr. - London (1983), 401-408

⁴ BRENNER, M.W.: In: Proc. EBC Congr. - Copenhagen (1957), 349-362

⁵ SCHUR, F. et al.: In: Brauerei Rundschau **91** (1980), 201-207

⁶ ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

⁷ GRAY, P.; STONE, I.: In: Brauwissenschaft **11** (1958), 214-219

⁸ NARZISS, L.: Abriss der Bierbrauerei, 4. Auflage, Enke Verlag Stuttgart 1980, 331

löslichem Eisen eintragen⁶. Bei Verwendung von stark eisenhaltigen Filterhilfsmitteln sollte deshalb das Voranschwemmwasser verworfen werden anstatt zur Wassereinsparung einen Kreislauf zu schalten. Weiterhin ist es ratsam große Chargen bzw. für Fass – oder Dosenbier konzipierte Chargen direkt nach der Voranschwemmung zu filtrieren, da dann der anfänglich erhöhte Eisengehalt besser verdünnt wird bzw. da Fass- und Dosenbiere sowieso nicht gushing-gefährdet sind. Kleinere Chargen können dann ohne neue Anschwemmung im Anschluss filtriert werden¹.

Viele kleine Meilensteine in der Geschichte der sekundären Gushingforschung haben zur weitgehenden Handhabbarkeit dieser Gushing-Verursacher geführt und damit sekundäres Gushing tatsächlich technologisch vermeidbar gemacht. In einigen Fällen wurden empirisch ermittelte Richtwerte festgelegt^{1,2,3,4,5}.

3.2 Mechanismus der Gasentbindung

Nun stellt sich die Frage, wie Kohlendioxid bei Druckentlastung des Systems „Flasche“ (beim Öffnen) schlagartig entbinden kann. Physikalischen Berechnungen zufolge ist nämlich die spontane Gasentbindung aus einer homogenen Flüssigkeit in einem glatten Gefäß bei atmosphärischem Druck unmöglich, auch wenn die Flüssigkeit mit Gas übersättigt ist. Das Kohlendioxid kann nur in Anwesenheit von Entbindungskeimen entweichen^{6,7}. Als solche sind einmal Gefäß-Innenrauhigkeiten und Feststoffpartikel geeigneter Größe und Form denkbar. Es können aber auch Heterogenitäten in der flüssigen Phase, wie Mizellen, für eine spontane Gasentbindung verantwortlich sein^{8,9,10}.

¹ JACOB, F.: 38. Technologisches Seminar, Freising - Weihenstephan 2000

² BRENNER, M.W.: In: Proc. EBC Congr. – Copenhagen (1957), 349-362

³ GRAY, P.; STONE, I.: In: Brauwissenschaft **11**, 1958, 214-219

⁴ PAHL, M.; WÖHLER, M.: Diss. Universität Gesamthochschule Paderborn, 1999

⁵ SCHILDBACH, R.; MÜLLER, J.: In: Brauwelt (1980), 1648

⁶ KRAUSE, B.: In: Svenska Bryggareföreningens Manadsblad **51** (1936), 221-236

⁷ YOUNT, D.E. et al.: In: J. Acoustical. Soc. of Am. **76** (1984), 1511-1521

⁸ FISCHER, S.: Diss. TU München 2001

⁹ FRANKE, D. et al.: In: Brauwelt **38/39** (1995), 1944-1949

¹⁰ DRAEGER, M.: In: Brauwelt **6** (1996), 259-269

Schließlich sind zur spontanen Entbindung von Kohlendioxid sogenannte komplexe Gaseinschluss-Verbindungen (vgl. Kap. 3.7.4) als Keime vorstellbar¹.

Die Entstehung von primärem Gushing beruht auf der Existenz stabilisierter Mikroblasen als Entbindungskeime in der verschlossenen Flasche. Auf diese Weise stabilisierte Blasen können über sehr lange Zeiträume in gelagertem Bier existieren. Zur spontanen Entbindung ist eine bestimmte, errechenbare Mindestanzahl an Bläschen nötig, die sogenannte kritische Entbindungskeimzahl. Die Bläschen müssen von einer Mizellhaut umgeben sein. So sind sie bis zum kritischen Durchmesser (berechenbar und messbar, liegt bei etwa 450 nm Ø) vor Kompression unter dem hohen Druck in der verschlossenen Flasche geschützt. Größere Blasen hingegen werden komprimiert. Dadurch diffundiert ein Teil des angesammelten Kohlendioxids aus der Blase und geht wieder in Lösung, sodass die Blase schrumpft. Bläschen mit einem wesentlich kleineren Durchmesser als der kritische Blasendurchmesser sind zwar unter den Druckverhältnissen der geschlossenen Flasche stabil, wachsen aber bei Druckentlastung nicht weiter an und steigen nicht auf; sie verhalten sich nicht als Entbindungskeime². Mizellen in der kritischen Größenordnung wurden in gushenden Bieren nachgewiesen, während in nicht gushenden Bieren solche Mizellen in geringer Anzahl oder nicht vorkamen. Dies bestätigen die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen von Gushingbieren mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik³ ebenso wie Partikelgrößenmessungen in gushenden Bieren².

Es wird angenommen, dass die Mizellmembran unter den Druckverhältnissen der geschlossenen Flasche gasundurchlässig ist. Nach Druckabfall beim Öffnen der Flasche sollen die Mikrobläschen jedoch bei atmosphärischem Druck in der Flüssigkeit übersättigtes Kohlendioxid aufnehmen können. Sie wachsen dann an, steigen auf und reißen dabei Flüssigkeit mit: Das Bier schäumt über⁴. Alternativ könnten die Häute von Mizellen mit kritischer Größe bei Druckentlastung des Systems platzen. Das freigewordene Gasbläschen würde sich dann ausdehnen und beim Aufsteigen weiteres Kohlendioxid und Flüssigkeit mitreißen.

¹ BENDER, M.L.: Cyclodextrin Chemistry 6 (1978), 1-2

² FISCHER, S.: Diss. TU München 2001

³ MITANI, Y.: et al.: In: J. Am. Soc. Brew. Chem. **60** (2002), 1-9

⁴ PELLAUD, J.: In: Interbrew Technology Development, Leuven, Belgium (2002)

Primären und die vielfältigen sekundären Gushing-Initiatoren führen in der Praxis oft erst in ihrer Summe zur kritischen Anzahl an Entbindungskeimen und bringen so das Bier beim Entspannen zum Überschäumen. Diese Arbeit thematisiert aber ausschließlich primäre Gushing-Ursachen. Sekundäre Ursachen sollen nur insoweit berücksichtigt werden, dass sie bei den Versuchen ausgeschlossen werden.

3.3 Fusarien

Die Gattung *Fusarium* gehört innerhalb der Abteilung *Mycota* der Klasse *Deuteromyces* oder *fungi imperfecti* an: Die filamentösen Fusarien werden bislang den imperfekten Pilzen zugeordnet, weil bei den meisten Fusarienarten (noch) kein Stadium sexueller Vermehrung bekannt ist oder erst spät dem entsprechenden anamorphen Stadium zugeordnet werden konnte. Phylogenetisch gehören sie bzw. ihre teleomorphen Formen (*Gibberella spp.*) aufgrund ihres septierten Myzels zu den Ascomyceten. Außerdem bilden sie – analog den asexuellen Stadien von Ascomyceten - Konidiosporen durch Abschnürung der Hyphenenden. Innerhalb ihrer Klasse gehören die Fusarien der Ordnung *Hypocreales* und der Familie *Hypocreales*¹ an.

Fusarien, die aufgrund ihrer saprophytischen bis parasitären Lebensweise und ihrer morphologischen Merkmalen zu den Schimmelpilzen gezählt werden, sind auf lebendem und totem Pflanzenmaterial sowie im Erdboden sehr weit verbreitet.

Als fakultativ anaerobe Organismen bilden die meisten Arten sowohl submerses Myzel als auch Lufthyphen, was ihrer weiten Verbreitung zugute kommt². Fusarien haben als Erreger von Pflanzenkrankheiten weltweite Bedeutung (Wurzel- und Stengelfäule, Blattflecken, Fruchtfäule, Krebswucherungen, Gefäßkrankheiten). Der Befall von Getreidepflanzen führt z.B. zur sogenannten Weißährigkeit (*Fusarium head blight*)³.

Weltweit am häufigsten sind *Fusarium sporotrichoides*, *F. graminearum* und *F. moniliforme* anzutreffen, während in Europa *F. culmorum*, *F. avenaceum* und

¹ SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag Stuttgart, 6. Auflage 1985, 154

² REISS, J.: Schimmelpilze. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage 1997, 61-70

³ DESJARDINS, A. E.; HOHN, T.M.; MCCORMICH, S.P.: In: Microbiol. Reviews **57/3** (2000), 595-604

F. subglutinans dominieren. Bedingt durch leicht abweichende Temperaturoptima tritt in Nordeuropa bzw. in Norddeutschland *F. culmorum* häufiger auf, wohingegen in Süddeutschland *F. graminearum* dominiert¹.

Diese regionalen Unterschiede sind auch auf der Suche nach Gushingfaktoren zu berücksichtigen: Sehr spezifische Nachweismethoden (PCR; immunologische Verfahren) erfassen nämlich möglicherweise nur exakt die Moleküle / Molekülabschnitte, auf die sie ausgelegt sind. Moleküle mit geringer Primärstruktur-Homologie, aber mit derselben Wirkung könnten solchen Tests Schwierigkeiten machen.

3.4 *Paenibacillus macerans*

Paenibacillus macerans, auch *Bacillus macerans* oder Flachsrottenbazillus genannt, weckte erst kürzlich Interesse bezüglich der Gushingfrage^{2,3}. Diese Bazillusart befällt in erster Linie Getreidewurzeln und -halme, wobei Wurzel- und Stengelfäule auftritt. Ein Befall von Spelzen und Körner wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben, aber auch nicht widerlegt. Diese pektinspaltende Bazillusart ist dazu in der Lage mithilfe des Enzyms Glycosyl-Cyclodextrin-Transferase (GCT) aus Stärke und verwandten Verbindungen Cyclodextrine zu bilden (vgl. Kap. 3.7.4).

3.5 Braugetreide und Standortfaktoren

Der Fusarienbefall von Braugetreide hängt unter anderem von Zeitpunkt und Dauer der Blüte, vom Grad der Offenblütigkeit, von Begrannung, Ährentyp und Halmlänge ab. Zu den Faktoren, die den Sporendruck beeinflussen, werden klimatische Einflüsse auf den Boden im Winter, Bodenbearbeitung und Vorfrucht gezählt. Minimale mechanische Bearbeitung der Bodenoberfläche und liegengelassene Überreste der Vorfrucht (insbesondere Mais!!) begünstigen die Verbreitung der Fusarien enorm.

¹ KERSHAW et al.: In: Fungal Genet. Biol. **23** (1998), 18-33

² GULATI, M:K.: In: Landw. F., Diss. Bonn 2001, 134

³ JØRGENSEN, A.: Mikroorganismen der Gärungsindustrie, Hans Carl Verlag 1956, 480-482

Noch größer als Getreidetypus und Sporendruck sind klimatische Einflüsse während kritischer Phasen des Getreidewachstums: Hohe Temperaturen im Mai synchronisieren das Ausreifen der Pilz-Dauerfruchtkörper. Folgen daraufhin Niederschläge zur Blütezeit der Getreidesorten, so kann der Pilz tief ins Korn hineinwachsen. Da die Pilze bescheidene Mindestanforderungen an das Klima stellen (mindestens 15°C und zwei Tage Nässe während der Blütezeit), kann es praktisch kaum Fusarien-freies Getreide geben, sondern es variiert der Infektionsgrad^{1,2}.

3.6 Beurteilung der Getreidequalität

Die Getreidequalität oder hier insbesondere der Pilzbefall einer Erntecharge bezogen auf Sorte, Jahrgang und Standort kann auf verschiedene Art bestimmt werden: Möglich ist eine visuelle Beurteilung der Körner (Schmactkörner, (relevante,) rote Körner, Auswuchs)^{3,4}, die Quantifizierung der Mykotoxinbelastung oder die Quantifizierung der Pilz-Biomasse z.B. anhand der Indikatorsubstanz Ergosterin. Die Pilze können mittels immunologischer Bestimmungen⁵, Polymerase Chain Reaction (PCR)^{6,7,8} oder der Charakterisierung des Myzels und der Konidiosporen identifiziert werden. Jedoch stehen all diese Merkmale in keinem direkten Zusammenhang mit der Gushingneigung von Bieren, die aus den Feldfrüchten nach dem Vermälzen gebraut werden. Da die Gushing verursachenden Substanzen nach wie vor unbekannt sind, kann auch deren Verbleib während Vermälzung, Würzebereitung, Vergärung und Lagerung schwer eingeschätzt werden.

Mit Hilfe künstlicher Feld-, Mälzungs-^{9,10} und Treberinfektionen¹¹ ließ sich nachweisen, dass nicht jede Fusarienart beim Befall von Getreidekörnern zu Gushing führt: Einige Fusarienarten (z.B. *Fusarium graminearum*, *Fusarium*

¹ SACHER, B.: Diss. TU München 1997, 2-4

² SCHWARZ, P.B. et al.: In: Monatszeitschrift für Brauwissenschaft **3/4** (2001), 55-63

³ MÜLLER, C.: In: Brauwelt **21** (1995), 1036-1054

⁴ NIESSEN, L.: In: Brauwelt **37** (1991), 1556-1562

⁵ VAAG, P.: Proc. EBC Congr. - Lisboa (1991), 553-554

⁶ EDEL, V. et al.: In: Mycological Research **101/2** (1997), 179-187

⁷ NIESSEN, L.; VOGEL, R.: In: Systematic and Applied Microbiology **20/1** (1997), 111-113

⁸ YLI-MATTILA, T.; HYVONEN, J.: In: Sydowia **48/2** (1996), 184-195

⁹ HAIKARA, A.: Proc. EBC Congr. - London (1983), 401-408

¹⁰ WEIDENEDER, A.: Diss. TU München 1992

¹¹ ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

culmorum) wurden als Gushing-Verursacher bestätigt, während andere Spezies derselben Familie (z. B. *F. tricinctum*) nicht zu Gushing führten (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: **Gushingverursachung durch Schimmelpilze**

-getestet am Modellsystem Fusarien-infizierter Treber¹ (vgl. Kap. 7.5.1 Gushingtest nach Donhauser)

Schimmelpilz	Gushingtendenz
<i>Fusarium graminearum</i>	stark
<i>Fusarium culmorum</i>	stark
<i>Fusarium avenaceum</i>	stark
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	stark
<i>Fusarium crookwellense</i>	schwach
<i>Fusarium tricinctum</i>	keine
<i>Fusarium oxysporum</i>	keine
<i>Fusarium poae</i>	keine
<i>Fusarium sambucinum</i>	stark
<i>Fusarium equiseti</i>	stark
<i>Alternaria alternata</i>	keine
<i>Penicillium spp.</i>	mittel

Somit gibt es in Bezug auf Primäres Gushing vier Typen von Fusarienbefall bei Malz:

1. von Fusarien unbelastetes Malz, dass primärgushingfreies Bier ergibt
2. mit nicht zu Gushing führenden Fusarien belastetes Malz, dass primärgushingfreies Bier ergibt
3. mit zu Gushing führenden Fusarien belastetes Malz, dass primär gushendes Bier ergibt
4. mit nicht zu Gushing führenden und mit zu Gushing führenden Fusarien belastetes Malz; Primäre Gushingtendenz momentan nur praktisch zu ermitteln

Da es sich bei den meisten Malzen um den Mischtypus 4 handelt, muss das tatsächliche Gushingpotenzial, das dem Braugetreide (Rohware, Malz) innewohnt, durch Brauen der Biere und testen der abgefüllten Flaschen (abgefüllte Flaschen

¹ ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

müssen unbedingt zuvor über einige Wochen gelagert werden!) geprüft werden, was allerdings zeit-, material- und arbeitsaufwändig ist. Weitere Möglichkeiten bieten seit Ende der 80-er Jahre bzw. seit Anfang der 90-er Jahre der forcierende Würzeschnelltest nach Donhauser¹ und der Carlsberg-Test² zur Ermittlung der Gushing-Tendenz von Rohware und Malz. Während der Entwicklung des Würzeschnelltests nach Donhauser wurde in umfangreichen Versuchen eine sehr gute Korrelation zwischen der Gushingneigung so forcierter Würzen und der Gushingneigung der entsprechenden Biere festgestellt. Die Schnelltests sind jedoch indirekte Verfahren, die nur eine Gushing-Tendenz, nicht aber das tatsächliche Auftreten von Gushing in der Praxis bzw. das Ausmaß der CO₂-Entbindung vorhersagen können. Außerdem birgt der Test Fehlerquellen in sich, auf die in Kapitel 4.5.2 genauer eingegangen werden soll.

3.7 Molekularbiologische Grundlagen für die Mizellbildung

Wie oben genannt (vgl. Kap. 3.2) bedarf das Auftreten von primärem Gushing zahlreicher prästabilisierter Mikrobblasen, die beim Öffnen der Flasche als Entbindungskeime für physikalisch gelöstes, in der entspannten Flüssigkeit übersättigtes Kohlendioxid dienen. Zur Mizellbildung orientieren sich die grenzflächenaktiven Moleküle mit ihrem hydrophilen Molekülteil zur wässrigen Mizellaußenseite, während der hydrophobe Rest eine Art organische Phase im Mizellinneren bildet. In dieser organischen Phase löst sich eingelagertes CO₂ deutlich besser als in Wasser. Kohlendioxid wird vom Wasser verdrängt, weil die relativ unpolaren Moleküle ohne Dipolmoment keine exergonischen Wasserstoffbrücken ausbilden können. Die Unterbrechung der Wasserstoffbrücken-Bindungen führt zu der hohen Solvatisierungs-Energie für CO₂ in Wasser. Kohlendioxid-gefüllte Mizellen formieren sich also exergonisch trotz Entropieabnahme. Schließlich schützt die Mizellhaut die angesammelten Gasreste unter dem Systemdruck vor Diffusion und Kompression³.

¹ DONHAUSER, S.; WEIDENEDER, A.; WINNEWISSER, W.; GEIGER, E.: In: Brauwelt **129** (1989), 1658

² RADAU, B. et al.: Brauerei-Forum **10** (1995), 377

³ DEGIORGIO, V.: Proc. Internat. School of Physics „Enrico Fermi“, Course XC (1985), 1-21

Für die Entstehung einer zum Überschäumen ausreichender Anzahl prästablisierter Mikroblasen ist eine ausreichende Konzentration potenzieller Mizellhaut-Bausteine (cmc – critical micelle concentration) notwendig, damit sich aus den stark verdünnten Bausteinen innerhalb der gegebenen zeitlichen Grenzen (entspricht dem Zeitraum zwischen Abfüllung und Konsum des Bieres) durch Diffusion, unterstützt durch Schüttelbewegungen, Mizellen ausbilden können¹. So muss entweder eine gushing-aktive Substanz in verhältnismäßig hoher Konzentration vorliegen, oder aber es existieren verschiedene primär gushing-aktive Komponenten, die durch Selbstaggregation sogenannte Mischmizellen (die Mizellhaut besteht aus heterogenen Bausteinen) ausbilden und erst in der Summe die kritische Mizellkonzentration erreichen.

An der Ausbildung einer Mischmizellhaut können sowohl Gushing-Initiatoren als auch –Promotoren beteiligt sein. Erstere sind für das Auftreten von Gushing zwingend erforderlich, da sie das Grundgerüst aufbauen und die notwendige Stabilität der Mizellhaut bedingen. Promotoren hingegen unterstützen die Mizellformation, indem sie Lücken auffüllen oder die Mizelle stabilisieren. Alleine sind sie aber nicht in der Lage Gushing auszulösen.

Gushing-Inhibitoren beteiligen sich ebenfalls an der Entstehung von Mizellhäuten bzw. lagern sich in die Mizelle ein. Sie destabilisieren jedoch die schützenden Filme oder aber verhindern eine Gaseinlagerung durch Verdrängung von Kohlendioxid aus dem Mizellinneren.

Als potentielle Mizellbausteine können prinzipiell alle natürlichen, grenzflächenaktiven Moleküle betrachtet werden. Kohlenhydrate und Nukleinsäuren besitzen keine hydrophoben Molekülbereiche und können deshalb nicht grenzflächenaktiv sein. Folglich konzentriert sich die Suche nach den gushing-aktiven Stoffen auf zwei große Stoffgruppen der Biomoleküle: Proteine und Lipide. Proteine verhalten sich dann grenzflächenaktiv, wenn aufgrund der Aminosäuresequenz, der sekundären oder tertiären Proteinstruktur räumlich deutlich voneinander abgegrenzte (Kopf-Schwanz-Ausbildung) hydrophobe (d.h. überwiegend unpolare Aminosäurereste an der Moleküloberfläche, polare und geladene Reste sind im Molekülinneren begraben) und hydrophile (d.h. überwiegend

¹ SHAH, O.D.: Micelles, Microemulsions and Monolayers. Marcel Dekker-Verlag New York, 1998

polare und geladene Aminosäurereste an der Moleküloberfläche) Abschnitte auftreten. Lipide sind dann grenzflächenaktiv, wenn sie eine oder mehrere freie funktionelle Gruppen besitzen oder wenn über Ether- oder Esterbindungen stark polare oder geladene Stoffe gebunden sind.

Alle in Bier vorkommenden grenzflächenaktiven Substanzen waren auf ihren Beitrag zum Gushing-Gesamtpotenzial zu untersuchen.

Da Befall von Getreide mit bestimmten Fusarien (s. Tab. 1) Gushing auslöst, müssen diese Pilze für die Entstehung gushing-relevanter, grenzflächenaktiver Stoffe verantwortlich sein. Diese Substanzen müssen im Rahmen der biochemischen Veränderungen im Korn, die die Schimmelpilze verursachen, entstehen. Die biochemischen Veränderungen im Korn können einmal auf Stressreaktionen von Seiten der Getreidepflanze durch den Schädlingsbefall beruhen. Weiterhin verursacht der Schimmelpilz durch Abbau von Getreideinhaltsstoffen sowie durch die Ausscheidung seiner Stoffwechselprodukte Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Getreides.

Aus dem primären Stoffwechsel der Fusarien sind keine besonderen Rückschlüsse auf die Entstehung von gushing-verdächtigen, grenzflächenaktiven Stoffen zu ziehen. Sie verfügen über ein breites Spektrum an extrazellulären Hydrolasen (Lipasen, Cellulasen, Proteinasen u.v.a.).

Aus dem sekundären Stoffwechsel sind viele Produkte bekannt (Mykotoxine, Alkaloide, Antibiotika, Farbstoffe, Hemm- und Wuchsstoffe für das Pflanzenwachstum u.a.), die jedoch allesamt nicht mit Gushing in Zusammenhang gebracht werden können^{1,2}.

Unter den genannten Stoffgruppen konnten bisher keine Gushing-Initiatoren, -Promotoren oder -Inhibitoren sicher auffindig gemacht werden. Auch Versuche, gushing-aktive Substanzen zu isolieren, waren nicht reproduzierbar. Ebenso konnte bisher kein biochemischer Unterschied gushender gegenüber nicht gushenden Bieren festgestellt werden. Gushingaktivität kann weder auf die Abwesenheit von Gushing-Inhibitoren noch auf die Anwesenheit von Gushing-Initiatoren und eventuell -Promotoren eindeutig zurückgeführt werden.

¹ MOSS, M.O.: 7. British Mycolog. Soc. Symposium – London 1982

Hier sollen nun besonders verdächtige Bierbestandteile bzw. Fusarien-Stoffwechselprodukte kurz vorgestellt werden.

3.7.1 Schaumproteine

Grenzflächenaktive Proteine sind in Bieren in großen Mengen vorhanden. Voraussetzung für Bierschaum ist die Stabilisierung vergrößerter Grenzflächen zwischen der flüssigen und der gasförmigen Phase. Diese Aufgabe übernehmen Mizellhäute aus grenzflächenaktiven Proteinen. Hauptkomponenten bei der Schaumentstehung sind nicht-spezifische Lipotransferproteine (ns-LTPs) aus der Albuminfraktion der Gerste, die - durch Glycosylierung und Cystinbrückenspaltung in unterschiedlichem Grad modifiziert - in erster Linie für die Schaumbildung verantwortlich sind. Internationale Forschungsprojekte zeigen großes Interesse an diesen pflanzentypischen Proteinen, die außer der Grenzflächenaktivität auch noch durch Hitzestabilität und Proteaseresistenz als potentielle Promotoren für Gushing auf sich aufmerksam machen.

Die zweite Hauptkomponente des Bierschaums – in der Schaumkrone gegenüber dem Restbier stark angereichert - bildet eine heterogene Proteingruppe modifizierter Abkömmlinge des Proteins Z, ebenfalls aus der Albuminfraktion der Gerste. Ihre Wirkung liegt in der Schaumstabilisierung¹.

Von Lipotransferproteinen wurde früher fälschlicherweise angenommen, dass sie in vivo als integrale Membranproteine in Pflanzenzellwänden verankert sind². Die Proteine besitzen jedoch eine N-terminale Aminosäuresequenz, die ihre extrazelluläre Bestimmung festlegt. Unter dem Einfluss biotischer und abiotischer Stressfaktoren produziert die Pflanze diese Proteine verstärkt. Sie sind vermutlich ein Faktor im pflanzlichen Abwehrsystem, dessen Bedeutung bisher noch unklar ist. Sie haben im nativen Zustand eine lipophile Tasche, in die z. B. Phospholipide eingelagert werden können.

Lipotransferproteine besitzen ein Molekulargewicht zwischen 9 und 16 kDa³. Die Aminosäuresequenzen der LTPs verschiedener Pflanzenarten sind sehr

¹ VOIGT, J.: Diss. TU München 1988

² YAMAHA, M.: In: Plant Cell Physiol. **33** (1992), 1-6

³ SØRENSEN, S.B. et al. : Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas **30/4** (1993), 136-145

unterschiedlich. Es kann jedoch in Bezug auf die Cysteinverteilung im Molekül ein spezifisches schematisches Muster ausgemacht werden:

$X_3-C-X_9-C-X_{12-15}-C-C-X_{19}-C-X-C-X_{23-25}-C-X_{13}-C-X_{2-4}$, wobei C Cystein und X jede andere Aminosäure darstellt. Dies führt zu kongruenten tertiären Proteinstrukturen und letztendlich zu vergleichbaren Hydrophobizitätsmustern: Das physikalisch-chemische Verhalten verschiedenster Lipotransferproteine gestaltet sich damit sehr ähnlich¹.

In Gerstenmalz, Würze und Bier kommen LTPs in modifizierter Form vor: Die vier vorhandenen Lysinreste sind in unterschiedlichem Grad glykosiliert¹. Die Glykosilierung hat eine größere Wasserlöslichkeit zur Folge. Außerdem werden in nativem Zustand im Molekülinnern begrabene, hydrophobe Bereiche, die die lipophile Tasche ausmachen, durch teilweise Spaltung der Cystinbrücken nach außen gekehrt. Die denaturierten Proteine verhalten sich grenzflächenaktiv und sind schaumaktiv. Native LTPs hingegen zeigen kaum Schaumaktivität^{2,3}. Modifizierte LTPs machen ca. 50 % der Schaumproteine in Bier aus. Der Modifikationsgrad wurde vom Getreide bis zum Bier hin verfolgt und nimmt proportional zum Schaumbildungs-Potenzial zu². Weizenmalz wurde bislang nicht untersucht. Es ist aber davon auszugehen, dass dort ähnliche Verhältnisse vorliegen.

Wie oben dargestellt, kommen Lipotransferproteine sowohl in gushenden als auch in nicht gushenden Bieren in hohen Konzentrationen vor. Sollten Lipotransferproteine das Gushingpotenzial eines Bieres beeinflussen, so wären sie als Promotoren denkbar. Möglicherweise treten diese Proteine dann in höherer Konzentration auf als in nicht gushendem Bier oder sind in von normalen Bieren abweichender Weise modifiziert.

3.7.2 Hydrophobine

Während der Bearbeitung dieser Problemstellung wurden auf dem EBC-Kongress in Budapest von einer finnischen Forschergruppe Hydrophobine als primärgushing-

¹ JÉGOU, S. et al.: In: J. Agric. Food Chem. **48** (2000), 5023-5029

² DIDIER, M. et al.: Proc. EBC Congr. – Budapest (2001) **67**, 631-639

³ SUBIRADE, M. et al.: In: J. Biophys. **69** (1995), 974-988

auslösende Substanzklasse vorgestellt¹. Diese Proteinklasse wird unter anderem von filamentösen Pilzen gebildet, die als submerse Kulturen Hydrophobine ins Nährsubstrat ausscheiden. Hydrophobine sind in nativer Form globuläre Proteine. Die Monomere sind wasserlöslich und hitzestabil. Sie sind aus nur 100 +/- 25 Aminosäuren aufgebaut², besitzen daher ein verhältnismäßig niedriges Molekulargewicht von 7-25 kDa und lassen sich durch folgende Gemeinsamkeiten im schematischen Aufbau beschreiben (Aufbau ähnelt stark den Lipotransferproteinen): X₈₋₂₃-C-X₅₋₉-C-C-X₁₁₋₃₉-C-X₈₋₂₃-C-X₅₋₉-C-C-X₆₋₁₈-C-X₂₋₁₃, wobei C Cystein und X jede beliebige andere Aminosäure darstellt. Dadurch haben verschiedene Hydrophobine ein gemeinsames Hydrophobizitätsmuster trotz des extrem geringen Homologiegrades der Aminosäuresequenz (< ca. 40 - 50%)³. Insgesamt produzieren ca. 1,5 Millionen Pilzarten schätzungsweise mehrere Millionen verschiedene Hydrophobintypen. Eine Pilzart kann bis zu 6 unterschiedliche Hydrophobintypen synthetisieren³. Die Moleküle verfügen über hydrophile und hydrophobe Bereiche, wobei letztere im nativen Zustand ins Molekülinnere gerichtet sind. Bei Grenzflächenkontakt werden die hydrophoben Bereiche nach außen gekehrt, sodass das Molekül sich amphiphil verhält. Die nun denaturierten Hydrophobine sammeln sich an Grenzflächen und aggregieren spontan zu sehr stabilen, monomolekularen Membranen ohne Ausbildung kovalenter Bindungen. Die Membranen erreichen einen hohen Ordnungsgrad. Die licht-reflektierende Filmschicht erweist sich unter dem Auflichtmikroskop als stäbchenförmige, röhrenartige Struktur; die Röhren sind parallel im Abstand von je 5-12 nm angeordnet⁴.

Die Funktion der Hydrophobine in vivo ist ein neues Forschungsgebiet und noch nicht vollständig geklärt. Hyphen filamentöser Pilze besitzen keine mechanischen Stützelemente. Submerse Kulturen können folglich die Grenzflächenspannung zwischen wässrigem Nährsubstrat und Luft nicht überwinden. Deshalb bedienen sich diese labilen Hyphen amphiphiler Hydrophobin-Polymerenfilme, um Luftmyzel ausbilden zu können⁵. Dabei reduzieren die Hydrophobine die Oberflächenspannung von Wasser⁶ (72 mNm⁻¹) auf etwa 24 mNm⁻¹.

¹ KLEEMOLA, T. et al.: Proc. EBC Congr. – Budapest (2001) **12**, 129-138

² KERSHAW et al.: In: Fungal Genet. Biol. **23** (1998), 18-33

³ WESSELS, J.G.H.: In: Advances in Microbial Physiology **38** (1997), 1-45

⁴ WÖSTEN, H.A.B.: In: Annu. Rev. Microbiol. 2001, 625-633

⁵ DE VRIES et al.: In: Arch. Microbiol. **159** (1993), 330-335

⁶ WÖSTEN, H.A.B. et al.: In: The Plant Cell, Am. Soc. Plant Physiol. **5** (1993), 1567-1574

Weitere Aufgaben erfüllen die Hydrophobine z.B. als Schutz vor bakteriellen Infektionen, als Hilfsmittel zur Anheftung an hydrophobe Blatt-Oberflächen bei der Infektion von Pflanzen u.v.a.¹.

Hydrophobine wurden bisher unter anderem von *Fusarium poae*, *Nigrospora spp.* und von *Trichoderma reesei* isoliert. Die Hydrophobine von *Schizophyllum commune*, einem Basidiomyceten, sind am besten untersucht. Man unterscheidet zwei Klassen: Klasse I – Hydrophobine werden von Asco- und Basidiomyceten produziert und kommen sehr häufig vor. Sie neigen stark zur spontaner Selbstaggregation. Die Polymerfilme sind extrem schwer löslich (unlöslich in heißer 2%-iger SDS-Lösung) und auch unter Druck sehr stabil.

Klasse II – Hydrophobine werden von Ascomyceten gebildet und sind ebenfalls weit verbreitet. Die Monomere besitzen einen höheren Homologiegrad als die Hydrophobine der Klasse I. Sie aggregieren nur an Pilzhyphen spontan, und ihre monomolekularen Filme sind unter besonderen Bedingungen instabil (unter Druck, bei Kälte, in 2%-SDS-Lösung, in 60%-igem Ethanol)².

Das Löslichkeitsverhalten der Protein-Polymerfilme ist sehr ungewöhnlich: In der klassischen Proteinchemie war bisher kein Proteintyp mit einem derartigen Aggregationsverhalten bekannt: Aggregate wie die Hydrophobine der Klasse I, die selbst in heißer 2%-iger SDS-Lösung nicht löslich sind. Klasse I - Hydrophobine lassen sich nach Aggregation nur durch Behandlung mit Trifluoressigsäure unter kompletter Entfaltung des Proteins wieder als wasserlösliche Monomere gewinnen. Nach Entfernen der Trifluoressigsäure und Lösen in Wasser bilden sie wieder ihre native globuläre Tertiärstruktur aus und sind erneut aggregierbar. Eine weitere Möglichkeit, Hydrophobine nach Polymerisierung wieder in wasserlösliche Monomere zu verwandeln, bietet die Oxidation der Cystin- bzw. Cysteinreste zu Sulfonsäuren mit Hilfe von Perameisensäure. Diese Derivatisierung ist dann irreversibel.

Die beschriebenen Eigenschaften der Hydrophobine führten dazu, dass diese trotz weiter Verbreitung in hohen Konzentrationen erst sehr spät entdeckt wurden. Erst die zugehörige mRNA in der Pilzzelle fiel auf, da das entsprechende Gen unter

¹ TALBOT, N.J.: In: The Mycota VIII- Biology of the Fungal Cell, Springer Verlag Berlin 2001, 145-159

² KERSHAW et. al.: In: Fungal Genet. Biol. **23** (1998), 18-33

bestimmten Kulturbedingungen extrem stark exprimiert wird. So konnten schließlich Hydrophobin-Monomere von *Fusarium poae* in vitro hergestellt werden. Die finnischen Entdecker der Gushing-Relevanz dieser Proteine entwickelten für Hydrophobine einen immunchemischen Nachweis. Damit sollen sie in Malzen nachweisbar sein¹.

Bisher ist es jedoch weltweit noch niemandem gelungen, Hydrophobine aus Fusarien-befallenen Matrices zu isolieren. Isolationen sind bisher ausschließlich aus Fusarienkulturen möglich, am besten aber gentechnisch.

Die finnische Entdeckergruppe konnte nachweisen, dass die Zugabe von 1 µg der nativen Reinst-Hydrophobine von *Fusarium poae* zu 330 ml Bier bzw. zu 330 ml Wasser im Laborversuch wiederholt Gushing auszulösen vermochte.

Die Neigung zur Selbstaggregation und die Ausbildung stabiler Filme bei Klasse II - Hydrophobinen könnten die Gushing-Initiierung in Bier erklären: Sie bilden in ausreichender Konzentration Mizellen aus, die in der geschlossenen Flasche CO₂-Cluster stabilisieren können. Unter den gegebenen Druckverhältnissen einer ungeöffneten Flasche mit Bier dürften die Hydrophobin-Filme gasundurchlässig sein, während diese Mizellen nach Druckentlastung beim Öffnen der Flasche als Entbindungskeime dienen könnten². Klasse I-Hydrophobine hingegen bilden zwar noch stabilere Membranen aus. Diese sind jedoch porenreich, sodass höchstwahrscheinlich unter den biergegebenen Verhältnissen Gasbläschen nicht stabilisiert werden können.

Warum aber führen nur bestimmte Fusarienarten zu Gushing, obwohl alle Arten dieser Gattung großzügig Hydrophobine produzieren? Die finnische Forschergruppe entwickelte einen ELISA-Test für Hydrophobine von *Fusarium poae*. Diese Hydrophobine wurden Bier zugegeben - und führten zu Gushing, obwohl *Fusarium poae* nicht zu den zu Gushing führenden Fusarienarten zählt.

Noch ist unklar, wieviele der Millionen Hydrophobintypen der immunchemische Test mit Antiseren gegen *Fusarium poae* erfasst und inwieweit die nachweisbaren Hydrophobine eine Gushingaktivität widerspiegeln (vgl. regionales Problem, Kap.3.3.).

¹ KLEEMOLA, T. et al.: Proc. EBC Congr. – Budapest (2001) **12**, 129-138

² PELLAUD, J.: In Interbrew Technology Development, Leuven Belgium (2002)

3.7.3 Polare Lipide

Polare und damit grenzflächenaktive Lipide können sehr unterschiedlich aufgebaut sein: In der Natur kommen verseifbare und unverseifbare, polare Lipide vor. Den Lipiden werden lipophile Grundgerüste mit kovalent gebundenen, geladenen oder polaren Gruppen zugerechnet, die von fettlöslichen Phyto-/Mykohormonen über fettlösliche Vitamine bis hin zu Isoprenoiden reichen¹. In der Natur kommen außerdem Glykolipide und Lipoproteine vor, wodurch die Vielfalt an polaren Lipiden weiter ausgebaut wird.

Zepf² führte mit einigen Vertretern aus der großen Vielfalt der polaren Lipide Versuche auf Gushingaktivität durch: Hierbei zeigte sich, dass freie Fettsäuren vorhandenes Gushingpotenzial dämpfen, während bei gebundenen Fettsäuren Kettenlänge und Sättigungsgrad eine große Rolle spielt. Lipide - verestert mit kurzkettigen und ungesättigten Fettsäuren - unterbinden vorhandenes Gushing-Potenzial, während Lipide - verestert mit langkettigen und gesättigten Fettsäuren - zum Überschäumen beitragen bzw. in carbonisiertem Wasser sogar Gushing auslösen.

In der Literatur wird im Zusammenhang mit Hydrophobinen erwähnt, dass diese stets mit Lipiden vergesellschaftet sind. Da diese Lipide jedoch die bereits von den Hydrophobinen reduzierte Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Luft nicht weiter senken, wurden sie ohne weitere Untersuchung außer Acht gelassen³.

Abschließend war zu klären, wie und warum *Geotrichum candidum*⁴, der sogenannten Milchschiimmel, Gushing unterdrückt: Wird Fusarien-belastetes Getreide während der Vermälzung mit *Geotrichum candidum* inokuliert, so nimmt die Gushingneigung eines aus dem Malz hergestellten Bieres gegenüber unbehandelt vermälztem Material ab. Zur Erklärung dieses Phänomens gibt es zwei Ansätze:

- Der zugesetzte Schimmelpilz verhindert weiteres Fusarienwachstum während des Vermälzens, indem er die Konkurrenten verdrängt

¹ BELITZ, H.D.: GROSCH, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag 1987, 130-131

² ZEPF, M.: Diss. TU München, 1998

³ WÖSTEN, H.A.B.: In: The Plant Cell, Am. Soc. Plant Physiol. **5** (1993), 1567-1574

⁴ FIRMENSCHRIFT: Improvement of Malt Quality by Bio-Protection: Use of *Geotrichum candidum*, Degussa, Düsseldorf

- *Geotrichum candidum* produziert Gushing-Inhibitoren, die den von den Fusarien produzierten, gushing-aktiven Substanzen entgegenwirken.

Gut vorstellbar wären als Gushing-Inhibitoren wiederum gushing-relevante polare Lipide. Deshalb sollten in dieser Arbeit auch die Lipide von *Geotrichum candidum* untersucht werden.

3.7.4 Cyclodextrine

Cyclodextrine, auch Schardinger Dextrine genannt, setzen sich aus D(+)-Glucopyranose-Einheiten zusammen, die über α -1,4-Bindungen unverzweigt verknüpft sind. Das Molekulargewicht liegt durchschnittlich bei etwa 1000 Da. Sie werden, wie bereits in Kapitel 3.4 erwähnt, von *Paenibacillus macerans* aus Stärke und deren Abbauprodukten gebildet. Der vorangestellte griechische Buchstabe beschreibt die Anzahl der Glucose-Einheiten im Ring: α - für 6, β - für 7, γ - für 8 und so weiter. Cyclodextrine sind hitzestabil bis 200°C, α -Cyclodextrin ist amylaseresistent und β -Cyclodextrin wird nur sehr langsam abgebaut. Cyclodextrine können mit einigen kleinen organischen Molekülen zyklische Einschluss-Verbindungen eingehen, die auch „Wirt-Gast“-Beziehungen genannt werden. Gut bekannt sind Cyclodextrine in der Lebensmitteltechnologie, wo sie z.B. als Aromaträger eingesetzt werden. Die einfachen, stöchiometrisch zusammengesetzten Komplexe sind sehr gut wasserlöslich und stabil bei pH > 3,0¹. In Bezug auf Gushing ist interessant, dass zu den komplexierbaren Molekülen auch Kohlendioxid zählt. Derartige Komplexe könnten nach Druckentlastung als Entbindungskeime dienen.

3.8 Zielsetzung

Verdächtige Substanzen waren in verschiedenen Matrices mit und ohne Gushingpotenzial zu vergleichen. Zu untersuchen waren Metabolite aus dem primären und dem sekundären Stoffwechsel sowie pflanzliche Zersetzungsüberreste

¹ BENDER, M.L.: Cyclodextrin Chemistry 6, Springer-Verlag New York 1978, 1-2

von Gushing verursachenden Fusarien sowie von Fusarien, die kein Gushing auslösen.

Viele Unklarheiten und Widersprüche hinsichtlich der potenziellen Gushing-Verursacher verlangten Untersuchungen, die das ganze Spektrum an potenziell gushingrelevanten Stoffen abdecken.

Eine große Schwierigkeit in der Gushingforschung ist das kaum ausreichend vorhandene Untersuchungsmaterial. Da die Ermittlung der Gushingneigung von Malzen aus professionellen Mälzereien inklusive Versand von Probe und Ergebnis mit einer geraumen Zeitverzögerung verbunden ist, waren gushingaktive Malzchargen allzu oft schon mit anderen verschnitten worden. Noch länger dauerte die Untersuchung der Gushing-Ursache: Waren primäre oder / und sekundäre Gushing-Faktoren im Spiel?

Um Material-Engpässe zu vermeiden und trotzdem ohne langwierige eigene Feldversuche auszukommen, sollte außer den naheliegenden Untersuchungsmaterialien (Malz, Würze, Bier und Fusarienkulturen) das Modellsystem Fusarien-inokulierter Treber herangezogen werden. Heisswasserauszüge aus Fusarien-infiziertem Gerstenmalztreber (nur Inokulationen mit zu Gushing führenden Fusarien) zeigen nach Carbonisierung reproduzierbar Gushing (vgl. Kap. 3.5). Das Modell Heisswasserauszug aus Fusarien-infiziertem Treber hat den weiteren Vorteil, dass im Vergleich zu Würze und untergärigem Bier die gelösten Substanzen weniger komplex zusammengesetzt sind und das Überschäumen monokausal auf primäre Gushing-Ursachen zurückzuführen ist. Gruppen- und strukturanalytische Untersuchungen sind damit einfacher und aussagekräftiger.

Da Praxisbiere grundsätzlich aus verschnittenen Malzchargen gebraut werden, war es unmöglich, ein gushendes Bier mit ausschließlich primären Ursachen aufzufindig zu machen. Deshalb sollte ein eindeutig primär gushendes Malz (umfassende Voruntersuchungen vorausgesetzt) unter Anwendung aller etablierten Präventiv-Maßnahmen gegen sekundäres Gushing gebraut werden. Nur so waren primäre Gushing-Ursachen bei diesem Bier garantiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Fusarienkulturen in mineralischem Minimalmedium mit C-Quelle

Die Fusarienkulturen in mineralischem Minimalmedium nach Nirenberg¹ wurden herangezogen, um Fusarien-Stoffwechselprodukte separat von pflanzlichem Material untersuchen zu können.

Für die Herstellung gushing-positiver Proben wurden *F. culmorum*, *F. graminearum*, teilweise *F. avenaceum*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichoides* und *F. equiseti* ausgewählt. *F. tricinctum*, *F. oxysporum* und *F. poae* sollten das gushing-negative Vergleichsmaterial liefern (vgl. Tabelle 1, Kap.3.5). Da Treber-Heisswasserauszüge aus von *F. oxysporum* inokulierten Materialien aber nicht konstant gushing-stabil waren (s. Kap.4.2.2), wurde schließlich nur noch mit *F. tricinctum* und *F. poae* als negative Vergleichsproben gearbeitet.

Die Fusarienkulturen wurden ohne Zellaufschluss filtriert, sodass das unlösliche Myzel von den in wässriger Lösung befindlichen Stoffwechselprodukte der Fusarien getrennt wurde.

Ergänzend wurden auch Kulturen von *Paenibacillus macerans* untersucht.

¹ NIRENBERG, H.I.: In: Can. J. Bot. **59** (1981), 1599-1609

4.1.1 Gushingneigung

Die Fusarienkulturen in synthetischem, nährstoffarmem Flüssigmedium nach Nirenberg (SNA Synthetischer nährstoffarmer Agar – ohne Agar für Flüssigkulturen) in flachen Gefäßen mit großer Oberfläche wurden nach der Wachstumsphase filtriert und das Filtrat auf die Gushingneigung geprüft:

Tabelle 2: **Gushing-Neigung von Fusarienstoffwechselprodukten**

	Fusarienart			
Gushing-Neigung	<i>F. tricinctum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>
Ø ÜSV aus n = 10 Flaschen	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml

Oben angeführte Zahlenwerte bestätigen die Ergebnisse von Zepf: Fusarien ohne Getreide oder ein Getreideprodukt als Nährsubstrat verursachen kein Gushing¹. Hierbei ist jedoch unklar, ob es sich um Mizellbausteine wie amphiphile Proteine oder Lipide handelt. Auch andere gelöste organische Stoffe üben einen stabilisierenden Effekt auf die Mizellen aus, indem sie die Viskosität der Flüssigkeit erhöhen oder indem sie sich quasi als Schutzschicht an die Mizellen anlagern.

Dem entgegen stehen die Resultate der finnischen Forschergruppe, dass Hydrophobine in einer Konzentration von 3 µg/l carbonisiertes Wasser zum Überschäumen bringen. Die Versuche in Kapitel 4.1.6 beweisen die Anwesenheit von Hydrophobinen in den Fusarienkulturen. Möglicherweise lag die Konzentration der Gushing-Initiatoren unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration.

Für Versuche mit *Paenibacillus macerans* wurden die Kultivierungsbedingungen angepasst, wie in Kap.7.4 vermerkt. *Paenibacillus macerans* ließ sich aber auch unter den in der Literatur angegebenen speziellen Bedingungen nicht ausreichend kultivieren. Die Versuche wurden deshalb mit Würze als Nährmedium durchgeführt (siehe Kapitel 4.5.2).

¹ ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

4.1.2 Trennung der extrazellulären Fusarienproteine nach dem isoelektrischen Punkt

Zunächst wurden aus den filtrierten (vgl. Kap. 7.6.5) Kulturmedien verschiedener Fusarien die ausgeschiedenen Proteine untersucht. Die Hoffnung war, dass neben diversen Exo-Enzymen Hydrophobin-Monomere oder andere gushing-relevante Proteine erkennbar sein könnten. Die isoelektrische Fokussierung (Abb.1) war zweifelsohne vielversprechend: Wenige deutliche Banden, insbesondere im sauren

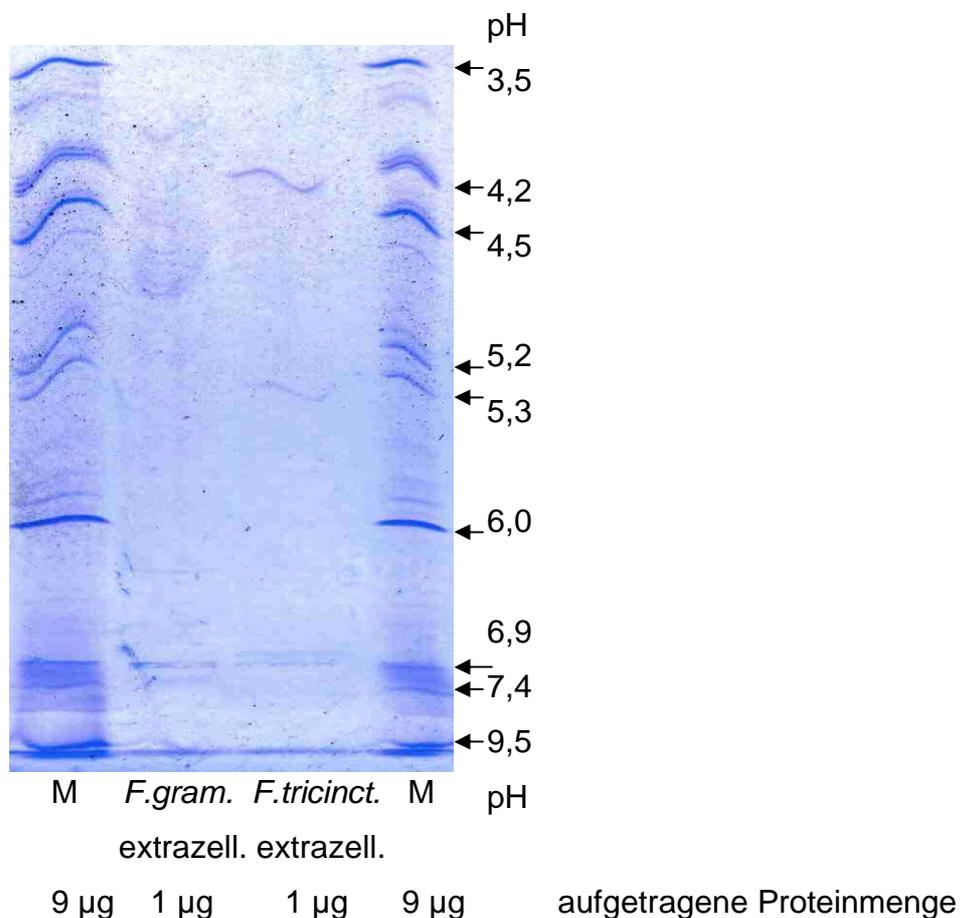


Abbildung 1: **Native Isoelektrische Fokussierung (IEF) extrazellulärer Fusarienproteine**

Zehnfache Proteinkonzentrierung durch Ultrazentrifugation
 pH-Gradient im Gel: 3-10 ohne Spreizung; Probenauftrag: 15 µl

pH-Bereich kamen zum Vorschein. Das zu Gushing führende *F. graminearum* zeigt einige Banden mehr im sauren pH-Bereich als das gushing-irrelevante *F. tricinctum*. Da Hydrophobine einen sauren isoelektrischen Punkt und ein molekulares Gewicht von etwa 10 kDa besitzen sollen, war eine Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht naheliegend.

4.1.3 Trennung der extrazellulären Fusarienproteine nach dem Molekulargewicht

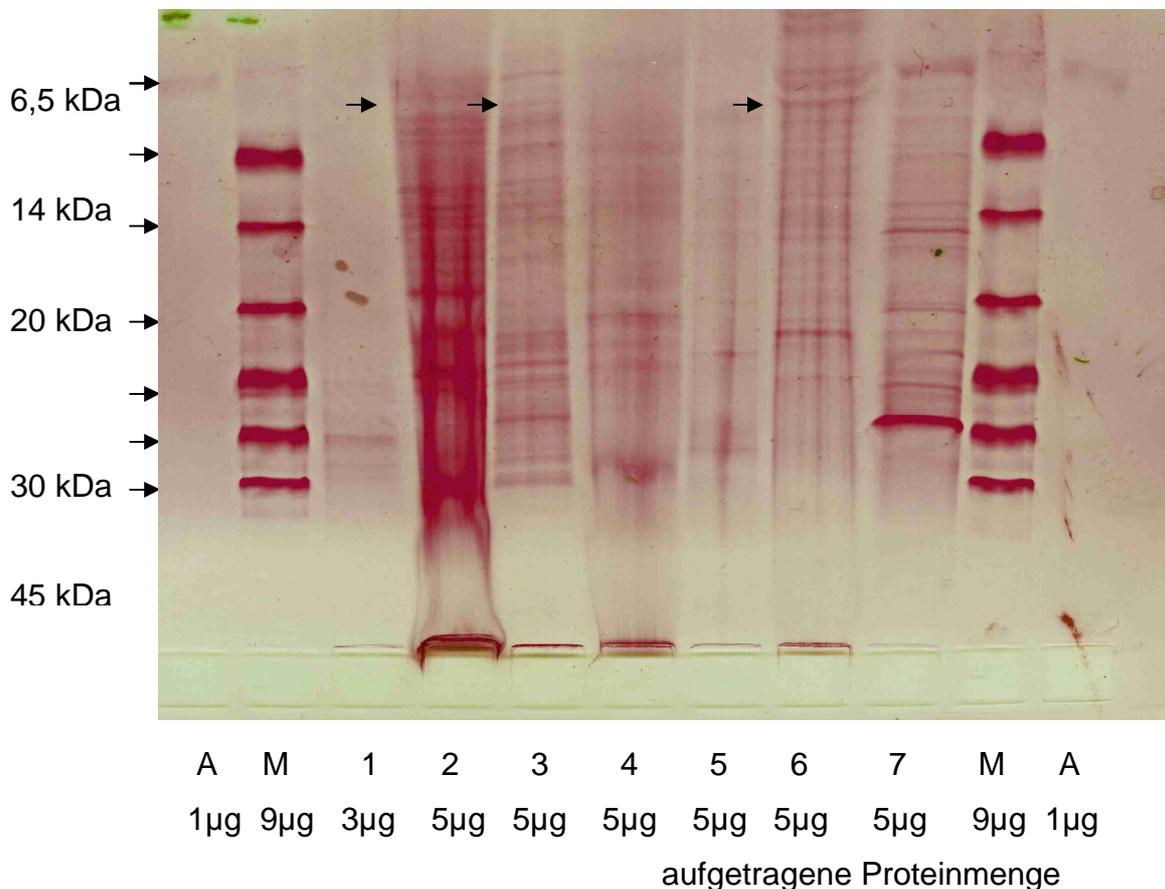


Abbildung 2: **Molekulargewichtstrennung extrazellulärer Fusarienproteine**

Zehnfache Proteinkonzentrierung durch Ultrazentrifugation

Gel: T = 15,0 %; C = 2 %

A: Aprotinin (MG 6,5 kDa)

M: Marker

1: *F. poae*

2 und 7: *F. culmorum*

3 und 5: *F. tricinctum*

4 und 6: *F. graminearum*

Die untersuchten Fusarienarten zeigten extrazelluläre Proteine über das gesamte untersuchte Spektrum molekularer Massen. Es ließen sich jedoch keine Gemeinsamkeiten unter den zu Gushing führenden Fusarien finden, die nicht zu Gushing führende Fusarien nicht teilten.

Mit den Methoden der klassischen Proteinchemie gelang es nicht, in Fusarien-Kulturen gushing-verdächtige Proteine aufzuspüren: Physikalisch-chemische Eigenschaften wie die der Hydrophobine vereiteln die Anreicherung und Trennung nach herkömmlichen proteinchemischen Methoden. Weiterhin könnten sich eventuell vorhandene Gushing-Faktoren aufgrund ihrer geringen Konzentration einem Nachweis entziehen.

4.1.4 Hydrophilisierung von hydrophoben Materialien

Die Hydrophilisierung hydrophober Materialien durch amphiphile Substanzen erfolgt durch die Ausbildung eines monomolekularen Films an der Grenzfläche zwischen der wässrigen Phase des Mediums und dem hydrophoben Material. Die Menge der pilzproduzierten, amphiphiler Substanzen kann anhand der Hydrophilisierung hydrophober Materialien unter verschiedenen Fusarien relativ abgeschätzt werden. Dazu wurde als Adsorptionsmaterial mit hydrophober Oberfläche Parafilm® verwendet, welcher günstige physikalisch-chemische Eigenschaften besitzt. In den vorliegenden Fusarienkulturen dürften Hydrophobine die dominierende amphiphile Substanzklasse sein. Hydrophobine werden von Parafilm adsorbiert und bleiben beim anschließenden Waschgang haften, da die entstandenen Filme wasserunlöslich sind.

Tabelle 3: **Physikalisch-chemische Eigenschaften von Parafilm®**¹

Physikalische-chemische Eigenschaften	
Toxizität	nicht giftig
Schmelztemperatur	60°C
Flammpunkt	301°C
Chemikalienbeständigkeit	hoch
Chemische Zusammensetzung	hauptsächlich Polyolefine und Paraffinwachse

Bei der Auswaage des Haftwassers entsprach eine große Menge an Haftwasser einem hohen Hydrophilisierungspotenzial, denn am ursprünglichen Material perlte Wasser fast rückstandslos ab (vgl. Kontrolle).

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden zunächst zwei Medien miteinander verglichen: Das rein mineralische SNA-Medium nach Nirenberg ohne Agar und ein etwas reichhaltigeres Flüssigmedium nach Dons.

¹ FIRMENSCHRIFT: Physikalische Daten von Parafilm® M. BRAND GMBH & CO KG, Wi, USA

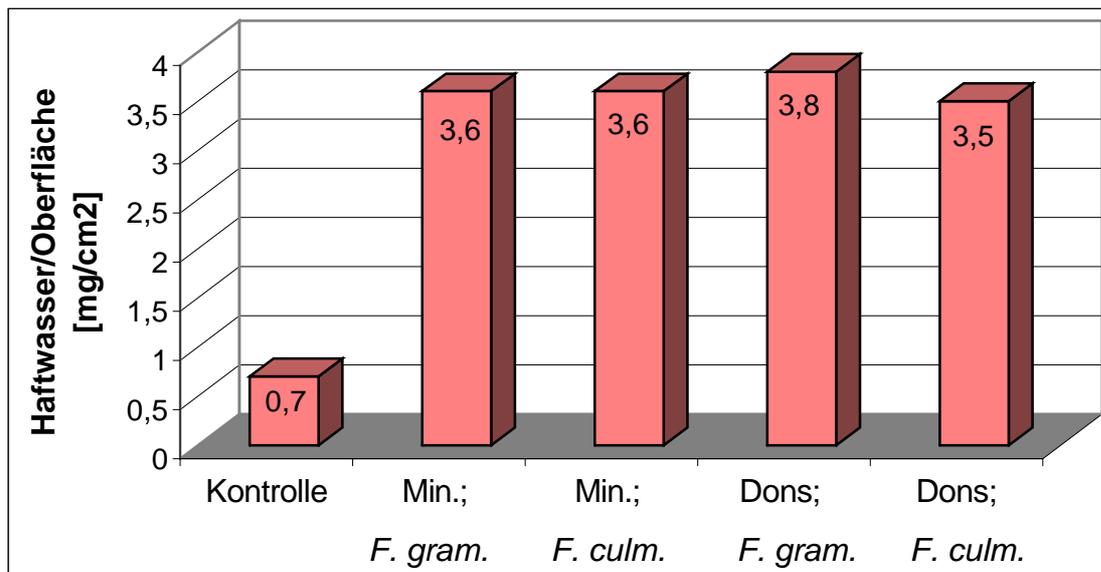


Abbildung 3: **Hydrophilisierungspotenziale – zwei Nährmedien im Vergleich**

Min.: Synthetischer nährstoffarmer Agar nach Nirenberg¹ (1981) ohne Agar
 Dons: Medium nach Dons et al.²

Alle Proben zeigten nach Abzug der Kontrollauswaage positive Werte. Das heisst, alle untersuchten Fusarien produzieren wasserunlösliche, grenzflächenaktive Filme. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um Hydrophobine.

Die Haftwasser-Auswaage nach der Verwendung des Mediums nach Dons unterschied sich nur unwesentlich von der Auswaage nach Verwendung des synthetischen nährstoffarmen Mediums nach Nirenberg. Für weitere Untersuchungen wurde das synthetische Medium bevorzugt benutzt, weil so keinerlei Fusarien-fremde Proteine oder Lipide ins System gelangten.

¹ NIRENBERG, H.I.: In: Can. J. Bot. **59** (1981), 1599-1609

² DONS, J.J.M. et al.: In: Biochim. Biophys. Acta, Elsevier Holland **563** (1979), 100-112

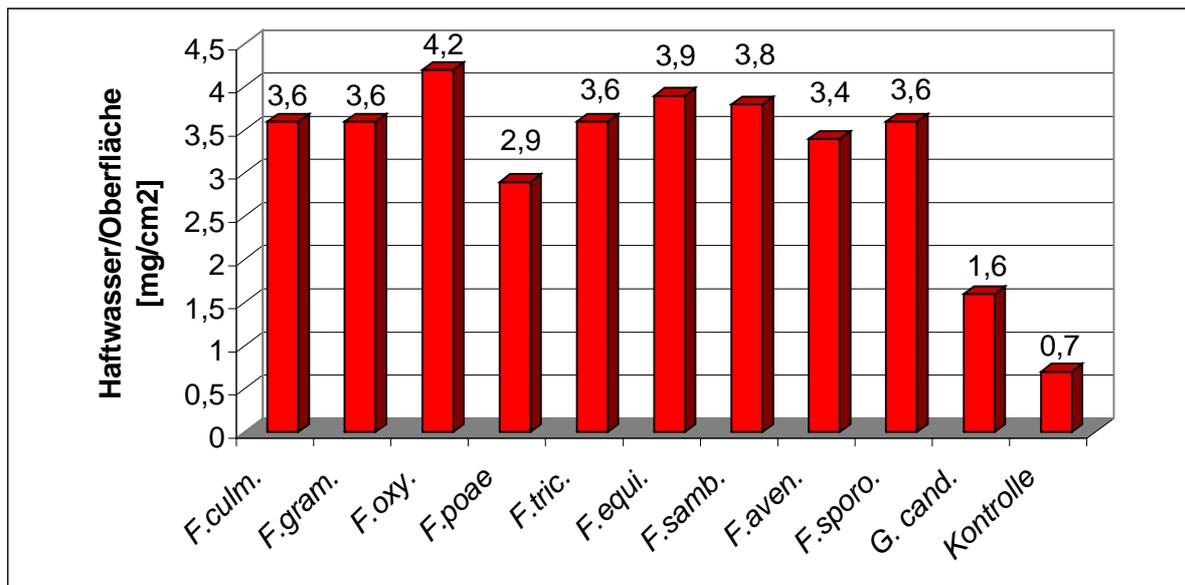


Abbildung 4: **Hydrophilisierungspotenziale einiger Fusarienarten**

Die angegebenen Werte stellen den Durchschnitt aus jeweils drei Ansätzen mit sehr geringen Abweichungen dar.

Min.: Synthetischer nährstoffarmer Agar nach Nirenberg¹ (1981) ohne Agar

Alle untersuchten Fusarienarten zeigten ähnliche Hydrophilisierungspotenziale. Hier war die Einteilung in zu Gushing führende und nicht zu Gushing führende Fusarien nicht nachvollziehbar.

Geotrichum candidum zeigte ein geringes Hydrophilisierungspotenzial.

¹ NIRENBERG, H.I.: In: Can. J. Bot. **59** (1981), 1599-1609

4.1.5 Fusarienlipide

4.1.5.1 Dünnschichtchromatographie

Aus den Fusarienkulturen nach Kap.7.6.5 wurde das extrazelluläre Material gefriergetrocknet. Daraus wurden die polaren Lipide extrahiert und auf einer Kieselgelplatte in einem geeigneten Lösungsmittelsystem aufgetrennt.

Extraktionsmethode und Trennsystem waren ganz auf polare Lipide ausgerichtet, da unpolare Fusarienlipide nicht grenzflächenaktiv sind. Da unpolare Lipide nicht ins Bier gelangen, sondern sukzessive mit dem Treber, Heisstrub oder Kühltrub entfernt werden bzw. an der Hefe haften bleiben oder beim Filtrieren zurückgehalten werden, sind sie ohnehin gushing-irrelevant.

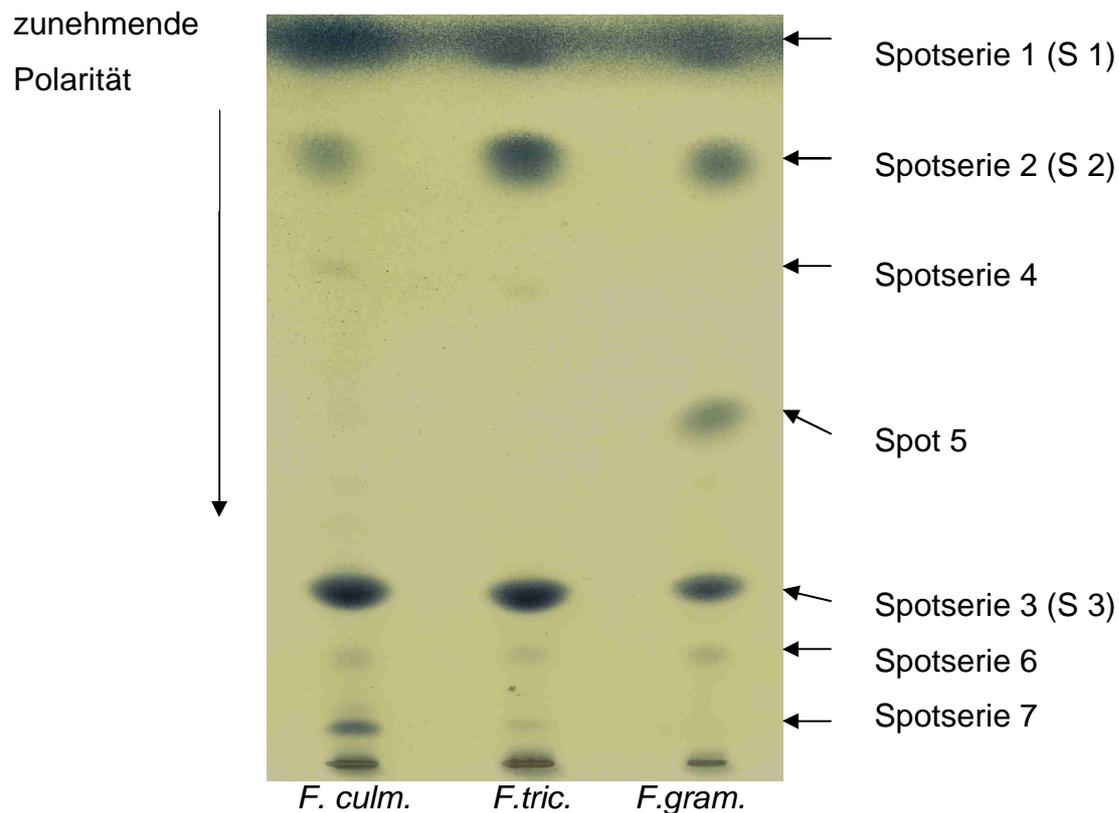


Abbildung 5: **Dünnschichtchromatographische Trennung von Fusarienlipiden**

Polare Lipide extrahiert mit Dichlormethan : Methanol (2:1) aus 400 ml Fusarienkulturfiltrat nach Gefrier Trocknung

Alle untersuchten Fusarien zeigten in diesem dünnschichtchromatographischen System drei gleiche Lipidspots (Spotserie 1, 2 und 3): Das bedeutet, dass die

Fusarien Lipide mit vergleichbarem Polaritätsgrad produzieren, nicht aber, dass die Lipide identisch sein müssen. Vergleichbaren Polaritätsgrad besitzen z.B. Lipide mit ähnlichem Aufbau wie z.B. Monoglyceride, die aus Glycerin mit einer veresterten Fettsäure und zwei freien Hydroxylgruppen bestehen. Die genaue Struktur der Fettsäure ist für die Polarität weitgehend irrelevant (innerhalb des Spektrums häufig vorkommender Fettsäuren in Schimmelpilzen).

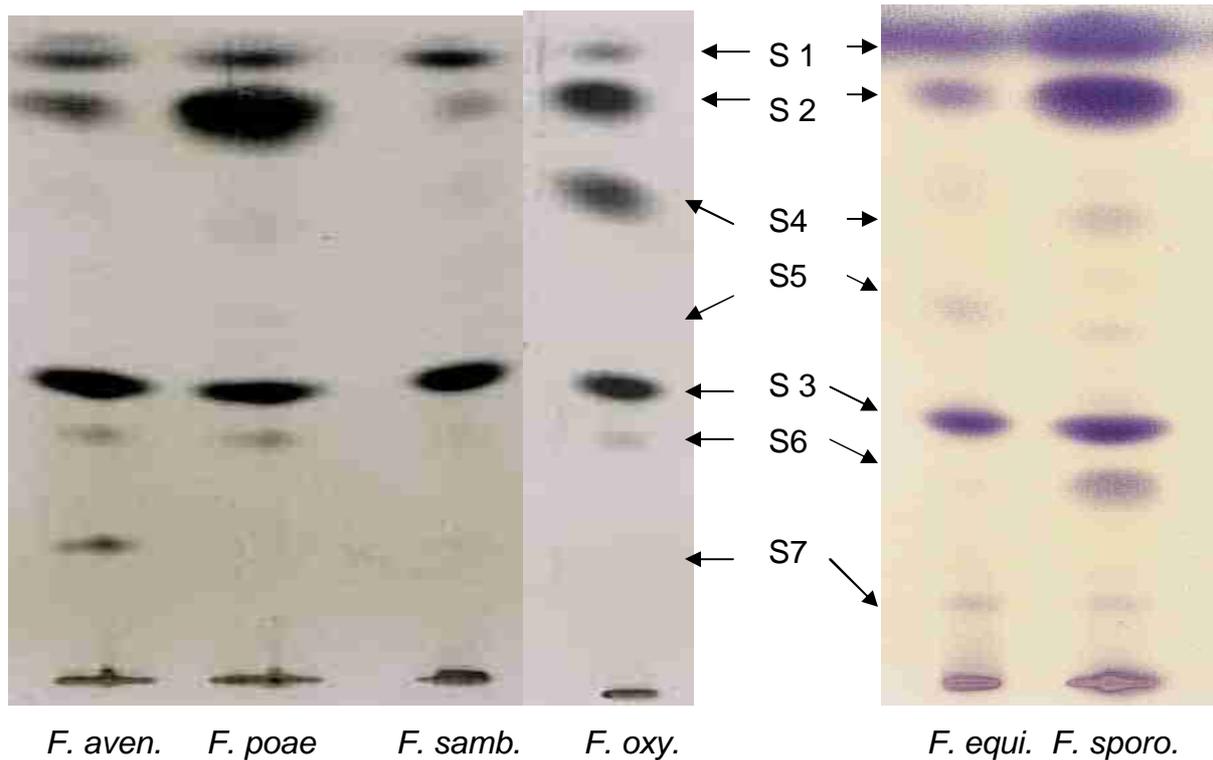


Abbildung 6: **Dünnschichtchromatographische Trennung von Fusarienlipiden**

Polare Lipide extrahiert mit Dichlormethan : Methanol (2:1) aus 400 ml Fusarienkulturfiltrat nach Gefriertrocknung

Manche Fusarien zeigten verschiedentliche zusätzliche Spots. Es konnte jedoch kein Spot gefunden werden, der nur allen zu Gushing führenden Fusarien oder allen nicht zu Gushing führenden Fusarien gemeinsam war.

Die densitometrische Auswertung der Fusarienlipid-Chromatogramme brachte zwar gewisse Abweichungen zwischen den Lipidspektren der untersuchten Fusarienarten ans Licht. Allerdings gab es auch hier keine Auffälligkeiten von zu Gushing führenden Fusarienarten gegenüber den nicht zu Gushing führenden Arten. Hier wird jeweils nur ein Beispiel der beiden Fusariengruppen dargestellt; die übrigen Diagramme befinden sich im Anhang.

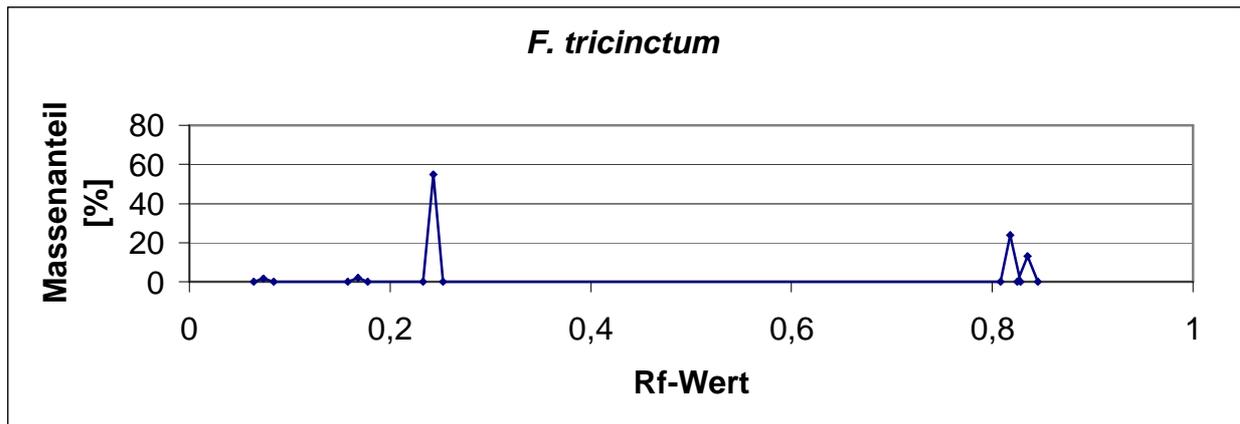


Abbildung 7: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie** polaren Lipiden einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart

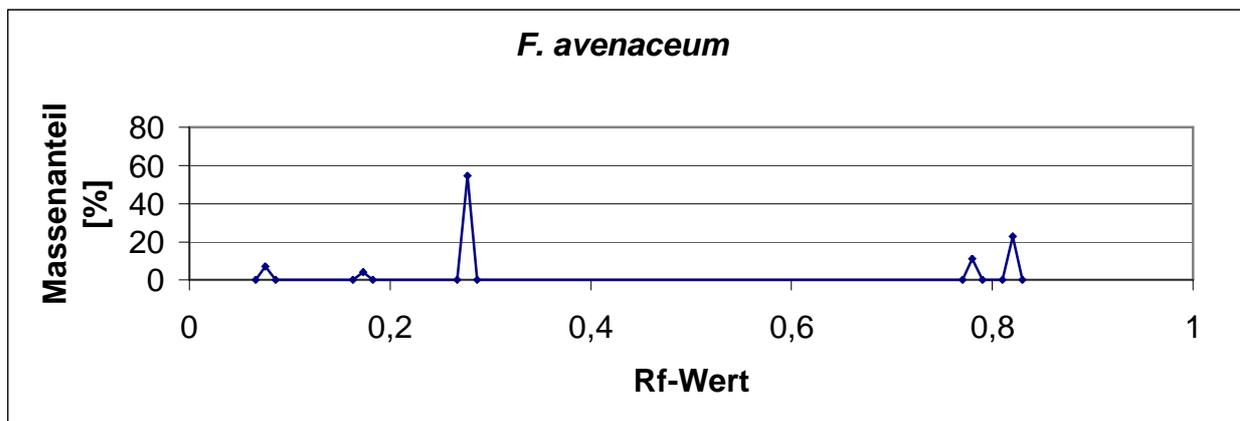


Abbildung 8: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie** polaren Lipiden einer zu Gushing führenden Fusarienart

4.1.5.2 Gaschromatographie

Die Trennmöglichkeiten der Dünnschichtchromatographie für polare Fusarienlipide reichten ganz offensichtlich für das Erkennen von strukturellen Unterschieden nicht aus.

Die klassische Gaschromatographie erlaubt zwar keine Trennung von kompletten polaren Lipidmolekülen aufgrund ihrer schweren Flüchtigkeit. Sie ist aber geeignet zur Bestimmung der Zusammensetzung im Lipidgemisch gebundener Fettsäuren und liefert damit wichtige Informationen für die Gushingrelevanz der Lipide (vgl. Kapitel 3.7.3).

Die Fusarienlipide wurden für die gaschromatographische Untersuchung aus lyophilisierten Fusarienkulturfiltraten mit Dichlormethan : Methanol (2:1) extrahiert (s. Kap. 7.8.4) und nach Abzug des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer ausgewogen. Die in komplexen Lipiden gebundenen Fettsäuren wurden zu Methylestern umgesetzt und kapillargaschromatographisch getrennt (s. Kap. 7.8.6). Zur Detektion wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) eingesetzt (Auftragsanalysen).

F. graminearum

Auswaage Gesamtfett:	101 mg
Palmitinsäure (16:0)	22,8 %
Stearinsäure (18:0)	20,5 %
Ölsäure (18:1)	29,3 %
Linolsäure (18:2)	21,5 %
Linolensäure (18:3)	5,9 %

F. poae

Auswaage Gesamtfett:	82 mg
Palmitinsäure (16:0)	16,8 %
Stearinsäure (18:0)	9,6 %
Ölsäure (18:1)	21,6 %
Linolsäure (18:2)	44,1 %
Linolensäure (18:3)	7,9 %

Dabei wurden die aufgeführten Prozentzahlen jeweils auf 100 % hochgerechnet. In Fusarien nur in Spuren vorkommende Fettsäuren wie Caprin-, Laurin-, Myristin-, Palmitöl- (16:1) oder Arachinsäure, die in der Summe weit weniger als 10 %-Punkte erreichen, wurden vernachlässigt.

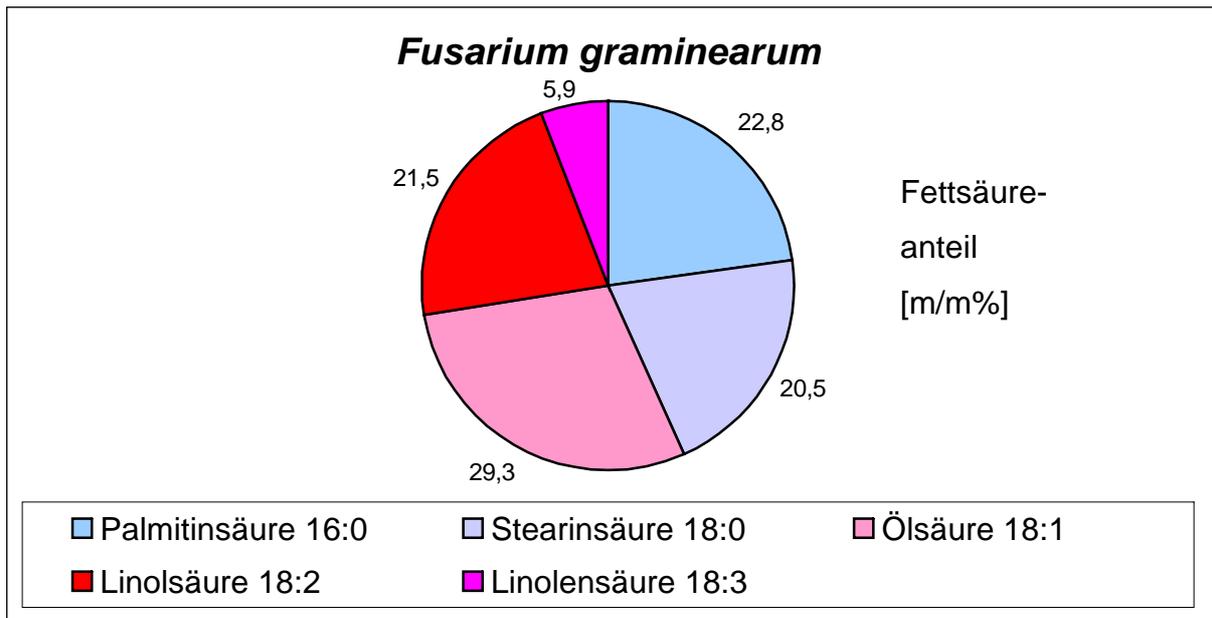


Abbildung 9: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *Fusarium graminearum***
polare Lipidfraktion einer zu Gushing führenden Fusarienart; Auswaage Gesamtfett: 101 mg

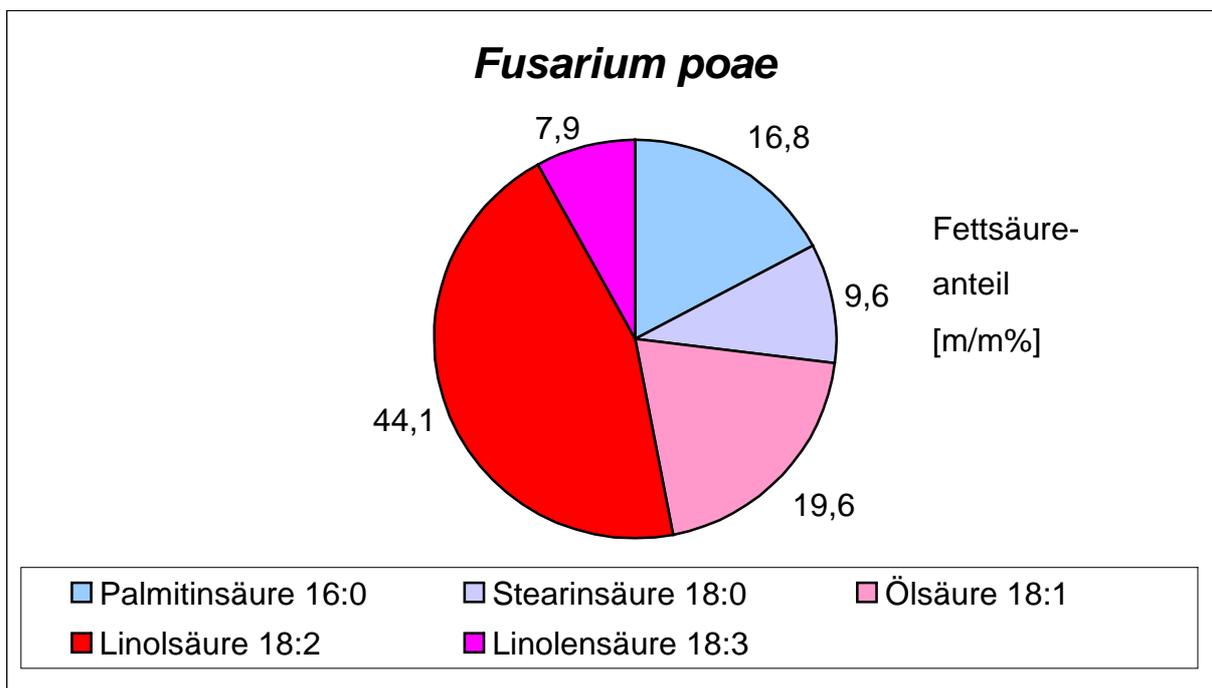


Abbildung 10: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *Fusarium poae***
polare Lipidfraktion einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart; Auswaage Gesamtfett: 82 mg

Wie die Abbildungen 9 und 10 deutlich demonstrieren, enthalten die polaren Lipide der nicht zu Gushing führenden Fusarienart einen entschieden höheren Anteil an

ungesättigten Fettsäuren (im Diagramm in Rottönen dargestellt) als die polaren Lipide der zu Gushing führenden Fusarienart. Bei zu Gushing führenden Fusarien nimmt der Anteil gesättigter Fettsäuren (im Diagramm in Blautönen dargestellt) zu Lasten der ungesättigten Fettsäuren zu. An welche Lipidbausteine und in welcher Position die Fettsäuren jeweils vor der Umesterung gebunden waren, lässt diese Methode offen.

Dennoch sind diese Ergebnisse von großer Bedeutung. Dieser schwerwiegende Unterschied zwischen zu Gushing führenden und nicht zu Gushing führenden Fusarien ist auch mit theoretischen Überlegungen zur Gushing-Entstehung erklärbar:

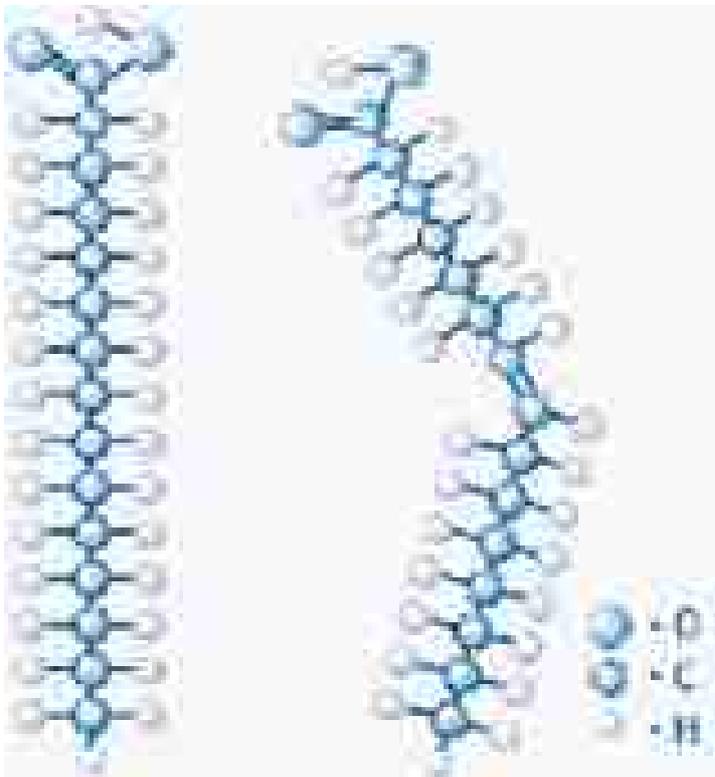


Abbildung 11: **räumliche Struktur einer gesättigten und einer ungesättigten Fettsäure**

Freie (in deprotonierter Form wasserlöslich) gesättigte Fettsäuren können dichte monomolekulare Mizellhäute bilden, indem sich zahlreiche Moleküle dicht an dicht zusammenlagern (vgl. Abbildung 12). Freie ungesättigte Fettsäuren hingegen stören die Ausbildung einer Mizellhaut: Die Doppelbindung führt zu einer sterisch hinderlichen Krümmung, sodass im Membranfilm der Mizellhaut ein Leck entsteht. Die Anwesenheit von freien, ungesättigten Fettsäuren stört somit den Aufbau einer

gasdichten Membran. Dieser Effekt zeigt sich auch bei Mizellen aus heterogenen Bausteinen – und führt zur Reduktion von vorhandenem Gushingpotenzial. Durch die Anwesenheit gesättigter Fettsäuren wird hingegen eine Membranbildung nicht gestört.

räumlicher Aufbau einer deprotonierten, gesättigten Fettsäure

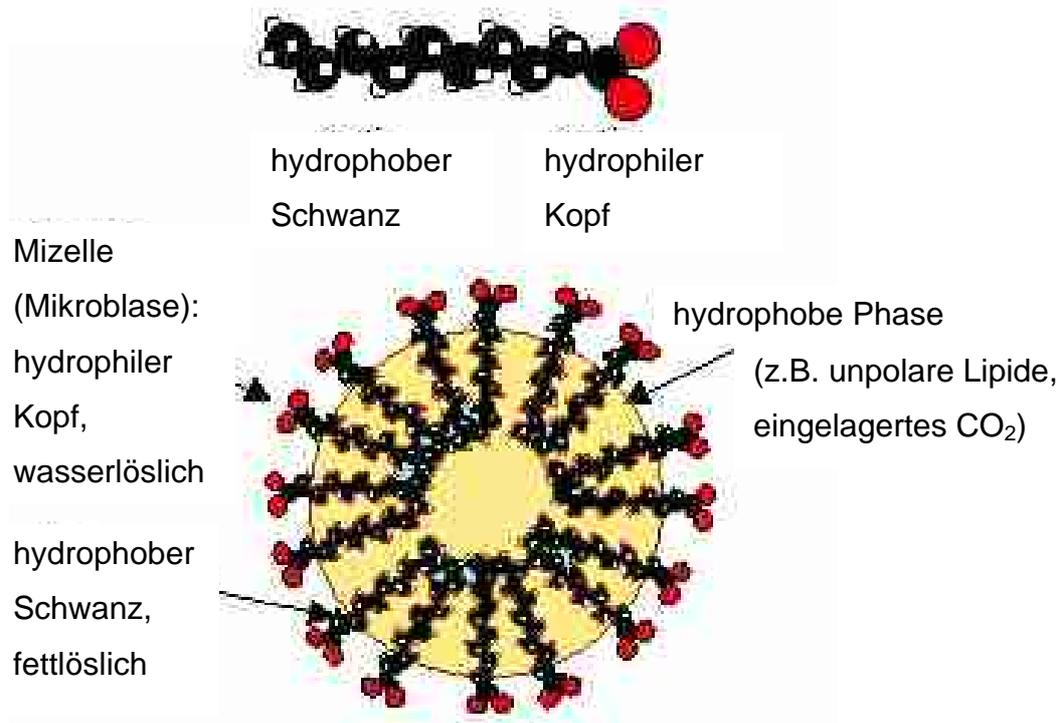


Abbildung 12: Mizellbildung bei gesättigten Fettsäuren

Das Prinzip ist mit geringen Einschränkungen auch auf verseifbare Lipide übertragbar: Ist beispielsweise ein Triglycerid aus gesättigten Fettsäuren aufgebaut, so besitzt das Fett einen hohen Schmelzpunkt. Die Moleküle können sich eng in regelmäßigen Strukturen zusammenlagern – das Fett ist bei Raumtemperatur fest (z.B. Butter, Margarine aus gehärteten pflanzlichen Ölen). Sind in einem Triglycerid eine oder mehrere ungesättigten Fettsäuren verestert, so handelt es sich um ein Öl mit deutlich niedrigerem Schmelzpunkt¹. Feste Strukturen unterhalb des Schmelzpunktes sind bei diesem Triglyceridtypus unregelmäßiger und deshalb intermolekulare Wechselwirkungen weniger intensiv.

¹ BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, 1987, 136

Auch andere untersuchten Fusarienarten folgen dem beschriebenen Gesetz:

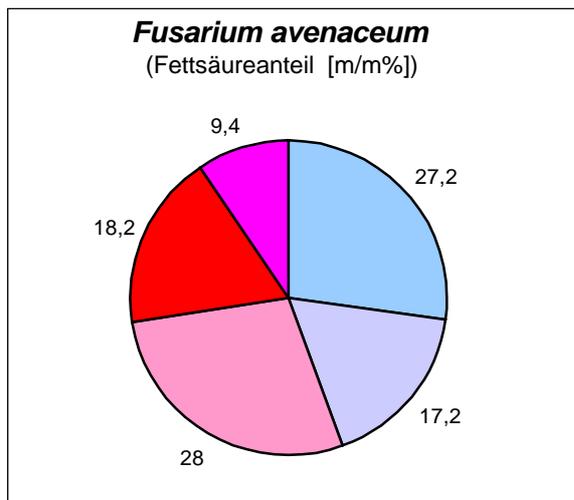


Abbildung 13: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *F. avenaceum***
polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart
Auswaage Gesamtfett: 86 mg

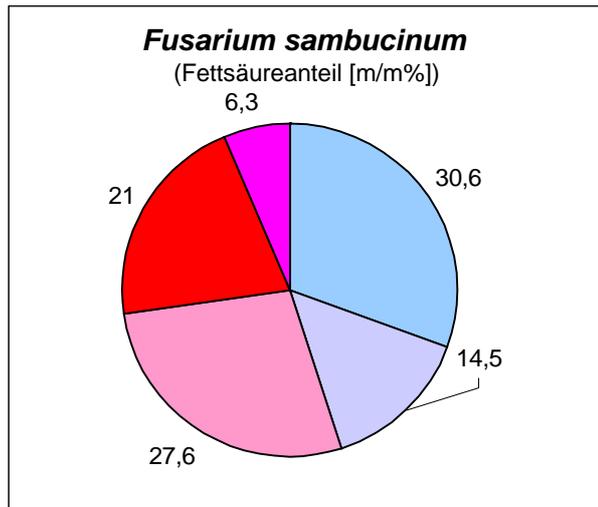


Abbildung 14: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *F. sambucinum***
polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart
Auswaage Gesamtfett: 100 mg

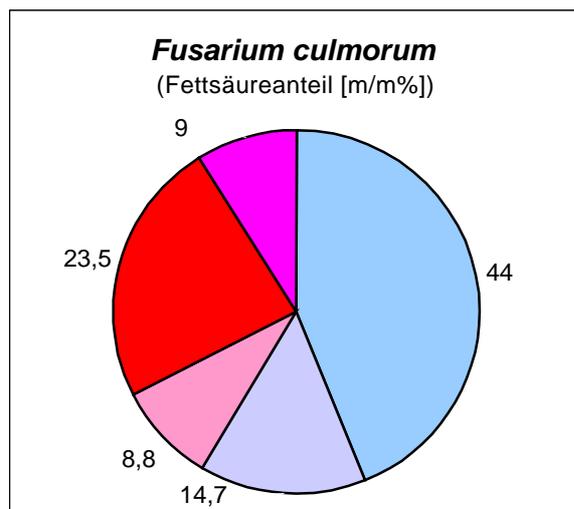


Abbildung 15: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *F. culmorum***
polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart
Auswaage Gesamtfett: 106 mg

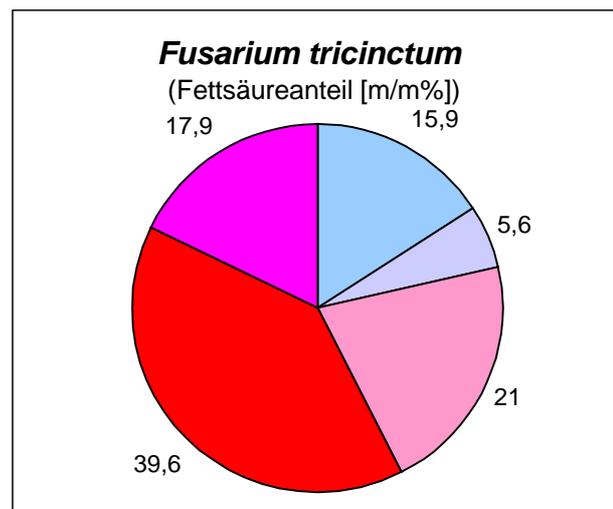
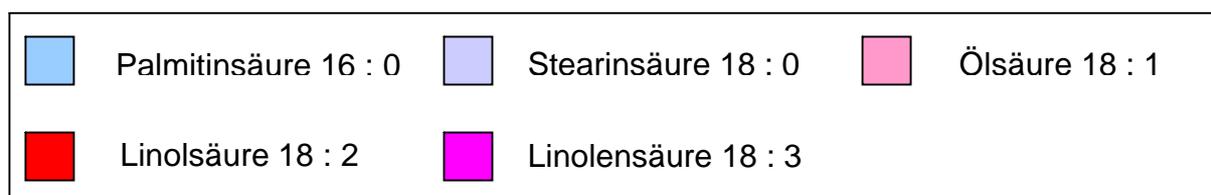


Abbildung 16: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *F. tricinctum***
polare Lipide einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart
Auswaage Gesamtfett: 82 mg



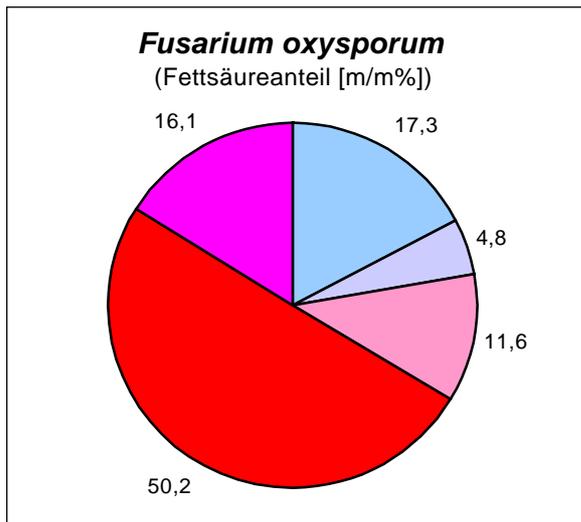


Abbildung 17: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *Foxysporum***
polare Lipide einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart
Auswaage Gesamtfett: 72 mg

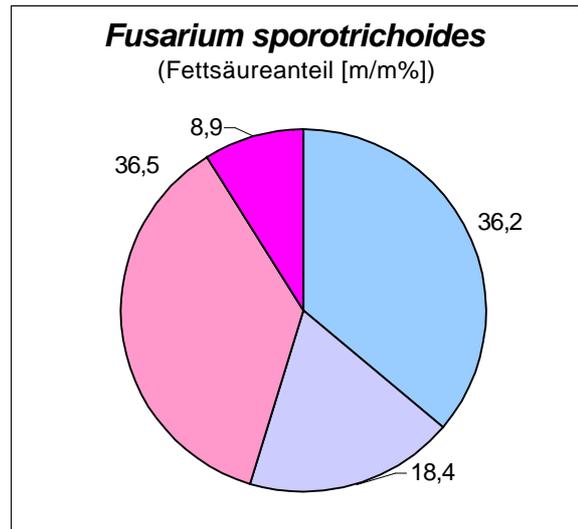


Abbildung 15: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *F.sporotrichoides***
polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart
Auswaage Gesamtfett: 92 mg

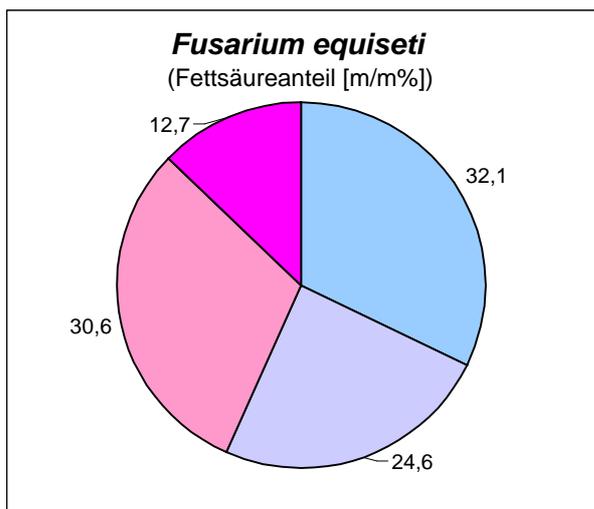
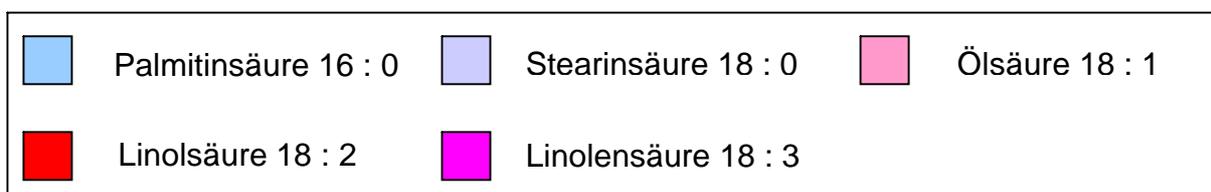


Abbildung 15: **Fettsäurespektrum der polaren Lipide von *F.equiseti***
polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart
Auswaage Gesamtfett: 80 mg



Die Fettsäuremethylester der Fusarienarten *F. sporotrichoides* und *F. equiseti* waren die zuletzt in Auftrag gegebenen Analysen. Die beiden Gaschromatogramme zeigten auffällig viele Störpeaks. Leider kam gerade zur Retentionszeit von Linolsäure jeweils ein breiter Störpeak, sodass diese Fettsäure nicht ausgewertet werden konnte.

Tabelle 4: Sättigungsgrad der Fettsäuren in polaren Fusarienlipiden

	Σ gesättigte Fettsäuren	Σ ungesättigte Fettsäuren	Verhältnis ges. FS / ung. FS
<i>F. graminearum</i>	42,8 %	57,2 %	0,75
<i>F. culmorum</i>	58,7 %	41,3 %	1,42
<i>F. avenaceum</i>	44,4 %	55,6 %	0,80
<i>F. sambucinum</i>	45,1 %	54,9 %	0,82
<i>F. poae</i>	26,4 %	73,6 %	0,36
<i>F. oxysporum</i>	22,1 %	77,9 %	0,28
<i>F. tricinctum</i>	21,5 %	78,5 %	0,27

Das Verhältnis gesättigter Fettsäuren zu ungesättigten Fettsäuren liegt bei zu Gushing führenden Fusarien mit einem Wert über 0,7 weit über dem von zu Gushing führenden Fusarien von unterhalb 0,4.

Dem Fettsäurespektrum zufolge wurde *Fusarium oxysporum* den nicht zu Gushing führenden Fusarien zugeordnet.

Fusarium sporotrichoides ließ sich aufgrund des Fettsäurespektrums keiner der beiden Gruppen eindeutig zuordnen. Das Verhältnis gesättigter Fettsäuren zu ungesättigten Fettsäuren lag im Mittelfeld. Somit verhält sich diese Fusarienart nicht nur in puncto Hydrophobinproduktion außergewöhnlich, sondern auch das Fettsäurespektrum weicht von den Regelmäßigkeiten der übrigen Arten ab.

Fusarium equiseti war die einzige Fusarienart, die überhaupt nicht ins Konzept passte: Obwohl *F. equiseti* zu Gushing führt, glich das Fettsäurespektrum den nicht zu Gushing führenden Fusarienarten.

4.2 Heisswasserauszüge aus Fusarien-infiziertem Treber

4.2.1 Optimierung des Ausgangsmaterials (frischer Nasstreber)

Das Gushing-Modellsystem „Fusarien-infizierter Treber“ war stets parat, wenn geeignete Praxisproben nicht zur Verfügung standen. Außerdem waren in diesem Ansatz primäre Gushingursachen garantiert. Das Modell diente als minimalistische, aber dennoch realitätsnahe Möglichkeit, primärem Gushing auf die Spur zu kommen.

Durch Wasserentzug konnte frischer Nasstreber über mehrere Monate hinweg haltbar gemacht werden.

Zur Trocknung wurden zwei Verfahren erprobt: Ein Trocknungsverfahren bei 95°C und die Gefriertrocknung. Zunächst ist zu bemerken, dass in der Regel während einer Trocknung bei 95°C eine Reihe von Reaktionen zwischen Proteinen und Kohlenhydraten stattfinden, wobei Melanoidine aus nicht-enzymatischen Bräunungsreaktionen sowie andere Maillardprodukte entstehen. Die Lyophilisierung hingegen geht schonender mit dem Material um.

Für die Lyophilisierung sprach außerdem, dass Fusarien auf lyophilisiertem Nährboden besser wachsen. Auf beimpftem, bei 95°C getrocknetem Treber waren nach einer Woche Wachstum nur wenige Fusarienkolonien zu finden, während sich über den lyophilisierten, beimpften Treber ein durchgehender Fusarienteppich zog. Dies ist eine Folge der größeren Oberfläche, die während der Gefriertrocknung erhalten blieb und damit die Rehydratisierbarkeit verbesserte. Die Trebermasse bei 95°C im Trockenschrank war hingegen „zusammengebacken“.

Per definitionem müsste Treber ein unlösliches Produkt sein; denn schließlich wird er in der Brauerei durch mehrmaliges Anschwänzen ausgelaugt, sodass nur unlösliche Malzbestandteile zurückbleiben sollten. Da die Glattwasser-Extraktbeute allerdings ökonomisch rentabel sein muss, bleibt etwas auswaschbarer Extrakt im Treber zurück. Dieser Rückstand beträgt ca. 0,4 g löslicher Extrakt pro 100 g Trockentreber. Der Extrakt besteht aus 1-2 % Protein, 60-70 % Kohlenhydraten und 1 % Polyphenolen. Eine gründliche Entfernung dieser Stoffe vor Abbau des Trebers durch Fusarien erleichtert die nachfolgende Analytik. Die nach der Inokulation

auswaschbaren Substanzen können dann nur Stoffwechselprodukte vom Pilz oder vom Pilz mobilisierte Treber-Abbauprodukte sein.

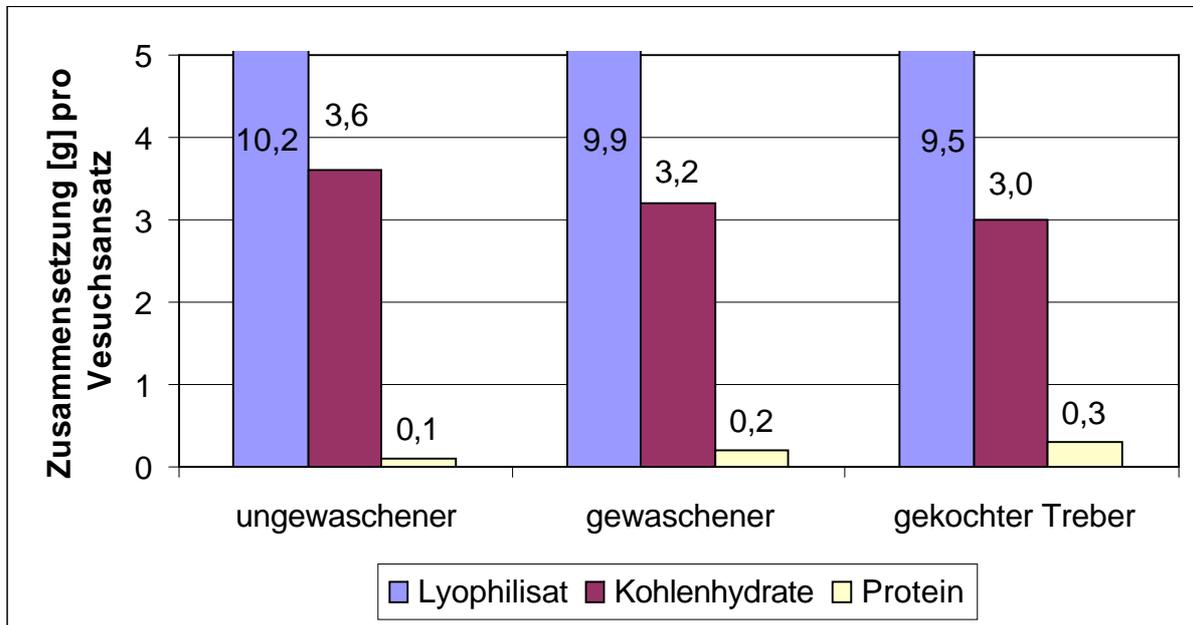


Abbildung 20: **Durchschnittliche Zusammensetzung des Heisswasserauszugs**

Jeweils Durchschnitt aus drei Aufarbeitungen aus *F. culmorum*-infiziertem Treber nach unterschiedlicher Trebervorbehandlung (je 170 g Trockentreber)

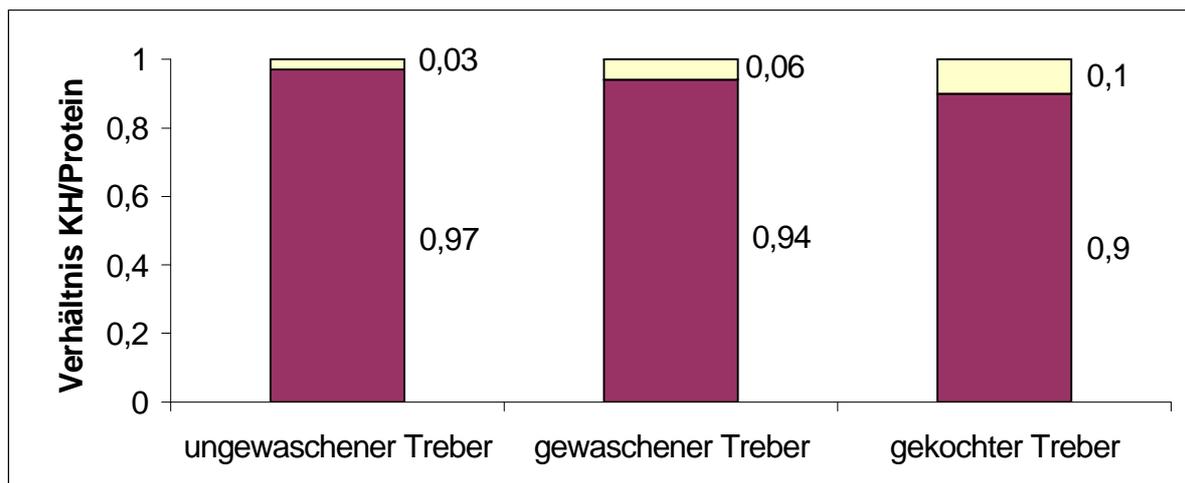


Abbildung 21: **Durchschnittliches Verhältnis Kohlenhydrate zu Protein im Heisswasserauszug**

berechnet aus den Ergebnissen aus Abbildung 20 aus *F. culmorum*-infiziertem Treber nach unterschiedlicher Trebervorbehandlung (je 170 g Trockentreber)

Zunächst wurde der frische Treber mit kochendem Wasser im Verhältnis ein Gewichtsteil feuchter Treber zu vier Gewichtsteilen Wasser unter Rühren gewaschen. So konnten jedoch nur ca. 60 % der löslichen Stoffe entfernt werden. Zur optimalen Reinigung und damit zu einem unlöslichen Ausgangsmedium führte dagegen folgende Methode: Die erforderliche Trebermenge wurde ohne zu Maischen nach den Bedingungen des Gushingtests gekocht, filtriert (siehe Kap. 7.5.1 Gushingtest nach Donhauser b) - d)¹). Der Filtrückstand wurde gegebenenfalls sofort autoklaviert und mit der Sporensuspension der gewünschten Fusarienart inokuliert. Alternativ konnte der gekochte Treber lyophilisiert, später wieder angequollen, autoklaviert und inokuliert werden. Nach sieben Tagen wurde der bewachsene Treber erneut entsprechend dem Gushingtest gekocht (mit Maischen) und das Filtrat weiterverarbeitet (Kap. 7.5.1 Gushingtest nach Donhauser a) – l)¹). Die Methode verhindert eine Kontamination des Trebers mit anderen mikrobiellen Treber-Destruenten. Aus diesem Grund konnte der Wassergehalt des beimpften Trebers gesteigert und ein verbessertes Fusarien-Wachstum erreicht werden. Die Filtrate aus derart aufgereinigten Proben zeigten aufgrund des optimierten Fusarien-Wachstums einen deutlich niedrigeren Kohlenhydratanteil zugunsten des Proteinanteils.

Der Heisswasserauszug mit den Stoffen, die von den Fusarien löslich gemacht oder synthetisiert worden waren, wurde für die Trübungsmessungen (4.2.3) direkt verwendet. Für die chemische Stoffgruppenanalytik (4.2.4) wurde der lyophilisierte Trockenextrakt der Filtrate herangezogen.

4.2.2 Gushingverhalten von Heisswasserauszügen und Auszugsprodukten

Die Überschäumvolumina der Heisswasserauszüge schwankten bei *F. culmorum* stark. Auch bei gushenden Auszügen kamen Flaschen vor, die kein Überschäumen aufwiesen. Die Mehrzahl der Proben zeigte jedoch ein deutliches Überschäumen. *F. poae*- und *F. tricinctum*-Inokulationen führten einheitlich zu stabilen Proben. *F. oxysporum* wurde aufgrund der festgestellten geringen Gushing-Neigung als

¹ DONHAUSER, S.; WEIDENEDER, A.; WINNEWISSER, W.; GEIGER, G.: In: Brauwelt 129 (1989), 1658

Negativprobe ausgeschlossen, sodass nur noch *F. tricinctum* und *F. poae* zur Erzeugung von gushing-negativem Material zur Verfügung stand.

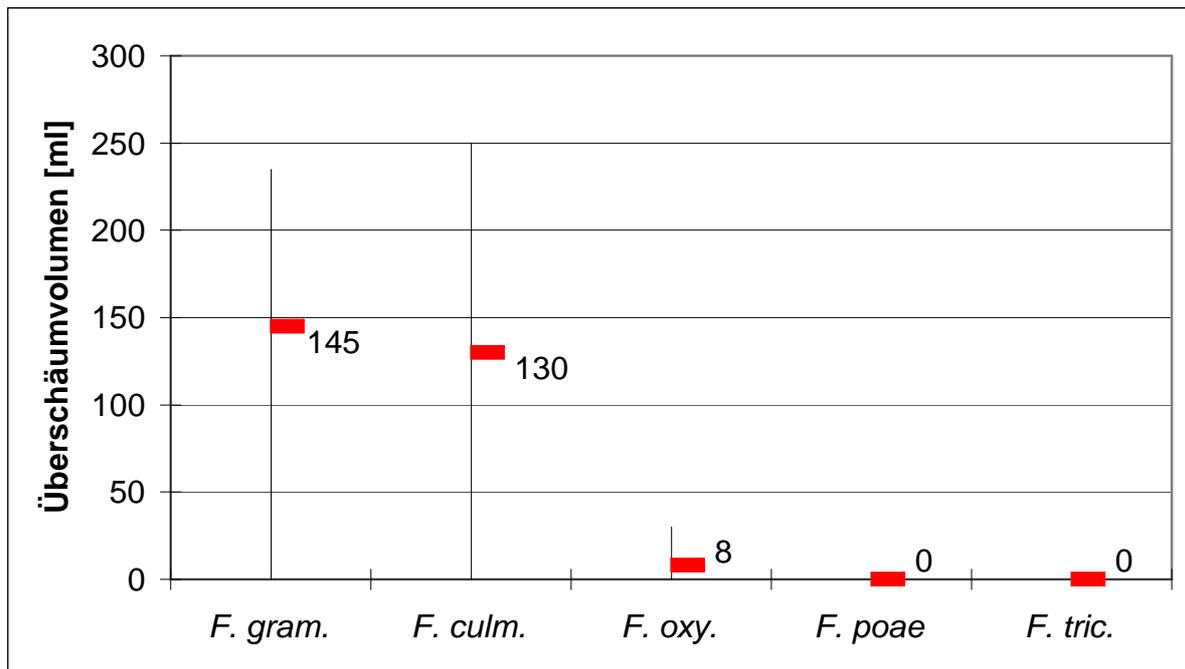


Abbildung 22: **Überschäumvolumina von Heisswasserauszügen**

aus mit unterschiedlichen Fusarien beimpftem Treber (170 g Trockentreber)
Durchschnitt aus je 10 Flaschen

Für Anreicherungsversuche von gushing-aktiven Substanzen wurden Heisswasserauszüge aus *F. culmorum*-infizierten Trebern verwendet. Wichtig war nach jedem Verfahrensschritt die Kontrolle des erhaltenen Überschäumvolumens.

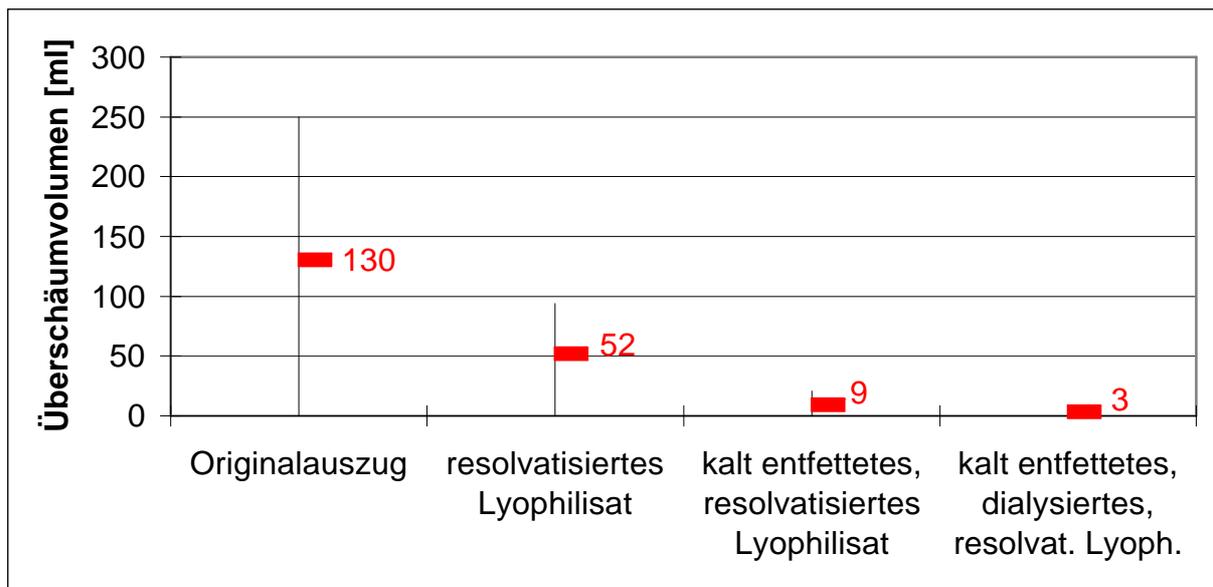


Abbildung 23: **Durchschnittliche Überschäumvolumina verschieden behandelter *F.culmorum*-Treber- Heisswasserauszüge im Gushingtest**

Durchschnitt von 2 Aufarbeitungen mit jeweils 5 Flaschen

Das Lyophilisat der Heisswasserauszüge aus *F. culmorum*-infizierten Trebern zeigte resolvatisiert, zentrifugiert, carbonisiert und abgefüllt ein gegenüber dem Originalauszug vermindertes Gushingpotenzial: Dies könnte dadurch bedingt sein, dass das vollständige Trocknen der Probe die Proteine mit hydrophober Luft in Kontakt brachte und sich deshalb manche Proteine (vgl. Hydrophobine!) denaturiert wurden.

Nach einer Entfettung war ebenfalls an eine rückläufige Überschäumtendenz zu denken, da polare Lipide an der Entstehung von Gushing beteiligt sein könnten. Zudem können organische Lösungsmittel Proteine denaturieren, darunter auch gushing-aktive Proteine.

Da die maximale Ausschlussgröße des verwendeten Dialyseschlauches 10 kDa betrug, war mit Verlusten von Heisswasserauszug-Bestandteilen mit einem Molekulargewichtsbereich zwischen 0 kDa und ca. 15 kDa zu rechnen. Darunter fallen auch gushingrelevante Substanzen. Trotz dieser Behandlungsschritte schäumte auch noch der resolvatisierte Extrakt nach Entfettung und Dialyse über. Dies weist darauf hin, dass hier die anfängliche Anzahl an stabilisierten Mikrobläschen weit über der kritischen Anzahl an Entbindungskeimen gelegen haben

muss. Weiterhin lässt dieser Versuch Proteine als Gushing-Inhibitoren vermuten, da Lipide als weitaus kleinere Moleküle bei einer erschöpfenden Dialyse einen Totalverlust erlitten hätten. Die Tatsache, dass ein kleiner Teil an Primärgushing-Initiatoren erhalten blieb, deutet auf eine Molekülgröße zwischen 10 – 15 kDa hin.

4.2.3 Trübungsmessungen

Über Heisswasserauszüge aus Fusarieninfiziertem Treber existieren keine Daten über die Trübungsstabilität. Zudem sollten analog zu den Trübungsmessungen von Weideneder Zusammenhänge mit der Gushingneigung überprüft werden¹. Dazu wurde die Trübungsneigung einiger Treberauszüge unter forcierenden Bedingungen über 8 Wochen hinweg beobachtet. Es wurden jeweils sechs Flaschen der Auszüge von *F. culmorum*, *F. oxysporum* und *F. poae* miteinander verglichen.

Die Intensität des Streulichts wurde jeweils in einem Winkel von 12° und 90° gemessen. Dabei ist der erste Wert proportional zur Größe der Partikel, während der Wert bei einem Streuwinkel von 90° die Packungsdichte der Partikel beschreibt.

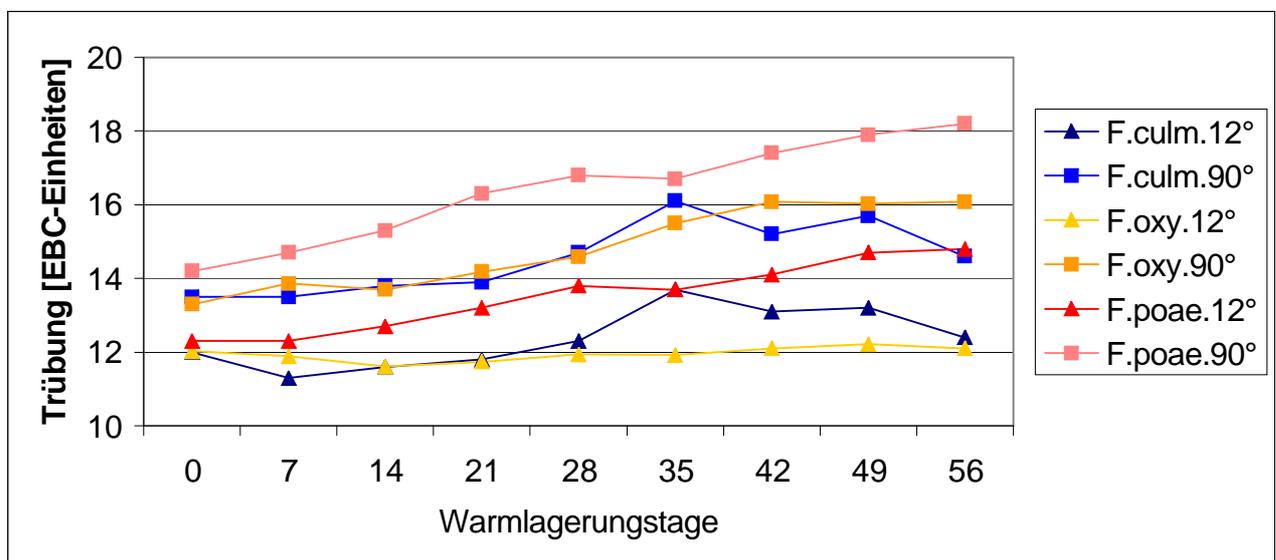


Abbildung 24: Trübungsverhalten der Treber-Heisswasserauszüge

Durchschnitt aus 4 (56.Tag) -10 (7.Tag) Flaschen

¹ WEIDENER, A.: Diss. TU München, 1992

Tabelle 5: **Überschäumvolumina von Heisswasserauszügen aus Fusarien-
infiziertem Treber im forcierenden Trübungstest**

Überschäumvolumina	14. Warm- lagerungstag	28. Warm- lagerungstag	42. Warm- lagerungstag	56. Warm- lagerungstag
<i>F. culmorum</i>	83 ml	105 ml	76 ml	79 ml
<i>F. oxysporum</i>	3 ml	0 ml	0 ml	1 ml
<i>F. tricinctum</i>	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml

Die Trübungen lagen bei allen drei Fusarienarten in der für Würzen üblichen Größenordnung: Sämtliche Proben hatten von Beginn an Werte über 10 EBC-Einheiten. Damit lagen die Trübungswerte für quantitative Auswertungen zu hoch. Da die Werte aber nicht weiter interpretiert werden sollten, sondern nur die Absolutwerte zu vergleichen waren, wurde die Untersuchung dennoch fortgesetzt.

Die Trübungsunterschiede zwischen den Probeflaschen einer Ansatzreihe waren gering. Jedoch zeigten alle Proben starke Tagesschwankungen. Bei *F. culmorum* war überhaupt kein Trend auszumachen. *F. poae* und *F. oxysporum* wiesen im Laufe des Beobachtungszeitraumes immer höhere Trübungswerte auf.

Nach 2, 4, 6 und 8 Wochen wurden je zwei Kontrollflaschen pro Fusarienart geöffnet: Die Überschäumvolumina blieben bei *Fusarium culmorum* und *Fusarium oxysporum* durchweg in derselben Größenordnung, obwohl die Trübungswerte stark schwankten. Nicht gushende Proben wiesen die stärksten Trübungen auf. Damit konnte in diesem System kein Zusammenhang zwischen messbaren Trübungen und Gushing ausgemacht werden.

4.2.4 Analytik nach chemischen Stoffgruppen

Die Betrachtung chemischer Stoffgruppen zeigte in der Zusammensetzung nur geringe Unterschiede zwischen den Abbauprodukten von *F. culmorum* und *F. poae*. Die Masse des Extrakts war bei den drei Fusarien vergleichbar, ebenso der prozentuale Kohlenhydrat- und Polyphenolgehalt. Tabelle 6 listet die genauen Zahlen auf:

Tabelle 6: Zusammensetzung der Heisswasserauszüge (Σ extrazelluläres Fusarien-Material und löslich gemachte Treberbestandteile)

Treberextrakte: Die Prozentzahlen beziehen sich auf Trockenextrakt des jeweiligen Heisswasserauszugs aus ausgekochtem, autoklaviertem und Fusarien-infiziertem Treber (Trockengewicht: 170 g).

Heisswasserextrakt aus bewachsenem Treber mit...	Extrakt	Protein	Kohlenhydrate	Polyphenole
... <i>F. culmorum</i>	9,5 g	3 %	36 %	1 %
... <i>F. poae</i>	9,6 g	3 %	36 %	1 %
... <i>F. oxysporum</i>	8,7 g	1 %	37 %	1 %

4.2.5 Anionenaustausch-Chromatographie von Treber-Heisswasserauszügen (*F. culmorum*)

In den Heisswasserauszügen waren gushing-verdächtige Proteine bereits vorangereichert, da alle Würzproteine entfernt waren. Dennoch mussten von den Fusarien in Lösung gebrachte Kohlenhydrate und niedermolekulare Begleitstoffe als analytische Störfaktoren abgetrennt werden. Ultrafiltration und Dialyse allein waren ungeeignet, weil in der Membran auch höher- und mittelmolekulare Kohlenhydrate zurückgehalten würden: Diese Stoffgruppe führt mit zunehmender Konzentration zu einer Viskositätserhöhung, die den weiteren Umgang mit den Proteinen erschwert. Die Ionenaustausch-Chromatographie schien ein geeignetes Mittel zur Proteinanreicherung durch Abtrennung von Kohlenhydraten und Polyphenolen zu sein¹. Das

¹ HIMMELHOCH, R.: In: Meth. Enzymol., XXII, Academic Press New York 1971, 273-286

Verhältnis Proteine / Kohlenhydrate war bereits durch die Auswaschung des Trebers verbessert worden, doch nun sollten ausreichende Proteinkonzentrationen für die Elektrophorese erreicht werden. Im Anschluss mussten die eluierten Proteine dialytisch wieder von den zugeführten Salzen befreit werden.

Erste Daten (Ergebnisse von Weideneder¹, Hydrophobine) über die isoelektrischen Punkte von gushing-aktiven Proteinen deuteten auf den sauren pH-Bereich hin. Deshalb wurde ein schwacher Anionenaustauscher einem Kationenaustauscher vorgezogen. Die Chromatographie wurde bei pH 8,5 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert treten die meisten Proteine mit negativer Ladung auf, sodass sie von diesem Ionenaustauscher gebunden werden können. Proteine mit zahlreichen sauren Aminosäureresten tragen in schwach alkalischem Milieu viele Ladungen und binden deshalb besonders gut an die Anionenaustauschersäule². Proteine mit überwiegend basischen Aminosäureresten binden bei diesem pH-Wert nicht.

Die erhaltenen Fraktionen wurden zu zwei Großfraktionen vereinigt (Trennung am Minimum der Proteinkurve; im Schaubild mit einer gestrichelten Linie markiert): Fraktion 1-38 (Waschpuffer mit den ungebundenen Substanzen) und Fraktion 39-65 (Eluat mit den an die Säule gebundenen Substanzen). Ca. 55 % der aufgetragenen Proteine erschienen so im Eluat und ca. 33 % im Waschpuffer. Die aufgetragenen Kohlenhydrate wurden beim dargestellten Chromatographielauf zu ca. 65 % im Waschpuffer ausgespült und ca. 24 % waren im Eluat nachweisbar.

¹ WEIDENEDER, A.: Diss. TU München 1992

² FIRMENSCHRIFT: Ion Exchange Chromatography. Amersham Pharmacia, Freiburg

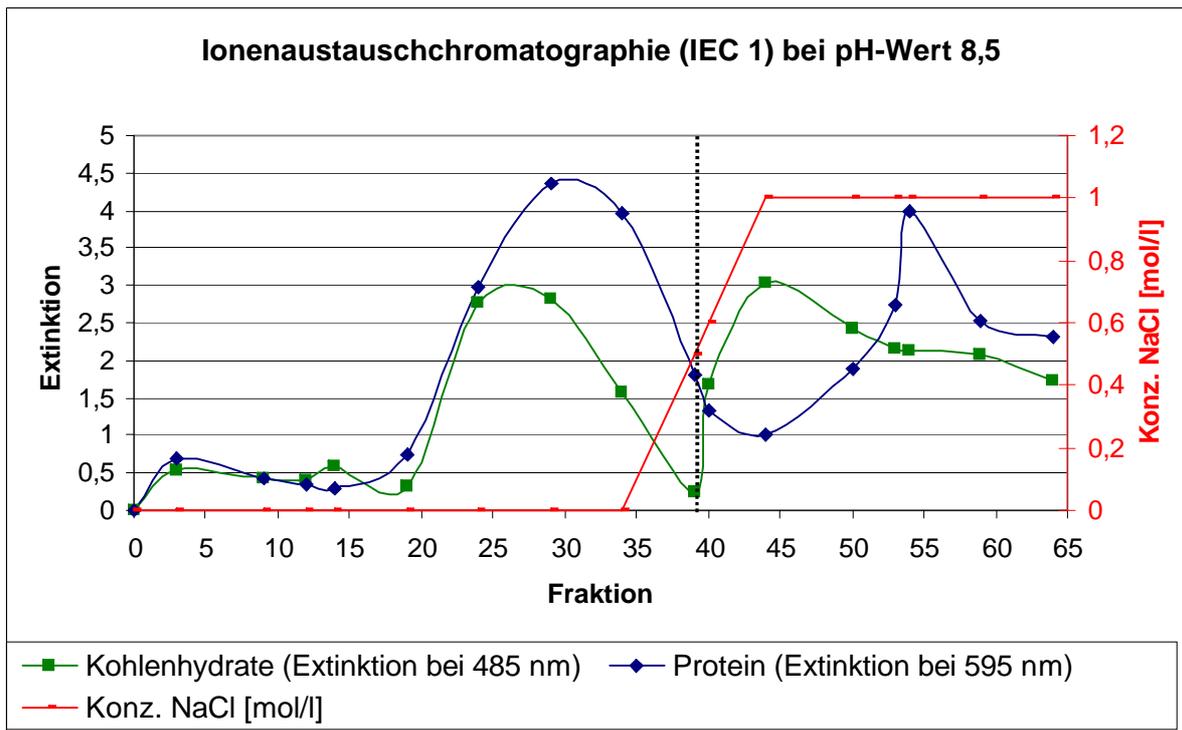


Abbildung 25: **Proteine und Kohlenhydrate im Anionenaustauscher (IEC 1)**

Säulenmaterial: Q Sepharose FF
 Säulendimension: 200 mm x 20 mm
 Gelbettvolumen: ca. 50 ml
 Auftrag: 2 g Lyophilisat gelöst in 100 ml Waschpuffer, darunter
 50 mg Protein
 810 mg Kohlenhydrate
 Waschpuffervolumen: 800 ml
 Gradientenvolumen: 400 ml

Die anfänglichen Versuche mit der Ionenaustauschchromatographie zeigten, dass eine vorherige Dialyse des in Lösung gebrachten Auftragsmaterials notwendig war. Eine hohe Ionen-Konzentration in der Probe ist zwar eigentlich nicht erklärbar (,da mit unlöslichem Treber und destilliertem Wasser gearbeitet wurde). Dennoch konnte mit Hilfe einer Dialyse die Bindung der Proteine an die Säule deutlich verbessert werden. Folglich wurden alle weiteren Proben dialysiert, um Störungen zuverlässig auszuschließen. Da nun aber die maximale Ausschlussgröße (MWCO \leq 10 kDa) des verwendeten Dialyseschlauches für globuläre Proteine 10-15 kDa betrug, musste in Kauf genommen werden, dass auch gushingaktive Moleküle im Grenzbereich verloren gingen.

Die meisten Proteine banden nun, wie erwartet, bei dem gewählten pH-Wert von 8,5 und niedriger Ionenstärke an das Säulenmaterial. Auch einige Kohlenhydrate verhielten sich im Experiment als Ladungsträger (z.B. Glykoproteine oder Zuckersäuren).

Die Erhöhung der Auftragsmenge auf 4 g bewährte sich nicht, da im Zuge dessen wieder mehr Protein ungebunden die Säule passierte. Dies war ein Hinweis auf eine Überladung der Säule.

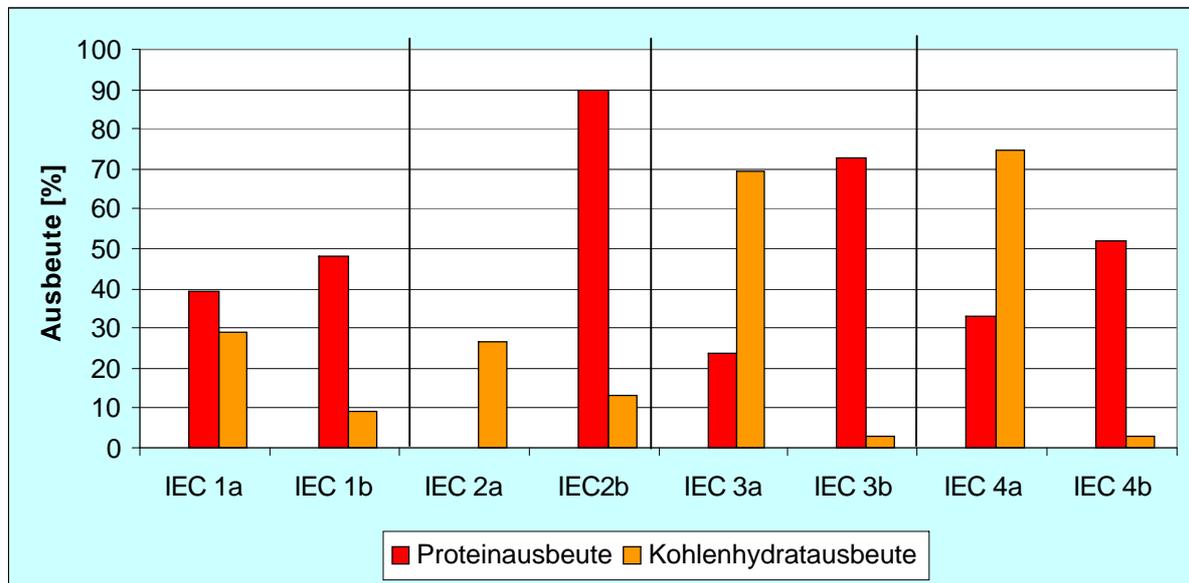


Abbildung 26: **Ausbeute aus der Ionenaustausch-Chromatographie unter unterschiedlichen Bedingungen**

a: nicht an die Säule bindende Substanzen

b: an die Säule bindende Substanzen

IEC 1: Probenauftrag ohne vorherige Dialyse

Auftrag: 2 g Lyophilisat in 100 ml Waschlösung; 800 ml Waschlösung

IEC 2: Probenauftrag nach vorheriger Dialyse

Auftrag: 2 g Lyophilisat in 100 ml Waschlösung; 800 ml Waschlösung

IEC 3: Probenauftrag nach vorheriger Dialyse

Auftrag: 2 g Lyophilisat in 100 ml Waschlösung; 400 ml Waschlösung

IEC 4: Probenauftrag nach vorheriger Dialyse

Auftrag: 4 g Lyophilisat in 150 ml Waschlösung; 800 ml Waschlösung

Protein- und Kohlenhydratbestimmungen aus dialysiertem Waschlösung bzw. Eluat

Nach so optimiertem Ionenaustausch wurden beide Fraktionen einem Gushingtest zugeführt. Positives Gushingpotenzial war nach dieser Trennung eher im Eluat zu erwarten, da amphiphile Proteine an die Säule binden. Der überwiegend Kohlenhydrate enthaltende Waschlösung hingegen ließ kein positives Gushingpotenzial vermuten. Tatsächlich zeigte das dialysierte Eluat Gushing, während die im Waschlösung enthaltenen Substanzen CO_2 nicht spontan entbinden konnten.

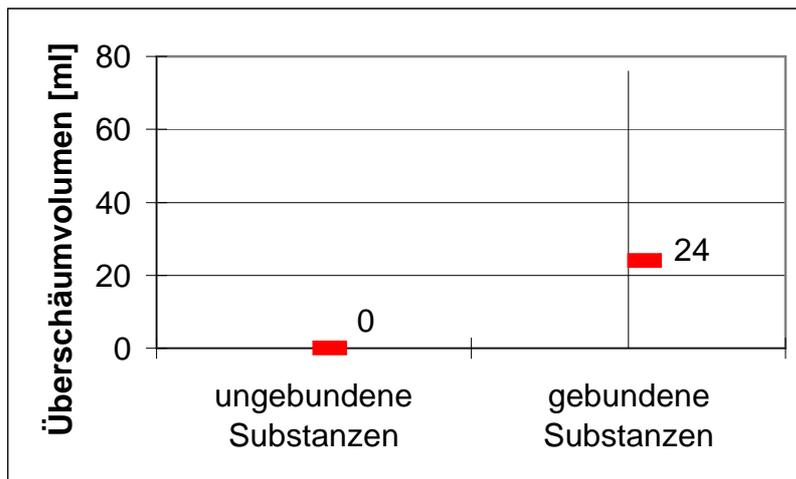


Abbildung 27: **Durchschnittliche Überschäumvolumina der IEC-Fractionen im Gushingtest**

Das Lyophilisat eines Heisswasserauszugs von mit *F. culmorum*-infiziertem Treber wurde in fünf Chromatographie-Läufen (gemäß Abb.26, IEC 2 aufgearbeitet) in je zwei Fraktionen getrennt; die Waschpuffer bzw. die Eluate wurden vereinigt.
Aufbereitung gemäß Vorschrift Kapitel 7.6.2; Durchschnitt ÜSV aus jeweils n = 10 Flaschen

Der Rückgang des Überschäumvolumens vom unbehandelten Heisswasserauszug zum dialysiertem Ionenaustausch-Eluat erklärt sich zum einen aus Verlusten bei jedem durchgeführten Arbeitsschritt. Zum anderen sind größere Verluste an gushing-aktivem Material der zweimaligen Dialyse zuzuschreiben.

Interessant ist, dass hier die angereicherten Gushinginitiatoren trotz Abtrennung viskositäts-erhöhender, ungeladener Stoffe immer noch beachtliches Gushing zeigen.

4.2.6 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) des Treber-Heisswasserauszugs

Als alternatives Kriterium zur selektiven Anreicherung gushingaktiver Substanzen bot sich die hydrophobe Interaktion zwischen dem unpolaren Schwanzteil der gesuchten amphiphilen Substanzen und entsprechendem Adsorptionsmaterial an. Mit Hilfe der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie können Proteine in rein polare Substanzen und in Substanzen mit sowohl hydrophoben als auch polaren Bereichen getrennt werden.

Die Hydrophobe Interaktion beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Resten der Trägermatrix und hydrophoben Bereichen auf der Oberfläche der zu trennenden Substanzen. Die Trägergruppen besitzen geringere Polarität als Wasser und binden deshalb Molekülbereiche von Probesubstanzen, die aufgrund ihrer geringen Polarität von Wasser schlecht benetzt werden. Antichaotrope Salze (aussalzend, wie z. B. Ammoniumsulfat) reduzieren die Löslichkeit dieser Substanzen in Wasser zusätzlich. Wird die Konzentration solcher Salze wieder verringert, eluieren die zuvor gebundenen Moleküle¹.

Als Säulenmaterial wurden Butyl-Sepharose und Phenyl-Sepharose getestet. Butyl-Sepharose trennt ausschließlich aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen, während die Phenyl-Sepharose neben hydrophoben Bindungen Wechselwirkungen zwischen delokalisierten π -Elektronen berücksichtigt. Folglich bindet Phenyl-Sepharose aromatische Aminosäuren stärker als Butyl-Sepharose. Auch Polyphenole werden von der Phenyl-Sepharose zurückgehalten².

Die Proben konnten bei der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie ohne vorherige Dialyse aufgetragen werden. Im Anschluss wurde die Säule von ungebundenen Substanzen frei gewaschen. Schließlich konnten die gebundenen Moleküle durch Reduktion der antichaotropen Salzkonzentration wieder desorbiert werden. Die aufgetragene Proteinmenge fand sich jedoch bei weitem nicht im Waschpuffer und in der Pufferlösung ohne antichaotrope Salze wieder. Deshalb wurde zunächst mit destilliertem Wasser, dann mit Dimethylsulfoxid (DMSO) - einem unpolarerem Lösungsmittel als Wasser - in steigendem Gradienten nacheluiert.

¹ SHALTIEL, S.: In: Meth. Enzymol. **104**, Academic Press New York 1984, 69-96

² FIRMENSCHRIFT: Hydrophobic Interaction Chromatography. Amersham Pharmacia, Freiburg

Mithilfe dieses Verfahrens konnten stark hydrophobe Proteine von der Gelmatrix zurückgewonnen werden. Dennoch fanden sich in der Summe aller Fraktionen längst nicht alle aufgetragenen Proteine wieder.

Ergänzend wurde versucht, die angereicherten Proteine aus dem Eluat des Ionenaustauschers nach ihrem Hydrophobizitätsgrad zu trennen. Wegen der geringen Ausbeute bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie waren diese Ansätze jedoch nicht auswertbar.

Von den ungebundenen Substanzen war nach entsprechender Aufbereitung im Gushingtest kein Überschäumen zu erwarten, da die Moleküle keine unpolaren Molekülbereiche besitzen und damit nicht grenzflächenaktiv sind. Die mehr oder weniger stark an die Gelmatrix gebundenen Substanzen könnten dagegen Gushingpotenzial besitzen.

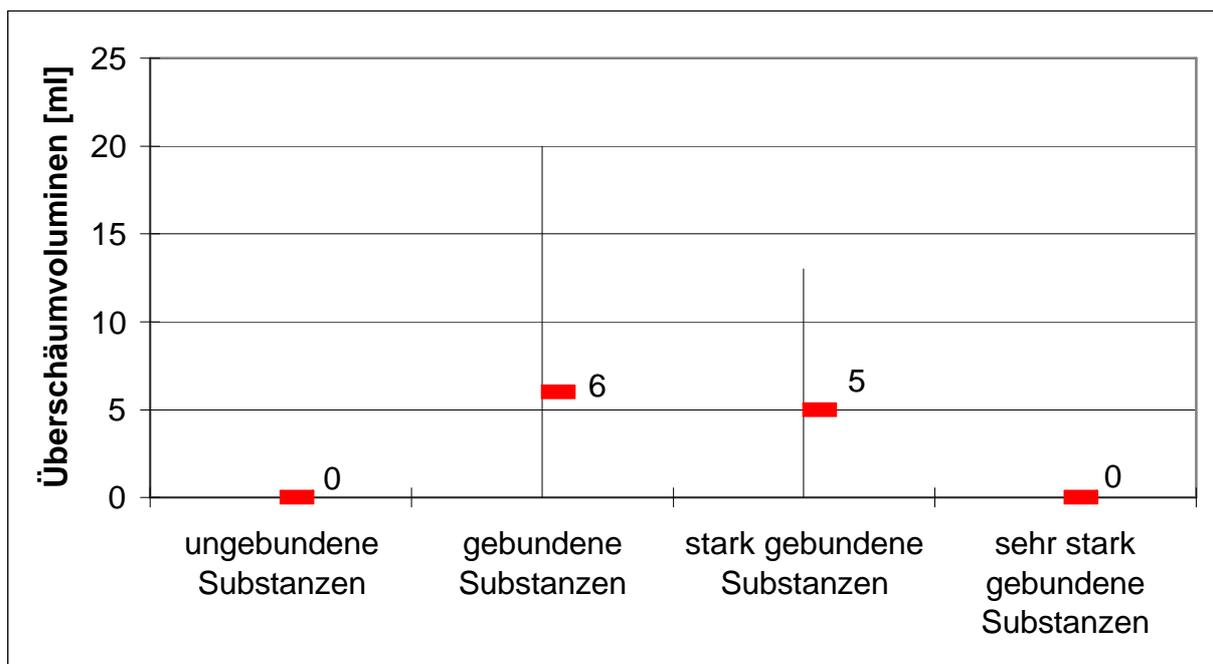


Abbildung 28: **Durchschnittliche Überschäumvolumina der HIC-Fractionen im Gushingtest**

Das Lyophilisat des Heisswasserauszugs von mit *F. culmorum*-infiziertem Treber wurde in fünf Chromatographie-Läufen getrennt und analoge Fraktionen wiedervereinigt.
 Aufbereitung gemäß Vorschrift Kapitel 7.6.2; Durchschnitt ÜSV jeweils aus n = 10 Flaschen
 Ungebundene Substanzen: gelöst im Waschpuffer (21 % des Gesamtproteins)
 Gebundene Substanzen: gelöst im Ammoniumsulfatfreien Puffer (28% des Gesamtproteins)
 Stark gebundene Substanzen: gelöst in destilliertem Wasser (9% des Gesamtproteins)
 Sehr stark geb. Substanzen: gelöst in DMSO (2% des Gesamtproteins)
 Proteinbestimmungen aus dialysiertem Waschpuffer bzw. Eluaten

Hier zeigte sich, dass weder die nicht gebundenen noch die sehr stark gebundenen Moleküle Gushingpotenzial besaßen, während der Ammoniumsulfat-freie Puffer und das organische Lösungsmittel gushing-relevante Substanzen von der Säule löste.

4.2.7 Trennung der Proteine im Treberauszug (*F.culm.*) nach dem Molekulargewicht

Die Trennung der Proteine im Heisswasserauszug nach ihrem Molekulargewicht führte zu einem Kontinuum, das von < 6,5 kDa bis > 97,0 kDa reichte. Eine deutliche Bande war bei ca. 60 kDa erkennbar. Im Bereich um 10 kDa war unter den Ladungsträgern keine spezielle Bande erkennbar, die Hinweise auf gushingrelevante Proteine liefern könnte.

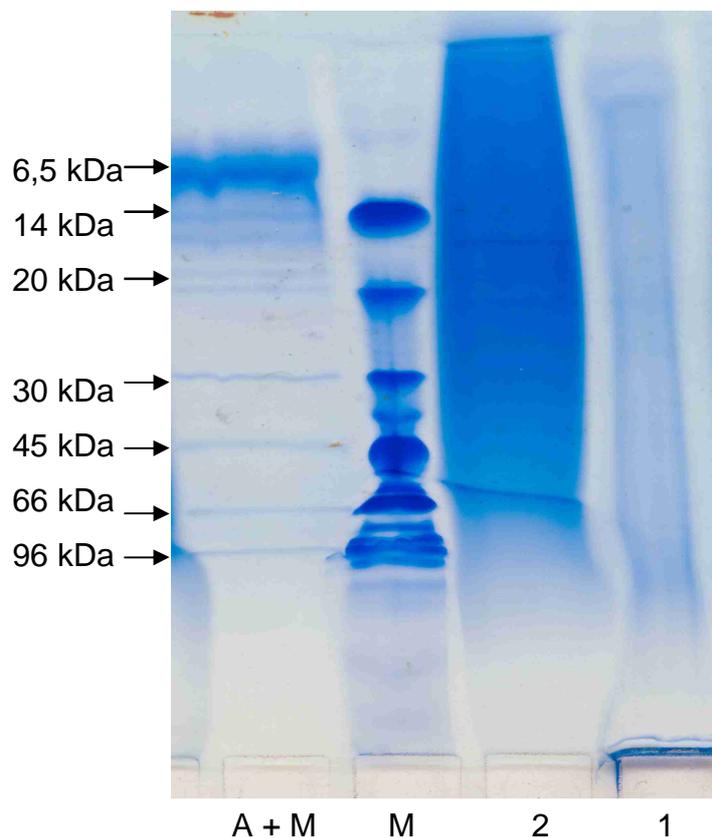


Abbildung 29: Trennung von Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie nach Molekulargewicht (Treber-Auszug von *F. culmorum*)

Gel: T = 12,5 %; C = 2 %

A + M: Aprotinin (bei 6,5 kDa) + Marker

1: IEC – ungebundene Substanzen

M: Marker

2: IEC – gebundene Substanzen

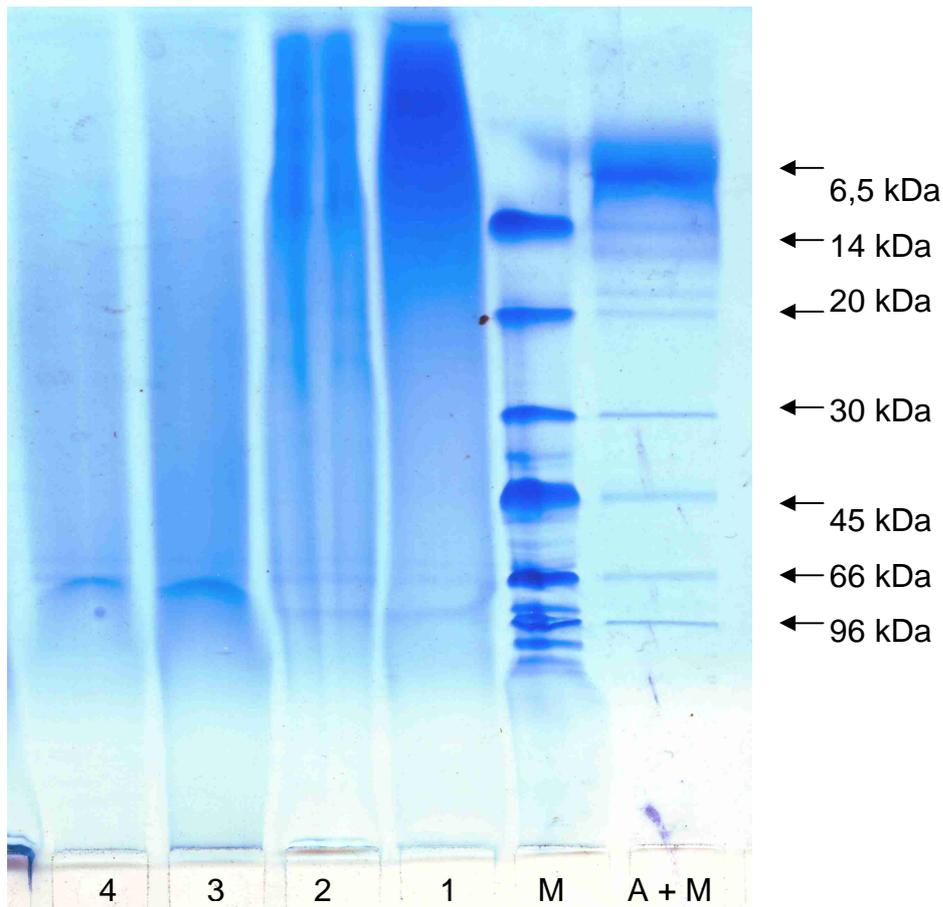


Abbildung 30: **Trennung von Fraktionen der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie nach Molekulargewicht**

Gel: T = 12,5 %; C = 2 %

A + M: Aprotinin (bei 6,5 kDa) + Marker

1: HIC - ungebundene Substanzen

3: HIC - stark gebundene Substanzen

M: Marker

2: HIC - schwach gebundene Substanzen

4: HIC - sehr stark gebundene Substanzen

Ähnlich der Molekulargewichtstrennung der Proteinfraction nach der Ionenaustausch-Chromatographie fiel auch die Proteintrennung nach Molekulargewicht im Anschluss an die Hydrophobe Interaktion unbefriedigend aus: Bei den Fraktionen 1 und 2 waren zwei sehr schwache Banden bei ca. 96 kDa und ca. 66 kDa erkennbar. Das Kontinuum konzentrierte sich auf niedermolekulare Bereiche zwischen ca. 25 kDa und < 6,5 kDa. In den Fraktionen 3 und 4 war eine Bande bei ca. 70 kDa deutlich erkennbar. Hier zog sich das Kontinuum von > 96,0 kDa bis ca. 14 kDa.

Interessant ist, dass kaum niedermolekulare Proteine hydrophobe Molekülabschnitte enthalten. Im Bereich um 10 kDa ist bei den Proteinen mit hydrophoben Molekülbereichen keine Bande erkennbar.

4.2.8 Lipidanalytik

4.2.8.1 Vergleich der Extraktionsmethoden

Die Lipide der Heisswasserauszüge aus Fusarien-infiziertem Treber wurden zunächst per Extraktion nach Soxhlet¹ (nach vorheriger Gefriertrocknung) oder mittels Festphasenextraktion (SPE- Solid Phase Extraction)² gewonnen. Dabei wurde im Extraktor erst mit Petrolether, dann mit Isopropylalkohol extrahiert, bei der SPE umgekehrt.

Jedoch war auch der Extraktionsrückstand von Interesse (vgl. Kap.4.2.8.2). Bei der Soxhlet-Extraktion wurden die Proteine durch Wärme- und Lösungsmittleinwirkung stark denaturiert, während Festphasenextraktionen für Lösungsmittelvolumina von fast 5 l unmöglich erschienen. Zudem führte die Extraktion der polaren Lipide zu dem Nachteil, dass auch Proteine mit extrahiert wurden. Deshalb erfolgte schließlich die Fettextraktion bei -15°C mit Petrolether. Anschließend wurden die polaren Lipide aus dem Lyophilisat mit Dichlormethan : Methanol (2:1) extrahiert.

Festphasen-, Soxhlet-extrahierte und bei -15°C extrahierte polare Lipide enthielten das gleiche Lipidspektrum, außer dass Isopropanolextrakte zusätzlich gelöste Proteine enthielten.

4.2.8.2 Gushingverhalten der Lipide von *F. culmorum*

Die Lipidfraktionen wurden jeweils in wässrigem 5%-igem Ethanol aufgenommen, entsprechend dem Gushingtest carbonisiert, abgefüllt und die Überschäumvolumina bestimmt (siehe Kap. 7.5.1 Gushingtest nach Weideneder h) bis l)³).

¹ RADIN, N.R.: In: Meth. Enzymol. **14**, Academic Press New York 1969, 245

² RADIN, N.R.: In: Meth. Enzymol. **72**, Academic Press New York 1981, 5

³ DONHAUSER, S.; WEIDENEDER, A.; WINNEWISSER, W.; GEIGER, E.: In: Brauereiwelt **129** (1989), 1658

Tabelle 7: **Durchschnittliche Überschäumvolumina der Lipid-Extrakte und des Rückstandes aus *F.culmorum*-Treberauszügen**

	Durchschnitt	Einzelflaschen				
resolvat. Lyophilisat	63 ml	42 ml	36 ml	5 ml	85 ml	78 ml
		105 ml	87 ml	55 ml	13 ml	120 ml
Lyophilisat, Soxhlet entfettet	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
		0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
Lyophilisat, gekühlt entfettet	49 ml	110 ml	2 ml	48 ml	12 ml	23 ml
		62 ml	93 ml	19 ml	26 ml	90 ml
unpolare Lipide, Petrolether-Fraktion (Soxhlet)	0 ml	0 ml	0 ml	1 ml	0 ml	0 ml
		0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
polare Lipide, Isopropanol-Fraktion (Soxhlet)	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
		0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
unpolare Lipide, Tiefkühlextrakt (Petrolether)	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
		0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
polare Lipide, Tiefkühlextrakt (CH ₂ Cl ₂ : MeOH (2:1))	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
		0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml

Nach Soxhlet mit Petrolether entfettete Lyophilisate zeigten kein Gushing. Deshalb wurden die folgenden Proben anstelle der Soxhlet-Extraktion bei ca. 40°C mit tiefgekühltem Petrolether bei -15°C extrahiert. Die carbonisierte Lösung dieses extrahierten Rückstandes zeigte ein beachtliches Gushingpotenzial. Durch eine anschließende Extraktion mit dem tiefgekühlten Lösungsmittelgemisch Dichlormethan : Methanol (2:1) wurden die polaren Lipide entfernt.

Keiner der Lipidextrakte zeigte Gushing. Insgesamt schienen weder die relativ unpolaren noch die polaren Lipide aus dem Treber-Heisswasserauszug von *F. culmorum* einen signifikanten Beitrag zum Gushingpotenzial des Heisswasserauszugs zu leisten: Nach den hier dargestellten Ergebnissen sind den

Lipiden keine gushing-initiatorischen Eigenschaften zuzusprechen. Besäßen die Lipide eine Funktion als Gushing-Promotoren, so wäre die herausgesprudelte Flüssigkeit des gekühlt entfetteten, aufbereiteten Lyophilisats deutlich reduziert gewesen. Handelte es sich um Gushing–Inhibitoren, so hätte das Gushingpotenzial der kalt entfetteten Probe gegenüber der unbehandelten Probe signifikant zugenommen.

4.3 Gerste

Der Weg von der Gerste bis zum Bier bedeutet einen langen Herstellungsprozess mit zahlreichen Verfahrensschritten, die nur schwer im Nachhinein zurückverfolgt werden können. Nur einmal wurde für diese Arbeit der Herstellungsprozesses von der Gerste ab begonnen, da im gesamten Entstehungszeitraum dieser Arbeit kein eindeutig primär gushing-aktives Gerstenmalz zur Verfügung stand. Diese Fusarien-belastete Gerstencharge G8 hatte jedoch den Nachteil, dass sie bereits zwei Jahre alt war, deshalb die Keimenergie etwas gelitten hatte und der Eiweißgehalt extrem hoch war. Trotz der technisch ungünstigen Daten konnte das Getreide im 10-kg-Maßstab am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I vermälzt werden.

Gerste von Freilandversuchen (Erntejahr 2000)

Lagerdauer:	2 Jahre
Keimenergie:	92 %
Eiweißgehalt:	13,4 %
Relevante rote Körner:	12 Stück / 200 g

Der mikrobiologische Befall war sehr hoch: Dem Malz war bereits im Erntejahr mittels PCR ein Befall mit Trichothecenbildnern von über 75 % attestiert worden, wobei es sich laut Erfahrungswerten größtenteils um *F. culmorum* handelte. Es konnte allerdings nicht garantiert werden, ob und inwieweit die Pilzkeime noch lebensfähig waren.

Die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen im Korninneren wurde deshalb am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie durch Auslegen der oberflächen-desinfizierten Körner auf SNA-Agar ermittelt und führte zu folgendem Resultat:

<i>Acremonium strictum</i>	2 %	<i>Epicoccum nigrum</i>	4 %
<i>Alternaria alternata</i>	4 %	Steriles Myzel	22 %
<i>Aspergillus sp.</i>	2 %	Körner ohne Befall	66 %

Es ist bekannt, dass der Schimmelpilzbefall sich bei sachgemäßer Lagerung über Monate reduziert. Dies scheint hier der Fall gewesen zu sein, da nur ein geringer Anteil der Körner mit Lagerpilzen (Aspergillen) befallen ist. Verwunderlich ist dennoch, dass 66% der Körner als befallsfrei bewertet wurde, da nicht einmal steriles Myzel nachweisbar war. Unklar blieb, was aus dem hohen Befall mit ca. 75% Trichothecenbildnern wurde.

Die Würze aus diesem Malz verhielt sich im Gushingtest stabil, sodass das Malz für keine weiteren Versuche verwendet werden konnte.

4.4 Malz

4.4.1 Mykologische Analyse

Leider schien es auch beim Zwischenprodukt Malz unmöglich, den Werdegang von Praxisware im Schema Getreide → Malz → Würze → Bier beim Auftreten von Gushing auch nur eine Produktionsstufe zurückzuverfolgen. Deshalb wurde versucht, mit Hilfe von Produktanalysen Rückschlüsse auf das Edukt zu ziehen.

So wurde je ein im Gushingtest gushendes und ein nicht gushendes Gersten- und Weizenmalz mykologisch untersucht. Die Bestimmung wurde nach Oberflächenbehandlung mit Natriumhypochlorid und nach Auslegung auf SNA am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Weißenstephan durchgeführt.

Der Besatz mit Pilzen war insgesamt sehr gering: Diese Methode eignet sich eigentlich nur für Rohfrucht, da während der Vermälzung – nach anfänglichem Wachstum – der Großteil an Mikroorganismen abgetötet wird.

Das Weizenmalz, das später zum Brauen von Gushingbier verwendet wurde, wurde nicht untersucht, weil es sich um dunkles Malz handelte: Die Überlebenschance von Fusarien in dunklem Malz ist noch geringer als in hellem Malz.

Tabelle 8: Lebende Schimmelpilze in Malzproben

GM- 1: Helles, nicht gushendes Gerstenmalz
 GM 8: Helles, gushendes Gerstenmalz (= G8 vermälzt)
 WM- 1: Helles, nicht gushendes Weizenmalz
 WM+ 1: Helles, gushendes Weizenmalz

	Malzproben-Bezeichnung			
	GM- 1	GM8	WM- 1	WM+ 1
Befallsfrei	46 %	49 %	74 %	42 %
<i>Alternaria alternata</i>	21 %	20 %	0 %	4 %
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0 %	0 %	1 %	0 %
<i>Drechslera sorokiniana</i>	0 %	6 %	0 %	0 %
<i>Epicoccum nigrum</i>	2 %	5 %	0 %	0 %
<i>Fusarium oxysporum</i>	1 %	0 %	0 %	0 %
<i>Fusarium poae</i>	0 %	0 %	0 %	0 %
<i>Fusarium tricinctum</i>	5 %	1 %	0 %	0 %
<i>Fusarium culmorum</i>	0 %	5 %	0 %	1 %
<i>Mucor (mucedo)</i>	1 %	0 %	10 %	39 %
rote Hefen	7 %	6 %	1 %	0 %
weiße Hefen	13 %	24 %	0 %	5 %
<i>Geotrichum candidum</i>	0 %	0 %	5 %	0 %
Bakterien	4 %	4 %	9 %	9 %
rote Körner /200 g Malz	8	7	4	13
davon relevant rote Körner /200 g Malz	0	4	0	7

Leider waren so gut wie keine lebenden Fusarien auf den Malzen feststellbar.

Die auf der Malzprobe GM 8 nachgewiesenen Keime stimmten in keiner Weise mit den Ergebnissen der Gerste (Kap. 4.3) überein. Zwar sind Veränderungen während der Vermälzung zu berücksichtigen. Der starke Rückgang der befallsfreien Körner ist dennoch nicht erklärbar. Möglicherweise liegt das Problem in der Probenahme.

4.4.2 Mykotoxine

Einen Hinweis auf Fusarienbefall der vorliegenden Malze könnte noch eine Mykotoxin-Analyse (insbesondere Trichothecene) geben, da die Pilzgifte hitzestabil sind (, obwohl der Mykotoxingehalt weder der Biomasse des Pilzes noch der Gushingtendenz proportional ist).

Bei negativem Befund können jedoch keine Rückschlüsse auf einen eventuellen Fusarienbefall der Malze gezogen werden, da Fusarien nicht zwangsläufig Mykotoxine bilden.

So wurden ein im Gushingtest gushing-positives, dunkles Weizenmalz (WM+2) und ein gushendes, helles Weizenmalz (WM+1) auf ihre Mykotoxin-Gehalte untersucht. Dazu wurde das am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II standardisierte HPLC-Verfahren angewandt¹.

Die Untersuchungen auf Nivalenol (NIV), Desoxynivalenol (DON) und Ochratoxin A (OTA) verliefen für beide untersuchte Malzproben negativ.

In den HPLC-Diagrammen beider Malzproben war ein sehr kleiner Peak β -Zearalenol (β -ol) zuzuordnen. Der Wert befand sich jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze und konnte deshalb nicht quantifiziert werden.

¹ STETTNER, G.: Diss. TU München, 2000

4.4.3 Malzlipide

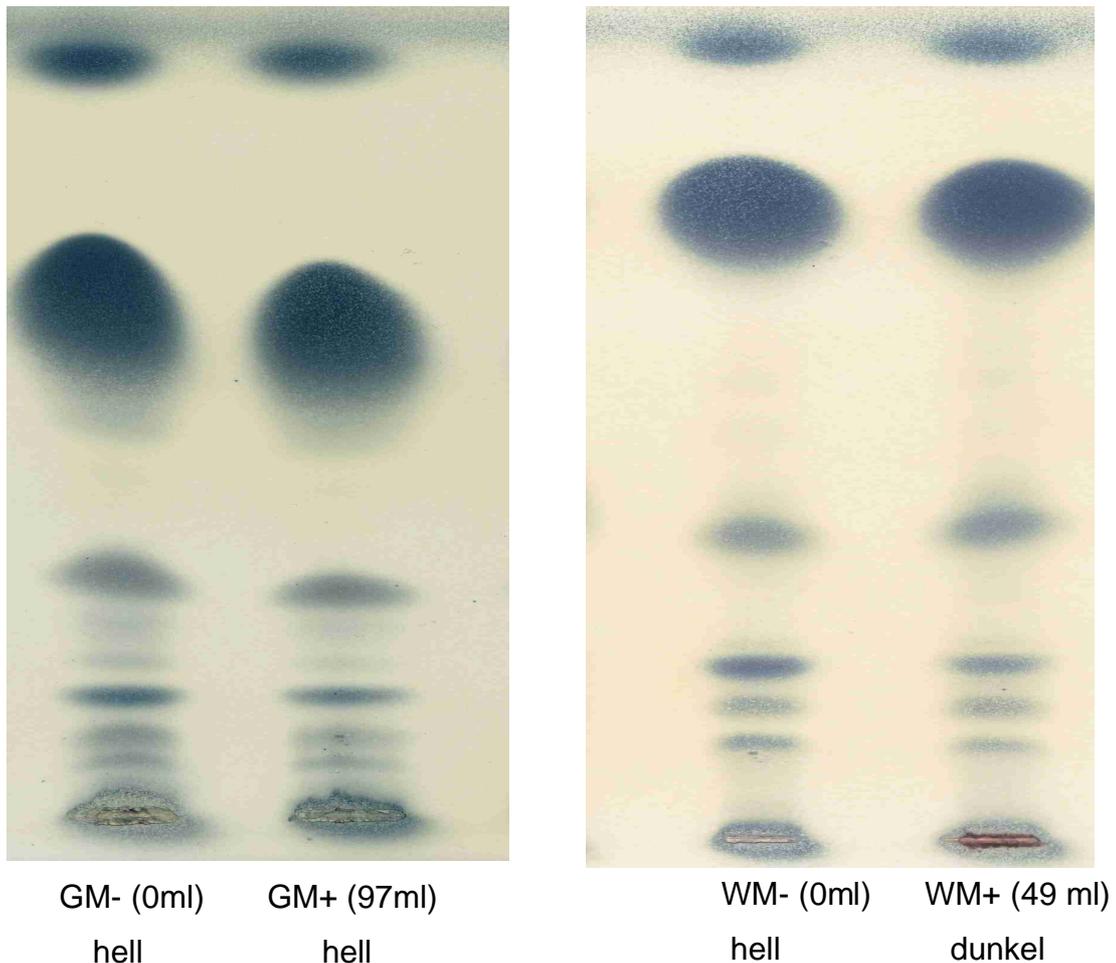


Abbildung 31: **Dünnschichtchromatographische Trennung von Malzlipiden**

GM- (0ml) hell: Helles Gerstenmalz, dessen Würze im Gushingtest nicht überschäumte
GM+ (97ml) hell: Helles Gerstenmalz, dessen Würze im Gushingtest durchschnittlich 97 ml überschäumte

WM- (0ml) hell: Helles Weizenmalz, dessen Würze im Gushingtest nicht überschäumte
WM+ (49ml) dunkel: Dunkles Weizenmalz, dessen Würze im Gushingtest durchschnittlich 49 ml überschäumte

Extraktion siehe Kap. 7.8.4

Im Vergleich diverser Malzlipide zeigten gushing-aktive Malze keine Auffälligkeiten. Die direkt aus den geschroteten Malzen extrahierten Lipide waren sehr hoch konzentriert. Durch die hohe Konzentration malzeigener Lipide (, die im Heisswasserauszug nicht in Lösung gehen), wurden eventuell vorhandene Fusarienlipide überdeckt.

4.5 Würzen

Zu Würzen im 4-Liter-Maßstab war der Zugang leicht, da Hand in Hand mit der Staatlichen Brautechnischen Prüf- und Versuchsanstalt Weihenstephan bei der Durchführung von Praxis-Gushingtests gearbeitet wurde. Die Beschaffung größerer Chargen Fusarien-belasteter Malze war aber aus den zuvor genannten (vgl. Kap. 3.7) und aus Datenschutz-Gründen sehr schwierig. Weiterhin waren gushing-positive Würzen mit Vorsicht zu betrachten, da diese zuerst auf Gushing-Ursachen zu prüfen waren; schließlich sollten nur primär gushing-positive Proben mit gushing-negativen Proben verglichen werden. Diese Voraussetzungen wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals konsequent berücksichtigt. Eventuelle Widersprüche zu früheren Arbeiten anderer Autoren sind vermutlich auf diese Weise erklärbar^{1,2}.

¹ HIPPELI, S.; ELSTNER, E.F.: In: Z. Naturforsch. **57** (2002), 1-8

² WEIDENEDER, A.: Diss. TU München 1992

4.5.1 Allgemeine Analyseergebnisse

Tabelle 9: Analysenwerte von Praxiswürzen

gewonnen nach dem Gushingtest nach Donhauser

GW- 1: Helle, nicht gushende Gerstenmalzwürze (= Würze aus GM-1)

GW+ 1: Helle, gushende Gerstenmalzwürze (= Würze aus GM+1)

GW+ 2: Helle, gushende Gerstenmalzwürze (= Würze aus GM+2)

WW- 1: Helle, nicht gushende Weizenmalzwürze (= Würze aus WM-1)

WW+ 1: Helle, gushende Weizenmalzwürze (= Würze aus WM+ 1)

WW+ 2: Dunkle, gushende Weizenmalzwürze (= Würze aus WM+ 2)

		GW-1	GW+1	GW+2	WW-1	WW+1	WW+2
KH		129 g/l	126 g/l	124 g/l	139 g/l	135 g/l	122 g/l
Protein		0,72 g/l	0,62 g/l	0,72 g/l	0,79 g/l	0,75 g/l	0,65 g/l
rote Körner	Summe	6	5	7	7	11	14
	relevant rot	0	2	4	2	4	nicht bestimmbar
Oxalsäure		35,2 mg/l	35,3 mg/l	34,5 mg/l	54,2 mg/l	46,6 mg/l	66,5mg/l
Ca ²⁺		24,7 mg/l	k.A.	33,6 mg/l	16,0 mg/l	23,1 mg/l	17,4 mg/l
Fe ^{2+/3+}		0,54 mg/l	0,47 mg/l	0,69 mg/l	0,52 mg/l	0,88 mg/l	0,81 mg/l
Al ³⁺		< 0,01 mg/l	0,06 mg/l	<0,01mg/l	<0,01mg/l	<0,01mg/l	0,04 mg/l
Zn ²⁺		0,21 mg/l	0,19 mg/l	0,20 mg/l	0,21 mg/l	0,20 mg/l	0,21 mg/l
Ø ÜSV aus 5 Flaschen		0 ml	32 ml	84 ml	0 ml	83 ml	48 ml

4.5.2 Gushingverhalten

Für weitere Untersuchungen wurden Proben mit möglichst eindeutig positiver bzw. negativer Gushingneigung gesammelt.

Wie sich schon in früheren Arbeiten herausstellte, kann in Anbetracht der bloßen Konzentration sekundär gushingaktiver Substanzen nicht ausgemacht werden, ob

die Würze deshalb überschäumt^{1,2,3,4}. Grenzwerte konnten weder im Experiment festgelegt noch errechnet werden⁵. In der Praxis werden als Richtwerte nur sehr niedrige Oxalsäure- (10 mg/l) und Eisen- (0,1 mg/l) Werte⁶ in Bieren nach der Filtration toleriert, um das Risiko für sekundäres Gushing möglichst gering zu halten. Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, liegen alle untersuchten Würzen sowohl mit ihrer Oxalsäure- als auch mit ihrer Eisenionen-Konzentration weit über den in Bier tolerierten Werten, obwohl zwei der sechs Würzen gar nicht überschäumten. Die hohen Werte sind nicht weiter ungewöhnlich, da die Konzentrationen bei der weiteren Bierbereitung abnehmen.

Zu Forschungszwecken war es nun aber notwendig, Malze mit ausschließlich primären Gushingursachen auszumachen. Deshalb wurden verschiedene chemische und physikalische Untersuchungsmethoden entwickelt, um den Grund für die positive Gushingtendenz eines Malzes ausfindig zu machen⁷.

4.5.2.1 Primäres oder sekundäres Gushing? Zugabe von Calciumionen

Die aus der Praxis übernommene Maßnahme, im Brauwasser Calciumionen zuzuführen, sollte erste Hinweise auf die Gushingursache des Malzes geben. Gushet die Würze nämlich aufgrund von Calciumoxalat-Ausfällungen, so kann durch Einstellung eines günstigeren Calciumionen/Oxalsäure-Verhältnisses vor Kaltlagerung und einer anschließenden Filtration das Überschäumvolumen reduziert bzw. sogar unterbunden werden.

Besonders ausführlich untersucht wurden die gushing-aktiven Malze GM+1 und WM+2 auf der Suche nach Material für ein selbstgebrautes Gushingbier.

¹ GRAY, P.; STONE, I.: In: Brauwissenschaft **11** (1958), 214-219

² SCHILDBACH, R.; MÜLLER, J.: In: Brauwelt (1980), 1648

³ SCHUR, F. et al.: In: Brauerei Rundschau **91** (1980), 201-207

⁴ ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

⁵ JACOB, F.: Handbuch für die produzierende Industrie 1997, 22-24

⁶ JACOB, F.: 38. Technologisches Seminar, Freising-Weihenstephan 2000

⁷ REITER, T.: Semesterarbeit, TU München 2002

Helles Gerstenmalz GM+1

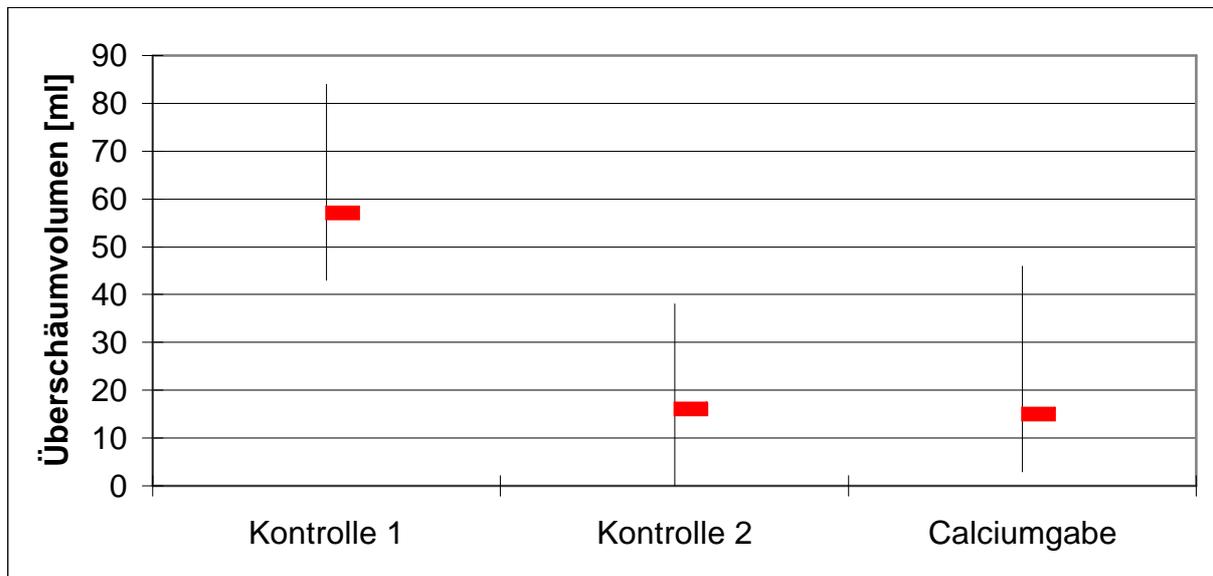


Abbildung 32: **Überschäumverhalten von gushing-aktivem, hellem Gerstenmalz (GW+1) vor und nach Calciumgabe**

Kontrollen 1 und 2: Zusatzfreie, helle Gerstenmalzwürze aus GM+1; Durchschnitt ÜSV 57 ml bzw. 16 ml, berechnet aus jeweils n = 5 Flaschen

Calciumgabe: Helle Gerstenmalzwürze aus GM+1 mit 5,3 mmol/l Ca^{2+} ; Durchschnitt ÜSV 15 ml, berechnet aus n = 10 Flaschen

Der Gerstenmalzwürze wurde die praxisübliche Calciumsalzmenge über das Brauwasser zugeführt¹. Die Dosage betrug 5,3 mmol/l Calciumionen und wurde in Form von 30 %-iger Calciumchloridlösung und Calciumsulfat beigemischt. Hiervon gelangten nur ca. 25% (1,3 mmol) tatsächlich in die Würze, da die gelösten Calciumionen mit verschiedenen Malzbestandteilen schwerlösliche Salze bilden (z.B. Phytinsäure) und im Treber zurückbleiben². Den gelösten Calciumionen stand ein Oxalsäuregehalt von 0,4 mmol/l gegenüber. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die Oxalsäure größtenteils in Form von Calciumoxalat durch Kaltlagerung und Zentrifugation abgetrennt wurde.

Da das verbesserte Verhältnis von Calciumionen zu freier Oxalsäure keine Veränderung bezüglich des Überschäumvolumens mit sich brachte, konnten bei dem

¹ ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

² SCHRÖDER, C.: Semesterarbeit, TU München 1992, 120

hier vorliegenden hellen Gerstenmalz Calciumoxalat-Ausfällungen als Gushingursache ausgeschlossen werden.

Dunkles Weizenmalz WM+2

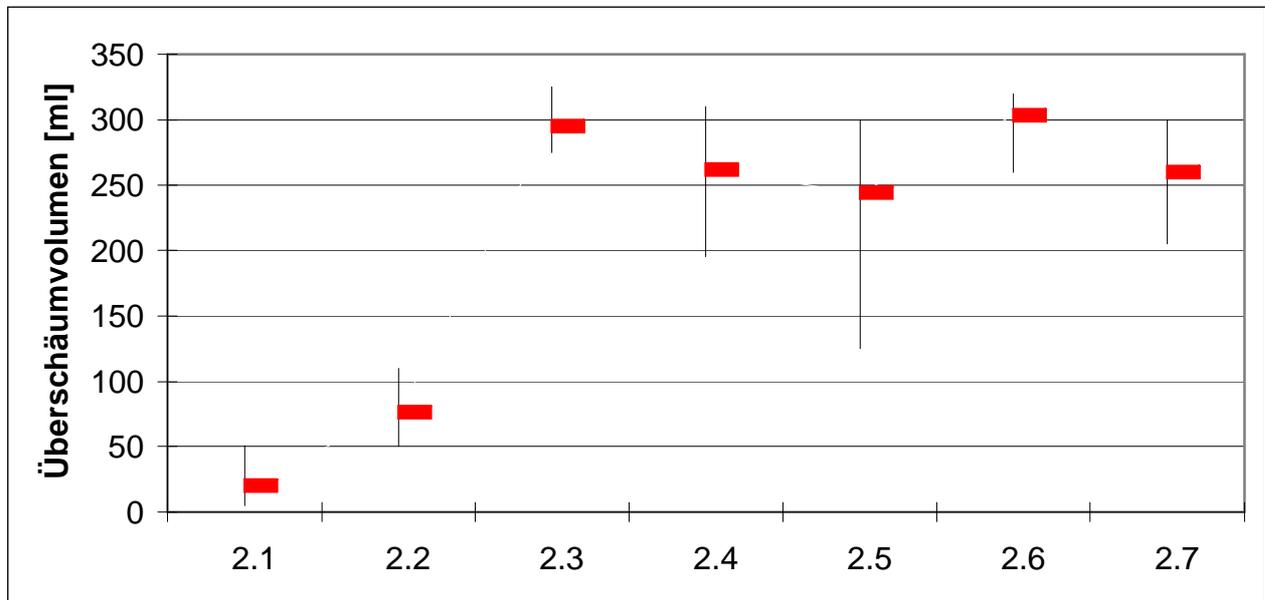


Abbildung 33: **Überschäumverhalten von gushing-aktivem dunklem Weizenmalz (WM+2) vor und nach Calciumgabe;**

Durchschnitt ÜSV aus jeweils n = 10 Flaschen

2.1: Kontrolle 1: Zusatzfreie, dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2	Ø 20 ml ÜSV
2.2: Kontrolle 2: Zusatzfreie, dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2	Ø 76 ml ÜSV
2.3: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit 5,3 mmol/l Ca ²⁺	Ø 295 ml ÜSV
2.4: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit 10,6 mmol/l Ca ²⁺ ; Lagerung: 1 Tag bei 4°C	Ø 262 ml ÜSV
2.5: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit 10,6 mmol/l Ca ²⁺ ; Lagerung: 3 Tage bei 4°C	Ø 244 ml ÜSV
2.6: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit 10,6 mmol/l Ca ²⁺ ; Lagerung: 6 Tage bei 4°C	Ø 303 ml ÜSV
2.7: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit 10,6 mmol/l Ca ²⁺ ; Lagerung: 6 Tage bei 0°C	Ø 260 ml ÜSV

Auch den Weizenmalzwürzen wurden zunächst praxisübliche Calciumsalzmengen (5,3 mmol/l) über das Brauwasser zugeführt. Da jedoch der natürliche Oxalsäuregehalt in Weizenmalzen beträchtlich höher liegt als in Gerstenmalzen, wurde die Calciumdosage hier verdoppelt.

Alle Ansätze mit zudosierten Calciumionen zeigten einen extremen Anstieg der Überschäumvolumina. Das erscheint zunächst sehr verwunderlich. Auch die Zugabe

größerer Calciummengen konnte das Ergebnis nicht verändern, obwohl mit dieser Maßnahme tatsächlich der Oxalsäuregehalt der kaltgelagerten und filtrierten Würze noch weiter gesenkt werden konnte, wie aus den chemischen Analysenergebnissen hervorgeht (vgl. Abb. 34).

Da die Präzipitation von Calciumoxalat neben dem Konzentrationsverhältnis der beiden Komponenten sowohl von der Kaltlagerungsdauer als auch der Temperatur abhängt, wurden auch diese beiden Faktoren variiert¹. Aber auch Variationen bezüglich Kaltlagerungsdauer und -temperatur bewirkten keinerlei Reduktion des Überschäumenvolumens. Folglich konnten verspätet ausgefallene Calciumoxalat-Präzipitate unmöglich die Gushingursache sein.

Das außergewöhnliche Phänomen kann jedoch aus Abbildung 34 erklärt werden: Heftigeres Überschäumen geht mit einem gegenüber der Kontrolle erhöhten Proteingehalt einher. Da sich der Proteinlösungsgrad bei zunehmender Ionenstärke erhöht, steigert die Zugabe von Calciumsalzen die Löslichkeit von einigen Malzproteinen (u.a. Prolamine, vgl. Lit.²). Offensichtlich werden so auch gushing-aktive Substanzen besser aus dem unlöslichen Rückstand herausgelöst.

¹ BURGER, M.; BECKER, K.: In: Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 7 (1949), 102-115

² BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag 1987, 613 f.

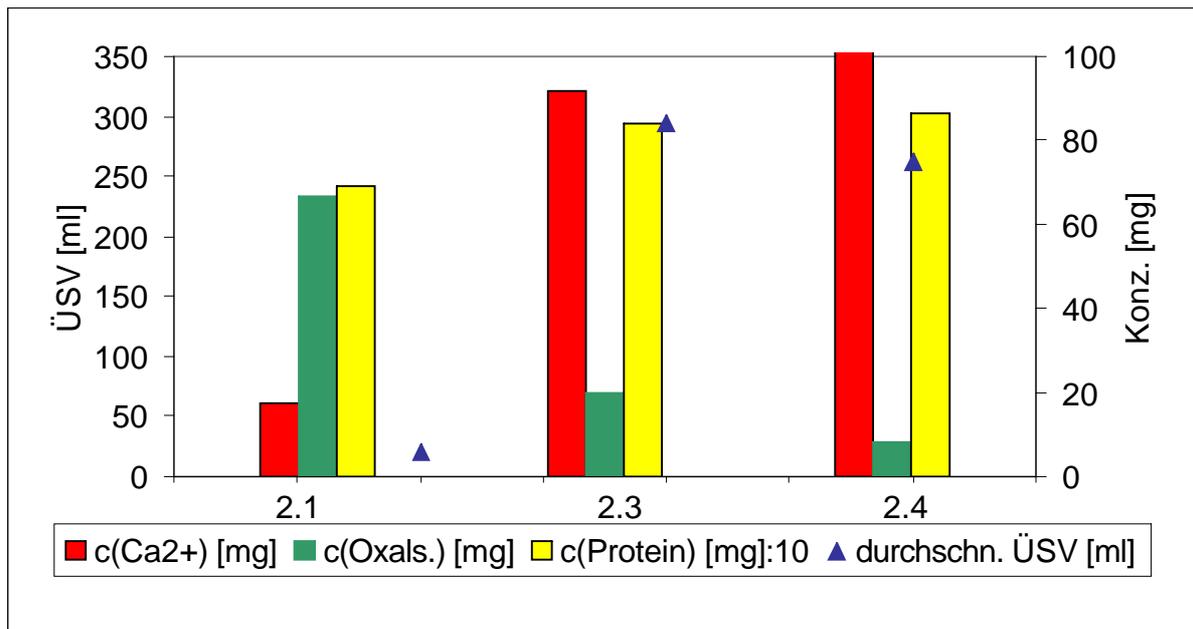


Abbildung 34: **Zusammenhänge verschiedener Parameter bei Variation der Calciumionen-Konzentration**

2.1: Kontrolle 1: Zusatzfreie, dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 Ø 20 ml ÜSV
 2.3: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit 5,3 mmol/l Ca²⁺ Ø 295 ml ÜSV
 2.4: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit 10,6 mmol/l Ca²⁺; Ø 262 ml ÜSV
 Lagerung: 1 Tag bei 4°C
 Konzentrationsbestimmungen nach Vereinigung des Inhalts aller Probenflaschen, aus denen auch das Überschäumvolumen gemittelt wurde

4.5.2.2 Primäres oder sekundäres Gushing? Zugabe eines Komplexbildners (EDTA-Na₂)

Der Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA-Na₂) wurde im Gushingtest nach Donhauser versuchsweise eingesetzt und brachte gegenüber der herkömmlichen Methode besondere Vorteile:

EDTA bildet sechszählige Chelatkomplexe mit allen mehrwertigen Metallkationen, wie auch Fe^{2+/3+} und Zn²⁺ aus. EDTA-Ca²⁺-Komplexe sind nicht ganz so stabil wie die erstgenannten; in einem Überschuss EDTA-Na₂ werden aber sowohl Eisenionen als auch Calciumionen komplex gebunden. Die Metallionen sind dann maskiert: Das heisst, sie können keine chemischen Reaktionen eingehen und damit weder Präzipitate bilden noch Wechselwirkungen mit in der Würze physikalisch gelösten Kohlendioxidmolekülen eingehen. In ionisierter Form bilden sechs der im EDTA⁴⁻ vorhandenen, nicht bindenden Elektronenpaare je eine komplexe Bindung zu dem mehrfach positiv geladenen Metallion aus.

Der Hang zur Komplexbildung ist so stark, dass sogar ausgefallenes Calciumoxalat wieder gelöst und die darin enthaltenen Calciumionen komplexiert werden. Die Substanz EDTA noch ihre Metallionen-Komplexe führen zu Gushing.

Ergänzend waren jedoch die Auswirkungen des Eisen- und Calciumentzugs aus der Würze zu überprüfen: Verändert sich die Trübungsstabilität in den carbonisierten Würzen? Sind Veränderungen insbesondere bezüglich der Proteinlöslichkeit zu erwarten? Inwieweit weicht die Gushingneigung der Würzen mit EDTA-Zusatz von zusatzfreien Würzen desselben Malzes ab?

Um diese Fragen und die Frage der Gushingursache zu klären, wurden aus verschiedenen Praxismalzen je drei Sude gekocht.

- Sud 1 Kontrolle - klassischer Gushingtest nach Donhauser ohne Zusätze
- Sud 2 Gushingtest nach Donhauser mit Zusatz von Calciumsalzen in angemessener Menge beim Einmaischen
 - Gerstenmalzwürzen mit 5,3 mmol Ca^{2+} /l destilliertes Brauwasser
 - Weizenmalzwürzen mit 10,6 mmol Ca^{2+} /l destilliertes Brauwasser
- Sud 3 Gushingtest nach Donhauser mit EDTA-Zusatz (50 mmol EDTA- Na_2) nach Heissfiltration der Würze

Die Calciumsalzgaben wurden wie üblich im Brauwasser zugeführt. EDTA wurde erst nach der Maisch- und Kochzeit in gelöster Form zugegeben, um beim Maischprozess aktive Enzyme (Entzug des Metallions im katalytischen Zentrum des Enzyms) und um die Proteinlöslichkeit nicht zu beeinträchtigen.

Die in Neuglasflaschen abgefüllten Sude wurden auf ihre Überschäumvolumina hin untersucht. Anschließend wurden Kohlenhydrat- und Proteinkonzentration bestimmt.

Tabelle 10: Reaktionen des Gushingverhaltens auf die Zugabe von Calcium-Salzen oder EDTA;
 Durchschnitt ÜSV aus jeweils n = 10 Flaschen

	ØÜSV Kontrolle [ml]	ØÜSV mit Ca ²⁺ [ml]	ØÜSV mit EDTA [ml]	Konzentration					
				Protein Kontrolle [mg/l]	Protein mit Ca ²⁺ [mg/l]	Protein mit EDTA [mg/l]	KH Kontrolle [g/l]	KH mit Ca ²⁺ [g/l]	KH mit EDTA [g/l]
1 GW, hell	26	35	8	502	526	486	131	132	132
2 GW, hell	0	0	0	552	563	555	132	132	131
3 WW, dunkel	109	36	20	544	559	531	131	131	131
4 GW, hell	44	48	3	542	560	551	136	135	136
5 WW, hell	78	62	172	590	600	597	136	136	136
6 WW, hell	120	203	98	445	499	444	138	136	137
7 WW, hell	33	0	0	415	443	422	132	132	132
8 GW, hell	0	0	0	369	370	370	136	135	135
9 WW, hell	155	294	179	575	634	573	132	131	132
10 GW, hell	31	46	0	544	552	545	133	134	134
11 GW+1, hell	19	17	2	396	404	403	132	133	133
12 WW+2, dunkel	54	124	50	455	501	438	134	135	133
13 GW, hell	36	23	169	635	639	623	132	132	133
14 WW, hell	49	64	112	627	640	635	137	137	137
15 GW, hell	67	5	0	633	641	632	135	134	134
16 WW, hell	0	0	0	589	590	584	135	136	135
17 WW, dunkel	180	22	16	577	598	568	136	136	136
18 GW, hell	27	0	0	616	624	618	131	132	131
19 WW, hell	92	77	3	468	472	473	133	131	132
20 WW, hell	63	214	82	528	587	529	137	137	136

Dabei ließen sich alle Würzen in eine der fünf in Tabelle 11 aufgeführten Kategorien einteilen:

Tabelle 11: Zuordnung von Würzen zu verschiedenen Gushingtypen

		Differenz- Überschäumvolumen zur Probe ohne Zusätze ($\Delta \text{ÜSV} = \text{ÜSV}_{\text{Sud2,3}} - \text{ÜSV}_{\text{Sud1}}$)	Differenz- Kohlenhydrat- Konzentration ($\Delta c_{\text{KH}} = c_{\text{KHSud2,3}} - c_{\text{KHSud1}}$)	Differenz Protein- Konzentration ($\Delta c_{\text{P}} = c_{\text{PSud2,3}} - c_{\text{PSud1}}$)
Würze Typ 1	Sud 1	Kein Überschäumen $\text{ÜSV} = 0$		
	Sud 2	Kein Überschäumen $\Delta \text{ÜSV} = 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} > 0$
	Sud 3	Kein Überschäumen $\Delta \text{ÜSV} = 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} = 0$
Würze Typ 2	Sud 1	$\text{ÜSV} > 0$		
	Sud 2	$\Delta \text{ÜSV} > 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} > 0$
	Sud 3	$\Delta \text{ÜSV} = 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} = 0$
Würze Typ 3	Sud 1	$\text{ÜSV} > 0$		
	Sud 2	Kein Überschäumen $\Delta \text{ÜSV} < 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} > 0$
	Sud 3	Kein Überschäumen $\Delta \text{ÜSV} < 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} = 0$
Würze Typ 4	Sud 1	$\text{ÜSV} > 0$		
	Sud 2	$\Delta \text{ÜSV} = 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} > 0$
	Sud 3	Kein Überschäumen $\Delta \text{ÜSV} < 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} = 0$
Würze Typ 5	Sud 1	$\text{ÜSV} > 0$		
	Sud 2	$\Delta \text{ÜSV} = 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} > 0$
	Sud 3	$\Delta \text{ÜSV} > 0$	$\Delta c_{\text{KH}} = 0$	$\Delta c_{\text{P}} = 0$

Die Kohlenhydratkonzentration wurde in keinem Fall beeinflusst. Ähnlich verhielten sich die Proteinkonzentrationen bei Sud 1 und Sud 3. Bei Sud 2 (nach Calciumsalzgabe) steigen die Proteinkonzentrationen aller Sude leicht an, was auf die höhere Ionenstärke zurückzuführen ist.

Bei EDTA-Gaben sinkt die Proteinlöslichkeit nicht, sodass die Aussagekraft des Gushingtests nicht beeinträchtigt wird. Ebenso wenig wurde in Anwesenheit des Komplexbildners die Trübungsstabilität beeinträchtigt.

Den oben aufgeführten Ergebnissen zufolge musste es sich bei Würzen vom Typ 1 um nicht gushende Ware handeln. Die Malze zeigten damit übereinstimmend 0-3 relevant rote Körner pro 200 g bei der Handbonitierung.

Würzen vom Typ 2 hatten primäre Gushingursachen, da ein Übersäumen weder durch Calcium- noch durch EDTA-Gabe unterdrückt werden konnte. Neuglasflaschen und die Abwesenheit von festen Fremdstoffen waren bei allen Untersuchungen auf Gushing vorausgesetzt. Die Malze zeigten damit übereinstimmend mehr als 3 relevant rote Körner pro 200 g bei der Handbonitierung.

Der Proteinlösungsgrad primär gushender Würzen war bereits ohne Zusätze gegenüber nicht gushenden Proben erhöht. Nun wurde der ohnehin höhere Proteinlösungsgrad bei Fusarien-infizierten Malzen durch Erhöhung der Ionenstärke (Calciumsalzgaben) noch verstärkt. Dadurch führte der Calciumzusatz zum Anstieg des Übersäumvolumens (vgl. Kap. 4.5.2.1). Diesem Typus wurde die Würze aus dem dunklen Weizenmalz WM+2 zugeordnet (Tabelle 10, lfd.Nr.12).

Die Gushingneigung von Würzen des Typs 3 war auf Calciumoxalat-Ausfällungen in der Flasche zurückzuführen, weil sich die spontane Gasentbindung bei Druckentlastung sowohl durch Calcium- als auch durch EDTA-Zusatz unterdrücken ließ. Die Malze zeigten damit übereinstimmend 0-5 relevant rote Körner pro 200 g bei der Handbonitierung.

Würzen des Typs 4 gushen aufgrund von Eisenionen: Nur der Zusatz von EDTA verhinderte die Kohlendioxidbindung. Diesem Typen wurde die Würze aus dem hellen Gerstenmalz GM+1 zugeordnet (Tabelle 10, lfd.Nr.11). Die Malze zeigten damit übereinstimmend 0-4 relevant rote Körner pro 200 g bei der Handbonitierung.

Würzen des Typs 5, deren Übersäumvolumen sich nach EDTA-Gabe erhöhte, konnte bisher keiner Gushingursache zugeordnet werden. Die Malze zeigten damit übereinstimmend 0-5 relevant rote Körner pro 200 g bei der Handbonitierung.

4.5.2.3 Primäres oder sekundäres Gushing? Adsorption an hydrophobe Materialien

Gushing-aktive, amphiphile Substanzen, insbesondere Hydrophobine, adsorbieren aus wässrigen Lösungen an wasserabweisende Grenzflächen (, soweit sie sich nicht bereits zu Mizellen zusammengelagert haben). Auf diese Weise sollten Hydrophobine an dem hydrophoben Material angereichert und die Würze von

gushing-initiiierenden Stoffen befreit werden. Deshalb wurden den Würzen jeweils gleiche Mengen Parafilm[®], einem weitgehend inertem Material, zugeführt: Die Zugabe erfolgte im Würze-Gushingtest in Anschluss an die Heiss-Filtration (Kap. 7.5.1 d)) nach Abkühlung auf ca. 50°C, da der Schmelzpunkt des Kunststoffes bei 60°C liegt (vgl. Physikalische Daten von Parafilm, Kap. 4.1.4, Tabelle 3).

Helles Gerstenmalz (GM+1)

Das Verfahren mit dem hydrophobem Material wurde zu Vergleichszwecken am Gerstenmalz GM+1 angewandt, obwohl es aufgrund der Calciumsalz- und EDTA-Gabe als Malztyp 4 (Gushing aufgrund von Eisenionen, vgl. Tabelle 8) klassifiziert worden war. Da hier keine grenzflächenaktiven Gushing-Initiatoren im Spiel sind, dürfte das hydrophobe Material keinen Einfluss auf die Gushingtendenz haben.

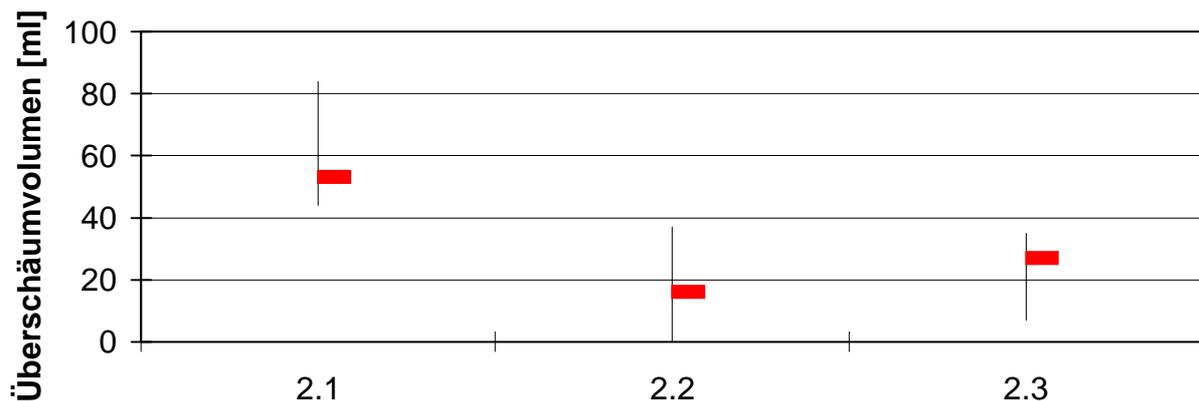


Abbildung 36: **Würzen vor und nach der Zugabe von hydrophobem Adsorptions-**

Material

Durchschnitt ÜSV aus jeweils n = 10 Flaschen

2.1: Kontrolle 1: Zusatzfreie, helle Gerstenmalzwürze aus GM+1 Ø 47 ml ÜSV

2.2: Kontrolle 2: Zusatzfreie, helle Gerstenmalzwürze aus GM+1 Ø 16 ml ÜSV

2.3: Helle Gerstenmalzwürze aus GM+1 mit Zusatz von hydrophobem
Adsorptionsmaterial Ø 27 ml ÜSV

Zusatz von hydrophobem Adsorptionsmaterial: ca. 14 g zerkleinerter Parafilm
(entspricht 0,3 m³ Oberfläche)

Die Zugabe von hydrophoben Materialien zu gushender, heller Gerstenmalzwürze führte tatsächlich zu keiner Veränderung des Überschäumvolumens.

Dunkles Weizenmalz (WM+2)

Anhand der vorhergehenden Versuche konnte bei diesem dunklen Weizenmalz sekundäres Gushing ausgeschlossen werden. Deshalb wurde in den nächsten Versuchen die Modellvorstellung der Blasenbildung durch stabilisierte Mikroblasen angenommen.

Da auch die Hydrophobine in das Spektrum potenzieller Mizellbestandteile gehören, sollte die Würze auf deren Anwesenheit geprüft werden. Laut ELISA-Test, durchgeführt von VTT Biotechnology Espoo, Finnland, sind in Malz WM+2 jedoch keine Hydrophobine vorhanden (leider wurde nur dieses Malz von dem Forscherteam untersucht und der entsprechende Kit wurde bis zum Abschluss der Forschungsarbeiten nicht kommerziell vertrieben). Aufgrund der Unklarheiten, welche Hydrophobine im Test erfasst werden und dem regional variierenden Fusarienvorkommen (vgl. Kap. 3.6.1.2) wurde die Möglichkeit, dass in dem vorliegenden dunklen Weizenmalz Hydrophobine enthalten sind, nicht ausgeschlossen.

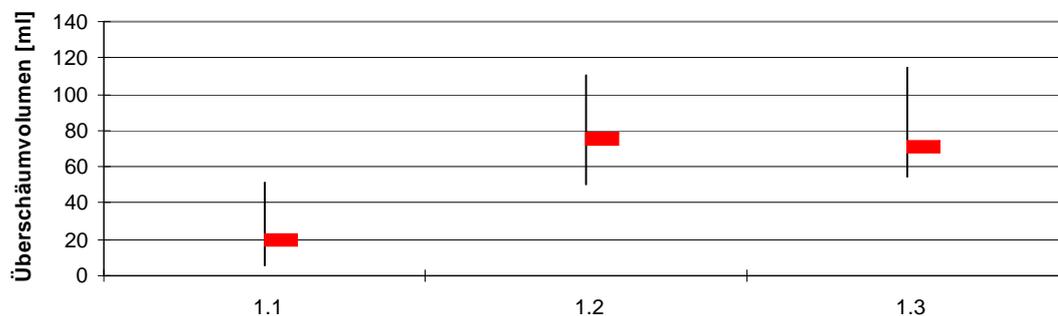


Abbildung 35: **Würzen vor und nach der Zugabe von hydrophobem Adsorptions-Material**

Durchschnitt ÜSV aus jeweils n = 10 Flaschen

1.1: Kontrolle 1: Zusatzfreie, dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 Ø 20 ml ÜSV

1.2: Kontrolle 2: Zusatzfreie, dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 Ø 76 ml ÜSV

1.3: Dunkle Weizenmalzwürze mit Zusatz von hydrophobem
Adsorptionsmaterial Ø 71 ml ÜSV

Zusatz von hydrophobem Adsorptionsmaterial: ca. 14 g zerkleinerter Parafilm
(entspricht 0,3 m³ Oberfläche)

Durch Zugabe von Material mit hydrophober Oberfläche zur Würze ist es nicht gelungen, das Überschäumvolumen der Weizenmalzwürze zu senken. Möglicherweise wurde die hydrophobe Oberfläche von amphiphilen Schaumproteinen besetzt, die zwar keine so starke Affinität zu Parafilm besitzen wie

Hydrophobine und nicht irreversibel binden, die aber um den Faktor 10^6 bis 10^9 höher konzentriert sind. Die Gushing-Initiatoren blieben in der Lösung aktiv.

4.5.2.4 Primäres oder sekundäres Gushing? Zugabe eines kommerziellen Gushing-Inhibitors

Der verwendete, als solcher kommerziell vertriebene Gushing-Inhibitor wird von einer Hopfen-Veredlungsfirma vertrieben und soll auf Basis der gushing-inhibierenden Wirkung von Hopfenölen funktionieren. Hopfenöle gelten als Gushing-Inhibitoren, weil sie zu einem hohen Prozentsatz aus Terpenen bestehen^{1,2}. In Deutschland sind derartige Zusätze mit dem Reinheitsgebot nicht vereinbar. Für den Gushingtest wurden zu Würzen aus den beiden gut untersuchten Gushingmalzen entsprechend den Herstellerangaben je 20 µl (1-5 ppm) des Produkts (in destilliertem Wasser dispergiert) / Gushingtest zugefügt, um die gushing-unterdrückende Wirkung auf primär und sekundär gushende Würzen zu prüfen.

Helles Gerstenmalz mit Gushing-Inhibitor

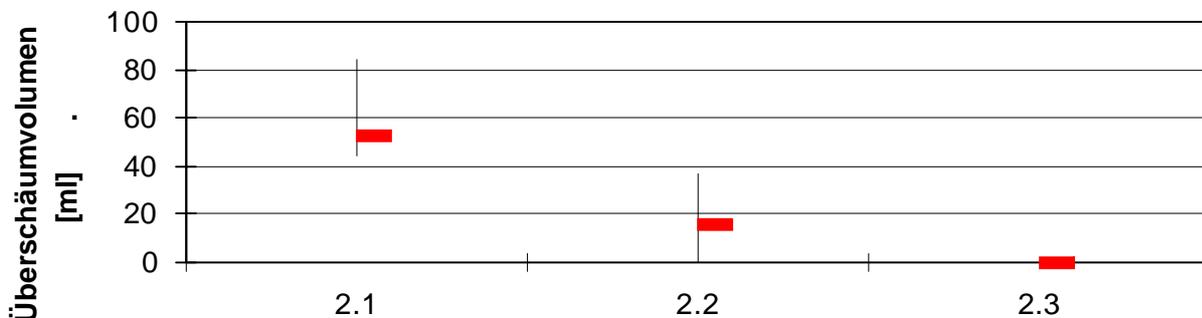


Abbildung 37: Zugabe eines kommerziellen Gushing-Inhibitors zu heller, gushender Gerstenmalzwürze

Durchschnitt ÜSV aus jeweils n = 10 Flaschen

2.1: Kontrolle 1

47 ml ÜSV

2.2: Kontrolle 2

16 ml ÜSV

2.3: Helle Gerstenmalzwürze aus GM+1 mit Zugabe des Gushing-Inhibitors (beim Einmischen)

0 ml ÜSV

Kontrollen 1 und 2: Zusatzfreie, helle Gerstenmalzwürze aus GM+1

Dosierung des Gushing-Inhibitors: 20 µl auf 4,6 l Brauwasser

¹ NARZISS, L.: Abriss der Bierbrauerei, Enke Verlag 1980, 114-115

² ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

Bei der vorliegenden hellen gushenden Gerstenmalzwürze wirkte das Hopfenöl als Gushing-Inhibitor und verhinderte ein Übersäumen vollständig. Da der Gasentbindungsmechanismus von Gushing aufgrund von erhöhten Eisenionen-Konzentrationen nicht ausreichend bekannt ist, können über die Wirkungsweise des Inhibitors nur Vermutungen getroffen werden. Allen Anscheins nach können die Terpene, die nicht zur Mizellbildung in der Lage sind, Gushing aufgrund von Gasresten ohne schützende Membran unterdrücken. Die genaue Klärung dieser Frage hätte den zeitlichen Rahmen der Arbeit gesprengt und hätte außerdem der Zielsetzung entgegengestanden, da die Arbeit auf primäres Gushing ausgerichtet war.

Dunkles Weizenmalz mit Gushing-Inhibitor

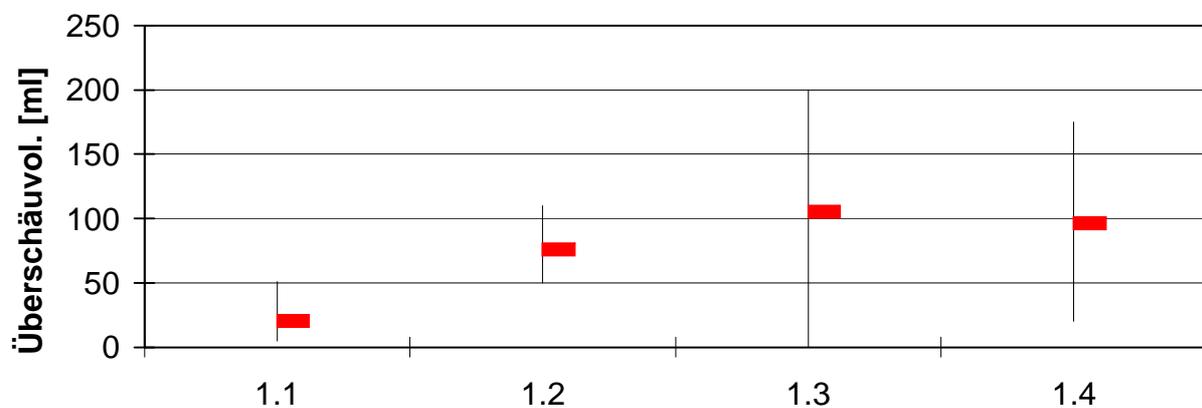


Abbildung 38: **Zugabe eines kommerziellen Gushing-Inhibitors zu dunkler, gushender Weizenmalzwürze**

Durchschnitt ÜSV aus jeweils n = 10 Flaschen

1.1: Kontrolle 1 20 ml ÜSV

1.2: Kontrolle 2 76 ml ÜSV

1.3: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit Zugabe des Gushing-Inhibitors (vor dem Zentrifugieren) 105 ml ÜSV

1.4: Dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2 mit Zugabe des Gushing-Inhibitors (beim Einmischen) 96 ml ÜSV

Kontrollen 1 und 2: Zusatzfreie, dunkle Weizenmalzwürze aus WM+2

Dosierung des Gushing-Inhibitors: 20 µl auf 4,6 l Brauwasser

Bei Test 1.3 wurde das Hopfenöl vor dem Zentrifugieren (Gushingtest Punkt f)) in die kalte Würze gegeben. Bei Test 1.4 wurde das Produkt direkt zum Einmischen (Gushingtest Punkt a)) zugeführt, um den Lösungs- bzw. Verteilungsgrad durch Wärmeeinwirkung und Rühren zu verbessern.

Das als Gushing-Inhibitor bekannte Hopfenöl konnte das Überschäumvolumen dieses primär gushenden Malzes nicht verringern. Terpene können folglich Gushing aufgrund von stabilisierten Mikrobläschen nicht unterdrücken.

4.5.2.5 Primäres oder sekundäres Gushing? Mechanische Behandlung

Zur Untersuchung des Einflusses einer mechanischen Behandlung wurden die Gushingtests nach der etablierten Methode gekocht. Die Würzen wurden wie immer im druckstabilen Corneliusbehälter carbonisiert. Anschließend wurden sie während einer einwöchigen Lagerzeit mehrmals entspannt und wieder aufcarbonisiert bzw. mehrmals kräftig geschüttelt. Danach wurden die Proben wie gewohnt abgefüllt.

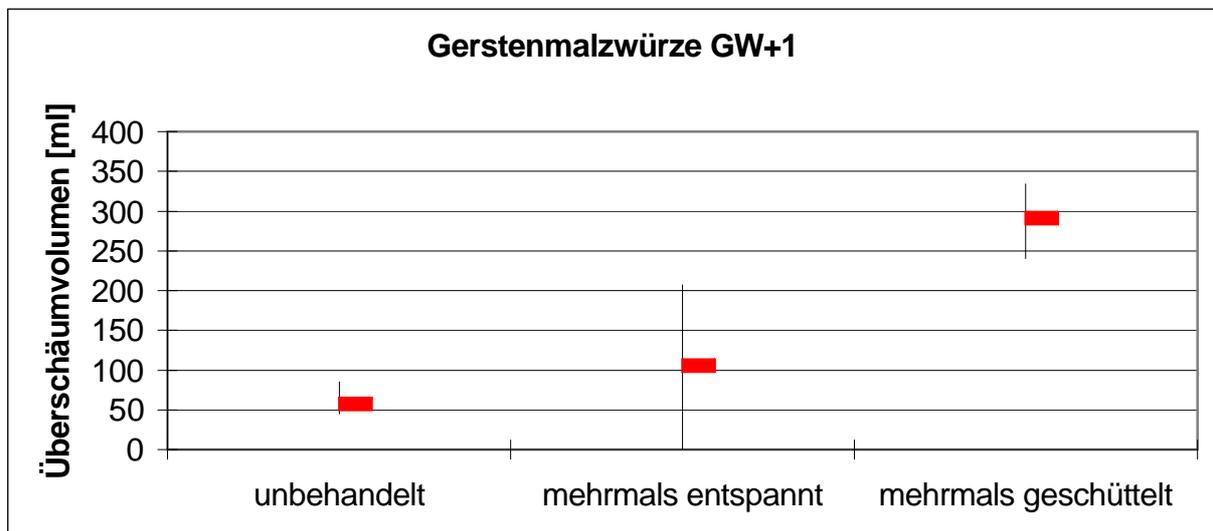


Abbildung 39: **Gushingverhalten von Gerstenmalzwürze nach mehrmaligem Entspannen bzw. Schütteln; Durchschnitt ÜSV aus jeweils 10 Flaschen**

Das Gushingverhalten der Gerstenmalzwürze, die aufgrund von dreiwertigen Eisenionen überschäumt, änderte sich unwesentlich durch mehrmaliges Aufcarbonisieren und Entspannen der Würze. Dies widerlegt ein lang gepflegtes Brauergerücht, dass Biere nach einmaligem Entspannen nie wieder Gushing zeigen würden.

Das mehrmalige Aufschütteln der carbonisierten Würzprobe hingegen verstärkt das bereits vorhandene Gushingpotenzial. Schütteln beschleunigt Diffusionsvorgänge

und ist somit mit einer längeren Lagerzeit zu vergleichen. Anscheinend haben sich so während der Lagerzeit mehr Entbindungskeime gebildet.

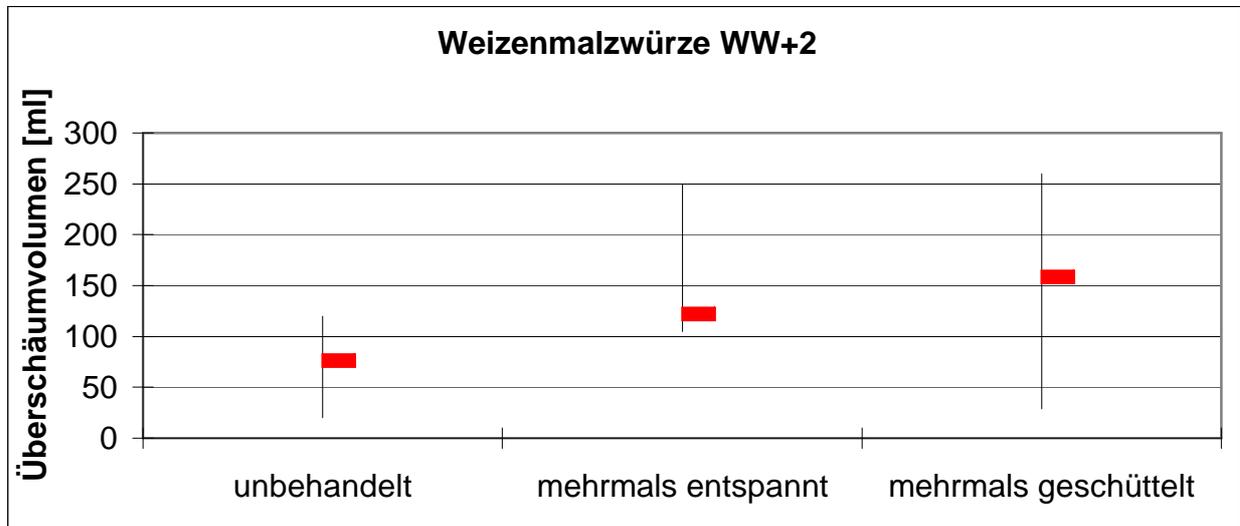


Abbildung 40: **Gushingverhalten von Weizenmalzwürze nach mehrmaligem Entspannen bzw. Schütteln; Durchschnitt ÜSV aus jeweils 10 Flaschen**

Das Überschäumvolumen der primär gushenden Weizenmalzwürze war durch Schütteln nicht mehr wesentlich zu steigern. Vielmehr verbreiterte sich die Spannweite der Überschäumvolumina einzelner Probeflaschen, was aber wohl eher auf statische Zufälligkeiten zurückzuführen ist.

Von großem Interesse war die Tatsache, dass die Proben nach mehrmaligem Entspannen immer noch zu starkem Überschäumen neigten. Dies deutet darauf hin, dass sich entweder so viele Mizellbausteine in Lösung befanden, dass diese erst nach und nach zu Mizellen zusammendiffundierten, sodass selbst nach dem letzten Aufcarbonisieren noch genügend Mizellbausteine vorhanden waren, um sich im gegebenen Zeitraum zu gasdichten Mizellen zusammenzufinden. Oder aber die zerplatzten Mizellhäute sind in der Lage, sich erneut zu Mizelle zu formieren. Ersteres ist sehr unwahrscheinlich, zumal schon für Gushingtests ohne Entspannung längere Latenzphasen bis zur Gushingentwicklung bekannt ist, dass es einer Latenzphase von mehreren Tagen bedarf. Der erneute Zusammenschluss von Mizellhäuten unter Einlagerung von Kohlendioxid ist bei Hydrophobinen schwer vorstellbar, da diese als unlösliche Filme an der Flüssigkeitsoberfläche treiben müssten. Heterogene Mizellbausteine hingegen könnten zwar eher einen

wasserlöslichen Mizellhautfilm ausbilden, der die beobachteten Eigenschaften bedingt. Die fehlenden Komponenten konnten aber in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

4.5.2.6 Vorschlag für einen modifizierten Gushingtest

Um sekundäre Gushingursachen im Gushingtest nach Donhauser et al. auszuschließen, sollten die künftigen Tests unter Zugabe von EDTA durchgeführt werden. Nach der Zugabe von EDTA erhielten in Kapitel 4.5.2.2 sowohl Würzen mit hohen Oxalsäure- als auch mit hohen Eisenionenwerten das Prädikat gushing-stabil. Da malzeigene Eisenionen in der Praxis keine Rolle spielen und gegen Calciumoxalat-Gushing in der Regel Präventivmaßnahmen angewandt werden, ist es sinnvoll, in den Gushingtests nur primär gushende Malze zu beanstanden.

Weiterhin wäre es hilfreich, parallel zu jedem Test Calcium-, Oxalsäure- und Eisenkonzentration in der Würze zur Kontrolle zu bestimmen. Zu bedenken sind hier jedoch die hohen Kosten, die sich auf den Malzpreis niederschlagen.

Zwar liegt dann immer noch eine gewisse Fehlerquote vor, die durch Malze vom Typ 5 hervorgerufen wird; diese liegt aber bedeutend niedriger als die Fehlerquote, hervorgerufen durch Malze der Typen 3 und 4.

4.5.3 Isoelektrische Fokussierung

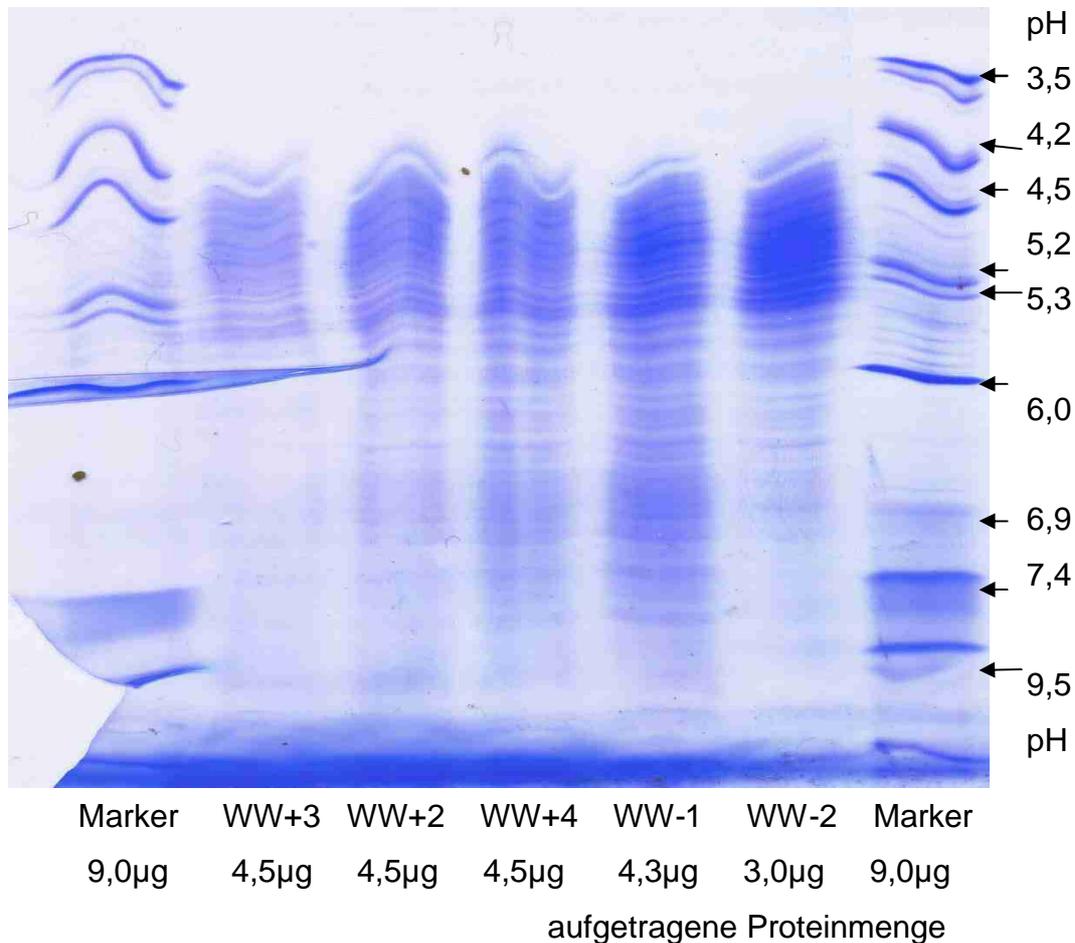


Abbildung 41: **Trennung der Würze Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt**

- pH-Gradient im Gel: 3-7 ohne Spreizung
- WW+3: Helle, primärgushende Weizenmalzwürze
- WW+2: Dunkle, primärgushende Weizenmalzwürze (= Würze aus WM+2)
- WW+4: Helle, primärgushende Weizenmalzwürze
- WW-1: Helle, nicht gushende Weizenmalzwürze (= Würze aus WM-1)
- WW-2: Helle, nicht gushende Weizenmalzwürze

Vergleiche der Proteinspektren von gushenden und nicht gushenden Weizenmalzwürzen sollten eigentlich frühere Ergebnisse bekräftigen, die in gushenden Würzen saurere Proteine fanden als in nicht gushenden^{1,2}. Dies konnte jedoch trotz der Untersuchung mehrerer primär gushenden Weizenmalzwürzen nicht bestätigt werden. Auch im neutralen und alkalischen pH-Bereich zeigten sich bezüglich gushender Proben keinerlei Auffälligkeiten. Es konnte kein Gushingfaktor ausfindig gemacht werden.

¹ WEIDENEDER, A.: Diss. TU München 1992

² HIPPELI, S.; ELSTNER, E.F.: In: Z. Naturforsch. **57** (2002), 1-8

4.5.4 Trennung nach Molekulargewicht

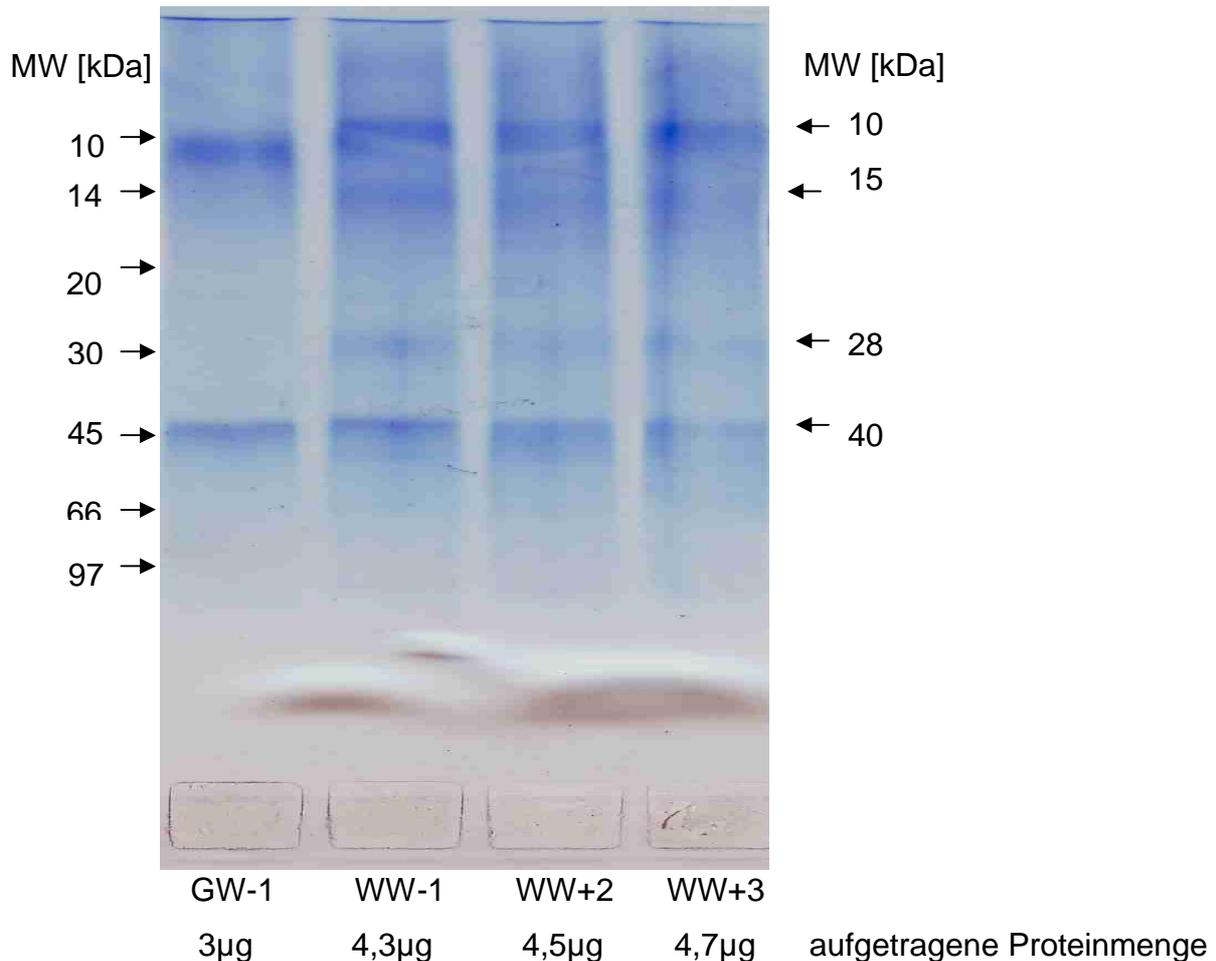


Abbildung 42: **Trennung von Würzproteinen nach ihrer Molekülgröße**

Gel: T = 15 %; C = 2 %

GW-1: Helle, nicht gushende Gerstenmalzwürze (= Würze aus GM-1)

WW-1: Helle, nicht gushende Weizenmalzwürze (= Würze aus WM-1)

WW+2: Dunkle, primärgushende Weizenmalzwürze (= Würze aus WM+2)

WW+3: Helle, primärgushende Weizenmalzwürze

Auch die Trennung der Würzproteine nach dem Molekulargewicht konnte keine gravierenden Unterschiede zwischen gushenden und nicht gushenden Proben aufzeigen. Erkennbar waren bei Gerstenmalz- und Weizenmalzwürzen jeweils Banden gleicher Intensität bei 10 und 40 kDa: Es handelt sich dabei um die schaumaktiven Proteine Lipotransferproteine und Derivate des Proteins Z. Bei Weizenmalzwürzen waren noch weitere Banden bei ca. 15 kDa und bei ca. 28 kDa erkennbar, die jedoch gushenden und nicht gushenden Würzen in gleicher Intensität gemeinsam waren.

Eine anschließend durchgeführte densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels führte zu folgenden Ergebnissen:

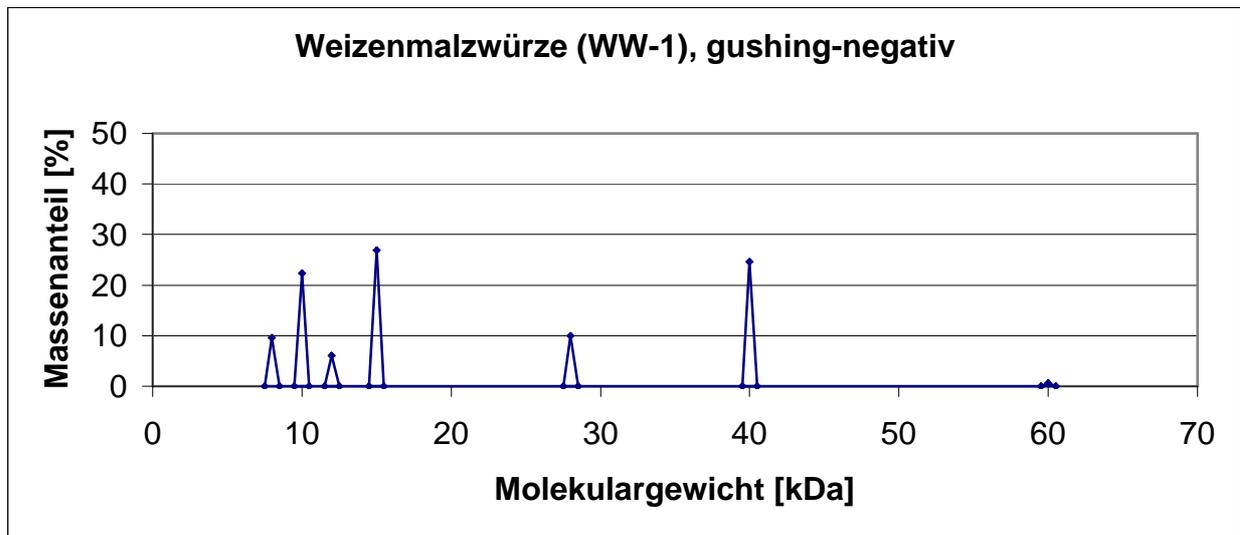


Abbildung 43: **Densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels**

Bahn 2 – gushing-negative Weizenmalzwürze (WW-1)

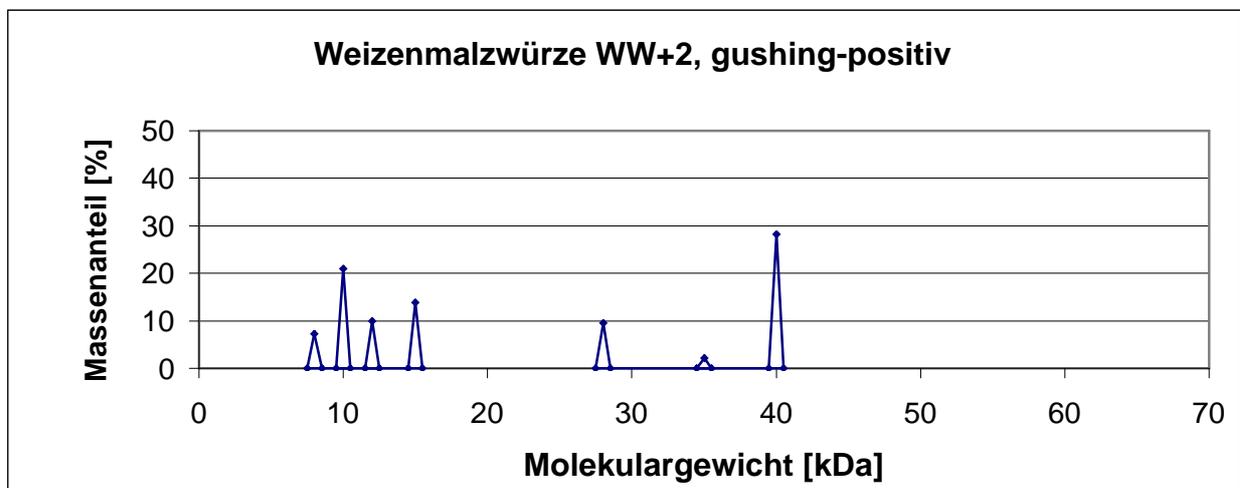


Abbildung 44: **Densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels**

Bahn 3 – gushing-positive Weizenmalzwürze (WW+2)

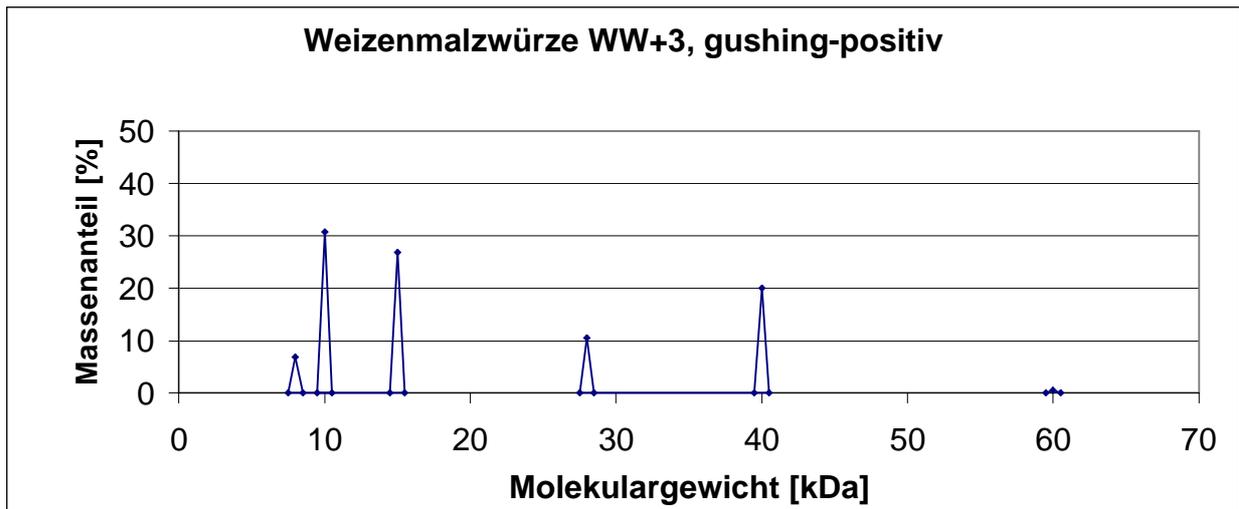


Abbildung 45: **Densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels**

Bahn 4 – gushing-positive Weizenmalzwürze (WW+3)

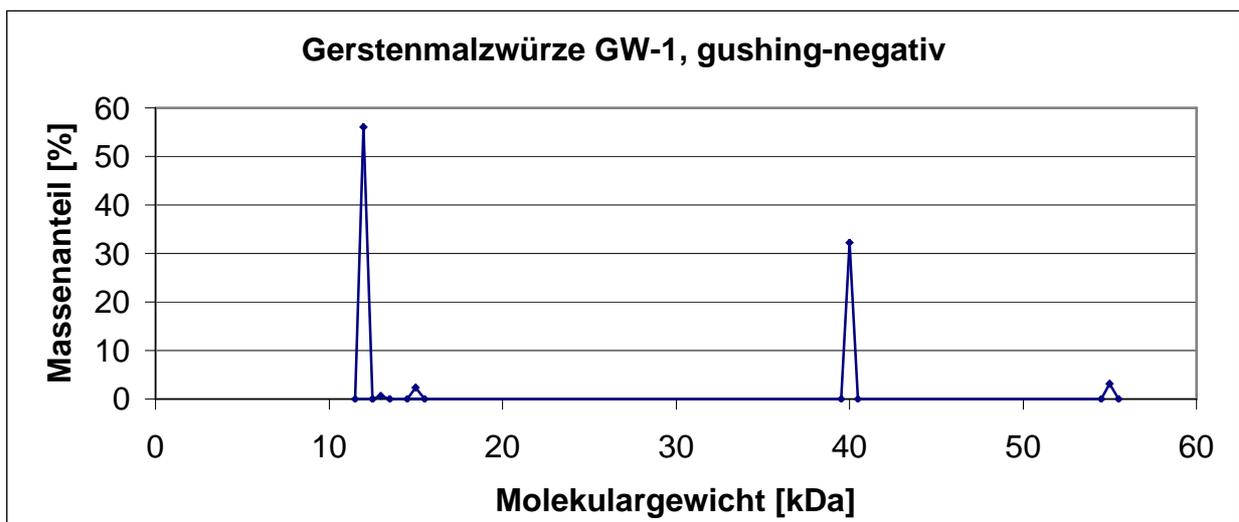


Abbildung 46: **Densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels**

Bahn 1 – gushing-negative Gerstenmalzwürze (GW-1)

Die beiden gushenden Weizenmalzwürzen ließen weder qualitative noch quantitative Gemeinsamkeiten erkennen, die nicht auch die nicht gushende Weizenmalzwürze zeigte. Insofern konnten auch hier keine gushing-verdächtigen Proteine in näheren Betracht gezogen werden.

Gerstenmalzwürze kann offensichtlich mit den Weizenmalzwürzen nicht direkt verglichen werden. Leider stand zu diesem Zeitpunkt der Arbeit keine nachgewiesenermaßen primär gushende Gerstenmalzwürze zur Verfügung.

4.5.5 Würzelipide

Die Lipide von gushenden bzw. nicht gushenden Würzen wurden durch Ausschütteln mit Dichlormethan : Methanol (2:1) extrahiert und konzentriert. Zur direkten Differenzierung pilzlicher und pflanzlicher Lipide wurden die Lipidextrakte aus lyophilisierten Fusarienkulturfiltraten (Dichlormethan : Methanol (2:1)) zum Vergleich herangezogen.

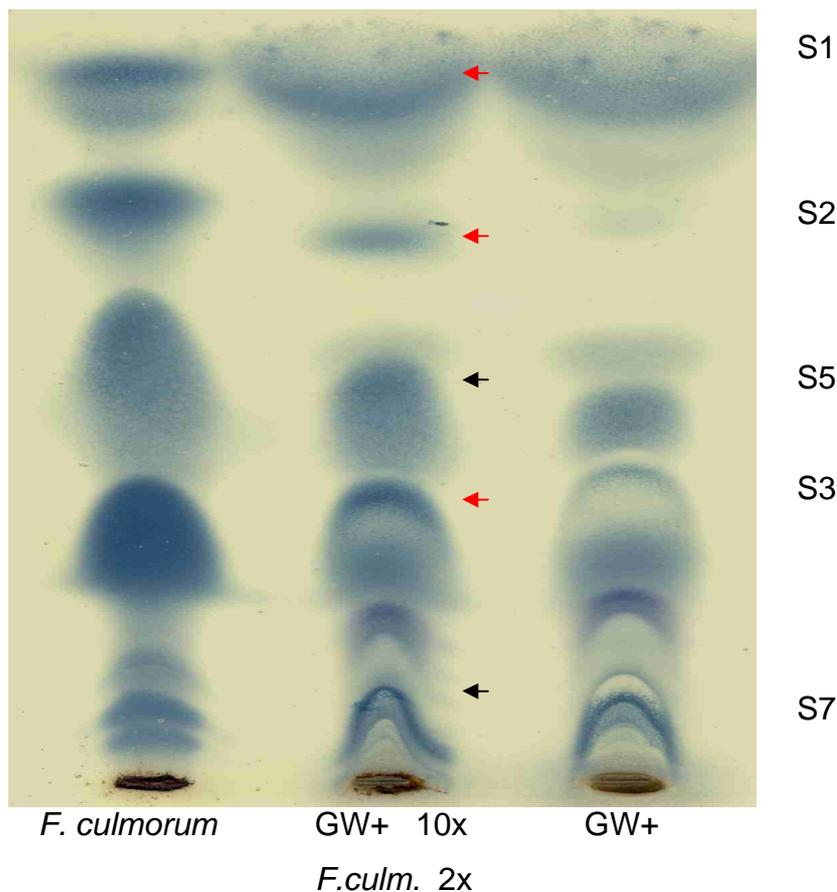


Abbildung 47: **Würzelipide im Vergleich zu Fusarienlipiden**

F. culmorum: Polare Lipidfraktion aus einer Kultur von *F. culm.*, Lipidspots vgl. Kap. 4.1.5.1
GW+: Lipide, extrahiert aus heller, gushender Gerstenmalzwürze mit durchschnittlich 124 ml
Überschäumvolumen im Gushingtest
Lipidextraktion siehe Kap. 7.8.4

Bei der Untersuchung diverser Praxisproben wurde festgestellt, dass ein Teil der in manchen in Gerstenmalzwürzen vorkommende Lipide im Dünnschichtchromatogramm durch Zugabe der Lipidextrakte aus einer beliebigen Fusarienart verstärkt wurden. In Abbildung 47 wurden die Hauptlipidspots S 1, S 2 und S 3 (vgl. Kap. 4.1.5.1) der Fusarien mit roten Pfeilen markiert.

Weiterhin zeigte sich, dass die Würzen - je nach Fusarienbefall - unterschiedlich kräftige Banden besaßen. In den meisten Gerstenmalzwürzen waren die Fusarienlipide kaum erkennbar.

Die Lipide aus Weizenmalzwürzen hingegen ließen sich mit diesem Lösungsmittelsystem nicht auftrennen. Die Lipide störten sich gegenseitig und verschmierten über die gesamte Bahn (vgl. Bierlipide Kap. 4.6.6.)

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals Fusarienlipiden in Getreideprodukten in Bezug auf Gushing Beachtung geschenkt. Mit Hilfe der aus Fusarienkulturen isolierten Referenzlipiden gelang es, diese in Gerstenmalzwürze aufzuspüren.

Diese Methode bietet sich an, den Fusarienbefall von Gerstenmalzen zu bestimmen. Die Vorteile liegen in der kurzen Analysendauer, der Einfachheit, ökonomischer Rentabilität und darin, dass die Malzkörner im Gegensatz zur optischen Auszählung komplett erfasst werden.

Oberstes Ziel war jedoch auch hier, stoffliche Auffälligkeiten mit dem Symptom primäres Gushing in Verbindung zu bringen. Da kein eindeutig primär gushing-aktives Gerstenmalz zur Verfügung stand (vgl. Kap. 4.5.2.2, Tab. 10), ist unklar, ob das Überschäumen dieser Würzen auf primäre Ursachen zurückzuführen war.

Zusammenhänge zwischen Überschäumvolumina und Fusarienlipidkonzentrationen konnten auch nicht gefunden werden, zumal sich Gushingneigung und Biomasse der Fusarien nicht proportional verhalten.

Näheres über diese Zusammenhänge bei Weizenmalzwürzen wird in Kapitel 4.7.2 behandelt.

4.6 Biere

4.6.1 Selbstgebrautes Gushingbier

Neben der Schwierigkeit, zu wissenschaftlichen Zwecken an gushendes Bier zu kommen, war es unmöglich, einem abgefüllten Bier eindeutig die Gushing-Ursache zuzuordnen. Trotzdem wurde wenigstens ein Referenzbier benötigt, das eindeutig primäre Gushing-Ursachen besitzt. Dies war nur möglich, indem aus bekanntem, primär gushing-aktivem Malz selbst Bier gebraut wurde. Für die Analytik am günstigsten war ein Bier aus nur einer Malzcharge (deshalb 100 % Weizenmalz, unverschnitten) mit praxisüblichen Brau- und Gärparametern. Eine anschließende Kieselgel-Filtration ersparte den Umgang mit suspendierter Hefe und anderen Trübungspartikeln.

Das zur Verfügung stehende, zu starkem Gushing führende Weizenmalz WW+2 (im Gushingtest) war in den Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2 rundum untersucht und die Gushing-Ursachen als primär bestätigt worden.

Dieses Malz wurde unter Zugabe von Calciumsalzen (10 mmol/l) eingemaischt. Die Stammwürze wurde für das gewünschte Kristall-Weißbier mit 100 % Weizenanteil auf 12,6 % eingestellt. Die Speisegabe wurde so berechnet, dass das Bier 7 g/l Kohlendioxid enthalten sollte. Die Nachgärung dauerte drei Tage. Nach der Hefeernte wurde über einen Plattenfilter filtriert. Das Filtrierhilfsmittel wurde zuvor von wasserlöslichen Kationen mit destilliertem Wasser befreit. Das Bier war in drei Gärbehältern nachvergoren worden; diese drei Fraktionen wurden während des Filtrationsvorgangs separat behandelt. Nach der Filtration wurden alle drei Filtrate zusätzlich auf gushing-kritische Kationen und Oxalsäuregehalte überprüft, um sekundäres Gushing sicher ausschließen zu können. Die Filtrate wurden daraufhin unverschnitten zum späteren Vergleich in Neuglasflaschen abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Tabelle 12: **Analytische Daten des selbstgebrauten Gushingbieres Sud 1**

	Filtrat 1	Filtrat 2	Filtrat 3
Kohlenhydrate	20,7 g/l	22,3 g/l	19,9 g/l
Protein	0,64 g/l	0,68 g/l	0,65 g/l
Oxalsäure	12,3 mg/l	9,6 mg/l	8,9 mg/l
Ca ²⁺	119,3 mg/l	114,2 mg/l	115,6 mg/l
Fe ^{2+/3+}	0,12 mg/l	0,13 mg/l	0,10 mg/l
Al ³⁺	0,25 mg/l	0,29 mg/l	0,29 mg/l
Zn ²⁺	0,06 mg/l	0,17 mg/l	0,24 mg/l
ÜSV			
nach 6 Wochen	0 ml	0 ml	0 ml
nach 8 Wochen	106 ml	123 ml	221 ml
nach 10 Wochen	50 ml	61 ml	24 ml
nach 12 Wochen	45 ml	75 ml	90 ml

Geöffnete Kontrollflaschen mit selbstgebrautem Bier schäumten während der ersten Wochen überhaupt nicht über. Erst acht Wochen nach dem Abfülldatum trat Gushing auf. Da sich nun die Übersäumvolumina umgekehrt proportional zum Eisengehalt der drei Filtrate verhielten (vgl. Tab.12) und bereits die Würze überprüft worden war, wurden die Metallionen als Gushing-Initiatoren ausgeschlossen.

Die zunehmenden Zinkgehalte konnten leider nicht erklärt werden. Eine Untersuchung des Filtermaterials auf den löslichen Zinkgehalt führte nicht zum Ergebnis.

Die Ergebnisse sind gleichzeitig eine Bestätigung des Gushingtests nach Donhauser, da dieser das verwendete Malz - im Gegensatz zum ELISA-Test auf Hydrophobine von *Fusarium poae* - richtig einstuft.

Das Bier wurde für Protein- und Lipidanalysen verwendet, sowie in Kapitel 4.7 für Zusätze anderer Substanzen mit Verdacht auf Gushingrelevanz eingesetzt.

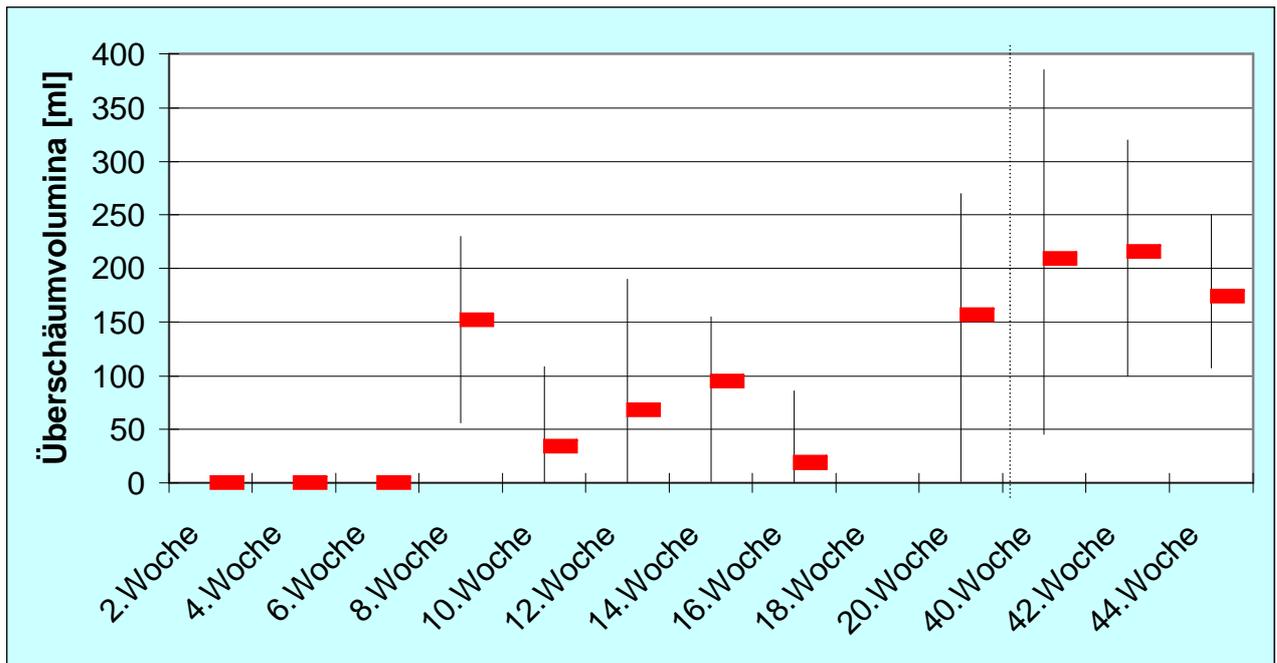


Abbildung 48: **Zeitliche Entwicklung der Überschäumvolumina beim selbstgebrauten Bier Sud 1**

Durchschnitt ÜSV aus jeweils 2 Flaschen der drei Filtrate

Die zeitliche Entwicklung der Überschäumvolumina ist ein altbekanntes Phänomen. Die Latenzphase lässt sich mit der Notwendigkeit erklären, dass die Mizellbausteine erst durch Diffusionsvorgänge zusammenfinden müssen. Hat Gushing aber erst einmal Fuß gefasst, hält es sich über Monate.

Anschließend wurde ein zweiter Sud mit dem gleichen Malz eingebraut, der sich vom ersten nur in folgenden Parametern unterschied:

- Es wurden längere Eiweißrasten eingehalten, um gebundene Gushingfaktoren besser herauszulösen
- Die Kochzeiten wurden verkürzt, um intensive Hitze-Koagulationen und ausgeprägte Modifizierungen der am Gushing beteiligten Substanzen zu vermeiden¹

Tabelle 13: Analytische Daten des selbstgebrauten Gushingbieres Sud 2

	Filtrat 1	Filtrat 2	Filtrat 3
Kohlenhydrate	21,6 g/l	26,4 g/l	25,6 g/l
Protein	0,66 g/l	0,70 g/l	0,63 g/l
Oxalsäure	11,6 mg/l	10,3 mg/l	14,4 mg/l
Ca ²⁺	110,8 mg/l	114,4 mg/l	115,8 mg/l
Fe ^{2+/3+}	0,14 mg/l	0,16 mg/l	0,17 mg/l
Al ³⁺	0,28 mg/l	0,24 mg/l	0,20 mg/l
Zn ²⁺	0,15 mg/l	0,02 mg/l	0,13 mg/l
ÜSV			
nach 10 Wochen	0 ml	0 ml	0 ml
nach 12 Wochen	16 ml	12 ml	11 ml
nach 14 Wochen	15 ml	11 ml	22 ml
nach 16 Wochen	45 ml	23 ml	43 ml

¹ PELLAUD, J.: In: Interbrew Technology Development, Leuven, Belgium

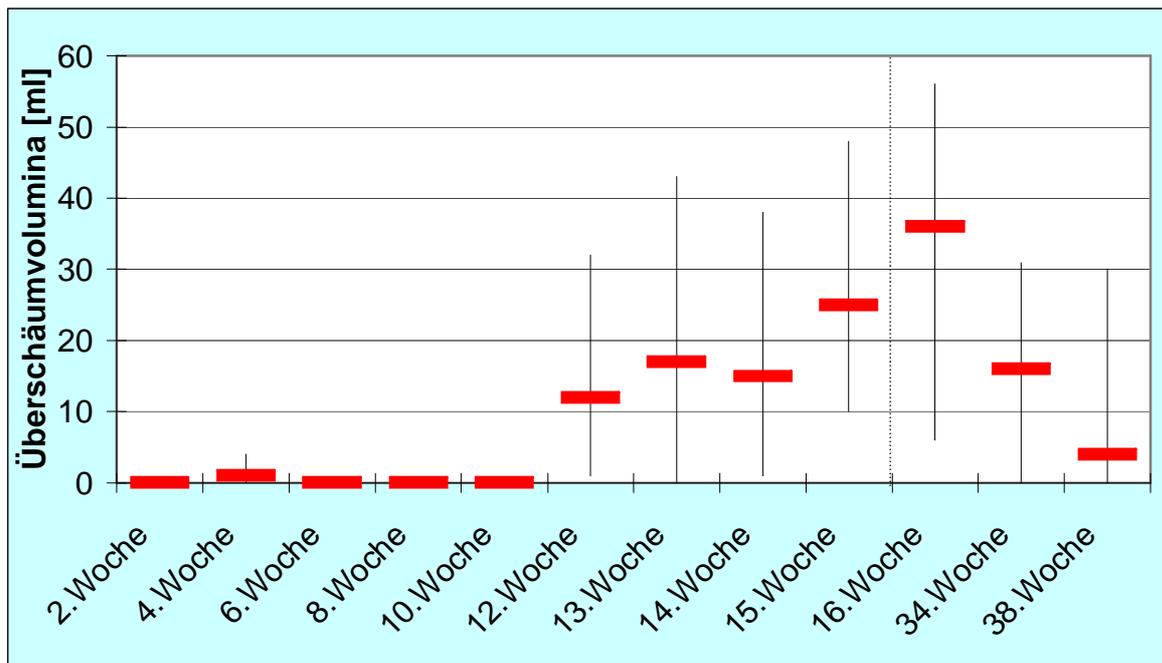


Abbildung 49: **Zeitliche Entwicklung der Überschäumvolumina beim selbstgebrauten Bier Sud 2**

Durchschnitt der drei Filtrate

Sud 2 zeigte in puncto Metallionenkonzentrationen keinerlei Auffälligkeiten. Bei den Zinkionen war hier von Filtrat 1 bis Filtrat 3 kein Trend erkennbar. Auch hier wurden die drei Filtrate unverschnitten in Neuglasflaschen abgefüllt.

Trotz der veränderten Parameter, die nach Literaturangaben das Gushingpotenzial hätten verstärken sollen, zeigte der Biersud 2 gegenüber Sud 1 keine verstärkte Gushingneigung. Stattdessen dauerte es bis zum Auftreten des Gushing-Phänomens umso länger. Alle untersuchten organischen Substanzen traten in Sud I und II in weitgehend gleichen Konzentrationen auf. Auffällig ist, dass die Veränderung der Brauparameter keine merkliche Änderung der Proteinkonzentrationen mit sich brachte, obwohl dies laut Literatur zu erwarten war.

Das überraschend hohe Überschäumvolumen von Sud 1 könnte daran liegen, dass beim Kochprozess der Würze zwar die gushing-initiiierenden Hydrophobine reduziert wurden, im Gegenzug aber Gushing-Inhibitoren ausgeschieden wurden.

Auch beim zweiten Sud blieb die Gushingneigung, die sich nach der Latenzphase eingependelt hatte, über Monate erhalten.

4.6.2 Zerschäumung

Die Zerschäumung bot sich als einfache Möglichkeit an, grenzflächenaktive Substanzen schonend anzureichern. Bei der Zerschäumung wird ein unpolares Gas durch eine Flüssigkeit geleitet. Die Grenzfläche Gas-Flüssigkeit wird dadurch vergrößert, dass das Gas durch eine Glasfritte in die Flüssigkeit gelangt und als winzige Bläschen fein verteilt durch die flüssige Phase aufsteigt. Dabei adsorbieren in der Flüssigkeit gelöste amphiphile Substanzen an die hydrophobe Bläschenoberfläche des unpolaren Gases. Die amphiphilen Substanzen steigen im Schaum auf, der im Kopfraum der Säule durch Regulierung des Gasdurchflusses möglichst „trocken“ werden soll, und sind im abgetrennten Spumat in erhöhter Konzentration zu finden.

Voraussetzung für eine Zerschäumung ist jedoch eine Flüssigkeit mit hoher Schaumstabilität, weswegen sich die Methode gut für Bier, weniger aber für Treber-Heisswasserauszüge oder Würzen eignet.

Es wurden pro Versuchsansatz je zwei Liter Bier mit Stickstoffgas solange zerschäumt (, weil dieses Gas im Gegensatz zu Kohlendioxid völlig unpolar ist), bis bei konstantem Gasdurchfluss kein Schaum mehr übertrat (ca. 70 ml Spumat war entstanden). Die Spumate wurden gushenden und nicht gushenden Würzen und Bieren zugeführt (siehe Kap. 4.7.2.3 und 4.7.2.4). Weiterhin sollten eventuelle Unterschiede zwischen Rückstand und Spumat festgestellt und die jeweiligen Proteinspektren elektrophoretisch untersucht werden (siehe Abb. 50 bzw. Kap. 4.6.3 und 4.6.4).

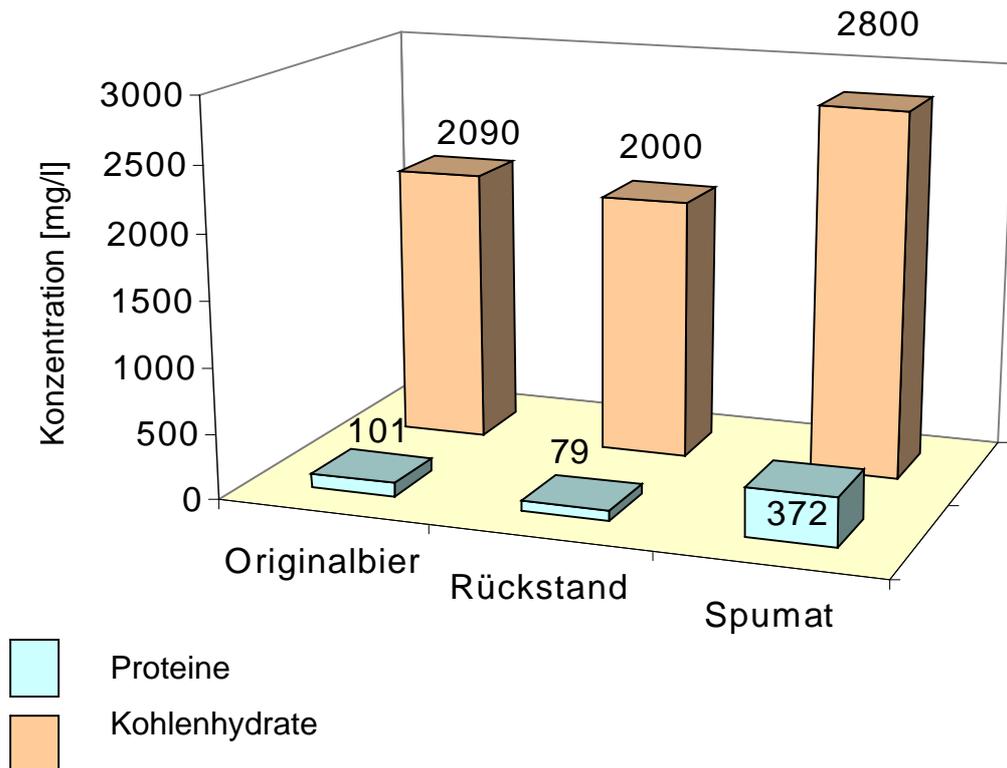


Abbildung 50: **Konzentrationsverhältnisse von Proteinen und Kohlenhydraten im Originalbier, Rückstand und Spumat**

Die Fraktionen enthielten folgende Absolutmengen:

	Originalbier	Rückstand	Spumat
Protein	202 mg	153 mg	26 mg
Kohlenhydrate	4,2 g	3,9 g	196 mg
Flüssigkeitsvolumen	2 l	1,93 l	0,07 l

Wie sich aus Abbildung 50 gut erkennen lässt, wird die Kohlenhydrat-Konzentration während der Zerschäumung nur leicht erhöht, da Kohlenhydrate nicht grenzflächenaktiv sind. Sie werden lediglich aufgrund von Wechselwirkungen mit amphiphilen Proteinen und in Form von Glykoproteinen im Spumat leicht angereichert. Die Proteine hingegen sind im Spumat in mehr als der 3-fachen Konzentration des Originalbieres wiederzufinden. Entsprechend nimmt die Proteinkonzentration im Rückstand im Vergleich zum unzerschäumten Bier leicht ab. Daraus kann gefolgert werden, dass in Bier enthaltene Proteine zu einem hohen Prozentsatz grenzflächenaktiv sind. Das Spumat dürfte sowohl schaumaktive als auch gushing-aktive Proteine / Substanzen in erhöhter Konzentration enthalten.

Insgesamt sind im Spumat 3 % des Gesamtbiervolumens und 26 % der Proteine wiederzufinden. Folglich enthält Bier einen hohen Anteil an grenzflächenaktiven Stoffen (größtenteils Proteine), zu deren Anreicherung sich die Zerschäumung bestens bewährt hat.

4.6.3 Isoelektrische Fokussierung

Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte von im Spumat angereicherten Proteinen aus gushendem Bier erfolgte wiederum unter besonderer Berücksichtigung, dass gushing-verdächtige Proteine extrem viele saure Aminosäurereste besitzen sollen. Folglich wurde beim Trennungsgel in diesem pH-Bereich eine Spreizung gewählt.

Aus Abbildung 51 geht hervor (unterschiedliche Auftragsmenge beachten!), dass bei gushendem Bier im Rückstand im Vergleich zum Spumat mehr Proteine mit neutralem isoelektrischen Punkt (pI) vorkommen. Damit ist also tatsächlich der Anteil saurer Proteine unter den amphiphilen Proteinen erhöht. Die von Weideneder beschriebenen sauren, gushing-aktiven Proteine sollen jedoch pI-Werte zwischen pH 1,6 besitzen und 4,6 besitzen¹. Im pH-Bereich < 4,2 sind im hier dargestellten Elektrogramm auf keiner Bahn Proteinbanden zu erkennen (vgl. Würzproteine). Da Asparaginsäure, die sauerste biogene Aminosäure, einen pI-Wert von 2,98 besitzt, würde ein Proteine, dass ausschließlich aus dieser Aminosäure zusammengesetzt ist, eben diesen pI-Wert aufzeigen. Proteine mit pI-Werten unterhalb dieses Wertes sind nicht bekannt. Die pKs-Werte von Oxalsäure hingegen liegen bei pKs(1) = 1,46 und pKs(2)= 4,40.

Auch im Vergleich der Spumate von gushendem und nicht gushendem Kristallweizenbier fallen Banden saurer Proteine bei Gushingbier auf. Zu beachten ist allerdings die Herstellung des nicht gushenden Weißbieres aus hellem Gerstenmalz (ca. 49 %) und Weizenmalz (ca. 51 %), während das gushende Bier aus 100 % dunklem Weizenmalz gebraut wurde. Auf Bahn 4 wurde das Spumat eines nicht gushenden untergärigen Bieres aufgetragen. Dieses lässt erkennen, dass die pI-Werte von Gerstenmalzproteinen noch weniger in den sauren pH-Bereich reichen als

¹ WEIDENEDER, A.: Diss. TU München 1993

die des nicht gushenden Weißbieres. Somit nimmt das aus der Malzmischung hergestellte Bier eine Mittelstellung zwischen den anderen beiden Bieren bezüglich des Proteinspektrums ein.

Zusammenhänge mit dem Gushingpotenzial sind in den Kapiteln 4.7.2.3 und 4.7.2.4 dargestellt.

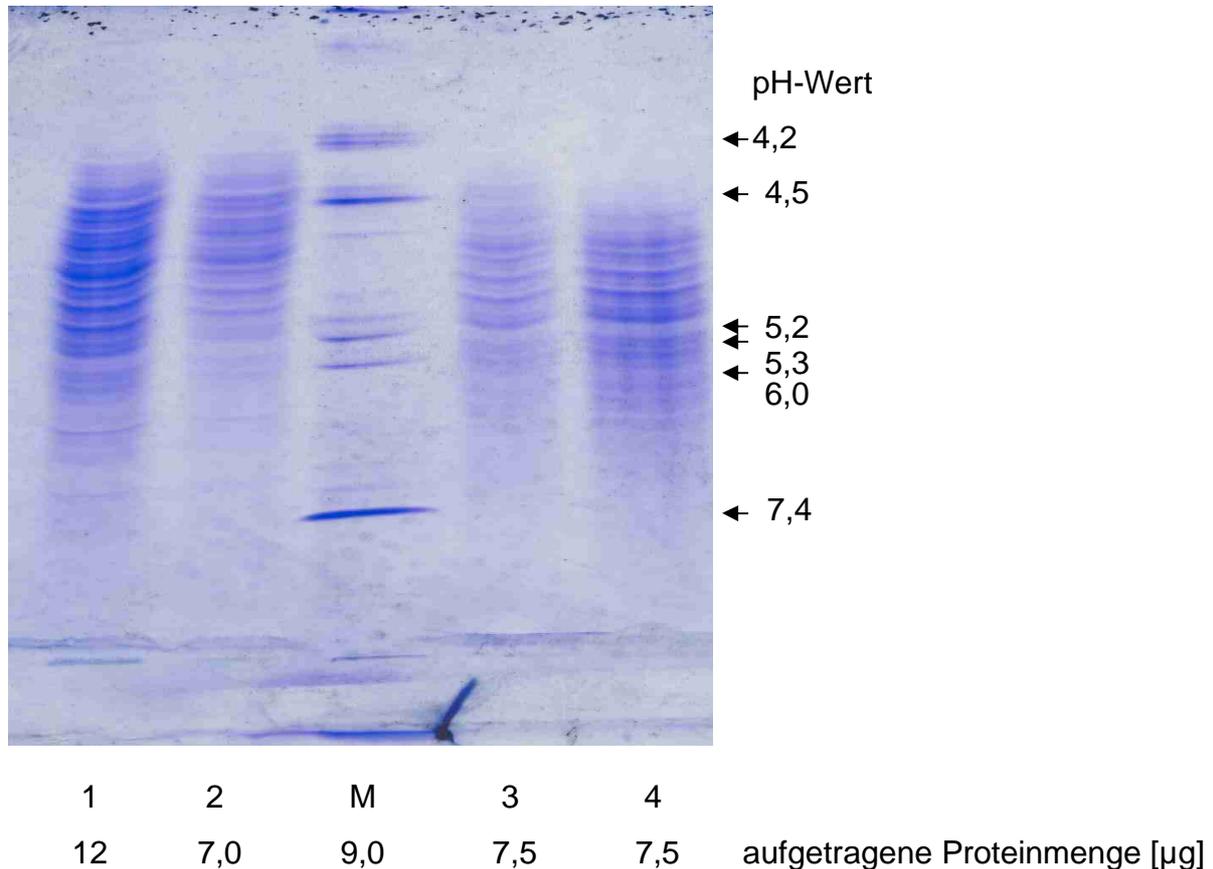


Abbildung 51: **Trennung von Bierproteinen nach ihrem isoelektrischen Punkt**

1: Selbstgebrautes Gushingbier WB+2 Sud I (Kristallweizen; ÜSV Ø 49 ml) – Rückstand

2: Selbstgebrautes Gushingbier WB+2 Sud I (Kristallweizen; ÜSV Ø 49 ml) – Spumat

3: Nicht gushendes Weißbier WB-6 (Kristallweizen (ca. 49 % Gerstenmalzanteil) – Spumat

4: Nicht gushendes, helles, untergäriges Bier - Spumat

M: Protein Test Mixture for pI-Determination, pH 3-10

Aufbereitung: Spumate / Rückstände wurden durch Ultrafiltration auf ca. 10% des ursprünglichen Volumens eingengt.

Der Rückstand des selbstgebrauten Gushingbieres (Probe 1) wurde etwas stärker konzentriert.

pH-Gradient im Gel: pH 3-10; Spreizung im Bereich 3-5 (Mischverhältnis 2:1)

4.6.4 Trennung der Bierproteine nach Molekulargewicht

Für die Trennung der Bierproteine nach ihrem Molekulargewicht wurden die Proben wie für die isoelektrische Fokussierung mittels Ultrafiltration konzentriert.

In allen vier Bahnen war eine deutliche Bande in vergleichbarer Intensität mit einem Molekulargewicht von 40 kDa (Abkömmlinge des Proteins Z) zu erkennen. Dieses Protein ist – wie schon erwähnt – das Hauptprotein für die Stabilisierung von Bierschaum^{1,2}.

Im Bereich um 10 kDa zeichneten sich Unterschiede zwischen den Biertypen ab: Zwar war auf allen vier Bahnen eine Bande in diesem Abschnitt erkennbar. Jedoch unterschieden sich die Spumate von den Rückständen dadurch, dass die Bande in den Spumaten sehr viel kräftiger ausfiel. Weiterhin trat das Spumat des Gushingbieres (dunkles Weißbier) gegenüber dem Spumat des nicht gushenden Bieres dadurch hervor, dass diese Bande noch kräftiger war. Beim nicht gushenden Bierspumate (helles Weißbier) handelte es sich ein Kontinuum zwischen ca. 10 kDa und 15 kDa.

Die Proteinbande bzw. das Kontinuum bei ca. 10 kDa besteht hauptsächlich aus nicht spezifischen Lipotransferproteinen (ns-LTPs). Sie kommen durch den Produktionsprozess vom Getreide zum Bier in unterschiedlichem Modifikationsgrad vor, der für die Schaumfähigkeit der Flüssigkeit entscheidend ist. Durch den variierenden Modifikationsgrad lässt sich die breite Bande von Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht erklären. In der Annahme, dass das Verhältnis der modifizierten Proteine zu nicht modifizierten variiert, wurde diese Proteingruppe als ein Gushing-Faktor (vermutlich ein Gushing-Promotor) postuliert³.

Es ist sehr ungewöhnlich, dass der Glykosylierungsgrad eines hellen Bieres höher ist als der eines dunklen, da die Glykosylierung von Aminosäureresten Teil der Maillardreaktion ist, die verstärkt bei höheren Darrtemperaturen abläuft.

¹ VOIGT, J.: Diss. TU München 1988

² JÉGOU, S. et al.: In: J. Agric. Food Chem. **48**, 2000, 5023-5029

³ HIPPELI, S.; ELSTNER, E.F.: In: Z. Naturforsch. **57**, 2002, 1-8

Der Einfluss der angereicherten grenzflächenaktiven Proteine, darunter die Lipotransferproteine, auf das Gushingpotenzial ist bei den Rückführungstests in den Kapiteln 4.7.2.3 und 4.7.2.4 dargestellt.

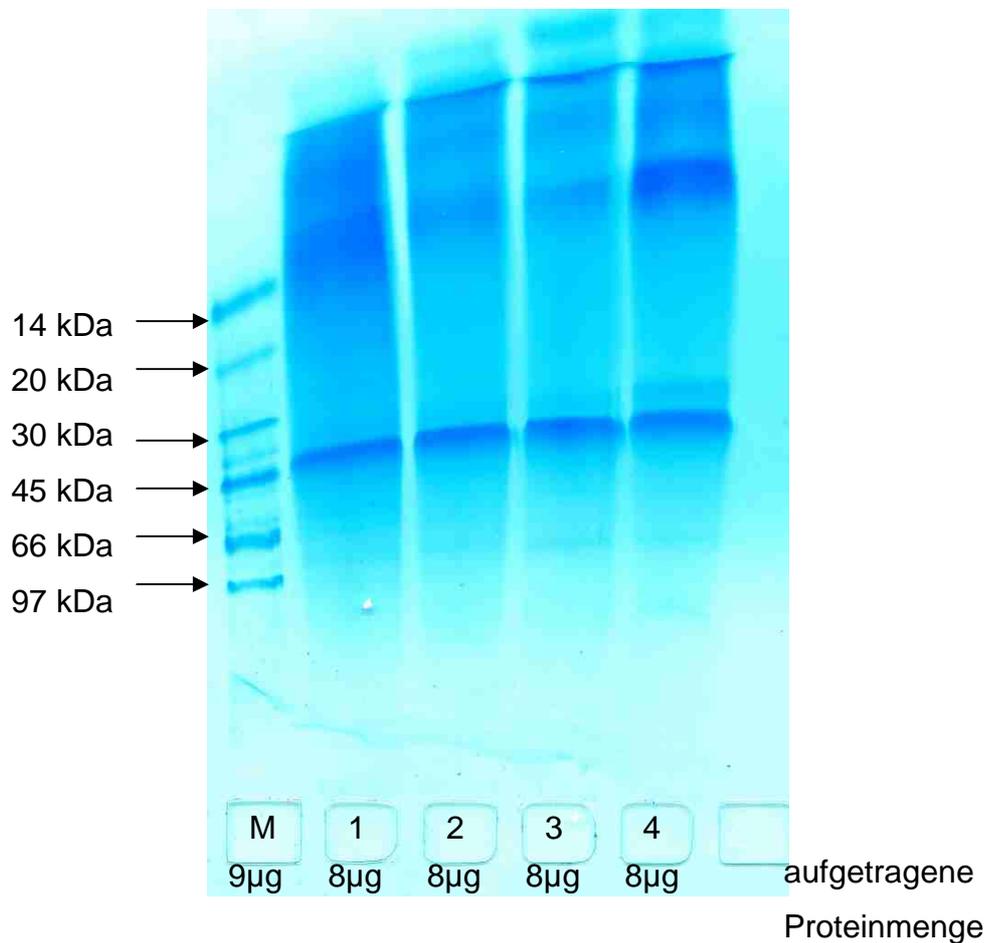


Abbildung 52: **Trennung der Bierproteine nach Molekulargewicht**

Gel: T = 15 %; C = 2 %

1: Nicht gushendes Bier WB-6 (Kristallweizen) – Spumat

2: Nicht gushendes Bier WB-6 (Kristallweizen) – Rückstand

3: Selbstgebrautes Gushingbier WB+2 Sud I (Kristallweizen; ÜSV Ø 49 ml) Rückstand

4: Selbstgebrautes Gushingbier WB+2 Sud I (Kristallweizen; ÜSV Ø 49 ml) – Spumat

M: Marker

4.6.5 Gelfiltrations-Chromatographie (GFC)

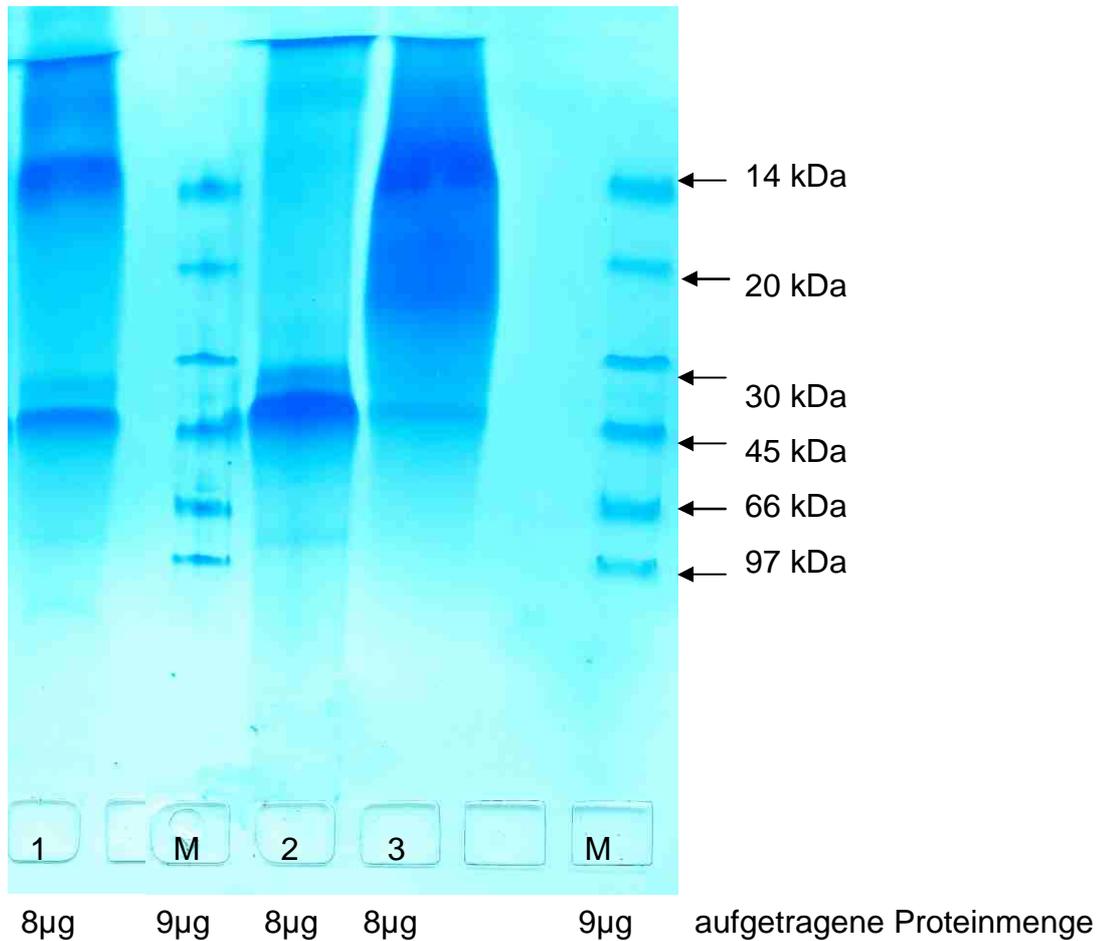


Abbildung 53: **Präparative Trennung der Bierproteine nach Molekulargewicht**

- nach Zerschäumung und anschließender Gelfiltration des Spumats
- 1: selbstgebrautes Gushing-Weißbier WB+2, Spumat
 - 2: 1 nach GFC - nicht zurückgehaltenes Protein
 - 3 : 1 nach GFC - zurückgehaltenes Protein
 - M: Marker

Das Gushingbier-Spumat wurde im Anschluss an die Zerschäumung einer Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) unterzogen. Es gelang, die 40 kDa -Proteine (Bahn 2, größere Moleküle) von dem niedermolekularen Kontinuum (Bahn 3) zu trennen.

Da jedoch das Gushingpotenzial der Spumate in den Rückführungstests (Kap. 4.7.2.3 und 4.7.2.4) negativ ausfiel, wurden keine weiteren präparativen Gelfiltrationen durchgeführt.

4.6.6 Bierlipide

Nun wurden die Lipidextrakte von gushenden und nicht gushenden Bieren dünnenschichtchromatographisch verglichen. Die für Würzelipide verwendete Methode musste modifiziert werden, da im Bier nur noch sehr polare Lipide vorhanden waren. Weniger polare Lipide wurden nämlich während der Bierbereitung ausgeschieden. So wurde für die Bierextrakte ein polareres, aber trotzdem mit dem Würzelipid-System vergleichbares Lösungsmittelsystem eingeführt:

Für Würze: Hexan: Diethylether: Eisessig (85:15:1)

Für Biere: Hexan: Diethylether: Eisessig (80:20:5)

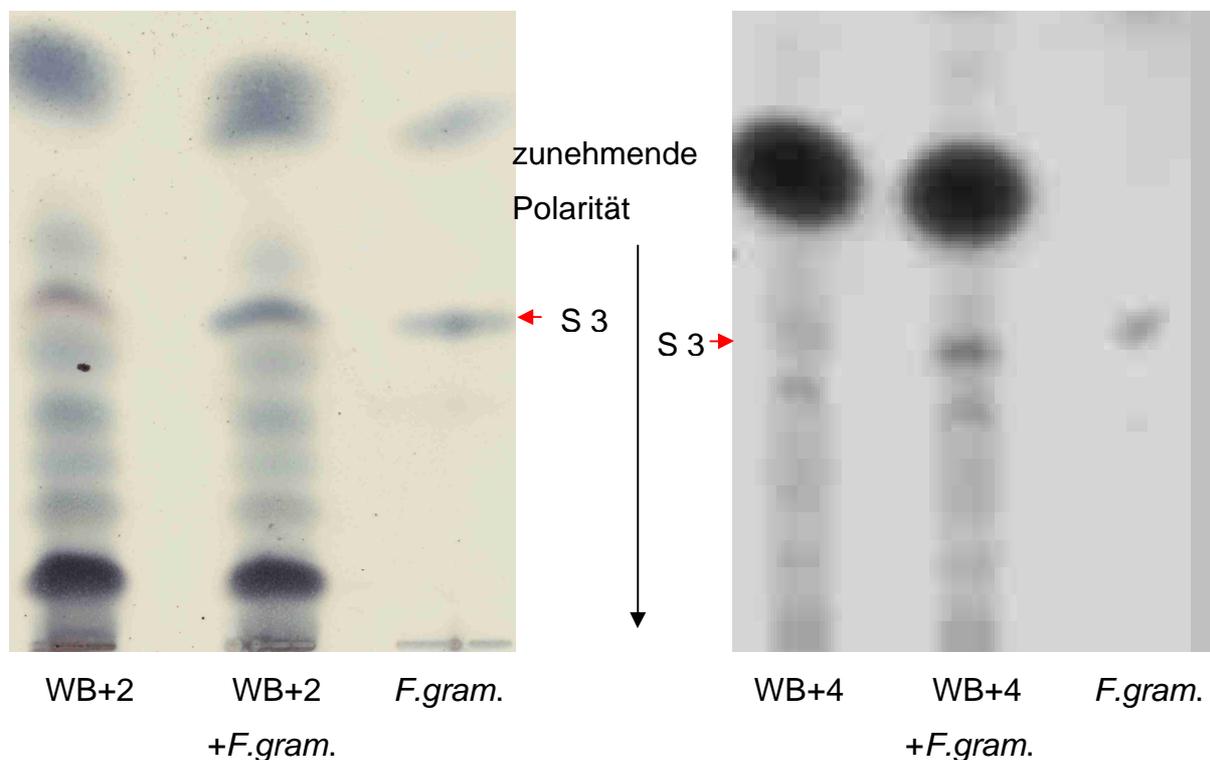


Abbildung 54: **Lipide gushender Weißbiere im Vergleich zu Fusarienlipiden**

WB+2: Lipidextrakt aus dunklem, selbstgebrautem Gushing-Kristallweißbier, 1. Sud (aus WM+2)

F. gram.: Polare Lipidfraktion, aus lyophilisierter Kultur von *F. gram.* mit Dichlormethan : Methanol (2:1) extrahiert

WB+4: Lipidextrakt aus hellem, gushendem Weißbier, ausgeschüttelt mit Dichlormethan : Methanol (2:1)

Es ließen sich im Lipidspektrum des selbstgebrauten Gushingbieres und eines weiteren gushenden Weißbieres Lipide nachweisen, die offensichtlich von Fusarien

Unter den Lipiden untergäriger Biere waren die Fusarienlipide weder bei gushenden noch bei nicht gushenden Proben nachweisbar:

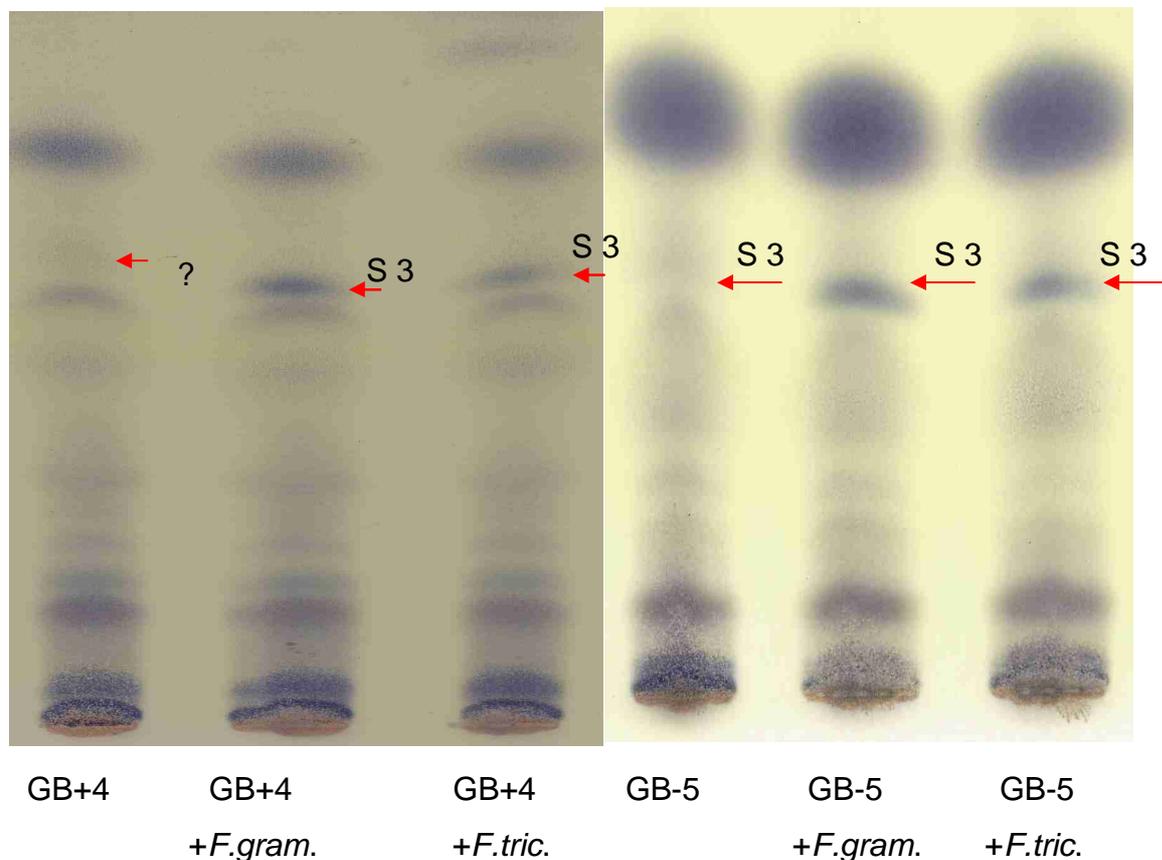


Abbildung 56: **Lipide untergäriger Biere – gushend und nicht gushend – mit Fusarienlipiden kombiniert**

GB+4: Lipidextrakt aus hellem, untergärigem Gushingbier, ausgeschüttelt mit Dichlormethan : Methanol (2:1)

GB-5: Lipidextrakt aus hellem, untergärigem, nicht gushendem Bier, ausgeschüttelt mit Dichlormethan : Methanol (2:1)

F. gram.: Polare Lipide aus lyophilisierter Kultur von *F. gram.* mit Dichlormethan : Methanol (2:1) extrahiert

F. tric.: Polare Lipide aus lyophilisierter Kultur von *F. tric.* mit Dichlormethan : Methanol (2:1) extrahiert; Lipidspots vgl. Kap. 4.1.5.1

In gushenden untergärigen Bieren ließen sich die Fusarienlipide nicht mehr nachweisen (primäre Gushingursachen konnten nicht bewiesen werden), auch wenn das in den entsprechenden Gerstenmalzwürzen noch möglich war. Das mag an der Tatsache liegen, dass Gerste nur schwach von Fusarien befallen wird. Durch die Ausscheidung der meisten Lipide im Bierherstellungsprozess wurde wohl die dünnschichtchromatographische Nachweisgrenze unterschritten.

4.7 Rückmischung isolierter Stoffgruppen zur Prüfung der Gushingrelevanz

4.7.1 Isolierte Stoffgruppen aus Treber-Heisswasserauszügen (*F.culmorum*)

Die isolierten Stoffgruppen der Heisswasserauszüge wurden gezielt wieder vermischt, um initiatorische, synergistische oder gushing-dämpfende Effekte offenzulegen. Dazu wurden die in Kapitel 4.2 nach unterschiedlichen Trennungskriterien gewonnenen Fraktionen in den ursprünglichen Anteilen wiedervereint. Unvergälltes Ethanol, 5% (v/v) wurde zugegeben, da diese Chemikalie zur Reduktion der Oberflächenspannung von Wasser beiträgt. Mit einem geeigneten Puffer wurde ein möglicher pH-Wert von Bier eingestellt.

4.7.1.1 Ungeladene oder kationische Substanzen (IEC-Fraktion bei pH 8,5) und Lipide

Die nicht an den Ionenaustauscher gebundenen Substanzen wurden nach Dialyse mit den in unvergälltem Ethanol gelösten, polaren Lipiden vermischt und auf die für einen Gushingtest erforderliche Flüssigkeitsmenge von 4,6 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach der in Kapitel 7.6.2 beschriebenen Aufbereitung konnte das Gemisch auf eventuelles Gushingpotenzial getestet werden.

Tabelle 14: **Überschäumvolumina im Gushingtest**

Rückmischung – ungebundene oder kationische Moleküle (IEC pH 8,5) / Lipidextrakt aus dem Heisswasserauszug von *F.culmorum*-infiziertem Treber

IEC2: Ionenaustauschchromatographie, Probenauftrag nach vorhergehender Dialyse

Auftrag: 5x 2g Lyophilisat des Heisswasserauszugs von *F.culm.*-infiziertem Treber

A: ungebundene Substanzen, vereinigt aus 5 Chromatographieläufen

Unpolare Lipide: Petroletherextrakt aus dem Lyophilisat des Heisswasserauszugs von *F.culm.* infiziertem Treber

Polare Lipide: Extrakt mit Dichlormethan : Methanol (2:1) aus dem Lyophilisat des Heisswasserauszugs von *F.culm.* infiziertem Treber

Lagerung der abgefüllten Flaschen über eine 1 Woche bei Raumtemperatur

	Durchschnitt	Einzelflaschen				
IEC2a + unpolare Lipide	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
		0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
IEC2a + polare Lipide	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
		0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
IEC2a + unpolare + polare Lipide	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml
		0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml

Der Gushingtest fiel eindeutig negativ aus. Schon im Einzeltest hatte keine der Substanzklassen kein Gushingpotenzial gezeigt (s. Kap. 4.2.5 und Kap. 4.2.8.2). Somit konnten nun auch synergistische Effekte bei einer Kombination aus den Fraktionen ausgeschlossen werden.

4.7.1.2 Anionische Substanzen (IEC-Fraktion bei pH 8,5) und Lipide

Auch die gebundenen Substanzen der Ionenaustausch-Chromatographie aus Kapitel 4.2 wurden dialysiert, mit den in unvergälltem Ethanol gelösten Lipiden vereint und mit destilliertem Wasser auf 4,6 l aufgefüllt.

Tabelle 15: **Überschäumvolumina im Gushingtest**

Rückmischung - anionische Moleküle / Lipide aus dem Heisswasserauszug von *F.culmorum*-infiziertem Treber

IEC2: Ionenaustauschchromatographie, Probenauftrag nach vorhergehender Dialyse

Auftrag: 5x 2g Lyophilisat des Heisswasserauszugs von *F.culm.*-infiziertem Treber

A: gebundene Substanzen, vereint aus 5 Chromatographieläufen

Unpolare Lipide: Petroletherextrakt aus dem Lyophilisat des Heisswasserauszugs von *F.culm.* infiziertem Treber

Polare Lipide: Extrakt mit Dichlormethan : Methanol (2:1) aus dem Lyophilisat des Heisswasserauszugs von *F.culm.* infiziertem Treber

Lagerung der abgefüllten Flaschen über eine 1 Woche bei Raumtemperatur

	Durchschnitt	Einzelflaschen				
IEC 2b + unpolare Lipide	3 ml	3 ml	10 ml	0 ml	2 ml	0 ml
		6 ml	0 ml	3 ml	3 ml	2 ml
IEC 2b + polare Lipide	6 ml	15 ml	1 ml	4 ml	0 ml	10 ml
		8 ml	2 ml	3 ml	9 ml	10 ml
IEC 2b + unpolare + polare Lipide	2 ml	3 ml	0 ml	5 ml	2 ml	0 ml
		0 ml	1 ml	0 ml	1 ml	7 ml

Im Gushingtest ergab sich hier nur eine schwache Tendenz zum Überschäumen. Das Gushingpotenzial ist jedoch gegenüber dem Eluat von der Ionenaustauschersäule nicht angestiegen. Das heißt, dass die Lipide kombiniert mit Gushing-Initiatoren sich auch hier weder als Promotoren, noch als Inhibitoren verhielten.

4.7.2 Zusätze angereicherter grenzflächenaktiver Proteine aus Bier

4.7.2.1 Zugabe der Spumate nicht gushender Biere zu Bieren / Würze

Die amphiphilen Inhaltsstoffe von Bier wurden mit Hilfe der Zerschäumung (vgl. Kap. 4.6.2 und 7.7.5) angereichert. Nun sollten die grenzflächenaktiven Substanzen von nicht gushendem Bier aus der Praxis bezüglich ihres Einflusses auf das Gushingpotenzial gushender und nicht gushender Biere untersucht werden.

Die Spumate wurden jeweils -3°C-kalten, gushenden bzw. nicht gushenden Bieren oder Würze zugefügt, wieder verschlossen, geschüttelt und eine Woche später bei Raumtemperatur wie im Gushingtest Abschnitt k) beschrieben geöffnet.

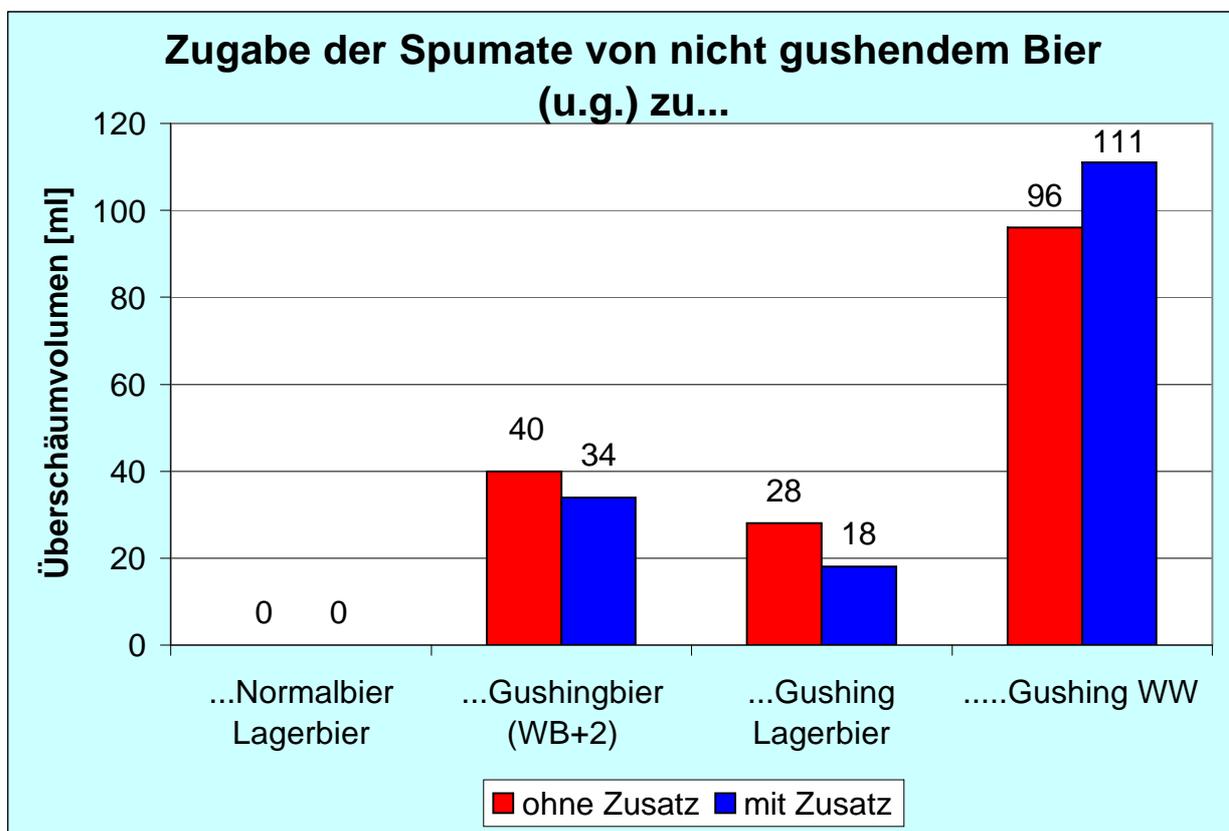


Abbildung 57: **Überschäumvolumina im Gushingtest**

Beimischung der Spumate von nicht gushendem Bier zu diversen Bieren oder Würze
Durchschnitt aus jeweils 3 Zumischungen à 1 Flasche
Ohne Zusatz: 70 ml Basisprobe durch Wasser ersetzt
Spumat: Von 2l hellem, untergärigem, nicht gushendem Bier
Normalbier / Lagerbier: Helles, untergäriges, nicht gushendes Bier
Gushingbier : Selbstgebrautes dunkles, gushendes Kristallweißbier, Sud 1, Ø ÜSV 49 ml
Gushing / Lagerbier: Helles, untergäriges, gushendes Bier Ø ÜSV 28 ml
Gushing WW: Helle, gushende Weizenmalzwürze (primär gushend) Ø ÜSV 134 ml
Lagerung: 1 Woche bei Raumtemperatur

Die Zerschäumungsspumate konnten nicht gushendes Basisbier nicht zum Überschäumen bewegen. Aber auch das Überschäumvolumen gushender Basisbiere veränderte sich nicht. (Statistische Schwankungen sind von einer Interpretation auszuschließen.)

Die Fraktionen enthielten als Hauptbestandteil die als Gushingpromotoren verdächtigten Lipotransferproteine (ca. 50% des Schaumproteins, vgl. Kap. 4.6.4). Synergistische Effekte nach Zugabe zu Gushingbier konnten hier nicht erkannt werden.

4.7.2.2 Zugabe der Spumate primärgushendem Bier zu Bieren / Würze

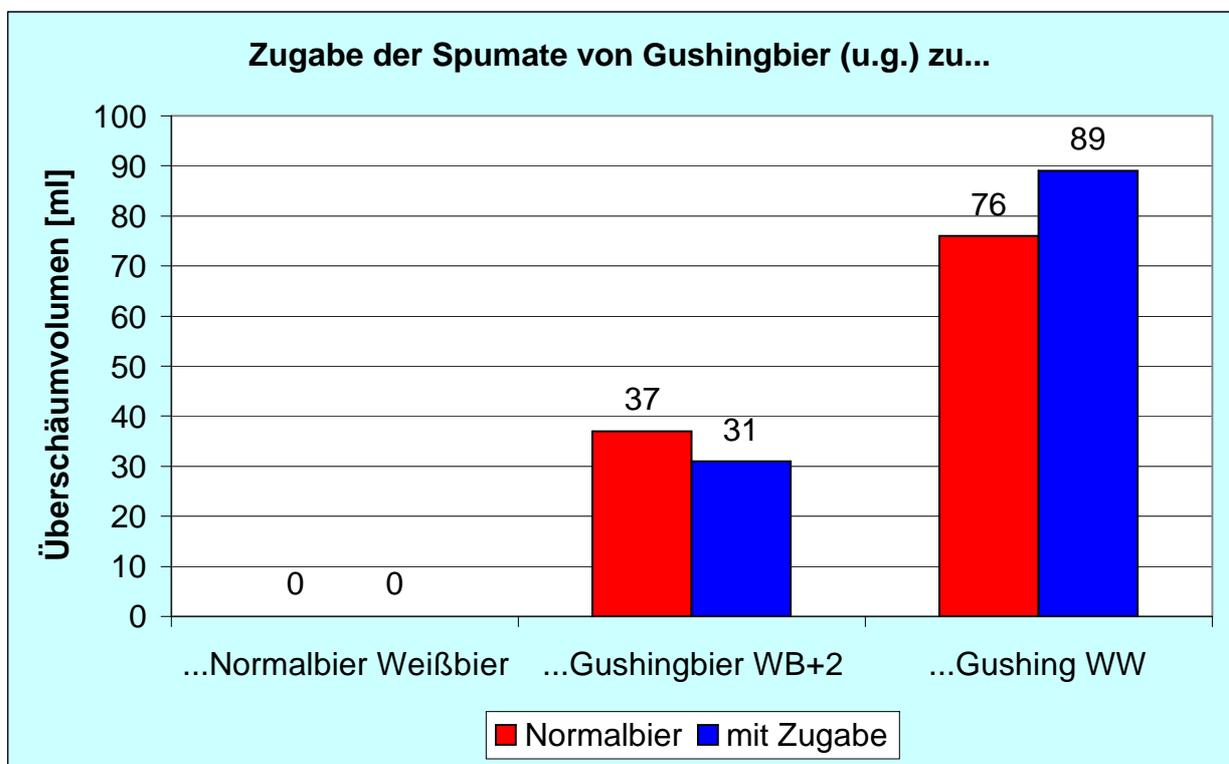


Abbildung 58: **Überschäumvolumina im Gushingtest**

Beimischung der Spumate von Gushingbier zu diversen Bieren oder Würze
 Durchschnitt aus jeweils 3 Zumischungen à 1 Flasche
 Ohne Zusatz: 70 ml Basisprobe durch Wasser ersetzt
 Spumat: Von 2 l selbstgebrautem Kristallweißbier WB+2, Sud 1 (ÜSV Ø 49 ml)
 Normalbier / Weißbier: Helles, nicht gushendes Kristallweißbier
 Gushingbier: Selbstgebrautes, dunkles Kristallweißbier WB+2, Sud 1 (ÜSV Ø 49 ml)
 Lagerung: 1 Woche bei Raumtemperatur

Die Zugabe von angereicherten Schaumproteinen aus Gushingbier zu nicht gushendem Weizenbier zeigte keine Veränderung des ursprünglichen

Überschäumverhaltens: Das Bier ließ sich auch durch den Zusatz von Lipotransferproteinen aus gushendem Bier nicht zum Überschäumen bewegen. Auch die Zugabe dieser Schaumproteine zu Gushingbier führte zu keinerlei Veränderung des ursprünglichen Überschäumvolumens.

4.7.2.3 Zugabe der Spumate von nicht gushendem Bier zu Fusarienkulturfiltraten

Die carbonisierten Filtrate der in Kapitel 4.1 beschriebenen Fusarienkulturen von *F. graminearum* bzw. *F. tricinctum* wurden in Flaschen abgefüllt, auf -3°C abgekühlt und anschließend mit Spumaten aus nicht gushendem Bier versetzt. Nach 7 Tagen wurden die Flaschen gemäß Kap. 7.5.1 k) und l) geöffnet. Jeder Ansatz wurde dreimal wiederholt.

Die Fusarienkulturfiltrate sowohl von zu Gushing führenden als auch von nicht zu Gushing führenden Fusarien waren nach Zugabe von Schaumproteinen aus gushing-inaktivem Bier stabil.

Die Ergebnisse dieses Versuchsaufbaus zeigen, dass die laut Literatur in Fusarienkulturen gelösten, nativen Hydrophobine als pilzliche Gushing-Initiatoren auch in Kombination mit pflanzlichen grenzflächenaktiven Bierproteinen (darunter Lipotransferproteine) nicht gushen.

Möglicherweise verhindern Inhibitoren (, die in gushing-inaktivem Spumat und / oder in dem Fusarienkulturfiltrat von *F. tricinctum* enthalten sind) ein Überschäumen.

4.7.2.4 Zugabe der Spumate von primärgushendem Bier zu Fusarienkulturen

Zu den Fusarienkulturfiltraten wurden nun Spumat-Fractionen von Bier mit positiver Primärgushingneigung gegeben (WB+2, Sud 1; ÜSV Ø 49 ml). Jeder Ansatz wurde dreimal wiederholt.

Auch die Zugabe von Spumaten aus primärgushendem Bier führte zu keinem positiven Überschäumvolumen. Diese Kombination müsste eigentlich Gushing-Initiatoren aus dem Spumat enthalten. Handelt es sich dabei um Hydrophobine, dürften diese aufgrund der vorangegangenen Zerschäumung restlos denaturiert und damit unlöslich sein. In dem Spumat als Konzentrat amphiphiler Substanzen

müssten außerdem eventuelle Gushing-Promotoren enthalten sein. Schließlich sind in den Filtraten aus den Fusarienkulturen gelöste, native Hydrophobine als Gushinginitiatoren zu erwarten. Im Fusarienkulturfiltrat von *Fusarium graminearum* (zu Gushing führende Fusarienart) dürften keine Gushing-Inhibitoren anwesend sein. Die Tatsache, dass selbst Fusarienkulturfiltrate von *F. graminearum* mit den zugesetzten Schaumproteinen von Gushingbier keinerlei Gushingpotenzial aufwies, war somit sehr erstaunlich.

Um ein ungünstiges Mischungsverhältnis als Ursache für das unterbliebene Übersäumen auszuschließen, wurden die Mengenverhältnisse der Komponenten in Kapitel 4.7.4 umgekehrt.

4.7.3 Zusatz der polaren Lipidfraktionen von Fusarienkulturfiltraten

Die polaren Lipidextrakte wurden aus 400 ml Fusarienkulturfiltrat nach dem Lyophilisieren mit Dichlormethan / Methanol (2:1) extrahiert. Der zur Trockne eingedampfte Lipidextrakt (70 – 120 mg) wurde in 1 ml Ethanol aufgenommen. Jeweils 1 ml Basisprobe pro 500 ml-Flasche wurde durch die ethanolische Lipidlösung ersetzt. Die Flaschen wurden wiederverkorkt, geschüttelt und nach einwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur geöffnet. Jeder Ansatz wurde dreimal wiederholt.

4.7.3.1 Zusatz der polaren Lipidfraktion von zu Gushing führenden Fusarien

Die Zugabe der polaren Lipidfraktion von *Fusarium graminearum* (einer zu Gushing führender Fusarienart) zu Normalbier, selbstgebrautem Gushing-Weißbier, untergärigem Gushingbier bzw. zu primärgushender Würze zeigte bei keiner der getesteten Basisproben eine wesentliche Veränderung des Übersäumvolumens. Lediglich beim gushendem Lagerbier lässt sich ein leichter Rückgang vermerken, der aber nicht sicher von statistischen Schwankungen abgegrenzt werden kann.

Die polaren Lipide von *Fusarium graminearum* sind folglich nicht in der Lage, Gushing in stabilen Bieren auszulösen. Werden die Lipide zu gushenden Basisproben zugegeben, so können sie weder die Gushingneigung unterstützen, noch diese unterbinden. Polare Lipide von zu Gushing führenden Fusarien sind also gushing-irrelevant.

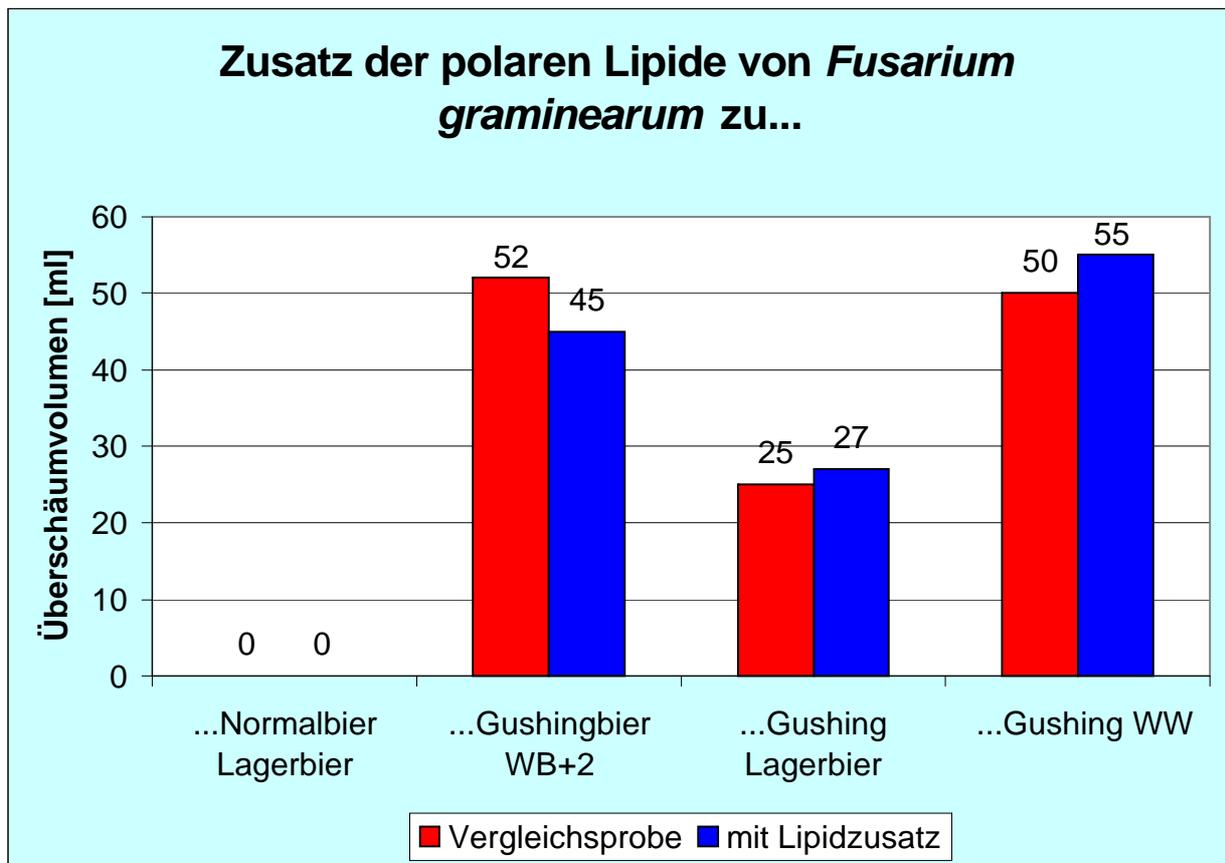


Abbildung 59: **Überschäumvolumina im Gushingtest**

Beimischung der polaren Lipide von *F.graminearum* zu diversen Bieren und Würze
 Durchschnitt aus jeweils 3 Zumischungen à 1 Flasche

Ohne Zusatz: 1 ml Basisprobe durch 1 ml unvergälltes Ethanol ersetzt

Normalbier / Lagerbier: Helles, untergäriges, nicht gushendes Bier

Gushing / Weißbier: Selbstgebrautes, gushendes Kristallweißbier, Sud 1, Ø ÜSV 49 ml

Gushing / Lagerbier: Helles, untergäriges, gushendes Bier, Ø ÜSV 28 ml

Gushing / Würze: Helle, primärgushende Weizenmalzwürze, Ø ÜSV 56 ml

Lagerung: 1 Woche bei Raumtemperatur

Die Ergebnisse passen zu den Resultaten aus Kapitel 4.7.1: Auch *Fusarium culmorum* ist eine Fusarienart, die zu Gushing führt. Die polaren Fusarienlipide sind im Heisswasserauszug zwar enthalten, haben aber keinen Einfluss auf die Gushingneigung, weder von bereits gushenden Bieren noch von Biere ohne positives Gushingpotenzial.

4.7.3.2 Zusatz der polaren Lipidextrakte von nicht zu Gushing führenden Fusarien

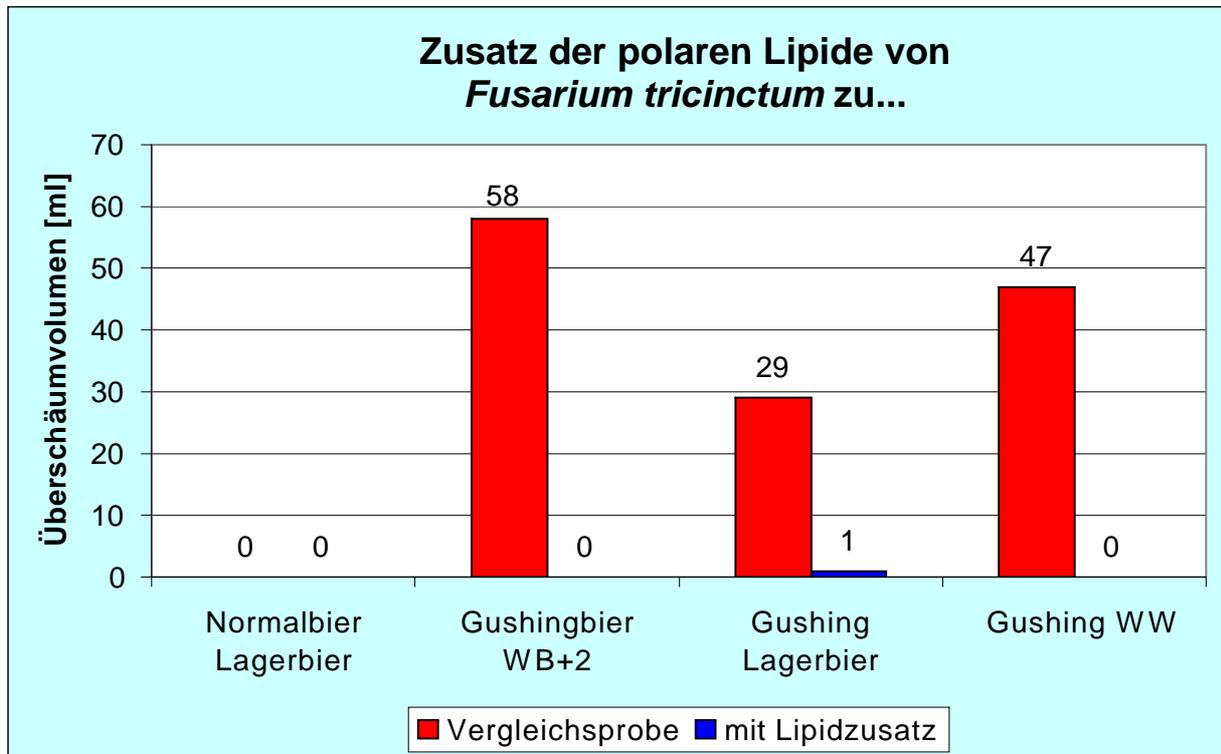


Abbildung 60: **Überschäumvolumina im Gushingtest**

Beimischung der polaren Lipide von *F. tricinctum* zu diversen Bieren und Würze
 Durchschnitt aus jeweils 3 Zumischungen à 1 Flasche
 Ohne Zusatz: 1 ml Basisprobe durch 1 ml unvergälltes Ethanol ersetzt
 Normalbier / Lagerbier: Helles, untergäriges, nicht gushendes Bier
 Gushing / Weißbier: Selbstgebrautes Kristallweißbier, Sud 1, Ø ÜSV 49 ml
 Gushing / Lagerbier: Helles, untergäriges, gushendes Bier, Ø ÜSV 28 ml
 Gushing / Würze: Helle, primärgushende Weizenmalzwürze, Ø ÜSV 56 ml
 Lagerung: 1 Woche bei Raumtemperatur

Auch die polaren Lipide von *Fusarium tricinctum*, einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart, vermochten bei gushing-inaktiven Basisbieren kein Gushing auszulösen. Nach Zusatz zu gushenden Basisproben hingegen waren die polaren Lipide in der Lage, ein Überschäumen primärgushender Biere und Würzen zu unterdrücken. Folglich kann mit Hilfe der polaren Lipidfraktion von nicht zu Gushing führenden Fusarien ein Überschäumen selbst nach dem Einstellen der Gushingtendenz noch verhindert werden. Es handelt sich somit hier um Gushing-Inhibitoren.

Die Inhibitorwirkung gilt bei primärem Gushing nun als erwiesen. Da der Gushingtyp des untergärigen Lagerbieres unbekannt war, können hier nur Vermutungen angeführt werden. Beim hier getesteten, untergärigen Gushingbier scheint es sich um gemischte (primäre und sekundäre) Gushingursachen zu handeln, da die polaren

Lipide von *F. graminearum* das Übersäumen nur dämpften (sekundärer Gushinganteil), während die polaren Lipide von *F. tricinctum* ein Übersäumen fast komplett unterbinden konnten (primäre und sekundäre Entbindungskeime).

Nun war auch der Einfluss der polaren Lipide aller weiterer, zur Verfügung stehenden Fusarienarten von Interesse. Die Lipidextrakte wurden – wie unter 4.7.3 genannt – gewonnen und jeweils einer Flasche des selbstgebrauten, gushenden Kristallweißbieres zugeführt.

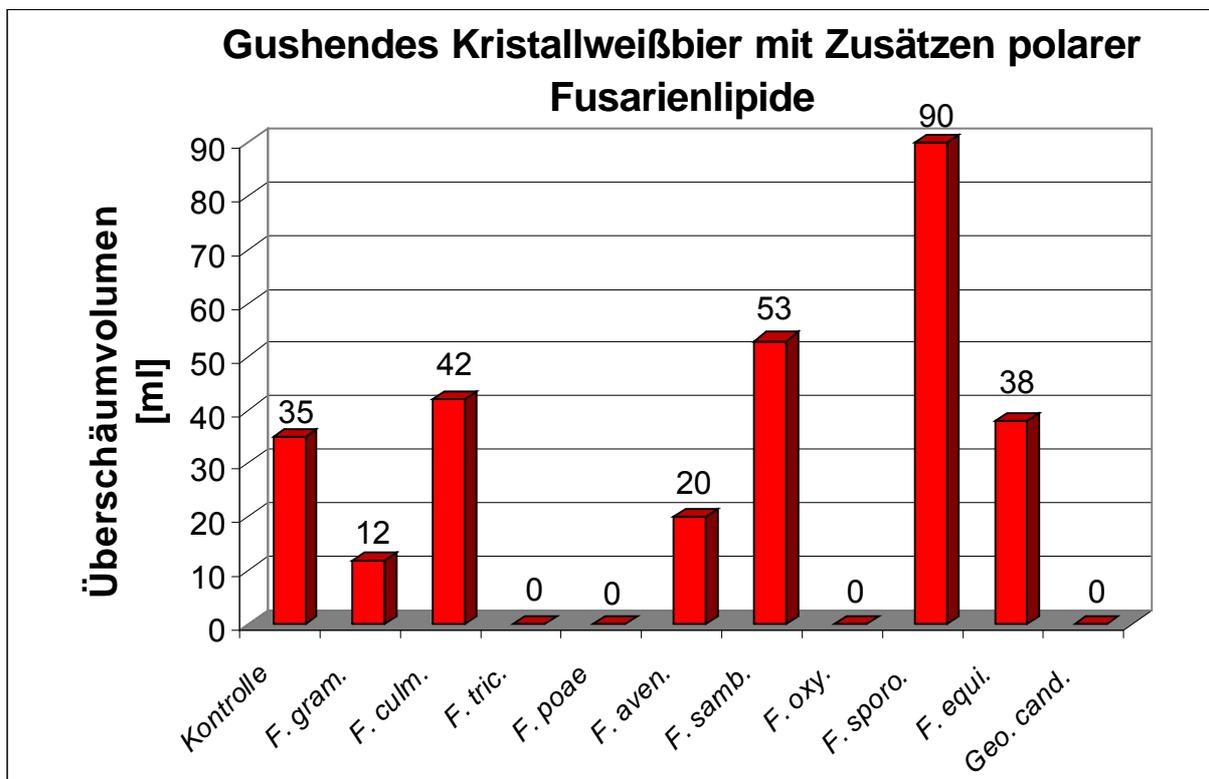


Abbildung 61: **Übersäumvolumina in Gushingtest**

Beimischung polarer Lipide aus Fusarienkulturfiltraten zu Gushingbier (Weißbier)
 Durchschnitt aus jeweils 3 Zumischungen à 1 Flasche
 Kontrolle: 1 ml Basisprobe durch 1 ml unvergälltes Ethanol ersetzt
 Kristallweißbier: Selbstgebrautes, dunkles, gushendes Kristallweißbier Sud 1, Ø ÜSV 49 ml
 Lagerung: 1 Woche bei Raumtemperatur

Die beschriebenen Ergebnisse wurden bei allen weiteren zur Verfügung stehenden Fusarienarten ausnahmslos bestätigt. Dies bekräftigt die Einteilung der Fusarien in eine zu Gushing führende und eine nicht zu Gushing führende Gruppe.

Die nicht zu Gushing führenden Fusarienarten *Fusarium tricinctum*, *Fusarium poae* und *Fusarium oxysporum* produzieren gushing-inhibitorisch wirksame polare Lipide.

Die Überschäumvolumina von Basisbieren kombiniert mit gushing-inaktiven Lipiden schwankten im statistischen Rahmen, während sich die mit gushing-unterdrückenden Lipiden versetzten Basisbiere eindeutig gushing-stabil verhielten. Hier ließen sich auch die in der GC-Analytik zweifelhaften Fusarienarten eindeutig zuordnen: *Fusarium sporotrichoides* gehört hier ganz offensichtlich zu den zu Gushing führenden Fusarienarten. Ebenso verhielt es sich mit *Fusarium equiseti*.

Damit passen diese Ergebnisse hervorragend mit denen in Kap. 4.1.5.2 zusammen.

Auch die Lipide von *Geotrichum candidum* verhinderten ein Überschäumen des eigentlich gushing-aktiven Basisbieres. Insofern tragen die gushing-reduzierenden Lipide des Schimmelpilzes auf alle Fälle zur Inaktivierung bereits vorhandener Gushingfaktoren bei. Möglicherweise verdrängt der biologische Gushing-Inhibitor auch noch zusätzlich die Fusarien während der Vermälzung.

4.7.4 Zusatz von Fusarienkulturfiltraten

Der folgende Versuchsansatz unterscheidet sich von den Kapiteln 4.7.2.3 und 4.7.2.4 nur im Mengenverhältnis der Komponenten. So wurde hier das nicht gushende Bier als Basisprobe verwendet, dem 4 % Fusarienkulturfiltrat zugesetzt wurde.

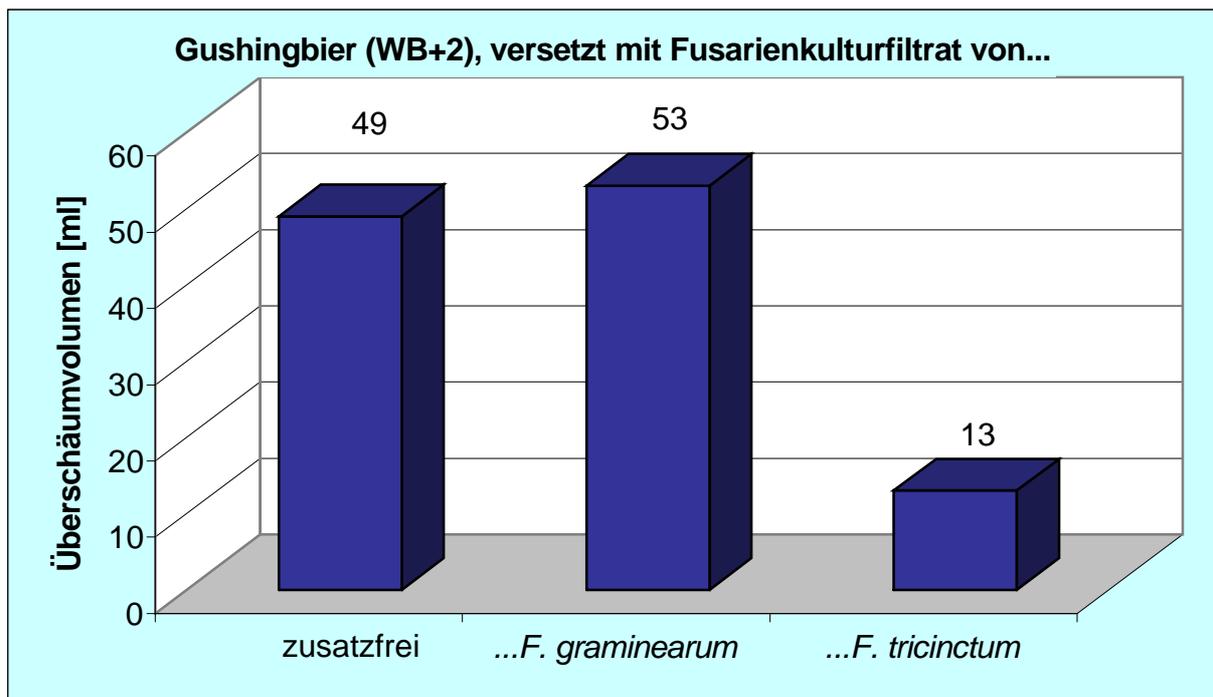


Abbildung 62: **Überschäumvolumina im Gushingtest**

Beimischung von Fusarienkulturfiltraten zu Gushingbier WB+2
Durchschnitt aus jeweils 3 Zumischungen à 1 Flasche
Zusatzfrei: 4% der Basisprobe wurden durch dest. Wasser ersetzt
Gushingbier: Selbstgebrautes, dunkles, gushendes Kristallweißbier, Sud 1, Ø ÜSV 49 ml
Lagerung: 1 Woche bei Raumtemperatur

Auch die Umkehrung der Konzentrationsverhältnisse legte keine synergistische Effekte offen.

Nicht gushendes Basisbier blieb ohne jegliches Überschäumen und das Potenzial von Gushingbier nahm nicht wesentlich zu durch die Zugabe von Fusarienkulturfiltraten. Der Zusatz des Fusarienkulturfiltrates von *Fusarium tricinctum* ließ das Überschäumvolumen sogar zurückgehen. Dieser Rückgang ist sicherlich auf die polaren, gushing-inhibierenden Lipide dieses nicht zu Gushing führenden Fusariums zurückzuführen.

4.7.5 Einfluss von *Paenibacillus macerans* / Cyclodextrinen

Zur Überprüfung der Gushingtendenz von *Paenibacillus macerans* wurde autoklavierte, im Test gushing-inaktive Gerstenmalzwürze aus der Praxis mit dem Bakterium inokuliert, sieben Tage bei 30°C inkubiert und dem Gushingtest nach Donhauser unterzogen (vgl. Kap. 7.5.1 f) – I)). Hierfür wurden zwei Ansätze durchgeführt (16 resultierende Probenflaschen).

Dabei schäumte keine der Probeflaschen über. *Paenibacillus macerans* scheint folglich innerhalb der Beobachtungszeit nicht in der Lage zu sein, gushing-initiiierende Substanzen zu produzieren.

Die Zugabe von Cyclodextrinen sollte Aufschluss darüber geben, ob der direkte Zusatz dieser Moleküle zu Gushing führen kann, indem Gaseinschluss-Komplexe der Cyclodextrine mit Kohlendioxid oder anderen kleinen Molekülen bei Druckentlastung als Kondensationskeime wirken und damit Gushing auslösen.

Die Cyclodextrine wurden zunächst zu unvergorener Weißbierwürze (bei Vorversuchen im Gushingtest stabil) gegeben und im Gushingtest nach Donhauser geprüft. Hierfür wurden zwei Ansätze durchgeführt (16 resultierende Probenflaschen).

In weiteren Versuchen wurden die Ansätze vergoren, um die allmähliche Kohlendioxid-Entwicklung in der Flüssigkeit besser nachzuempfinden und damit eine Komplexbildung unter Originalbedingungen zu beobachten. Auch hier wurden zwei Ansätze durchgeführt (16 resultierende Probenflaschen).

Keine der Proben zeigte Gushing, auch nicht nach ein-, zwei-, und dreiwöchiger Lagerzeit der abgefüllten Flaschen. Folglich verhalten sich Cyclodextrin-Einschluss-Komplexe bei Druckentlastung nicht als Kondensationskeime. Die Vermutung, Cyclodextrine könnten Gushing-Initiatoren sein, ist damit widerlegt.

5 Gesamtdiskussion

Zur Interpretation der Ergebnisse ist von besonderer Wichtigkeit, dass bei den einzelnen Versuchen der Beobachtungszeitraum begrenzt war. Da bis zum Erscheinen des Gushing-Phänomens eine schwer einschätzbare Latenzphase einzuhalten ist, kann bei negativen Ergebnissen eine Gushingaktivität nie absolut ausgeschlossen werden. Die Latenzphase ist bedingt durch Diffusionsvorgänge, die zur Mizellbildung notwendig sind. Die Geschwindigkeit bei der Mizellbildung verhält sich proportional zu den Konzentrationen der beteiligten Substanzen. Im Untersuchungszeitraum positive Proben enthalten im Vergleich zu negativen Proben höhere Konzentrationen an Mizellbausteinen oder / und niedrigere Inhibitor-Konzentrationen.

Untersuchung von Merkmalen und Reaktionen primär gushender Treber-Heisswasserauszüge, Malze, Würzen und Biere

Der Mykotoxingehalt zweier Weizenmalze wurde untersucht, da ein positiver Nachweis von Fusarien-spezifischen **Mykotoxinen** (Trichothecene) die Anwesenheit von Fusarien bezeugt. Aufgrund eines negativen Nachweises lässt sich jedoch keine Aussage treffen. Quantitative Bestimmungen geben ebenfalls keinen Hinweis auf das Gushingpotenzial der Ware. Beim in der vorliegenden Arbeit intensiv untersuchten dunklen Weizenmalz war der Befund sowohl für Nivalenol (NIV) als auch für Desoxynivalenol (DON) und Ochratoxin A (OTA) negativ. Ein kleiner Peak ließ sich zwar anhand der Retentionszeit der Substanz β -Zearalenol (ZEA) zuordnen. Die Konzentration dieses vor allem von *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* gebildeten Mykotoxins war jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze, sodass es sich nicht quantifizieren ließ.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine Feldinfektionen vorgesehen waren, standen von keiner Probecharge die belastete Rohware, deren primär gushing-aktives Malz, Würze und das fertige Bier zur Verfügung. Es ist unmöglich, diesen Produktionsweg von Praxisware vom Bier ab rückwärts zu verfolgen. So wurde unter anderem versucht, dem Produkt Informationen abzugewinnen, die normalerweise dem Edukt

entnommen werden. Die **mykologische Analyse** einiger Malze musste jedoch scheitern, da das vorhandene Pilzmyzel größtenteils tot war und keine Hinweise mehr auf einen Befall mit zu Gushing führenden Fusarien geben konnte.

Auf eine mykologische Analyse des für die Herstellung von Gushingbier verwendeten dunklen Weizenmalz wurde aufgrund der noch höheren Darrtemperaturen verzichtet.

Im Gushingtest nach Donhauser gushende **Würzen** konnten erfolgreich verschiedenen Gushingursachen zugeordnet werden: Würzen, die trotz Zugabe von **Calciumionen** oder dem Komplexbildner **EDTA** gushing-aktiv waren, galten als primär gushend. Fremdkörper wurden durch sorgfältiges Arbeiten, Flascheninnenrauhigkeiten durch Neuglasflaschen ausgeschlossen. Die Erhöhung der Calciumkonzentration ging sogar mit dem Anstieg des Überschäumvolumens einher, weil offensichtlich durch die höhere Ionenkonzentration mehr Gushing-Initiatoren und eventuell auch Promotoren besser in Lösung gingen.

Interessanterweise ließ sich primäres Gushing mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen, sogenannten **Gushing-Inhibitors auf Basis von Hopfenölen** nicht unterdrücken, während das Überschäumen sich von den Lipiden, produziert von nicht zu Gushing führenden Fusarien, unterdrücken ließ.

Eine **mechanische Behandlung** der carbonisierten Würze erwies sich als Gushing fördernd – sowohl für primäres als auch für sekundäres Gushing. Im Schüttelvorgang werden Diffusionsvorgänge unterstützt und damit die Latenzphase (, die beim selbstgebrauten Bier immerhin zwischen 8 und 12 Wochen lag,) verkürzt.

Das **mehrmalige Entspannen** einer primär gushing-aktiven, wieder und wieder aufcarbonisierten Würze führte nicht zum Absinken des Gushingpotenzials. Dieses Verhalten entspricht nicht den theoretischen Erwartungen bei Hydrophobinen als Gushingursache. Die Kohlendioxid-Bläschen stabilisierenden, unlöslichen Hydrophobinfilme würden bei mehrmaligem Aufcarbonisieren und Entspannen allmählich verbraucht, sodass sich die löslichen Mizellbausteine für die Bildung weiterer stabilisierter Bläschen allmählich erschöpfen müssten. Da jedoch die zur Hydrophobinuntersuchung notwendigen Methoden hier nicht zur Verfügung standen bzw. deren Einführung den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte, wird die Erklärung dieses Phänomens künftigen Forschungsarbeiten überlassen, die ganz auf Hydrophobine ausgerichtet sind.

Erfolgreich waren die Versuche zur **Hydrophilisierung hydrophober Oberflächen**. Es gelang, anhand der in Minimalmedien gezüchteten Fusarienkulturen, allen zur Verfügung stehenden Fusarienarten die Fähigkeit zur Hydrophilisierung wasserabweisender Oberflächen nachzuweisen. Dieses Phänomen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Hydrophobine zurückzuführen, da amphiphile Schaumproteine und andere adsorbierte, amphiphile und wasserlösliche Substanzen sich bei der Reinigung unter fließendem Wasser wieder abgelöst hätten. Dabei konnten keine quantitativen Unterschiede zwischen zu Gushing führenden und nicht zu Gushing führenden Fusarien festgestellt werden. Diese Versuche und die Ergebnisse der finnischen Forschergruppe der VTT Biotechnology, die isolierte Hydrophobine von *Fusarium poae* (einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart) im µg-Maßstab zu Bier zugaben und dabei Gushing auslösten, bestätigen die These, dass alle Fusarien – egal ob nun im Endeffekt zu Gushing führend oder nicht – Gushing-Initiatoren produzieren.

Der umgekehrte Versuch, mit hydrophoben Materialien gushing-initiiierende Substanzen aus primär gushender Würze zu entfernen, scheiterte: Vermutlich wurde das hydrophobe Material von amphiphilen Schaumproteinen besetzt, die zwar keine so starke Affinität zu Parafilm besitzen wie Hydrophobine und auch nicht irreversibel binden, die aber in Würze um den Faktor 10^6 bis 10^9 höher konzentriert vorlagen. So blieben ausreichend Gushing-Initiatoren in Lösung, um immer noch Gushing auszulösen.

Die Herstellung von selbstgebrautem primär-gushendem Bier bestätigte ein weiteres Mal die Aussagekraft des Gushingtests nach Donhauser, der das verwendete Malz als instabil einstufte: Das Bier schäumte nach 8 Wochen Latenzphase stark über. Der Einfluss einiger technologischer Parameter auf das Gushingpotenzial wurde anhand des selbstgebrauten Bieres nach den Vorschlägen von Pellaud¹ untersucht: Bei einem zweiten Sud waren die **Eiweißrasten verlängert** worden, um eventuell gebundene Gushingfaktoren besser in Lösung zu bringen. Zudem waren die **Kochzeiten verkürzt** worden, um intensive Hitze-Koagulationen und weitere Modifizierungen der am Gushing beteiligten Substanzen zu verhindern. Dennoch verringerte sich durch eine solche Abwandlung der Brauparameter das Überschäumvolumen gegenüber dem ersten Sud. Am erhöhten Proteinlösungsgrad

¹ PELLAUD, J.: In: Interbrew Technology Development, Leuven, Belgium

kann der Verlust an Überschäumvolumen kaum liegen, da dessen Erhöhung bei Würze (durch Zudosierung von Calciumsalzen) zu verstärktem Überschäumen führte. Stattdessen mag der Verlust an Gushingpotenzial daran liegen, dass auch Gushing-Inhibitoren bei einer intensiven Hitzekoagulation aus dem Sud ausgetragen werden. Den Ergebnissen zufolge überwiegt hier der zuletzt genannte Effekt, sodass das Überschäumvolumen sich verringert. Tendenziell lassen sich diese Ergebnisse in die Praxis umsetzen; die Grenzen einer Kochzeitverkürzung liegen jedoch in der Trübungsstabilität und im Geschmack des entstehenden Bieres.

Cyclodextrine

Cyclodextrine kamen theoretisch als Gushing-Initiatoren in Frage, weil sie kleine Moleküle (u.a. Kohlendioxid) als Einschlussverbindung komplex binden können. Zu untersuchen war, ob diese Komplexe bei Druckentlastung als Entbindungskeime fungieren.

Das Cyclodextrine produzierende Bakterium *Paenibacillus macerans* konnte keine gushing-initiiierenden Substanzen in Würze hervorbringen.

Der Einfluss von Cyclodextrinen auf das Überschäumvolumen wurde durch Zugabe verschiedener Cyclodextrintypen zu gushing-stabiler Weizenbierwürze getestet. Zunächst wurden die Auswirkungen im forcierenden Gushing-Schnelltest nach Donhauser überprüft. Sowohl α -, β - als auch γ - Cyclodextrine konnten so jedoch kein Gushing auslösen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Würzen nach Zugabe der Cyclodextrine vergoren, um eine praxisnahe, allmähliche Kohlendioxid-Entwicklung während der Gärung zu erhalten. Allerdings zeigte auch in diesen Ansätzen keine Probe positives Gushingpotenzial.

Cyclodextrin-Einschlussverbindungen haben sich somit nicht als Entbindungskeime verhalten und können als Gushing-Initiatoren ausgeschlossen werden.

Tabelle 16: **Übersicht – Überschäumverhalten Cyclodextrine**

Testmaterial	Überschäum- Verhalten	Bedeutung
nicht gushendes Bier mit α -, β -, γ -Cyclodextrinen	stabil	α -, β -, γ -Cyclodextrine sind nicht in der Lage, Gushing auszulösen
nicht gushende Würze vergoren mit α -, β -, γ -Cyclodextrinen	stabil	
spezielles synthet. Nährmedium mit <i>Paenibacillus macerans</i>	stabil	<i>Paenibacillus macerans</i> produziert keine gushing-initiiierenden Substanzen
nicht gushende Würze, inkubiert mit <i>Paenibacillus macerans</i>	stabil	

Proteine

Ein Forschungsschwerpunkt entfiel auf grenzflächenaktive Proteine. Neben den Schaumproteinen, unter denen besonders die pflanzlichen, nicht spezifischen Lipotransferproteine von Interesse waren, zogen von den Fusarien produzierte, grenzflächenaktive Proteine - die Hydrophobine - viel Aufmerksamkeit auf sich. Darüber hinaus wurden aber alle Substanzen, die Gushing-verdächtige Eigenschaften besitzen, intensiv betrachtet.

Gushing-verdächtige Proteine ließen sich auf verschiedene Weise anreichern. Mithilfe der Ionenaustausch-Chromatographie ließen sich Träger negativer Ladung (bei pH 8,5), darunter die meisten Proteine, hervorragend anreichern. Hier fanden sich nur im Eluat gushing-aktive Substanzen wieder. Sehr wahrscheinlich handelt es sich dabei um Proteine, da Lipide aufgrund ihrer geringen Molekülgröße bei einer Dialyse (MWCO 10 kDa) vollständig ausgespült worden wären.

Auch die Zerschäumung mit Stickstoff als unpolares, inertes Gas war durchweg eine sehr wichtige, weil schonende und verlustarme Methode zur Konzentrierung grenzflächenaktiver Substanzen. Pflanzliche, grenzflächenaktive Proteine zeigten im Spumat mehr als die dreifache Konzentration im Vergleich zum Originalbier bei gleich bleibender Kohlenhydratkonzentration. Hier ging jedoch aufgrund des intensiven Grenzflächenkontaktes die Gushingaktivität verloren.

Mittels Gelfiltrations-Chromatographie gelang es, das Spumat eines gushenden Bieres präparativ in zwei Fraktionen aufzutrennen: Die höhermolekulare Fraktion enthielt größtenteils Proteine mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, während sich

in der niedermolekularen Fraktion hauptsächlich Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 kDa befanden.

Schließlich wurde die Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose als Gelmatrix zur Anreicherung von gushing-verdächtigen Substanzen eingesetzt. Da allerdings bei dieser Chromatographietechnik die Proteinverluste und damit auch der Verlust an gushing-aktiver Substanz sehr hoch war, blieb kaum Material übrig. Insbesondere Hydrophobine binden an dieses Gel irreversibel. Mit dem Bekanntwerden der Eigenschaften von Hydrophobinen wurde diese Methode verworfen (siehe unten).

Die Effizienz der jeweiligen Anreicherungs-methode wurde durch entsprechende Gushingtests überprüft. Dabei ist zu beachten, dass zahlreiche Arbeitsschritte bei der Aufbereitung und Konzentrierung von Proteinen die Ausbeuten verminderten. Besonders Dialysen brachten bei Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht - unterhalb von 15 kDa - extreme Verluste mit sich, die auch im Überschäumpotenzial der einzelnen Fraktionen bei den Gushingtests zu beobachten waren.

Zur Trennung der angereicherten Proteine wurden die Isoelektrische Fokussierung und die SDS-PAG-Elektrophorese herangezogen. Im Pherogramm der Würzproteine unterschieden sich Proteine aus primär gushenden Proben bezüglich ihres isoelektrischen Punktes in keiner Weise von denen in nicht gushenden Proben. Ergebnisse früherer Arbeiten konnten nicht bestätigt werden¹: Insbesondere im sauren pH-Bereich wurden keine Auffälligkeiten gefunden, die auf gushing-aktive Proteine hingedeutet hätten. Auch eine visuelle, halbquantitative Abschätzung der Konzentrationsverhältnisse von Würzproteinen ließ keine Unterscheidung zwischen gushenden und nicht gushenden Proben zu.

Die Proteinspektren von Bierproteinen im Vergleich zeigten keine Besonderheiten von gushing-positiven Bieren. Stattdessen fiel hier nur auf, dass die sauersten Proteine von untergärigen Bieren bei pH 4,5 zu finden waren, während Weißbiere Proteine mit bis zu pI-Wert 4,2 enthielten. Dies erklärt sich jedoch aus der Proteinzusammensetzung der Rohware².

¹ WEIDENEDER, A.: Diss. TU München 1992

² BELITZ, H.-D.; GROSCHE, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie 1987, 614 - 616

Wie die SDS-PAG-Elektrophorese sichtbar machte, setzen sich Würze- und Bierproteine hauptsächlich aus Lipotransferproteinen mit einem molekularen Gewicht von ca. 10 kDa und aus Derivaten des Proteins Z mit ca. 40 kDa zusammen. Dazu kam bei den untersuchten Weizenmalzwürzen eine etwas schwächere Bande mit etwa 15 kDa und eine Bande mit ca. 28 kDa. Wie die densitometrische Auswertung deutlich machte, treten diese vier Banden bei allen untersuchten Weizenwürzeproben, ob gushend oder nicht gushend, in gleicher Intensität auf. Bei den Bierproben waren bei 15 kDa und 28 kDa keine Banden mehr erkennbar; stattdessen waren die Banden bei 10 kDa und 40 kDa von einem Kontinuum unterlegt. Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa wurden durch die Zerschäumung der Probe deutlich im Spumat konzentriert, denn Lipotransferproteine sind für die Schaumbildung im Bier hauptverantwortlich. Äußerst interessant war jedoch, dass die Streuung der Proteine um den 10 kDa-Bereich, die auf einem unterschiedlich starken Glykosylierungsgrad beruht¹, bei nicht gushenden Bieren ausgeprägter war als bei gushenden, zumal es sich bei dem gushendem um dunkles Bier handelte.

Die extrazellulären Fusarienproteine aus Fusarienkulturfiltraten (submerse Kulturen), bei denen der Hydrophobinanteil per se viel höher geschätzt wurde als unter Würze- und Bierproteinen, waren mittels der besonders schonenden Ultrazentrifugation angereichert, entsalzt und konzentriert worden. Da hier die Membran aus Cellulose besteht, dürften Hydrophobine daran nicht denaturieren. Hier konnten jedoch nur wenige Milliliter unter großem Zeitaufwand aufgearbeitet werden.

Die Trennung entsprechend dem isoelektrischen Punkt legte offen, dass *Fusarium graminearum* ein dichtes Proteinspektrum im Bereich pH 4,0 – 4,8 entwickelt. Bei *Fusarium tricinctum* prägten eine Bande bei ca. pH 5,3 und eine bei ca. pH 4,3 das Bild. Aber auch hier waren keine Auffälligkeiten unter zu Gushing führenden Fusarien – insbesondere Hydrophobine - zu erkennen. Die Trennung dieser Proteine nach molekularem Gewicht führte zum selben unauffälligen Ergebnis.

Hydrophobine wurden im Sommer 2001 mit Gushing in Zusammenhang gebracht, und deshalb konnte erst von diesem Zeitpunkt an auf ihre physikalischen und

¹ JEGOU; S. et al.: In : J. Agric. Food Chem. **48** (2000), 5023-5029

chemischen Eigenschaften eingegangen werden¹. Die schwierige Handhabbarkeit dieser gushing-verdächtigen Proteine (permanente Löslichkeitsprobleme, irreversible Bindung an hydrophobe Polymere (wie z.B auch an Phenylsepharose) wurde erst zur Mitte des zweiten Forschungsjahres bekannt. Zahlreiche Versuche mussten deshalb wiederholt werden, was zu beachtlichen Verzögerungen führte. Von diesem Zeitpunkt ab wurden Kunststoff-Laborutensilien konsequent gegen Glasgeräte ausgetauscht, da mit Verlusten zu rechnen ist. Desweiteren wurde seither bei Dialysen, Gelfiltrationen und SDS-Gelelektrophoresen besonders auf Proteine im Molekulargewichtsbereich um 10 kDa geachtet. Dialyseschläuche mit einer maximalen Ausschlussgrenze von 10 kDa konnten aber aus Kostengründen nicht gegen Produkte mit niedrigerer Ausschlussgrenze ausgetauscht werden.

Zur Isolierung von Hydrophobinen war die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie ungeeignet, da die Proteine irreversibel an Phenylsepharose (ebenso an Butylsepharose) binden. Erstaunlicherweise wurden im Experiment aber nicht alle Gushing-Initiatoren dauerhaft an die Gelmatrix gebunden, da im Gushingtest die Eluate immer noch Überschäumvolumen zeigten.

Auch die Zerschäumung taugte nicht zur Anreicherung der nativen, globulären Proteine. Da dieser Proteintyp bei Grenzflächenkontakt spontan zu unlöslichen Filmen aggregiert, verloren diese Proteine ihre gushing-initiiierende Wirkung, sodass sie bei anschließender Zudosierung zu diversen Basisproben kein Gushing verursachen konnten. Die Gewinnung unlöslicher Bestandteile aus dem Spumat war leider unmöglich, weil die Konzentrationsverhältnisse viel zu ungünstig waren: Hydrophobine sind in Bier nur im Konzentrationsbereich ng/l bis µg/l zu erwarten.

Leider war eine Anreicherung der Hydrophobine auch mittels Ultrazentrifugation nicht möglich.

Bei isoelektrischen Fokussierungen wurde von nun an besonders auf saure Proteine geachtet und bei SDS-PAGE auf den Bereich um 10 kDa, da der isoelektrische Punkt von Hydrophobinen im Sauren vermutet wird und das molekulare Gewicht um 10 – 13 kDa liegt (vgl. Kap.3.7.2). Dennoch konnten Hydrophobine mit den etablierten Methoden elektrophoretisch nicht nachgewiesen werden.

¹ KLEEMOLA; T. et al.: Proc. EBC Congr. – Budapest, 2001

Die beste Methode, diese Proteingruppe zu isolieren, dürfte der Weg über die Genexpression sein, was auch die Entdecker eingeschlagen hatten.

Kurz nach der Entdeckung von Hydrophobinen für Gushing wurden die Lipotransferproteine mit einem Molekulargewicht von ebenfalls etwa 10 kDa als Gushing-Promotoren postuliert (vgl. Kap.3.7.1).

Lipotransferproteine waren zwar sowohl in gushenden als auch in nicht gushenden Bieren nachweisbar. Aber der Versuch, diesen Proteinen einen synergistischen Beitrag zum Gushingpotenzial nachzuweisen, schlug fehl. Die Spumate nicht gushender Biere konnten weder die im Original nicht gushenden Fusarienkulturen (sowohl zu Gushing führender als auch nicht zu Gushing führender Fusarien), noch nicht gushende Biere und Würzen zum Gushen bewegen. Genauso wenig beeinflussten diese Zugaben das vorhandene Potenzial primärgushing-aktiver Würzen und Biere. Außerdem gushten Heisswasserauszüge aus Treber, der mit zu Gushing führenden Fusarien bewachsen war, in denen keine Lipotransferproteine enthalten waren, wie elektrophoretische Untersuchungen deutlich machten. Hier waren zuvor alle löslichen Proteine entfernt worden. Pflanzliche Stressreaktionen auf den Pilzbefall waren nicht mehr möglich, da das Pflanzenmaterial bereits tot war. Damit war die Vermutung, stets im Bier vorhandene, schaumaktive Lipotransferproteine könnten als Gushing-Promotoren vorhandenes Gushing-Potenzial verstärken, widerlegt. Die Kombinationen von Spumaten gushender Biere mit Fusarienkultur-Filtraten, Würzen und Bieren führten zu ähnlichen Ergebnissen: Auch hier wurde das Gushingpotenzial der Basisproben nicht verändert.

Gushing-Initiatoren ließen sich, wie durch die Gushingtests bewiesen werden konnte, mit einigen Methoden anreichern, wobei ihnen ein hohes Molekulargewicht (mindestens 10 kDa), elektrostatische Ladung und hydrophobe Molekülabschnitte (daraus folgt Amphiphilie, da zusätzlich wasserlöslich) nachgewiesen werden konnten. Daraus lässt sich folgern, dass es sich höchstwahrscheinlich um Proteine handelt. Ein elektrophoretischer Nachweis konkreter Substanzen war aber nicht möglich. Dennoch könnten sich unter den elektrophoretisch getrennten Proteinen Gushing-Initiatoren oder -Promotoren befinden. Da es praktisch keine Fusarien-freien (Weizen-)Malzchargen gibt, könnten gushing-relevante Substanzen in allen

Proben vorhanden sein. Diese führen dann in Abwesenheit von Inhibitoren bei jedem (Fusarien-belasteten) Malz zu Gushing.

Tabelle 17: **Übersicht - Überschäumverhalten Proteine**

Testmaterial	Überschäum- Verhalten	Bedeutung
FKF Fus-	stabil	Hydrophobine (mit Hydrophilisierungstest nachgewiesen) lösen kein Gushing aus? kein primäres Gushing ohne Malzbestandteile (vgl. Zepf ¹)
FKF Fus+	stabil	
HWA Fus-	stabil	Unterscheidung Fus-/Fus+ bestätigt Primäres Gushing im Modellsystem HWA reproduzierbar; spricht gegen LTPs als Gushingpromotoren
HWA Fus+	gushend	
HWA Fus+; Lyophilisat resolvat.	gushend	Gushing-aktive Substanzen überstehen Gefriertrocknung unter geringen Verlusten
HWA Fus+; Lyophilisat resolvatisiert, entfettet (RT)	gushend	Proteine werden bei Behandlung mit Lösungsmittel bei RT teils denaturiert, sodass das ÜSV reduziert wird
HWA Fus+; Lyophilisat resolvatisiert, entfettet, dialysiert	gushend	Gushingpotenzial erfährt Verluste bei Dialyse (MWCO 10 kDa) → Gushing-Initiatoren und –Promotoren mit Molekulargewicht < 15 kDa (Hinweis auf Proteine)
HWA Fus+; nicht ionische Substanzen	stabil	Gushing-initiiierende Substanzen sind Ladungsträger → Hinweis auf Proteine
HWA Fus+; ionische Substanzen	gushend	
HWA Fus+; rein polar (HIC)	stabil	Gushing-initiiierende Substanzen haben hydrophile (Wasserlöslichkeit) und hydrophobe Bereiche → Amphiphilie, Bestätigung für Mizelltheorie → gushing-aktive Substanzen binden nicht vollständig irreversibel an Phenylsepharose (Hinweis auf Hydrophobine)
HWA Fus+; unpolar (HIC)	gushend	
HWA Fus+; stark unpolar (HIC)	gushend	
HWA Fus+; sehr stark unpolar (HIC)	stabil	
selbstgebrautes Gushingbier	gushend	Bestätigung für Gushingtest nach Donhauser Finnischer ELISA-Test auf Hydrophobine (<i>F. poae</i>) negativ – spricht auf Hydrophobintypen, wie sie in Mitteleuropa verbreitet sind, nicht an?

¹ ZEPF; M.: Diss. TU München, 1998

Tabelle 18: **Übersicht – Überschäumverhalten von Mischungen**

Testmaterial Basisprobe mit Zusatz	Überschäum- Verhalten	Bedeutung
Würze / Bier, nicht gushend / Spumat von nicht gushendem Bier	stabil kein Einfluss	LTPs sind keine Gushing-Initiatoren
Würze / Bier, nicht gushend / Spumat von gushendem Bier	stabil kein Einfluss	modifizierte LTPs aus Gushingbieren sind keine Gushing-Initiatoren; im Spumat angereicherte Hydrophobine gehen verloren bzw. können wegen vorzeitiger Denaturierung kein Gushing auslösen
Würze / Bier, gushend / Spumat von nicht gushendem Bier	gushend kein Einfluss	LTPs aus nicht gushenden Bieren sind keine Promotoren
Würze / Bier, gushend / Spumat von gushendem Bier	gushend kein Einfluss	LTPs aus Gushingbieren sind keine Gushing-Promotoren
FKF Fus- / Spumat von nicht gushendem Bier	stabil kein Einfluss	Hydrophobine von Fus- und LTPs von stabilem Bier funktionieren nicht gemeinsam als Gushing-Initiatoren und –Promotoren (anwesende Inhibitoren!)
FKF Fus- / Spumat von gushendem Bier	stabil kein Einfluss	Hydrophobine Fus- und LTPs von Gushingbier funktionieren nicht gemeinsam als Gushing-Initiatoren und -Promotoren (anwesende Inhibitoren!)
FKF Fus+ / Spumat von nicht gush. Bier	stabil kein Einfluss	Hydrophobine Fus- und LTPs von stabilem Bier funktionieren nicht gemeinsam als Gushing-Initiatoren und -Promotoren (anwesende Inhibitoren!)
FKF Fus+ / Spumat von gushendem Bier	stabil! kein Einfluss	Hydrophobine Fus- und LTPs von Gushingbier funktionieren nicht gemeinsam als Gushing-Initiatoren und –Promotoren; keine Inhibitoren. Fehlen viskositätserhöhende Kohlenhydrate als Promotoren?
Bier, nicht gushend / FKF Fus-	stabil kein Einfluss	LTPs von stabilem Bier und Hydrophobine (Fus-) funktionieren nicht gemeinsam als Gushing-Initiatoren und –Promotoren; Anwesenheit von Inhibitoren!
Bier, gushend / FKF Fus-	leichte Dämpfung	Anwesenheit weniger Gushing-Inhibitoren
Bier, nicht gushend / FKF Fus+	stabil kein Einfluss	LTPs von stabilem Bier und Hydrophobine (Fus-) funktionieren nicht gemeinsam als Gushing-Initiatoren und –Promotoren
Bier, gushend / FKF Fus+	gushend kein Einfluss	LTPs von stabilem Bier und Hydrophobine Fus-; Hydrophobine werden nicht in vorhandene Mizellen eingebaut → kein synergistischer Effekt

Lipide

Amphiphile Lipide (verseifbare und einfache Lipide mit polarem Aufbau) pilzlichen wie pflanzlichen Ursprungs waren der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit.

Von Fusarien produzierte, extrazelluläre, polare Lipide wurden aus dem extrazellulären Fusarienkulturfiltrat extrahiert. Die Dünnschichtchromatographie leistete gute Dienste als Screeningverfahren. So konnten auf einfache, preisgünstige und reproduzierbare Weise die Lipidspots neun verschiedener Fusarienarten miteinander verglichen werden. Es stellte sich heraus, dass allen untersuchten Fusarienarten drei Spots gemeinsam waren. Diese drei Lipidfraktionen wurden unter den Lipiden einiger Malze, Würzen und Biere wiedererkannt. Zusätzliche Spots mancher Spezies wurden außer Acht gelassen, da kein Spot für zu Gushing führende oder nicht zu Gushing führende Arten charakteristisch war. Stattdessen unterschieden sich zum Teil sogar verschiedene Stämme einer Art in diesen Spots.

In den Dünnschichtchromatogrammen der Malzlipide ließen sich die fusarientypischen Lipidspots nicht erkennen. Die aus den Malzen extrahierten Lipide störten sich bei der Trennung gegenseitig. Erst im Laufe des Brauprozesses setzen sich offenbar die Fusarienlipide durch, da diese gute Löslichkeit im wässrigen Milieu zeigen, also stärker polar sind als die meisten pflanzlichen Lipide. Zwischen Malzen, die im Gushingtest überschäumten und solchen, die nicht zu Gushing neigten, war kein Unterschied zu erkennen. Dies galt sowohl für Gersten- als auch für Weizenmalze.

Unter den Würzelipiden waren Fusarienlipide gut erkennbar. Die drei Lipidspotserien ließen sich in allen Gerstenmalz-Proben – ob gushend oder nicht gushend! – wiederfinden. Durch Beimischen von isolierten Fusarienlipiden zu den Würzelipiden konnten sogar noch weitere Banden den Fusarienlipiden zugeschrieben werden.

Zusammenhänge zwischen Überschäumvolumen und Fusarienbefall konnten aber nicht mit dem Gushingpotenzial korreliert, nicht festgestellt werden. Zudem stand kein eindeutig primär gushing-aktives Gerstenmalz zur Verfügung.

In Weizenmalzwürzen waren immer noch so viele verschiedene polare Lipidtypen vorhanden, dass diese bei einer dünnschichtchromatographischen Trennung

ineinander verliefen. Deshalb konnte hier kein Lipidspot den Fusarienlipiden zugeordnet werden.

Unter den Bierlipiden waren im Vergleich zu den Würzelipiden nur mehr die polarsten Lipide vorhanden; weniger polare Lipide waren während der Bierbereitung abgeschieden worden. Unter den Weißbierlipiden konnten nun mit Hilfe von Additionsversuchen sehr polare Fusarienlipide nachgewiesen werden, darunter Lipidspot S 3. Dies galt für die Lipide sowohl aus gushenden als auch aus nicht gushenden Weißbieren. Somit ließ sich anhand der Weißbierlipid-Chromatogramme nicht erkennen, ob es sich um gushendes oder nicht gushendes Bier handelte. Die Anwesenheit der Fusarienlipide war zwar nachweisbar, nicht aber ihr Einfluß auf die Gushingtendenz.

Die anatomischen Unterschiede zwischen Weizen und Gerste bringen einen schwächeren Fusarienbefall der Gerste gegenüber dem Weizen mit sich. Dies hat zur Folge, dass die Fusarienlipide bei Gerstenmalzsuden unter den Würzelipiden durchaus erkennbar sind, während Weißbiere für Lipiduntersuchungen den Weizenmalzwürzen vorzuziehen sind.

Zunächst wurden die Lipidextrakte aus dem Heisswasserauszug von Fusarieninfiziertem Treber separat auf die Gushingneigung untersucht. Der Treber war mit *Fusarium culmorum*, einem zu Gushing führenden *Fusarium*, inokuliert und inkubiert worden. Erwartungsgemäß schäumten die aufbereiteten Lipidextrakte nicht über (keine Gushing-Initiatoren). Erstaunlicher war, dass die proteinreiche Fraktion des Ionenaustauschs vom gleichen Ausgangsmaterial mit keinem dieser Lipidextrakte synergistische Effekte zeigte. Die Mischmizellen-Arbeitshypothese, die von Initiatoren und Promotoren als heterogene Co-Bausteine in der Mizellhaut ausging, konnte nun nicht mit Fusarienlipiden als Gushing-Promotoren untermauert werden. Stattdessen hatten die Lipide der zu Gushing führenden Fusarienart keinerlei Einfluss auf das Gushingpotenzial der angereicherten Proteinfraktion.

Der Einfluss polarer Fusarienlipide auf das Gushingpotenzial Kohlendioxid-haltiger Flüssigkeiten wurde ebenfalls in Bieren und Würzen überprüft. Dazu wurden diese Pilzlipidauszüge gushenden und nicht gushenden Bieren sowie primärgushender Würze beigemischt. Bei der als erstes untersuchten, zu Gushing führenden Fusarienart *Fusarium graminearum* wurden die Ergebnisse, die mit den Lipiden des

Heisswasserauszuges erzielt worden waren, bekräftigt: Weder bei gushing-aktiven, noch bei gushing-inaktiven Basisproben wurde durch die Zugabe der Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart die Gushingneigung beeinflusst. Diese Tatsache ließ sich mit Hilfe weiterer zu Gushing führender Fusarienarten ausnahmslos bestätigen. Die Lipide verhielten sich weder als Gushing-Initiatoren noch als –Promotoren, aber auch nicht als Inhibitoren.

Die Zumischung der Lipide von nicht zu Gushing führenden Fusarienarten führte dann jedoch zu einer großen Überraschung: Die Lipidextrakte von *Fusarium tricinctum* waren in der Lage, das primäre Gushingpotenzial aller zuvor gushing-aktiver Basisproben komplett zu unterbinden. Basisproben ohne Gushingaktivität blieben unbeeinflusst. Lipide nicht zu Gushing führender Fusarienarten konnten als Gushing-Inhibitoren für Primärgushing charakterisiert werden, zumal auch weitere untersuchte, nicht zu Gushing führende Fusarienarten zum gleichen Ergebnis führten. Dabei waren die gushing-dämpfenden Fusarienlipide keineswegs schaumnegativ, denn weder die Schaumfähigkeit gushing-aktiver Würzen noch gushing-aktiver Biere litt gegenüber normalen Proben.

Auch die Lipide von *Geotrichum candidum* verhielten sich im Kombinationstest als Gushing-Inhibitoren.

Die Resultate aus den Kombinationsversuchen verlangten nach einer strukturchemischen Erklärung. Hierzu war der Vergleich eines wichtigen strukturchemischen Faktors zwischen den polaren Lipiden der beiden Fusariengruppen notwendig. Da bereits in früheren Arbeiten dem Sättigungsgrad der Fettsäuren eine charakteristische Wirkung auf die Gushingtendenz zugeschrieben worden war, sollten auch die Lipide pilzlichen Ursprungs auf das Verhältnis der in den komplexen Lipiden gebundenen Fettsäuren untersucht werden¹. Dazu bot sich eine gaschromatographische Trennung der methylierten Fettsäuren aus der polaren Lipidfraktion an. Tatsächlich ließ sich anhand dieser Untersuchungen feststellen, dass bei zu Gushing führenden Fusarien das Verhältnis gesättigter zu ungesättigten Fettsäuren weit über 0,7 lag, dagegen bei nicht zu Gushing führenden Fusarien unterhalb von 0,4.

Der Zusatz eines kommerziellen Gushing-Inhibitors auf Basis von Hopfenölen hatte bei primärem Gushing nicht zum Ziel geführt, während sekundäres Gushing

¹ ZEPF, M.: Diss. TU München 1998

unterdrückt worden war. Ebenso verhielt es sich mit den Lipiden von nicht zu Gushing führenden Fusarienarten. Lipide von nicht zu Gushing führenden Fusarienarten dagegen waren in der Lage, primäres und sekundäres Gushing zu unterdrücken. Daraus lässt sich ableiten, dass primäres Gushing nur von polaren Lipiden unterdrückt werden kann, die zur Mizellbildung fähig sind und durch ihre sterische Anordnung für gasdurchlässige Poren in der Mizellmembran aus Gushinginitiatoren sorgen. Terpene und polare Lipide verestert mit überwiegend gesättigten Fettsäuren hingegen können nur dann Gushing verhindern, wenn gushing-initiiierende Gasreste nicht von einer Membran geschützt sind.

Natürliche Inhibitoren für primäres Gushing sind also polare, schaumverträgliche Lipide überwiegend mit ungesättigten Fettsäuren verestert, die von nicht zu Gushing führenden Fusarien produziert werden.

Tabelle 19: **Übersicht – Überschäumverhalten Lipide**

Testmaterial	Überschäum- Verhalten	Bedeutung
Lyophilisat resolvatisiert (HWA Fus+), kalt entfettet mit Petrolether und CH ₂ Cl ₂ :MeOH (2:1)	gushend	polare Lipide von Fus+ sind weder Gushing-Initiatoren noch Gushing-Promotoren noch Inhibitoren
Lipide (HWA Fus+), Petroletherfraktion	stabil	Unpolare Lipide von Fus+ sind keine Gushing-Initiatoren
Lipide (HWA Fus+), Isopropanol bzw. (Dichlormethan : Methanol (2 :1))	stabil	polare Lipide von Fus+ sind keine Gushing-Initiatoren
nicht ion.Substanzen (HWA Fus+) / Lipide (HWA Fus+), Petrolether bzw. Dichlormethan : Methanol (2 :1)	stabil kein Einfluss	Unpolare Lipide von Fus+ sind weder Gushing-Initiatoren noch -Promotoren
ion. Substanzen (HWA Fus+) / Lipide (HWA Fus+) Petrolether bzw. Dichlormethan : Methanol (2 :1)	gushend kein Einfluss	Unpolare Lipide von Fus+ sind weder Gushing-Initiatoren noch -Promotoren noch Inhibitoren
Würze bzw. Bier primärgushend / Lipide (FKF Fus+), Dichlormethan : Methanol (2 :1)	gushend kein Einfluss	polare Lipide von Fus+ sind weder Gushing-Initiatoren noch -Promotoren noch Inhibitoren
Bier, gushend / FKF Fus-	gushend leichte Dämpfung	Geringe Dosis an Gushing-Inhibitoren
Würze bzw. Bier gushend / Lipide (FKF Fus-), Dichlormethan : Methanol (2 :1)	stabil Gushing dämpfend	polare Lipide von Fus- sind Gushing-Inhibitoren für primäres Gushing

6 Ausblick

Sicherlich haben die letzten Jahren intensiver Gushingforschung einiges erreicht, wenn auch manche Antwort viele neue Fragen aufgeworfen hat. Die vielschichtige Betrachtung des Problems von der chemischen, physikalischen, biologischen, mikrobiologischen, landwirtschaftlichen und brauereitechnologischen Seite führte kontinuierlich in kleinen Schritten nach vorne. In den vergangenen Jahren entwickelten sich Theorien über die zu Gushing führenden Mechanismen, die nach und nach bestätigt oder widerlegt werden müssen.

So musste auch die dieser Arbeit zugrunde gelegte Arbeitshypothese über Mischmizellen neu überdacht werden, um die experimentellen Ergebnisse erklären zu können. Die Resultate entsprachen dem modifizierten Modell von Proteinmizellen, die durch Einlagerung von Lipiden verestert mit ungesättigten Fettsäuren gasundicht werden, ließen sich so logisch begründen oder sogar vorhersagen.

Einige Unklarheiten und die Tatsache, dass ein so vielschichtiges Problem einen nicht zu bewältigenden Umfang an Untersuchungen verlangt, machen weitere Untersuchungen notwendig, die nach wie vor das ganze Spektrum an Möglichkeiten zur Gushing-Entstehung abdecken sollten.

Den Brauer mit akuten Gushingproblemen mag es wenig trösten, dass bisher in puncto primärem Gushing in erster Linie die theoretische Problemlösung auf dem Vormarsch ist. Theoretisches Verständnis ist aber nun einmal die beste Voraussetzung für praktische Lösungen.

7 Material und Methoden

7.1 Geräte

Abfüllanlage, Esau & Hueber, Schrobenhausen

AS 30 Dünnschichtchromatographie-Auftragsgerät, Desaga - Sarstedt, Heidelberg

Corneliuscontainer, Cornelius, Langenfeld, Austria

Elektrophoresekammer Desaphor HF, Desaga - Sarstedt, Heidelberg

Gefriertrocknungsanlage L 05, WKF, Brandau

Filtrationsanlage, Seitz, Bad Kreuznach

Kleinsudanlage mit ZKG´s, BAM, Freising

Kryostat RK 20, Lauda Königshofen

Kühlzelle, K + T GmbH, Weikersheim

Labofuge GL, Heraeus, Hanau

LKB 2111 Multirac, Amersham Biosciences, Freiburg

LKB 2132 Microperpex Peristaltic Pump, Amersham Biosciences, Freiburg

LKB 2197 Power Supply, Amersham Biosciences, Freiburg

LKB 2210 2-Channel Recorder, Amersham Biosciences, Freiburg

LKB 2238 UVICORD SII, Amersham Biosciences, Freiburg

LKB 2297 Macrodrive 5 Power Supply, Amersham Biosciences, Freiburg

LKB Ultraphor 2217 Elektrophoresekammer, Amersham Biosciences, Freiburg

MEBAK Mühle, Bühler Miag, Braunschweig

Pilz-Heizhaube mit 3-stufigem Leistungsregler, Heraeus, Hanau

Rotationsverdampfer VV 2000, Heidolph, Kehlheim

SG 1 Sprühgerät für Dünnschichtchromatographie, Desaga - Sarstedt, Heidelberg

Sorvall RC-5B Hochleistungszentrifuge, Kendro, Rodenbach

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

Thermoplate S, Desaga - Sarstedt, Heidelberg

Trübungsmessgerät, Monitek, Düsseldorf

Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg

Varioklav, H & P Labortechnik, Oberschleißheim

Variomag Elektronikrührer, Hois & Partner, München

Zerschäumungsapparatur, Maßfertigung Glasbläserei, Weihenstephan

7.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Ammoniumperoxodisulfat (PER), Serva, Heidelberg
Ampholyte, pH variabel, Serva, Heidelberg
Aprotinin, Sigma-Aldrich, Steinheim
Centricon, Millipore, Eschborn
Coomassie G 250, Serva, Heidelberg
Coomassie R 250, Serva, Heidelberg
Coomassie-Proteinreagenz, Bio-Rad, München
Cytochrom C (Pferdeherz), Roche, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma-Aldrich, Steinheim
1,4 Dithiothreitol (DTT), Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Roth, Karlsruhe
Euroflaschen 0,5l – Neuglas, bezogen von Staatsbrauerei, Weihenstephan
ExcelGel Buffer Strips, Amersham Biosciences, Freiburg
ExcelGel SDS Homogenous 12,5 %, Amersham Biosciences, Freiburg
ExcelGel SDS Homogenous 15,0 %, Amersham Biosciences, Freiburg
Fleischextrakt, Merck, Darmstadt
Gelbond PAG-Film, BMA, Rockland, Maine, USA
Gellösungen rotiphorese A und B, Roth, Karlsruhe
Gushing-Inhibitor, Hopsteiner, Mainburg
Hefeextrakt, Merck, Darmstadt
HPTLC Kieselgelplatten 60 F 254, 20 x 10 cm, Merck, Darmstadt
IEF-Proteinmarker, Serva, Heidelberg
Kieselgur grob und fein - Filtrierhilfsmittel, Seitz, Bad Kreuznach
Malzextrakt, Merck, Darmstadt
Molybdätophosphorsäure, Merck, Darmstadt
MTBE (tertiärer Butylmethylether), Merck, Darmstadt
Natriumazid, Merck, Darmstadt
Parafilm, Pechiney, Wisconsin, USA
PEG –20000 (Polyethylenglykol), Roth, Karlsruhe
Pepton (Bacto), Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France
Perhydrol (30%-iges H₂O₂), Merck, Darmstadt
Petrolether (40–60°), Merck, Darmstadt

Phenol, Sigma-Aldrich, Steinheim
 Phenylsepharose 6 Fast Flow (high sub), Amersham Biosciences, Freiburg
 Q Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Freiburg
 Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA), Roche, Mannheim
 SDS (Natriumdodecylsulfat), Serva, Heidelberg
 SDS-Proteinmarker LMW-Calibration Kit, Amersham Biosciences, Freiburg
 Sephacryl S-300 High Resolution, Amersham Biosciences, Freiburg
 SPE-Säulchen C18, 6 ml Säulchen mit 100 mg Füllung, Mallinckrodt / Baker, Phillipsburg, N.J., USA
 TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin), Serva, Heidelberg
 Trichloressigsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
 Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim
 Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH), Macherey-Nagel, Düren
 Visking, MWCO 10 – 14 kDa, verschiedene Durchmesser, Serva, Heidelberg

7.3 Untersuchungsmaterial

Mikroorganismen:

<i>Fusarium avenaceum</i>	LN 23.90	<i>Fusarium culmorum</i>	DSMZ 62182
<i>Fusarium equiseti</i>	LN 101.89	<i>Fusarium graminearum</i>	DSMZ 4529
<i>Fusarium poae</i>	LN 33.90	<i>Fusarium oxysporum</i>	DSMZ 62292
<i>Fusarium sambucinum</i>	LN 104.93	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	LN 147.89
<i>Fusarium tricinctum</i>	LN 111.89		
<i>Geotrichum candidum</i>	DSMZ 1240		
<i>Paenibacillus macerans</i> DSMZ 24 (Aufbewahrung bei 4°C im Medium nach Kap. 7.4 für <i>P. macerans</i>)			

Mit „LN“ bezeichnete Stämme wurden von Herrn Priv. Doz. Dr. L. Niessen isoliert und dem Lehrstuhl überlassen.

Die Stammsammlungen wurden in SNA-Agar bei 10°C aufbewahrt¹.

¹ Vgl. NIESSEN, L.: Diss. TU München 1993

Treber

Frischer Nasstreber von untergärigem Lagerbier wurde dem Läuterbottich der Staatsbrauerei Weihenstephan entnommen und sofort weiterverarbeitet. Zur Konservierung wurde der Nasstreber gefriergetrocknet.

Gerste

G8: Braugerste von Freilandversuchen, Erntejahr 2000, Sorte unbekannt

Malze

GM- 1: Helles, nicht gushendes Gerstenmalz

GM+1: Helles, gushendes Gerstenmalz

GM+2: Helles, gushendes Gerstenmalz

GM+3: Helles, gushendes Gerstenmalz

WM- 1: Helles, nicht gushendes Weizenmalz

WM+1: Helles, gushendes Weizenmalz

WM+2: Dunkles, gushendes Weizenmalz

WM+3: Helles, gushendes Weizenmalz

Würze

GW- 1: Helle, nicht gushende Gerstenmalzwürze (=Würze aus GM-1)

GW+1: Helle, gushende Gerstenmalzwürze (=Würze aus GM+1)

GW+2: Helle, gushende Gerstenmalzwürze (=Würze aus GM+2)

GW+3: Helle, gushende Gerstenmalzwürze (=Würze aus GM+3)

GW+4/5/6/7: Weitere gushende Praxiswürzen

WW- 1: Helle, nicht gushende Weizenmalzwürze (=Würze aus WM-1)

WW+1: Helle, gushende Weizenmalzwürze (=Würze aus WM+1)

WW+2: Dunkle, gushende Weizenmalzwürze (=Würze aus WM+2)

WW+3: Helle, gushende Weizenmalzwürze (=Würze aus WM+3)

Bier

WB+2: Dunkles, selbstgebrautes Gushing-Kristallweißbier, 1. Sud (aus WM+2)

WB+2a: Dunkles, selbstgebrautes Gushing-Kristallweißbier, 2. Sud (aus WM+2)

WB+4: Helles, gushendes Weißbier

WB- 5: Helles, nicht gushendes Kristallweißbier

WB- 6: Helles, nicht gushendes Kristallweißbier

WB- 7: Helles, nicht gushendes Weißbier

WB- 8: Dunkles, nicht gushendes Weißbier

GB+ 4: Helles, untergäriges Gushingbier

GB- 5: Helles, untergäriges, nicht gushendes Bier

7.4 Puffer, Medien, Lösungen

Dialysepuffer

Zur Dialyse wurden 2, 3 oder 5 cm-breite Visking-Schläuche aus regenerierter Zellulose verwendet, die jeweils eine obere Ausschlussgrenze (MWCO-molecular weight cut off) von 10 kDa besaßen.

Erst wurde über 3 Tage bei 4°C unter mehrmaligem Pufferwechsel gegen 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0), dann gegen 10%-ig PEG (MG 20000) in Natriumphosphatpuffer dialysiert.

Minimalmedium nach Dons et al.¹

3,6 g Glucose

40 g Saccharose

2 g Hefe-Extrakt

1 g Malz-Extrakt

1,5 g (NH₄)₂SO₄

1 g MgSO₄ x 7 H₂O

0,46 g KH₂PO₄

1 g K₂HPO₄

5 mg FeCl₃

Alle Zutaten wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf 1l aufgefüllt.

¹ DONS, J.J.M. et al.: In Biochim. Biophys. Acta, Elsevier Holland **563** (1979), 100-112

Würzeagar

1l gehopfte Würze (ca. 8% Extrakt) 16-18 g Agar

Synthetischer nährstoffarmer Agar (SNA) nach Nirenberg¹

1 g KH ₂ PO ₄	0,5 g KCl
1 g KNO ₃	0,2 g Glucose
0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g Saccharose
20 g Agar	

Die Zutaten wurden in destilliertem Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und 15 min. bei 121°C autoklaviert.

Bei allen Ansätzen, mit Ausnahme der Fusarienstammkulturen, wurde auf den Agar zur Verbesserung der Verarbeitungsmöglichkeiten verzichtet.

Medium für *Paenibacillus macerans* DSM 24

Pepton	5,0 g	Fleischextrakt	3,0 g
Agar	15,0 g		

Die Zutaten wurden in destilliertem Wasser gelöst, die Lösung auf pH 7,0 eingestellt, mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Nach der Beeimpfung mit *Paenibacillus macerans* wurde das Medium bei 30°C ca. 10 Tage lang unter gelegentlichem Umschütteln bebrütet.

¹ NIRENBERG, H.I.: In: Can. J. Bot. **59** (1981), 1599-1609

7.5 Allgemeine Methoden

7.5.1 Gushingtest nach Donhauser et al.¹

- a) 860 g geschrotetes Malz (170 g Trockentreber / Fusarien-bewachsener Treber) mit 4,6 l Wasser bei RT einmaischen, 100 min. rühren
- b) 80 min bei Stufe 2 zum Kochen aufheizen, kurz vor Kochbeginn Kühler aufsetzen
- c) 1 h Kochen bei Heizstufe 1
- d) Heissfiltration über Faltenfilter
- e) Lagerung bei 4°C mind. 12 h zur Kühltrubabscheidung
- f) Zentrifugation bei 9.000 U/min., 4°C, 20 min.
- g) Zugabe von 0,2 g/l Natriumazid zum Überstand
- h) Carbonisierung im Container: Erst ca. 30 s. über Füllrohr CO₂ durch Flüssigkeit perlen lassen, sodass Luft nach oben über Deckelventil entweichen kann; dann auf 4,6 bar bringen; 36 h äquilibrieren lassen (auf 2,8 bar +/- 0,1 bar)
- i) Neuglasflaschen langsam füllen, beim Schließen des Füllventils langsam druckentlasten; rasch verkorken
- j) Lagerung bei RT 2 Tage
- k) 4x Über-Kopf-Wenden der Flasche um 360° (2 s pro Wendung), 5 min. stehen lassen
- l) Rasches Öffnen der Flasche, einzelne Überschäumvolumina durch Differenzwägung ermitteln, Ergebnis: Durchschnittswert der Einzelöffnungen

¹ DONHAUSER, S.; WEIDENEDER, A.; WINNEWISSER, W.; GEIGER, E.: In: Brauwelt **129** (1989), 1658

7.5.2 Forciertest

Die kolloidale Stabilität von Bieren wird für gewöhnlich mittels der Forciermethode geprüft. In den Brautechnischen Analysenmethoden (MEBAK) wird für nicht stabilisierte Biere eine Temperatur von 40°C vorgeschlagen. Dabei werden mindestens 5 Flaschen in einem 24-stündlichem Wechsel so lange 40°C und 10°C ausgesetzt, bis eine Trübungszunahme von 2 EBC-Formazineinheiten erreicht sind. In dieser Arbeit wurden jedoch Treber-Heisswasserauszüge untersucht, die die 2,0 EBC-Einheiten schon vor der Forcierung weit überschritten hatte. Deshalb wurden alle parallel untersuchten Treber-Heisswasserauszüge, die von unterschiedlichen Fusarien stammten, direkt miteinander verglichen.¹

7.5.3 Quantifizierung von Calcium-, Eisen- und Aluminiumionen

Die benötigten quantitativen Kationenbestimmungen wurden von der Staatlichen Brautechnischen Prüf- und Versuchsanstalt Weihenstephan mittels ICP OES (Inductively-Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) durchgeführt^{2,3,4,5}. Die ICP OES erlaubt die quantitative Erfassung von bis zu 92 Elementen gleichzeitig. Die Messlösung wird zerstäubt und das Aerosol mit Hilfe eines Trägergases in ein induktiv gekoppeltes Plasma (ICP) transportiert. Dort werden die Elemente zur Strahlung angeregt. Diese wird in einem Spektrometer zerlegt, und die Intensitäten der emittierten Elementlinien werden mit Detektoren (Photovervielfachern) gemessen.

Dabei können nach geeigneter Verdünnung die Elemente ohne weitere Aufbereitung direkt quantifiziert werden, wodurch die Methode sehr sicher und genau ist.

¹ SCHILD, E. et al.: In: Brauwissenschaft **17** (1964), 289

² FISHMAN, M.J.; FRIEDMAN, L.C.: In: U.S. Geological Survey Open-File Report **8**, 709

³ FIRMENSCHRIFT: Concepts Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma, Perkin Elmer, Düsseldorf

⁴ NÖLTE, J.: ICP Emissionsspektroskopie für Praktiker, Wiley VCH, 2002

⁵ DIN 38 406 – E 22 : 1988-03: Deutsches Forschungsinstitut für Normung e.V., Berlin 1988

7.5.4 Oxalsäure-Bestimmung

Die quantitative Oxalsäure-Bestimmung erfolgte über die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) und wurde als Auftragsanalyse von der Staatlichen Brautechnischen Prüf- und Versuchsanstalt Weihenstephan durchgeführt¹.

7.5.5 Bestimmung der Gesamtkohlenhydrat-Konzentration (Phenolmethode)²

Die Bestimmung erlaubt die Abschätzung der Summe aller Kohlenhydrate in der Probe. Die Reagenzien erfassen reduzierende wie nicht reduzierende Zucker, Pentosen und Hexosen, sowie Mono-, Oligo- und Polysaccharide. Die Messung erfolgt über den Vergleich der Färbungen des Glucose-Standards mit der zu untersuchenden Probe.

Stammlösung 1 mg/ ml Glucose

daraus eine Verdünnungsreihe mit 5, 10, 30, 50 µg /ml

Standardkurve: 800 µl der Standardverdünnungen

20 µl wässrige Phenol-Lösung (80%ig)

2,0 ml H₂SO_{4 conc}

Probe: 800 µl der (gegebenfalls verdünnten) Probe

20 µl wässrige Phenol-Lösung (80%ig)

2,0 ml H₂SO_{4 conc}

Reagenzien-

Leerwert: 800 µl H₂O + 20 µl wässrige

Phenol-Lösung (80%ig) + 2,0 ml H₂SO_{4 conc}

Die Extinktionsmessung wurde bei 485 nm in 1 cm Küvetten gegen den Reagenzienleerwert vorgenommen.

¹ DRAWERT, F. (Hrsg.): Brautechnische Analysenmethoden- MEBAK 3, 1996, 87-88

² ASHWELL, G.:In: Meth. Enzymol. VIII, Academic Press, New York 1966, 85-95

7.5.6 Gesamtphenole (EBC)¹

Polyphenole reagieren mit Eisen(III)-Ionen in alkalischer Lösung unter Bildung gefärbter Eisenkomplexe; die entstehende bräunliche Farbe wird spektralphotometrisch gemessen.

10 ml Probe
0,5 ml Ammonium-Fe-Citrat
auf 25 ml mit H₂O auffüllen

8 ml CMC-EDTA-Na₂
0,5 ml Ammoniak

Die Extinktionsmessung erfolgt nach 10 min bei 600 nm gegen einen Reagenzienleerwert.

Reagenzienleerwert:

10 ml Probe
0,5 ml Ammoniak-lösung
auf 25 ml mit H₂O auffüllen

8 ml CMC-EDTA-Na₂

Der Gesamtphenolgehalt lässt sich aus der folgenden Gleichung errechnen:
Gesamtphenole (mg/l) = E x 820

Herstellung von CMC-EDTA-Na₂:

10 g Carboxymethylcellulose (CMC), niederviskos
2 g EDTA-Na₂ in 500 ml H₂O lösen
mit H₂O auf 1 l auffüllen, evtl. zentrifugieren

Herstellung von ammoniakalischer Ammoniumeisen-(III)-citrat-Lösung (3,5%ig):

3,5 g Ammoniumeisen-(III)-citrat, grün (16% Fe) in 100 ml H₂O lösen
Ammoniak: H₂O (1:2)

¹ DRAWERT, F.: In: Proc. EBC Congr. (1979), Berlin (West), 335-340

7.6 Spezielle Arbeitsmethoden

7.6.1 Varianten des Gushingtests nach Donhauser et al.

Zugabe von Calciumionen

Zu Gerstenwürzen wurden 1,4 ml 30%-ige Calciumchloridlösung (3,8 mmol) und 2,8 g Calciumsulfat (20,6 mmol) zugegeben. Dies entspricht den praxisüblichen Zudosierungen.

Aufgrund des natürlicherweise höheren Oxalsäuregehaltes von Weizenmalzen wurde Weizenwürzen die doppelte Menge der Calciumsalze zudosiert.

Die Salze wurden stets Reinheitsgebot-konform im Brauwasser gelöst zugeführt.

Zugabe des Komplexbildners EDTA-Na₂ (Titriplex III)

6,85 g EDTA-Na₂ x 2 H₂O wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst beim Gushingtest mit dem Aufsetzen des Kühlers (Kap. 7.5.1 b)) zugeführt (zum Einmischen nur 4,5 l destilliertes Wasser verwenden), damit eine Beeinträchtigung der Enzymaktivitäten während des Maischens (durch Entzug der Kationen im katalytischen Zentrum) sicher ausgeschlossen werden konnte.

Adsorption grenzflächenaktiver Würzebestandteile an Parafilm

Während der Durchführung des Würze-Gushingtests wurde nach der Heissfiltration (Arbeitsschritt d)) zur noch ca. 50°C warmer Würze ca. 14 g (entspricht 0,3 m³ Oberfläche) des zerkleinerten Parafilms zugegeben. Unter Rühren wurde die Würze dann allmählich auf 4°C abgekühlt und 24 Stunden lang , bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurde das Adsorptionsmaterial wieder entfernt und der Gushingtest wie gewohnt fortgesetzt.

7.6.2 Gushingtest für eine Stoffgruppe

Die in einem vorhergehenden Trennungsschritt präparativ gewonnene Fraktion wurde in 0,01 M Acetatpuffer mit pH 4,7 gelöst, 23 ml unvergälltes Ethanol zugegeben (→ 5 % vol/vol) und mit Puffer auf 4,6 l aufgefüllt. Mit der so aufbereiteten Stoffgruppe wurde der Gushingtest nach Donhauser a)-l) durchgeführt.

7.6.3 Beimischung von Fusarienlipiden

Die Basisprobe wurde auf -3°C gekühlt. Dann wurde unter äußerster Vorsicht 1 ml Matrix durch die alkoholische Lipidlösung (unvergälltes Ethanol) ersetzt.

7.6.4 Handhabung der Fusariendauerkulturen

Fusarien wurden aus der Lehrstuhl-eigenen Stammsammlung (Kap. 7.3) regelmäßig auf Würzeagar übergeimpft, um frische, üppig wachsende Pilzkörper zu erhalten. Anschließend wurde wenig Myzel in flüssiges SNA-Medium nach Nirenberg¹ übertragen, da die Pilze in diesem Medium in besonderem Ausmaß die typischen Konidienformen produzieren. Zur Einschränkung der Myzelbildung wurde das Medium während des Sporulierens bei Raumtemperatur geschüttelt. Mithilfe dieser Sporensuspensionen konnten dann die verschiedensten Matrices (SNA-Flüssigmedium, autoklavierter Treber) beimpft werden.

Jeweils vor der Inokulation einer Matrix mit einer Sporensuspension wurden zur Überprüfung der Pilzidentität die Konidiosporen mikroskopisch untersucht.²

7.6.5 Fusarienkulturen (flüssig)

Die Fusarien wurden mithilfe der Sporensuspensionen in ca. 400 ml des autoklavierten, synthetischen nährstoffarmen Flüssigmediums nach Nirenberg in ein flaches, verschließbares Gefäß übergeimpft. Nach einwöchiger Wachstumsphase

¹ NIRENBERG, H.I.: In: Can. J. Bot. **59**, 1981, 1599-1609

² NIESSEN, L.: Diss., TU München-Weihenstephan 1992

unter UV-Bestrahlung bei Raumtemperatur war ein Fusarienteppich an der Oberfläche sowie submerses Myzel herangewachsen. Diese Kulturen wurden filtriert, um die extrazellulären Stoffwechselprodukte der Fusarien, die auch ins Bier gelangen könnten, abzutrennen. Der Filtrerrückstand wurde verworfen.

Diese Fusarienkulturfiltrate wurden für Lipidextraktionen, proteinchemische Untersuchungen und Bestimmung des Hydrophilisierungs-Potenzials, sowie für Gushingtests nach Donhauser verwendet.

Geotrichum candidum wurde analog den Fusarien kultiviert.

7.6.5.1 Aufbereitung der Fusarienkulturen für SDS-PAGE und IEF

Die Fusarienkulturfiltrate wurden mittels Ultrafiltration (MWCO 3 kDa) unter regelmäßiger Kontrolle des Proteingehalts konzentriert.

7.6.5.2 Aufbereitung der Fusarienkulturen zur Lipidextraktion

Die Fusarienkulturfiltrate wurden lyophilisiert. (Lipidextraktion siehe Kap. 7.8.4).

7.6.6 Hydrophilisierungspotenziale von Fusarien

Das Fusarien-inokulierte SNA-Medium wurde 5 Tage lang bei 24°C und UV-Bestrahlung bebrütet. Anschließend wurde das bewachsene Medium luftblasenfrei mit Parafilm bedeckt und weitere zwei Tage bebrütet.

Danach wurde der Parafilm unter fließendem destilliertem Wasser gründlich von anhaftendem Myzel gereinigt, um schließlich nach vorsichtigem Abschütteln das verbliebene Haftwasser auszuwiegen.

7.7 Proteine

7.7.1 Quantitative Photometrie (Bradford)¹

Die Proteinbestimmung nach Bradford ermöglichte eine Abschätzung der Proteinkonzentrationen verschiedener Proben. Die Messung erfolgt über den Vergleich des Farbumschlags der Probe mit dem des Standardproteins BSA (Bovine Serum Albumin). Da BSA im Vergleich zu anderen Proteinen eine sehr hohe Affinität zu Coomassieblau besitzt, wird der Proteingehalt der Probe immer etwas unterschätzt. Coomassieblau zeigt dann eine hohe Affinität zu Proteinen, wenn diese eine intakte Sekundärstruktur besitzen. Vollständig denaturierte Proteine hingegen werden nicht erfasst (random coil).

Stammlösung 1 mg/ ml BSA

daraus eine Verdünnungsreihe 5, 10, 30, 50 µg/ ml

Standardkurve: 800 µl der verdünnten Stammlösung
200 µl Coomassie Reagenz

Probe: 800 µl der (gegebenfalls verdünnten) Probe
200 µl Coomassie Reagenz

Reagenzien-

Leerwert: 800 µl H₂O
200 µl Coomassie Reagenz

Die Extinktionsmessung wurde bei 595 nm in 1 cm Plastikkuvetten gegen den Reagenzienleerwert durchgeführt und über die Eichgerade ausgewertet.

¹ BRADFORD; M.: In: *Analyt. Biochem.* **72** (1976), 248-254

7.7.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Probenvorbereitung: Die Treber-Heisswasserauszug-Lyophilisate wurden im kleinstmöglichen Volumen destillierten Wassers gelöst und gegen 0,01M Natriumphosphat-Puffer pH 7 bzw. 10%iges PEG (MG 20000 Da) in 0,01M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 dialysiert (Kap. 7.4).¹ Die Proben wurden mit möglichst geringem Volumen desselbigen Puffers quantitativ aus dem Dialyseschlauch auf die Säule gespült.

Säulenmaterial:	Q Sepharose FF
Säulendimension:	200 mm x 26 mm
Gelbettvolumen:	ca. 50 ml
Waschpuffer:	0,01 M Tris, pH 8,5; 0 M NaCl
Elutionspuffer:	0,01 M Tris, pH 8,5; 1 M NaCl
Detektion:	280 nm
Fraktionen à 15 ml	

7.7.3 Hydrophobe Interaktion

Probenvorbereitung: Die Treber-Heisswasserauszug-Lyophilisate wurden in minimalem Flüssigkeitsvolumen (Waschpuffer) gelöst.²

Säulenmaterial:	Butylsepharose bzw. Phenylsepharose
Säulendimension:	200 mm x 26 mm
Gelbettvolumen:	53 ml
Waschpuffer:	1 M Ammoniumsulfat; 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7
Elutionsmittel:	1) 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 2) H ₂ O 3) 35%iges Dimethylsulfoxid (DMSO)
Detektion:	280 nm
15 ml Fraktionen	

¹ HIMMELHOCH, R.: In: Meth. Enzymol., **XXII**, Academic Press New York 1971, 273-286

² SHALTIEL, S.: In: Meth. Enzymol. **104**, Academic Press New York 1984, 69-96

7.7.4 Gelfiltration

Gelfiltration ist die einfachste und schonendste aller Chromatographie-Techniken. Hier werden die Moleküle auf Basis von Größenunterschieden getrennt. Dabei werden die Moleküle nicht an die Säule gebunden, sondern zeitweise in Poren definierter Größe eingelagert. Der Trennbereich des verwendeten Gels lag zwischen 1 kDa und 70 kDa.

Säulenmaterial:	Superdex 75 prep grade
Säulendimension:	200 mm x 26 mm
Gelbettvolumen:	45 ml
Probenpuffer:	0,05 M Natriumacetat, pH 4,7
Detektion:	280 nm
15 ml Fraktionen	

7.7.5 Zerschäumung

Säulendimension:	Ø 5,5 cm
	Länge: 165 cm
U-förmiges Überleitungsrohr:	Ø 5 cm
Verwendetes Gas:	Stickstoff
Gasdurchfluss:	12,8 ml/min
Glasfritte:	Porengröße 3 (15 – 40 µm)
Zeitraum:	ca. 5 h; (kein weiterer Schaumübertritt)
Eingesetzte Probe:	jeweils 2l

7.7.6 SDS-PAGE

Bei der nicht nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Durch Zusatz von SDS im Überschuss werden hydrophobe Bindungen gespalten und einzelne Ladungsunterschiede durch die Negativladung überdeckt. Die vollständige Streckung der Proteine kann optional durch den Zusatz von DTT erfolgen, der eine Reoxidation verhindert. Auf diese Weise werden Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur vollständig zerstört.

Alle Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen vorbereitet. Zur Trennung wurden homogene Fertiggele (T = 15,0 %; C = 2 %) verwendet.

Stammpuffer: 6,06 g Tris
 0,4 g SDS
 0,01 g NaN₃
 mit destilliertem H₂O → 80 ml
 mit 6 N HCl auf pH 6,8 einstellen
 mit destilliertem H₂O → 100 ml

Nichtreduzierende Probenpuffer:
 1,0 g SDS
 3,0 mg EDTA (verhindert eine katalytische Oxidation)
 0,01 g NaN₃
 10 mg Bromphenolblau
 2,5 ml Stammlösung
 mit destilliertem H₂O → 100 ml

DTT-Lösung: 250 mg DTT auf 0,5 ml destilliertem H₂O (täglich frisch zubereitet)

Reduzierender Probenpuffer:

10 ml nichtreduzierender Probenpuffer wurden mit 100 µl DTT-Lösung versetzt.

Probenvorbereitung:

250 µl Probe wurde mit 250 µl reduzierendem SDS-Puffer gemischt, 10 min. gekocht und danach pro 100 µl Probe 1µl DTT zupipettiert.

Gel: ExcelGel Homogenous T= 15,0 %

Probenauftrag: 15 µl wurden in eingegossene Probenaufgabebecken pipettiert

Die Elektrophorese der Proben wurde bei 14°C unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 20: **Bedingungen für die SDS-PAG-Elektrophorese (Begrenzungen)**

¹⁾ bis Bromphenolblau-Front etwa 1 cm über den Probenaufgabebecken ist

²⁾ Spannung reduzieren, wenn Bromphenolblau-Front ca. 0,5 cm von der Anode entfernt ist.

Zeit (min)	Spannung (V)	Strom (mA)	Leistung (W)
ca. 45 ¹⁾	200	50	30
80 ²⁾	600	50	22
ca. 30	100	5	5

7.7.7 Coomassie-Färbung nach Weber & Osborn für SDS-PAGE

Die Gele wurden mit Coomassie-Blau nach Weber & Osborn angefärbt¹.

Färbelösung:	2,5 g Coomassie G 250
	450 ml Methanol
	450 ml Wasser
	100 ml Eisessig
Spülen:	mit bidestilliertem Wasser
Entfärber:	50 ml Methanol
	875 ml bidestilliertes Wasser
	75 ml Eisessig

7.7.8 Native isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel

Die isoelektrische Fokussierung erlaubt eine Trennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) in einem elektrischen Feld². Dabei kommen native Gele ohne Harnstoffzusatz aus. Unter Verwendung der Klapptechnik nach Radola wurden ultradünne, native Gele auf Trägerfolie hergestellt^{3,4}.

Gel:	4,7%T; 3%C; 2,8%CA
Gelstammlösung	1720 µl rotiphorese Gel A (30 % Acrylamid)
	750 µl rotiphorese Gel B (2 % Bis)
	2300 µl Glycerin
	700 µl Servalymix (pH siehe entsprechende Abbildung)
	4600 µl dest. H ₂ O
	10 µl TEMED
PER-Lösung:	10 µl 40 %-ige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (40 mg in 100 µl)

¹ WEBER, K.; OSBORN, M.: In: J. Biol. Chem. **244** (1969), 4406-4412

² WESTERMEIER, R.: Electrophoresis in Practice, 2. Auflage, VCH Weinheim 1997

³ RADOLA, B.J.: In: Electrophoresis **1** (1980)

⁴ GÖRG, A.; POSTEL, W.; WESTERMEIER, R.: In: Anal. Biochem. **89** (1978)

Nach Polymerisation über Nacht wurde die Glasplatte mit einem Spatel vorsichtig entfernt, das Gel in die Fokussierkammer gelegt und nach Probenauftrag mit der isoelektrischen Fokussierung begonnen.

Elektrodenpuffer: Anode: 0,5 M H₃PO₄
 Kathode: 0,5 M NaOH

Probenauftrag: 17 µl; 1 cm von Kathode wurden mittels Applikationsstreifen aufpipettiert.

Tabelle 21: Fokussierbedingungen zur Proteintrennung bei 12°C (Begrenzungen)

	Zeit (min.)	Spannung (V)	Strom (mA)	Leistung (W)
Vorfokussierung	30	500	10	15
Probenfokussierung	30	500	10	15
Fokussierung	60	1000	10	15
Fokussierung	120	2000	10	15

7.7.9 Coomassie-Ampholytfärbung für IEF

Nach der isoelektrischen Fokussierung mit Ampholytmischung wurden die Ampholyte in der Fixierlösung entfernt und anschließend das Gel in Coomassie-Blau gefärbt¹.

Tabelle 22: Coomassie-Ampholyt-Färbung

	Reagenz	Kontaktzeit
Fixierung	Fixierlösung	20 min.
Waschen	bidestilliertes H ₂ O	2 x 1 min.
Färbung	Färbelösung	30 min.
Entfärbung	Entfärber	15 min.
Spülen	bidestilliertes H ₂ O	2 x 2 min.

¹ WESTERMEIER, R.: Electrophoresis in Practice, 2. Auflage, VCH Weinheim, 1997

Fixierlösung: 37,5 g TCA in 250 ml H₂O lösen

Entfärber: 250 ml MeOH
100 ml HAc
auf 1 l H₂O auffüllen

Der Entfärber wurde vor Gebrauch frisch hergestellt.

Färbelösung: 0,3 g Coomassie R 250
500 ml Entfärber

Der Farbstoff wurde innerhalb von zwei Stunden unter Rühren gelöst und anschließend filtriert.

7.8 Lipide

7.8.1 Soxhlet-Extraktion

10 g Treber-Heisswasser-Lyophilisat
200 ml Petrolether (60-90°)
200 ml Isopropanol

Das Lyophilisat wurde erst 4 Stunden mit Petrolether extrahiert, dann 4 Stunden mit Isopropanol¹.

7.8.2 Festphasenextraktion SPE (solid phase extraction)

SPE-Säulen (C18), 6 ml-Säulchen mit 100 mg Füllung
4,6 l Würze oder Heisswasserauszug
200 ml Isopropanol
200 ml Petrolether (60-90°)

Die Säulen wurden mit 0,01 M Natriumphosphat-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde das Untersuchungsmaterial aufgegeben und mit Pufferlösung nachgespült. Nun wurde erst mit Isopropanol, dann mit Petrolether eluiert¹.

¹ RADIN, N.R.: In: Meth. Enzymol. 14, Academic Press New York 1969, 245

7.8.3 Kalte Lipidextraktion

10 g Treber-Heisswasser-Lyophilisat

200 ml Petrolether (60-90°), auf –15°C gekühlt

Das Lyophilisat wurde über Nacht bei max. –8°C (Eis-Kochsalz-Mischung) mit Petrolether extrahiert.

Anschließend wurden die polaren Lipide über Nacht bei max. –8°C (Eis-Kochsalz-Mischung) mit Dichlormethan : Methanol (2:1) extrahiert².

7.8.4 Weitere Lipid-Extraktionsmethoden

Für Dünnschicht-/Gaschromatographie

200 ml flüssige Probe wurde auf pH 2,5 eingestellt und mit

200 ml CH₂Cl₂ / MeOH (2:1) ausgeschüttelt

Die wässrige Phase wurde nach Phasentrennung verworfen. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C und 300 mbar auf etwa 1 ml eingengt.

Für Gushingtests

Petroletherextrakt aus

- dem Lyophilisat von 4,6 l Heisswasserextrakt

Dichlormethan : Methanol (2:1)-Extrakt aus

- dem Lyophilisat von 400 ml Fusarienkulturfiltrat
- dem Lyophilisat von 4,6 l Heisswasserextrakt

Die Lyophilisate wurden mit 200 ml Petrolether bzw. 200 ml CH₂Cl₂ / MeOH (2:1) unter Rühren über Nacht bei max. -8°C (Eis-Kochsalz-Mischung) extrahiert und der Extrakt wie oben beschrieben auf ca. 1 ml eingengt.

¹ RADIN, N.R.: In: Meth. Enzymol. **72**, Academic Press New York 1981, 5

² HAMILTON, R.J.: Lipid Analysis – A Practical Approach, IRL Press Oxford, 1992

7.8.5 Dünnschichtchromatographie für polare Lipide nach Powalla¹

Lösungsmittelsysteme:

Für Würze: Hexan: Diethylether: Eisessig (85:15:1)

Für Bier: Hexan: Diethylether: Eisessig (80:20:5)

Entwicklung: auf HPTLC-Kieselgelplatten

Detektion: 3,5%ige alkohol. Molybdätophosphorsäure-Lösung²

Die mit dem Nachweisreagenz besprühten Platten wurden auf 140 °C erhitzt, bis sich die Lipide auf gelbem Grund blau färbten.

7.8.6 Aufbereitung polarer Lipide für die Gaschromatographie³

Die nach Kap.7.8.4 extrahierten Lipide wurden zur Trockne eingedampft, in tertiärem Butylmethylether (MTBE) wieder aufgenommen und in ein kleineres Gefäß pipettiert. Nach erneutem Verdampfen des Lösungsmittel im Stickstoffstrom wurden die Lipide ausgewogen.

Zur Umesterung wurden 20 mg Fett in 2 ml MTBE gelöst. 100 µl dieser Lösung wurden mit 30 µl 0,2 M Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) in Methanol versetzt. Nach einigen Sekunden Reaktionszeit unter Schütteln konnte die Lösung direkt in den Gaschromatographen injiziert werden. Die Umesterungen wurden am Lehrstuhl für Energie und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie in Weihenstephan nach der Europäischen Norm DIN EN ISO 5509 : 2000 durchgeführt.

7.8.7 Gaschromatographische Untersuchung der Methylester von Fettsäuren

Die anfallenden gaschromatischen Untersuchungen wurden am Lehrstuhl für Energie und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie in Weihenstephan nach der Europäischen Norm DIN EN ISO 5508 : 1995-07 durchgeführt⁴.

¹ POWALLA, M.: Diss. Univ. Braunschweig 1990

² JORK, E. et al.: Dünnschicht-Chromatographie, Reagenzien und Nachweis-Methoden **1a**, 1989

³ DIN EN ISO 5509 : 2000: Herstellung von Fettsäuremethylestern

⁴ DIN EN ISO 5508 : 1995-07: Gaschromatographische Untersuchungen der Methylester von Fettsäuren

7.9 Kleinmälzung

7.9.1 Vermälzung Fusarien-befallener Gerste

Zur Kleinvermälzung der Fusarien-infizierten Gerste G+1 wurde das Standardmälzverfahren nach MEBAK angewandt¹. Die Vermälzung wurde am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I in Weihenstephan durchgeführt.

3 Weichtage

45 % Keimgutfeuchte

4 Keimtage

Isotherme Haufenführung bei 14,5°C

7.10 Kleinsud

7.10.1 Herstellung von obergäurigem gushendem Kristallweißbier

Beide aufgeführten Sude wurden nach dem Infusions-Maischverfahren hergestellt. Es wurden jeweils 100 % des Fusarien-befallenen Weizenmalzes WM+2 verwendet, denn ein Zusatz von gushing-inaktivem Gerstenmalz hätte die Konzentration gushing-aktiver Substanzen im Bier verringert und die stoffliche Zusammensetzung des Sudes insgesamt verkompliziert. Zur Unterstützung des Läuterprozesses wurde beim Abmaischen gewaschener, lyophilisierter Treber zugefügt.

¹ KUHN, D.: In: Brauwissenschaft 7 (1971), 238

7.10.1.1 Sud I

Maischen

Malzeinwaage:	12 kg
Lyophilisierter Treber, Einwaage:	500 g
Hauptguss:	42 l (10% Leitungswasser, 90% Aqua dest.) 46 ml wässrige CaCl ₂ -Lösung, 30% (w/v) 91 g CaSO ₄
Maischdauer:	90 min.

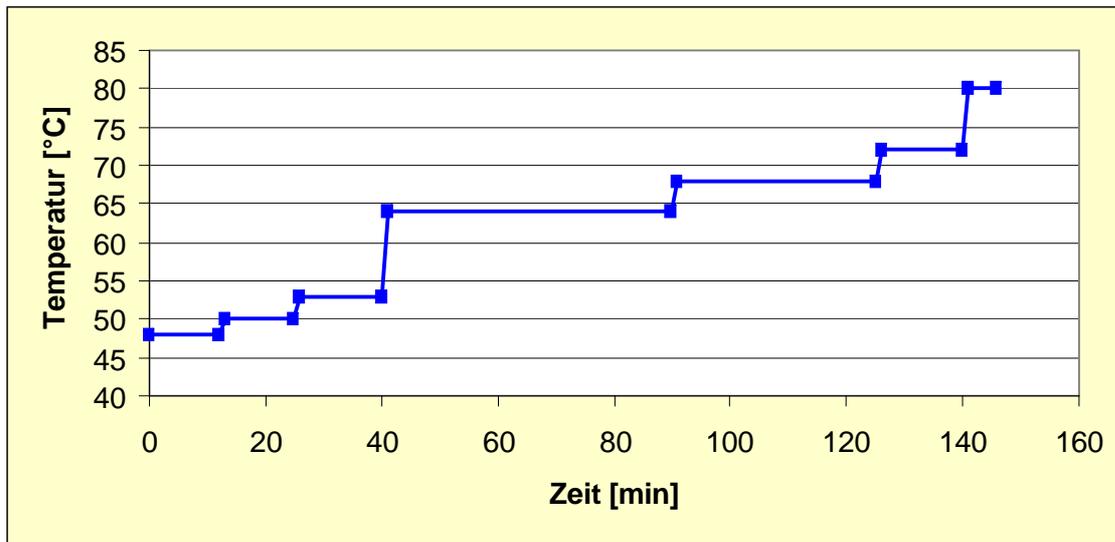


Abbildung 63: Maischdiagramm für Sud I

Hopfengabe:	60,8 g Hopfen (5,5% α) entspricht 56 mg α -Säure /l (25% Ausbeute) (\rightarrow 14 BE)
-------------	---

Abläuterung

Dauer:	Vorderwürze 100 min Nachguss (20 l) 40 min Nachguss (20 l) 30 min
Vorderwürze:	30 l; 18,2 % Stammwürze
Pfannevollwürze:	75 l; 11,5 % Stammwürze
Ausschlagwürze:	65 l; 13,8 % Stammwürze (+ 6 l Wasser) 15 l Ausschlagwürze wurden als Speise aufgehoben.
Anstellwürze:	72 l; 12,6 % Stammwürze; pH 5,24
Anstelltemperatur:	16,8°C

Anstellen nach vorheriger Belüftung

Obergärige Press-Hefe: 200 g auf 50 l

Gärungstemperatur: 19,5°C

Endvergärungsgrad: 2,7%

1. Gärtag: 10,1 % scheinbarer Extrakt; pH 4,95

3. Gärtag: 2,6 % scheinbarer Extrakt; pH 4,34

Nach Erreichen des Endvergärungsgrades wurde der Gärtank auf 14°C gekühlt. Schließlich wurde Speise für einen End-CO₂-Gehalt von ca. 9,5 g/l (entspricht 4,7 bar bei 20°C) zugegeben. Die Nachgärung bei 20°C dauerte drei Tage. Danach wurde das Jungbier 11 Tage lang bei 0°C gelagert. Vor der Filtration betrug der Druck im Gärbehälter 2,0 bar bei 0°C.

Filtration

Voranschwemmung: 20 g grobe Kieselgur auf 300 ml entgastes H₂O (10 min)

20 g feine Kieselgur auf 300 ml entgastes H₂O (10 min)

Laufende Dosage: 12 g feine Kieselgur auf 700 ml entgastes H₂O pro Std.

Druckverhältnisse: Lagertank (Unfiltrat): 6,0 bar

Drucktank; 4,3 bar (ca. 10°C) (Spundungsdruck nach Filter)

Filtrationsgeschwindigkeit: 10 l/h

Es wurde ein Schichtenfilter mit einer Kammer für Kieselgur verwendet.

Die Nachgärung fand in drei separaten Behältern statt. Diese drei Fraktionen wurden nacheinander filtriert und wiederum getrennt behandelt, um störende Faktoren wie z.B. Eisenionen aus der Filtration eliminieren zu können.

Abfüllung

Die Proben wurden bei 4,5 bar Überdruck in NRW-Neuglasflaschen abgefüllt und unter regelmäßiger Überprüfung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

7.10.1.2 Sud II

Ein zweiter Sud wurde bis auf folgende Parameter gleich wie Sud I behandelt:

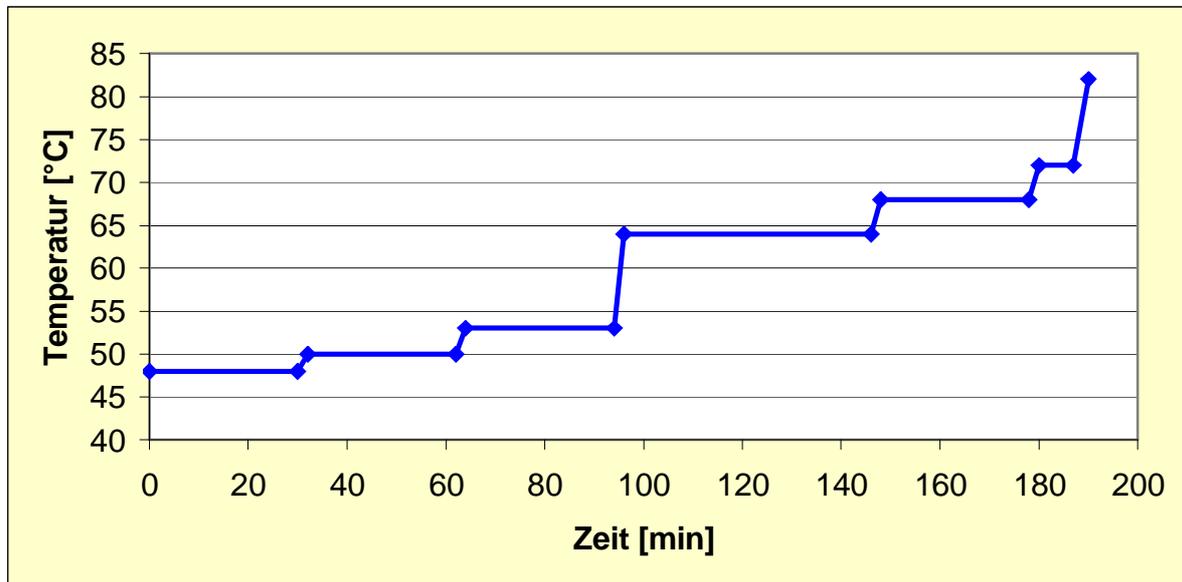


Abbildung 64: Maischdiagramm für Sud II

Neben der Verlängerung der Eiweißrasten wurde die Kochzeit verkürzt.

8 Literatur

- AMAHA, M. et al.: Gushing Inducers produced by some Mould Strains. In: Proc. Eur. Brew. Conv. (1973), Salzburg, 381-398
- AMAHA, M.; KITABATAKE, K.: Gushing in Beer. In: Brewing Science, 2, 1. Aufl. (1981), Academic Press London, 457-489
- ASHWELL, G.: New Colometric Methods of Sugar Analysis. In: Meth. Enzymol. (Ginsburg, V.; Neufeld, E.F., Eds.), VIII, Academic Press New York 1966, 85-95
- BACKLEH, M.: Zur Effizienz der Zerschäumungsanalyse bei der Anreicherung von Inhaltsstoffen aus pflanzlichen Lebensmitteln, Diss. TU München 2001
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 3. Auflage (1987) Springer-Verlag Berlin
- BENDER, M.L.: Cyclodextrin Chemistry- Reactivity and Structure, 6 (1978), 1-2
- BRADFORD, M.: Rapid and sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye-binding. In: Analyt. Biochem. 72 (1976), 248-254
- BRENNER, M.W.: Gushing Beer Causes and some Means of Prevention. In: Proc. EBC Congr.- Copenhagen (1957),II. 349-362
- BURGER, M.; BECKER, K.: Oxalate Studies on Beer. In: Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 7 (1949), 102-115
- DEGIORGIO, V.: Physics of Amphiphiles. Proc. Internat. School of Physics „Enrico Fermi“, Course XC (1985), 1-21
- DESJARDINS, A. E.; HOHN, T.M.; MCCORMICH, S.P.: Fumonisin B(1)-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48/11 (2000), 5773-5780
- DE VRIES, O.H.T. et al.: Insoluble Hydrophobin Complexes in the Walls of *Schizophyllum commune* and other Filamentous Fungi. In: Arch. Microbiol. 159 (1993), 330-335
- DIDIER, M. et al.: Generation of Foaming Proteins along the Malting and Brewing Processes, Proc. EBC Congr. – Budapest (2001), 67, 631-638
- DIN 38 406 – E 22 : 1988-03 : Bestimmung der Elemente Ag, Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ti, Tl, V, W, Zn, Zr durch Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES), Deutsches Institut für Normung e.V. Berlin, 1988
- DIN EN ISO 5508 : 1995-07: Gaschromatographische Untersuchung der Methylester von Fettsäuren. Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, 1995
- DIN EN ISO 5509 : 2000: Herstellung von Fettsäuremethylestern. Deutsches Institut für Normung e.V. Berlin, 2000
- DONHAUSER, S.; WEIDENEDER, A.; WINNEWISSER, W.; GEIGER, G.: Beurteilung von Malz als Ursache der Gushingneigung von Bier. In: Brauwelt 129 (1989), 1658

- DONHAUSER, S.; WEIDENEDER, A.; WINNEWISSER, W.; GEIGER, E.: Test zur Ermittlung der Gushingneigung von Rohfrucht, Malz, Würze und Bier. In: Brauwelt 130 (1990), 1317-1320
- DONS, J.J.M. et al.: Characterization of the Genome of the Basidiomycete *Schizo-phylum commune*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 563 (1979), 100-112
- DRAEGER, M.: Physikalische Überlegungen zum Thema Gushing. In: *Brauwelt* 6 (1996), 259-269
- DRAWERT, F. et al.: Zur Problematik der Analyse phenolischer Verbindungen. In: *Proc. EBC Congr.* (1979), Berlin (West), 335-340
- DRAWERT, F. (Hrsg.): *Brautechnische Analysenmethoden – Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK) 3*, 2. Aufl., Freising 1996, 87-88
- EDEL, V. et al.: Evaluation of Restriction Analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the Identification of *Fusarium* Species. In: *Mycological Research* 101/2 (1997), 179-187
- FIRMENSCHRIFT: *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma*, Perkin Elmer, Düsseldorf
- FIRMENSCHRIFT: *Gel Filtration*. Amersham Biosciences, Freiburg
- FIRMENSCHRIFT: *Improvement of Malt Quality by Bio-Protection: Use of *Geotrichum candidum**, Degussa, Düsseldorf
- FIRMENSCHRIFT: *Ion Exchange Chromatography*. Amersham Biosciences, Freiburg
- FIRMENSCHRIFT: *Hydrophobic Interaction Chromatography*. Amersham Pharmacia, Freiburg
- FIRMENSCHRIFT: *Physikalische Daten von Parafilm®* M. BRAND GMBH & CO KG, Wisconsin, USA
- FISCHER, S.: *Blasenbildung von in Flüssigkeiten gelösten Gasen*. Diss. TU München, 2001
- FISHMAN, M.J.; FRIEDMAN, L.C.: *Methods for Determination of Inorganics in Water and fluvial Sediments*. In: *U.S. Geological Survey Open-File Report 8* (1985), 709
- FRANKE, D. et al.: *Theorie zur Existenz von Mikroblasen in Getränken*. In: *Brauwelt* 38/39 (1995), 1944-1949
- GARDNER, R.J.: *Mechanism of Gushing – A Review*. In: *J. Inst. Brew.* 79 (1973), 275-283
- GJERTSEN, P.; TROLLE, B.; ANDERSEN, K.: *Studies on Gushing*, *Proc. EBC Congr. Stockholm* (1963), 428-438
- GÖRG, A.; POSTEL, W.; WESTERMEIER, R.: *Ultrathin-layer Isoelectric Focussing in Polyacrylamide Gels on Cellophane*. In: *Anal. Biochem.* 89, 1978, 60-70
- GÖRG, A. et al.: *Gel Gradient Electrophoresis, Isoelectric Focussing and two-dimensional Techniques in horizontal, ultrathin Polyacrylamide Layers*. In: *J. Biochem. Biophys.* 3, 1980, 273-284

- GRAY, P.; STONE, I.: Durch Metalle verursachtes Wildwerden von Bier. In: Brauwissenschaft 11 (1958), 214-219
- GUADET, J. et al.: Phylogeny of some *Fusarium* Species, as determined by large-subunit rRNA Sequence Comparison. In: Mol. Biol. Evol. 6 (1989), 227-242
- GUGGENBERGER, J.; KLEBER, W.: Über den Mechanismus des Wildwerdens von Bier. In: Proc. EBC Congr. Brüssel (1963), 299-317
- GULATI, M. K.: Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung der Rhizomfäule (*Phytophthora cactorum*) und der roten Wurzelfäule (*Phytophthora fragariae*) an Erdbeere. Diss. Bonn 2001, 134
- HAIKARA, A.: Malt and Beer from Barley artificially contaminated with *Fusarium* in the Field, In: Proc. EBC Congr. – London (1983), 401-408
- HAMILTON, R.J.: Lipid Analysis – A Practical Approach, IRL Press Oxford, 1992
- HIMMELHOCH, R.: Chromatography of Proteins on Ion-Exchange Adsorbens. In: Meth. Enzymol. (Jakoby, W.B., Ed.), XXII, Academic Press New York, 1971, 273-286
- HIPPELI, S.; ELSTNER, E. F.: Are Hydrophobins and/or non-specific Lipid Transfer Proteins responsible for Gushing in Beer? New Hypothesis on the chemical Nature of Gushing inducing Factors. In: Z. Naturforsch. 57 (2002), 1-8
- JACOB, F.: Lösliche Anteile in Filtrierhilfs- und Stabilisierungsmitteln – Problemsubstanzen, Grenzwerte, Getränkeherstellung Deutschland. Handbuch für die produzierende Industrie, 1997, 22-24
- JACOB, F.: Aktuelle Erfahrungen aus der Betriebspraxis. 38. Technologisches Seminar, Freising-Weihenstephan, 2000
- JÉGOU, S. et al.: Purification and Structural Characterisation of LTP1 Polypeptides from Beer. In: J. Agric. Food Chem. 48 (2000), 5023-5029
- JØRGENSEN, A.: Mikroorganismen der Gärungsindustrie, 7. Auflage, Hans Carl Verlag Nürnberg, 1956, 480-482
- JORK, E. et al.: Dünnschicht-Chromatographie, Reagenzien und Nachweis-Methoden 1a, VCH Weinheim, 1989
- KASTNER, H.: Das „Wildwerden“ des Malzbieres. In: Wochenschrift f. Brauerei 26 (1909), 169
- KERSHAW et al.: Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in fungal Morphogenesis. In: Fungal Genet. Biol. 23 (1998), 18-33
- KIENINGER, H.: Gushing des Flaschenbieres – derzeitiger Forschungsstand. In: Brauwelt 116 (1976), 1600-1603 und 1633-1636
- KLEEMOLA, T. et al.: Characterization and Detection of the Gushing Factors produced by Fungi, Proc. EBC Congr. – Budapest (2001) 12, 129-138
- KRAUSE, B.: On the Stability of saturated Carbon Dioxide. In: Svenska Bryggareföreningens Manadsblad 51 (1936), 221-236

- KUHN, D.: Beschreibung eines Kleinmälzungsverfahrens als Standardverfahren. In: Brauwissenschaft 7 (1971), 238
- LISKE, R.B.: Untersuchungen zu antagonistisch wirksamen Mikroorganismen gegen *Fusarium culmorum* bei der Vermälzung von Gerste und Weizen, Diss. TU München-Weihenstephan, 2002
- MARTIN, G.G. et al.: Adsorption of a Fungal Hydrophobin onto Surfaces is Mediated by Association Polysaccharide Schizophyllan. In: Biopolymers 49 (1999), 621-633
- MATISSEK, S. et al.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin, 1992
- MITANI, Y. et al.: Dynamic Behavior of Carbon Dioxide Gas related to Formation and Diminution of Beer Foam. In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 60 (2002), 1-9
- MOSS, M.O.: The Applied Mycology of *Fusarium*. 7. British Mycol. Soc. Symposium (1982), London
- MÜLLER, C.: Möglichkeiten zur Bewertung des Gesundheitszustandes von Braugerste und Malz. In: Brauwelt 21 (1995), 1036-1054
- NARZISS, L.: Abriss der Bierbrauerei, 4. Auflage, Enke Verlag Stuttgart 1980, 114-115
- NARZISS, L.: Abriss der Bierbrauerei, 4. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 1980, 331
- NELSON, P.E.: *Fusarium*, APS Press Minnesota, 2001, 1-14
- NIESSEN, L. M. et al.: Möglichkeiten einer verbesserten visuellen Beurteilung des mikrobiologischen Status von Malz. In: Brauwelt 37 (1991), 1556-1562
- NIESSEN, L. M.; VOGEL, R.: Specific Identification of *Fusarium graminearum* by PCR with *gaoA* targeted Primers. In: Systematic and Applied Microbiology 20/1 (1997), 111-113
- NIESSEN, L.M.: Entwicklung und Anwendung immunchemischer Verfahren zum Nachweis wichtiger *Fusarium*-Toxine bei der Bierbereitung sowie mykologische Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) von Bieren, Diss. TU München 1993
- NIRENBERG, H.I.: A Simplified Method for Identifying *Fusarium* spp. occurring on Wheat. In: Can. J. Bot. 59 (1981), 1599-1609
- NÖLTE, J.: ICP Emissionspektroskopie für Praktiker, Wiley VCH Weinheim, 2002
- OSTWALD, W.; MISCHKE, W.: Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie. In: Kolloid-Zeitschrift 90 (1940), 17-25
- PAHL, M.; WÖHLER, M.: Analyse der Rückstände in maschinell gereinigten Flaschen, Diss. Universität Gesamthochschule Paderborn, 1999
- PATENTSCHRIFT: Internat. Public. No.: WO 99 / 54725; Internat. Patent Classif.: G01N 33 / 02. World Intellectual Property Organization, Stockholm, 1999
- PELLAUD, J.: Gushing: State of the Art. In: Interbrew Technology Development, Paper presented at the Xth Jean de Clerck Chair, Leuven, Belgium (2002)
- POWALLA, M.: Mikrobielle Bildung und Charakterisierung grenzflächenaktiver Penta- und Disaccharidlipide aus *Nocardia corynebacterioides*, Diss. Univ. Braunschweig 1990

- RADAU, B. et al.: Modifizierter Carlsberg-Test (MCT). In : Brauerei-Forum 10 (1995), 377
- RADIN, N.R.: Preparation of Lipid Extracts. In: Meth. Enzymol. (Lowenstein, J.M., Ed.) 14, Academic Press New York, 1969, 245
- RADIN, N.R.: Extraction of Lipids with a Solvent of low Toxicity. In: Meth. Enzymol. (Lowenstein, J.M., ed.) 72, Academic Press New York, 1981, 5
- RADOLA, B.J.: Ultrathin- layer Isoelectric Focussing in Polyacrylamide Gels on Silanized Glass Plates or Polyesterfilms. –In: Electrophoresis 1, 1980
- REISS, J.: Schimmelpilze. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage, 1997, 61-70
- REITER, T.: Untersuchung zur Eingrenzung der Gushing-Faktoren mit chemischen und physikalischen Behandlungsmethoden anhand von zwei Malzen. Semesterarbeit, TU München 2002
- SACHER, B.: Über den Einfluss von Sorte, Umwelt, agronomische Maßnahmen und Mälzungstechnologie auf die wertbestimmenden Eigenschaften von Winterweizen, Diss. TU München 1997, 2-4
- SCHILD, E. et al.: Die Vorausbestimmung der Eiweißstabilität von Exportbieren. In: Brauwissenschaft 17 (1964), 289
- SCHILDBACH, R.; MÜLLER, J.: Einflüsse der Technologie auf den Oxalsäuregehalt des Bieres und seiner Rohstoffe. In: Brauwelt, 1980, 1648
- SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie, 6. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 1985, 154
- SCHRÖDER, C.: Untersuchungen zum Calciumoxalat-Gehalt in Malz, Würze und Bier. Semesterarbeit TU München 1992, 120
- SCHUR, F. et al.: Brautechnologische Bedeutung von Oxalat. In: Brauerei Rundschau 91 (1980), 201-207
- SCHWARZ, P.B. et al.: Effect of Fusarium graminearum and F. poae Infection on Barley and Malt Quality. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft, 3/4 (2001), 55-63
- SHAH, O. D.: Micelles, Microemulsions and Monolayers – Science and Technology. Marcel Dekker-Verlag New York, 10. Auflage, 1998
- SHALTIEL, S.: Hydrophobic Chromatography. In: Meth. Enzymol. (Jakoby, W.B., Ed.) 104, Academic Press New York 1984, 69-96
- SØRENSEN, S.B. et al.: Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas 30/4 (1993), 136-145
- STETTNER, G.: Nachweis und Verhalten von Deoxynivalenol und Ochratoxin A während der Bierbereitung. Diss. TU München 2000
- STOSCHECK, C.M.: Quantitation of Protein. In: Meth. Enzymol. (Deutscher, M.P., Ed.) 182, Academic Press San Diego 1990, 50-68
- SUBIRADE, M. et al.: Interaction of a Nonspecific Wheat Lipid Transfer Protein with Phospholipid Monolayers Imaged by Fluorescence Microscopy and Studied by Infrared Spectroscopy. In: J. Biophys. 69 (1995), 974-988

- TALBOT, N.J.: Fungal Hydrophobins. In: The Mycota VIII- Biology of the Fungal Cell, Springer Verlag Berlin 2001, 145-159
- VAAG, P.: Immunological Detection of Fusarium in Barley and Malt, Proc. EBC Congr. – Lisboa (1991), 553-554
- VESTERBERG, O.: Isoelectric Focussing of Proteins. In: Meth. Enzymol. (Jakoby, W.B., Ed.) XXII, Academic Press New York 1971, 389-433
- VOIGT, J.: Untersuchungen zur Beschreibung der proteinischen Fraktion des Bierschaums und deren Beeinflussung durch technologische Faktoren. Diss. TU München 1988
- WEBER, K.; OSBORN, M.: The Reliability of Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels. In: J. Biol. Chem. 244 (1969), 4406-4412
- WEIDENEDER, A.: Untersuchungen zum malzverursachten Wildwerden (Gushing) des Bieres. Diss. TU München 1992
- WESSELS, J.G.H.: Hydrophobins: Proteins that Change the Nature of the Fungal Surface. Advances in Microbial Physiology 38 (1997), 1-45
- WESTERMEIER, R.: Electrophoresis in Practice, 2. Auflage, VCH Weinheim, 1997
- WÖSTEN, H.A.B. et al.: Interfacial Self-Assembly of Fungal Hydrophobins into a Hydrophobic Rodlet Layer. In: The Plant Cell, Am. Soc. Plant Physiol. 5 (1993), 1567-1574
- WÖSTEN, H.A.B.: Hydrophobins: Multipurpose Proteins. In: Annu. Rev. Microbiol., 2001, 625-633
- YAMAHA, M.: Lipid Transfer Proteins in Plants and Microorganisms. In: Plant Cell Physiol. 33 (1992), 1-6
- YLI-MATTILA, T.; HYVONEN, J.: RAPD-PCR Analysis of Fusarium Strains – Cladistic Evaluation of Results. In: Sydowia 48/2 (1996), 184-195
- YOUNT, D.E. et al.: A microscopic Investigation of Bubble Formation Nuclei. In: J. Acoustical. Soc. of Am. 76 (1984), 1511-1521
- ZEPF, M: Gushing-Ursachenfindung anhand von Modellversuchen. Diss. TU München 1998

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Native Isoelektrische Fokussierung (IEF) extrazellulärer Fusarien-Proteine.....	38
Abbildung 2:	Molekulargewichtstrennung extrazellulärer Fusarienproteine.....	39
Abbildung 3:	Hydrophobisierungspotenziale im Vergleich.....	41
Abbildung 4:	Hydrophobisierungspotenziale einiger Fusarienarten.....	42
Abbildung 5:	Dünnschichtchromatographische Trennung von Fusarienlipiden.....	43
Abbildung 6:	Dünnschichtchromatographische Trennung von Fusarienlipiden.....	44
Abbildung 7:	Densitometrische DC-Auswertung von <i>F. tricinctum</i> -Lipiden.....	45
Abbildung 8:	Densitometrische DC-Auswertung von <i>F. avenaceum</i> -Lipiden.....	45
Abbildung 9:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. graminearum</i>	47
Abbildung 10:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. poae</i>	47
Abbildung 11:	Räumliche Struktur einer gesättigten und einer ungesättigter Fettsäure.....	48
Abbildung 12:	Mizellbildung bei gesättigten Fettsäuren.....	49
Abbildung 13:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. avenaceum</i>	50
Abbildung 14:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. sambucinum</i>	50
Abbildung 15:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. culmorum</i>	50
Abbildung 16:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. tricinctum</i>	50
Abbildung 17:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. oxysporum</i>	51
Abbildung 18:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. sporotrichoides</i>	51
Abbildung 19:	Fettsäurespektrum der polaren Lipidfraktion – <i>F. equiseti</i>	51
Abbildung 20:	Durchschnittliche Zusammensetzung des Heisswasserauszugs.....	54
Abbildung 21:	Durchschnittliches Verhältnis Kohlenhydrate zu Protein im Heisswasserauszug	54
Abbildung 22:	Überschäumvolumina von Heisswasserauszügen.....	56
Abbildung 23:	Durchschnittliche Überschäumvolumina verschieden behandelter <i>F.culmorum</i> -Heisswasserauszüge im Gushingtest.....	57
Abbildung 24:	Trübungsverhalten der Treber-Heisswasserauszüge.....	58
Abbildung 25:	Proteine und Kohlenhydrate im Anionenaustauscher.....	62
Abbildung 26:	Ausbeute aus der IEC unter unterschiedlichen Bedingungen.....	63
Abbildung 27:	Durchschnittliche Überschäumvolumina der IEC-Fractionen im Gushingtest.....	64
Abbildung 28:	Durchschnittliche Überschäumvolumina der HIC-Fractionen im Gushingtest.....	66
Abbildung 29:	Trennung von IEC-Fractionen nach Molekulargewicht (Treber-Auszug von <i>F. culmorum</i>).....	67
Abbildung 30:	Trennung von HIC-Fractionen nach Molekulargewicht (Treber-Auszug von <i>F. culmorum</i>).....	68
Abbildung 31:	Dünnschichtchromatographische Trennung von Malzlipiden.....	75
Abbildung 32:	Überschäumverhalten von gushing-aktivem, hellem Gerstenmalz (GW+1) vor und nach Calciumgabe.....	79
Abbildung 33:	Überschäumverhalten von gushing-aktivem, dunklem Weizenmalz (WM+2) vor und nach Calciumzugabe.....	80
Abbildung 34:	Zusammenhänge verschiedener Parameter bei Variation der Calcium-Konzentration	82
Abbildung 35:	Würzen vor und nach der Zugabe von hydrophobem Adsorptionsmaterial.....	87
Abbildung 36:	Würzen vor und nach der Zugabe von hydrophobem Adsorptionsmaterial.....	88
Abbildung 37:	Zugabe eines kommerziellen Gushing-Inhibitors zu heller, gushender Gerstenmalzwürze.....	89
Abbildung 38:	Zugabe eines kommerziellen Gushing-Inhibitors zu dunkler, gushender Weizenmalzwürze.....	90
Abbildung 39:	Gushingverhalten von Gerstenmalzwürze nach mehrmaligem Entspannen bzw. Schütteln.....	91
Abbildung 40:	Gushingverhalten von Weizenmalzwürze nach mehrmaligem Entspannen bzw. Schütteln.....	92
Abbildung 41:	Trennung der Würzeproteine nach ihrem isoelektrischen Punkt.....	94
Abbildung 42:	Trennung von Würzeproteinen nach ihrem molekularen Gewicht.....	95

Abbildung 43:	Densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels – gushing-negative Weizenmalzwürze.....	96
Abbildung 44:	Densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels – gushing-positive Weizenmalzwürze.....	96
Abbildung 45:	Densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels – gushing-positive Weizenmalzwürze.....	97
Abbildung 46:	Densitometrische Auswertung des SDS-PAGE-Gels – gushing-negative Gerstenmalzwürze.....	97
Abbildung 47:	Würzelipide im Vergleich zu Fusarienlipiden.....	98
Abbildung 48:	Zeitliche Entwicklung der Überschäumvolumina beim selbstgebrauten Bier Sud 1 (Durchschnitt der drei Filtrate).....	102
Abbildung 49:	Zeitliche Entwicklung der Überschäumvolumina beim selbstgebrauten Bier Sud 2 (Durchschnitt der drei Filtrate).....	104
Abbildung 50:	Konzentrationsverhältnisse von Protein und Kohlenhydraten im Originalbier, Rückstand und Spumat.....	106
Abbildung 51:	Trennung der Bierproteine nach ihrem isoelektrischen Punkt.....	108
Abbildung 52:	Trennung von Bierproteinen nach Molekulargewicht.....	110
Abbildung 53:	Präparative Trennung der Bierproteine nach Molekulargewicht.....	111
Abbildung 54:	Lipide gushender Weißbiere im Vergleich zu Fusarienlipiden.....	112
Abbildung 55:	Lipide nicht gushender Weißbiere im Vergleich zu Fusarienlipiden.....	113
Abbildung 56:	Lipide untergäriger Biere – gushend und nicht gushend – mit Fusarienlipiden kombiniert.....	114
Abbildung 57:	Überschäumvolumina im Gushingtest – Zugabe von Spumaten nicht-gushender Biere (u.g.).....	118
Abbildung 58:	Überschäumvolumina im Gushingtest – Zugabe von Spumaten primär-gushender Biere	119
Abbildung 59:	Überschäumvolumina im Gushingtest – Zugabe der polaren Lipidfraktion von <i>Fusarium graminearum</i>	122
Abbildung 60:	Überschäumvolumina im Gushingtest – Zugabe der polaren Lipidfraktion von <i>Fusarium tricinctum</i>	123
Abbildung 61:	Überschäumvolumina im Gushingtest – Gushendes Kristallweißbier mit Zusätzen polarer Fusarienlipide.....	124
Abbildung 62:	Überschäumvolumina im Gushingtest – Gushingbier, versetzt mit Fusarienkulturfiltrat.....	126
Abbildung 63:	Maischdiagramm für Sud 1.....	169
Abbildung 64:	Maischdiagramm für Sud 2.....	170
Abbildung 65:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>F. avenaceum</i>	181
Abbildung 66:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>F. sambucinum</i>	181
Abbildung 67:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>F. sporotrichoides</i>	182
Abbildung 68:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>F. culmorum</i>	182
Abbildung 69:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>F. poae</i>	183
Abbildung 70:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>F. oxysporum</i>	183
Abbildung 71:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>F. equiseti</i>	184
Abbildung 72:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>F. tricinctum</i>	184
Abbildung 73:	Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie <i>Geotrichum candidum</i>	185

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Gushingverursachung durch Schimmelpilze.....	24
Tabelle 2:	Gushing-Neigung von Fusarien-Stoffwechselprodukten.....	37
Tabelle 3:	Physikalisch-chemische Eigenschaften von Parafilm.....	40
Tabelle 4:	Sättigungsgrad der Fettsäuren in polaren Lipiden.....	52
Tabelle 5:	Überschäumvolumina von Heisswasserauszügen aus Fusarien-infiziertem Treber im forcierenden Trübungstest.....	59
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Heisswasserauszüge.....	60
Tabelle 7:	Durchschnittliche Überschäumvolumina der Lipid-Extraktionsfraktionen von <i>F. culmorum</i> -Treberauszügen.....	70
Tabelle 8:	Lebende Schimmelpilze in Malzproben.....	73
Tabelle 9:	Analysenwerte von Praxiswürzen.....	77
Tabelle 10:	Reaktionen des Gushingverhaltens auf die Zugabe von Calciumsalzen oder EDTA.....	84
Tabelle 11:	Zuordnung von Würzen zu verschiedenen Gushingtypen.....	85
Tabelle 12:	Analytische Daten des selbstgebrauten Gushingbieres Sud 1.....	101
Tabelle 13:	Analytische Daten des selbstgebrauten Gushingbieres Sud 2.....	103
Tabelle 14:	Überschäumvolumina im Gushingtest ungeladene oder kationische Substanzen (IEC-Fraktion bei pH 8,5) und Lipide..	116
Tabelle 15:	Überschäumvolumina im Gushingtest - geladene Substanzen (IEC-Fraktion) und Lipide.....	117
Tabelle 16:	Übersicht – Überschäumverhalten Cyclodextrine.....	133
Tabelle 17:	Übersicht – Überschäumverhalten Proteine.....	138
Tabelle 18:	Übersicht – Überschäumverhalten von Mischungen.....	139
Tabelle 19:	Übersicht – Überschäumverhalten Lipide.....	143
Tabelle 20:	Bedingungen für die SDS-PAG-Elektrophorese.....	162
Tabelle 21:	Fokussierbedingungen zur Proteintrennung bei 12°C.....	164
Tabelle 22:	Coomassie-Ampholyt-Färbung.....	164

9.3 Densitometrische DC-Auswertung von Fusarienlipiden

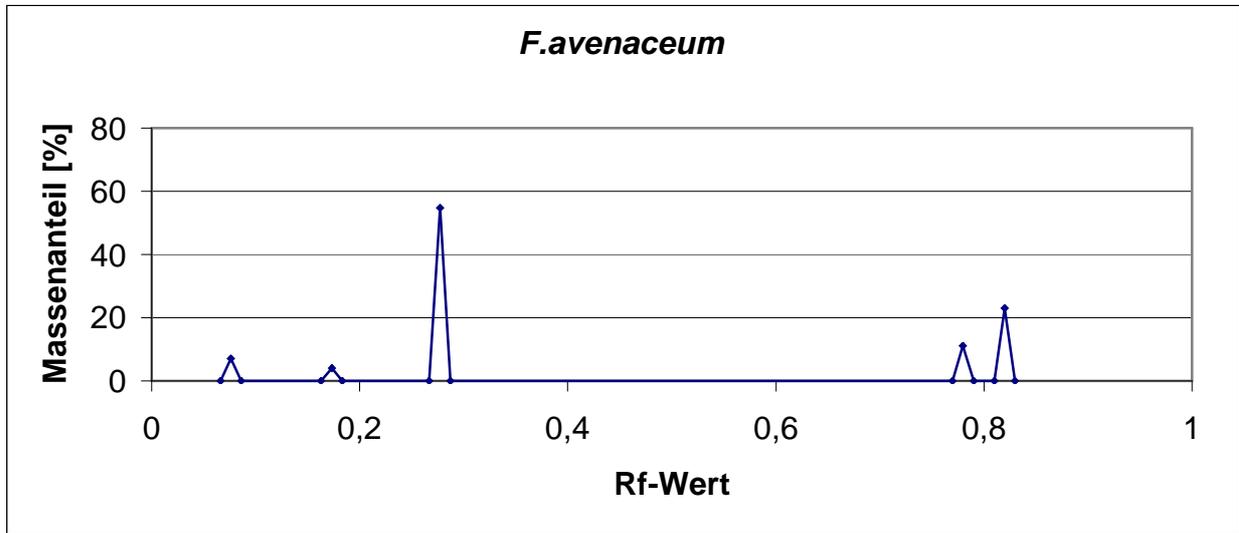


Abbildung 68: Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie Polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart

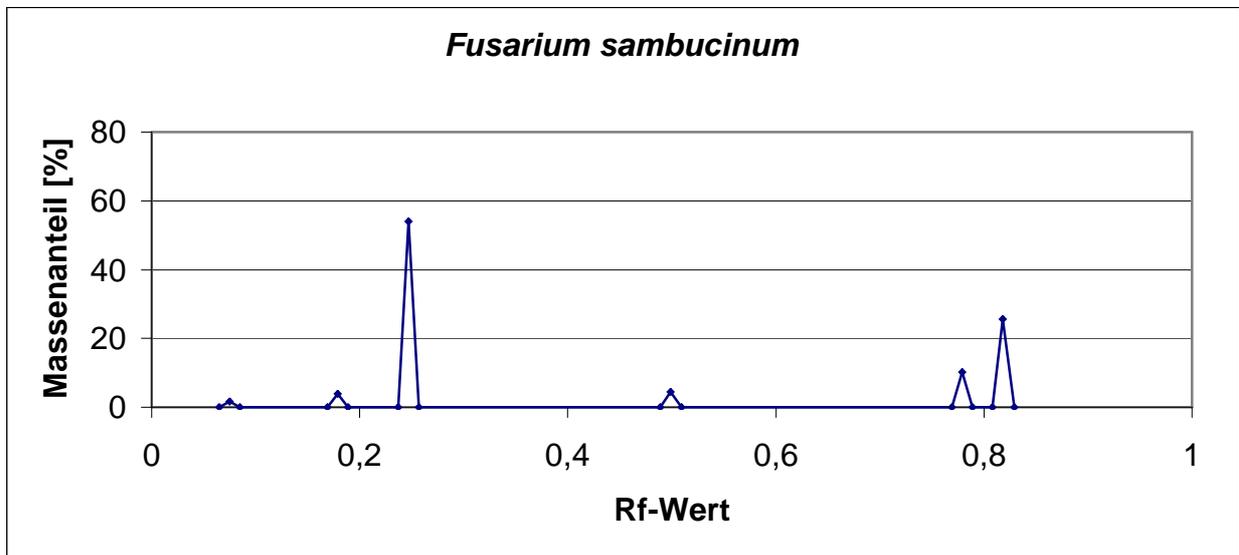


Abbildung 69: Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie Polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart

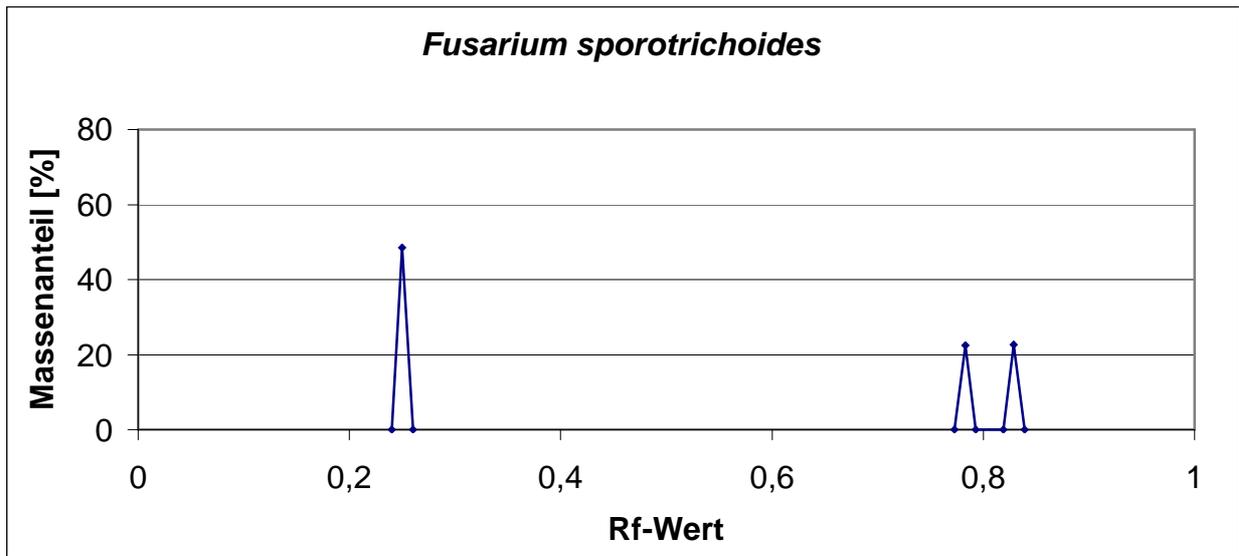


Abbildung 70: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie**
 Polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart

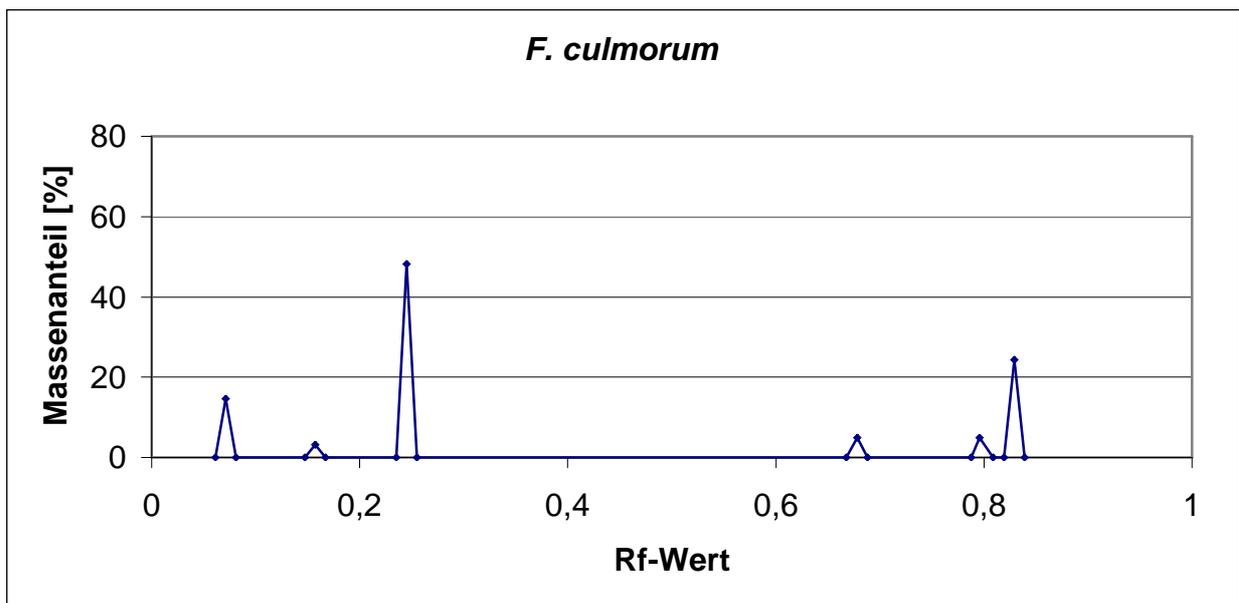


Abbildung 72: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie**
 Polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart

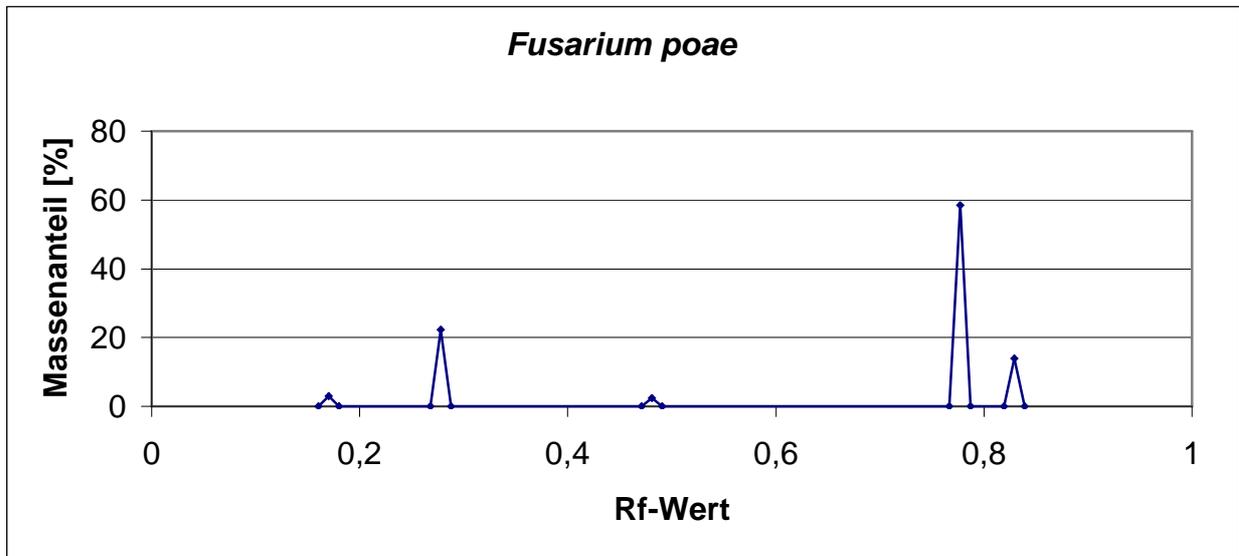


Abbildung 72: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie**
 Polare Lipide einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart

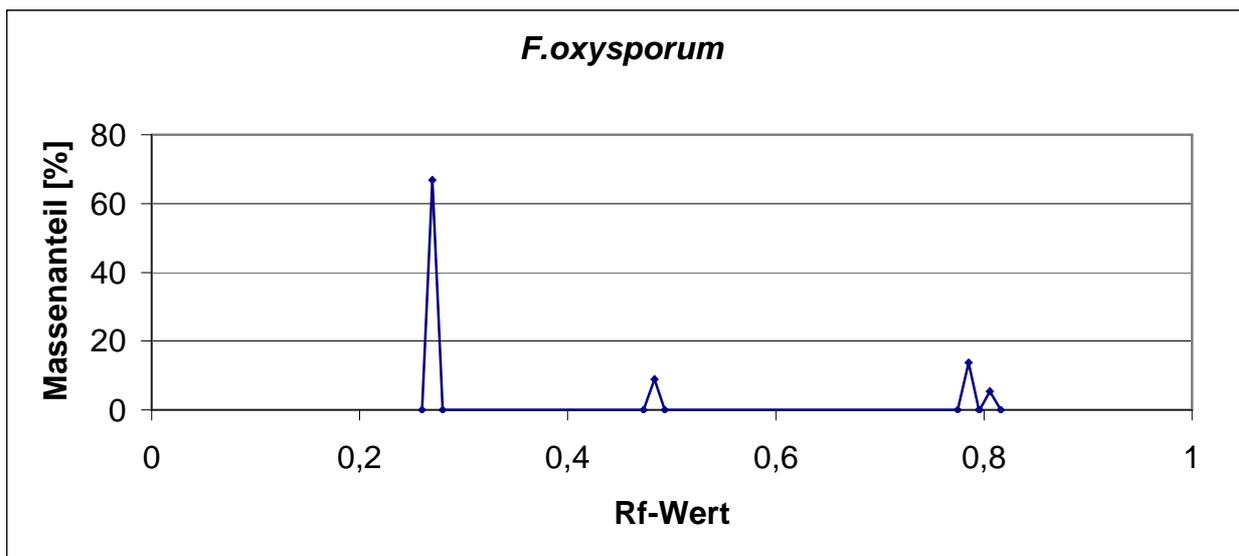


Abbildung 73: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie**
 Polare Lipide einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart

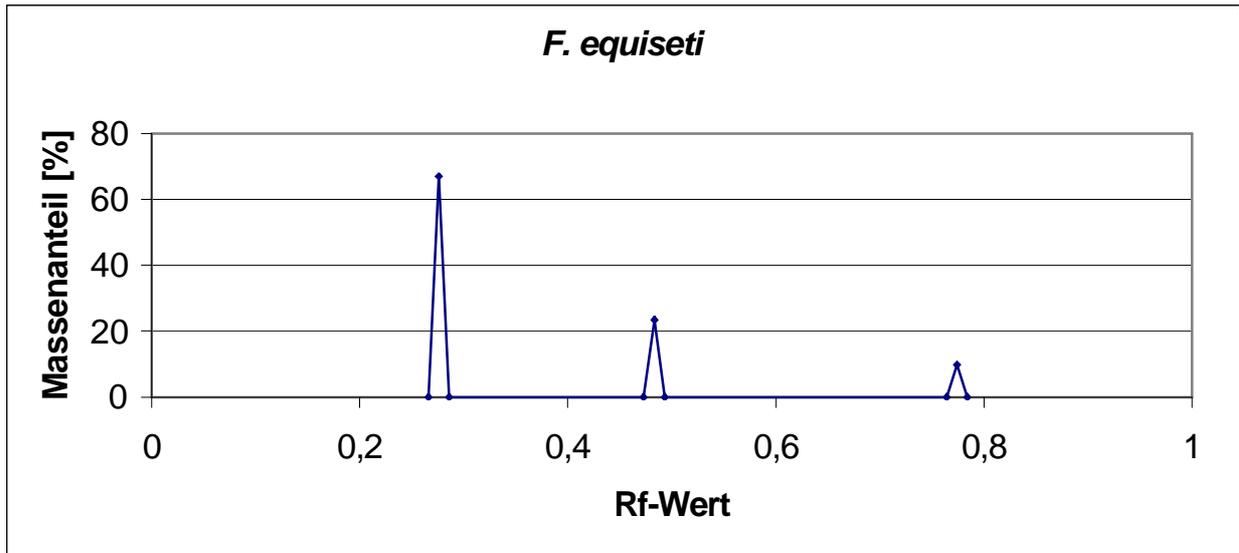


Abbildung 74: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie**
 Polare Lipide einer zu Gushing führenden Fusarienart

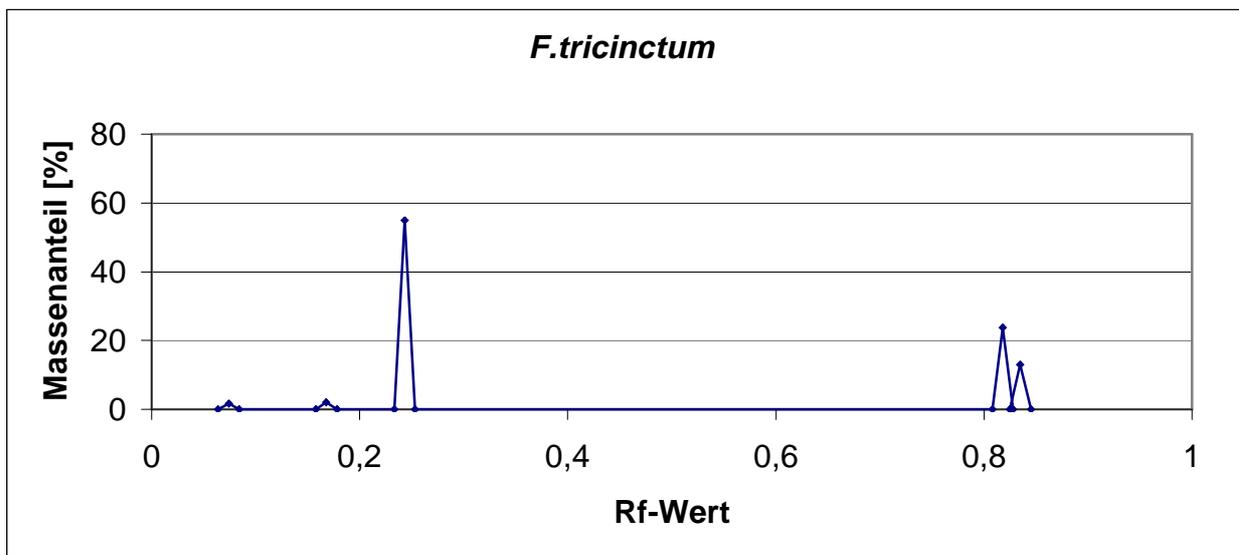


Abbildung 75: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie**
 Polare Lipide einer nicht zu Gushing führenden Fusarienart

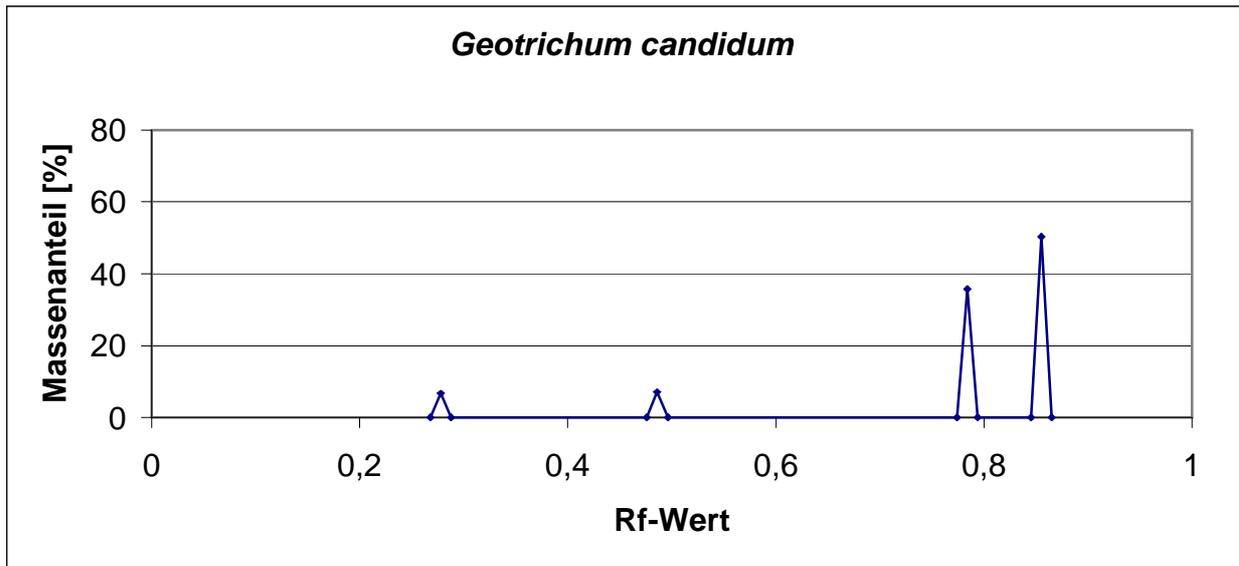


Abbildung 76: **Densitometrische Auswertung der Dünnschicht-Chromatographie**
Polare Lipide einer gushing-unterdrückenden Schimmelpilzart