

Technische Universität München
Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I

Enzymchemische und technologische Untersuchungen
über den Einfluss von Hefeenzymen – speziell Hefeproteinase
auf den Bierschaum

Marc Stamm

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

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. R. F. Vogel

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. W. Back
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. E. Geiger

Die Dissertation wurde am 15.11.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.12.2000 angenommen.

Vorwort

Ich möchte mich an dieser Stelle bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. W. Back für die Überlassung dieses interessanten und vielfältigen Themas, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie seine zahlreichen Hinweise und wertvollen Anregungen, die zur Durchführung und Gestaltung dieser Arbeit führten bedanken. Weiterhin danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen und mir genügend Freiraum während meiner Diensttätigkeit zur Durchführung der Arbeit einzuräumen.

Auch Herrn Dipl.-Ing. (FH) M. Zarnkow möchte ich danken. Er hat mich während der Zeit des Entstehens der vorliegenden Arbeit hervorragend bei der Leitung des Bierlabor unterstützt und mir so ermöglicht, Zeit zur Erstellung dieser Arbeit zu finden.

Mein Dank gilt weiterhin dem Laborpersonal des Bierlabors am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, vor allem Frau M. Braasch, die mir geduldig und mit großer Hilfsbereitschaft bei den durchzuführenden Analysen zur Seite stand.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Semester- und Diplomarbeitern, welche mit ihren Arbeiten zum Gelingen meiner Forschung beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Freunden, welche mir durch Höhen und Tiefen hindurchgeholfen haben und mit Ihren Anregungen und Diskussionen hilfreich zur Seite standen.

1 Einleitung und Problemstellung

Das Thema der vorliegenden Arbeit lautet:

Enzymchemische und technologische Untersuchungen über den Einfluss von Hefeenzymen – speziell Hefeproteinase auf den Bierschaum

In den letzten Jahren stieg die Anzahl der Biere, die nicht pasteurisiert auf den Markt kommen, vor allem in Japan, in den USA und in Europa stark an. Traditionell füllen viele kleine Brauereien, aber auch immer mehr kleine Hausbrauereien ihr Bier unpasteurisiert ab. Die gesteigerte Nachfrage nach solchen „kaltsteril“ abgefüllten Bieren erfordert nicht nur ein gesteigertes Augenmerk der Produktion auf verbesserte Filtrationstechniken sowie Reinigungs- und Desinfektionstechniken, sondern auch die Kenntnis der Umwandlungsreaktionen, die während der Gärung und Lagerung stattfinden und in der Flasche weiterlaufen.

Diese im filtrierten Bier weiterlaufenden Umwandlungsreaktionen sind auf das Vorhandensein von Enzymen und deren katalytische Aktivität zurückzuführen.

Da bei der Gärung von einem sterilen Substrat - Würze - ausgegangen wird, spielen Enzyme, welche aus dem Malz in der Maische vorliegen, bei den Untersuchungen keine Rolle, da diese beim Würzekochen inaktiviert werden. Meist stammen die im Bier vorkommenden Enzyme aus der Hefe, welche sie für ihren Stoffwechsel synthetisiert. Hierbei wird unterschieden, ob diese Enzyme aus der aktiven Zelle ausgeschieden werden, um hochmolekulare Substanzen im Substrat zu spalten und diese dann als Spaltprodukte leichter aufzunehmen oder ob es sich um durch Autolyse der Zelle freigesetzte Enzyme handelt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich vor allem mit dem Problem der Proteinaseexkretion der Hefe und dem Einfluss der Proteinase auf den Bierschaum. Hierbei wurden speziell einige Produktionsparameter herausgegriffen und auf bestehenden Erkenntnissen aufbauend versucht, eine Analytik für den

Nachweis von Proteinasen im Medium Bier zu entwickeln. Diese Analytik muss in der Lage sein, vorhandenes Wissen zu untermauern, in Zahlenwerte zu fassen und praktische Hinweise zur Optimierung des Bierschaums zu liefern. Sie muss so gehalten sein, dass sie in jedem Brauereiroutinelabor, welches mit einem Spektralphotometer ausgestattet ist, durchgeführt werden kann. Hierbei wurde von bekannten Analysenmethoden ausgegangen und versucht diese zu modifizieren, um sie an den speziellen Einsatz im Medium Bier zu adaptieren. Weitere Kriterien waren hierbei das Senken der Bestimmungsgrenze und das Verkürzen der Analysendauer.

Durch den entwickelten quantitativen Nachweis der proteolytischen Aktivität wurde der Einfluss der Variation verschiedener gärungs- und lagerungstechnologischer Parameter auf die proteolytische Aktivität im Bier untersucht. Als hauptsächlich zu untersuchende Faktoren wurden die Variation der Anstell-, Gär- und Lagerungstemperaturen, die Hefevitalität, der Hefestamm, die Druckverhältnisse und die Würzezusammensetzung betrachtet. Weiterhin wurde der Einfluss der Pasteurisation bzw. Kurzzeiterhitzung auf die Inaktivierung der proteolytischen Enzyme betrachtet.

Ein weiteres Ziel war es, die Veränderung der Zusammensetzung der an der Schaumbildung beteiligten Eiweißfraktionen durch den Einfluss von Proteinasen zu bestimmen und ihr Molekulargewicht zu ermitteln. Hochmolekulare Stickstoffverbindungen, vor allem Proteine, stabilisieren und bestimmen den Bierschaum anteilmäßig am meisten. Den Stickstoffverbindungen mit einem Molekulargewicht zwischen 30000 Dalton und 60000 Dalton werden schaumpositive Eigenschaften zugeschrieben^{1,2}. Da diese von Proteinasen bei der Bierlagerung angegriffen und in ihrer Molekülstruktur verändert bzw. degradiert werden, wurde mittels einer SDS-PAGE die Veränderung der Molekulargewichtsverteilung dieser Stickstoffverbindungen bestimmt. Diese

¹ Narziß, L., Reicheneder, E. und Barth, D. (1982): Über den Beitrag von hochmolekularen Proteinfractionen und Glykoproteiden zum Bierschaum, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 35, S. 213-223

² Narziß, L. (1978): Der Bierschaum, Brauwelt 29, S. 1045-1057

Veränderung der Molekulargewichtsverteilung während der Lagerung wurde auch in einer Abnahme der Schaumstabilität des Bieres beobachtet.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Weg zur Ermittlung der maßgeblichen Eiweißkomponenten von Bieren mit guten Schaumeigenschaften bestimmt und im Speziellen eine geeignete Versuchsanordnung hierfür erarbeitet. Wie bereits frühere Arbeiten auf diesem Gebiet zeigten³, hat sich für die Bestimmung der Proteinfractionen die Anwendung der SDS-PAGE als sehr günstig erwiesen.

³ Voigt, J.C. (1992): Untersuchungen zur Beschreibung der proteinischen Fraktion des Bierschaums und deren Beeinflußung durch technologische Faktoren, Dissertation, TU-München

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung und Problemstellung	1
2 Theoretische Grundlagen	2
2.1 Die Hefeenzyme	2
2.2 Der Bierschaum	9
2.3 Schaummessmethoden	12
2.4 Analytik der Bierschauminhaltsstoffe	17
2.5 Einflussparameter auf den Bierschaum	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Enzymatische Analytik der Proteinasekonzentration	20
3.1.1 Azocoll Methode	21
3.1.2 Azocasein Methode	23
3.1.3 MCA Methode	25
3.1.4 Casein, Resorufin-markiert Methode	28
3.1.5 Angepasste Casein, Resorufin-markiert Methode	30
3.2 Elektrophoretische Analytik	31
3.2.1 Schaumfraktionierung	32
3.2.2 SDS-PAGE der Schaumproteine	37
3.3 Routineanalytik	43
3.3.1 Schaumbestimmung nach <i>Nibem</i> und <i>Ross & Clark</i>	43
3.3.2 Gesamtstickstoff	43
3.3.3 Koagulierbarer Stickstoff	43
3.3.4 MgSO ₄ -fällbarer Stickstoff	43
3.3.5 Freier Amino-Stickstoff	43
3.3.6 Hefezellzahl	43
3.3.7 Lebendzellzahl der Hefe	44
3.3.8 Intrazellulärer pH-Wert	44
3.3.9 pH-Wert	47
3.3.10 Extrakt und Alkoholgehalt	47
3.4 Herstellung von Bieren im Technikummaßstab	48
3.5 Gewinnung des Hefeextraktes	48

4	Ergebnisse	49
4.1	Vergleich der Nachweismethoden	49
4.1.1	Azocoll Methode	49
4.1.2	Azocasein Methode	51
4.1.3	MCA Methode	53
4.1.4	Casein, Resorufin-markiert Methode	55
4.1.5	Angepasste Casein, Resorufin-markiert Methode	57
4.2	Proteolytische Aktivität in Praxisbieren	64
4.3	Bierbereitungstechnologie und Proteinasenexkretion	66
4.3.1	Hefeaufbewahrung	66
4.3.2	Intrazellulärer pH-Wert	70
4.3.3	Die Variation des Gärverfahrens	72
4.3.4	Der Zinkgehalt der Anstellwürze	86
4.3.5	Einfluss des Hefestammes	89
4.4	Einfluss der Proteinasen auf den Bierschaum	92
4.4.1	Einfluss von proteolytisch aktivem Hefeextrakt auf den Bierschaum	92
4.4.2	Verfolgung der Veränderung der Schaumhaltigkeit unpasteurisierter Praxisbiere während der Flaschenlagerung	95
4.4.3	Verfolgung der Veränderung der Schaumproteinfraktionen unpasteurisierter Praxisbiere während der Flaschenlagerung	99
4.5	Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität in Bier	102
4.6	Inaktivierung der proteolytischen Aktivität in Bier	103
5	Diskussion	106
6	Zusammenfassung	112
7	Literaturverzeichnis	114
Anhang		
I	Abkürzungsverzeichnis	I
II	Abbildungsverzeichnis	III
III	Tabellenverzeichnis	V

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Hefeenzyme

Eine physiologisch besonders wichtige Gruppe der Proteine sind die Enzyme. Sie sind die Biokatalysatoren der lebenden Zelle. Die Einteilung und die international vereinbarte Nomenklatur der Enzyme richtet sich nach den von den Enzymen katalysierten Reaktionen. Es gibt sechs Hauptklassen, die jeweils in Unterklassen unterteilt werden⁴.

1961 hat die „*International Union of Pure Applied Chemistry (I.U.P.A.C.)*“ bestimmte Regeln für die Nomenklatur und die Einteilung der Enzyme aufgestellt. Nach der Art der katalysierten Reaktion werden 6 Hauptklassen unterschieden; innerhalb der Hauptklassen wird nach den chemischen Bindungen, die gelöst oder geknüpft werden, weiter aufgeteilt. Auf Grund dieser Einteilung sind alle ausreichend charakterisierten Enzyme in einer Liste aufgeführt und erhalten eine Klassifizierungsnummer (EC-Nr.); die ersten drei Ziffern geben die Haupt- und Unterklassen an, die vierte ist die Seriennummer innerhalb der zweiten Untergruppe. Die erste Gruppe bilden die Dehydrogenasen, Reduktasen, Oxidasen und Oxygenasen. In Gruppe 2 fallen die gruppenübertragenden Enzyme, in Gruppe 3 Hydrolasen, deren Name aus dem Substrat durch Anhängen der Endung -ase gebildet wird. Zur vierten Gruppe, den Lyasen, rechnen alle Enzyme, die C-C, C-O, C-N und andere Bindungen durch Eliminierungsreaktionen, d. h. auf nicht-hydrolytischem Wege lösen; dabei bleiben Moleküle oder Atomgruppen mit einer Doppelbindung zurück. Umgekehrt ist die Anlagerung von Reaktionspartnern an eine Doppelbindung als die Umkehrung einer Lyasereaktion aufzufassen, das Enzym also gleichfalls eine Lyase. Wenn bei Lyasen die Additionsreaktion die entscheidende ist, kann das Enzym auch „Synthase“ genannt werden. In Gruppe 5 finden sich die Isomerasen, Epimerasen etc., und die 6. Gruppe umfasst die Ligasen, Enzyme, die eine Bindung zwischen zwei Substraten in gekoppelter Reaktion mit der Hydrolyse einer Phosphatbindung

⁴ Karlson, P. (1980): Kurzes Lehrbuch der Biochemie, S. 77

von ATP oder einem anderen energiereichen Triphosphat herstellen⁵. Zur dritten Hauptklasse der Enzyme zählen auch die Proteinase. Nach dem Angriffspunkt an der Peptidkette unterscheidet man Exopeptidasen und Endopeptidasen (Proteinase). Exopeptidasen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie nur vom Ende der Peptidkette her spalten, also jeweils die endständigen Aminosäuren ablösen. Man unterscheidet hier weiter zwischen Carboxypeptidasen, die vom Carboxyende her wirken und Aminopeptidasen, die am Aminoende angreifen. Endopeptidasen spalten die Proteine an bestimmten Stellen in der Mitte der Kette, sie greifen das Kettenende nicht an. Sie wirken somit vorwiegend auf Proteine und höhere Polypeptide und werden trivial daher auch Proteinase oder Proteasen genannt⁶. Im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen sind die Proteinase nicht spezifisch auf bestimmte Substrate eingestellt, sondern auf bestimmte Strukturmerkmale der Peptidketten. Denaturierte Proteine – wie im speziellen Schaumproteine – werden leichter hydrolysiert als native. Innerhalb der Peptidkette erfolgt der Angriff bevorzugt oder nur an bestimmten Stellen, d. h. vor oder hinter bestimmten Aminosäureresten⁷.

Die Existenz von Enzymen, speziell von Proteinase im Bier aus Hefe wurde schon von vielen Autoren beschrieben^{8,9,10}. Der qualitative und quantitative Nachweis dieser Proteinase erfolgt meist durch einen Abbau von zugesetztem Substrat und die analytische Verfolgung des Substratumsatzes mittels photometrischer Verfahren.

Auch immunchemische Verfahren haben sich zur Bestimmung der Proteinaseaktivität bzw. der verschiedenen Proteinase etabliert¹¹.

⁵ Karlson, P. (1980): Kurzes Lehrbuch der Biochemie, S. 74

⁶ Karlson, P. (1980): Kurzes Lehrbuch der Biochemie, S. 144

⁷ Karlson, P. (1980): Kurzes Lehrbuch der Biochemie, S. 145

⁸ Moddox, I.S., Hough, J.S. (1955): Proteolytic Enzymes and Autolysing Brewers' Yeast, Proceeding of the 26th Congress of the European Brewery Convention Interlaken

⁹ Dreyer, T., Biedermann, K., Ottesen, M. (1983): Yeast Proteinase in Beer, Carlsberg Research Communications, Copenhagen, Volume 48, 5, S. 249–253

¹⁰ Narziß, L. (1978): Der Bierschaum, Brauwelt 29, S. 1045–1057

¹¹ Briem, F. (1993): Technologische und immunchemische Untersuchungen über das Verhalten und den Einfluß von Bierinhaltsstoffen und Hefeproteinase auf die Bierqualität, Dissertation, TU-München

*Johnson*¹² berichtet von einer Exopeptidase aus Hefe, die in ihrer Spezifität von allen anderen bekannten Exopeptidasen abweicht. *Grassmann* und *Dyckerhoff*¹³ konnten aus Hefeautolysaten eine Endopeptidase isolieren. Diese soll in ihrem Verhalten weitgehend Papain identisch sein und die Fähigkeit besitzen, sich selbst auch bei sehr geringen Temperaturen zu aktivieren.

Proteinase A (EC 3.4.23.25 / früher 3.4.23.8 oder 3.4.23.6), eine Asparaginproteinase, ist in den Vacuolen von *Saccharomyces cerevisiae* zusammen mit verschiedenen Hydrolasen einschließlich zweier Carboxypeptidasen, Y und S, einer Serinproteinase B, zweier Aminopeptidasen I und Co, mehreren Phosphatasen und einer Ribonuclease, lokalisiert¹⁴. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Proteinase A während der Gärung aus der Hefezelle ausgeschieden wird und schaumaktive Proteine spaltet, was zu einer Herabsetzung der Schaumhaltigkeit führt¹⁵. Proteinase A kann reinst dargestellt werden und ihre Eigenschaften sind gut charakterisiert¹⁶.

Man nimmt an, dass Proteinase A im intrazellulären Proteinstoffwechsel beteiligt ist und über verschiedene Zellmechanismen als inaktive Form in die Vacuolen transportiert wird. Dort liegt sie als inaktives Pro-Protein vor und wird durch Autokatalyse in die aktive Form überführt¹⁷.

Das Enzym hydrolysiert Peptidbindungen bei einem pH-Optimum von 2,4–6,0 und einem Temperatur-Optimum von 25 °C an der Stelle mit der Aminosäuresequenz: ...-Leu-Leu↔Val-Tyr-...¹⁸.

Hefeproteinase werden auch aus der sich im aktiven Zustand befindlichen Hefezelle exkretiert, jedoch kommt es durch Autolyse zu einem starken Ansteigen

¹² Johnson, M.J. (1941): *Biological Chemistry*, 575, S. 137

¹³ Grassmann, H., Dyckerhoff (1928): *Hoppe-Seyler's Physiologische Chemie*, 41, S. 179

¹⁴ Dreyer, T. (1989): *Yeast Proteinase in Beer*, *Carlsberg Research Communications*, 54, S. 85

¹⁵ Dreyer, T., Halkier, B., Sevensen, I., Ottesen, M. (1986): *Yeast Proteinase in Beer*, *Carlsberg Research Communications*, 54, S. 27

¹⁶ Dreyer, T., Biedermann, K., Ottesen, M. (1983): *Yeast Proteinase in Beer*, *Carlsberg Research Communications*, 48, S. 249–253

¹⁷ Meussdorfer, F., Tortora, P. und Holzer, H. (1980): *Purification and Properties of Proteinase A from Yeast*, *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 255, 24, S. 12087-12093

¹⁸ N.N. (1998): *Enzyme Handbook*, Springer Verlag, Band 13

von proteolytischen Enzymen im Substrat Bier. Die im aktiven Zustand ausgeschiedenen proteolytischen Enzyme dienen dazu, Eiweißstoffe im Substrat abzubauen und diese Abbauprodukte für den eigenen Metabolismus zur Verfügung zu stellen.

Weiterhin sind Proteinasen in eine Vielzahl von Stoffwechselfunktionen der Hefezelle eingebunden, wie zum Beispiel die katalytische Inaktivierung, die Sporulation, die Bildung und den Abbau von Alpha-Faktoren und nicht zuletzt den Abbau von Nonsense-Mutationen¹⁹.

Es finden sich in der einschlägigen Literatur widersprüchliche Angaben zum Molekulargewicht, *Ammerer et. al.*²⁰ beschreiben die Proteinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* mit 41,4 kD. Laut *Furukubo et. al.*²¹ liegt das Molekulargewicht der als inaktiven ins Bier ausgeschiedenen Form bei 54 kD. Das Molekulargewicht der, durch Autokatalyse entstandenen, aktiven Form bei 44 kD. In anderen Angaben finden sich eine ganze Reihe von Molekulargewichten, abhängig vom Nachweisverfahren²². Auch wird von der Existenz verschiedener Subgruppen ausgegangen²³.

Im Normalfall sollte die Proteinase A über die verschiedenen Zellmechanismen in die Vacuolen der Hefezellen transportiert werden und unter passenden physiologischen Umständen nicht aus der Zelle exkretiert werden. *Kondo et. al.*²⁴ stellen die Hypothese auf, dass es unter Stresseinfluss zu einer vermehrten Exkretion von Proteinase A aus der Hefezelle kommt. Hierbei wird die im Golgi-Apparat gebildete Proteinase A nicht in die Vacuolen der Zelle transportiert,

¹⁹ Tuite, M., Oliver, S. (1991): *Saccharomyces*, Biotechnologie Handbooks. Vol 4, S. 72

²⁰ Ammerer, G., Hunter, C.P., Rothman, J.H., Saari, G.C., Valts, L.A., Stevens, T.H. (1986): *Molecular and Cell Biologie*, 6, S. 2490-2499

²¹ Furukubo, S., Matsumoto, Y., Yomo, M., Fukui, N., Aschikari, T. und Kakimi, Y. (1997): *Proceeding of the 26th Congress of the European Brewery Convention*, Maastricht

²² N.N. (1998): *Enzyme Handbook*, Springer Verlag, Band 13

²³ Briem, F. (1993): *Technologische und immunchemische Untersuchungen über das Verhalten und den Einfluß von Bierinhaltsstoffen und Hefeproteinase auf die Bierqualität*, Dissertation, TU-München

²⁴ Kondo, H., Yomo, H., Furukubo, S., Fukui, N., Nakatani, K., und Kawasaki, Y. (1999): *Advanced Method for Measuring Proteinase A in Beer and Application to Brewing*, *Journal of the Institute of Brewing*, Volume 105, S. 293-300

sondern während der Gärung direkt ins umgebende Medium ausgeschieden (Abb. 1).

Diese einflussnehmenden Stressfaktoren sind vor allem der Mangel an niedermolekularen Stickstoffverbindungen, die hohen Alkoholkonzentrationen, hohe Drücke und CO₂-Konzentrationen.

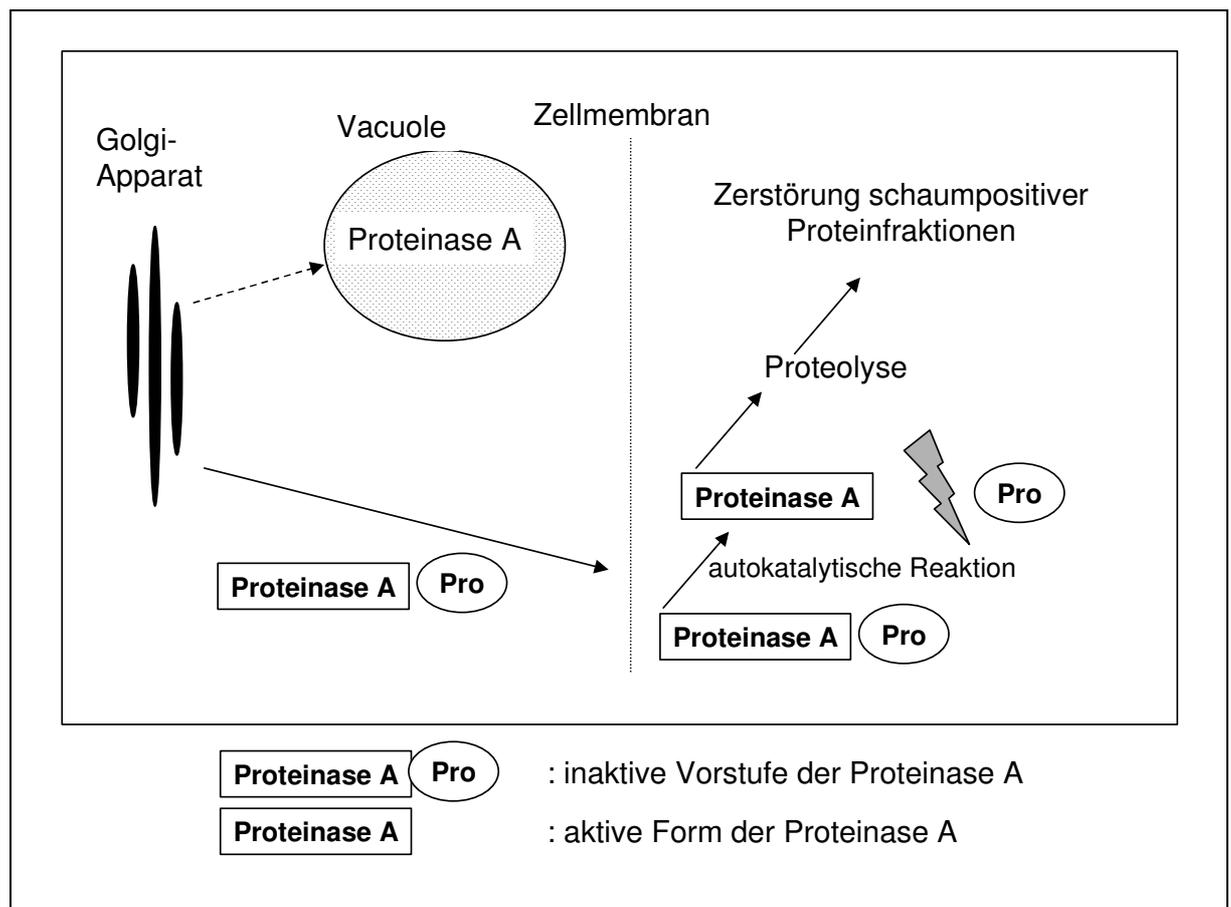


Abb. 1: Hypothetischer Mechanismus der Exkretion von Proteinase A in lebenden Hefezellen nach Kondo et. al.

2.2 Der Bierschaum

Der Bierschaum besteht in erster Linie aus einer Dispersion, in der das gasförmige Dispersum CO_2 im flüssigen Dispersionsmittel Bier verteilt ist. Das Schaumbier ist in seiner stofflichen Zusammensetzung gegenüber dem Restbier mit sogenannten Schaumbildnern angereichert. Die aufsteigenden CO_2 -Bläschen akkumulieren auf ihrem Weg durch das Bier an die Oberfläche schaumaktive Substanzen, die durch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften die Schaumbildung und -stabilisierung erst möglich machen²⁵.

Bei Austritt des CO_2 -Bläschens aus der Bieroberfläche findet eine Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche statt. Die zu dieser Oberflächenvergrößerung notwendige Energie wird durch den oberflächenaktiven Charakter mancher schaumpositiver Substanzen herabgesetzt²⁶.

Die nach dem Einschänken gebildete Schaummenge nimmt mit der Zeit ab. Hierfür sind die Schaumdrainage, die Koaleszens sowie die Disproportionierung verantwortlich²⁷.

Die Schaumdrainage bezeichnet den Rückfluss der Flüssigkeit aus dem Schaum ins Bier zurück und ist die Hauptursache für den Volumenverlust des Bierschaums. Da die Flüssigkeit die Lamellen zwischen den Schaumblasen bildet, erleichtern abnehmende Wandstärken das Platzen der Blasen und die Koaleszens, das Wachsen einer Schaumblase auf Kosten einer anderen. Disproportionierung bezeichnet das diffusionsbedingte Schrumpfen von Schaumblasen²⁸.

²⁵ Kamm, G. (1966): Über den Schaum allgemein und den des Bieres, Brauwelt Nr.31/32, S. 549-555

²⁶ Bamforth, C.W. (1985): The Foaming Properties Of Beer, Journal of the Institute of Brewing, Volume 91, S. 370-383

²⁷ Ronteltap, Hollemans, Bisperik und Prins (1991): Interaction Between Beer Protein And Isohumulone, Journal of the Institute of Brewing, Volume 82, S. 25-32

²⁸ Fath, R. und Sommer, K. (1985): Physikalische Aspekte der Schaumstabilität, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 38, S. 116-120

Eine hohe Oberflächenviskosität und elektrische Doppelschichten der Schaumblasen wirken dem Schaumzerfall entgegen, indem sie den Flüssigkeitsabfluss aus dem Schaum verlangsamen. Die dünner werdenden Schaumlamellen werden durch Oberflächenelastizität und Maragonieeffekt stabilisiert, die das Platzen der Lamellen verzögern²⁹.

Schaumlamellen werden durch filmbildende Stoffe wie Polypeptide und Glykoproteine gebildet, die sowohl hydrophile wie hydrophobe Eigenschaften besitzen. Weiterhin sind Kohlenhydrate, Isohumulone und Metallionen an der Stabilisierung der Schaumlamelle beteiligt (*Bamforth 1985*).

Proteine sind die wichtigste schaubildende Fraktion im Bier. Die Bedeutung der Polypeptide für den Bierschaum nimmt mit steigendem Molekulargewicht zu, einzelne Aminosäuren sind schaumnegativ. Dem LPT 1-, BSZ 4-, BSZ 7-Protein und dem 40 kD-Protein werden für den Schaum besondere Bedeutung zugeschrieben^{30,31,32}.

Glykoproteine sind mit ihrem oberflächenaktiven Proteinanteil an der Filmbildung der Blasenwand beteiligt. Der in die Flüssigkeit ragende Kohlenhydratanteil verengt die Blasenzwischenräume und ist an der Erhöhung der Oberflächenviskosität im Bierschaum beteiligt. Kohlenhydrate stabilisieren den Bierschaum durch Anlagerung an die filmbildenden Proteine, die dadurch vor der Auswaschung durch die abfließende Flüssigkeit geschützt werden³³.

Metallkationen und Isohumulone sind selbst nicht oberflächenaktiv, aber von entscheidender Bedeutung für den Bierschaum. Hopfensäuren binden über hydrophobe Wechselwirkungen und Dipolkräfte an Polypeptide. Dies wird durch

²⁹ Lange, H. (1972): Schäume und ihre Stabilität, VDI-Berichte Nr. 182, S. 71-77

³⁰ Sörensen, Bech, Muldbjerg, Beenfeld und Breddam (1993): Barley Lipid Transfer Protein 1 is Involved in Beer Foam Formation, MBAA Technical Quarterly, Volume 30, S. 136-145

³¹ Evans, D.E. und Hejgaard (1999): The Impact of Malt Derived Proteins on Beer Foam Quality. Journal of the Institute of Brewing, 105, S.159-169

³² Jegou, S., Douliez, J.P., Molle, D., Boivin, P., Marion, D. (1999): Proceedings of the EBC Congress, Cannes, S. 167-174

³³ Narziß, L., Reicheneder, E. und Barth, D. (1982): Über den Beitrag von hochmolekularen Proteinfractionen und Glykoproteiden zum Bierschaum, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 35, 9, S. 213-221

die Metallionen unterstützt, die zu einer Vernetzung der Komplexe beitragen. Hopfenbitterstoffe haben weiterhin einen positiven Einfluss auf das Schaumhaftvermögen, das ebenso wie das Schaumbildungsvermögen und die Schaumhaltbarkeit zu den offensichtlichen Eigenschaften des Bierschaums gehört³⁴.

Trotz der Erforschung der oben aufgeführten Fraktionen sind ihre Funktionen und Bedeutungen im Zusammenspiel für den Bierschaum nicht mit Sicherheit bestimmt. Es ist nicht geklärt, ob die Anwesenheit einer bestimmten Stoffklasse in einer Mindestkonzentration oder das Gleichgewicht der Stoffe zueinander für einen stabilen Schaum verantwortlich ist.

Die Ergebnisse der Schaumforschung haben bisher nur bedingten Wert für den Brauer, da technologische Maßnahmen zur Förderung schaumpositiver Substanzen gleichzeitig zu Änderung in Geschmack und Qualität des Bieres führen.

³⁴ Roberts, R.T. (1977): Colloidal Aspect of Beer Foam, The Brewers Digest, June 1977, S. 50-58

2.3 Schaummessmethoden

Die Methoden der Schaumbestimmung sind ein sehr weitreichendes Gebiet. Die im deutschsprachigen Raum am weitesten verbreiteten Schaummessmethoden sind die Methoden nach *Ross & Clark* und *NIBEM*. Diese Methoden werden auch im europäischen Ausland eingesetzt, sind jedoch über die europäischen Grenzen nur noch zum Teil anerkannt. Das liegt daran, dass es zur Zeit keine international offiziell anerkannte Analysenmethode zur exakten Charakterisierung des Bierschaums gibt. Zwar gibt es verschiedene Empfehlungen seitens nationaler und länderübergreifender Organisationen, wie z. B. MBAA, ASBC, IOB, MEBAK, welche Methode angewandt werden soll, aber niemand ist bereit oder in der Lage, eine Methode als generell anwendbar zu bezeichnen.

Daher wird es nicht einfacher, Faktoren zu erforschen, die die Bierschaumhaltigkeit beeinflussen. Die meisten Autoren beschränken sich deshalb auf eine oder zwei Methoden, die im jeweiligen Ursprungsland am gebräuchlichsten sind. Allerdings existieren umfangreiche Arbeiten zur Reproduzierbarkeit von Schaummessungen³⁵, aus denen hervorgeht, mit welchen Fehlern solche Schaummessungen behaftet sind.

Die einfachste Art, den Bierschaum zu beurteilen, ist die subjektive Betrachtung eines eingeschenkten Glases. Der Biertrinker beurteilt hier zum einen die gesamte Schaummenge, zum anderen die Restmenge des Schaums, die nach dem Antrinken am Glas haftet. Im Deutschen gibt es hierfür keinen speziellen Terminus wie im Englischen; die Wörter „cling“ und „lacing“ werden daher allgemein mit Schaumhaftungsvermögen übersetzt.

Auf der rein äußerlichen Betrachtung beruhen auch einige Einschenktests, die seit langem in Laborvorschriften zu finden sind³⁶.

³⁵ Weyh, H. (1988): Zur Reproduzierbarkeit von Schaummessungen, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 41, S. 124-128, S. 353-360, S. 441-445

³⁶ Weyh, H. (1987): Die Schaumhaltbarkeit nach der Analyse und im Glas, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 40, S. 108-117

Ähnlich wie bei der Beurteilung des Geschmacks mit Verkostergremien werden Personen zum Beurteilen des ursprünglich erzeugten Schaums, der Schaumhaltbarkeit und des Schaumhaftungsvermögens herangezogen. Es erfolgt eine Benotung von 1 bis 10, wobei hier jeweils ein Vergleichsbier herangezogen wird³⁷. Diese Methode, unterstützt durch die Schaummessung nach *Rudin*³⁸, ergibt eine zwar subjektive, aber der Verbrauchereinschätzung nachempfundene und daher bedeutungsvolle Beurteilung.

Die wichtigste Gruppe der Schaummessmethoden orientiert sich am Schaumzerfall, wobei entweder das Niveau eines künstlich erzeugten Schaums oder die Menge des anfallenden Rücklaufbieres verfolgt wird. Die bedeutendsten Methoden sind die Messung nach *Ross & Clark*³⁹; *Klopper*⁴⁰ und *Rudin*⁴¹.

Diese Methoden sind zwar nach *Weyh* (1988) nur bedingt untereinander vergleichbar, haben aber ihre Berechtigung, da zumindest innerhalb eines Labors reproduzierbare Werte gewonnen werden können. Allerdings nur dann, wenn immer dieselbe Apparatur möglichst von der gleichen Person bedient wird. Alle diese Messungen sind auch abhängig vom Raumklima, folglich von der Raumtemperatur, der relativen Luftfeuchtigkeit, dem Umgebungsluftdruck, den Luftbewegungen der Umgebung und der Biertemperatur⁴².

Die gebräuchlichste Methode im Europäischen Raum ist zur Zeit die *NIBEM*-Methode⁴³. Hier wird Bier aufgeschäumt und die Zeit zum Absinken des Schaumniveaus um eine festgelegte Strecke mittels Elektroden gemessen.

³⁷ Hegarty, P.K. und Crompton, I.E. (1990): Factors affecting foam stability, EBC-Vortrag, Dublin

³⁸ Rudin, A.D. (1957): Measurement of the foam stability of beer, Journal of the Institute of Brewing, 63, S. 506-509

³⁹ MEBAK (1993): Brautechnische Analysenmethoden Band II, Freising, S.178

⁴⁰ Klopper, W.J. (1972): Neue Untersuchungen über Schaumstabilität, Fermentatio, 68, S. 163-175

⁴¹ Rudin, A.D. (1957): Measurement of the foam stability of beer, Journal of the Institute of Brewing, 63, S. 506-509

⁴² N. N. (2000): Schaummessung auf den Zahn gefühlt, Brauwelt 9/10, S. 364f

⁴³ MEBAK (1993): Brautechnische Analysenmethoden Band II, Freising, S.181

Bei der *Ross & Clark*-Methode wird nicht entkohlensäueres Bier mit CO₂ aufgeschäumt und zu verschiedenen Zeiten aufgefangene Volumina von Rücklaufbier zueinander ins Verhältnis gesetzt. Diese Verhältnis gibt den sogenannten Sigma-Wert, ohne Einheit, an.

Ebenfalls eine Zeit misst die *Rudin*-Methode. Entkohlensäueres Bier wird mit CO₂ aufgeschäumt und die Zeit des Anstiegs des Rücklaufbiers zwischen zwei Marken gemessen. In der Literatur wird vermerkt, dass sich diese Methode besonders zur Charakterisierung von Schaumeigenschaften von isolierten Fraktionen aus Bier eignet (*Bamforth* 1985).

In letzter Zeit werden wieder vermehrt Methoden mit elektronischen Hilfsmitteln entwickelt, die mehr auf die Haltbarkeit des Schaums im einzelnen zielen.

Eine wiederholbare Methode mittels eines digitalen Bildverarbeitungssystems umgeht die bisher genannten Probleme⁴⁴. Eine sehr kleine Menge entgasten Bieres wird automatisch geschüttelt und der Schaumzerfall wird optisch per Kamera aufgezeichnet. Gefilmt wird hier der am Glasrand haftende Schaum.

Eine optische Überwachung des Schaumzerfalls für Flaschenbier mittels einer Photozelle beschreibt *Wilson*⁴⁵, wobei er eine gute Korrelation mit einer standardisierten Einschenkmethod und eine mittlere Korrelation mit der *Ross & Clark*-Methode feststellt.

Ein weiteres, computergesteuertes optisches Analysesystem, welches die Hauptmängel der Schaummessung, die unnatürliche Schaumerzeugung, Entkohlensäuern des Bieres und die alleinige Betrachtung der Rücklaufmenge, ausschließt, ist die Imageanalyse. Auch hier wird per Videokamera der

⁴⁴ Haugsted, C. und Erdal, K. (1993): Further results obtained the opto-electrical foam assay system, EBC-Vortrag, Dublin

⁴⁵ Wilson, P.J. und Mundy, A.P (1984): An improved methode for measuring beer foam collapse, Journal of the Institute of Brewing, 90, S. 385-388

Schaumzerfall gefilmt, allerdings von oben. Die Methode zeigt gute Reproduzierbarkeit, ist aber abhängig von der Art des Einschenkens⁴⁶.

Als weiterer Gesichtspunkt wurde der sogenannte „Schaumhaftungsindex“ (lacing index) gefunden, wobei „natürlich“ eingeschenkt wird und die Trinkweise durch schrittweise Entleerung des Probenbehälters nachempfunden wird. Der am Glas haftende Restschaum wird als wässrige Lösung photometrisch bei 230 nm gemessen und mit dem Originalbier verglichen⁴⁷. Die erhaltenen Werte sind ein Maß für das Schaumhaftungsvermögen.

Auch für das Schaumhaftungsvermögen wurde eine computergesteuerte Apparatur entwickelt, die die an einem rotierenden Glas haftenden Schaumringe mittels eines beweglichen Infrarotdetektors digitalisiert und zwei- oder dreidimensional auswertet. Schaumringe, die keine Lücken aufweisen, werden hierbei als optimal definiert⁴⁸.

Eine weitere Methode zur berührungslosen optischen Messung des Schaumzerfalls und gleichzeitiger Messung der Bierhöhe ist die Messung mittels des FOAM TEST SYSTEMS (FTS) von Paar⁴⁹. Hierbei wird gleich der Schaumerzeugung bei NIBEM über ein Aufschäumbogen Bierschaum in einem Probeglas erzeugt. Zusätzlich zur Absenkung der Schaumoberkante wird die Bewegung der Schaumunterkante mittels Lichtschranken gemessen. Neben den NIBEM-Werten werden zusätzlich drei neuartige Schaumparameter (Integrales Schaumvolumen, Schaumzerfallszeit und Schaumbildungsvermögen) aus den Messdaten von Schaumober- und unterkante berechnet. Die vom FTS

⁴⁶ Hegarty, P.K., Cope, R., Crompton, I.E., und Wallach, E.R. (1991): An image analysis system for measuring beer foam stability, Proceedings of the EBC Congress, Zürich, S. 553-560

⁴⁷ Bamforth, C.W. und Jackson, G. (1983): Aspekts of foam lacing. Proceedings of the EBC Congress, London, S. 331-338

⁴⁸ Strien, J. v. und Wassenaar, F.R. (1990): Measurement of the cling of beer, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 43, S. 106-111

⁴⁹ Anton Paar GmbH (1996): FTS Anleitung zur Schaumerzeugung, Graz

ausgegebenen *NIBEM*-Werte korrelieren laut *Arnould* und *Dorst*⁵⁰ gut, eine Korrelation zu *Ross & Clark* ist jedoch nicht zu erkennen⁵¹.

⁵⁰ Drost, M. und Arnould, G. (1997): Vergleich des Foam Test System (FTS) von Anton Paar GmbH mit dem *NIBEM* Foam-Stability-Tester von Haffmans, Zürich

⁵¹ Langer, O. (1997): Vergleich des Foam Test Systems (FTS) der Anton Paar GmbH mit *NIBEM* Foam-Stability-Tester von Haffmans und der Methode nach *Ross & Clark*, Semesterarbeit, TU-München

2.4 Einflussparameter auf den Bierschaum

In der Literatur findet sich immer wieder die Einteilung in schaumpositive und schaumnegative Bierinhaltsstoffe.

Tabelle 1: Übersicht über die Einflussfaktoren auf die Schaumhaltbarkeit^{52,53,54,55}

SCHAUM-VERMINDERND	SCHAUM-FÖRDERND
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Niedermolekulare Stickstoffverbindungen (spezielle hydrophile Aminosäuren) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ hochmolekulare Stickstoffverbindungen (10000 - 60000 Dalton)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fettsäuren(C₆- C₁₂), Neutrallipide 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hopfenbitterstoffe (iso α-Säuren, α-Säuren)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fette, Öle und Reinigungsmittel 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucan, Gummistoffe und Pentosane
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hochmolekulare polymere Polyphenole 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Niedermolekulare Polyphenole
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glyceride, Sterine 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Niedermolekulare oligomere Polysaccharide
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alkohole(auch höhere) und andere GNP 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Melanoidine
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ester, Sulfite 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stickstoff, Sauerstoff, Luft
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Detergentien (speziell nicht- und kationische) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Schwermetalle

Zu den schaumnegativen Substanzen zählen Alkohole und andere Gärungsprodukte wie Fettsäuren, niedere Peptide, freie Aminosäuren, hochmolekulare Polyphenole und von außen mit dem Bier in Berührung kommende Fremdstoffe wie Fette, Öle und Reinigungsmittel^{56,57,58}.

⁵² Narziß, L. (1995): Abriß der Bierbrauerei, Enke Verlag, Stuttgart, S. 319-320

⁵³ Belitz, H.D, Grosch, W. (1992): Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, S. 815

⁵⁴ Kunze, W. (1994): Technologie Brauer und Mälzer, VLB Berlin, 7. Auflage, S. 528

⁵⁵ Heyse, K.U. (1994): Handbuch der Brauereipraxis, S. 242-243

⁵⁶ Zürcher, C. und Kraus, G. (1971): Freie niedere Fettsäuren und ihre Ethylester als Bieraromastoffe und Schaumzerstörer, Monatsschrift für Brauerei, 24, S. 230-237

⁵⁷ Schur, F. (1987): Frühindikatoren für das Schaumbild des Bieres, Brauereirundschau, 98, S. 2-10

⁵⁸ Unkel, M. (1987): Der Bierschaum – Erfahrungen aus der Praxis der Betriebsberatung, Brauwelt, 127, S. 467-472

Während der Bierbereitung gilt es, die schaumnegativen Stoffe möglichst zu vermeiden und eine günstige Zusammensetzung der schaumpositiven Stoffe anzustreben. Zu ihnen gehören in erster Linie höhermolekulare Eiweißsubstanzen, aber auch Hopfenbitterstoffe, Melanoidine, niedere Polyphenole und langkettige Kohlenhydrate. Auch Schwermetalle wie Eisen haben eine schaumfördernde Wirkung.

Aus der Vielfalt dieser Substanzen ist zu erkennen, dass es sich bei der Optimierung des Bierschaums immer um eine Kompromisslösung handeln muss, wobei die Förderung von einzelnen schaumpositiven Stoffen nachteilige Effekte der übrigen Qualitätsmerkmale des Bieres bewirken kann^{59,60,61,62}.

Die im Sinne des Reinheitsgebotes mögliche Einflussnahme beschränkt sich auf die erlaubten Rohstoffe und technologischen Maßnahmen während der Mälzung und Bierherstellung. Für Biere, welche nicht nach dem Reinheitsgebot gebraut werden, stehen dem Brauer zusätzliche Roh- und Hilfsstoffe, sowie spezielle Produktionsverfahren zur Verfügung.

⁵⁹ Mändl, B. (1966): Maßnahmen zur Schaumverbesserung der Biere, Brauwelt, 106, S. 666-770

⁶⁰ Röttger, W. (1972): Über den Einfluss des Mälzungs- und Brauverfahrens auf die Molekulargewichtsverteilung der Stickstoffsubstanzen in Würze und Bier, Dissertation, TU-München

⁶¹ Hegarty, P.K. und Crompton, I.E. (1990): Factors affecting foam stability, EBC-Vortrag, Dublin

⁶² Bamforth C.W. (2000): Beer quality series: Foam, Brewers` Guardian, 4, S. 40-43

2.5 Analytik der Bierschauminhaltsstoffe

Ebenso umfangreich wie die Messmethoden des Schaums sind die Analysenmethoden zur Bestimmung der Bierinhaltsstoffe, die daran beteiligt sind.

Die Analytik der am Bierschaum beteiligten Substanzen stützt sich hauptsächlich auf die Isolierung und Charakterisierung der schaumpositiven und schaumnegativen Bierinhaltsstoffe. An erster Stelle stehen die proteinischen Substanzen. Diese werden durch chromatographische Methoden wie Gelfiltration, Ultrafiltration, Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, elektrophoretische Methoden, aber auch durch immunologische Verfahren getrennt und charakterisiert^{63,64}.

Es zeigt sich, dass im wesentlichen mit Glucoseeinheiten verzweigte Polypeptidketten die Hauptgruppe der am Schaum beteiligten Substanzen darstellt. Die Aussagen über die typischen Eigenschaften dieser Proteine sind jedoch nicht einheitlich, zum Teil sogar widersprüchlich.

Eine weitere Disziplin der Analytik des Bierschaums geht auf die schaumbeeinträchtigende Wirkung von im Bier vorkommenden Proteinasen ein^{65,66,67,68}.

⁶³ Bamforth, C.W. und Jackson, G. (1983): Aspects of foam lacing. Proceedings of the EBC Congress, London, S. 331-338

⁶⁴ Voigt, J.C. (1992): Untersuchungen zur Beschreibung der proteinischen Fraktion des Bierschaums und deren Beeinflussung durch technologische Faktoren, Dissertation, TU-München

⁶⁵ Dreyer, T., Biedermann, K., Ottesen, M. (1983): Yeast Proteinase in Beer, Carlsberg Research Communications, 48, 5, S. 249-253

⁶⁶ Gommelt, T. (1987): Verhalten von Proteinasen während der Gärung und Lagerung des Bieres und deren Einfluss auf die Schaumqualität, Diplomarbeit, TU-München

⁶⁷ Reicheneder, E. und Narziß, L. (1989): Untersuchungen von Hefeproteinase auf den Bierschaum, Proceedings of the EBC Congress, Zürich, S. 577-584

⁶⁸ Briem, F. (1993): Technologische und immunchemische Untersuchungen über das Verhalten und den Einfluß von Bierinhaltsstoffen und Hefeproteinase auf die Bierqualität, Dissertation, TU-München

3 Material und Methoden

3.1 Enzymatische Analytik der Proteinasekonzentration

Die quantitative Aktivitätsbestimmung von Proteinase in Bier ist schon seit längerem ein Ziel verschiedener Forschungsprojekte. Hierbei wurden die unterschiedlichsten Methoden entwickelt.

An dieser Stelle soll auf die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden eingegangen werden.

Um die verschiedenen angewandten Methoden zu vergleichen, wurde eine Eichreihe mit Proteinase A (SIGMA P 8892) aus Bäckerhefe durchgeführt. Diese zeigt eine Aktivität von 15-50 Units pro mg Protein, wobei 1 Unit 1 mg Insulin Chain B (Oxidiert) pro Minute bei pH 6,0 und 25 °C hydrolisiert.

Für die Bestimmungen wurde Bier durch Erhitzen über 5 min auf 90 °C sterilisiert und mit steigenden Mengen an Proteinase A versetzt. Die erhaltenen Messwerte sind jeweils als Konzentration von Proteinase A angegeben.

Lösungen/Reagenzien:

I. *Mcllvaine* Puffer (pH 5,5)

a) 14,2 g Na_2HPO_4 in Wasser lösen und auf 400 ml auffüllen.

b) 9,605 g Citronensäure in Wasser lösen und auf 500 ml auffüllen.

c) Lösung a) mit Lösung b) auf pH 5,5 einstellen.

II. Proteinase A Vorratslösung

1 mg Proteinase A in 1 ml *Mcllvaine* Puffer (pH 5,5) lösen.

3.1.1 Azocoll Methode

Prinzip: Ein mit Azofarbstoff verbundenes Collageneinweiß dient als Proteinase substrat. Das Bestimmungsprinzip beruht auf der Umsetzung der Substrate durch Proteinase, die farbstoffmarkierte Peptide freisetzen, welche nicht mehr fällbar oder filtrierbar sind. Diese dienen als Messgröße für die vorhandene proteolytische Aktivität.

Geräte: Spektralphotometer, Cadas 200, Dr. Lange
Eppendorffpipetten verschiedener Volumina
Temperiergerät, Vortemp 56 EVC, UNIEQUIP

Verbrauchsmaterialien: Einwegküvetten, Plastik
Pipettenspitzen
Blaubandfilter
Reagenzgläser
Azocoll, MERCK

Institutsmethode nach Reicheneder mit Azocoll als Substrat⁶⁹Lösungen/Reagenzien:

I. Puffer-Lösung

2 Mol Hepes + 0,06 % NaN₃, in 100 ml H₂O, pH: 4,66

II. Probe-Lösung

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 520 nm (Extinktion)

Schichtdicke: 1 cm

Inkubationstemperatur: 36 °C

Tabelle 2: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Azocoll nach Reicheneder

In 100 ml Reagier-Gefäße pipettieren	Proben-leerwert (LW)	Hauptwert (HW)	Reagenzien-blindwert (RBW)
Substrat (Azocoll)	-	20 mg (±0,1 mg)	20 mg (±0,1 mg)
Puffer-Lösung (I)	1 ml	1 ml	1 ml
Probe-Lösung (II)	10 ml	10 ml	
bidest. Wasser	ohne Proteinase A	mit Proteinase A	10 ml
Bei 36 °C über 22 h inkubieren. Über Blaubandfilter filtrieren. Sofort Extinktionen messen.			
Proteinasenaktivität _{22h} : $\Delta E = Ext.HW - Ext.LW - RBW$			

⁶⁹ Reicheneder, E.: Institutsmethode zur Bestimmung von Proteinase im Bier mit Azocoll als Substrat, interne Mitteilung

Institutsmethode nach Reicheneder mit Azocasein als Substrat⁷⁰Lösungen/Reagenzien:

I. Substrat-Lösung

900 mg Azocasein in 20 ml Puffer-Lösung

II. Puffer-Lösung

0,3 Mol HEPES + 0,06 % NaN₃, in 100 ml H₂O, pH: 7,4 mit NaOH

III. Probe-Lösung

IV. Stopplösung

48 % Trichloressigsäure

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 360 nm (Extinktion)

Schichtdicke: 1 cm

Inkubationstemperatur: 36 °C

Tabelle 3: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Azocasein nach Reicheneder

In 1 ml Reagier-Gefäße pipettieren	Probenleerwert (LW)	Probe
Substrat-Lösung (I)	2 ml	2 ml
bidest. Wasser	10 ml	5 ml
Probe-Lösung (III)	-	5 ml
Bei 36 °C über 0 h und bis 21 h inkubieren. 3 ml in 10 ml Zentrifugenbecher pipettieren, Reaktion abstoppen durch Zusatz von		
Stopp-Reagenz (IV)	1 ml	1 ml
10 min schütteln, anschließend 30 min zentrifugieren und sofort in Einwegküvetten pipettieren und Extinktion gegen Luft messen.		
Proteinasenaktivität _{3h} : $\Delta E = (Ext.HW_{xh} - Ext.HW_{0h}) - (Ext.LW_{xh} - Ext.LW_{0h}) \times 1000$		
Proteinasenaktivität _{21h} : $\Delta E = (Ext.HW_{21h} - Ext.HW_{0h}) - (Ext.LW_{21h} - Ext.LW_{0h}) \times 1000$		

⁷⁰ Reicheneder, E.: Institutsmethode zur Bestimmung von Proteinase im Bier mit Azocasein als Substrat, interne Mitteilung

3.1.3 MCA-Methode

Die MCA-Methode wurde vom *Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba*⁷¹ ursprünglich zur Bestimmung von Renin, welches von der Niere abgegeben wird, entwickelt. Erstmals zur Bestimmung von Bierproteinasen wurde sie von *Yokosawa*⁷² et. al. und von *Oka*⁷³ angewandt. In einem gemeinsamen Forschungsprojekt am *Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I* mit der *Suntory Breweries Ltd.* verwendete *Oka* MCA als Substrat zum Proteinase-A-Nachweis. Die MCA-Methode wurde auf die Eignung zur Bestimmung von Bierproteinasen hin geprüft und weiterentwickelt. Hierbei wurde erstmals ein rein synthetisches Substrat verwendet. Eine weitere, auf synthetischem Substrat basierende, Proteinase-Nachweismethode beschreibt auch *Kondo*⁷⁴. Hier kommt ebenfalls ein Protein-MCA-Substrat⁷⁵ zum Einsatz, dessen Abbauprodukte fluorimetrisch gemessen werden. Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich hauptsächlich in der Sequenz der Aminosäuren des Proteinrestes.

Prinzip: Nach dem Abbau des Protein-MCA-Substrates durch Proteinase A aus Bier wird das Abbauprodukt nochmals mit Leucinaminopeptidase M gespalten. Dadurch wird fluoreszierendes AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) freigesetzt. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Menge an freigesetztem AMC und somit zur Menge an Proteinase A.

MCA-Substrat kann selbst nicht von Leucinaminopeptidase M abgebaut werden, da es ein Succinylrest am N-Ende enthält.

⁷¹ Murakami, K., et al (1981): New fluorogenic Substrates for Renin, *Analytical Biochemistry*, 110, S. 232

⁷² Yokosawa, H., et al (1983): Purification and Fluorometric Assay of Proteinase A from Yeast, *Analytical Biochemistry*, 134, S. 210

⁷³ Oka, K. (1994): Interne Mitteilung

⁷⁴ Kondo, H., Yomo, H., Furukubo, S., Fukui, N., Nakatami, K., Kawasaki, Y. (1999): Advanced Method for Measuring Proteinase A in Beer and Application to Brewing, *Journal of the Institute of Brewing*, 105, S. 293-300

Enzymatischer Abbau:

1. Suc-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Val-Tyr-MCA $\xrightarrow{\text{PROTEINASE A}}$
 Suc-Arg-Pro-Phe-His-Leu + Val-Tyr-MCA
2. Val-Tyr-MCA $\xrightarrow{\text{LEUCINAMINOPEPTIDASE M}}$ Val + Tyr + AMC (Fluoreszenz)⁷⁶

Proteinase A spaltet spezifisch zwischen Leucin- und Valin-Bausteinen wobei ein Val-Tyr-MCA – Rest entsteht, dieser wird erst dann durch Leucinaminopeptidase M zu AMC abgebaut.

Geräte: Spektralphotometer, Cadas 200, Dr. Lange
 Laborzentrifuge, Centrifuge 5410, Eppendorf
 Eppendorfpipetten verschiedener Volumina
 Temperiergerät, Vortemp 56 EVC, UNIEQUIP

Verbrauchsmaterialien: Einwegküvetten, Plastik
 Pipettenspitzen
 Na₂HPO₄
 Citronensäure
 MCA-Subtrat
 Dimethylformamid
 Tris
 1 N HCl-Lösung
 48 %ige Trichloressigsäure
 Proteinase A (SIGMA P 8892)
 Na₂HPO₄
 Aminopeptidase M (SIGMA L 0632)
 Eppendorf Reaktionsgefäße

⁷⁵ Peptide Institute, Protein Research Foundation, 4-1-2 Ina, Minoh-shi, Osaka 562, Japan

⁷⁶ Yokosawa, H., et al (1983): Purification and Fluorometric Assay of Proteinase A from Yeast, Analytical Biochemistry, 134, S. 210

Methode nach Oka⁷⁷ mit MCA als SubstratLösungen/Reagenzien:I. *Mcllvaine* Puffer pH 5,5a) 14,2 g Na₂HPO₄ in Wasser lösen und auf 400 ml auffüllen.

b) 9,605 g Citronensäure in Wasser lösen und auf 500 ml auffüllen.

c) Lösung a) mit Lösung b) auf pH 4,5 einstellen.

II. 1 mM MCA-Substrat-Lösung

1,1 mg MCA-Substrat in 3,4 ml Dimethylformamid lösen.

III. 1M Tris-HCl pH 8,5

24,22 g Tris in ca. 100 ml Wasser, mit 1 N HCl auf pH 8,5 einstellen, auf 200 ml auffüllen.

IV. Leucinaminopeptidase-M-Lösung

1 mg Leucinaminopeptidase M (SIGMA L 0632) in 10 ml Tris-HCl

V. Probelösung

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 440 nm (Emissionsmessung)

Schichtdicke: 1 cm

Inkubationstemperatur: 30 °C (Proteinase-A), 37 °C (Leucinaminopeptidase-M)

Tabelle 4: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels MCA nach OKA

In 1,5 ml Reagier-Gefäße pipettieren	Probenleerwert	Probe
<i>Mcllvaine</i> Puffer (I)	220 µl	220 µl
Substrat-Lösung (II)	20 µl	20 µl
Probe-Lösung (V)	20 µl (ohne Proteinase-A)	20 µl (mit Proteinase-A)
Proben 1 min zentrifugieren, 20 h bei 30 °C inkubieren, 10 min bei 90 °C inaktivieren.		
1M Tris-HCl pH 8,5 (III)	200 µl	200 µl
Leucinaminopeptidase-M-Lösung (IV)	20 µl	20 µl
1 min zentrifugieren, 2 h bei 37 °C inkubieren, 10 min bei 90 °C inaktivieren.		
<i>Mcllvaine</i> Puffer (I)	720 µl	720 µl
mischen und Extinktion der Probe gegen Leerwert bei Raumtemperatur sofort fluorimetrisch Differenz bestimmen.		

⁷⁷ Oka, K. (1994): Interne Mitteilung

3.1.4 Casein, Resorufin-markiert Methode

Die Bestimmung von proteolytischer Aktivität mittels Casein, Resorufin-markiert wurde schon von Twining⁷⁸ beschrieben.

Geräte: Spektralphotometer CADAS 200, Dr. Lange
Labofuge Universal 30 RF, Hettich
Eppendorffpipetten verschiedener Volumina
Temperiergerät, Vortemp 56 EVC, UNIEQUIP

Verbrauchsmaterialien: Universelles Proteasen-Substrat, (Casein, Resorufin-
markiert, Boehringer Mannheim Best. Nr. 1080
733/1734 334)
Einwegküvetten, Plastik
Pipettenspitzen
CaCl₂
Tris
1 N HCl-Lösung
Trichloressigsäure
Proteinase A (SIGMA P 8892)
Eppendorf Reaktionsgefäße

⁷⁸ Twining, S.S. (1984): Analytical Biochemistry, 143, S. 30-34

Methode nach Twining/Boehringer⁷⁹:Lösungen/Reagenzien:

I. Substrat-Lösung

0,4 % Casein, Resorufin-markiert (w/v) in bidest. Wasser.

II. Inkubations-Puffer

0,2 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,02 M CaCl₂.

III. Probe-Lösung

IV. Stopp-Reagens

5 % Trichloressigsäure (w/v) in bidest. Wasser.

V. Test-Puffer 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 574 nm (Absorptionsmessung)

Schichtdicke: 1 cm

Inkubationstemperatur: 37 °C

Tabelle 5: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Casein, Resorufin-markiert nach *Twining/Boehringer*

In 1 ml Reagier-Gefäße pipettieren	Probenleerwert	Probe
Substrat-Lösung (I)	50 µl	50 µl
Inkubationspuffer (II)	50 µl	50 µl
bidest. Wasser	100 µl	-
Probe-Lösung (III)	-	100 µl
Bei 37 °C über einen bestimmten Zeitraum (15 min bis über Nacht) inkubieren. Reaktion abstoppen durch Zusatz von		
Stopp-Reagenz (IV)	480 µl	480 µl
10 min bei 37 °C inkubieren, anschließend 5 min zentrifugieren und in Einwegküvetten pipettieren.		
Zentrifugations-Überstand	400 µl	400 µl
Test-Puffer (V)	600 µl	600 µl
mischen und Extinktion der Probe gegen Leerwert bei Raumtemperatur sofort messen (= Δ E Probe); bzw. fluorimetrisch Differenz bestimmen.		

⁷⁹ N.N.: Beilage zum Universellen Proteasen-Substrat, Boehringer Mannheim

3.1.5 Angepasste Casein, Resorufin-markiert Methode

Lösungen/Reagenzien:

I. Substrat-Lösung

0,4 % Casein, Resorufin-markiert (GV) in bidest. Wasser.

II. Stopp-Reagens

5 % Trichloressigsäure (GV) in bidest. Wasser.

III. Test-Puffer 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 578 nm (Absorptionsmessung)

Schichtdicke: 1 cm

Inkubationstemperatur: 25 °C

Vorbereitung:

Bierprobe auf pH 6,0 einstellen.

Sterilprobe: Bierprobe für 5 min auf 90 °C erhitzen.

Tabelle 6: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels angepasster Casein, Resorufin-markiert Methode

In 1 ml Reagier-Gefäße pipettieren	Probenleerwert	Probe
Substrat-Lösung (I)	100 µl	100 µl
Sterilprobe:	500 µl	-
Bierprobe:	-	500 µl
Bei 25 °C über 22 h inkubieren. Reaktion abstoppen durch Zusatz von		
Stopp-Reagenz (II)	500 µl	500 µl
10 min bei 25 °C inkubieren, anschließend 5 min zentrifugieren und in Einwegküvetten pipettieren.		
Zentrifugations-Überstand	800 µl	800 µl
Test-Puffer (III)	1000 µl	1000 µl
mischen und Extinktion der Probe gegen Leerwert bei Raumtemperatur sofort messen (= ΔE Probe).		

3.2 Elektrophoretische Analytik

Die SDS-Page trennt Moleküle, im konkreten Fall die Proteine, nach ihrer Molekülgröße und somit auch nach deren Masse auf. Durch lineare Konzentrationsgradienten im Polyacrylamidgel wird die elektrophoretische Trennung gegenüber herkömmlichen Methoden deutlich verbessert⁸⁰. Um die Porengröße des Gels auf die benötigte Größe einzustellen, wird die Konzentrationsänderung des Acrylamids bzw. des Bis-acrylamids variiert. Dies bedeutet, dass die Porengröße des Gels mit steigender Polyacrylamidkonzentration immer kleiner wird, so dass die Proteine im elektrischen Feld so lange transportiert werden, bis sie die ihrer Größe entsprechenden Poren erreicht haben und dort stecken bleiben. In den Poren werden die Moleküle dicht aufeinander geschoben und bilden dadurch scharf abgetrennte Zonen, die somit gut zu erkennen sind. Handelt es sich um globuläre Proteine, ist die ermittelte Molekülgröße dem Molekulargewicht äquivalent⁸¹.

Da die einzelnen Proteine unterschiedliche Formen, Untereinheiten und Ladungsdichten aufweisen, werden diese durch Spaltung der Disulfidbrücken mittels Natriumdodecylsulfat (SDS) in ihre einzelnen Polypeptidketten aufgetrennt und somit vergleichbar gemacht. Damit die Proteine nicht vollständig dissoziieren, wird 2-Mercaptoethanol zugesetzt, das zusätzlich eine weitere Oxidation der SH-Gruppen und die damit einhergehende Oligomerisierung der Polypeptide verhindert⁸².

Denaturieren die Proteine durch das überschüssige SDS, verbindet sich das Detergenz mit den Polypeptiden in einem konstanten Massenverhältnis (1,4 g SDS pro Gramm des Polypeptids) und überführt diese in eine gestreckte Struktur. Jedes SDS-Molekül besitzt eine starke negative Ladung, die die Eigenladung der Polypeptide effektiv überdeckt. Mit wenigen Ausnahmen hat dieser

⁸⁰ Voigt, J.C.(1992): Untersuchungen zur Beschreibung der proteinischen Fraktion des Bierschaums und deren Beeinflußung durch technologische Faktoren, Dissertation, TU-München, S. 30

⁸¹ Ohlenschläger, Berger, Depner (1980): Electrophoresis, Darmstadt, S. 73

⁸² Ohlenschläger, Berger, Depner (1980): Electrophoresis, Darmstadt, S. 73

Polypeptidkomplex ein konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse. Dadurch wird es möglich, näherungsweise eine Proportionalität der elektrophoretischen Mobilität und des Molekulargewichtes der Proteine herzustellen. Als Folge dieses konstanten Verhältnisses entsteht bei der Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der im Handel erhältlichen Marker-Proteine mit bekanntem Molekulargewicht eine lineare Eichkurve⁸³.

3.2.1 Schaumfraktionierung

Um die Trennung der verschiedenen Proteinfractionen im Bierschaum zu erhalten, wurde ein rein physikalisches Verfahren angewandt, das in seinem Aufbau an die Analyse der Schaumhaltbarkeit nach *Ross & Clark* angelehnt ist. Diese Art der Schaumfraktionierung wurde vor allem deshalb gewählt, da hier der natürliche Schaumzerfall wirklichkeitsgetreu simuliert wird und mit den gewonnenen Fraktionen Rückschlüsse auf die Verhältnisse im Bier gezogen werden können. Ein weiterer Grund für diese Art der Fraktionierung war der geringe Einfluss des Kohlendioxidgehaltes im Bier auf das Ergebnis der Schaumbildung⁸⁴.

Lösungen/Reagenzien:

Kohlendioxid, reinst

Octanol

Puffer pH 4,52:

0,6 g/l Kalium-Dihydrogenphosphat, 0,3 g/l Citrat, 0,7 g/l Natriumchlorid, 0,2 g/l

Magnesiumchlorid mit konz. HCl auf pH 4,52

Geräte:

Schaumzylinder, graduiert, zylindrisch, 600 ml Volumen, unten dicht ansitzender Hahn

Becherglas, 100 ml

2 Messzylinder, 150 ml

Gasverteilungsrohr

⁸³ Ohlenschläger, Berger, Depner (1980): Electrophoresis, Darmstadt, S. 73

Feindruckminderer
Gaswaschflasche
Stoppuhr

Das nicht entkohlensäuerte Bier wird in der Flasche (oder der Dose) im Wasserbad auf eine Temperatur von 20 °C eingestellt. Von dieser vorbereiteten Probe werden 100 ml Bier vorsichtig und möglichst ohne Schaumbildung zu verursachen in einem Messzylinder abgemessen und in den fettfreien Schaumzylinder überführt. Dabei ist darauf zu achten, dass möglichst wenig Schaum entsteht. Dieser Vorgang wird erleichtert, wenn der Messzylinder zunächst bis zum Rand gefüllt und anschließend auf das erforderliche Maß von 100 ml abgeschüttet wird.

Für die nun folgende Fraktionierung wird der Druckminderer der CO₂-Flasche auf maximal 0,8 bar eingestellt und mit Hilfe des Feindruckminderers so reguliert, dass ein möglichst konstantes Schaumvolumen pro Zeiteinheit entsteht. Es muss hierbei darauf geachtet werden, daß die Stellschraube des Druckminderers gut erreichbar ist, um gegebenenfalls eine Korrektur während des Schäumens zu ermöglichen.

Sind die notwendigen Vorkehrungen getroffen, kann mit der Durchführung begonnen werden. Die Zeitnahme für das anschließend aufgeführte Zeitschema erfolgt mit Hilfe der Stoppuhr und beginnt mit dem Eintauchen des Gasverteilungsrohres in das Bier.

⁸⁴ MEBAK (1993): Brautechnische Analysenmethoden, Bd. II, S.178

Es wird dann wie folgt verfahren:

Durchführung der Schaumfraktionierung:

0 – 60 Sekunden	Aufschäumen
75 – 90 Sekunden	Restbier (RB) auffangen
90 – 270 Sekunden	Bier verwerfen
270 – 870 Sekunden	Schaumbier (SB) auffangen
nach 870 Sekunden	Schaumrest (SR) mit Puffer abspülen und auffangen

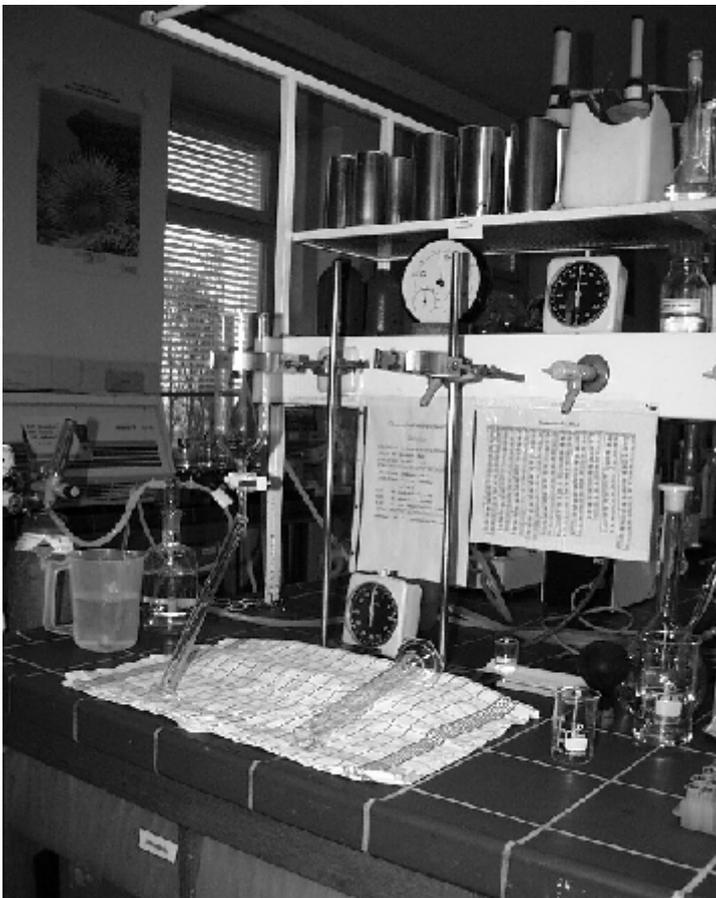


Abb. 2: Versuchsaufbau zur Schaumfraktionierung

Der Versuchsaufbau zur Schaumfraktionierung, ist ähnlich dem der Schaumbestimmung nach *Ross & Clark* (Abb. 2).

Beim Aufschäumen ist darauf zu achten, dass das Schaumvolumen von etwa 500 ml mit dem Erreichen der 60sten Sekunde zusammenfällt.

Nach Ablauf von weiteren 15 Sekunden wird das verbliebene Restbier (dies ist der im Schaumzylinder zusammengelaufene Bierrest über dem Auslaufhahn) in das vorbereitete Becherglas bis zur 90sten Sekunde abgelassen. Dabei darf kein Schaum aus dem Zylinder in das Becherglas gelangen, da das Ergebnis dadurch verfälscht würde. Das Auffangen soll genau nach Ablauf von 90 Sekunden beendet werden und möglichst konstant verlaufen.

Während der nächsten 3 Minuten wird das entstehende Bier in einem weiteren Becherglas gesammelt und später verworfen, da dieser Anteil Proteine enthält, die schon Schaum gebildet haben und somit auch denaturiert waren.

Nach Ablauf von 270 Sekunden wird das sich bildende Schaumbier 10 Minuten lang in einem Messzylinder gesammelt. In diesem Zeitabschnitt ist der Hahn des Schaumzylinders voll geöffnet.

Die nun noch an den Glasinnenseiten anhaftenden Schaumreste werden mit 5 ml Puffer aus einer entsprechenden Pipette unter kreisender Bewegung im Schaumzylinder in den bereitgestellten Messzylinder gespült. Diese Fraktion bildet den Schaumrest.

Um den anhaftenden Schaum, der oft sehr stabil und stark haftend ist, zu gewinnen, kann dieser Rest mit Hilfe sehr geringer Mengen Octanol von $< 1\mu\text{l}$ niedergeschlagen werden.

Da die 3 gewonnenen Fraktionen anfällig gegenüber Infektionen sind, wird ihnen eine sehr kleine Menge $< 0,1\text{ g}$ Natriumazid zugesetzt, um sie zu konservieren. Diese Art der Stabilisierung ist jedoch nur notwendig, wenn die nachfolgende

Elektrophorese nicht unmittelbar nach der Fraktionierung durchgeführt werden kann.

Der verwendete Kaliumhydrogenphosphat-Citrat-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Puffer simuliert die Ionenverhältnisse von Bier, beugt gleichzeitig einer Denaturierung der Proteine vor und verhindert somit eine Trübung der Fraktion Schaumrest⁸⁵.

⁸⁵ Voigt, J.C. (1992): Untersuchungen zur Beschreibung der proteinischen Fraktion des Bierschaums und deren Beeinflußung durch technologische Faktoren, Dissertation, TU-München, S. 28ff

3.2.2 SDS-PAGE der Schaumproteine

Geräte:

Eppendorff-Reaktionsgefäße, 1,5 ml

Eppendorffpipette, 100 µl

Einmalpipettenspitzen, 100 µl

Ständer für Eppendorff-Reaktionsgefäße

Ultrophor 2217 Elektrofokussierkammer, Firma Pharmacia LKB Biotechnologie

Labor-Thermostat K 20, Haake

Netzgerät EPS 3500, Pharmacia

Dosierpipette, 2-10 µl

Probeaufgabenbeschlone, Amersham Pharmacia

ExcelGele™ SDS, Gradient 8-18, Amersham Pharmacia

Laborwaage

Messkolben, 100 ml

Färbeschalen

elektrischer Schüttler

Glasplatte, etwa DIN A4 – Format

Lösungen/Reagenzien:

I. SDS-Probenpuffer pH 8

2,5 % SDS, 10 mM Tris, 1 mM EDTA mit konz. HCl auf pH 8

II. Markerproteingemisch, LKB Biotechnologie

III. Trichloressigsäure-Lösung 15 % (TCS)

150 g Trichloressigsäure in 1000 ml H₂O

IV. Glutaraldehyd-Lösung 12,5 %

12,5 g Glutaraldehyd in 100 ml H₂O

V. 30 % Ethanollösung

30 ml Ethanol in 100 ml H₂O

VI. 70 % Ethanollösung

70 ml Ethanol in 100 ml H₂O

VII. Silbernitrat-Lösung 0,6 %

0,6 g AgNO₃ in 100 ml H₂O

VIII. Natriumcarbonat-Lösung 1,25 %

12,5 g Na₂CO₃ in 1000 ml H₂O

IX. EDTA-Lösung 50 mM

50 mM EDTA in 1000 ml H₂O

X. Essigsäure-Lösung 10%

100 g Essigsäure in 1000 ml H₂O

XI. Glycerin-Methanol-Lösung (10 %, 40 %)

10 g Glycerin und 40 g Methanol in 100 ml H₂O

Bromphenolblau

Paraffinöl

Formaldehyd, konz.

Tabelle 7: Markerproteingemisch der Firma LKB Biotechnologie

Substanz	Molekulargewicht
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	94.000 Dalton
Albumin (Rinderserum)	67.000 Dalton
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	43.000 Dalton
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	30.000 Dalton
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	20.100 Dalton
α-Lactalbumin (Kuhmilch)	14.400 Dalton

Probenvorbereitung

Für das Trennergebnis und die Reproduzierbarkeit ist die Einhaltung der Parameter der Probenvorbereitung von Bedeutung. Die nachfolgend beschriebene Variante hat sich in vorangegangenen Versuchsreihen als die geeignetste erwiesen.

Die zuvor gewonnenen Fraktionen Restbier, Schaumbier und Schaumrest werden im Verhältnis 5:3 mit Probenpuffer versetzt und während 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Marker wird in Pulverform geliefert und muss vor Beginn der Versuchsreihe mit 200 µl SDS-Probenpuffer (I.), sowie etwas Bromphenolblau versetzt werden.

Versuchsdurchführung

Vor dem Beginn der Elektrophorese wird der Labor-Kyrostat an die Elektrofokussierkammer angeschlossen und auf eine Betriebstemperatur von 12 °C heruntergekühlt.

Für die weiteren Arbeitsgänge müssen unbedingt saubere Einmalgummihandschuhe getragen werden, da das Gel verunreinigt werden kann und außerdem giftig ist.

Paraffinöl wird als Kontaktflüssigkeit zwischen Gel und Kühlplatte auftragen, um eine gleichmäßige Kühlung zu gewährleisten.

Anschließend wird die Gelpackung möglichst nahe am Rand aufgeschnitten. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Trägerfolie des Gels keinen Schaden nimmt, da die Kühlung sonst nicht einwandfrei erfolgen kann.

Im nächsten Arbeitsschritt wird das Gel auf die Kühlplatte der Fokussierkammer aufgelegt. Dabei ist darauf zu achten, dass möglichst keine oder nur wenige Bläschen zwischen Gel und Platte im Paraffin entstehen, da sonst während der Elektrophorese Stellen mit ungenügender Kühlung entstehen können. Vorteilhaft ist es daher, wenn das Gel leicht gebogen wird, in der Mitte der Kühlplatte aufgesetzt und nach außen hin aufgelegt wird:

Die eventuell noch vorhandenen Luftbläschen werden mit Hilfe eines Labortuches, durch Wischen von der Innenfläche des Gels zum Rand hin, herausgeschoben. Sind alle Luftbläschen beseitigt, wird die Schutzfolie abgenommen.

Nach dem Auflegen des Gels bildet sich am Rand der Trägerfolie ein Überschuss des Paraffins, der noch entfernt werden muss, bevor die Pufferstreifen aufgelegt werden.

Ist dieser Vorgang abgeschlossen, wird die Probenaufgabeschablone etwa 10 mm von der Kathode entfernt auf das Gel aufgelegt. Mit Hilfe der Eppendorffpipette werden 2,5 µl der Proben mit jeweils einer neuen Pipettenspitze aufgetragen.

Nun wird die Glasabdeckplatte mit den beiden Elektroden auf die Pufferstreifen gelegt.

Nach den getroffenen Vorbereitungen wird der Trennvorgang durch das Einschalten des Netzgerätes eingeleitet. Am Netzgerät werden dabei 600 V, 40 mA und 35 W eingestellt.

Der Trennvorgang ist abgeschlossen, wenn die Front der blauen Markierungen der Markerproteine in den Anodenbereich einwandern. Dieser Vorgang dauert unter normalen Umständen circa 90 Minuten.

Abschließend wird die Schutzhaube abgenommen, die Steckverbindungen gelöst und die Glasabdeckplatte mit den Elektroden abgenommen. Sind die Pufferstreifen entfernt, kann das Gel abgenommen und gefärbt werden.

Silberfärbung der SDS-PAGE Gele

Das hier beschriebene Versuchsschema wurde in Anlehnung an *Heukeshoven* durchgeführt. Die Silberfärbung hat den Vorteil, dass sie hoch empfindlich ist und somit eine sehr feine Unterscheidung der einzelnen Proteinmassen ermöglicht⁸⁶.

Die für die Färbung notwendigen Reagenzien werden in der relativ geringen Menge von 100 ml hergestellt, welche für eine Gelplatte ausreichend sind, da die Lösungen selbst oder durch den Kontakt mit den Gelen giftig sind beziehungsweise giftig werden.

⁸⁶ Heukeshoven, J., Dernick, R. (1988): Improved silver staining procedure for PhastSystem development unit, *Electrophoresis*, 9, S. 28-32

Tabelle 8: Färbetechnik: (in Anlehnung an *Heukeshoven*)¹⁸

	Schritt	Lösung	Zeit
1.	Fixierung	15 % TCS-Lösung (IV)	30 min
2.	Fixierung	12,5 % Glutaraldehyd-Lösung(V)	30 min
3.	Waschen	70 % Ethanol-Lösung (VII)	2 min
4.	Waschen	30 % Ethanol-Lösung (VI)	2 x 2 min
5.	Waschen	H ₂ O bidest.	4 x 5 min
Pause über Nacht bei maximal 10 °C			
6.	Waschen	H ₂ O bidest.	4 x 5 min
7.	Imprägnieren	0,6 % AgNO ₃ (VIII)	40 min
8	Spülen	H ₂ O bidest.	1 min
in frischer Färbeschale:			
9.	Entwickeln	1,25 % Na ₂ CO ₃ (IX)+ 60 µl Formaldehyd	8-10 min
10.	Waschen	H ₂ O bidest.	1 min
11.	Stoppen	50 mM EDTA (X)	10 min
12	Stoppen	10 % Essigsäure-Lösung (XI)	10 min
13.	Waschen	H ₂ O bidest	3 x 5 min
14.	Konservieren	Glycerin-Methanol-Lösung (XII)	5 min

Scannen und Auswertung

Die angewandte Silberfärbung ist nach *Voigt (1992)* sehr empfindlich und weist schon Proteine im Bereich von 0,3–0,5 ng/µl nach.

Die erhaltenen SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegele wurden mittels einem Flachbettscanner AGFA 1212U mit einer Auflösung von 300 dpi in Graustufen gescannt. Die digitalisierten Gele wurden mit *GelCompar* der Firma *Applied Math* am PC zu Densitogrammen verarbeitet. Die erhaltenen Densitogramme zeigen einzelne Peaks, deren Fläche proportional zu der jeweiligen Substanzmenge ist. Das Ermitteln der Basislinie und die Entfärbung des Hintergrundes wurde durch die Software übernommen. Eine absolute Quantifizierung der einzelnen Banden war jedoch wegen der unbekanntenen Gesamtkonzentration der aufgegebenen Proteine nicht möglich. Die Auswertung beschränkt sich daher auf eine semiquantitative, relative Bewertung der Banden. Da mit

Molekulargewichtsmarkern im Bereich von 14,4-94,0 kD gearbeitet wurde, wurden die Densitogramme auf diesen Bereich begrenzt (Abb.3).

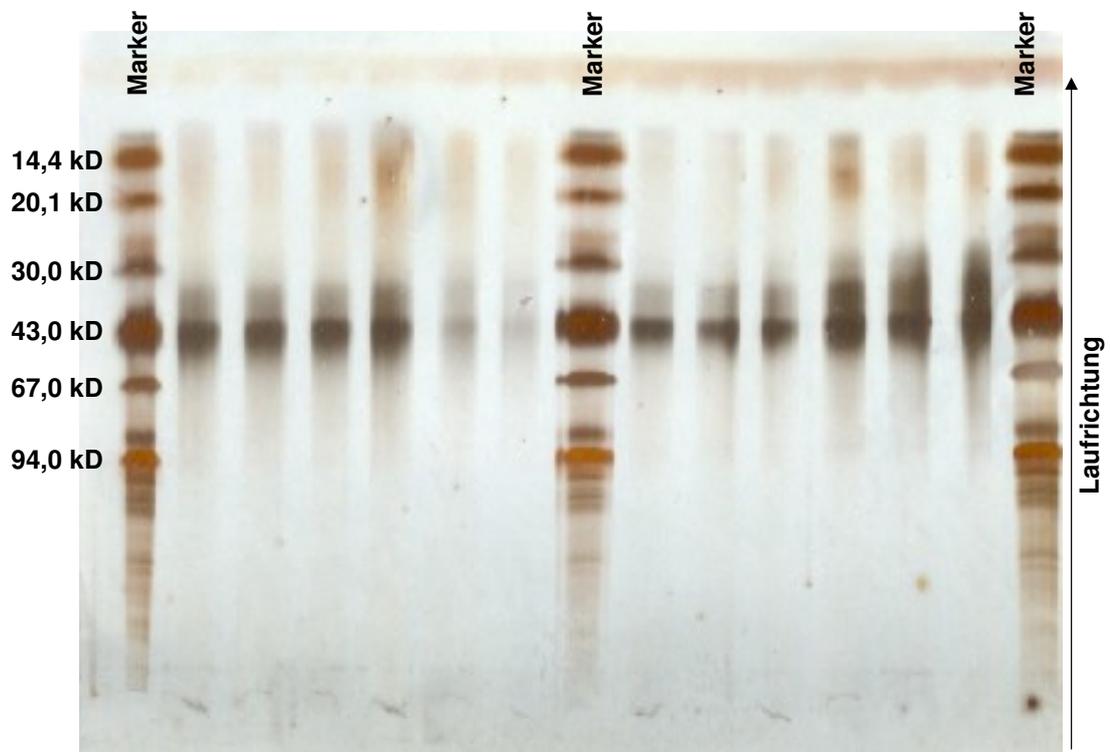


Abb. 3: SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegel zur Molekulargewichtsbestimmung

3.3 Routineanalytik

3.3.1 Schaumbestimmung nach *NIBEM* und *Ross und Clark*

Die Bestimmung der Schaumhaltbarkeit wurde nach *NIBEM* und *Ross & Clark*⁸⁷ durchgeführt.

3.3.2 Gesamtstickstoff

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs in Würze und Bier wurde nach *MEBAK* durchgeführt.

3.3.3 Koagulierbarer Stickstoff

Die Bestimmung des Koagulierbaren Stickstoffs in Würze und Bier wurde nach *MEBAK* durchgeführt.

3.3.4 MgSO₄-fällbarer Stickstoff

Die Bestimmung des MgSO₄-fällbaren Stickstoffs in Würze und Bier wurde nach *MEBAK* durchgeführt.

3.3.5 Freier Amino-Stickstoff

Die Bestimmung des Freien Amino-Stickstoffs in Würze und Bier wurde nach *MEBAK* durchgeführt.

3.3.6 Hefezellzahl

Die Bestimmung der Hefezellzahl erfolgte über ein Zellzählgerät der Fa. Schärfe GmbH, Typ CASYBRAU.

⁸⁷ *MEBAK* (1993): Brautechnische Analysenmethoden Bd. II, Freising

Für die Messungen wurde der Messbereich zwischen 4 µm und 15 µm Partikelgröße und ein Probenvolumen von 200 µl gewählt. Zur Auflösung von Zellagglomeraten wurden die Hefeproben vor der Messung 10 min im Ultraschallbad behandelt. Zur Messung wurde mit Casyton Lösung der Fa. Schärfe eine Verdünnung von 1:1000 hergestellt und die Zellzahl mittels dreifacher Messung bestimmt⁸⁸.

3.3.7 Lebendzellzahl der Hefe

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl und Vitalität von Hefe wurde die Methylenblau-Färbung nach *Back*⁸⁹ angewandt.

3.3.8 Intrazellulärer pH-Wert

Die ICP-Methode (intracellular pH) dient der Ermittlung der Hefevitalität und wurde nach *Back*⁹⁰ angewandt.

Prinzip:

5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat wird der Zellsuspension zugesetzt. Im Cytosol der Zelle erfolgt durch dort vorhandene Esterasen eine Hydrolyse von 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat, wodurch die Zelle mit fluoreszierendem 5(6)-Carboxyfluorescein geladen wird. Um die Protonen-Ausstoß-Aktivität zu messen, wird der intrazelluläre pH-Wert bei einem niedrigen extrazellulären pH-Wert bestimmt. Die mit 5(6)-Carboxyfluorescein geladenen Zellen werden in einem Puffer (pH 3) gehalten. Es ist nun möglich, den intrazellulären pH-Wert individueller Zellen durch die Technik der Verarbeitung mikroskopischer Bilder als auch die Gesamtheit der Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers unter Verwendung der linearen Beziehung zwischen pH-Wert und Fluoreszenz-

⁸⁸ N.N.: Gebrauchsanweisung Schärfe GmbH

⁸⁹ Back, W. (2000): Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil II, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, S. 191

⁹⁰ Back, W., Imai, T., Forster C., Narziß, L. (1998): Hefevitalität und Bierqualität, Monatsschrift für Brauwissenschaft 11/12, S. 189-195

Intensität zu messen. Der intrazelluläre pH-Wert aktiver Zellen nimmt nicht ab, auch wenn der extrazelluläre pH-Wert niedrig ist. Im Gegensatz dazu fällt aber der intrazelluläre pH-Wert weniger aktiver Zellen bei niedrigem extrazellulären pH-Wert deutlich ab.

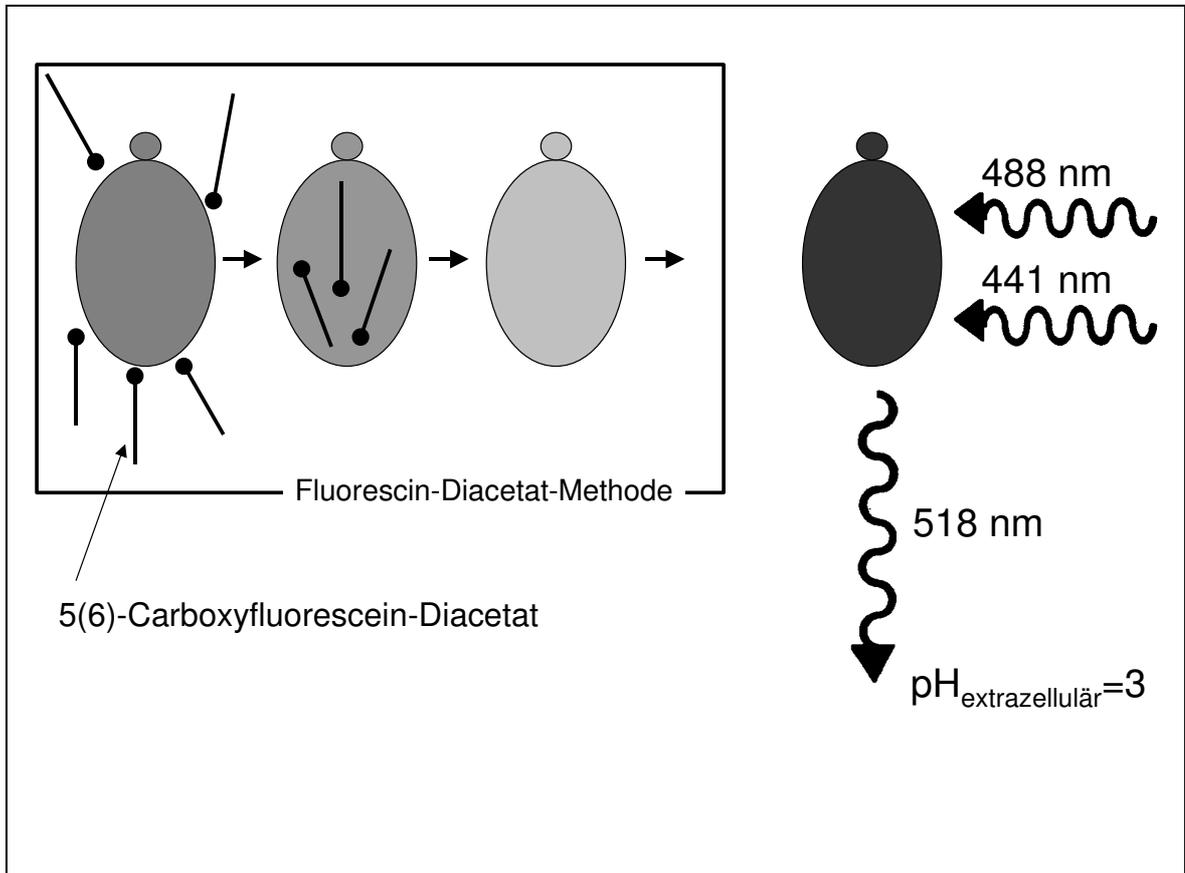


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der ICP-Methode nach *Back/Imai*⁹⁰

Durchführung

Lösungen/Reagenzien:

- I. Citronensäure-Natriumhydrogenphosphat-Puffer pH 3,0
50 mM Citronensäure, 50 mM Natriumhydrogenphosphat, 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂
- II. 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Lösung
10 mM 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat in Dimethylsulfoxid

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 441 nm und 488 nm (Erregung)
518 nm (Emissionsmessung)

Dickbreiige Hefe wird mit einem Hefesieb (40 µm) gewaschen, um Schmutzablagerungen abzusondern. 2 ml abzentrifugierte Hefe (Zentrifugieren bei 3000 g, 5 min und bei 2 °C) werden zweimal mit Citronensäure-Natriumhydrogenphosphat-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschen wird die Hefe abzentrifugiert. Die sedimentierte Hefe wird wieder mit kaltem Puffer (0 °C) gemischt und die Mischung mit demselben Puffer auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt. 0,3 ml 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Lösung werden zu der Hefemischung hinzugefügt und sofort 1 min lang kräftig geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu erreichen. Die Mischung wird sodann in Eis aufbewahrt. Nach 15 min wird sie wieder gemischt und für weitere 15 min in Eis aufbewahrt. Die mit 5(6)-Carboxy-fluorescein geladene Hefe wird dreimal mit kaltem Puffer gewaschen. Die sedimentierte Hefe wird nun wieder mit frischem kaltem Puffer vermischt und die Mischung mit dem gleichen Puffer auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt. 0,3 ml dieser Mischung werden zu 10 ml kaltem Puffer A hinzugefügt. Nach dem Zentrifugieren wird die sedimentierte Hefe mit kaltem Puffer A zweimal gewaschen und wieder mit 10 ml desgleichen kalten Puffers vermischt. Diese Mischung wird 90 min lang in Eis aufbewahrt (während dieser Periode soll die

Hefesuspension alle 30 min gemischt werden, um Zellablagerungen zu vermeiden). Nach erneutem Zentrifugieren wird die sedimentierte Hefe wieder mit 3,0 ml Puffer (Raum-Temperatur) vermischt. (Falls die Fluoreszenzmessung nicht sofort durchgeführt werden kann, ist es möglich, die abzentrifugierte Hefe für ein bis zwei Stunden ohne Zusatz von Puffer in Eis aufzubewahren. Die erhaltene Mischung wird nun in eine Quarz-Küvette gegeben und die Intensität der Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzspektrometer gemessen.

Bestimmung

Die Kalibrierung für den intrazellulären pH-Wert wird erstellt, indem 5(6)-Carboxyfluorescein in auf unterschiedliche pH-Werte (im Bereich von pH 6,4 bis pH 4,8 in 0,2 pH-Schritten) eingestellten Puffer gelöst wird und wie bei der Hefeprobe die Emissionswellenlänge dieser Lösungen bei 518 nm in Abhängigkeit der Erregungswellenlängen 488 und 441 nm gemessen wird. Durch die logarithmische Auftragung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten als Funktion des pH-Wertes erhält man eine Kalibrierkurve, aus welcher der intrazelluläre pH-Wert abgelesen werden kann.

3.3.9 pH-Wert

Die pH-Messung erfolgte mit einem pH-Meter der Fa. WTW. Zur Vorbereitung wurden die Proben über einen Faltenfilter und Kieselgur entkohlensäuert und geklärt.

3.3.10 Extrakt und Alkoholgehalt

Die Bestimmung von Extrakt, Alkoholgehalt, Stammwürze und Vergärungsgrade der Proben erfolgt mit Hilfe eines SCABA Bieranalysators der Fa. Tecator nach der *Mebak*. Zur Vorbereitung wurden die Proben über einen Faltenfilter und Kieselgur entkohlensäuert und geklärt.

3.4 Herstellung von Bieren im Technikummaßstab

Da die Versuche im Realmaßstab zu aufwendig bzw. eine Gefährdung der gleichbleibenden Qualität der hergestellten Biere dargestellt hätten, wurden sie im Technikummaßstab in einer Menge von 10–50 l hergestellt.

Die Kleingärung wurde, falls nicht anders beschrieben, nach der Lehrstuhlmethode *Technologie der Brauerei I* in wassergekühlten 10-50 l ZKG's bei 10 °C durchgeführt. Die Würze (helle Würze aus 100 % Gerstenmalz) wurde über ein Venturirohr mit einer Belüftungsrate von ca. 15 l/hl belüftet und die Hefe wurde im Verhältnis von 100 g (Gewicht im Nasszustand) pro 10 Liter Würze angestellt. Der scheinbare Extrakt (E_s) wurde täglich während der Gärung unter Verwendung des Biegeschwingers kontrolliert. Nach Beendigung der Hauptgärung wurden die Jungbiere zur Reifung geschlaucht. Es erfolgte eine dreitägige Warmreifung bei 22 °C in *CORNELIUS*TM-Containern. Die Lagerung erfolgt 3 Tage bei 6 °C, anschließend 3 Tage bei 4 °C und 10 Tage bei 0 °C. Der Spundungsdruck wurde auf 1 bar eingestellt. Ausnahmen bilden die unter Variation der Gär- und Lagerungstemperatur hergestellten Biere. Die Änderungen der Parameter einzelner Versuchsreihen sind im Ergebnisteil dargestellt. Nach erfolgter Reifung wurden die Biere filtriert und abgefüllt. Hierbei kamen Filterschichten (Typ KS 50) der Firma Seitz zum Einsatz.

3.5 Gewinnung des Hefeextraktes

Hierzu wurde untergärige Erntehefe von Stamm *Saccharomyces carlsbergensis* Stamm 34 verwendet. Die Hefe wurde auf Kontaminationen hin überprüft, abzentrifugiert und durch Stehenlassen der Hefe im Kühlschrank bei 4 °C über 4 Wochen autolysiert. Nach der Autolyse wurde der Überstand abgezogen und zentrifugiert. Aus dem erhaltenen Überstand wurde die flüssige Phase entnommen und die Proteinasekonzentration bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Methoden

Die genaue Messbarkeit der während der Gärung, Reifung und Lagerung ablaufenden enzymatischen, vor allem der proteolytischen Aktivität, ist z. B. für die Vorhersagbarkeit der Schaumhaltigkeit eines Bieres von großer Bedeutung. Um die proteolytische Aktivität während der Bierbereitungsprozesse genauer untersuchen zu können, müssen der Analytik Verfahren zur Hand gegeben werden, mit der die proteolytische Aktivität ermittelbar ist. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die etablierten Nachweismethoden bezüglich ihrer Empfindlichkeiten verglichen und der neu entwickelten Methode gegenübergestellt. Mittels einer Kalibrierung der Methoden durch Vorlage definierter Mengen an Proteinase A, wurde die Nachweisgrenze und der Absolutfehler bestimmt.

4.1.1 Azocoll Methode

In der folgenden Tabelle sind die ermittelten Messergebnisse zur Bestimmung der Kalibriergerade für die Azocoll-Methode nach *Reicheneder* dargestellt. Die Konzentrationen der mit Proteinase A versetzten Bierproben sind auf einen Gehalt von 1000 bis 25000 ppb eingestellt worden. Dieser Bereich erlaubte eine photometrische Messung der Spaltprodukte des Azocollabbaus durch zugesetzte Proteinase A. Die negativen Extinktionen im unteren Konzentrationsbereich (1000 ppb) ergaben sich aus der Differenz des Probenleerwertes zur Probe. Sie sind messtechnisch bedingt, da bei sehr geringen Extinktionen laut *Kortüm*⁸¹ ein Fehler von $> 1\%$ vorliegt. Weiterhin hat in diesem Bereich ein zu geringer enzymatischer Umsatz des vorgelegten Proteinasesubstrates stattgefunden.

⁸¹ Kortüm, G. (1962): Kolorimetrie, Photometrie und Spektroskopie, Anleitung für die chemische Laboratoriumspraxis, Springer-Verlag, S. 249

Dieser geringe Substratumsatz ist auch bei allen anderen Nachweisverfahren festzustellen und ist auf eine zu kurze Inkubationszeit und auf einen Mangel an Substrat zurückzuführen.

Tabelle 9: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung der Azocoll-Methode. Angabe in rel. Extinktion

Konz. Prot. A [ppb]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte
1000	-0,004	-0,010	-0,008	-0,007
5000	0,079	0,077	0,070	0,075
10000	0,178	0,182	0,193	0,216
15000	0,270	0,266	0,271	0,269
25000	0,460	0,452	0,445	0,452

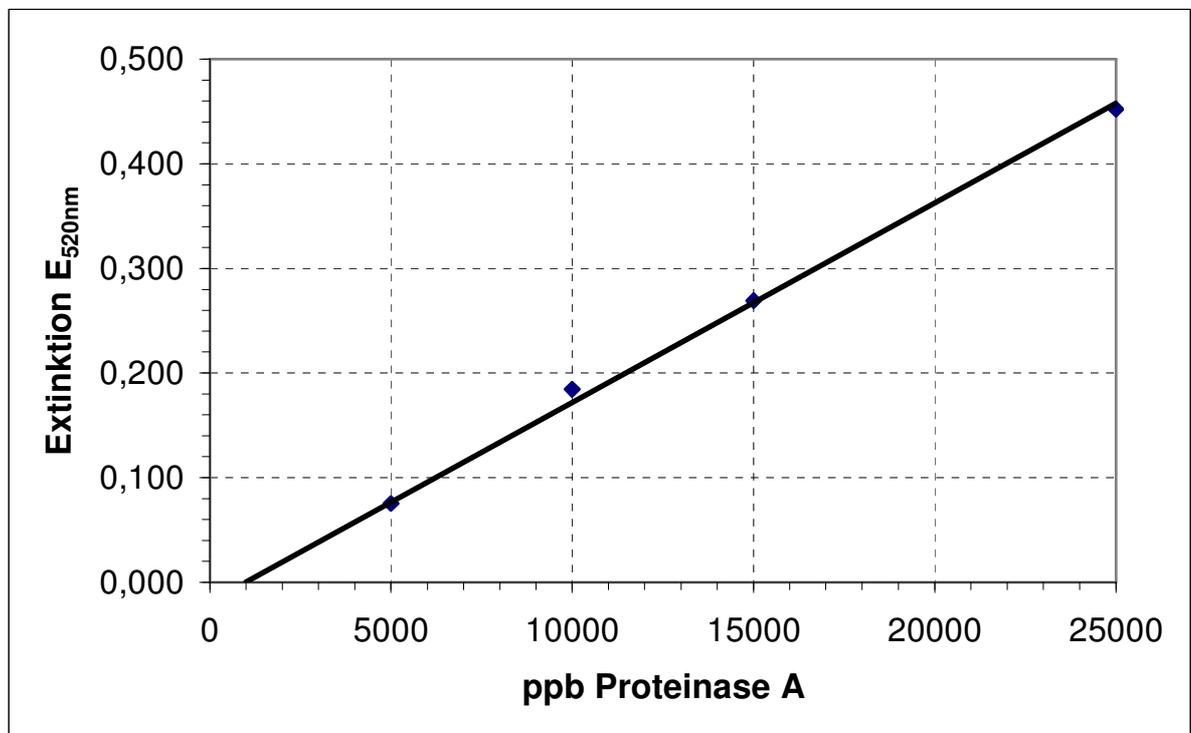


Abb. 5: Kalibrierung zur Azocoll-Methode

Die Kalibrierung der Azocoll-Methode nach *Reicheneder* zur Bestimmung der Nachweisgrenze ist der vorangegangenen Abbildung zu entnehmen. Durch Ermittlung der Trendline (Abb. 5) ergab sich eine Nachweisgrenze von 1200 ppb Proteinase A in Bier und ein Absolutfehler von ± 631 ppb.

4.1.2 Azocasein Methode

In der folgenden Tabelle sind die ermittelten Messergebnisse zur Bestimmung der Kalibriergerade für die Azocasein-Methode nach *Reicheneder* dargestellt. Die Konzentrationen der mit Proteinase A versetzten Bierproben sind auf einen Gehalt von 100 bis 10000 ppb eingestellt worden. Dieser Bereich erlaubte eine photometrische Messung der Spaltprodukte des Azocaseinabbaus durch Proteinase A. Wie auch bei der Azocoll-Methode ergeben sich negative Werte für die Konzentrationsbestimmung im unteren Messbereich (100 ppb). Diese sind ebenfalls auf die Messtechnik, die Substratkonzentration und die Inkubationszeit zurückzuführen.

Tabelle 10: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung zur Azocasein-Methode, Angabe in rel. Extinktion

Konz. Prot. A [ppb]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte
100	-0,016	-0,017	-0,014	-0,016
1000	0,037	0,045	0,033	0,038
2500	0,048	0,055	0,053	0,052
5000	0,110	0,108	0,099	0,106
10000	0,220	0,217	0,211	0,216

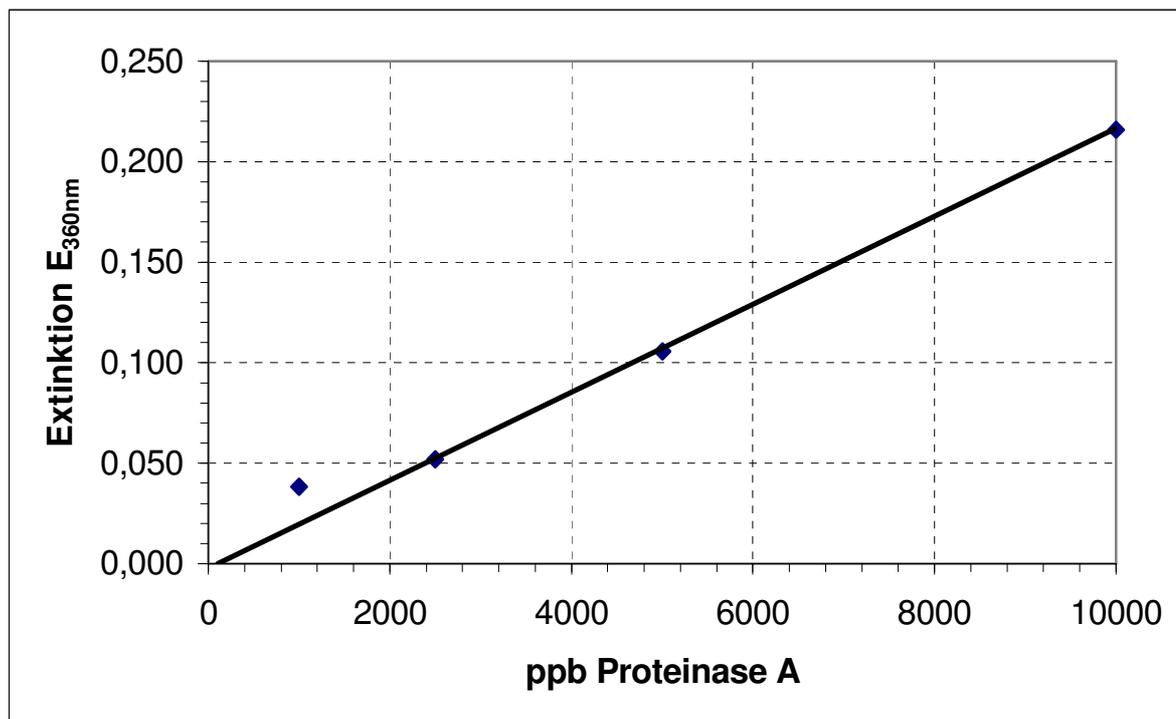


Abb. 6: Kalibrierung zur Azocasein-Methode

In Abbildung 6 ist die Kalibrierung der Azocasein-Methode nach *Reicheneder* dargestellt. Aus den Bestimmungen ergab sich die dargestellte Trendlinie. Die Nachweisgrenze liegt für diese Methode bei 220 ppb Proteinase A in Bier und bei einem Absolutfehler von ± 76 ppb. Die Azocasein-Methode zeigte eine 5-mal höhere Empfindlichkeit gegenüber der Azocoll-Methode.

4.1.3 MCA-Methode

In Tabelle 11 sind die ermittelten Messergebnisse zur Bestimmung der Kalibriergerade für die MCA-Methode nach *Oka* dargestellt. Die Konzentrationen der mit Proteinase A versetzten Bierproben sind auf einen Gehalt von 1 bis 60 ppb eingestellt worden. Dieser Bereich erlaubte eine photometrische Messung der Spaltprodukte des MCA-Substrates durch Proteinase A.

Tabelle 11: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung zur MCA-Methode (Verdünnung 1:10), Angabe in rel. Fluoreszenz

Konz. Prot. A [ppb]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte
1	-3,40	-3,60	-5,70	-4,30
10	3,60	3,60	3,80	3,67
25	11,50	14,90	12,40	12,93
40	22,00	23,40	20,40	21,93
60	34,85	40,00	32,50	35,78

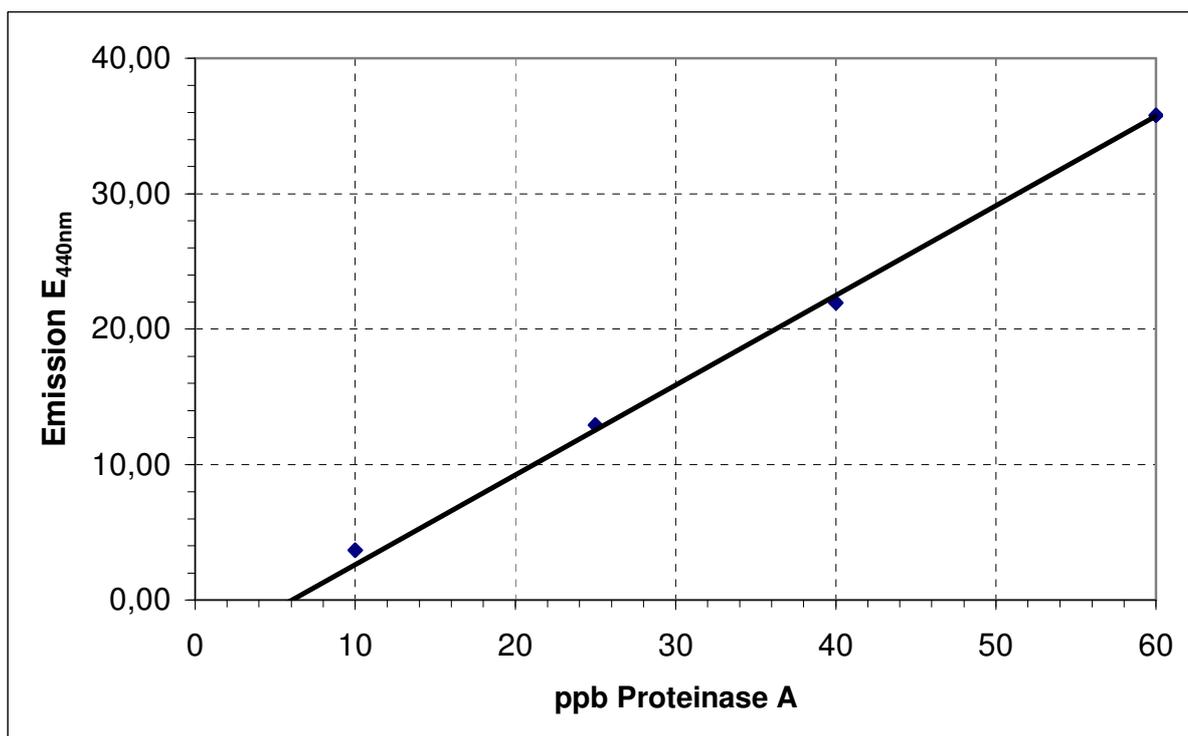


Abb. 7: Kalibrierung zur MCA-Methode

Wie auch bei der Azocoll-Methode und Azocasein-Methode ergeben sich negative Werte für die Konzentrationsbestimmung im unteren Messbereich (1 ppb). Diese

sind ebenfalls auf die Messtechnik, die Substratkonzentration und die Inkubationszeit zurückzuführen.

Die Kalibrierung der MCA-Methode nach *Oka* ist der Abbildung 7 zu entnehmen. Sie ergab eine Nachweisgrenze von 8 ppb Proteinase A in Bier und einen Absolutfehler von $\pm 3,3$ ppb. Der Vergleich mit der Azocoll-Methode zur MCA-Methode zeigt eine 150-fach höhere Empfindlichkeit der MCA-Methode.

4.1.4 Casein, Resorufin-markiert Methode nach *Twining/Boehringer*

Die ermittelten Messergebnisse zur Bestimmung der Kalibrierung für die Casein, Resorufin-markiert Methode nach *Twining/Boehringer* sind in der folgenden Tabelle als relative Extinktionen des Probenleerwertes zum Probenwert dargestellt. Die Konzentrationen der mit Proteinase A versetzten Bierproben sind auf einen Gehalt von 50 bis 1000 ppb eingestellt worden. Dieser Bereich erlaubte eine photometrische Messung der Spaltprodukte des Casein, Resorufin-markiert-Substrates durch Proteinase A.

Tabelle 12: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung zur Casein, Resorufin-markiert Methode

Konz. Prot. A [ppb]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte
50	-0,012	-0,009	0,001	-0,007
100	0,030	0,041	0,031	0,034
250	0,050	0,049	0,053	0,051
500	0,096	0,095	0,095	0,095
750	0,112	0,115	0,114	0,114
1000	0,170	0,173	0,172	0,172

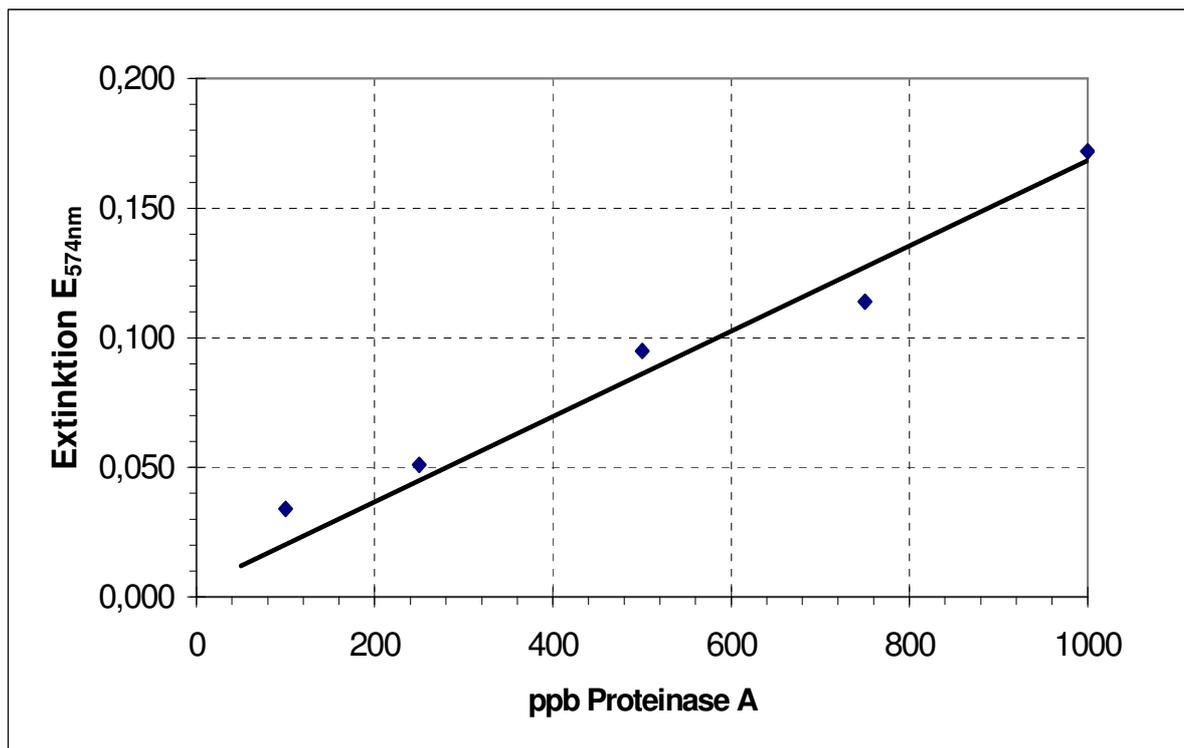


Abb. 8: Kalibrierung zur Casein, Resorufin-markiert Methode nach *Twining/Boehringer*

Wie auch bei der Azocoll-Methode, der Azocasein-Methode und MCA-Methode ergeben sich negative Werte für die Konzentrationsbestimmung im unteren Messbereich bei 50 ppb (Tabelle 12). Diese sind, wie schon zuvor genannt, auf die Messtechnik, die Substratkonzentration und die Inkubationszeit zurückzuführen. Die Kalibrierung der Casein, Resorufin-markiert Methode nach *Twining/Boehringer* (Abb. 8) ergab eine Nachweisgrenze von 112 ppb und einen Absolutfehler der Messwerte von ± 25 ppb.

4.1.5 Angepasste Casein, Resorufin-markiert Methode

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die von *Twining/Boehringer* beschriebene Methode für den Einsatz in Bier speziell angepasst. Casein, Resorufin-markiert als Substrat zeigte sich für die Anwendung in Bier als sehr geeignet. Die Vorteile liegen hierbei in der:

- einfachen Handhabung,
- geringen Nachweisgrenze,
- einfachen Durchführbarkeit,
- guten Reproduzierbarkeit der Messergebnisse,
- Einsatzmöglichkeit in jedem Brauereiroutinelabor,
- kurzen Analysenzeiten und im geringen Arbeitsaufwand.

Beschreibung der Methode:

In Gegensatz zur ursprünglichen Methode nach *Twining/Boehringer* wurde auf den Einsatz von Inkubationspuffer verzichtet. Dieser hat einen ähnlichen Ionengehalt wie Bier und ist somit entbehrlich, zum anderen verdünnt er die zu bestimmenden Enzyme. Der pH-Wert der Probelösung wird direkt auf pH 6,0 eingestellt, die Inkubationstemperatur wurde auf 25 °C gesenkt. Die Pufferzusammensetzungen bleiben gleich. Für die Extinktionsmessung der Spaltprodukte zeigte sich eine Wellenlänge von 578 nm und ein pH-Wert von 6,0 der Probelösung als am geeignetsten. Ein Belassen des pH-Wertes der Messlösung auf dem pH-Wert des Bieres (pH \approx 4,5) zeigt hierbei, dass das pH-Optimum der Proteinase A verlassen wurde und dadurch zu wenig Substrat in messbare Spaltprodukte umgesetzt wird. Weiterhin ist die höhere Extinktion bei einem Inkubations-pH von 6,0 ein Beweis, dass der größte Anteil der proteolytischen Aktivität von der Proteinase A ausgehen muss, da ihr pH-Optimum zur Spaltung von Casein bei einem pH von 6,0 liegt⁸². Siehe hierzu Abbildung 9.

⁸² N.N. (1998): Enzyme Handbook, Springer Verlag, Band 13

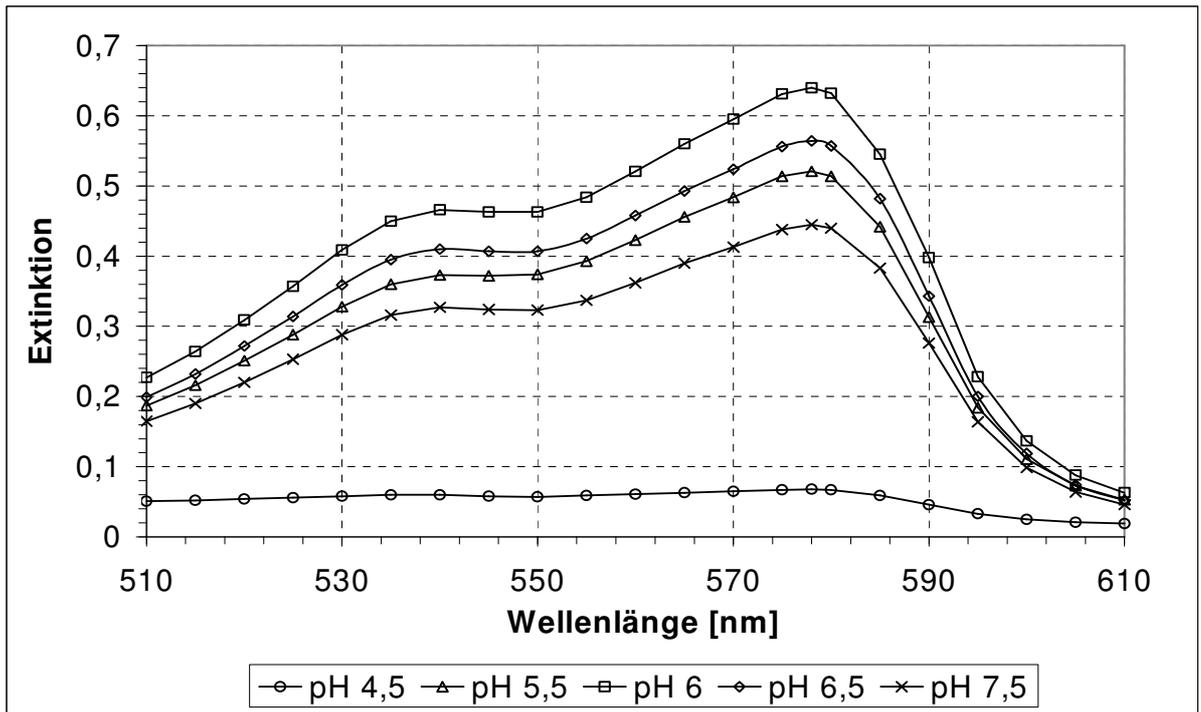


Abb. 9: Abhängigkeit der Extinktionen von unterschiedlichem Inkubations-pH und Wellenlängen in Bier mit hoher proteolytischer Aktivität bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C

Aus der modifizierten Bestimmungsmethode ergaben sich die in Tabelle 13 angeführten Werte.

Tabelle 13: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung zur Casein, Resorufin-markiert Methode

Konz. Prot. A [ppb]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwerte
0,025	0,000	-0,001	-0,003	-0,001
0,05	0,004	0,004	0,003	0,004
0,2	0,015	0,016	0,018	0,016
0,6	0,039	0,038	0,038	0,038
2	0,101	0,100	0,103	0,101

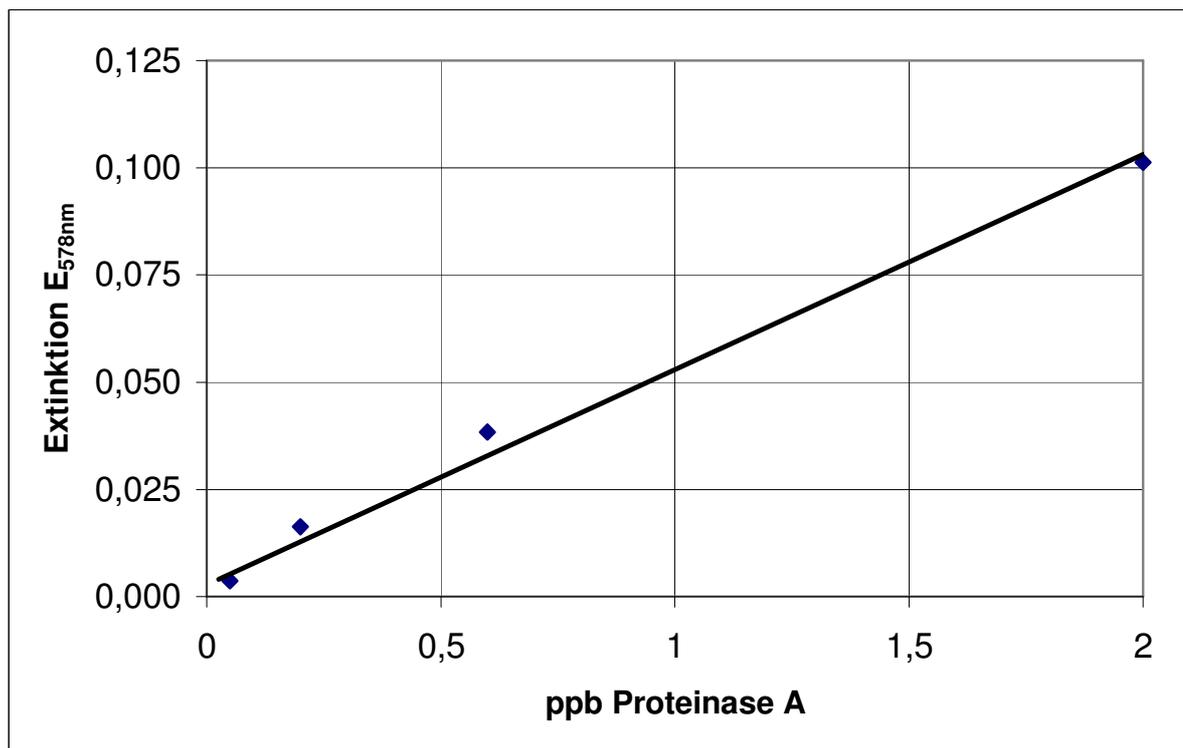


Abb. 10: Kalibrierung zur angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode

Durch die Anpassung der Bestimmungsparameter ist es gelungen, die Nachweisgrenzen auf 0,04 ppb und den Absolutfehler auf $\pm 0,045$ ppb zu senken. Da Aktivitätswerte von unter 10 ppb Proteinase A nur in kurzzeiterhitzten bzw. pasteurisierten Bieren zu finden sind und bei der Schaumproblematik keine bedeutende Rolle spielen, genügt es, eine Kalibrierung für Gehalte zwischen 10 bis 100 ppb zu erstellen. Ein Beispiel ist der Abbildung 11 zu entnehmen.

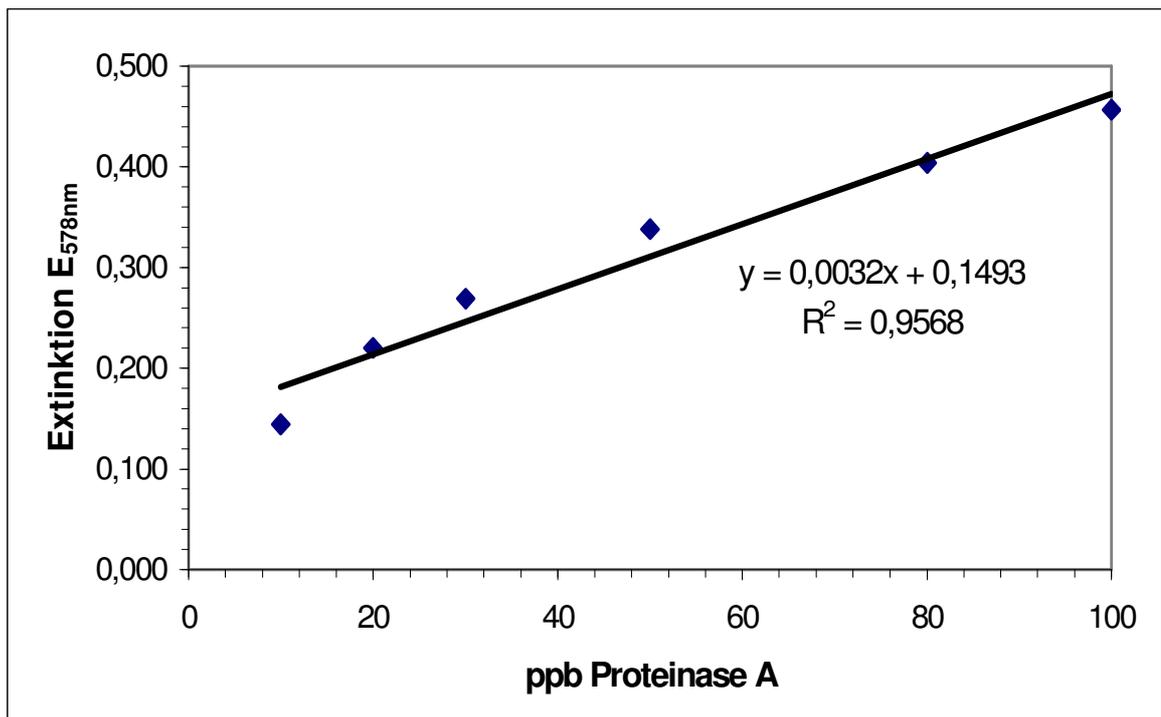


Abb. 11: Beispiel einer Kalibrierung zur angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode zwischen 10 bis 100 ppb Proteinase A mit linearer Kalibriergeraden

In Abbildung 11 ist ein Beispiel zur Kalibrierung der angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode zwischen 10 bis 100 ppb für Proteinase A in Bier dargestellt. Die Kalibriergerade ist als lineare Funktion dargestellt, um eine einfachere Rückrechnung der in Probenbieren gemessenen Extinktionen in eine Konzentration durchführen zu können. Mathematisch gesehen ist eine logarithmische Kalibrierung exakter, was sich wiederholt feststellen ließ (Abb. 12). Die lineare Funktion ist zur Bestimmung ausreichend genau. Der abflachende Verlauf der Kurve bei höheren Konzentrationen ist auf einen Mangel an Substrat und eine Selbstverdauung der Enzyme zurückzuführen. Die proteolytischen Enzyme nutzen sich hierbei gegenseitig als Substrat und es kommt bei der Probeninkubation zu einer scheinbaren Verringerung der Proteinasekonzentration.

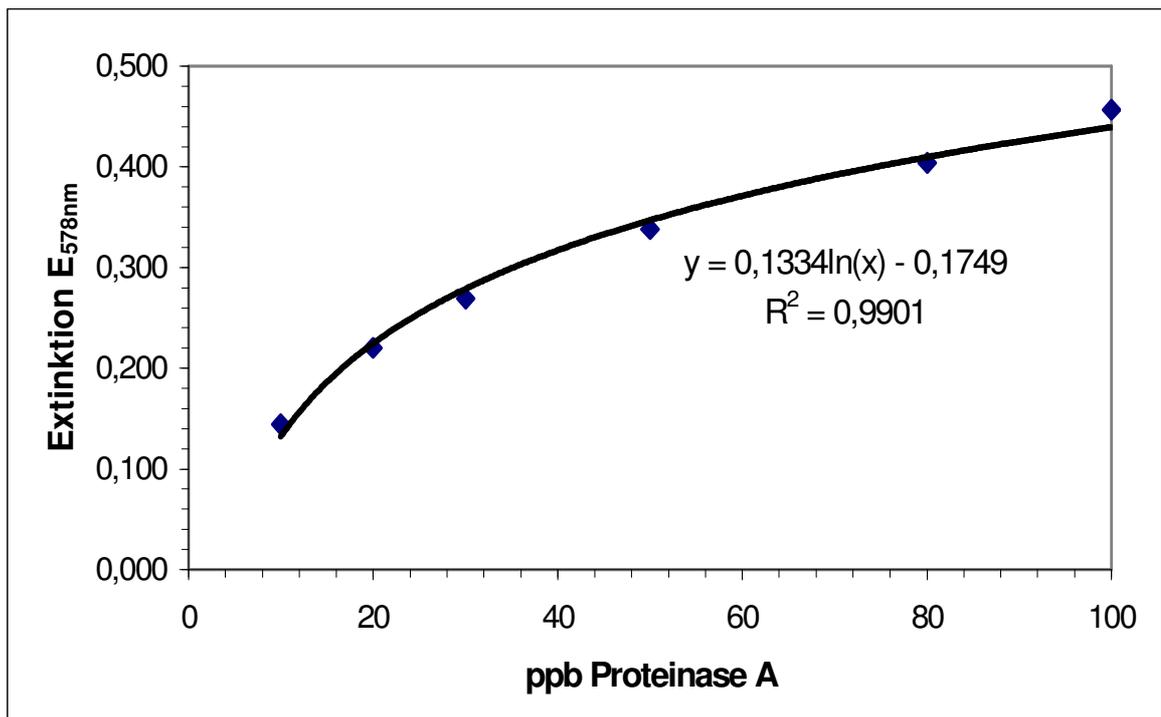


Abb. 12: Beispiel einer Kalibrierung zur angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode zwischen 10 bis 100 ppb Proteinase A mit logarithmischer Kalibriergeraden

Zusammenfassung:

Da der größte Anteil der Proteinasekonzentration in einem Bereich von 10 bis 100 ppb liegt, kommt nur eine Bestimmung mittels MCA nach *Oka* oder die angepasste Casein, Resorufin-markiert Methode zur Bestimmung in Frage.

Die proteolytische Aktivität eines Bieres muss hauptsächlich durch Proteinase A verursacht werden, da die beste Substratumsetzung beim pH-Optimum von Proteinase A stattfindet. Die von *Reicheneder* und *Narziß*⁸³ angewandte Bestimmungsmethode mit Azocoll wurde schon von *Nielsen*⁸⁴ als nicht empfehlenswert eingestuft.

Eine weitere, ebenfalls von *Reicheneder* und *Narziß* entwickelte Methode ist der Einsatz von Azocasein als Proteinase-Substrat, dessen Empfindlichkeit 30mal höher als die des Azocolls angegeben wird. Diese Methode wurde von *Oka*⁸⁵ im Rahmen einer Forschungsarbeit am *Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I* hinsichtlich Empfindlichkeit, Genauigkeit, Analysenzeitdauer, Aufwand und Leistungskosten untersucht. Dabei stellte sich vor allem die Empfindlichkeit als nicht ausreichend dar. Die MCA-Methode wurde gegenüber der Azocaseinbestimmung als 10mal empfindlicher beschrieben. Es finden sich in der Literatur aber auch Hinweise, dass Bier für die Fluoreszenzmessung nicht geeignet ist, da es fluoreszierende Substanzen wie Aminosäuren und Melanoidine enthält, die zu einer hohen Eigenfluoreszenz in der Nullprobe führen können und deshalb eine präzise Messung unmöglich machen sollen⁸⁶.

Nicht in Betracht kam eine Bestimmung mittels Tritium-markiertem, säuredenaturiertem Hämoglobin, die laut *Dreyer*⁸⁷ eine Messgenauigkeit von 10 U Pepsin/l erlaubt. Diese Methode wird von *Oka* als weniger exakt im Vergleich zur

⁸³ Narziß, L., Reicheneder, E. (1987): Untersuchungen über die Schaumschädigung des Bieres durch Hefeproteinase, *Brauwelt*, 21, S. 956-962

⁸⁴ Nielsen, H., Hoybye-Hansen, I. (1988): Beeinträchtigung des Bierschaums durch Enzyme der Hefe, *Brauwelt*, 3, S. 43

⁸⁵ Oka, K. (1994): Vergleich der zwei Bestimmungsmethoden der Proteinaseaktivität aus Hefe (MCA oder Azocasein als Substrat), interne Mitteilung

⁸⁶ Yokoi, S., et al (1996): A fluorometric Assay for Proteinase A from Yeast, *Analytical Biochemistry*, 134, S. 211

⁸⁷ Dreyer, T., et al (1983): Yeast Proteinase in Beer, *Carlsberg Research Communication*, 48, S. 249

MCA-Methode beschrieben. Darüber hinaus muss mit radioaktiven Stoffen gearbeitet werden, was in der Praxis gewisse Probleme mit sich bringt.

In Tabelle 14 ist ein Vergleich der Methoden hinsichtlich Nachweisgrenze und Absolutfehler der Nachweisgrenze dargestellt.

Tabelle14: Vergleich der Nachweisgrenzen und Absolutfehlern der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Proteinase A

Methode:	Nachweisgrenze ⁸⁸ [ppb]:	Absolutfehler ⁸⁹ [ppb]:
<i>Azocoll</i>	1200	± 631
<i>Azocasein</i>	220	± 76
<i>MCA</i>	8	± 3,3
<i>Casein,</i> <i>Resorufin-markiert</i>	112	± 25
<i>angepasste Casein,</i> <i>Resorufin-markiert</i>	0,04	± 0,045

⁸⁸ Doerffel, K. (1987): Statistik in der analytischen Chemie, VCH Verlagsgemeinschaft, S. 91

⁸⁹ Doerffel, K. (1987): Statistik in der analytischen Chemie, VCH Verlagsgemeinschaft, S. 15

4.2 Proteolytische Aktivität in Praxisbieren

Durch die Entwicklung des angepassten Analysenverfahrens war es möglich, die proteolytische Aktivität von unterschiedlichen Praxisbieren zu ermitteln. Zu diesen Untersuchungen wurden Biere herangezogen, welche ohne den Einsatz eines Flaschenpasteurs bzw. Kurzzeiterhitzung zur Abfüllung kommen. Die Biere wurden direkt nach der Abfüllung auf ihren Gehalt an Proteinase analysiert. In allen untersuchten Bieren wurden Proteinaseaktivitäten nachgewiesen.

Tabelle 15: Anteil der in unpasteurisierten Praxisbieren vorkommenden proteolytischen Aktivität in ppb Proteinase A

ppb Proteinase A	1-10	10-100	100-1000	1000-10000
Anzahl der Biere	4	62	54	25
% der Biere	3	43	37	17

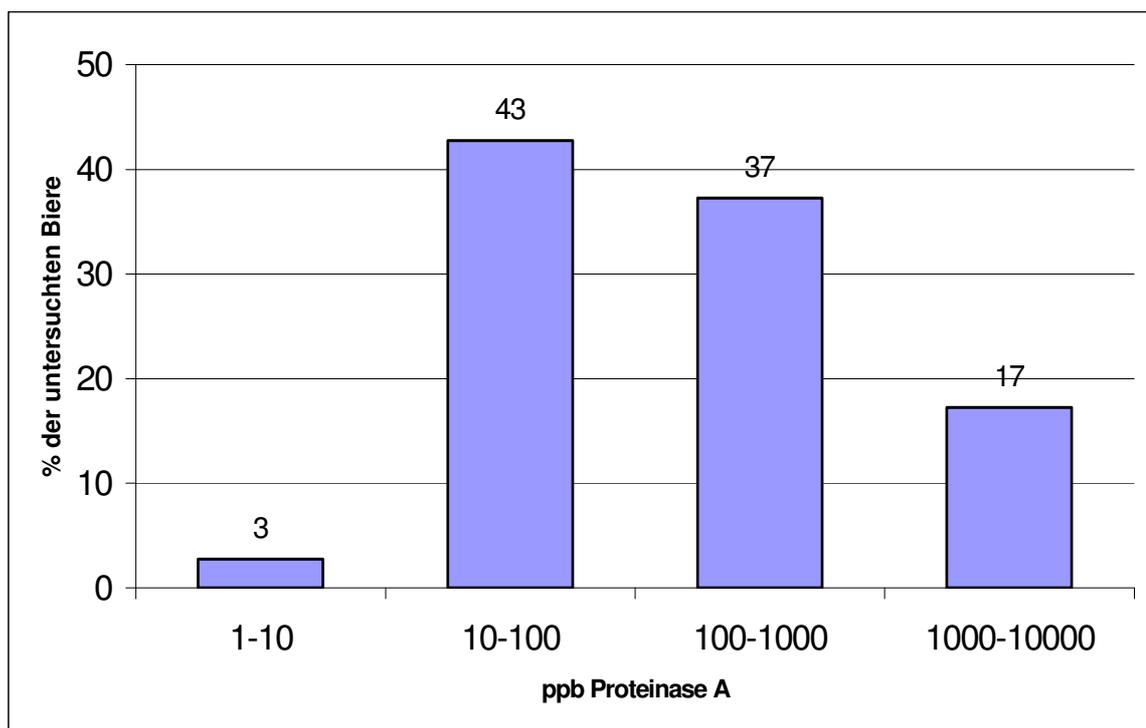


Abb. 13: Prozentuale Verteilung der Proteinasegehalte in ppb Proteinase A in untersuchten Praxisbieren

Abbildung 13 zeigt, dass sehr wenige Biere einen Proteinasegehalt im Bereich von 1-10 ppb Proteinase A aufwiesen. Der größte Anteil mit 43 % der

untersuchten Biere zeigte einen Proteinasengehalt von 10-100 ppb Proteinase A. Den zweitgrößten Anteil (37 %) der Biere macht der Bereich von 100–1000 ppb Proteinase A aus. Biere mit einem Gehalt von 1000–10000 ppb wurden ebenfalls nur selten ermittelt, wobei es sich meist um Hefeweizenbiere handelte, deren enthaltene Hefe einen Anteil von weit über 10 % toter Zellen aufwies. Bockbiere, welche nach traditionellen Verfahren hergestellt werden und lange auf einem Teil der Hefe im Lagerkeller liegen zeigten ebenfalls diese hohen Konzentrationen. Die ermittelten Proteinasengehalte verdeutlichen, dass für die Bestimmung der Proteinasengehalte in Bier eine Methode mit einer Nachweisgrenze von mindestens 10 ppb zur Bestimmung herangezogen werden muss. Vor allem untergärige Biere zeigten bei den Untersuchungen Proteinasengehalte in diesem Bereich. Auch die Bestimmung der während der Gärung auftretenden Proteinasengehalte, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, liegen meist in einer Spanne von 10 bis 100 ppb.

4.3 Bierbereitungstechnologie und Proteinasenexkretion

4.3.1 Hefeaufbewahrung

Material: 10 l Glaskolben
 10 l *CORNELIUS*TM Container
 untergärige Hefestämme
Saccharomyces carlsbergensis 34/78 (im Folgenden: Stamm 1)
Saccharomyces carlsbergensis A34 (im Folgenden: Stamm 2)

In dieser Versuchsreihe wurden mit zwei untergärigen Erntehefen verschiedener Stämme Lagerversuche unternommen. Untersucht wurde, inwieweit sich der Lagerdruck, die Lagertemperatur und das Lagermedium, Bier oder Wasser, auf die Proteinasenexkretion und den Anteil toter Zellen auf die Hefe auswirken. Hierzu wurde die Proteinasenkonzentration, der Anteil toter Zellen, der pH-Wert im Überstand und der Anteil toter Zellen über die Lagerdauer der Hefen beobachtet. Beide Erntehefen wurden im gleichen physiologischem Zustand angesetzt, wie aus Tabelle 16 zu ersehen ist.

Tabelle 16: Analysenwerte des Ausgangszustandes der Hefestämme 1 und 2

	pH-Wert	tote Zellen [%]	Proteinase A [ppb]	HZZ [10^6 /ml]
Stamm 1	5,14	5,0	<50	272
Stamm 2	5,13	5,0	<50	277

In Abbildung 14 ist der Anstieg der Proteinasenkonzentrationen der beiden Hefestämme bei Normaldruck und einer Variation der Lagertemperatur von 0, 4 bzw. 11 °C in Wasser dargestellt.

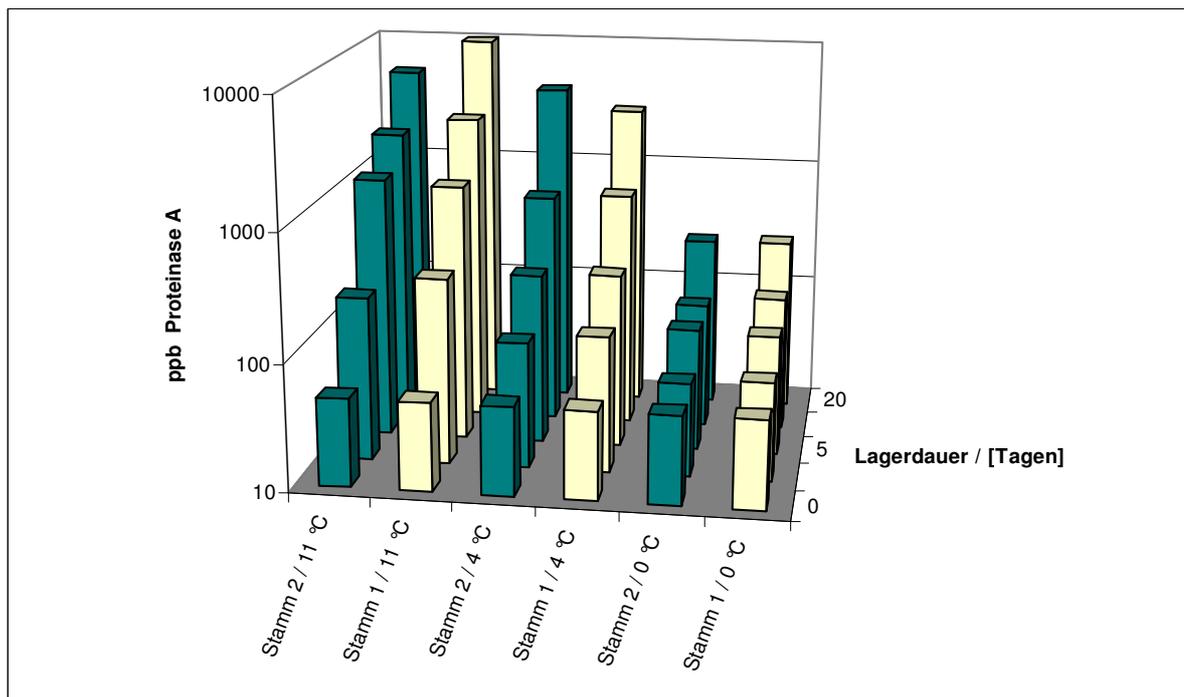


Abb. 14: Anstieg der Proteinasekonzentrationen, beider Hefestämme bei Normaldruck und einer Lagertemperatur von 0, 4 bzw. 11 °C in Wasser über die Lagerdauer

Es zeigte sich, dass ein Ansteigen der Proteinasekonzentration von den verwendeten Hefestämmen unabhängig, jedoch die Lagertemperatur von großer Bedeutung ist. In den ersten 5 Tagen stieg bei einer Lagertemperatur von 11 °C die Proteinasekonzentration um ein 3-4faches gegenüber einer Lagerung der Erntehefen bei 4 °C. Es zeigt sich, dass eine Hefeaufbewahrung bei 0 °C über die ersten Tage am unproblematischsten ist, da die Proteinaseaktivität nicht so stark ansteigt. Narziß⁹⁰ sieht eine Maximaltemperatur von 4 °C für eine Hefelagerung über 4 Tage noch als unkritisch an. Höhere Lagertemperaturen sind für die Hefe ungeeignet, es sei denn, die Hefe wird sofort wieder zum Anstellen verwendet. Die pH-Werte der untersuchten Proben stiegen ebenfalls über die Lagerdauer, wenn auch nur langsam, auf Werte von über pH 5,5 an.

⁹⁰ Narziß, L. (1995): Abriß der Bier Bierbrauerei, Enke Verlag Stuttgart, S. 213

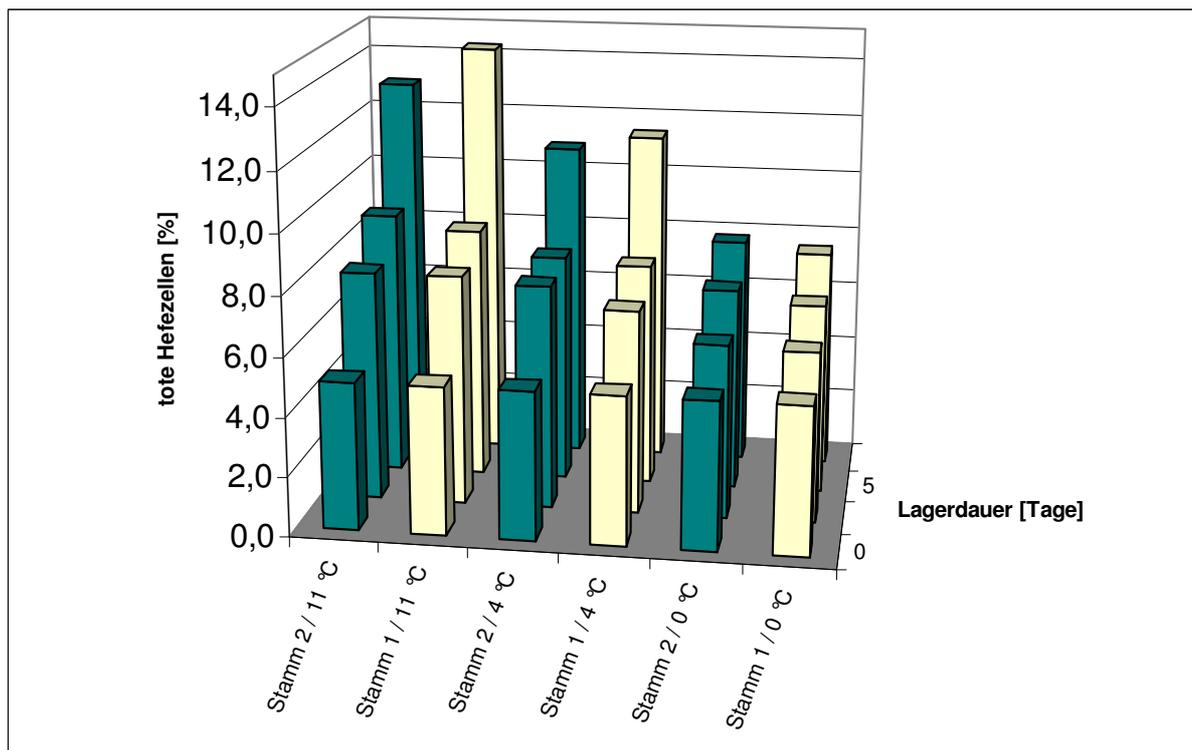


Abb. 15: Anstieg des Anteils toter Hefezellen, beider Hefestämme bei Normaldruck und einer Lagertemperatur von 0, 4 bzw. 11 °C in Wasser über die Lagerdauer

Abbildung 15 zeigt, dass der Anteil toter Zellen im gleichen Versuchsansatz bei höheren Lagertemperaturen stärker ansteigt. Die stärkere Sterberate der Hefezellen geht mit einer erhöhten Proteinaseausschüttung einher.

Das gleiche Verhalten zeigten auch die Hefen, welche in Bier als Überstand gelagert wurden. Auch eine Lagerung unter Druck bremste das vermehrte Absterben der Hefezellen bei höheren Temperaturen nicht.

Bei der Unterscheidung der Lagermedien Wasser oder Bier zeigte sich, dass das Lagermedium keinen, die Lagertemperatur jedoch einen Einfluss auf die Proteinaseexkretion hat. Auch eine Erhöhung des Lagerungsdruckes auf 2 bar bei höherer Lagertemperatur spielte über eine lange Lagerzeit keine Rolle, nur bei kurzen Lagerzeiten wurde die Proteinaseexkretion etwas gebremst.

Hieraus ergab sich ein Zusammenhang zwischen einem Ansteigen der Proteinasekonzentration und einem Abnehmen der Hefevitalität über die Lagerdauer bei erhöhten Lagertemperaturen (Abb. 16).

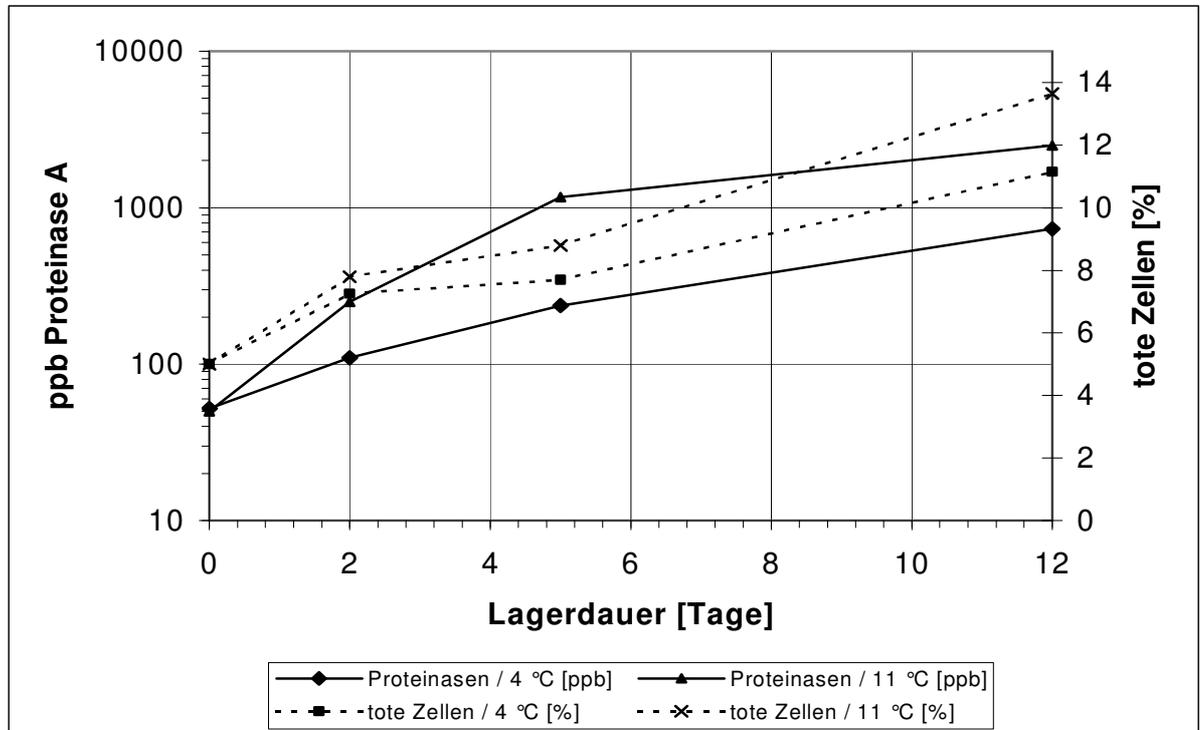


Abb. 16: Veränderung des Proteinasegehalts im Überstand im Vergleich zur Anzahl toter Zellen über die Lagerdauer bei 4 bzw. 11 °C aus dem Durchschnitt beider Hefestämme

Wie Abbildung 16 zeigt, kam während der Lagerung Hefe zu einer linearen Zunahme toter Zellen und zu einer logarithmischen Zunahme der Proteinasekonzentration. Dieses Ansteigen wurde auch bei den Hefen beobachtet, welche bei einer Temperatur von 0 °C gelagert wurden, es verlief aber gebremst.

4.3.2 Intrazellulärer pH-Wert

In einer Versuchsreihe, die in Zusammenarbeit mit *Imai* durchgeführt wurde, wurde die Beziehung zwischen den ICP-Werten und der Proteinasenausschüttung der Hefe untersucht. Hierzu wurden Biere im Kleinmaßstab mit Hefen unterschiedlicher ICP-Werte vergoren und die Biere auf ihre Schaumhaltigkeit nach *Ross & Clark* und Proteinasenkonzentration hin untersucht.

Die Biere zeigten eine deutliche Abnahme der Schaumhaltigkeit bei schlechteren ICP-Werten (Abbildung 17).

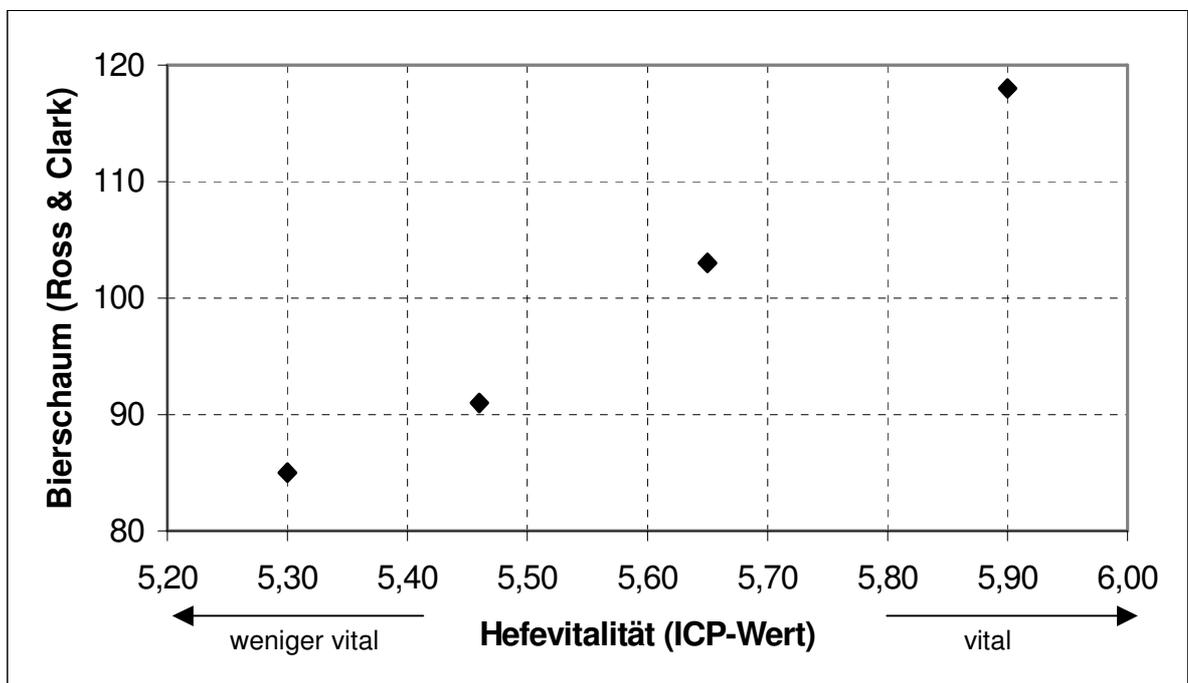


Abb. 17: Beziehung zwischen Schaumhaltigkeit und Hefevitalität

Ebenso zeigte sich ein Zusammenhang zwischen steigender Proteinasenaktivität der Biere und der Verwendung von Hefe geringerer Vitalität.

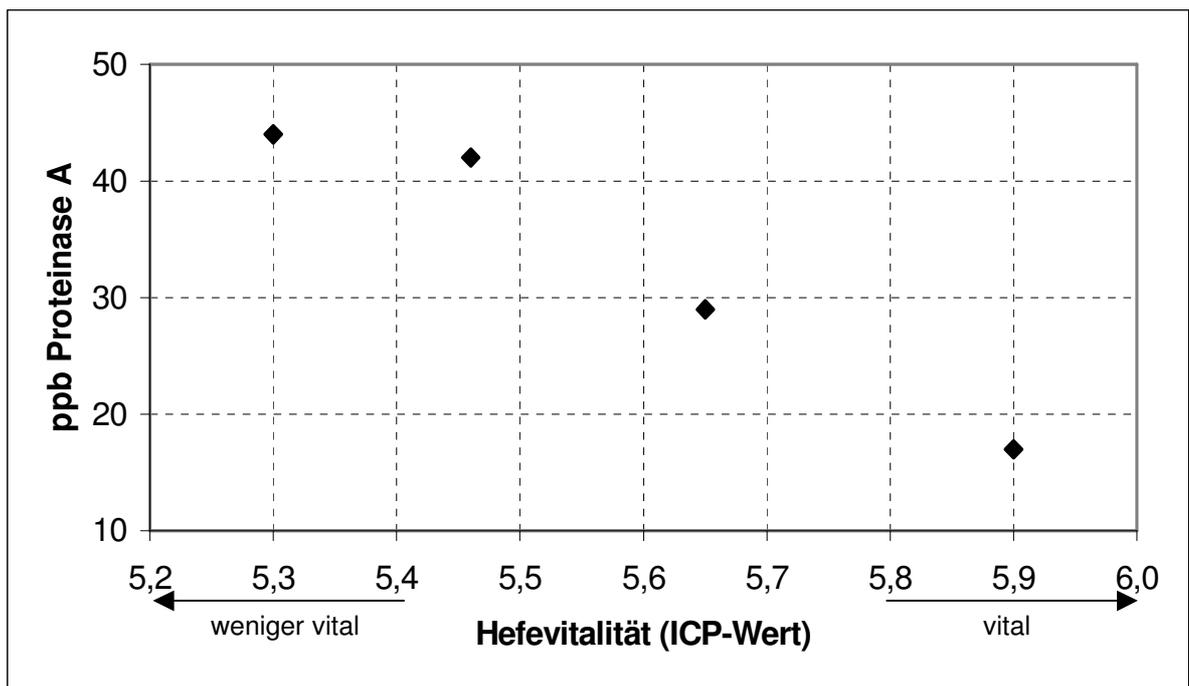


Abb. 18: Beziehung zwischen Proteinaseaktivität und der Hefevitalität

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Hefevitalität, des Gehaltes an Proteinase und Schaumstabilität besteht. Biere, die unter Verwendung wenig vitaler Hefe hergestellt wurden, zeigten eine höhere proteolytische Aktivität und eine geringere Schaumhaltbarkeit.

4.3.3 Die Variation des Gärverfahrens

Um den Einfluss des Gärverfahrens auf die Proteinaseexkretion während der Gärung zu verfolgen, wurden Kleingärungen im Pilotmaßstab in der Technikumsbrauerei des Lehrstuhls durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Gärungs- und Reifungsparameter (unter Variation jeweils eines Parameters miteinander) untersucht:

1. Hefegabe
5, 10 und $15 \cdot 10^6$ Zellen / ml *Saccharomyces carlsbergensis A34*
2. Hefevitalität
40, 77 und 96 % lebende Zellen
3. Gärtemperatur
8, 10, 12 °C
4. Reifungstemperatur
kalt: 3 Tage bei 6 °C, 3 Tage 4 °C, 10 Tage 0 °C
warm: 3 Tage 22 °C

Während der Versuche wurden Jungbierproben auf den Gehalt an Proteinase jeweils nach abgeschlossener Gärung, Reifung und Lagerung untersucht. Weiterhin wurden die hergestellten Biere auf ihre Schaumhaltbarkeit nach der Abfüllung und nach 3 Monaten Lagerung bei 20 °C untersucht.

Die Anstellhefezellzahl

Es wurden 3 gleiche Würzen mit jeweils 5, 10 bzw. $15 \cdot 10^6$ Zellen / ml mit gleicher Hefe (96 % lebende Zellen) angestellt. Weiterhin blieb die Gärtemperatur bei 10 °C und die Reifung 3 Tage bei 22 °C konstant. Die Jungbiere wurden bis auf 3,5 % E_s vergoren, nach der Reifung 3 Tage bei 4 °C und abschließend 10 Tage bei 0 °C gelagert. Die aus den Versuchsparametern resultierenden Proben wurden jeweils am Ende der Gärung, Reifung und Lagerung genommen. In Abbildung 19 ist die proteolytische Aktivität, bezogen auf ppb Proteinase A, nach Ende Gärung, Reifung und Lagerung über die Variation der Anstellhefezellzahl dargestellt.

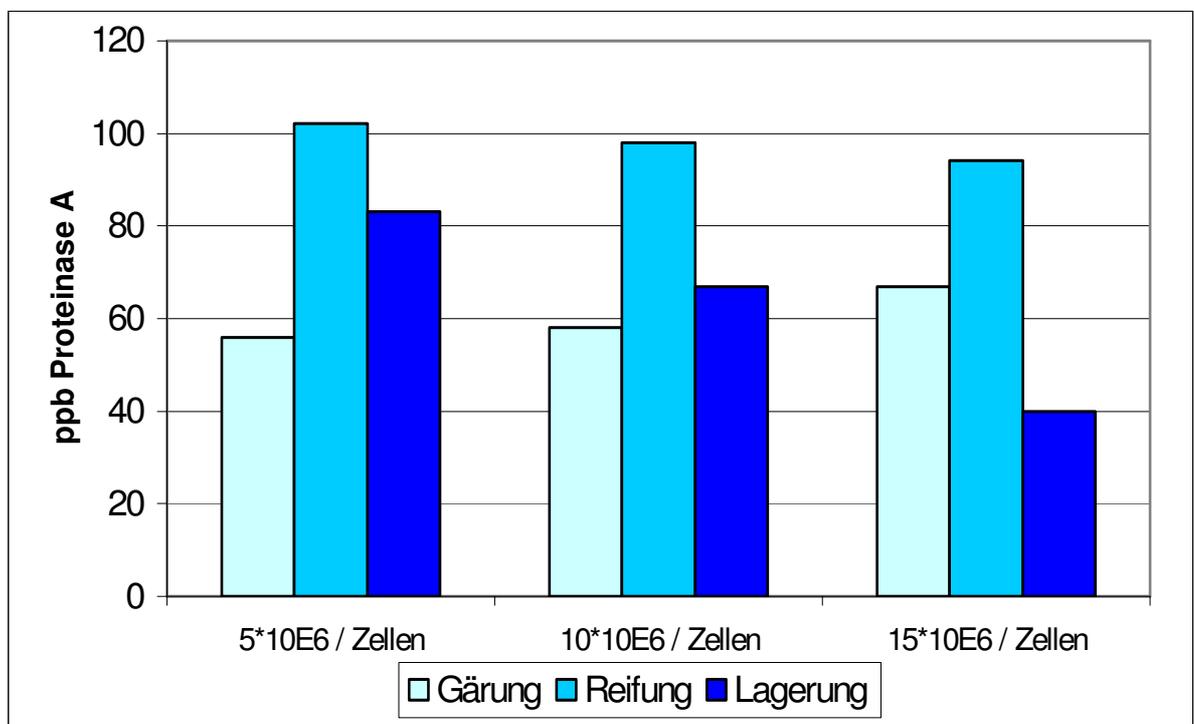


Abb. 19: Proteinasekonzentrationen nach Gärung, Reifung und Lagerung bei Variation der Anstellzellzahl

Die Proteinasekonzentrationen der Jungbiere stiegen mit erhöhter Hefegabe leicht an, wie die Proben am Ende der Gärungen zeigen. Sie lagen bedingt durch die hohen Gärtemperaturen von 10 °C bei durchschnittlich 60 ppb. Nach der Reifung zeigte sich ein gegenteiliger Effekt, indem die Proteinasegehalte der Proben mit steigender Hefezellzahl leicht und nach der Lagerung stark abnahmen.

Tabelle 17 zeigt die Stickstoffverhältnisse der Anstellwürze und der aus den Versuchen hergestellten Biere. Bei Betrachtung der hochmolekularen Stickstofffraktion (MgSO_4 -Stickstoff) und des freien Amino-Stickstoffs zeigt sich eine geringere Abnahme dieser Fraktionen bei der Gärung mit höheren Zellzahlen.

Tabelle 17: Stickstoffverhältnisse der Anstellwürze und der fertigen Biere

	Anstellwürze	$5 \cdot 10^6$ Zellen	$10 \cdot 10^6$ Zellen	$15 \cdot 10^6$ Zellen
Ges. Stickstoff (mg/100ml)	108,9	84,8	80,5	81,2
Koag. Stickstoff (mg/100ml)	1,2	1,1	1,2	1,2
Hochm. Stickstoff (mg/100ml)	17,9	12,9	12,1	14,1
FAN (mg/100ml)	23,5	14,2	14,1	15,2
FAN am Gesamtstickstoff (%)	21,6	16,8	17,5	18,7

Die Schonung des hochmolekularen Stickstoffs während der Bierbereitung spiegelt sich auch in den besseren Schaumwerten nach *Ross & Clark* wider, wie aus Diagramm 20 zu entnehmen ist. Eine Korrelation zu den *NIBEM*-Schaumwerten ist jedoch nicht zu erkennen (Diagramm 21).

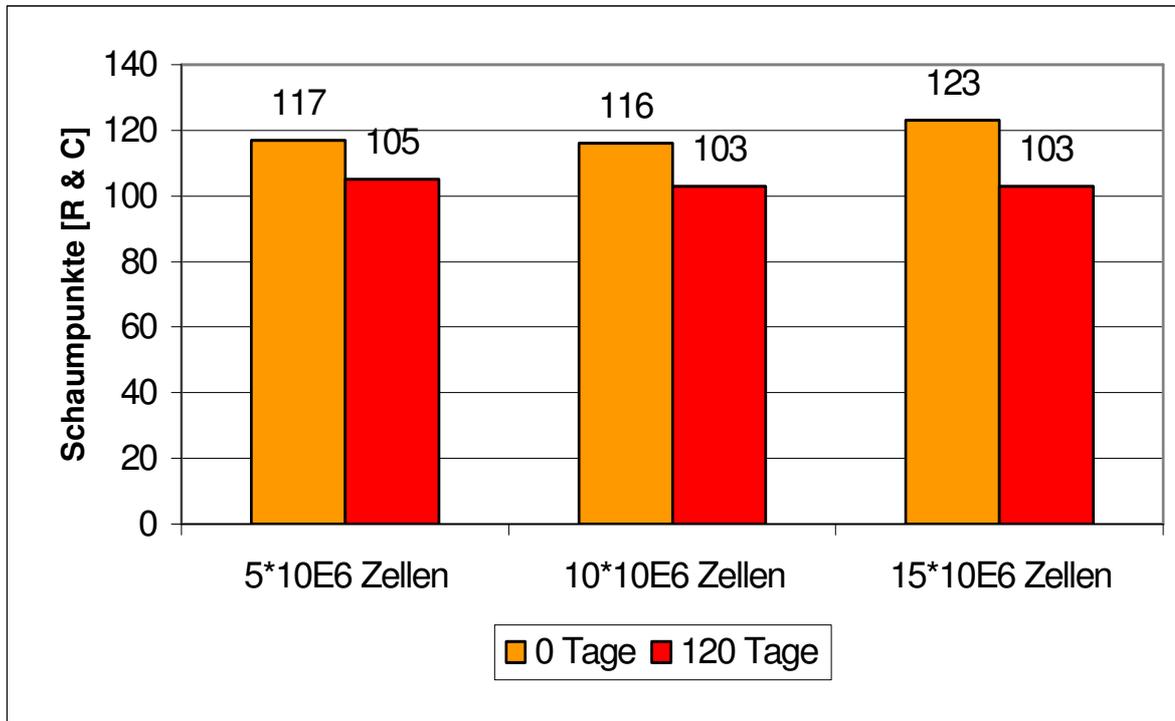


Abb. 20: Schaumwerte nach *Ross & Clark* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C

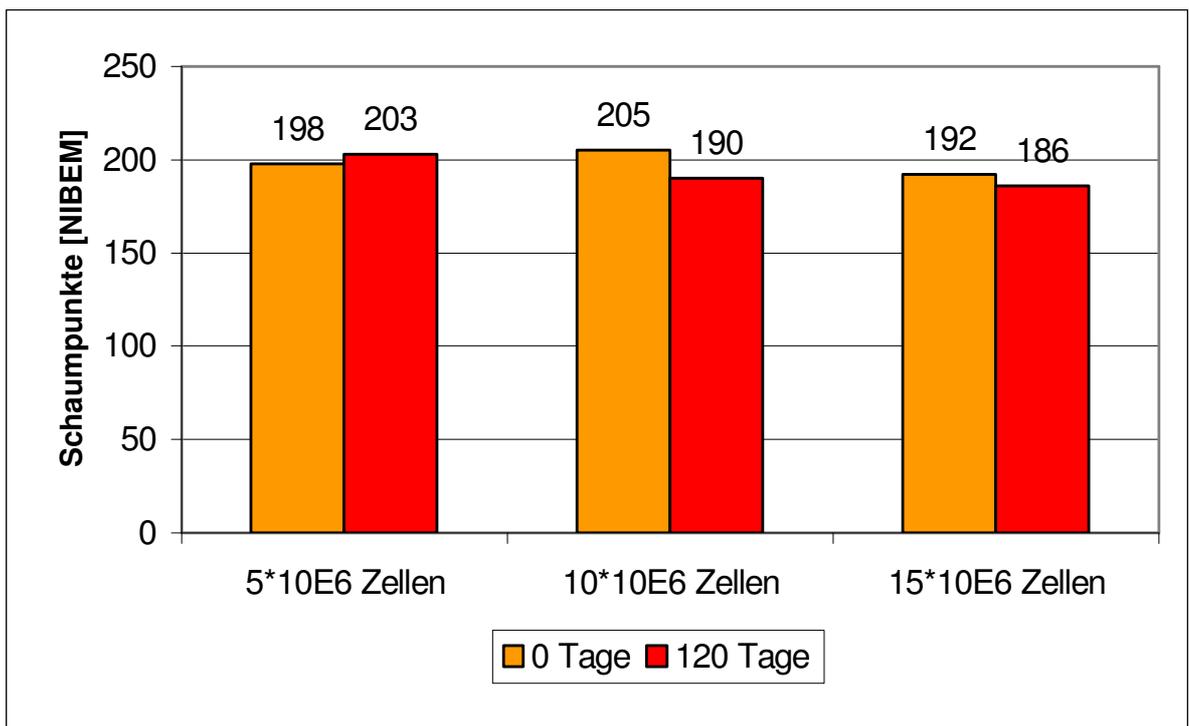


Abb. 21: Schaumwerte nach *NIBEM* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C

Es zeigte sich, dass ein Anstellen der Würze mit möglichst hoher Zellzahl, in diesem Fall $15 \cdot 10^6$ Zellen/ml deutlich geringere Proteinasekonzentrationen während der Reifung und Lagerung erbrachten. Eine Erklärung für diesen Effekt ist, dass die Hefe früher in den Gärungsstoffwechsel verfällt, da bei gleichem O_2 -Ausgangsgehalt der Anstellwürzen der Sauerstoff durch die höhere Zellzahl schneller verbraucht wird. Die Vermehrungsphase beim Anstellen ist somit kürzer und die Hefe baut nicht über den intrazellulären Proteinstoffwechsel Biomasse auf. Dies hat eine geringere Enzyymbildung für den Proteinstoffwechsel zur Folge. Dieser Effekt kann auch am prozentualen Gehalt des FAN verfolgt werden. Die Jungbiere, welche mit der höheren Zellzahl angestellt wurden, zeigten auch einen höheren Gehalt an FAN am Gesamtstickstoff (Tabelle 17).

Die Hefevitalität

Es wurden 2 gleiche Würzen mit jeweils $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit Hefe unterschiedlicher Vitalität (Methylenblau 96 und 77 % lebende Zellen) angestellt. Weiterhin blieb die Gärtemperatur bei 10 °C und die Reifung 3 Tage bei 22 °C konstant. Die Jungbiere wurden bei 3,5 % Extrakt geschlaucht, nach der Reifung 3 Tage bei 4 °C und abschließend 10 Tage bei 0 °C gelagert. Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils am Ende der Gärung, Reifung und Lagerung genommen.

Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Proteinasekonzentrationen nach Gärung, Reifung und Lagerung bei Variation der Hefevitalität. Das Anstellen der Würze mit Hefe von hoher Vitalität zeigte auch hier wieder ein Ansteigen der Proteinasekonzentration von der Gärung zur Reifung und ein Abfallen der Werte zum Ende der Lagerung. Bei geringerer Hefevitalität (77 % Lebendanteil) kommt es jedoch zu einem konstanten Ansteigen der Proteinasekonzentrationen über Gärung, Reifung und Lagerung hinweg. Dieses Ansteigen ist durch ein Adaptieren der geschädigten Zellen während der Induktionsphase der Gärung im Substrat zu erklären. Hierbei geht die Zahl der lebenden Zellen etwas zurück und es kommt zu einer Exkretion der Zellinhaltsstoffe⁹¹. Das weitere Ansteigen der Proteinasegehalte zur Lagerung hin ist durch ein Überlagern zweier Effekte begründet. Auf der einen Seite kommt es zu einem weiteren Auflösen der geschwächten Zellen und somit zu weiteren Zellinhaltsstoffexkretionen, auf der anderen Seite bilden die vitalen Zellen für den einsetzenden Aminosäurestoffwechsel Enzyme, um den Proteinturnover zu gewährleisten.

⁹¹ Bronn, W. K.: Vorlesungsskript „Technologie der Hefefabrikation – Backhefe“, Versuchsanstalt der Hefeindustrie, TU-Berlin, Kap. 4.6, S. 8f

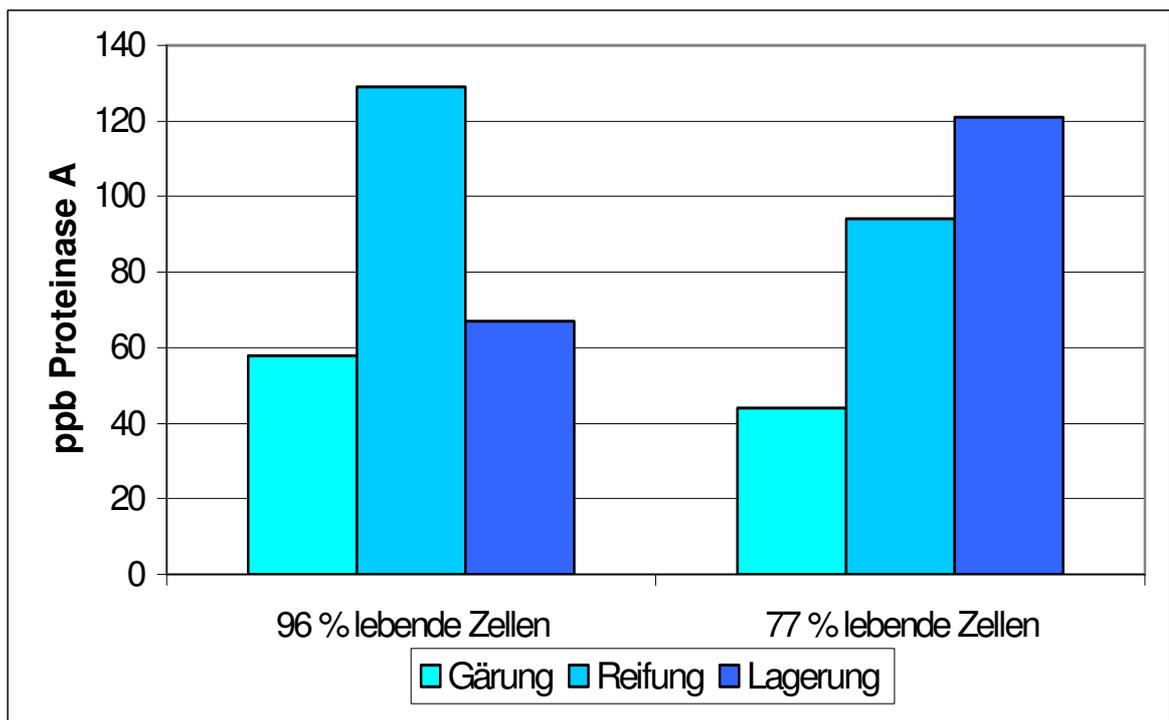


Abb. 22: Proteinasekonzentrationen nach Gärung, Reifung und Lagerung bei Variation der Hefevitalität

Das vermehrte Assimilieren von Stickstoffsubstanzen zum Zellaufbau der weniger vitalen Hefe ist auch an der stärkeren Abnahme des freien Aminostickstoffes (Tabelle 18) zu erkennen, wobei der Gehalt an hochmolekularem Stickstoff in der Würze geschont wird.

Tabelle 18: Stickstoffverhältnisse der Anstellwürze und der fertigen Biere

	Anstellwürze	96 % lebende	77 % lebende
Ges. Stickstoff (mg/100ml)	108,9	80,5	82,4
Koag. Stickstoff (mg/100ml)	1,2	1,2	1,2
Hochm. Stickstoff (mg/100ml)	17,9	12,1	13,7
FAN (mg/100ml)	23,5	14,1	13,5
FAN am Gesamtstickstoff (%)	21,6	17,8	16,4

Die ermittelten Schaumwerte nach *Ross & Clark* (Abb. 23) und *NIBEM* (Abb. 24) zeigen, dass die Bierschäume schon ohne Flaschenlagerung (0 Tage Biere) geschädigt sind.

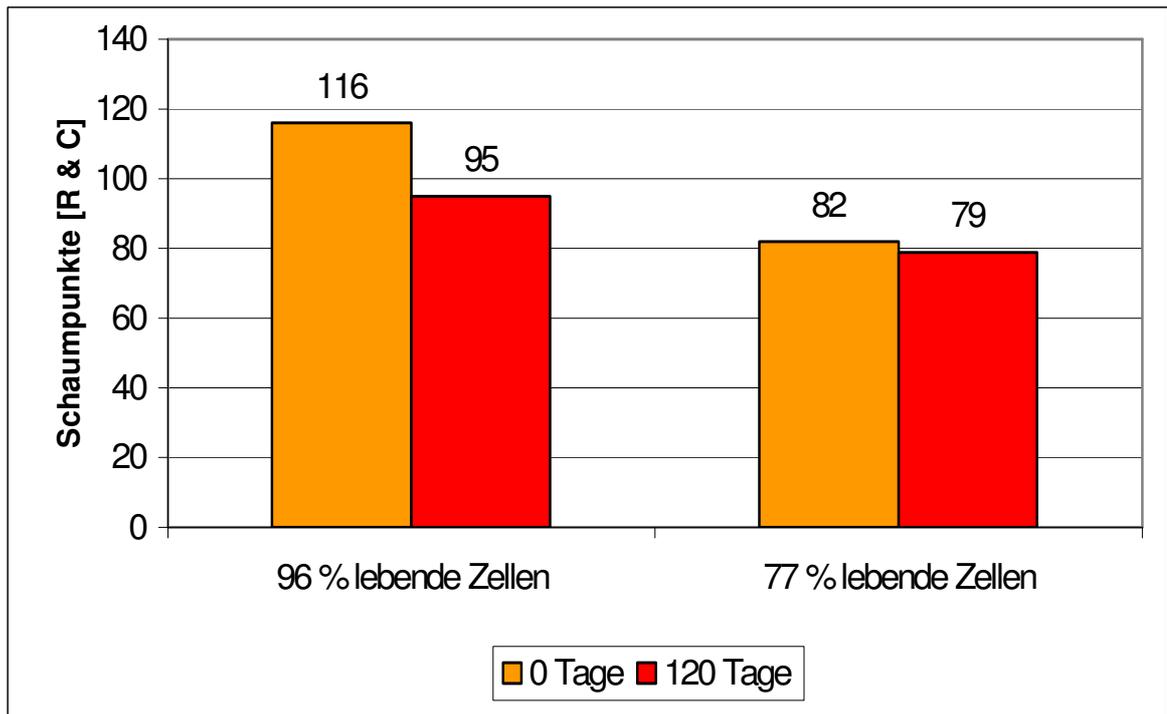


Abb. 23: Schaumwerte nach *Ross & Clark* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C

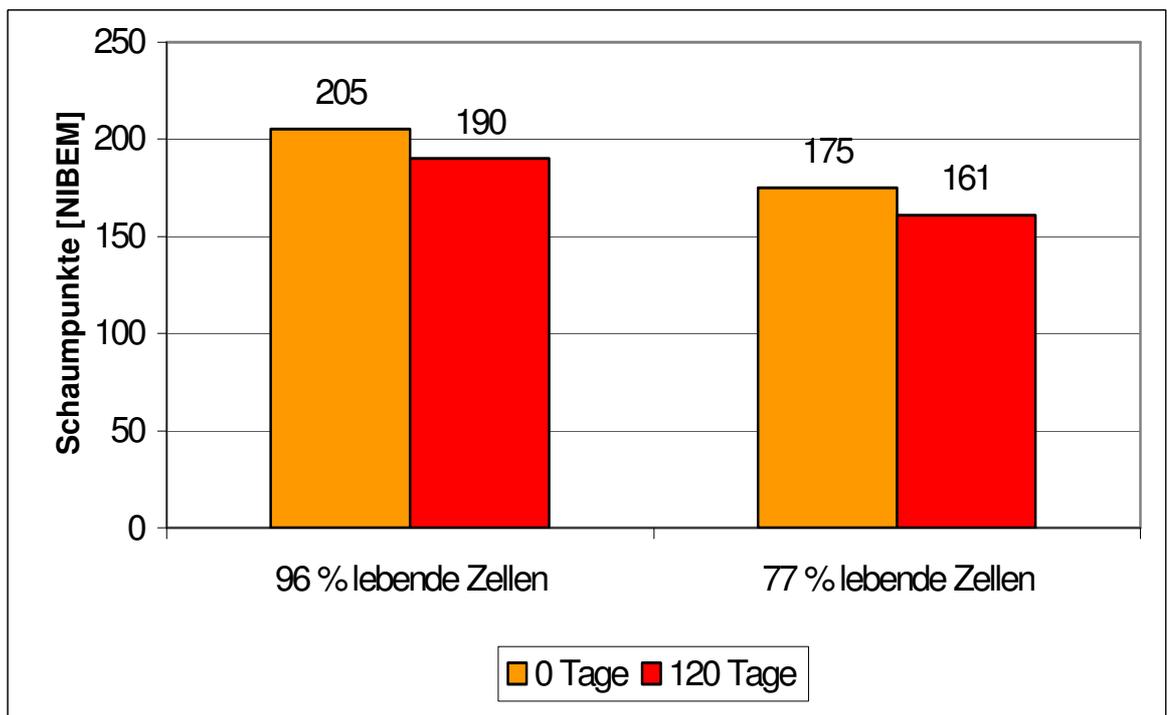


Abb. 24: Schaumwerte nach *NIBEM* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C

Diese Schädigung ist auf der einen Seite auf die nach der Reifung noch höheren Proteinasenhalte (Abb. 22) der mit weniger vitalen Hefe hergestellten Biere

zurückzuführen, auf der anderen Seite auch auf die durch die Zellauflösung ins Bier übergegangenen Zellinhaltsstoffe. Diesen Zellinhaltsstoffen, vor allem den Fettsäuren, wird eine stark schaumschädigende Wirkung zugesprochen⁹².

⁹² Zürcher, C. und Krauß, G. (1971): Freie niedere Fettsäuren und ihre Ethylester als Bieraromastoffe und Schaumzerstörer, Monatschrift für Brauerei, 24, S. 230-237

Die Gärtemperatur

In diesen Versuchsreihen wurde der Einfluss der Gärtemperatur auf die Proteinasekonzentration untersucht. Hierzu wurden Würzen bei unterschiedlichen Gärtemperaturen vergoren. Am Ende der Hauptgärung ($E_s = 3,5\%$ GG) wurden die Jungbiere 3 Tage bei 22 °C gereift und anschließend 10 Tage bei 0 °C gelagert. Aus den Versuchsansätzen ergaben sich jeweils drei Messpunkte: Ende Hauptgärung, Reifung und Lagerung. Die Veränderungen der Proteinasekonzentrationen über die Versuchsanordnungen bezogen auf Proteinase A sind in folgender Abbildung dargestellt.

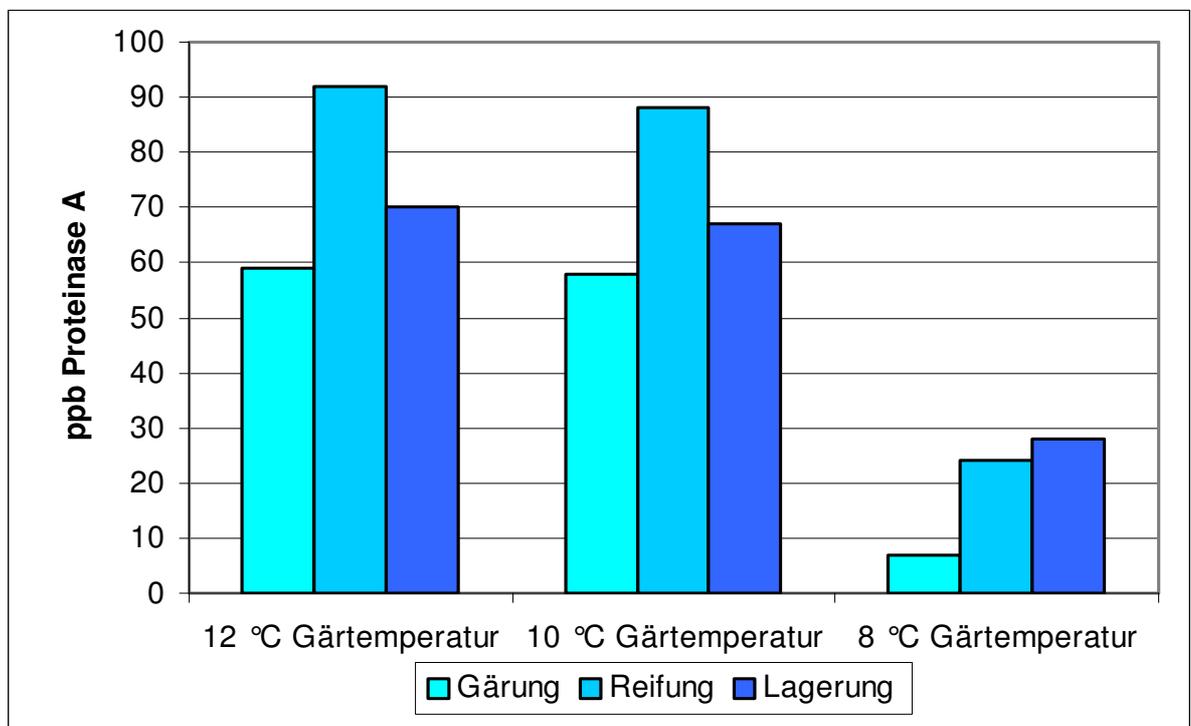


Abb. 25: Proteinasekonzentrationen nach Gärung, Reifung und Lagerung bei Variation der Gärtemperatur

Es zeigte sich, dass eine Änderung der Gärtemperatur von 12 °C auf 10 °C keine deutliche Verringerung der Proteinasekonzentration erbrachte. Nur durch ein weiteres Absenken der Gärtemperatur auf 8 °C ist eine deutlich geringere Proteinasekonzentration zu erreichen. Die Proteinasekonzentration steigt zwar bei

der 8 °C Probe über die Reifung und Lagerung leicht an, erreicht aber nicht das Niveau der 12 und 10 °C-Versuche.

In Tabelle 19 sind die Stickstoffverhältnisse der Anstellwürze und der aus den Versuchen hergestellten Biere zu entnehmen.

Tabelle 19: Stickstoffverhältnisse der Anstellwürze und der fertigen Biere

	Würze	8 °C	10 °C	12 °C
Ges. Stickstoff (mg/100ml)	108,9	86,5	80,5	83,1
Koag. Stickstoff (mg/100ml)	1,2	0,9	1,2	0,9
Hochm. Stickstoff (mg/100ml)	17,9	12,4	12,1	11,4
FAN (mg/100ml)	23,5	16,1	14,1	15,1

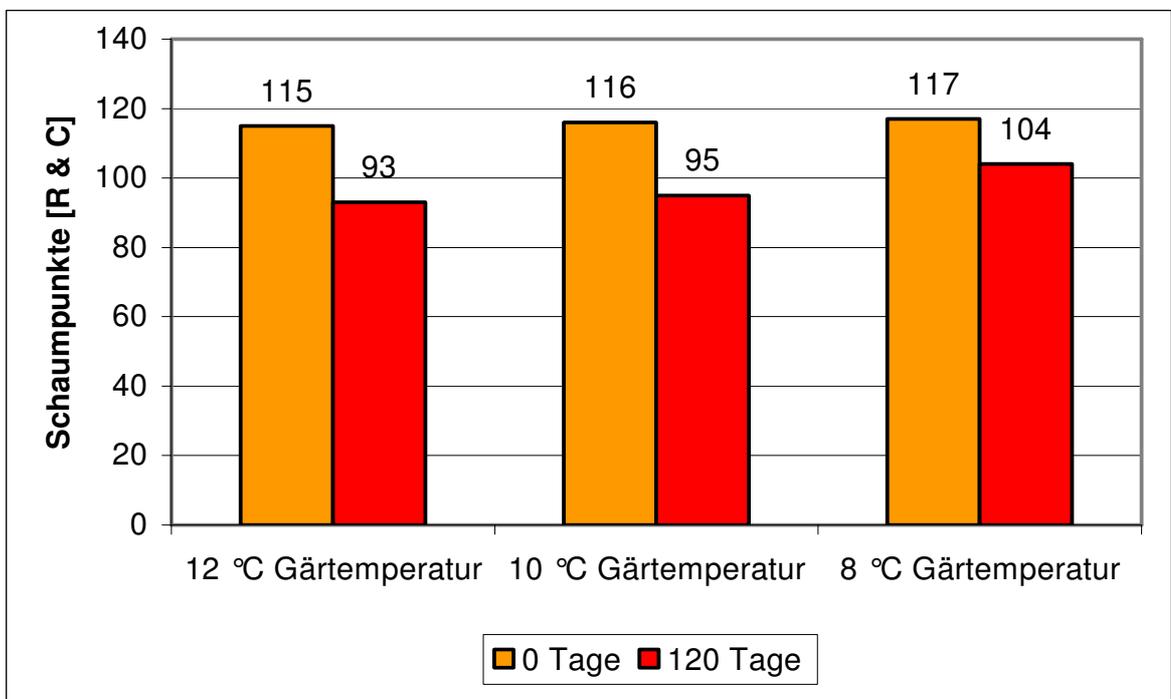


Abb. 26: Schaumwerte nach *Ross & Clark* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C

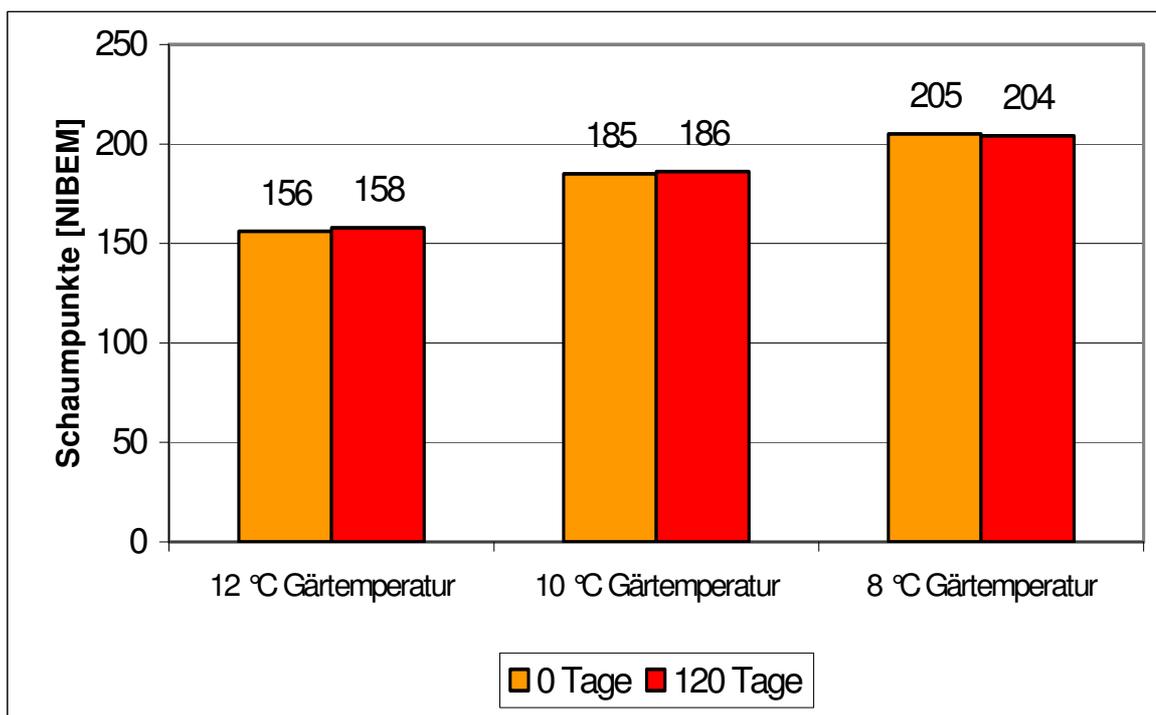


Abb. 27: Schaumwerte nach *NIBEM* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C

Es zeigte sich, dass eine geringe Gärtemperatur die Stoffwechselfvorgänge in der Hefe bremst und es damit zu einer geringeren Enzymproduktion während der Gärung (Abb. 25) kommt. Selbst eine Reifung der Biere bei 22 °C führt nicht zu Proteinasenausschüttung wie bei den Bieren, die mit 12 bzw. 10 °C vergoren wurden. Dieser Effekt kann durch eine verhaltene Gärung der Hefe bei geringen Gärtemperaturen erklärt werden. Es kommt somit bei den 8 °C Bieren, bedingt durch die geringeren Proteinasenkonzentrationen, zu besseren Schaumwerten vor allem nach *NIBEM* (Abb. 27) und einer geringeren Schaumverschlechterung nach 120tägiger Flaschenlagerung bei den *Ross & Clark* Schaumwerten (Abb. 26).

Die Reifungstemperatur

Es wurde eine Würze mit $10 \cdot 10^6$ Zellen / ml mit Hefe (Vitalität: 96 % lebende Zellen) angestellt. Die Gärtemperatur betrug 10 °C bis ein Extraktgehalt von 3,5 % erreicht war. Danach wurde der Versuchsansatz auf zwei Teile aufgeteilt. Ein Bier wurde bei 22 °C bis zum Diacetylabbau gereift und 10 Tage bei 0 °C gelagert, das zweite 3 Tage bei 6 °C , 3 Tage bei 4 °C gereift und bei 0 °C bis zur Diacetylreduktion gelagert. Die Proteinasegehalte der Proben wurden jeweils am Ende der Gärung, Reifung und Lagerung gemessen.

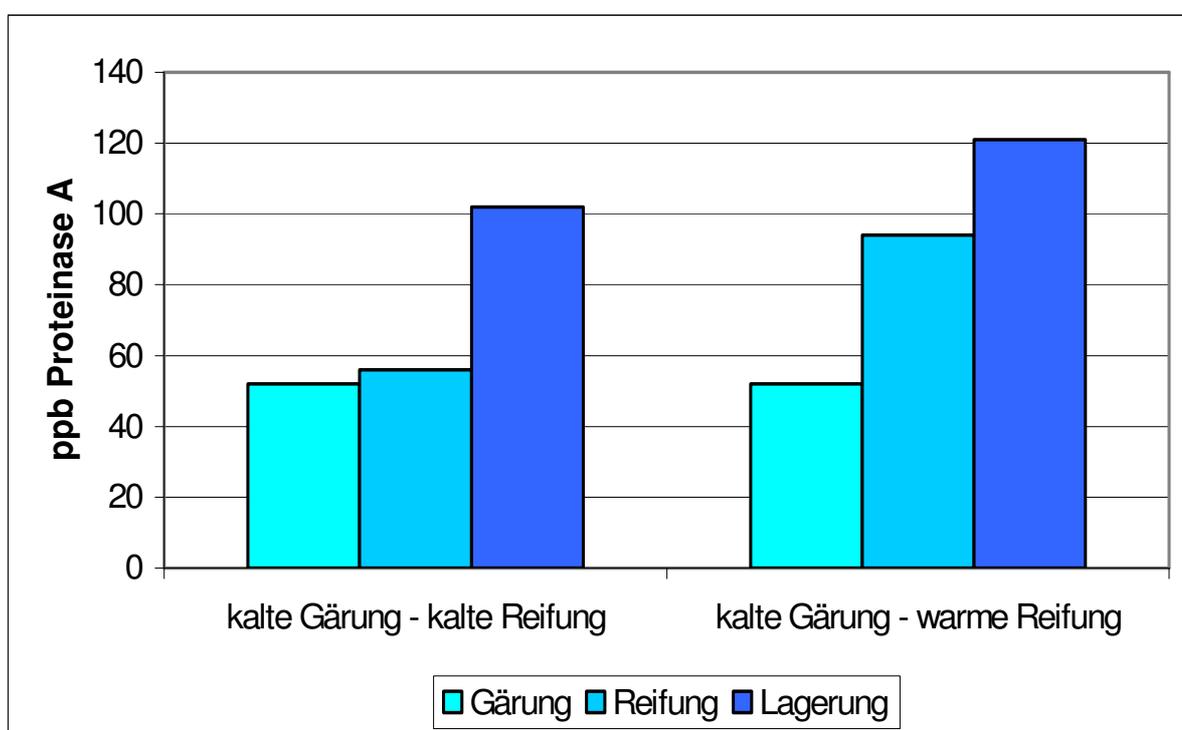


Abb. 28: Proteinasekonzentrationen in Abhängigkeit der Reifungstemperatur

Ausgehend von der kalten Gärung der Proben zeigten die Jungbiere bei der Reifung ansteigende Proteinasegehalte (Abb. 28). Hierbei stiegen die Gehalte der warm gereiften Biere deutlicher an, als die zum Vergleich kalt gereiften Biere. Dieser Trend setzt sich auch bei der Lagerung fort, indem die warm gereiften Biere weiter ansteigende Proteinasegehalte über das Niveau der kalt gereiften Biere zeigten.

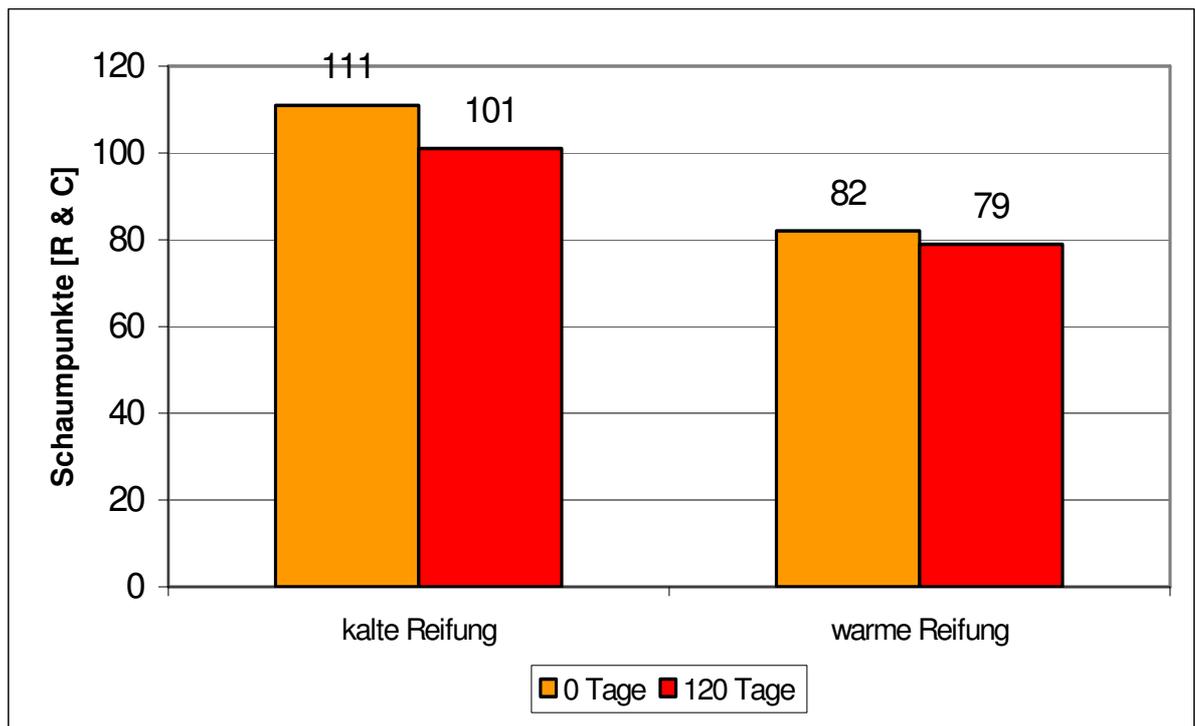


Abb. 29: Schaumwerte nach *Ross & Clark* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C

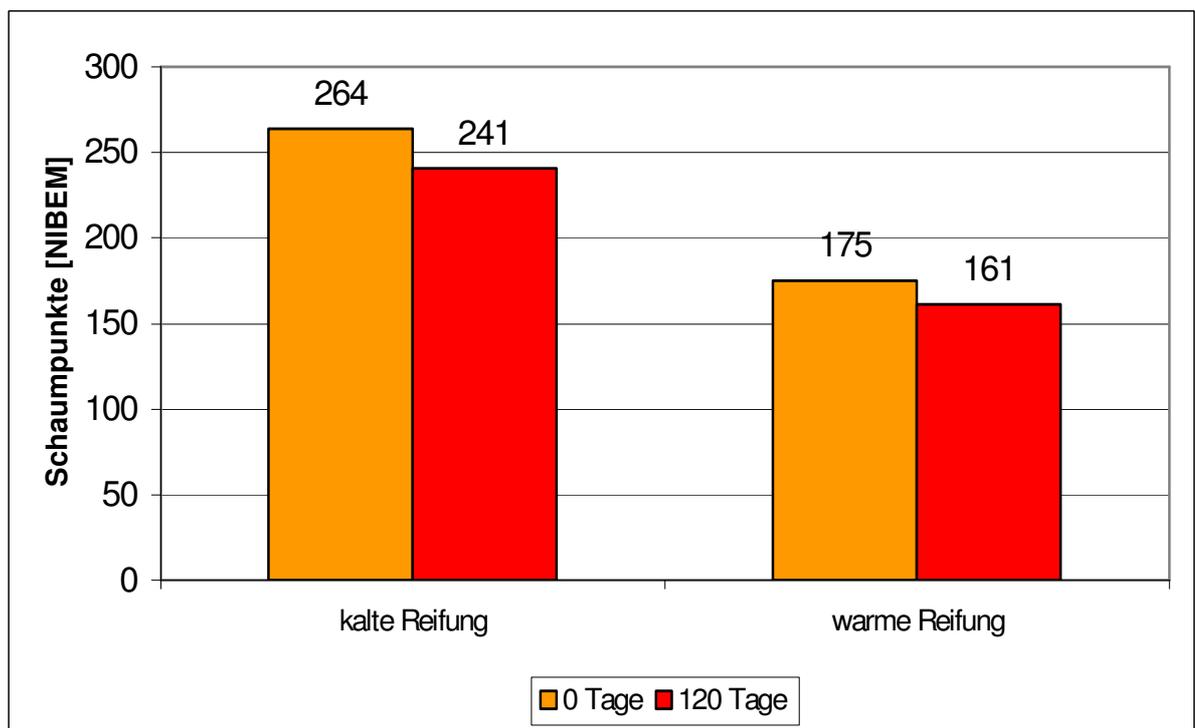


Abb. 30: Schaumwerte nach *NIBEM* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C

Die höheren Proteinasegehalte während der Reifung spiegelten sich auch in den schlechteren Schäumen der aus den Versuchen hergestellten Bieren wider (Abb. 29 und 30).

4.3.4 Der Zinkgehalt der Anstellwürze

Zink ist von großer physiologischer Bedeutung für die Eiweißsynthese, die Zellvermehrung der Hefe und somit für die Gärung. Bei einem Zinkmangel kommt es zu schleppender Hefevermehrung, schleppender Gärung und zur unvollständigen Reduzierung des Diacetyls⁹³. Als essentieller Cofaktor ist Zink bei verschiedenen Hefeenzymen, z. B. der Alkoholdehydrogenase, von besonderer Bedeutung. Es beschleunigt die Riboflavinsynthese, aktiviert die basischen und sauren Phosphatasen und unterstützt die Hefezelle beim Proteinstoffwechsel⁹⁴. Die Hefe benötigt neben Zink weitere anorganische Spurenelemente. Diese für die Hefe wichtigen Spurenelemente lassen sich in drei Untergruppen einteilen: Makroelemente (Mg, K, Zn, Fe, Ca, Mn, Cl), Mikroelemente (Co, B, Cd, Mo, Cu, Va, Ni, Cr, I) und Inhibitoren/Toxine (Ag, Bd, Hg, Se, Pd, Te, As, Ni, Os, Li)⁹⁵. Der Zinkgehalt der Anstellwürze sollte laut *Narziß*⁹⁶ bei 0,12-0,25 mg/l (auf 12 % Extrakt berechnet) liegen. Meist liefert die Würze genügende Mengen der benötigten Elemente mit Ausnahme von Zink. Es sind aber eine Reihe von Möglichkeiten bekannt, um den Zinkgehalt der Würze zu erhöhen: Rohstoffauswahl (Zinkgehalt der Gerste); erhöhte Malzauflösung; niedriger pH-Wert der Maische; niedrige Einmaischtemperaturen; kurze Maischzeiten; geringe Maischekonzentration; Spelzen- und Treberauszüge⁹⁷.

Um den Einfluss des Zinkgehaltes auf die Proteinasenausschüttung der Hefe während der Gärung zu untersuchen, wurde Würze mit einem geringem Zinkgehalt in der Technikumbrauerei hergestellt. Die Würze wurde in drei gleiche Teile aufgeteilt. Ein Teil wurde bei geringem (0,09 mg/l) Zinkgehalt belassen, beim zweiten (0,12 mg/l) und dritten Teil (0,18 mg/l) wurde der Zinkgehalt mittels

⁹³ Kunze, W. (1994): Technologie Brauer und Mälzer, VLB Berlin, 7. Auflage, S. 182

⁹⁴ Heggart, H.M., Margartis, A., Pikington H., Stewert, R.J., Dowhanick, T.M. und Rusell, I. (1999): Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review, MBAA Technical Quarterly, Volume 36, Nr. 4, S. 383-406

⁹⁵ Heggart, H.M., Margartis, A., Pikington H., Stewert, R.J., Dowhanick, T.M. und Rusell, I. (1999): Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review, MBAA Technical Quarterly, Volume 36, Nr. 4, S. 383-406

⁹⁶ Narziß, L. (1985): Abriß der Bierbrauerei, Enke Verlag, Stuttgart, S. 181

⁹⁷ McLaren, J.I., Fischborn, T., Briem, F., Englmann, J., Geiger, E. (1999): Zinkproblem gelöst ?, Brauwelt, 45/46, S. 2158-2160

Zinkchloridzugabe eingestellt. Die Würzen wurden mit Hefe des Stamms *Saccharomyces carlsbergensis* W34 ($15 \cdot 10^6$ Zellen/ml) vergoren. Um ein Einbringen von Zink durch die Hefe zu vermeiden, erfolgte das Heranziehen der zum Anstellen benötigten Hefemenge in zinkfreiem Nährmedium. Die Würzen wurden isotherm bei 9 °C, bis auf einen E_s von 4 % GG, vergoren.

In Abbildung 31 sind die Extraktabnahmen der Versuche dargestellt. Deutlich ist eine Adaptationszeit der Hefen, an das Substrat in den ersten zwei Tagen zu erkennen. Die Abnahme des Extraktes verläuft bei allen Versuchen erst sehr schleppend. Der Ansatz der Würze mit 0,18 mg/l Zink zeigte dann aber eine starke Beschleunigung der Gärung und damit eine schnelle Extraktabnahme auf 4 % nach bereits 6 Gärtagen. Bei den Würzen mit 0,09 mg/l und 0,12 mg/l verlief dagegen die Extraktabnahme weiterhin schleppend.

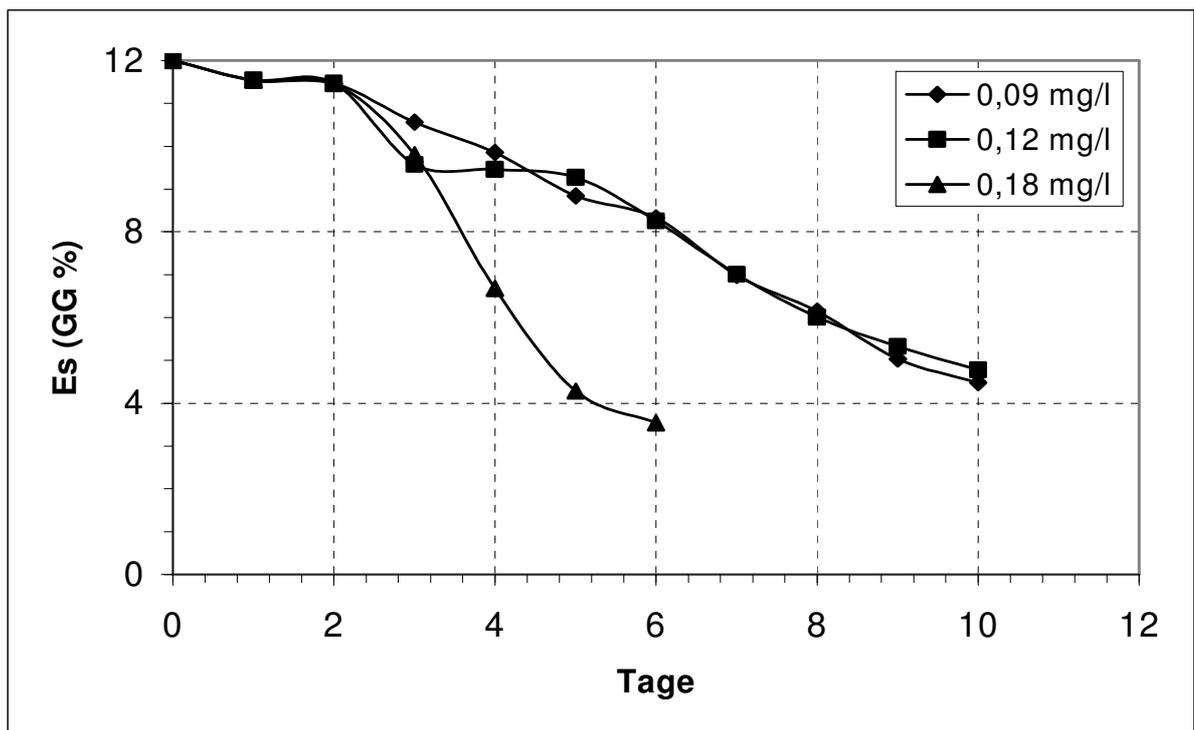


Abb. 31: Extraktabnahme der Versuche bei isothermer Gärung bei 9 °C

Eine Untersuchung der Zinkwerte nach der Gärung zeigte, dass der gesamte Zinkpool der Würze während der Gärung durch die Hefe verbraucht wurde.

Die schnelle Extraktabnahme der Versuche mit hohem Zinkgehalt der Anstellwürzen deutet auf eine gute Vitalisierung der Hefen hin. Dies zeigte sich auch in den Proteinasekonzentrationen der Hefe. Die Hefen die in zinkreicher Würze zur Gärung kamen, zeigten eine geringere Proteinasekonzentration im Vergleich zu den Hefen in zinkarmer Würze (Abb. 32).

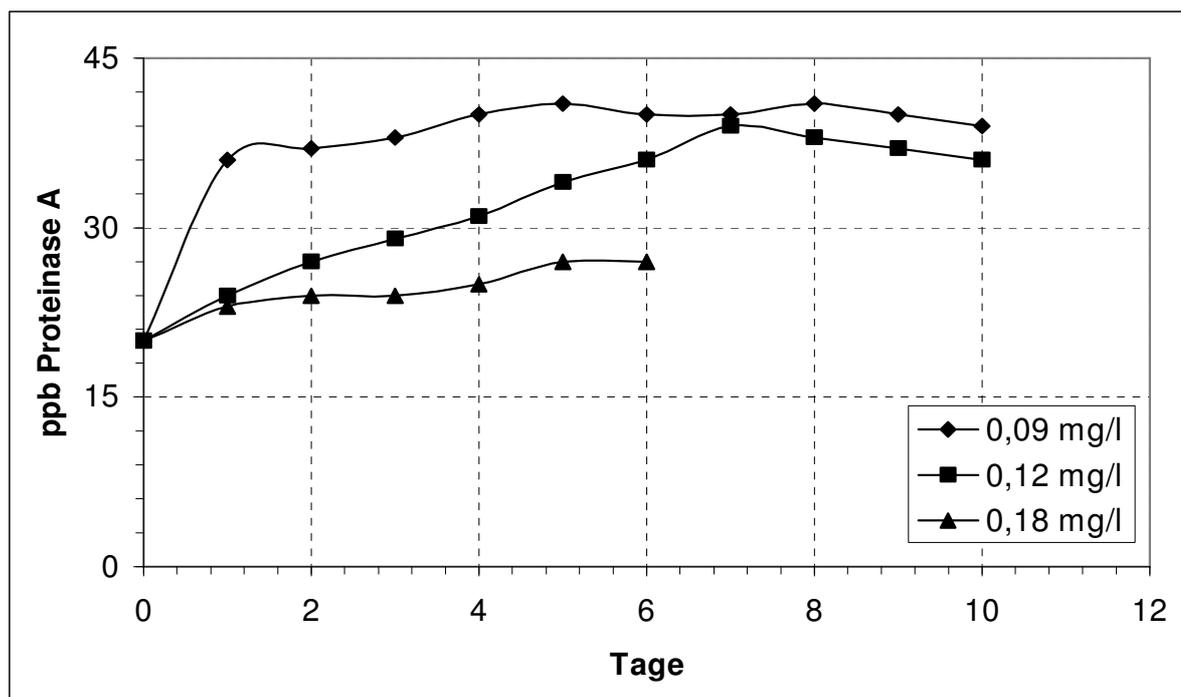


Abb. 32: Verlauf der Zunahme der Proteinasekonzentration der Versuche während isothermer Gärung bei 9 °C

4.3.5 Einfluss des Hefestammes

Der Hefestamm hat nach *Narziß et. al.*⁹⁸ einen großen Einfluss auf die Bierqualität, Extrakt- und pH-Abfall während der Gärung und die Farbveränderung der Biere. Auch eine unterschiedliche Proteinaseexkretion der Hefestämme sollte somit zu beobachten sein.

Um mögliche stammspezifische Unterschiede bei der Proteinaseexkretion von Bierhefen zu ermitteln, wurden mit sechs untergärigen Hefen Kleingärungen bei konstanten Temperaturen im 2 l Maßstab durchgeführt. Alle Teststämme stammen aus der lehrstuhleigenen Stammsammlung. Sie wurden vor Versuchsbeginn gleichmäßig auf eine Anstellzellzahl von $15 \cdot 10^6$ Zellen/ml herangezogen. Die verwendete Würze war bei allen Versuchen gleich und wurde bis auf einen E_s von 3,5 % (GG) bei 6 bzw. 9 °C vergoren.

Tabelle 20: Untersuchte Teststämme

Bezeichnung	Teststämme
H 1	<i>Saccharomyces cerevisiae W 68</i>
H 2	<i>Saccharomyces carlsbergensis Hebru</i>
H 3	<i>Saccharomyces cerevisiae W 66</i>
H 4	<i>Saccharomyces carlsbergensis B*</i>
H 5	<i>Saccharomyces carlsbergensis D*</i>
H 6	<i>Saccharomyces carlsbergensis W 34/70</i>

* Brauereispezifische Hefestämme

Die zu den Untersuchungen herangezogenen Teststämme H 4 und H 5 stammten aus Brauereibetrieben und sind brauereieigene Stämme, welche einer Variation der *Saccharomyces carlsbergensis W 34* zugeschrieben werden können. Sie kamen als Hefemuster aus dem laufenden Brauereibetrieb zu den Untersuchungen. Alle anderen sind als Reinzuchten im Labor herangezogen worden.

Die Gärungen zeigten bei einem E_s ab ca. 8 bis 4 GG % ansteigende Proteinasekonzentrationen, die sich zum Teil bis zum Zeitpunkt des Schlauchens auf einem hohen Niveau hielten.

⁹⁸ Narziß, L., Miedaner, H., Gresser, A. (1983): Heferasse und Bierqualität, Brauwelt, 13, S. 478-486

Bei den Hefestämmen H 1 und H 5 kam es zu verstärkten Ausscheidungen von Proteinase während der Gärung (Abbildungen 33 und 34). Dieser Effekt nahm mit steigender Gärtemperatur zu.

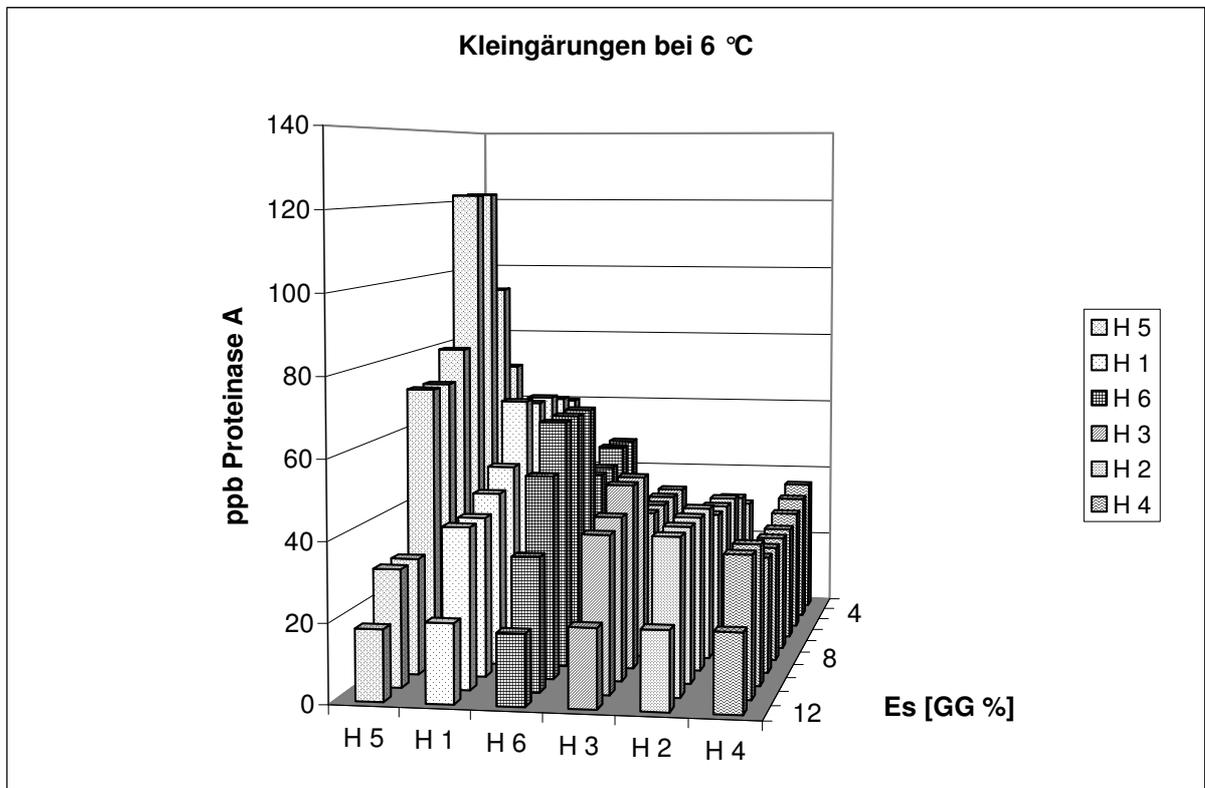


Abb. 33: Veränderung der Proteinasekonzentration während der Gärung bei 6 °C

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Proteinaseexkretion der Teststämme. Allgemein kam es zu einem Ansteigen der Proteinasekonzentrationen während der ersten Gärtage, welche auf eine einsetzende Stoffwechselaktivität zurückzuführen sind. Einige Hefen zeigten jedoch stark ansteigende Aktivitäten. Vor allem der Teststamm H 5 zeigte unabhängig von der Gärtemperatur (4 °C, 9 °C; Abb. 33 und 34) ein noch stärkeres Exkretieren von proteolytischen Enzymen. Teststamm H 4 zeigte dagegen nur bei einer Gärtemperatur von 9 °C eine höhere Exkretion. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine Degenerierung der Produktionsstämme zurückzuführen.

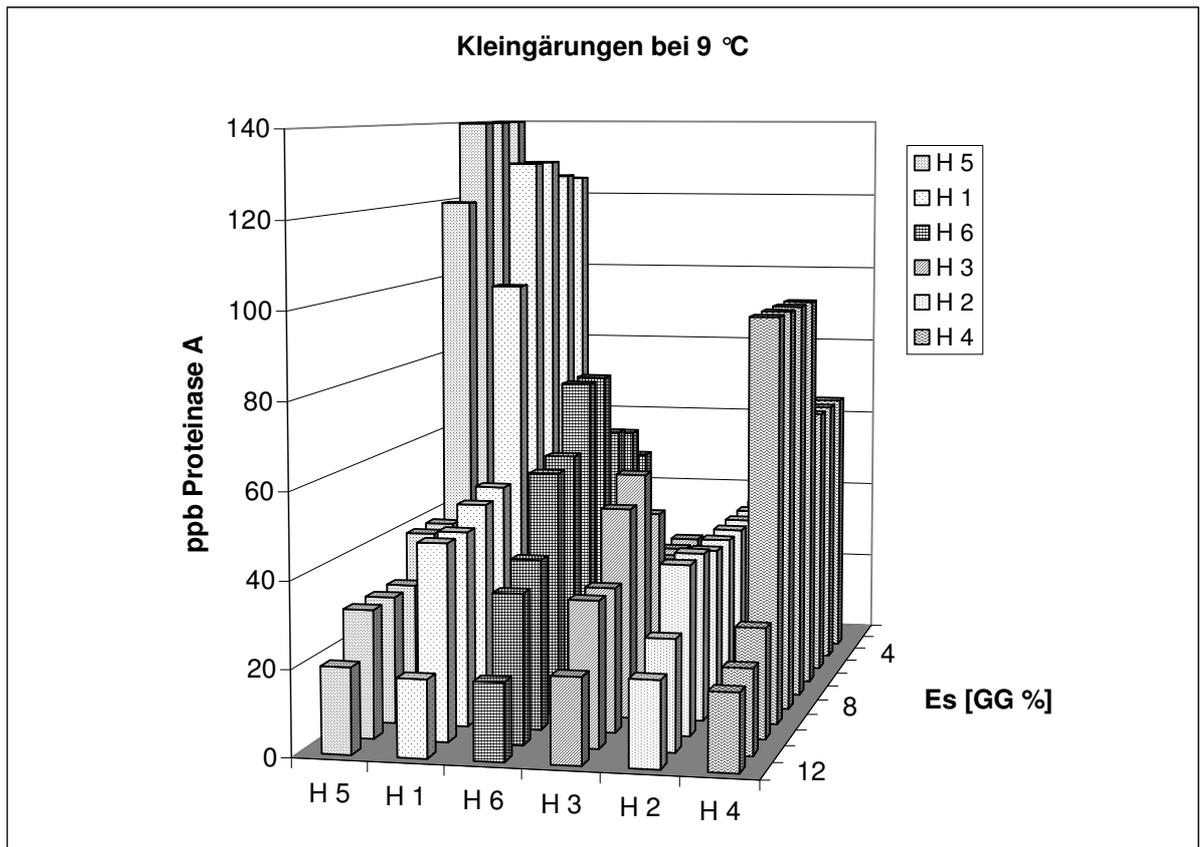


Abb. 34: Veränderung der Proteinasekonzentration bei einer Gärtemperatur von 9 °C

4.4 Einfluss der Proteinase auf den Bierschaum

4.4.1 Einfluss von proteolytisch aktivem Hefeautolysat auf den Bierschaum

Hefeautolysat enthält neben den Zellkompartimenten einen hohen Gehalt an Enzymen, unter anderen auch an proteolytischen Enzymen. Um den Einfluss dieser proteolytischen Enzyme auf den Bierschaum untersuchen zu können, wurden pasteurisiertem Flaschenbier definierte Mengen an Hefeautolysat von bekannter Proteinasekonzentration bezogen auf Proteinase A zugegeben. Die Flaschen wurden nach der Beimpfung wieder verschlossen und bei 20 °C inkubiert. Um die Einwirkung, von durch das Autolysat eingebrachten Fettsäuren und anderer schaumnegativer Substanzen auszuschließen, wurden nur die Veränderung der Schaumzahlen zwischen zweier mit proteolytisch aktivem Hefeautolysat versetzten Vergleichsbiere bestimmt. Weiterhin wurde die Veränderung der Schaumzahl von der nicht beimpften Probe bestimmt, um die von der Proteinaseeinwirkung unabhängige Veränderung der Schaumqualität über die Lagerung zu ermitteln. Gleichzeitig mit den Schaumbestimmungen wurde eine Bestimmung der Proteinasekonzentration durchgeführt. Eine lineare Abhängigkeit zwischen Proteinasekonzentration und Abnahme der Schaumpunkte nach *Ross & Clark* konnte in diesem Fall nicht gefunden werden (Abb. 35). Eine mögliche Erklärung ist, dass die proteolytischen Enzyme schon in den ersten Tagen während der Inkubation die schaumpositiven Proteinfractionen zersetzt haben, die bei der Bestimmung nach *Ross & Clark* eine Rolle spielen. Lediglich bei den relativen Schaumabnahmen nach *NIBEM* ist ein Zusammenhang zwischen Proteinasekonzentration und relativer Schaum-abnahme zu erkennen (Abb. 36). Bei Betrachtung der Abnahme der Proteinasekonzentration über die Lagerzeit wurde festgestellt, dass die Ausgangswerte durchschnittlich auf ein 20stel des ursprünglichen Wertes gefallen sind. Dieser Effekt wurde wiederholt auch bei anderen Versuchen festgestellt. Der Grund für dieses Verhalten ist in einem Selbstabbau der Enzyme während der Lagerung des Bieres zu suchen.

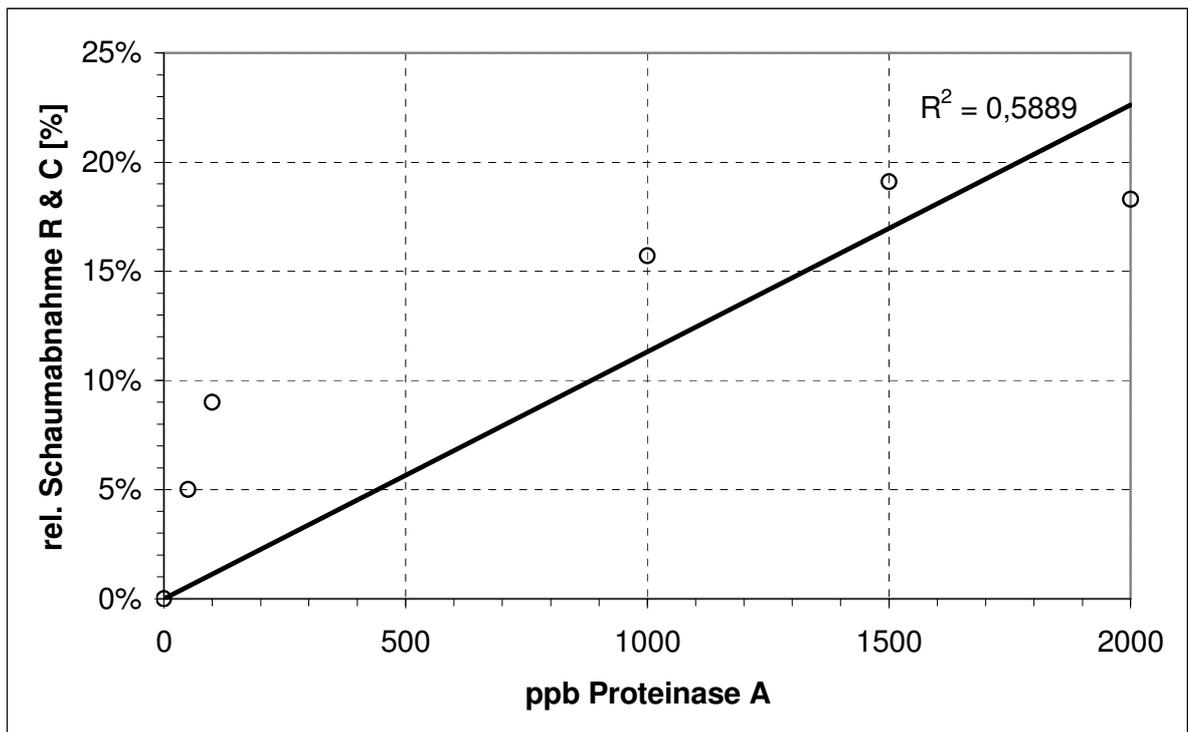


Abb. 35: Relative Schaumabnahme nach *Ross & Clark* in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration

Abbildung 35 zeigt, dass mit zunehmender proteolytischer Aktivität im untersuchten Bier die Schaumhaltigkeit abnimmt. Die Werte um 100 ppb Proteinase A, welche auch häufig in Praxisbieren gefunden werden, zeigen, dass es schon hier zu proteinasenbedingten Schaumverschlechterungen kommen kann. Bei Bieren mit über 1000 ppb Proteinase A – vor allem Hefeweizenbiere – ist somit die Gefahr gegeben, dass der Schaum um bis 20 % nach *Ross & Clark* abnehmen kann. Die relative Schaumabnahme nach *Ross & Clark* in Abhängigkeit ansteigender Proteinasekonzentration zeigte bei diesen Versuchen einen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,767$.

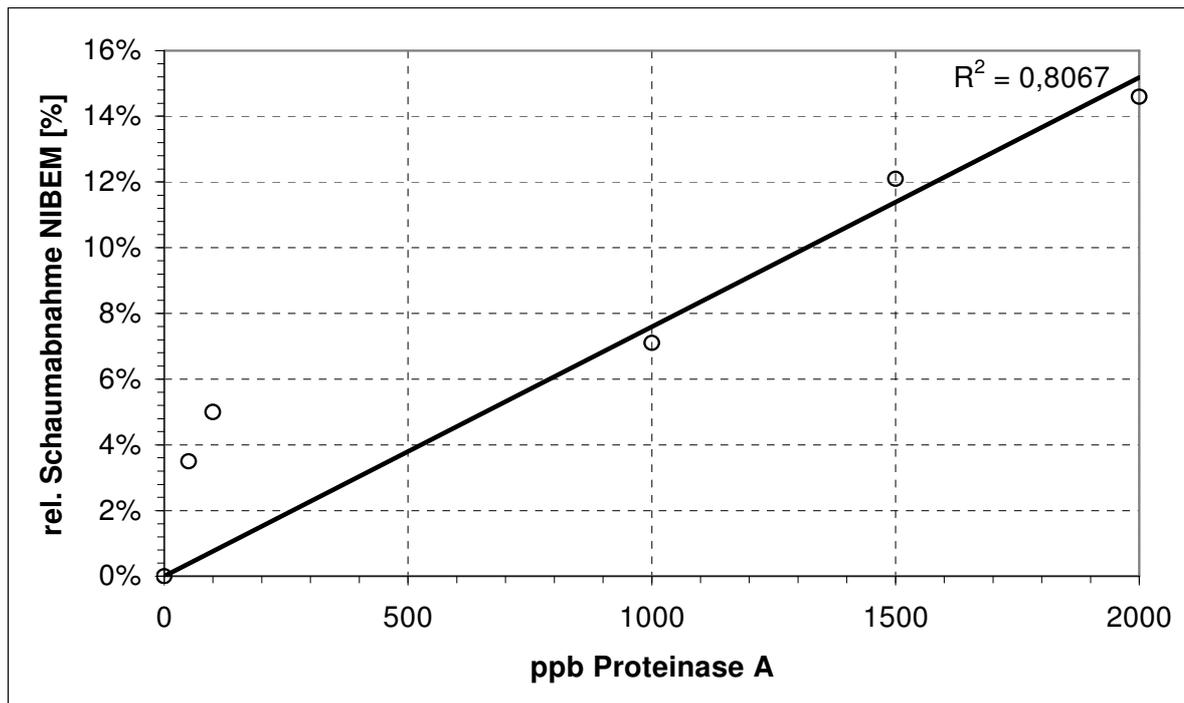


Abb. 36: Relative Schaumabnahme nach *NIBEM* in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration

Bei den untersuchten relativen Schaumabnahmen nach *NIBEM* in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration (Abb. 36) zeigte sich eine deutlich bessere Korrelation mit einem Koeffizienten von $r=0,898$. Die unterschiedlichen Korrelationskoeffizienten der Abhängigkeiten zwischen Proteinasezunahme und Schaumverschlechterung sind in den verschiedenen Schaumbestimmungs-Methoden zu suchen.

4.4.2 Verfolgung der Veränderung der Schaumhaltigkeit unpasteurisierter Praxisbiere während der Flaschenlagerung

Zur Untersuchung der Veränderung der Schaumhaltigkeit unpasteurisierter Biere während der Lagerung wurden frisch abgefüllte Biere von fünf regionalen Brauereien herangezogen. Der Proteinasengehalt der Biere sollte hierbei produkteigenen Ursprungs sein. Es wurden gängige Sorten wie Helles Vollbier, Bier nach Pilsener Brauart und Weizenbier der Brauereien untereinander verglichen. Am Tag der Abfüllung wurde die Proteinasekonzentration und die Schaumhaltigkeit nach *Ross & Clark* und *NIBEM* gemessen. Die Biere wurden über die Versuchsdauer von vier Wochen bei 20 °C gelagert. Nach Beendigung der Lagerung wurde nochmals die Schaumhaltigkeit nach *Ross & Clark* und *NIBEM* gemessen. Die prozentuale Abnahmen der Schaumpunkte der Biere sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 21: Veränderung der Schaumhaltezeiten bei **Hellen Vollbieren** bei Lagerung über vier Wochen bei 20 °C

	ppb Proteinase A	% Schaumpunkteabnahme <i>Ross & Clark</i>	% Schaumpunkteabnahme <i>NIBEM</i>
Brauerei 1	159	11	10
Brauerei 2	584	7	0
Brauerei 3	1074	4	0
Brauerei 4	1455	5	40
Brauerei 5	212	14	14

Tabelle 22: Veränderung der Schaumhaltezeiten bei Bieren nach **Pilsener** Brauart bei Lagerung über vier Wochen bei 20 °C

	ppb Proteinase A	% Schaumpunkteabnahme <i>Ross & Clark</i>	% Schaumpunkteabnahme <i>NIBEM</i>
Brauerei 1	156	26	36
Brauerei 2	646	2	10
Brauerei 3	431	13	0
Brauerei 4	318	11	25
Brauerei 5	352	6	0

Tabelle 23: Veränderung der Schaumhaltezeiten bei **Hefeweizenbieren** bei Lagerung über vier Wochen bei 20 °C

	ppb Proteinase A	Schaumpunkteabnahme <i>Ross & Clark</i>	Schaumpunkteabnahme <i>NIBEM</i>
Brauerei 1	2675	3	6
Brauerei 2	3626	20	54
Brauerei 3	2650	11	26
Brauerei 4	431	9	30
Brauerei 5	1783	6	33

Aus diesen Untersuchungen ergaben sich die in Abbildung 37 und 38 dargestellten Beziehungen von Schaumverschlechterung und proteolytischer Aktivität.

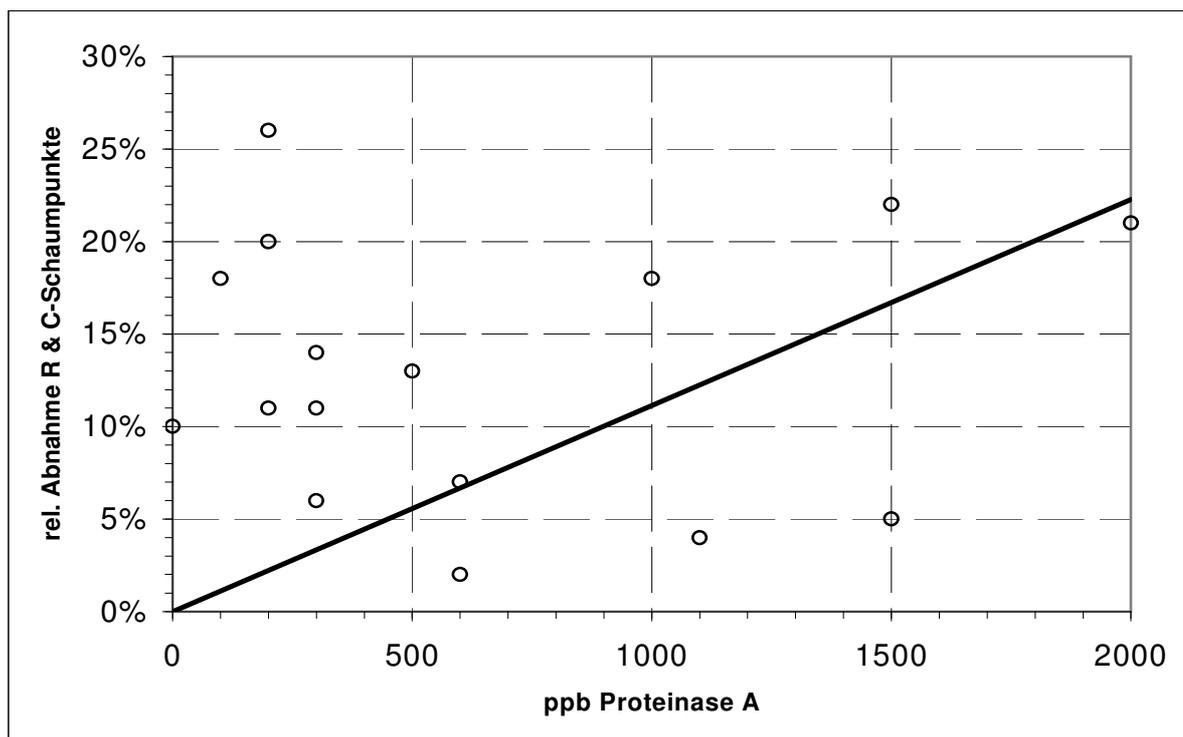


Abb. 37: Abnahme *Ross & Clark*-Schaumpunkte in Prozent in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration

Die untersuchten Biere stammen aus nicht vergleichbaren Produktionsverfahren und somit können die Ergebnisse nur übergreifend betrachtet werden. Die relative Abnahme der *Ross & Clark*-Schaumpunkte in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration zeigt bei diesem großen Probenumfang keine statistisch aussagekräftige Korrelation.

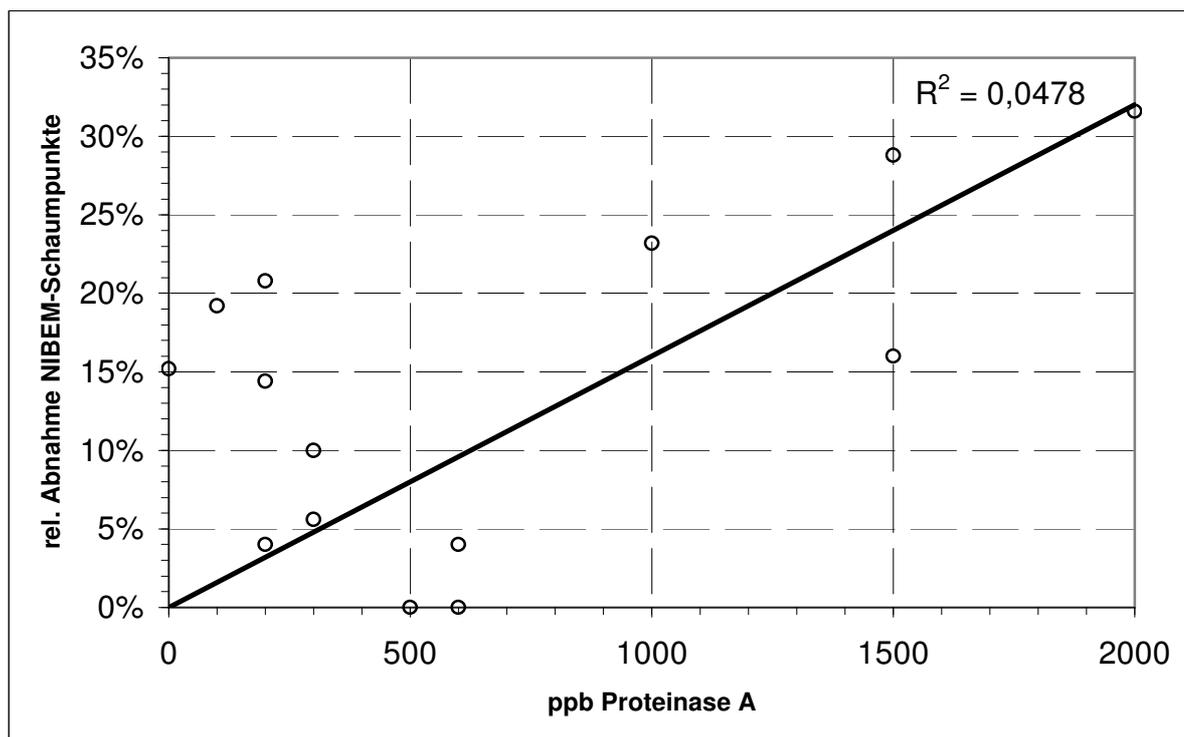
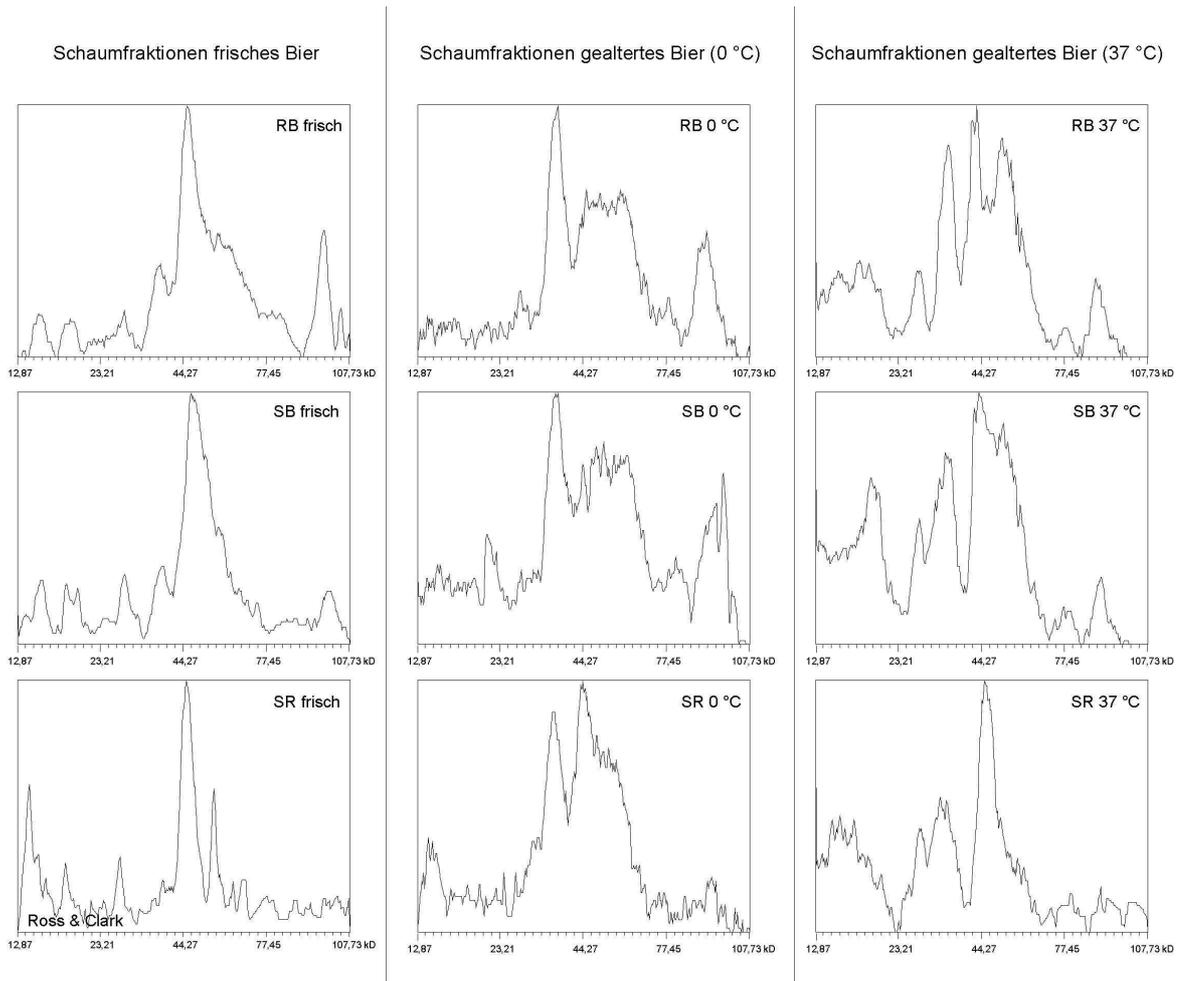


Abb. 38: Abnahme *NIBEM*-Schaumpunkte in Prozent in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration

Bei Betrachtung der relativen Abnahme der *NIBEM*-Schaumpunkte (Abb. 38) in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration ist eine bessere, wenn auch nicht befriedigende Korrelation zu erkennen ($r=0,218$). Hier muss ebenso erwähnt werden, dass die untersuchten Biere unterschiedlicher Herkunft sind und die Werte nur übergreifend betrachtet werden können.

4.4.3 Verfolgung der Veränderung der Schaumproteinfraktionen unpasteurisierter Praxisbiere während der Flaschenlagerung

Die proteolytische Aktivität von Enzymen bewirkt einen Abbau von hochmolekularen Proteinen zu niedermolekularen Proteinfragmenten. Diese Umwandlungsreaktionen sollten auch bei Schaumproteinfraktionen zu beobachten sein. Um eine Aussage über den Abbau von hochmolekularen Schaumproteinen durch Hefeproteinase treffen zu können, wurden von Bieren mit hoher proteolytischer Aktivität, Schaumproteinspektren mittels der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) erstellt. In diesen Versuchsreihen wurden die Proteinspektren frischer und bei 0 °C bzw. 37 °C gealterter Biere gegenüber gestellt. Es wurden wie auch schon bei *Voigt (1992)* zwei Hauptpeaks in den Densitogrammen frischer Biere bei 14 und 44 kD gefunden. Dem 14 kD Peak schreibt *Voigt* eine gute Schaumhaftung zu, da er vor allem in der Fraktion Schaumrest (SR) zu finden ist (Abb. 39). Insgesamt müssen alle in der SDS-Elektrophorese gefundenen Schaumfraktionen an der Schaumstabilisierung beteiligt sein, da sie beim Schaumfraktionierungsprozess angereichert werden. Die von *Voigt* genannten Ergebnisse konnten bei ungealterten Bieren bestätigt werden. Die Densitogramme der Schaumfraktionen der Biere, die bei 0 °C gealtert wurden, zeigten im Bereich von 14 bis 44 kD mehr und stärkere Peaks. Diese Peaks sind womöglich auf einen Abbau höhermolekularer Fraktionen zurückzuführen, da die Peaks um den 44 kD Bereich kleiner werden und ein stärkerer Peak bei 30 kD hinzugekommen ist. Dieser Peak ist auch bei den bei 37 °C gealterten Bieren zu erkennen. Hier ist jedoch der Abbau der hochmolekularen Fraktionen noch weiter fortgeschritten, was sich anhand der Peaks zwischen 12 und 23 kD belegen lässt (Abb. 39).



Schaumwerte	frisch	gealtert 0 °C	gealtert 37 °C
Ross & Clark	123	98	89
NIBEM	239	202	162

Abb. 39: Densitogramme der Schaumproteinfraktionen RB, SB, SR eines Bieres im frischen und im gealterten Zustand (0 °C, 37 °C)

Die absoluten Flächen der Densitogramme sind nicht ohne weiteres vergleichbar, da die elektrophoretische Trennung zum Teil auf verschiedenen Gelen gelaufen ist. Eine unterschiedliche Anfärbung der Gele ist durch die hohe Empfindlichkeit der Silberfärbung nicht zu vermeiden. Es wurden aber Mehrfachbestimmungen von jeder Probe durchgeführt. Weiterhin gleicht die verwendete Software Höhenunterschiede der Peaks durch die Normalisierung der gefärbten Gele aus.

Die Veränderung der Schaumfraktionen und der mit ihnen einhergehende Schaumverlust korreliert sehr gut mit *Ross & Clark* und *NIBEM*. Die bei 0 °C gealterten Proben zeigten eine relative Schaumabnahme von 21 % R & C und 15 % *NIBEM*. Die bei 37 °C gealterten Biere 28 % R & C und 32 % *NIBEM*. Das stärkere Abnehmen der Schaumhaltigkeit nach *Ross & Clark* und *NIBEM* und das Verschieben der Molekulargewichtsverteilung hin zu niedermolekularen Fraktionen bei höherer Alterungstemperatur deutet auf den Einfluss der proteolytischen Aktivität auf die Schaumhaltigkeit hin.

4.5 Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität in Bier

In dieser Versuchsreihe wurde die Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität in Bier untersucht. Der Verlauf der Kurve zeigt, dass es mit zunehmender Erhitzung bis 55 °C zu einem Ansteigen der proteolytischen Aktivität kommt. Diesen Effekt haben auch schon *Briem* und *Furukubo* beschrieben. Es ist davon auszugehen, dass es durch die Temperaturerhöhung zu einer Aktivierung der als inaktiven Vorform ausgeschiedenen Proteinase A kommt. Auch ein Abbau von Inhibitoren in diesem Temperaturbereich kommt als Erklärung in Frage.

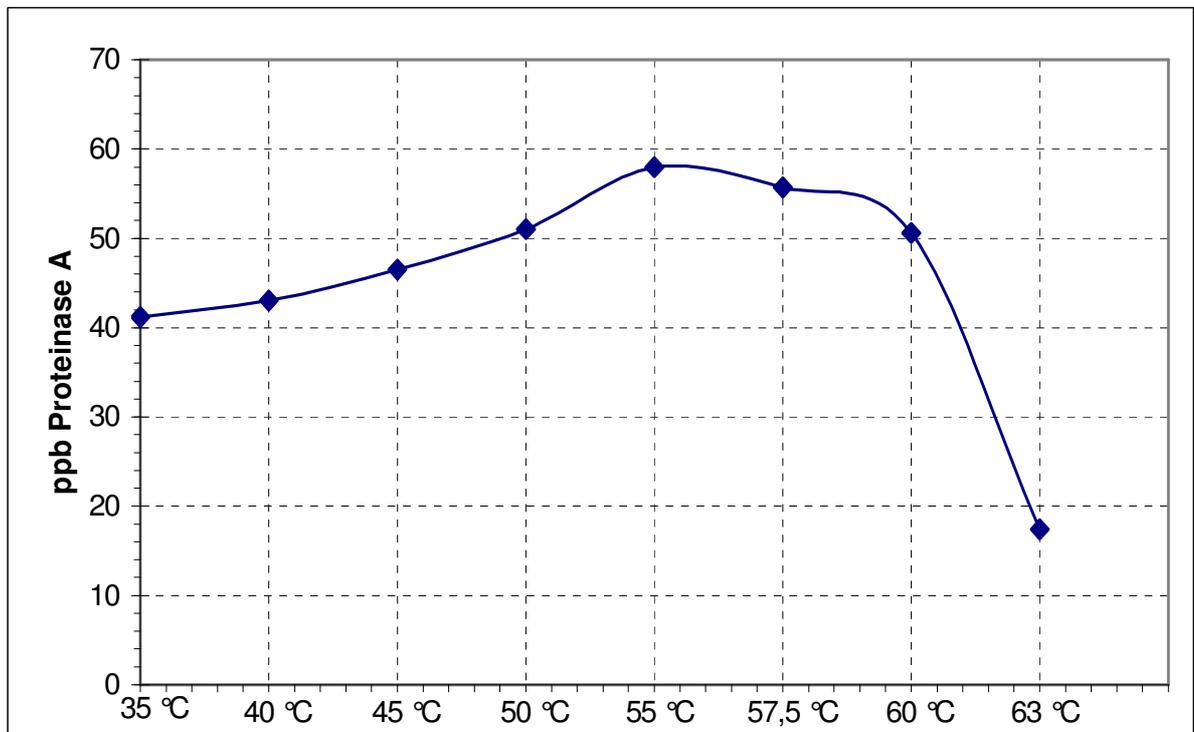


Abb. 40: Temperaturabhängigkeit der Proteinaseaktivität in Bier

4.6 Inaktivierung der proteolytischen Aktivität in Bier

Die Möglichkeiten zur Inaktivierung der proteolytischen Aktivität in Bier bestehen einerseits in der Anwendung chemischer und andererseits physikalischer Verfahren. Dem Einsatz von Enzyminhibitoren auf chemischer Basis sind jedoch im Rahmen des Reinheitsgebotes enge Grenzen gesetzt. Daher kommen zur Stabilisierung der proteolytischen Aktivität nur physikalische Methoden in Frage. Aufgrund der geringen räumlichen Größe von Enzymen können die in der Getränketechnologie angewandten Filtrationsverfahren nur bedingt eine Reduzierung der Enzymgehalte bewirken. Zur sicheren Inaktivierung der proteolytischen Aktivität kann daher nur die Hitzebehandlung angesehen werden. Das Prinzip der Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen geht auf *Pasteur* zurück. Die Inaktivierung von Enzymen ist pH-, Temperatur-, Zeit- und Substratabhängig. Für die in der Brauereiindustrie angewandten Plattenerhitzungsverfahren gibt *Back*⁹⁹, zur Erreichung einer ausreichenden biologischen Sicherheit, einen Wert von 30 Pasteureinheiten an. Die Pasteureinheiten für das Substrat Bier errechnen sich mit: $PE = Z * 1,393^{(T-60)}$ (Z= Zeit in Minuten; T= Temperatur in °C). Zur Bestimmung der thermischen Stabilität der proteolytischen Aktivität im Bier wurden Pasteurisationsbedingungen im Labor nachempfunden. Dabei wurde von einer nach *Narziß*¹⁰⁰ empfohlenen Pasteurisationstemperatur von 68-75 °C bei der schonenden Erhitzung im Plattenapparat ausgegangen. Die aus den Versuchsreihen ermittelten Verläufe sind der Abbildung 41 zu entnehmen.

⁹⁹ Back, W. (2000): Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil II, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, S. 228

¹⁰⁰ Narziß, L. (1986): Abriß der Bierbrauerei, Enke Verlag Stuttgart, S. 299

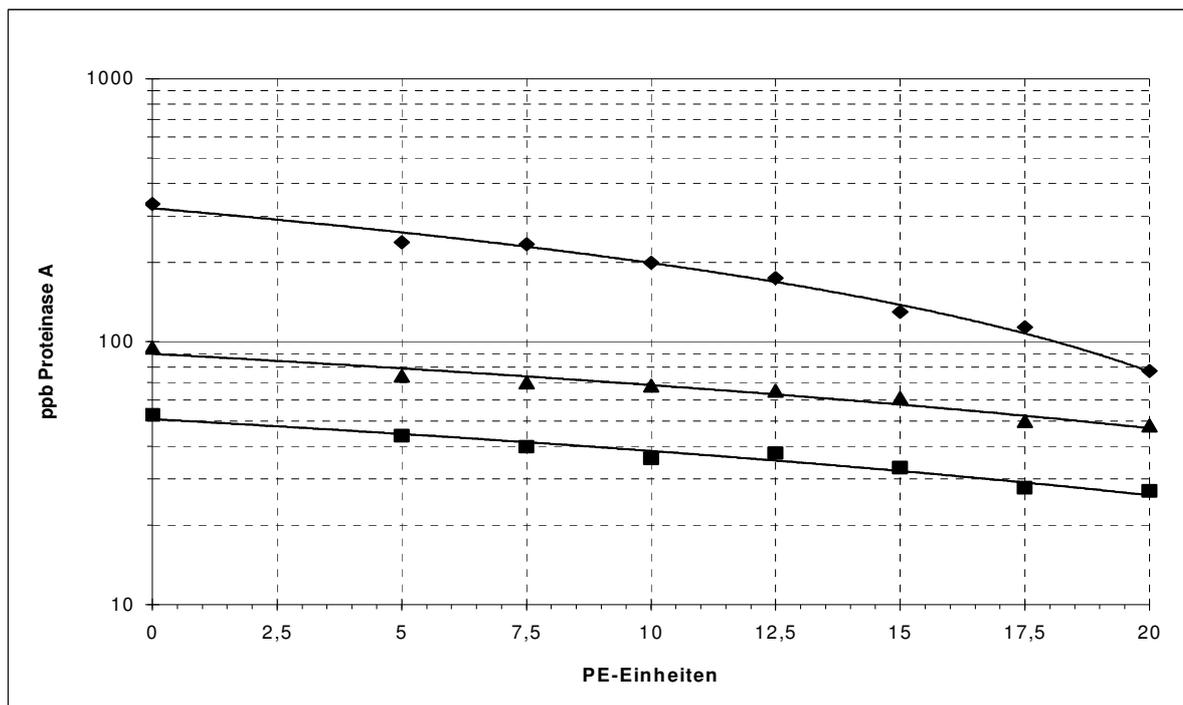


Abb. 41: Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von den Pasteureinheiten

Es zeigt sich deutlich, dass es bei höheren Ausgangskonzentrationen (Abb. 41) zu einem schnelleren Abnehmen der proteolytischen Aktivität während der Pasteurisation kommt. Bei geringeren Konzentrationen ist eine verzögerte Abnahme zu erkennen (Abb. 41). Um jedoch eine sichere Inaktivierung der proteolytischen Aktivität zu gewährleisten, d.h. eine 90 %ige Inaktivierungsrate, müssen die Biere mit über 30 PE-Einheiten kurzzeiterhitzt werden. Siehe hierzu die ermittelten D-Werte in Minuten für eine 90 %ige Inaktivierung in Abbildung 42.

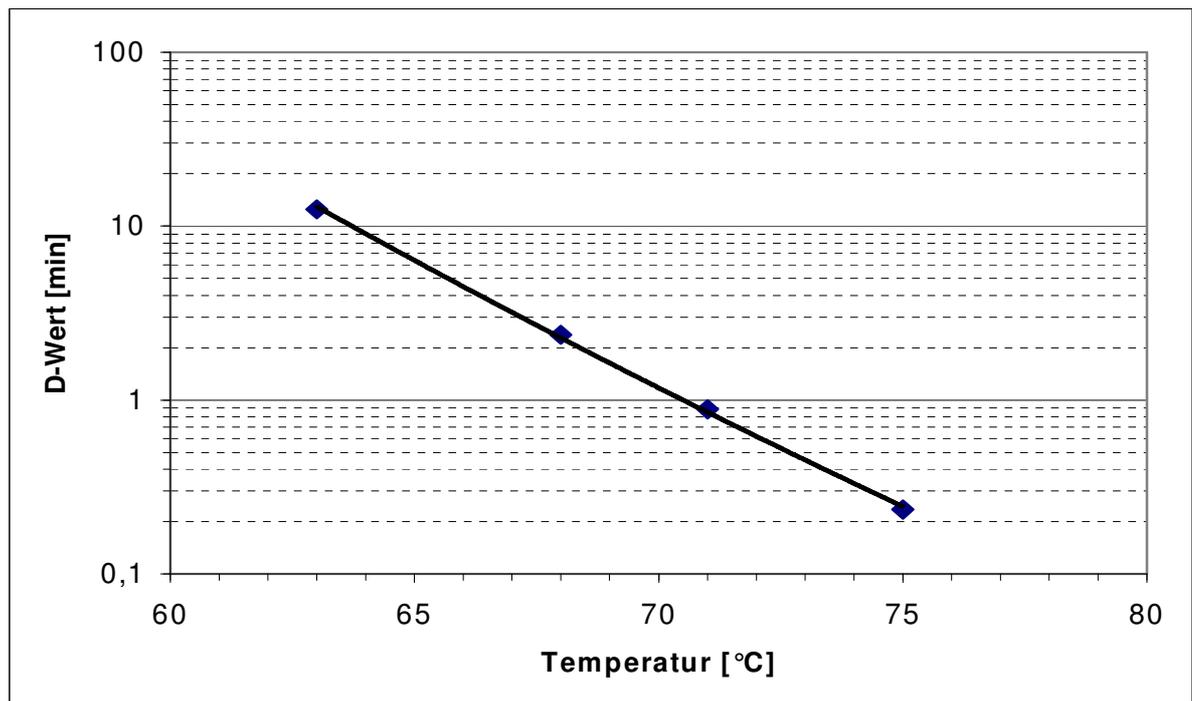


Abb. 42: Thermische Inaktivierung der proteolytischen Aktivität in Bier (90% Inaktivierung)

Aus den für die 90 %ige Inaktivierung gewonnenen D-Werte (Abb. 42) ist zu erkennen, dass bei einer Pasteurisationstemperatur von 62 °C eine Heißhaltezeit von über 10 min erforderlich ist. Dies entspricht ca. 33 PE-Einheiten. Bei höheren Pasteurisationswerten von 75 °C sinkt dementsprechend die Heißhaltezeit auf 0,24 min.

5 Diskussion

Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Bier spielt in der Brauereipraxis bisher meist eine untergeordnete Rolle, da keine für den Praxisbetrieb geeigneten Analysemethoden zur Verfügung standen. Einerseits war die Nachweisgrenze zu hoch (Azocoll, Azocasein) oder es mussten spezielle Analysengeräte (MCA-Methode), z.B. ein Fluoreszenzspektrometer zur Bestimmung angeschafft werden. Mit Hilfe der neu entwickelten Methode konnten im Praxisbetrieb gute Ergebnisse in der Bestimmbarkeit und Verfolgung der proteolytischen Aktivität erzielt werden, da ein im Brauereilabor vorhandener Spektralphotometer eingesetzt werden kann. Die MCA-Methode, die ebenfalls im Rahmen der Arbeit eingesetzt wurde, zeichnet sich dadurch aus, dass die Aminosäuresequenz des Proteinrestes des MCA-Substrates sehr spezifisch auf das Substratspektrum der Proteinase A abgestimmt ist. Es hat sich jedoch eine sehr gute Übereinstimmung der Analyseergebnisse zwischen der MCA Methode und der angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode herausgestellt. Die Nachweisgrenze der angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode konnte soweit gesenkt werden, dass eine Bestimmung der während der Gärung, Reifung und Lagerung auftretenden proteolytischen Aktivitäten möglich wurde.

Proteolytische Aktivität in Praxisbieren

Die Untersuchungen der proteolytischen Aktivität von Praxisbieren zeigten Werte in einen Bereich von 1-10000 ppb. Vor allem Hefeweizenbiere wiesen Aktivitätswerte in einem Bereich von über 1000 ppb auf. Diese hohen Werte sind auf ein Autolysieren der beinhaltenden Hefe zurückzuführen und müssen sich nicht gleich nach der Abfüllung zeigen, sie können sogar während der Flaschenlagerung ansteigen.

Eine Untersuchung der Bierschaumproteinprofile mittels SDS-PAGE, von hefefreien, proteolytisch aktiven Bieren zeigte, dass eine Veränderung zu Lasten der höhermolekularen Fraktionen während der Lagerung zu erkennen ist. Biere, welche bei 37 °C gelagert wurden, zeigten eine stärkere Schwächung dieser Fraktionen als die bei 0 °C gelagerten Vergleichsbiere. Diese Verminderung der höhermolekularen Fraktionen um einen Bereich von 40 kD zeigte sich auch im Unterschied der Schaumverschlechterung der Biere. Da mit hefefreien Bieren gearbeitet wurde, kann diese Schaumverminderung nicht durch ein Einbringen von mittelkettigen Fettsäuren ins Bier erklärt werden.

Bierbereitungstechnologie

Die Betrachtung der proteolytischen Aktivität während der Gärung, Reifung und Lagerung kann als ein indirektes Maß für die Hefevitalität betrachtet werden. Physiologische Stressfaktoren, wie z.B. ein Substratmangel und ein Mangel an Cofaktoren (Zn) führen zu einer schleppenden Gärung und zu vermehrter Proteinaseexkretion der Hefe. Auch der Vergleich mit direkten Messmethoden (Methylenblau-Färbung, ICP-Wert) der Hefevitalität zeigte, dass eine schlechte Hefevitalität mit einer höheren Proteinaseexkretion der Hefe einhergeht. Verbunden mit dem Ansteigen der proteolytischen Aktivität war immer eine Schaumverschlechterung der Probestiere zu beobachten. Hohe Gär-, Lagerungs- und Reifungstemperaturen und wenig vitale Hefe beim Bierbereitungsprozess begünstigen die vermehrte Proteinaseexkretion. Durch das längere Verbleiben der Enzyme am Temperaturoptimum, während z.B. schleppender Gärungen oder hoher Reifungstemperaturen, kommt es zu einer Schaumverschlechterung aufgrund des Abbaus von schaumpositiven Fraktionen. Auch sollte hier ein Freisetzen von mittelkettigen Fettsäuren nicht außer Betracht bleiben.

Wichtig bei der Betrachtung der Proteinasekonzentrationen während der Bierbereitung ist, dass die gemessenen Werte nur Momentaufnahmen sind und die Proteinase ständig einer Selbstverdauung unterliegen, indem sie sich gegenseitig als Substrat nutzen. Hierzu wurden die proteolytischen Aktivitäten von Praxisbieren direkt nach der Abfüllung und nach zweiwöchiger Flaschenlagerung untersucht. Hier zeigte sich, dass bei unterschiedlicher Ausgangskonzentration eine gleichmäßige Abnahme zu den Endkonzentrationen zu verzeichnen war (Abb. 43).

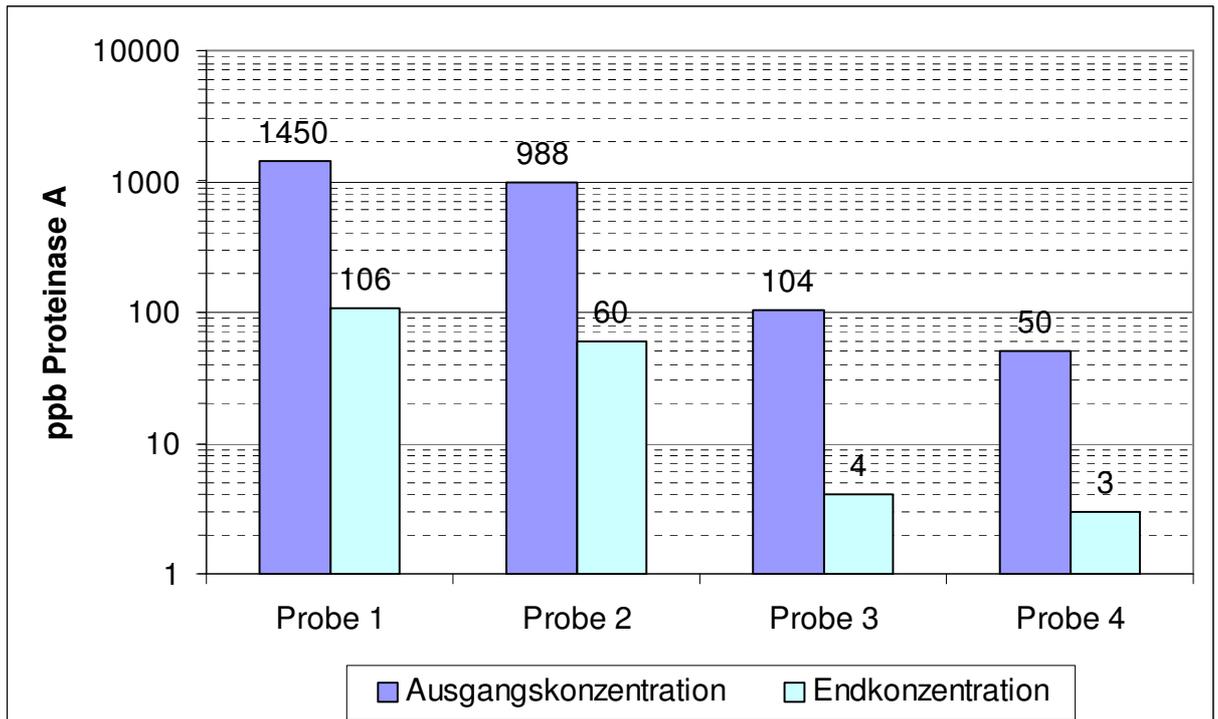


Abb. 43: Abnahme der proteolytischen Aktivität nach zweiwöchiger Flaschenlagerung bei 25 °C

Durchschnittlich sanken die proteolytischen Aktivitäten nach der Lagerung auf einen 20sten Teil der Ausgangskonzentration. Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass die Proteinasekonzentrationen möglichst ständig zu kontrollieren sind und sie durch die Wahl entsprechender Bierbereitungstechnologien, auf einem möglichst geringen Niveau zu halten sind.

Heferasse und Proteinaseexkretion

Der Hefestamm spielt bei der Freisetzung von Proteinase während der Gärung eine große Rolle. Bei den Untersuchungen konnten stammspezifische Unterschiede gefunden werden. Ein Einfluss der Gärtemperatur konnte ebenfalls festgestellt werden. So zeigten manche Teststämme, gerade bei höheren Temperaturen ein vermehrtes Ausscheiden proteolytischer Enzyme. Teststämme, welche aus dem laufenden Betrieb der Brauerei untersucht wurden, zeigten aufgrund einer betriebsspezifischen Anpassung der Hefe weit überhöhte Proteinaseexkretionen.

Einfluss proteolytischer Aktivität auf den Bierschaum

Die Zugabe von Hefeautolysat mit hoher proteolytischer Aktivität zu Probebieren zeigte eine zeitabhängige Abnahme der Schaumhaltigkeit. Die Abnahmen der Schaumwerte nach *Ross & Clark* und *NIBEM* korrelierten mit zunehmender proteolytischer Aktivität. Der Einfluss anderer schaumzerstörender Hefeinhaltsstoffe wurde durch die Testbedingungen weitgehend ausgeschlossen. Bei Untersuchungen zur Schaumhaltigkeit unpasteurisierter Praxisbiere konnte keine Korrelation zwischen proteolytischer Aktivität und Schaumhaltigkeit gefunden werden. Dies kann daran liegen, dass die schaumaktiven Proteinfractionen schon im Produktionsprozess geschädigt worden sind und dadurch nicht mehr als Substrat für die Proteinase zur Verfügung stehen. Ein weiterer Grund für die schlechte Korrelation kann in der Vielfältigkeit der schaumaktiven Substanzen und deren Veränderung während der Bierbereitung gesehen werden. Es sind jedoch Zusammenhänge zwischen der Veränderung der Molekulargewichtsverteilung anhand von SDS-PAGE-Densitogrammen von proteolytisch aktiven Bieren und der Schaumhaltigkeit dieser Biere festgestellt worden.

Inaktivierung der proteolytischen Aktivität in Bier

Zur Inaktivierung der proteolytischen Aktivität in Bier kann nur eine Kurzzeiterhitzung oder eine Flaschenpasteurisation in Frage kommen. Die in der Brauereitechnologie oft angewandten Pasteureinheiten (14 PE), zur Sicherung einer mikrobiologischen Stabilität reichen zur Inaktivierung von 90 % der proteolytischen Aktivität nicht aus. Um eine sichere Inaktivierung und proteolytische Stabilität zu erreichen sind daher Pasteurisationsraten von über 33 PE zu empfehlen.

Besser als eine Inaktivierung der proteolytischen Aktivität im Nachhinein ist es jedoch durch die Wahl schonender Bierbereitungstechnologien die Proteinaseexkretion schon während der Herstellung auf einem möglichst geringen Wert zu halten, da schaumpositive Einweißfraktionen schon während des Bierbereitungsprozesses, durch eine proteolytische Aktivität, geschädigt werden können.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einflüsse proteolytischer Enzyme, welche von der Hefe ausgehen, auf den Bierschaum untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Hefe großen Einfluss auf die Schaumhaltbarkeit des Bieres hat. Obwohl die Bestimmung des Bierschaums ein sehr schwierig zu kontrollierendes Qualitätsmerkmal darstellt, konnten Beziehungen von Hefevitalität und Bierschaum dargestellt werden.

Es wurden enzymatische Methoden weiterentwickelt, mit denen eine einfache Bestimmung der proteolytischen Aktivität im Bier möglich wurde. Mit Hilfe elektrophoretischer Methoden ist eine Charakterisierung der am Schaum beteiligten Proteinfractionen und deren Veränderung durch den Einfluss proteolytischer Enzyme möglich geworden.

Die zur Bierbereitung wichtigen Faktoren Gär-, Lagerungs- und Reifungsparameter, die Hefevitalität und der Einfluss von Cofaktoren sind untereinander kombiniert untersucht worden.

Folgende schaummindernden Effekte, die von der Hefe ausgehen, sind durch neue Analysemethoden untermauert worden:

- Die proteolytische Aktivität im Bier geht hauptsächlich von Proteinase A aus.
- Die Hefevitalität hat großen Einfluss auf die proteolytische Aktivität im Bier.
- Ein Mangel an Cofaktoren, vor allem Zink, führt zu höheren proteolytischen Aktivitäten im Bier.
- Hohe Gär-, Lagerungs- und Reifungstemperaturen führen zu schlechten Schaumwerten im Bier und zu höheren proteolytischen Aktivitäten während und nach dem Bierherstellungsprozess.

- Die Messung der proteolytischen Aktivität stellt immer nur eine Momentaufnahme der Situation dar, da es immer wieder zu einem Selbstabbau der Enzyme kommt.
- Die hauptsächlich in frischen Bieren zu findenden positiven Proteinfractionen haben ein Molekulargewicht von 14 und 44 kD. Durch die Einwirkung von proteolytischen Enzymen der Hefe kommt es zu einem Abbau vor allem der 44 kD Fraktion hin zu niedermolekularen Fraktionen.
- Der Abbau der schaumpositiven Fraktionen ist auch in einem Rückgang der Schaumhaltbarkeit zu beobachten.
- Die zur Inaktivierung der proteolytischen Aktivität notwendigen PE-Einheiten liegen bei über 30 PE.
- Besser als eine Inaktivierung der Enzyme am Ende des Bierherstellungsprozesses ist die Vermeidung der Exkretion der Enzyme durch geeignete Bierherstellungsverfahren schon von Anfang an.

Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass Bierschaum nicht nur auf einer guten Auswahl der Rohstoffe basiert, sondern auch auf einer schonenden Weiterverarbeitung zum fertigen Produkt beruht.

Literaturverzeichnis

- Ammerer, G., Hunter, C.P., Rothman, J.H., Saari, G.C., Valts, L.A., Stevens, T.H. (1986): Molecular and Cell Biology , **6**
- Anton Paar GmbH (1996): FTS Anleitung zur Schaumerzeugung, Graz
- Back, W. (2000): Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil II, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg
- Back, W., Imai, T., Forster C., Narziß, L. (1998): Hefevitalität und Bierqualität, Monatsschrift für Brauwissenschaft, **11/12**
- Bamforth, C.W. (2000): Beer quality series, Foam, Brewers` Guardian, 4,
- Bamforth, C.W. (1985): The Foaming Properties Of Beer, Journal of the Institute of Brewing, **91**
- Bamforth, C.W. und Jackson, G. (1983): Aspects of foam lacing. Proceedings of the EBC Congress, London
- Belitz, H.D, Grosch, W. (1992): Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag
- Briem, F. (1993): Technologische und immunchemische Untersuchungen über das Verhalten und den Einfluß von Bierinhaltsstoffen und Hefeproteinase auf die Bierqualität, Dissertation, TU-München
- Bronn, W.K.: Vorlesungsskript Technologie der Hefefabrikation - Backhefe, Versuchsanstalt der Hefeindustrie, TU-Berlin, Kap. 4.6
- Doerffel, K. (1987): Statistik in der analytischen Chemie, VCH Verlagsgemeinschaft
- Dreyer, T. (1989): Yeast Proteinase in Beer, Carlsberg Research Communications, **54**
- Dreyer, T., Biedermann, K., Ottesen, M. (1983): Yeast Proteinase in Beer, Carlsberg Research Communications, **48**
- Dreyer, T., Halkier, B., Sevensen, I., Ottesen, M. (1986): Yeast Proteinase in Beer, Carlsberg Research Communications, **54**
- Drost, M. und Arnould, G. (1997): Vergleich des Foam Test System (FTS): von Anton Paar GmbH mit dem NIBEM Foam-Stability-Tester von Haffmans, Zürich

- Evans, D.E. und Hejgaard (1999): The Impact of Malt Derivated Proteins on Beer Foam Quality, Journal of the Institute of Brewing, **105**
- Fath, R. und Sommer, K. (1985): Physikalische Aspekte der Schaumstabilität, Monatsschrift für Brauwissenschaft, **38**
- Furukubo, S., Matsumoto, Y., Yomo, M., Fukui, N., Aschikari, T. und Kakimi, Y. (1997): Proceedings of the European Brewery Congress, Maastricht
- Gommelt, T. (1987): Verhalten von Proteinasen während der Gärung und Lagerung des Bieres und deren Einfluss auf die Schaumqualität, Diplomarbeit, TU-München
- Grassmann, H., Dyckerhoff (1928): Hoppe-Seyler's Physiologische Chemie, 41
- Haugsted, C. und Erdal, K. (1993): Further results obtained the opto-electrical foam assay system, Proceedings of the European Brewery Congress, Dublin
- Hegarty, P.K. und Crompton, I.E. (1990): Factors affecting foam stability, Proceedings of the European Brewery Congress, Dublin
- Hegarty, P.K., Cope, R., Crompton, I.E., und Wallach, E.R. (1991): An image analysis system for measuring beer foam stability, Proceedings of the EBC Congress, Zürich
- Heggart, H.M., Margartis, A., Pikington H., Stewert, R.J., Dowhanick, T.M. und Rusell, I. (1999): Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics A Review, MBAA Technical Quarterly, **36**
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1988): Improved silver staining procedure for PhastSystem development unit, Electrophoresis, **9**
- Heyse, K.U. (1994): Handbuch der Brauereipraxis
- Jegou, S., Douliez, J.P., Molle, D., Boivin, P., Marion, D. (1999): Proceedings of the EBC Congress, Cannes
- Johnson, M. J. (1941): Biological Chemistry, **575**
- Kamm, G. (1966): Über den Schaum allgemein und den des Bieres, Brauwelt, **31/32**
- Karlson, P. (1980): Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Enke Verlag, Stuttgart
- Klopper, W.J. (1972): Neue Untersuchungen über Schaumstabilität, Fermentatio, **68**

- Kondo, H., Yomo, H., Furukubo, S., Fukui, N., Nakatani, K., Kawasaki, Y. (1999): Advanced Method for Measuring Proteinase A in Beer and Application to Brewing, Journal of the Institute of Brewing, **105**
- Kortüm, G. (1962): Kolorimetrie, Photometrie und Spektroskopie, Anleitung für die chemische Laboratoriumspraxis, Springer-Verlag
- Kunze, W. (1994): Technologie Brauer und Mälzer, VLB Berlin, 7. Auflage
- Lange, H. (1972): Schäume und ihre Stabilität, VDI-Berichte, **182**
- Langer, O. (1997): Vergleich des Foam Test Systems (FTS): der Anton Paar GmbH mit NIBEM Foam-Stability-Tester von Haffmans und der Methode nach Ross & Clark, Semesterarbeit, TU-München
- Mändl, B. (1966): Maßnahmen zur Schaumverbesserung der Biere, Brauwelt, **106**
- McLaren, J.I., Fischborn, T., Briem, F., Englmann, J., Geiger, E. (1999): Zinkproblem gelöst ?, Brauwelt, **45/46**
- MEBAK (1993): Brautechnische Analysenmethoden Band II, Freising
- Meusdorfer, F., Tortora, P. und Holzer, H. (1980): Purification and Properties of Proteinase A from Yeast, The Journal of Biological Chemistry, **255**, 24
- Moddox, I. S., Hough, J. S. (1955): Proteolytic Enzymes and Autolysing Brewers' Yeast, Proceedings of the European Brewery Congress, Interlaken
- Murakami, K., et al (1981): New fluorogenic Substrates for Renin, Analytical Biochemistry, **110**
- N.N. (1988): Enzyme Handbook, Springer Verlag, Band 13
- N.N.: Beilage zum Universellen Proteasen-Substrat, Boehringer Mannheim
- N.N. (2000): Schaummessung auf den Zahn gefühlt, Brauwelt, **9/10**
- N.N.: Gebrauchsanweisung Schärfe GmbH
- Narziß, L. (1978): Der Bierschaum, Brauwelt, **29**
- Narziß, L. (1986): Abriß der Bierbrauerei, Enke Verlag Stuttgart
- Narziß, L. (1995): Abriß der Bierbrauerei, Enke Verlag Stuttgart
- Narziß, L., Miedaner, H., Gresser, A. (1983): Heferasse und Bierqualität, Brauwelt, **13**
- Narziß, L., Reicheneder, E. (1987): Untersuchungen über die Schaumschädigung des Bieres durch Hefeproteinasen, Brauwelt, **21**

- Narziß, L., Reicheneder, E. und Barth, D. (1982): Über den Beitrag von hochmolekularen Proteinfractionen und Glykoproteiden zum Bierschaum, Monatsschrift für Brauwissenschaft, **9**
- Nielsen, H., Hoybye-Hansen, I. (1988): Beeinträchtigung des Bierschaums durch Enzyme der Hefe, Brauwelt, **3**
- Ohlenschläger, Berger, Depner (1980): Electrophoresis, Darmstadt
- Oka, K. (1994): Interne Mitteilung
- Oka, K. (1994): Vergleich der zwei Bestimmungsmethoden der Proteinaseaktivität aus Hefe (MCA oder Azocasein als Substrat), interne Mitteilung
- Reicheneder, E. :Institutsmethode zur Bestimmung von Proteinase im Bier mit Azocoll als Substrat, interne Mitteilung
- Reicheneder, E. :Institutsmethode zur Bestimmung von Proteinase im Bier mit Azocasein als Substrat, interne Mitteilung
- Reicheneder, E. und Narziß, L. (1989): Untersuchungen von Hefeproteinase auf den Bierschaum, Proceedings of the EBC Congress, Zürich
- Roberts, R.T. (1977): Colloidal Aspect of Beer Foam, The Brewers Digest, June 1977
- Ronteltap, Hollemans, Bisperik und Prins (1991): Interaction Between Beer Protein And Isohumulone, Journal of the Institute of Brewing, **82**
- Röttger, W. (1972): Über den Einfluss des Mälzungs- und Brauverfahrens auf die Molekulargewichtsverteilung der Stickstoffsubstanzen in Würze und Bier, Dissertation, TU-München
- Rudin, A.D. (1957): Measurement of the foam stability of beer, Journal of the Institute of Brewing, **63**
- Schur, F. (1987): Frühindikatoren für das Schaumbild des Bieres, Schweizer Brauereirundschau, **98**
- Sörensen, Bech, Muldbjerg, Beenfeld und Breddam (1993): Barley Lipid Transfer Protein 1 is Involved in Beer Foam Formation, MBAA Technical Quarterly, **30**
- Strien, J.v. und Wassenaar, F.R. (1990): Measurement of the cling of beer, Monatsschrift für Brauwissenschaft, **43**

- Tuite, M., Oliver, S. (1991): Saccharomyces, Biotechnologie Handbooks, 4
- Twining, S.S. (1984): Analytical Biochemistry, **143**
- Unkel, M. (1987): Der Bierschaum - Erfahrungen aus der Praxis der Betriebsberatung, Brauwelt, **127**
- Voigt, J.C. (1992): Untersuchungen zur Beschreibung der proteinischen Fraktion des Bierschaums und deren Beeinflußung durch technologische Faktoren, Dissertation, TU-München
- Weyh, H. (1987): Die Schaumhaltbarkeit nach der Analyse und im Glas, Monatsschrift für Brauwissenschaft, **40**
- Weyh, H. (1988): Zur Reproduzierbarkeit von Schaummessungen, Monatsschrift für Brauwissenschaft, **41**
- Wilson, P.J. und Mundy, A.P. (1984): An improved methode for measuring beer foam collapse, Journal of the Institute of Brewing, **90**
- Yokoi, S., et al (1996): A fluorometric Assay for Proteinase A from Yeast, Analytical Biochemistry, **134**
- Yokosawa, H., et al (1983): Purification and Fluorometric Assay of Proteinase A from Yeast, Analytical Biochemistry, **134**
- Zürcher, C. und Krauß, G. (1971): Freie niedere Fettsäuren und ihre Ethylester als Bieraromastoffe und Schaumzerstörer, Monatsschrift für Brauerei, **24**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
ASBC	American Society of Brewing Chemists
Best.	Bestell
BSZ	Z forms of <u>B</u> arley <u>s</u> erine proteinase inhibitor Proteins
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
D	Dalton
d.h.	das heißt
dest.	destilliert
dpi	dots per inch
E	Extinktion
EBC	European Brewery Convention
EC-Nr	Enzyme Commission (Enzym Kommission der internationalen Union für Biochemie) Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Es	scheinbarer Extrakt
Fa.	Firma
FAN	Freier Aminostickstoff
g	Erdbeschleunigung
Ges. N	Gesamtstickstoff
GG%	Gewicht/Gewicht Prozent
GNP	Gärungsnebenprodukte
GV	Gewicht/Volumen
ICP	intracellular pH
IOB	Institute of Brewing
Konz.	Konzentration
konz.	konzentriert
LPT	Lipid Transfer Protein
MBAA	Masters Brewers Association of the Americas
MCA	Methylcoumarin
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission
N	Stickstoff
NIBEM	Netherlands Institute for Malting Barley, Malt and Beer Research
Nr.	Nummer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Personal Computer
Prot.	Proteinase
r	Korrelationskoeffizient
R&C	Schaumhaltbarkeit nach Ross & Clark
R ²	Bestimmtheitsmaß
RB	Restbier
rel.	relativ
SB	Schaumbier
SCABA	Servo Chem Automatic Beer Analyzer

SDS	Sodium dodecyl sulphate, Natriumdodecylsulfat
SR	Schaumrest
t	Temperatur
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	Technische Universität
U	Umdrehung
U/min	Umdrehung pro Minute
Z	Zeit
z.B.	zum Beispiel
ZKG	Zylindrokonischer Gärtank

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Hypothetischer Mechanismus der Exkretion von Proteinase A in lebenden Hefezellen nach *Kondo et. al.*
- Abb. 2: Versuchsaufbau zur Schaumfraktionierung
- Abb. 3: SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegegel zur Molekulargewichtsbestimmung
- Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der ICP-Methode nach *Back/Imai*
- Abb. 5: Kalibrierung zur Azocoll-Methode
- Abb. 6: Kalibrierung zur Azocasein-Methode
- Abb. 7: Kalibrierung zur MCA-Methode
- Abb. 8: Kalibrierung zur Casein, Resorufin-markiert Methode nach *Twining/Boehringer*
- Abb. 9: Abhängigkeit der Extinktionen von unterschiedlichem Inkubations-pH und Wellenlängen in Bier mit hoher proteolytischer Aktivität bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C
- Abb. 10: Kalibrierung zur angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode
- Abb. 11: Beispiel einer Kalibrierung zur angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode zwischen 10 bis 100 ppb Proteinase A mit linearer Auftragung der Ausgleichsgeraden
- Abb. 12: Beispiel einer Kalibrierung zur angepassten Casein, Resorufin-markiert Methode zwischen 10 bis 100 ppb Proteinase A mit logarithmischer Auftragung der Ausgleichsgeraden
- Abb. 13: Prozentuale Verteilung der Proteinasengehalte in ppb Proteinase A in untersuchten Praxisbieren
- Abb. 14: Anstieg der Proteinasekonzentrationen, beider Hefestämme bei Normaldruck und einer Lagertemperatur von 0, 4 bzw. 11 °C in Wasser über die Lagerdauer
- Abb. 15: Anstieg des Anteils toter Hefezellen, beider Hefestämme bei Normaldruck und einer Lagertemperatur von 0, 4 bzw. 11 °C in Wasser über die Lagerdauer
- Abb. 16: Veränderung des Proteinasengehalts im Überstand im Vergleich zur Anzahl toter Zellen über die Lagerdauer bei 4 bzw. 11 °C aus dem Durchschnitt beider Hefestämme
- Abb. 17: Beziehung zwischen Schaumhaltigkeit und Hefevitalität
- Abb. 18: Beziehung zwischen Proteinaseaktivität und der Hefevitalität
- Abb. 19: Proteinasekonzentrationen nach Gärung, Reifung und Lagerung bei Variation der Anstellzellzahl
- Abb. 20: Schaumwerte nach *Ross & Clark* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C
- Abb. 21: Schaumwerte nach *NIBEM* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C
- Abb. 22: Proteinasekonzentrationen nach Gärung, Reifung und Lagerung bei Variation der Hefevitalität

- Abb. 23: Schaumwerte nach *Ross & Clark* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C
- Abb. 24: Schaumwerte nach *NIBEM* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C
- Abb. 25: Proteinasekonzentrationen nach Gärung, Reifung und Lagerung bei Variation der Gärtemperatur
- Abb. 26: Schaumwerte nach *Ross & Clark* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C
- Abb. 27: Schaumwerte nach *NIBEM* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C
- Abb. 28: Proteinasekonzentrationen in Abhängigkeit der Reifungstemperatur
- Abb. 29: Schaumwerte nach *Ross & Clark* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C
- Abb. 30: Schaumwerte nach *NIBEM* nach Abfüllung und nach 120 Tagen Lagerung bei 20 °C
- Abb. 31: Extraktabnahme der Versuche bei isothermer Gärung bei 9 °C
- Abb. 32: Verlauf der Zunahme der Proteinasekonzentration der Versuche während isothermer Gärung bei 9 °C
- Abb. 33: Veränderung der Proteinasekonzentration während der Gärung bei 4 °C
- Abb. 34: Veränderung der Proteinasekonzentration bei einer Gärtemperatur von 9 °C
- Abb. 35: Relative Schaumabnahme nach *Ross & Clark* in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration
- Abb. 36: Relative Schaumabnahme nach *NIBEM* in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration
- Abb. 37: Abnahme *Ross & Clark*-Schaumpunkte in Prozent in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration
- Abb. 38: Abnahme *NIBEM*-Schaumpunkte in Prozent in Abhängigkeit der Proteinasekonzentration
- Abb. 39: Densitogramme der Schaumproteinfraktionen RB, SB, SR eines Bieres im frischen und im gealterten Zustand (0 °C, 37 °C)
- Abb. 40: Temperaturabhängigkeit der Proteinaseaktivität in Bier
- Abb. 41: Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von den Pasteureinheiten
- Abb. 42: Thermische Inaktivierung der proteolytischen Aktivität in Bier (90% Inaktivierung)
- Abb. 43: Abnahme der proteolytischen Aktivität nach zweiwöchiger Flaschenlagerung bei 25 °C

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Übersicht über die Einflussfaktoren auf die Schaumhaltbarkeit
- Tabelle 2: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Azocoll nach *Reicheneder*
- Tabelle 3: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Azocasein nach *Reicheneder*
- Tabelle 4: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels MCA nach *OKA*
- Tabelle 5: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Casein, Resorufin-markiert nach *Twining/Boehringer*
- Tabelle 6: Durchführung der Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels angepasster Casein, Resorufin-markiert Methode
- Tabelle 7: Markerproteingemisch der Firma LKB Biotechnologie
- Tabelle 8: Färbetechnik: (in Anlehnung an *Heukeshoven*)
- Tabelle 9: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung der Azocoll-Methode. Angabe in rel. Extinktion
- Tabelle 10: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung zur Azocasein-Methode, Angabe in rel. Extinktion
- Tabelle 11: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung zur MCA-Methode (Verdünnung 1:10), Angabe in rel. Fluoreszenz
- Tabelle 12: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung zur Casein, Resorufin-markiert Methode
- Tabelle 13: Messergebnisse zur Ermittlung der Kalibrierung zur Casein, Resorufin-markiert Methode
- Tabelle 14: Vergleich der Nachweisgrenzen und Absolutfehlern der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Proteinase A
- Tabelle 15: Anteil der in unpasteurisierten Praxisbieren vorkommenden Proteinasegehalte in ppb Proteinase A
- Tabelle 16: Analysenwerte des Ausgangszustandes der Hefestämme 1 und 2
- Tabelle 17: Stickstoffverhältnisse der Anstellwürze und der fertigen Biere
- Tabelle 18: Stickstoffverhältnisse der Anstellwürze und der fertigen Biere
- Tabelle 19: Stickstoffverhältnisse der Anstellwürze und der fertigen Biere
- Tabelle 20: Untersuchte Teststämme
- Tabelle 21: Veränderung der Schaumhaltezeiten bei **Hellen Vollbieren** bei Lagerung über vier Wochen bei 20 °C
- Tabelle 22: Veränderung der Schaumhaltezeiten bei Bieren nach **Pilsener** Brauart bei Lagerung über vier Wochen bei 20 °C

- Tabelle 23: Veränderung der Schaumhaltezeiten bei **Hefeweizenbieren** bei Lagerung über vier Wochen bei 20 °C