

**Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II der
Technischen Universität München**

Beurteilung der Bierqualität anhand unterschiedlicher Reduktonklassen

Johannes Burkert

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 (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c.(Zonguldak Univ./Türkei) H. Parlar

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Geiger
2. apl. Prof. Dr. D. Wabner

Die Dissertation wurde am 23.08.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.10.2005 angenommen.

Mein herzlicher Dank gilt:

meinen geschätzten Doktorvätern Herrn Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger und Prof.Dr. Dr. Dietrich Wabner für die vorbildliche Betreuung dieser Arbeit,

der Wissenschaftlichen Station für Brauerei München e.V. und dem Bayerischen Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten für die großzügige finanzielle Unterstützung,

der Bayerischen Staatsbrauerei Weihenstephan, dem Hofbrauhaus Freising, der Paulaner Brauerei München und der Spaten-Franziskaner-Bräu München für die Bereitstellung von Probenmaterial,

Dr. Robert Neumann für die Unterstützung bei Problemen der Software und der Elektronik,

meinen Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II Dipl.-Ing. Andreas Brandl, Irmgard Frey, Hildegard Giebels, Christine Volk, Christa Huf, Susan Illing, Dipl.-Ing. Armin Koller, Dipl.-Ing.Marc Kusche, Dr. Andreas Papp, Dr. Georg Stettner, Dr. Christoph Tenge, Christl Volkhart, Dr.Diethard Wagner, Dipl.-Ing. Urs Wellhoener und Dr. Michael Zepf für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und ihre große Hilfsbereitschaft,

insbesondere meiner Ehefrau und Kollegin Beate Burkert für praktische und moralische Unterstützung,

meinen Kollegen von der Arbeitsgruppe Angewandte Elektrochemie und Chemische Umwelttechnik Katrin Geier, Dr. Derk Horstkotte, Dr. Peter Pfeifer, Dr.Tina Renner, Dr.Oliver Specht, MA Matthias Wanckel und Dr. Ilse Wurdack für ihre Unterstützung in Garching,

Herrn Dipl.-Ing. Daniel Wittek und Herrn cand. Ing. Christian Fuhrmann für ihre vorbildliche Mitarbeit.

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung und Problemstellung	8
3	Experimentelles	11
3.1	Verwendete Chemikalien	11
3.2	Der elektrochemische Analysenautomat	12
3.2.1	Die verschiedenen elektrochemischen Messverfahren	12
3.2.1.1	Cyclovoltametrie in Bier	12
3.2.1.2	Bestimmung der Reduktionskraft innerhalb einer festgelegten Reaktionszeit (Elektrochemischer Indikator-Time-Test)	17
3.2.1.3	Bestimmung der Reduktonverteilung	19
3.2.2	Die Messapparatur	20
3.2.3	Praktische Durchführung der elektrochemischen Messungen	23
3.3	Herkömmliche Analysen zum Vergleich	28
3.3.1	Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene	28
3.3.1.1	Gesamtpolyphenole	28
3.3.1.2	Anthocyanogene	28
3.3.2	Bestimmung der reduzierenden Substanzen nach Chapon	29
3.3.3	Diphenylpicrylhydrazyl-reduzierende Aktivität	29
3.3.4	HPLC-Bestimmung einzelner phenolischer Substanzen	30
3.3.5	Enzymatische Schwefeldioxidbestimmung	33

3.4	Bierbereitung im Technikum	34
3.4.1	Substrat	34
3.4.2	Gärung und Lagerung	34
3.4.3	Filtration	35
3.4.5	Abfüllung	35
4	Ergebnisse und Diskussion	36
4.1	Zusatz von phenolischen Substanzen	36
4.1.1	Zusatz von phenolischen Substanzen zum abgefüllten Bier	36
4.1.2	Zusatz zu Würze und Schlauchbier	43
4.2	Einfluss von Sauerstoff bei Drucktankbier	54
4.3	Einfluss der Belüftungstechnologie	
4.3.1	Einfluss intensiver Belüftung (Flotation)	67
4.3.2	Einfluss der Zweitbelüftung	94
4.3.3	Verzicht auf Belüftung	123
4.4	Stabilisierung	143
4.4.1	Verhalten der Reduktone im Verlauf der Stabilisierung	143
4.4.1.1	Eiweißseitige Stabilisierung	144
4.4.1.2	Polyphenolseitige Stabilisierung	149
4.4.2	Einfluss von unterschiedlichen Stabilisierungsmethoden und Sauerstoff	157
4.4.2.1	Reine Kieselgurfiltration	157

4.4.2.2	PVPP-stabilisiertes Bier	162
4.4.2.3	Veränderung der Messwerte durch das Forcieren	166
4.5	Einfluss der Gärtemperatur	173
4.6	Alterung großtechnisch hergestellter Biere	191
4.7	Veränderung des Potentialfensters bei der Cyclovoltametrischen Messung zur Erhöhung der Spezifität gegenüber Radikalfängern	194
5	Untersuchungen an Äpfeln von unterschiedlich gedüngten Bäumen	197
5.1	Hintergrund	197
5.2	Material und Methoden	197
5.3	Ergebnisse und Diskussion der Messungen an Äpfeln	201

6	Gesamtdiskussion	210
6.1	Ergebnisse der elektrochemischen Messungen in Bezug zu den redoxrelevanten Stoffklassen	210
6.1.1	Phenolische Substanzen	210
6.1.2	Melanoidine	215
6.1.3	Schwefeldioxid	217
6.1.4	Andere Reduktone	218
6.2	Der Begriff der Reduktone	219
6.3	Verhalten der Reduktone während des Brauprozesses	222
6.4	Technologische Bedeutung der elektrochemischen Messergebnisse und praktische Einsatzmöglichkeiten	225
6.5	Verbesserungen am Elektrochemischen Analysenautomaten	229
7	Ausblick	230
8	Abbildungsverzeichnis	232
9	Tabellenverzeichnis	239
10	Abkürzungsverzeichnis	240
11	Literatur	241

1 Zusammenfassung

Durch Sauerstoff wird die Bierqualität in vielerlei Hinsicht negativ beeinflusst. Einen Schutz vor dieser Oxidation bieten reduzierende Substanzen, die auch oft als Reduktone bezeichnet werden. Diesen Substanzen werden zusätzlich noch positive sensorische und gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Deshalb wurden zahlreiche Methoden entwickelt, um den Gehalt an diesen Substanzen abzuschätzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die von Mitarbeitern der „Arbeitsgruppe Angewandte Elektrochemie und Chemische Umwelttechnik“ entwickelten Messmethoden auf ihre Anwendbarkeit für die Brauereianalytik geprüft. Der „Elektrochemische Analysenautomat“ kann mittels eines cyclovoltametrischen Verfahrens einen reproduzierbaren Wert für das Redoxpotential, das „Mittlere Nullstrompotential“ von Bier und Zwischenprodukten bestimmen. Ein niedriges Potential bedeutet einen höheren Gehalt an reduzierenden Substanzen. Bisherige Verfahren der klassischen stromlosen Potentialmessung dagegen konnten aufgrund vieler irreversibler Redoxprozesse im Bier keinen reproduzierbaren und allgemeingültigen Wert für das Redoxpotential liefern.

Auch die Reduktionskraft der Bierreduktone gegenüber Dichlorophenol-Indophenol (DCI) wird elektrochemisch detektiert. Durch eine spezielle Kalibrierung mit Ascorbinsäure gelingt es bei dieser Messung, im Gegensatz zu den meisten herkömmlichen Bestimmungen der Reduktionskraft, einen objektiven Wert für die tatsächliche Wirkung der Reduktone in der Matrix Bier zu ermitteln. Dabei wird im Anschluss an die eigentliche Messung ein Teil des verbliebenen DCI durch eine definierte Ascorbinsäuremenge reduziert und das reduzierte DCI ebenfalls elektrochemisch detektiert. Bildet man das Verhältnis der beiden so ermittelten Werte (Stromstärke), gewinnt man einen objektiven, reproduzierbaren Summenparameter („Stromverhältnis“) für die Reduktionskraft des Bieres. So kann erstmals relativ unabhängig von den Reaktionsbedingungen (u.a. der Temperatur und der Menge des tatsächlich gelösten DCI) ein Wert für die Reduktionskraft ermittelt werden, der als allgemeingültiger Summenparameter die reduzierende Kraft des Substrats im Verhältnis zur reduzierenden Kraft einer definierten Menge Ascorbinsäure anzeigt. Dadurch sind die Werte verschiedener Labors erstmals untereinander vergleichbar, was bei anderen Methoden aufgrund vieler Faktoren, die die komplexen Redoxreaktionen beeinflussen, nicht der Fall war.

Zusätzlich ermöglicht es die elektrochemische Detektion, auch trübe oder dunkle Proben zu messen, wofür die photometrischen Verfahren ungeeignet sind. Dadurch fällt eine aufwändige Probenvorbereitung weg, bei der durch Sauerstoffeinfluss die Ergebnisse verfälscht werden können.

Bei dieser Bestimmung der Reduktionskraft (Elektrochemischer Indikator-Time-Test) kann durch Variation der Reaktionszeiten zwischen schnell-, mittelschnell- und langsamreduzierenden Reduktionen unterschieden werden.

Die Ergebnisse dieser elektrochemischen Messungen wurden mit den Analysenwerten anderer Methoden verglichen. Dabei handelte es sich um andere summarische Parameter der Reduktionskraft und auch Bestimmungen bestimmter Antioxidantien, wie phenolischen Substanzen und Schwefeldioxid.

Es konnte festgestellt werden, dass gerade die Abnahme schnellreduzierender Substanzen ein Indikator für Sauerstoffbelastung ist. Eine übermäßige Sauerstoffbelastung kann auch durch ein erhöhtes Potential nachgewiesen werden.

Die bedeutende Gruppe der phenolischen Reduktionen hat einen großen Einfluss auf das Potential. Eine Entfernung durch Stabilisierungsmaßnahmen steigert das Potential und ein Zusatz dieser Substanzen senkt das Potential. Hinsichtlich der Reduktionklassen gehören diese phenolischen Substanzen, die auch starke Radikalfängerqualitäten besitzen, zu den langsamreduzierenden Substanzen oder Substanzen, die nicht mit DCI reagieren.

Ein hoher Gehalt an phenolischen Substanzen, wie bei einem Verzicht auf PVPP-Stabilisierung vorhanden, trägt bei Bieralterung und erhöhter Sauerstoffbelastung zum Erhalt eines niedrigen Potentials und auch aller Reduktionklassen bei und stärkt damit die Reduktionskraft.

Es konnte auch mittels der Elektrochemischen Messungen und Referenzmethoden nachgewiesen werden, dass technologische Verfahren wie Zweitbelüftung oder intensive Belüftung (z.B. Flotation) das Substrat schädigten und selbst im fertigen Bier ein ungünstigerer Redoxzustand zu finden war.

Für Versuchsreihen, bei denen die Parameter der Gärung verändert wurden, konnte der Schwefeldioxidgehalt als wichtiger Einflussfaktor sowohl auf die Reduktionskraft als auch das Potential ausgemacht werden.

Hinsichtlich der Entwicklung des Gehaltes an Reduktionen während des Bierbereitungsprozesses wurde festgestellt, dass die schnellreduzierenden Substanzen während der Gärung, Lagerung und Filtration abnehmen. Parallel dazu steigt das Potential an, was allgemein auf ein weniger reduzierendes Milieu hinweist. Mittelschnell- und langsamreduzierende Reduktionen nehmen bei der Hauptgärung zu, dennoch spielen sie mengenmäßig im Vergleich zu den schnellreduzierenden Substanzen eine geringe Rolle.

Es wurden auch Messungen in anderen Produkten, wie Apfelsaft durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen Rohstoffqualität und Redoxeigenschaften aufzuzeigen.

Gerade die cyclovoltametrische Potentialmessung detektiert als Summenparameter alle Reduktone und gibt so dem Technologen einen zuverlässigen Wert für den Redoxzustand des Produktes oder Zwischenproduktes. Da diese Methode im Prinzip chemikalienfrei arbeitet, ist an eine Weiterentwicklung des cyclovoltametrischen Meßsystems zu einer online-tauglichen Variante zu denken. Der Elektrochemische ITT gibt zusätzlich noch Auskunft über die Zusammensetzung nach Reduktionklassen. Diese Messungen sind demnach ein wichtiger Anhaltspunkt für die antioxidative Aktivität, die unter den Gegebenheiten des jeweiligen Betriebes (Rohstoffe, Technologie) erreicht werden kann.

Bei Abweichungen muss eine Fehlersuche erfolgen und bei Versuchen, bei denen bewusst technologische Veränderungen durchgeführt werden, kann auch eine Beurteilung dieser Neuerungen hinsichtlich des Redoxzustandes erfolgen. Da es sich bei den elektrochemischen Summenparametern, wie oben ausgeführt, um universell gültige Werte für den Oxidationszustand handelt, kann der Brauer sich auch an vergleichbaren Konkurrenzprodukten orientieren und falls nötig Maßnahmen zur Verbesserungen der antioxidativen Eigenschaften seiner Produkte ergreifen. Zusätzlich werden durch die routinemäßige Durchführung der Messungen und deren Auswertung die Mitarbeiter hinsichtlich der Sauerstoffproblematik sensibilisiert. Ein solcher routinemäßiger Einsatz bietet sich an, da die Messungen weitestgehend automatisiert wurden.

In der Forschung und Entwicklung kann die Methode einfach und schnell darüber Aufschluss geben, wie sich Veränderungen einzelner technologischer Parameter auf den Redoxzustand und die Reduktionskraft auswirken.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte die Definition des Begriffes „Reduktone“ verfeinert werden. Als Reduktone betrachten wir die Gesamtheit aller im Bier tatsächlich reduzierend wirkenden Substanzen, unabhängig von ihrer chemischen Struktur. Als beste Nachweismethode hat sich hier die cyclovoltametrische Messung erwiesen, bei der die Reduktone chemikalienfrei direkt im Medium Bier an der Arbeitselektrode reagieren.

2 Einleitung und Problemstellung

Dem Einfluß des Sauerstoffes auf biologische Systeme kommt ein hoher Stellenwert zu. Nicht nur in der Brauereitechnologie^{1,2}, sondern auch beispielsweise in der Medizin wird über die Folgen des Angriffes radikalischen reaktiven Sauerstoffes diskutiert^{3,4}. Besonderen Wert legt man auf die Schutzmechanismen gegen die Oxidation organischen Materials. Eine wichtige Rolle spielen dabei Antioxidantien, die auch einfach als "Reduktone" bezeichnet werden.⁵

Das Vorkommen, die Bildung und die Veränderung verschiedener Stoffe bei Sauerstoffeinfluss und der Alterung des Bieres ist wegen des großen Umfangs (über 7000 Substanzen) trotz zahlreicher Untersuchungen weitgehend unerforscht. Zudem ist einleuchtend, dass die quantitative Bestimmung zahlreicher Einzelsubstanzen als Leitsubstanzen für die Routineanalytik im Betrieb einen zu großen Aufwand bedeutet. Auch die Aussagekraft des Gehalts an bestimmten Einzelsubstanzen ist nicht unbedingt groß. Ein vielbeachtetes Beispiel ist die intensive Suche nach einzelnen Alterungsindikatoren. Auch die Wirkung einzelner Antioxidantien ist stark von der Matrix abhängig. Besonders hervorgehoben wird diese Problematik bei medizinischen Untersuchungen in der Übertragbarkeit von "in vitro"-Ergebnissen auf die tatsächliche Wirkung ("in vivo")⁶. Deshalb bietet es sich an, stets möglichst einfache Bestimmungen von Summenparametern zu entwickeln. In der hier vorliegenden Arbeit geht es um die Bestimmung von solchen Summenparametern, die die Anfälligkeit von Bier und Zwischenprodukten gegenüber einer Oxidation durch Sauerstoff bzw. eine Schädigung durch bereits erfolgte Oxidation aufzeigen können. Luftsauerstoff, der in allen Phasen der Bierbereitung (ausser bei der bewussten Würzebelüftung vor der Gärung) vom Substrat ferngehalten werden sollte, verschlechtert den Geschmack des Bieres und beschleunigt die Entwicklung eines Alterungsgeschmackes. Man bezeichnet dieses Problem als Geschmacksstabilität, das mit weiten Distributionswegen und langer Mindesthaltbarkeitszeit zusätzlich an Bedeutung gewinnt.

¹ Wackerbauer,K.,Hardt,R.,"Radikalreaktionen und die Geschmacksstabilität des Bieres", Brauwelt 136,1996,S.1880-1888

² Back,W.Franz,O., "Das antioxidative Potential von Bier", Brauwelt 141, 2001, S.209-219

³ Böhm,H., Boenig,H.; Hempel,J., Raab, Kroke,A., "Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien in der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Krankheiten, Ernährungswiss.37 (2), 1998, S.147-163

⁴ Wearne,S., Estimating dietary intakes of flavanoids, International Congress and Symposium Series 226,The Royal Society of Medicine Press,1999, S.35-44

⁵ Schank,K., "Reductones", Synthesis, 1972, S.176-190

⁶ Hollmann,P, "Bioavailability of flavanoids", International Congress and Symposium Series 226, The Royal Society of Medicine Press, 1999, S.45-52

Dieses darf aber nicht isoliert betrachtet werden, denn zusätzlich sind die biologische und kolloidale Stabilität ein wichtiger Faktor. Auch bei letzterer spielt die Kondensation und Oxidation von Polyphenolen eine wichtige Rolle. Denn erst Polymere (Gerbstoffe) haben eine eiweißfällende Wirkung, die dann zu unerwünschten Trübungen führt. Deshalb legt man oft Wert auf eine Reduzierung der Polyphenole, was in der Praxis durch PVPP-Stabilisierung erreicht wird¹. Dabei wurde oft der positive Einfluss der Polyphenole als Radikalfänger vergessen.

Dieses Thema gewann in den letzten Jahren vorallem durch die medizinische Forschung an Bedeutung. Hier zeigte sich ganz deutlich die anticancerogene Wirkung der phenolischen Substanzen im Blut durch ihre Radikalfängerqualitäten, d.h. der Fähigkeit zum Abfangen aktiver Sauerstoffformen². Ähnliche Mechanismen ermöglichen es, im Bier den Angriff des Sauerstoffes auf Bierinhaltsstoffe, der vor allem bei der Abfüllung ins Bier gelangt, zu verhindern. Da durch modernste Abfülltechnik die Möglichkeiten, den Luftsauerstoffeintrag beim Füllvorgang weiter zu reduzieren, nahezu erschöpft sind, gewinnt die Betrachtung der Antioxidantien an Bedeutung. Da ein Zusatz solcher Substanzen nach dem Reinheitsgebot nicht gestattet ist, müssen geeignete Methoden angewandt werden, um diese antioxidative Kraft des Bieres zu ermitteln und so technologische Maßnahmen ergreifen zu können, um diese Summenparameter zu "verbessern", d.h. den Gehalt an relevanten Antioxidantien zu erhalten und eventuell zu erhöhen. Bisher wurden zahlreiche Methoden entwickelt, um summarisch die Reduktionskraft des Bieres, die durch die unterschiedlichsten Antioxidantien bedingt ist, zu bestimmen³. Hierzu wurde dem Bier meist ein Oxidationsmittel zugesetzt und anschließend dessen reduzierte Form photometrisch bestimmt. Dafür wurde immer eine bestimmte Reaktionszeit festgelegt. Problematisch ist hierbei, welche Antioxidantien erfasst werden. Außerdem sind diese Bestimmungen ungeeignet für trübe und dunkle Proben.

So bieten sich elektrochemische Methoden zu diesem Zweck an. Schon in früheren Arbeiten wurde versucht, die antioxidative Kraft des Bieres durch einfache stromlose Messung des Redoxpotentials zu ermitteln^{4,5}. Die Einstellung des konstanten Potentials dauerte Stunden und die Ergebnisse waren meist nicht reproduzierbar und besaßen keine praktische Bedeutung⁶. Erst durch die Anwendung eines cyclovoltametrischen Verfahrens können reproduzierbare Ergebnisse für ein Potential, das mittlere Nullstrompotential,

¹ Narziß, L., Bellmer, H.-G., "Einfluss der Stabilisierung des Bieres mit PVPP und Betonit auf den Polyphenolgehalt und den Polymerisationsindex", Brauwissenschaft 29, 1976, S.256-261

² Zhao, K., et al., "DNA-Damage by Nitrite and Peroxynitrite Protection by dietary Phenols", Methods in Enzymology 335, 2001, S296-307

³ Moll, M., "Determination of antioxidants in brewing, Part 1 Chemical methods", Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, 2001, S.28-32

⁴ Drawert, F., Krempl, H., Sipos, S., "Ein potentiometrisches Verfahren zur Bestimmung der Reduktone im Bier", Brauwissenschaft 30, 1977, S.245-250

⁵ van Strien, J., de Jong, R.L., "A new method for the determination of redox conditions of beer and wort", Brauwissenschaft 35, 1982, S.13-17

⁶ Steiner, K., Länzlinger, U., "Zur Redoxpotentialmessung von Würze und Bier", Brauerei- und allgemeine Getränke-Rundschau 97, Nr.4., 1986, S.69-92

ermittelt werden. Bei der komplexen Matrix Bier gibt es im so ermittelten Cyclovoltogramm, anders als bei Einzelsubstanzen, keine spezifischen Peaks. Jedoch das angesprochene "Mittlere Nullstrompotential" ist gut reproduzierbar. Dieses ist zwar nicht mit dem Redoxpotential im Nernst'schen Sinne identisch, kann aber durchaus über den Redoxzustand des Bieres Aufschluss geben. Eine weitere Einsatzmöglichkeit der Elektrochemie ist der sogenannte "Elektrochemische Indikator-Time-Test"-eine Variante, bei der das durch die Bierreduktone reduzierte Dichlorophenol-Indophenol bei konstantem Potential rückoxidiert wird. Durch anschließende Zugabe einer definierten Menge Ascorbinsäure kann man die durch die Bierreduktone und die Ascorbinsäure bedingten Stromanstiege aufeinander beziehen. Zugleich ist es möglich, die Reaktionszeiten der Bierreduktone zu verändern und so leicht "schnell-, mittelschnell- und langsamreduzierende Substanzen" zu bestimmen¹.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Aussagekraft dieser Summenparameter und deren technologische Relevanz zu untersuchen. Dabei sollen Änderungen in der Technologie durchgeführt und deren Auswirkung auf die Messparameter untersucht werden. Auch das Verhalten während der Alterung soll beobachtet werden. Außerdem soll der Einfluss des Zusatzes von natürlichen Antioxidantien in der Matrix Bier beobachtet werden, nachdem die Einzelsubstanzen in Puffern schon in vorherigen Arbeiten untersucht wurden. Gleichzeitig werden Referenzmethoden angewandt und deren Ergebnisse denen der elektrochemischen Messungen gegenübergestellt. Ein großer Themenkreis in diesem Zusammenhang ist der Einfluss von Sauerstoff in den verschiedenen Produktionsphasen von Bier. Würzebelüftung und Fermentationstechnologie müssen auch hinsichtlich des Redoxzustandes gewertet werden.

¹ Neumann, R., Elektrochemische Bestimmungsmethoden für das Reduktionsvermögen von Bier: Ansprechverhalten auf Probenveränderung und Beeinflussung durch Matrixeffekte", Dissertation, TU München, 2000

3 Experimentelles

3.1 Verwendete Chemikalien

Dichlorophenolindophenol Natriumsalz Hydrat von Merck (D-Darmstadt)

Ethanol (vergällt)

Oxalsäure-Dihydrat von Merck (D-Darmstadt)

L(+)-Ascorbinsäure (99,7%) von Merck (D-Darmstadt)

Essigsäure von Merck (D-Darmstadt)

Natriumtriacetat von Merck (D-Darmstadt)

Test-Kit zur Sulfitbestimmung von Boehringer (D-Mannheim):

Triethanolamin-Puffer, pH ca. 8,0

NADH-Tablette

NADH-Peroxidase (ca. 3U)

Sulfit-Oxidase (ca. 4U)

Ferulasäure von Aldrich (D-Steinheim)

(+)-Catechin-Hydrat (98%) von Aldrich (D-Steinheim)

Diphenyl-Pyryl-Hydrazil 2,2'-Bipyridin (99,5%) Merck (D-Darmstadt)

Ethanol (vergällt)

Methanol

3.2 Der elektrochemische Analysenautomat

3.2.1 Die verschiedenen elektrochemischen Messverfahren

3.2.1.1 Cyclovoltametrie in Bier

Bisher verwendete Verfahren zur Potentialbestimmung beruhten auf dem Prinzip der stromlosen Potentialmessung. Hierbei wurde das Bier gegen eine Normalwasserelektrode oder eine andere konstante Bezugselektrode gemessen. Dazu war es erforderlich, dass sich an der Messelektrode ein Gleichgewicht einstellt. Bei einfachen, vollständig reversiblen Redoxprozessen stellt sich dieses Potential abhängig von dem Gehalt an reduzierter und oxidierte Form des Redoxpaares ein. Berechnet wird dieses Potential nach der Nernst'schen Gleichung. Bei mehreren Redoxpaaren stellt sich ein sogenanntes Mischpotential ein.

Problem bei den bisherigen Verfahren zur stromlosen Potentialmessung beim Bier war die Komplexität der Matrix Bier. Beim Bier überlagern sich verschiedenste reversible, teilweise reversible und irreversible Redoxprozesse. So dauert es oft mehrere Stunden bis sich ein einigermaßen konstantes Potential einstellt. Zusätzlich ist dieses Potential nicht reproduzierbar, da sich das zu messende Substrat durch die an der Elektrode ablaufenden irreversiblen oder teilweise reversiblen Prozesse laufend verändert. So wird die Einstellung eines reproduzierbaren, für das ursprüngliche Bier repräsentativen Mischpotentials unmöglich gemacht.

Beim cyclovoltametrischen Verfahren zur Potentialbestimmung werden hingegen dem Substrat verschiedene Spannungen "aufgezwungen".¹ Der Potentiostat steigert die Spannung an der Arbeitselektrode kontinuierlich von einem Startpotential bis zu einem Umkehrpotential. Ist letzteres erreicht, so wird die Spannung ebenfalls kontinuierlich auf das Startpotential zurückgefahren.(vgl.Abb.1).

¹ Gosser,D.K., "Cyclic voltametry:simulation and analysis of reaction mechanism",VCM,Weinheim 1990

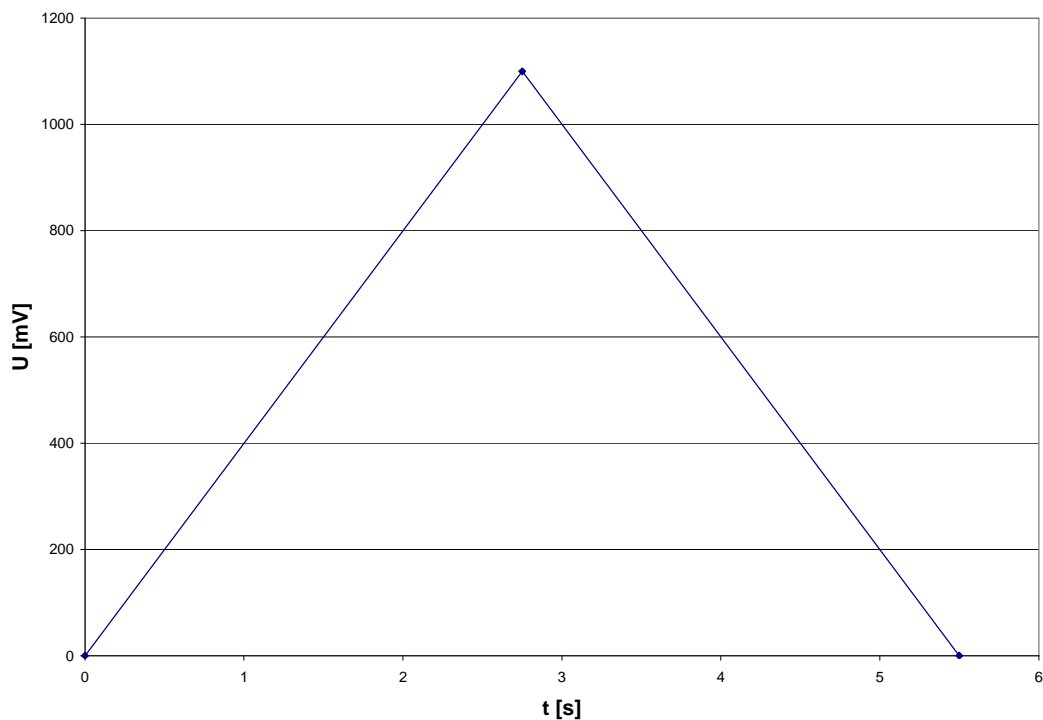


Abb.1 : Spannungsverlauf bei der Cyclovoltametrie

Ein solcher kompletter Zyklus heißt "Scan". Den Bereich zwischen den beiden Spannungen bezeichnet man als "Spannungsrampe" oder "Potentialfenster". Die Geschwindigkeit, mit der das Potential erhöht bzw. abgesenkt wird, wird Scanrate genannt und in V/s angegeben. Registriert wird die sogenannte "Stromantwort", also der Strom, der tatsächlich an der Arbeitselektrode fließt. Praktisch werden bei bestimmten Spannungen Inhaltsstoffe des zu messenden Substrats oxidiert und beim Herunterfahren der Spannung die vorher oxidierten Formen der Inhaltsstoffe rückreduziert, die sich an der Arbeitselektrode angereichert haben. Trägt man die Stromantwort über der Spannung auf, erhält man ein sogenanntes "Cyclovoltogramm". Bei Reinsubstanzen ergeben sich bei bestimmten Spannungen Strommaxima, die für die Oxidation bestimmter aktiver Gruppen typisch sind. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Detektion von Substanzen in der Chromatographie zunutze¹.

¹ Chiavari, G., Vitali, P., Galletti, G.C., "Elektrochemical detection in the high-performance liquid chromatography of polyphenols (vegetable tannins)", Journal of Chromatography Vol 392, 1987, S.426-434

Beim komplexen Medium Bier erhält man hingegen keine Peaks, jedoch eine Kurve, die die Spannungsachse an zwei Stellen schneidet (vgl. Abb.2).

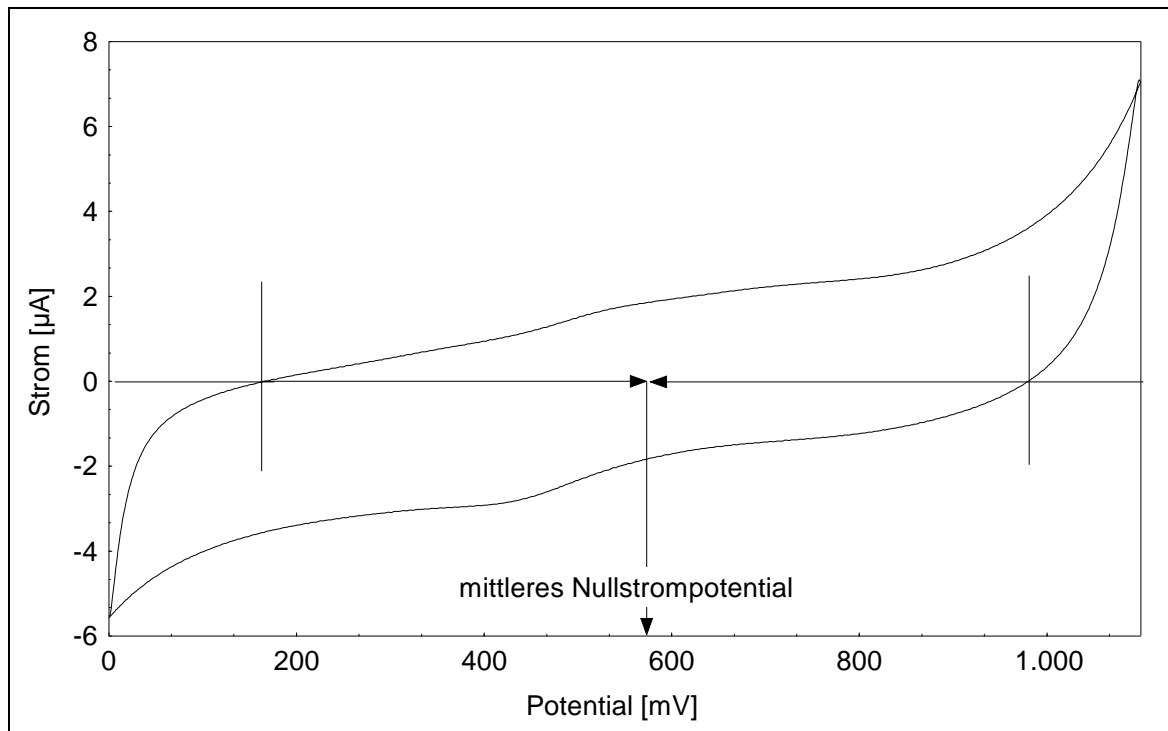


Abb.2: Ermittlung des Mittleren Nullstrompotentials

Die so ermittelten Spannungen nennt man 1. bzw. 2.Nullstrompotential. Das Mittel dieser Potenziale bezeichnet man als "Mittleres Nullstrompotential". Bei einfachen reversiblen Redoxpaaren steht dieses Potential in engem Zusammenhang zum klassisch bestimmten Redoxpotential. So bietet die cyclovoltametrische Methode eine schnelle, gut reproduzierbare Möglichkeit zur Erfassung des Redoxzustandes.

Die Cyclovoltagramme lassen auch noch eine andere Interpretation zu, die hier zum besseren Verständnis der Methode kurz beschrieben wird: Die Fläche oberhalb der x-Achse ist proportional zur Ladungsmenge, die bei der Oxidation der Bierreduktone übertragen wurde, denn es gilt:

$$Q = I \cdot t \quad \text{(Gleichung 1)}$$

$$U = s \cdot t \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Q: Spannung [V]; **I:** Stromstärke [A]; **t:** Zeit [s]

s: Scanrate [V/s]

$$Q = I \cdot U / s \quad \text{(Gleichung 3)}$$

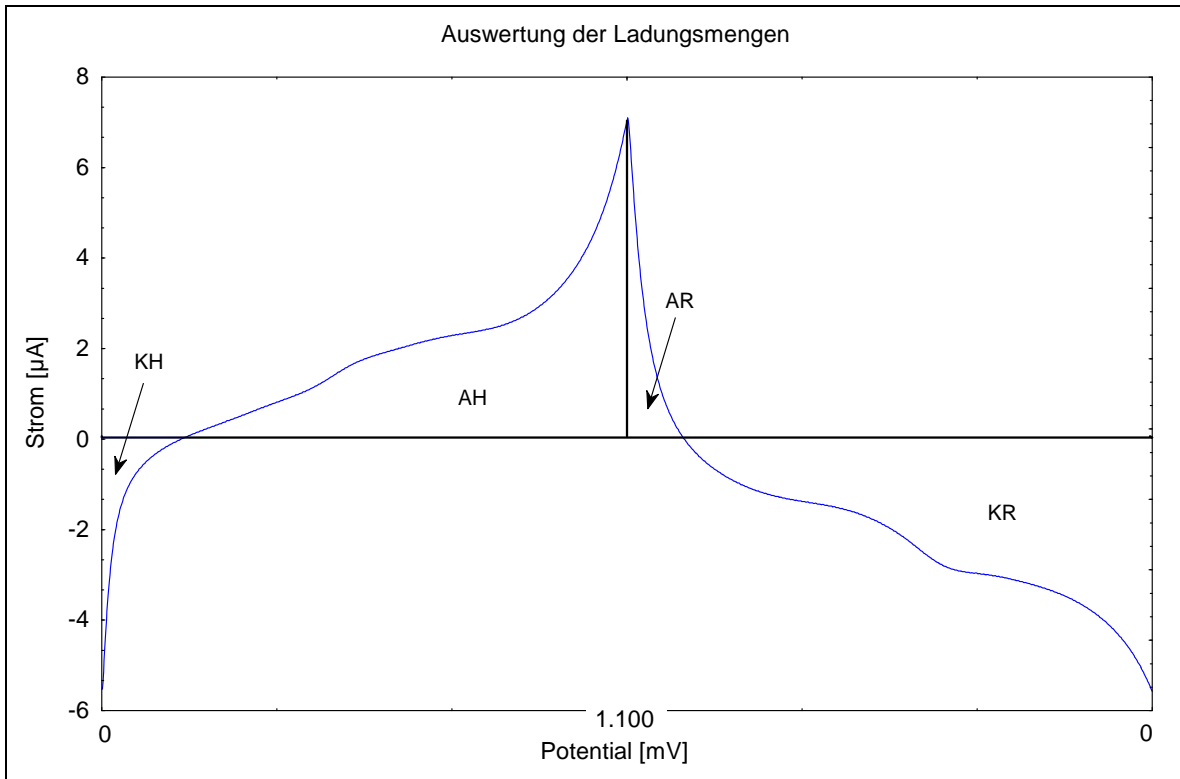


Abb.3 : Darstellung der Flächen, die den geflossenen Ladungen entsprechen

Umgekehrt gilt für die bei der Rückreduktion der oxidierten Reduktone beim Herunterfahren der Spannung dieser Zusammenhang, sodass die Fläche unterhalb der x-Achse die bei dieser Reduktion übertragene Ladungsmenge darstellt. Beim Bier ist die bei der Rückreduktion übertragene Ladungsmenge stets deutlich geringer als die bei der Oxidation übertragene Ladungsmenge. Hieraus wird ersichtlich, dass die Oxidationsprozesse wie in der Einleitung angesprochen im Bier häufig irreversibel oder nur teilweise reversibel sind.

Neumann¹ versuchte diese übertragenen Ladungen in mehreren Versuchsreihen auszuwerten und einen Zusammenhang zur Reduktionskraft des Bieres herzustellen. Tatsächlich waren aber diese Ergebnisse sehr schlecht reproduzierbar und konnten so nicht als Summenparameter für die reduzierende Kraft einer Bierprobe verwendet werden.

Dagegen erwies sich die Auswertung der Cyclovoltogramme über das Mittlere Nullstrompotential als äußerst günstig zur Ermittlung eines aussagekräftigen Summenparameters.

¹ Neumann, R., "Elektrochemische Bestimmungsmethoden für das Reduktionsvermögen von Bier: Ansprechverhalten auf Probenveränderung und Beeinflussung durch Matrixeffekte", Dissertation, TU München, 2000

Im Laufe der bisherigen Arbeiten hat sich zur Messung von Bier ein Spannungsfenster von 0-1100mV und eine Scanrate von 400 mV/s als am günstigsten erwiesen. Hier war die Reproduzierbarkeit am höchsten und Unterschiede zwischen verschiedenen Bieren wurden am deutlichsten. Da gerade beim Substrat Bier sehr schnell eine Elektrodenpassivierung eintritt, wird nur ein Scan gefahren. So erhält man die am besten reproduzierbaren Ergebnisse.

Generell ist zur praktischen Deutung des Mittleren Nullstrompotentials zu sagen:

Ein höheres Mittleres Nullstrompotential bedeutet ein weniger stark reduzierendes Medium, in dem weniger elektroaktive reduzierende Substanzen vorhanden sind, die schon bei niedrigeren Spannungen an die Arbeitselektrode Elektronen abgeben können.

An dieser Stelle muss auch prinzipiell auf den Einfluss gelösten Sauerstoffes auf die cyclovoltametrischen Messungen eingegangen werden. Das 1.Nullstrompotential ist davon abhängig, in welchem Ausmaß Substanzen im Bier sind, die am Beginn des Scans, also bei niedrigen Spannungen an der Arbeitselektrode reduziert werden, also Substanzen die unter diesen Bedingungen als Oxidantien wirken. In den Proben gelöster Sauerstoff kann bei diesen Spannungen auch reagieren und so einen höheren Anteil oxidierender Verbindungen vortäuschen. So werden das 1.Nullstrompotential und damit das Mittlere Nullstrompotential erhöht und so das Potential als weniger reduzierend eingeschätzt.

Deshalb ist es unerlässlich, gelösten Sauerstoff bei der cyclovoltametrischen Messung weitgehend auszuschließen. Bei Bierproben, die Kohlendioxid und nur kleine Spuren von Sauerstoff enthalten, muss unbedingt auf die Vermeidung einer Aufnahme von Luftsauerstoff geachtet werden, was durch Sicherstellung einer Schutzgasatmosphäre gewährleistet ist. Maische oder Würzproben hingegen sind für diese Messmethode deshalb nur bedingt geeignet, da sie große Mengen an Sauerstoff enthalten, wobei dieser Gehalt sehr stark abhängig von der Probenahme ist und deshalb sehr stark schwankt. Auch ein Austreiben des Sauerstoffes durch Einblasen von Stickstoff über eine Fritte brachte in Vorversuchen keine reproduzierbaren Ergebnisse beim Nullstrompotential.

3.2.1.2 Bestimmung der Reduktionskraft innerhalb einer festgelegten Reaktionszeit (Elektrochemischer Indikator-Time-Test)

Der elektrochemische Indikator-Time-Test ist eine Abwandlung des photometrischen ITT¹. Durch die Bierreduktone wird 2,6-Dichlorophenol-Indophenol (DCI) reduziert.

Die reduzierte, farblose Form wird nicht photometrisch bestimmt, sondern durch Rückoxidation bei einer spezifischen Spannung von 625 mV. Da bei 625 mV nicht nur reduziertes DCI rückoxidiert wird, sondern auch Bierreduktone, wird vor der DCI-Zugabe eine Minute lang der sogenannte "Grundstrom" gemessen. Vor der Zugabe des DCI wird die Spannung abgeschaltet. Dosierte werden 0,55 ml der DCI-Lösung (4,5 mmol/l). Ein Stromfluss während der vierminütigen Reaktionszeit würde zur Passivierung der Elektroden beitragen, d.h. würde während der gesamten Reaktionszeit ein Strom fließen, würde die Kathode schnell mit DCI belegt. Erst nach vier Minuten Reaktionszeit wird für 30 Sekunden wieder die Spannung angelegt.

Nachdem der durch die Rückoxidation des reduzierten DCI bedingte Strom gemessen worden ist, wird die Messzelle wieder ausgeschaltet.

Von diesem muss noch der Grundstrom als Blindwert abgezogen werden. So ergibt sich der durch die Reduktion des DCI durch die Bierreduktone bedingte Strom ΔI_{DCI} .

Da aber die Elektroden trotz der beschriebenen Reinigung vor jeder Messung stets unterschiedliche wirksame Oberflächen haben, reicht der Strom ΔI_{DCI} allein nicht zur reproduzierbaren Bestimmung der Reduktionskraft aus.

Deshalb muss eine definierte Lösung eines schnellreduzierenden Reduktions als Standard zugegeben werden. Hier bietet sich Ascorbinsäure an, die schnell und quantitativ mit DCI reagiert.

Sofort erfolgt daraufhin die Zugabe von 0,55 ml der 0,001 molaren Ascorbinsäurelösung. Eine längere Reaktionszeit ist hier nicht erforderlich, da Vitamin C spontan mit DCI reagiert. So wird in einer weiteren Einschaltzeit von 30 Sekunden der resultierende Strom gemessen. Dieser Strom setzt sich zusammen aus dem durch die Bierreduktone nach 4 Minuten und dem durch die Ascorbinsäure reduzierten DCI, das bei 625 mV rückoxidiert wird

¹ Gray, P.P., Stone, I.M., "Oxidation in beers, I. A simplified method for measurement", J. Inst. Brewing 45, 1939, S.253-263

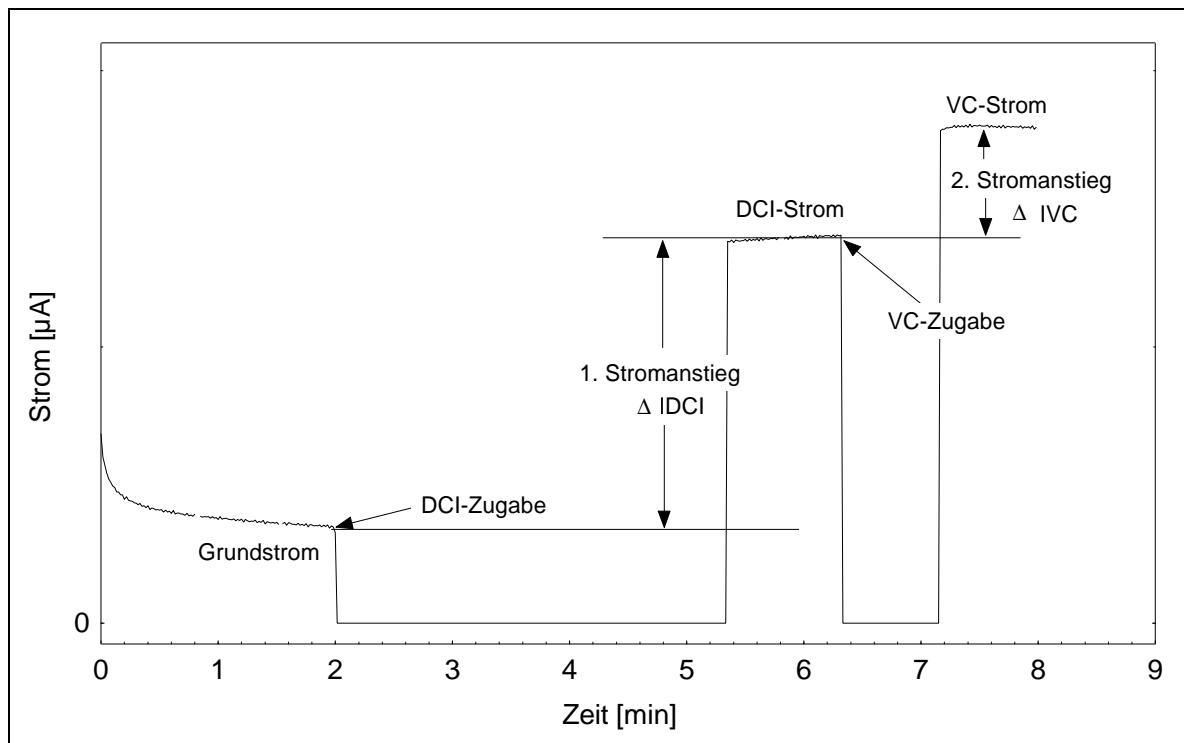


Abb.4: Ermittlung des Stromverhältnisses

Zieht man den ersteren Strom vom nach der Ascorbinsäurezugabe ermittelten Gesamtstrom ab, so erhält man den durch die definierte Zugabe bedingten Stromanstieg (ΔIVC). (vgl. Abb.4)

Das Stromverhältnis nach 4 Minuten ergibt sich folgendermaßen:

$$SV = \Delta IDC / \Delta IVC$$

(Gleichung 4)

Es ist auch eine Variation der Reaktionszeiten der Probe mit DCI möglich. So kann der Stromanstieg nach 4, 10 und 15 Minuten gemessen werden. Die in den jeweiligen Intervallen reagierenden Substanzen bezeichnen wir als schnell-, mittelschnell- und langsamreduzierende Reduktone.

Da die definierte Ascorbinsäurelösung als Standard verwendet wurde, ist es einfach, das Stromverhältnis und damit die Reduktionskraft des Bieres in Vitamin C-Äquivalenten anzugeben.

3.2.1.3 Bestimmung der Reduktonverteilung

Durch die vorher angesprochene Möglichkeit der Variation der Reaktionszeiten ist es möglich, den absoluten Gehalt an Reduktionen anzugeben, die in der jeweiligen Zeit DCI reduzieren. Eine weiteres Messprogramm bietet die Möglichkeit einer Bestimmung des Anteils schnellreduzierender, mittelschnell- und langsamreduzierender Substanzen in nur einer Messung. Wie bei der Bestimmung des Stromverhältnisses wird zuerst vor DCI-Zugabe der sogenannte Grundstrom bestimmt. Genau 4 Minuten, 10 Minuten und 15 Minuten nach DCI-Zugabe wird jeweils für 20 Sekunden die zur Rückoxidation des reduzierten DCI erforderliche notwendige Spannung von 625 mV angelegt.

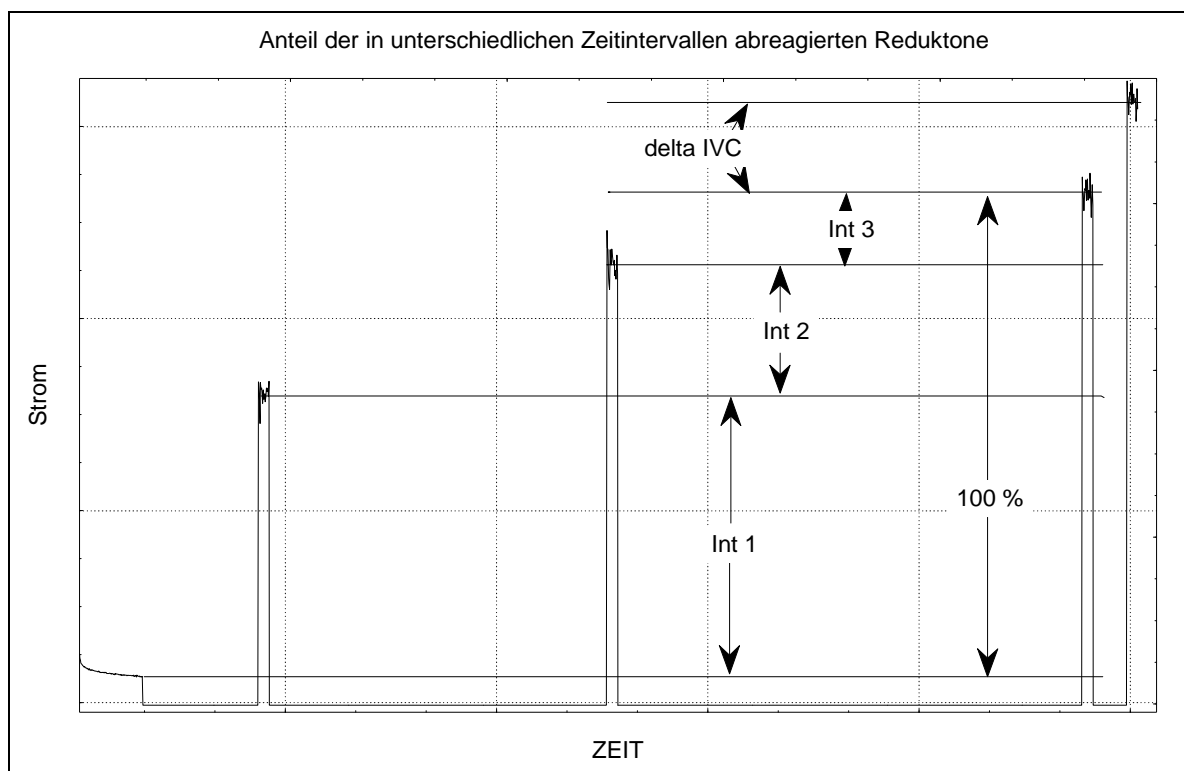


Abb.5: Bestimmung der Reduktonverteilung

Die jeweiligen Stromanstiege sind proportional zu der Menge der in den jeweiligen Zeitabschnitten reduzierenden Substanzen. Setzt man den Gesamtstrom nach 15 min abzüglich des Grundstromes als 100%, so kann man aus den jeweiligen Steigerungen der Stromstärke nach 4,10 bzw. 15 Minuten die Anteile der jeweiligen Reduktonklassen errechnen.

3.2.2 Die Messapparatur

Beim elektrochemischen Analysenautomat sollen Potential und Reduktionskraft automatisiert gemessen werden. Dabei ist eine aufwendige Probenvorbereitung zu umgehen. Sowohl die Dosierung von Bier und Reagenzien als auch die notwendige Entgasung müssen automatisch durchgeführt werden. Letztere ist gerade im Falle von Reduktionskraftmessungen ein Problem. Das Kohlendioxid und die dadurch bedingte Schaumentwicklung stören die genaue Dosierung. Eine Entkarbonisierung vor der Zudosierung des Bieres würde neben des Zeit- und Arbeitsaufwandes (Umfüllen in ein anderes Gefäß, Rühren) auch den Eintrag von Sauerstoff bedeuten, der gerade bei unseren Messungen einen großen Störfaktor darstellt. Dadurch würde Arbeiten unter Schutzgas nötig, was auf diese Weise in der Routineanalytik nicht möglich ist. Zugleich soll automatisch die bereits angesprochene mengenmäßig genaue Dosierung von Bier und Reagenzien, als auch der genaue Zeitpunkt der Dosierung gewährleistet sein, da dieser die Ergebnisse entscheidend mitbeeinflusst. Im Laufe der vorangegangenen Arbeiten konnte nach dem Prinzip einer Anordnung von Standardlaborgeräten (die für die Routineanalytik wegen der komplizierten Handhabung ungeeignet war) ein kompaktes Gerät entwickelt werden, das sowohl in der Bedienung für den Endanwender einfacher ist, als auch kostenmäßig unter der ursprünglichen Laboranlage liegt. Ein tragbares Pumpenphotometer der Firma ME-Instrument GmbH, Trappenkamp (Gerätebezeichnung APP 5003)¹ wurde für die Zwecke der elektrochemischen Messungen umgebaut. Das Gerät besitzt eine Kolbenpumpe und ein 8/1-Wegeventil. Die Pumpe kann über das Ventil acht verschiedene Positionen ansteuern. Dabei handelt es sich um den Probeneinlauf, zwei Vorratsbehälter für Acetatpuffer und Alkohollösung. Die anderen Einläufe sind für die Ascorbinsäurelösung, DCI-Lösung, entionisiertes Wasser, Abwasserauslauf, und die Dosierung in die elektrochemische Messzelle. Gesteuert werden Ventil und Pumpe über den Mikrocomputer des Gerätes. Auf einem Rechner läuft die mitgelieferte Steuersoftware, die über eine serielle Schnittstelle mit dem APP kommuniziert. Über die Steuersoftware kann das Steuerprogramm über die Schnittstelle an den Rechner des Gerätes übermittelt werden. Umgekehrt können vom APP Fehlermeldungen an den PC gegeben werden. Das Steuerprogramm muss nicht immer neu gesendet werden, sondern verbleibt im Speicher des APP, bis es überschrieben wird.

¹ Analyseautomat APP 5003, Handbuch und Steuerprogramm, ME Instrument GmbH, Trappenkamp, 1992

Das Steuerprogramm erlaubt folgende Funktionen:

- Übertragung der Dosieranweisungen
- Start und Abbruch der Dosier Routinen
- Entlüften der Reagenzienschläuche nach Wechsel der Lösungen
- Spülen von Messzelle und Kolben mit entionisiertem Wasser
- Spülen der gesamten Anlage
- Empfangen von Fehlermeldungen wie Netzzusammenbruch oder Schwergängigkeit des Pumpenkolbens

Anpassung des APP für die elektrochemischen Messungen

Der Ausgleichsbehälter, der beim ursprünglichen APP ausschließlich dem Mischen der Probe und der Chemikalien diente, wurde durch eine "Elektrochemische Messzelle" ersetzt. Wie beim Ausgleichsgefäß ist hier programmbedingt kein größeres Flüssigkeitsvolumen als 10ml möglich. Um ein Einströmen des Bieres, das durch die Beaufschlagung mit dem Schutzgas unter Überdruck steht, beim Überfahren der Einlaufposition zu verhindern, wurde vor das 8/1-Wege-Ventil noch ein Magnetventil vorgeschaltet. Das Programm steuert dieses in der Weise, dass es nur geöffnet wird, wenn Probe angesaugt werden soll.

Die elektrochemische Messzelle

Das Kernstück, die eigentliche Messzelle ist aus Acrylglas hergestellt. Es besteht aus einem Acrylglasrohr von 50mm Länge, auf das auf der Unterseite eine Bodenplatte aufgeklebt wurde. Durch diese Platte wurde der Zulaufkanal gebohrt. Unterhalb der Messzelle befindet sich ein Magnetrührer. Eine konstante Betriebsspannung (5V Spannungsregler) an einem Getriebemotor sorgt für eine konstante Rührgeschwindigkeit, welche reproduzierbare Strömungsverhältnisse an den Elektroden gewährleistet. Auf das Acrylglasrohr wird eine Acrylglas-Platte mit 8 Bohrungen aufgeschraubt. Drei der Bohrungen im Winkel von 120° zueinander dienen der Verschraubung mit dem Rohr, drei weitere im Inneren der Platte dienen als Halterung für die Arbeits-, Gegen- und Bezugs elektrode. In eine weitere kleinere Bohrung wird ein dünner Schlauch zur Schutzgaszufuhr gesteckt. Eine weitere gleichartige kleine Bohrung dient als Entlüftungsöffnung.

Lösungen für die elektrochemischen Messungen

Für die elektrochemischen Messungen wurden folgende Lösungen verwendet:

DCI-Lösung, Konzentration 4,5 mmol/l

Ascorbinsäurelösung 1,0 mmol/l:

44,0 mg Ascorbinsäure und 31,5 mg Oxalsäure-Dihydrat werden mit dest. Wasser im Messkolben auf 250 ml aufgefüllt. Die Oxalsäure stabilisiert die Ascorbinsäure und schützt sie gegen die Oxidation durch den im destilliertem Wasser gelösten Sauerstoff.

1 molarer Acetatpuffer

Die Elektroden

Arbeitselektrode:

Als Arbeitselektrode wird ein in Glas eingeschweißter Platindraht verwendet.

Gegenelektrode

Die Gegenelektrode bildet ein Platinblech, das durch Punktschweißen an einem Platindraht befestigt wurde.

Silber-Silberchlorid-Bezugselektrode

Die Bezugselektrode besteht aus einem mit Silberchlorid beschichteten Silberdraht. Als Diaphragma ist in ein Duran-Glasrohr ein Stück eines Magnesiastäbchens eingeschmolzen. Das Magnesia-Diaphragma kann durch abgeschiedenes Silberchlorid verstopfen: In diesem Fall erhält man verrauschte Cyclovoltogramme oder eine Drift des Bezugselektrodenpotentials. Das Diaphragma wird gereinigt, indem man einige Milliliter Ammoniak (25%) mittels Wasserstrahlpumpe durch dieses saugt.

Elektrolyt

Als Elektrolyt wird eine gesättigte KCl-Lösung mit Silberchlorid verwendet. Seitlich ist ein kleines Loch als Nachfüll- und Belüftungsöffnung eingeblasen.

Kolbenpumpe

Als Kolben dient ein kompakter Titanzylinder mit einem Durchmesser von 15,5 mm , der nahe der beiden Enden je eine Nut für die Dichtringe besitzt.

Probenwechsler

Die automatisierte Messung mit dem EAA dauert 25 bis 35 Minuten. Es bietet sich an, nicht nur mehrere Messungen an einer Probe durchzuführen, sondern auch vollautomatisch mehrere Proben zu bestimmen. Dazu wurde ein Probenwechslersystem entwickelt, das bis zu 8 verschiedene Proben zulässt. Kernstück dieses Probenwechslers ist ein 8/1-Wegeventil. Die Position des Ventils kann über die Datenleitung ständig abgefragt werden und per Relais bei Erreichen der richtigen Stellung durch Ausschalten des Motors fixiert werden.

Die Probeflaschen werden mittels eines Gummistopfens mit Edelstahlsteigrohr und Schutzgaszufuhr verschlossen. Die Schutzgaszufuhr erfolgt über eine Waschflasche, aus der alle 8 Schutzgasschläuche versorgt werden. So wird bei einem Übersäumen des Bieres ein Eindringen des Schaums in die Schutzgasleitung, über die auch die Gaszufuhr zur Messzelle erfolgt, verhindert.

3.2.3 Praktische Durchführung der elektrochemischen Messungen

Bestimmung des Potentials der Bezugs elektrode

Um das Anlegen der Spannungen durch den Potentiostaten zu ermöglichen, muss das Potential der Bezugs elektrode bestimmt werden.

Eine Drift des Potentials kann sich im Verlauf der Messungen oder der Aufbewahrung durch eine Veränderung der Durchlässigkeit des Diaphragmas ergeben. Außerdem verändert sich die Oberfläche des Silberchlorid drahtes und die Silberchlorid lösung.

Da während der Messung bei offenem Belüftungsloch immer etwas Lösung ausläuft, muss diese regelmäßig nachgefüllt werden.

Nach jedem Nachfüllen der Elektrode sollte das Potential neu bestimmt werden.

Dazu wird eine Normalwasserstoffelektrode einige Minuten voll belastet (200 mA).

Der Strom wird nach Anschließen der Bezugselektrode auf 2 mA heruntergefahren, um eine Potentialmessung mit geringerem Strom zu ermöglichen.

Anschließen der Bezugselektrode

Vor der Messung wird die Elektrode aus dem Aufbewahrungsköcher (mit Kalium-Chlorid-Lösung) entnommen, durch die Bohrung des Deckels der Messzelle gesteckt und an den Kontakt angesteckt. Wichtig ist außerdem, dass der Gummischlauch über dem Belüftungsloch heraufgeschoben wird, um einen Stoffaustausch über das Diaphragma zu ermöglichen.

Es ist dabei äußerst wichtig, den Kontakt vorsichtig zu handhaben, da der Silberdraht äußerst empfindlich gegen Brechen ist.

Wird nicht gemessen, empfiehlt es sich, die Elektrode wieder abzuhängen, um ein Auslaufen des Elektrolyten zu verhindern.

Sicherstellung der Schutzgasatmosphäre

Vor der Messung muss unbedingt die Schutzgasatmosphäre gewährleistet werden. Im besonderen ist die Schutzgasatmosphäre für die cyclovoltametrische Messung wichtig. Vorversuche im Rahmen der Entwicklung des EAA haben gezeigt, dass gelöster Sauerstoff vor allem das erste Nullstrompotential erhöht und damit ein erhöhtes Mittleres Nullstrompotential vortäuscht.¹

Der Indikator-Time-Test wird nicht so schnell durch gelösten Sauerstoff beeinflusst. So wird bei den photometrischen Indikator-Time-Test stets ohne Schutzgasatmosphäre gearbeitet.

Im Falle des Gerätes mit automatischem Probenwechsler werden die Probeflaschen jedoch oft Stunden vor der Messung geöffnet und angeschlossen. Deshalb erweist sich die Begasung des Kopfraumes der Flaschen mit Schutzgas als günstig, da beim Anschließen

¹ Gebhardt, E., Elektrochemische Bestimmungen von Reduktionen im Bier", Dissertation, TU München, 1993

zutretener Sauerstoff sonst in das Bier diffundieren könnte und bei Zimmertemperatur tatsächlich eine langsame Oxidation der Bierinhaltsstoffe stattfindet, die die Reduktionskraft des Bieres gegenüber DCI tatsächlich absenkt. Dazu wird die Schutzgaszufuhr (Stickstoff) geöffnet und einige Minuten ein starker Gasstrom durch die Messzelle und die Waschflasche, die der Begasung der Probenflaschen dient, geleitet. Erst dann kann die Stickstoffzufuhr auf einen notwendigen minimalen Strom reduziert werden, der das Eindringen von Sauerstoff in die Messzelle verhindert.

Entlüftung der Schläuche

Da an jedem Messtag die DCI-Lösung und die Ascorbinsäure-Lösung neu hergestellt werden, müssen die jeweiligen Chemikalienschläuche des EAA neu in den 25 ml- bzw. 250 ml-Schlauch eingebracht werden. Das selbe gilt für den Schlauch zur Ansaugung des destillierten Wassers. Dabei ist stets Luft in den Schläuchen. Das ist ebenfalls bei den Vorratsbehältern für die Ethanollösung und den Acetat-Puffer der Fall, wenn diese frisch nachgefüllt wurden, wozu die Schläuche aus den Behältern entfernt werden müssen.

Deshalb besitzt das Gerät eine Entlüftungsroutine. Dabei werden die Lösungen durch den jeweiligen Schlauchweg bis zur Pumpe angesaugt und dann über das Abflussventil ausgeschoben.

Die Probenschläuche auf diese Weise zu entlüften ist, nicht notwendig, da sie innerhalb der Messroutine bei der Vorspülung der Messzelle bereits durchgespült werden.

Anschließen der Bierproben

Beim Öffnen der Probeflaschen ist darauf zu achten, dass, ähnlich wie bei der Abfüllung der Flaschen keine Luft in den Flaschenhals gerät. Dies wird vermieden, indem man die Flasche durch Schütteln zum Überschäumen bringt und sofort das Edelstahlsteigrohr einführt und mit dem Gummistopfen verschließt. So steht die Flasche unter leichtem Stickstoffüberdruck. Der bei der Dosierung des Bieres entstehende Kopfraum in der Flasche wird durch Stickstoff aufgefüllt. Dadurch wird einer Lösung von Luftsauerstoff im Bier vorgebeugt.

Elektrodenreinigung

Nachdem bei jeder Messung eine Elektrodenpassivierung, d.h. eine Verkleinerung der wirksamen Elektrodenoberfläche durch Belegung mit Reaktionsprodukten stattfindet, ist es

notwendig, vor jeder Messung eine Elektrodenreinigung durchzuführen. Als günstigste Methode hat sich hier ein Redoxcyclus in einem Acetatpuffer erwiesen.

In einem Vorratsgefäß wird ein 1 molarer Acetatpuffer bereitgehalten, der zum Zwecke der Elektrodenreinigung automatisch mit entionisiertem Wasser auf 0,1 mol/l verdünnt wird.

Vor jeder Messung werden die Elektroden in diesem Acetatpuffer cyclisiert. (Scanbereich 0 bis 1.600 mV, Scanrate 400 mV/s). Die Wasserstoff- und Sauerstoffentwicklung verstärkt die Reinigungswirkung des Puffers.

Das Cyclovoltogramm des Acetatpuffers wird während des Scans auf dem Bildschirm angezeigt. Das hat den Vorteil, dass bei der Beobachtung dieses Scans etwaige Fehler bereits vor der eigentlichen Messung des Bieres erkannt werden können. Mögliche auftretende Probleme sind:

Fehlender Kontakt der Elektroden, keine Dosierung des Puffers

-erkennbar durch zwei gerade Linien bei $I=0$

Wackelkontakte an den Elektroden

-erkennbar durch ein verrauschtes CV

Drift des Potentials der Bezugs elektrode

-erkennbar durch abweichende Form des Graphen des CV.

Beobachtet man keine dieser Abweichungen, kann man mit großer Sicherheit davon ausgehen, dass im weiteren Verlauf der Messungen keine auf diese Faktoren zurückgehenden Störungen mehr auftreten.

Spülung der Messzelle

Um Reste des Acetatpuffers aus der Messzelle zu entfernen, wird mit destiliertem Wasser nachgespült. Anschließend erfolgt die Vorspülung der Messzelle mit der Probe.

Durch mehrmaliges Hin- und Herpumpen des Bieres zwischen Kolbenpumpe und Messzelle und Rühren mittels Magnetrührer wird das Bier entgast. Mit abnehmenden Kohlendioxidgehalt verringert sich die Schaumbildung und die Dosierbarkeit des Bieres verbessert sich. Schließlich werden 8,8 ml Bier dosiert.

Messung

Ist das Bier dosiert und entgast, wird wie eingangs bei den Messverfahren beschrieben die cyclovoltametrische Messung am Bier vorgenommen. Während der Messung wird der Rührer ausgeschaltet.

Anschließend wird das Bier je nach Messprogramm verdünnt und der elektrochemische Indikator-Test wie beschrieben durchgeführt.

Spülung der Zelle

Nach Abschluss des Messprogramms wird die Zelle mit der Ethanolösung (20%) gespült.

3.3 Herkömmliche Analysen zum Vergleich

3.3.1 Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene

3.3.1.1 Bestimmung der Gesamtpolyphenole

Die Gesamtpolyphenole wurden nach der Vorschrift der Mitteleuropäische Brautechnischen Analysenkommision bestimmt¹.

3.3.1.2 Bestimmung der Anthocyanogene

Als Anthocyanogene wird jene Gruppe von phenolischen Verbindungen bezeichnet, die an Polyamidpulver adsorbiert werden und unter Hitze mit Salzsäure rotgefärbte Anthocyanidine bilden. Dabei macht man sich zu nutze, dass stärker polymerisierte Verbindungen weniger zu dieser Farbbildung neigen¹.

Die Anthocyanogene werden deshalb in der Literatur als die niedermolekularen, eher reduzierenden phenolischen Substanzen bezeichnet.

Deshalb wurde auch der Polymerisationsindex (PI) geprägt als Verhältnis der Gesamtpolyphenole zu den Anthocyanogenen. Ein hoher Polymerisationsindex war ein Anhaltspunkt für einen hohen Anteil polymerisierter, höhermolekularer Polyphenole, die weniger antioxidative Eigenschaften haben. Umgekehrt weist ein niedriger PI auf höhere Gehalte niedrigmolekularer antioxidativer phenolischer Substanzen hin.

Bestimmt werden sie ebenfalls nach der Vorschrift der MEBAK.

¹ Brautechnische Analysemethoden Band II, Methodensammlung der MEBAK, Pfenninger, H. (Hrsg.), Selbstverlag der MEBAK, Freising -Weihenstephan 1993

3.3.2 Bestimmung der reduzierenden Substanzen nach Chapon

Die von Chapon und Louis entwickelte Methode beruht auf der Reduktion von dreiwertigem Eisen zu zweiwertigem durch die reduzierenden Substanzen des Bieres.¹

Mit Dipyridyl bilden die zweiwertigen Eisenionen einen roten Farbstoff, der im Photometer bei 510 nm gemessen werden kann.

Zur Dipyridyl-Lösung wird eine $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ -Lösung gegeben. Nach etwa 5 Minuten stellt sich ein Gleichgewicht ein. Nun wird die Ausgangsextinktion bei 510 nm bestimmt.

Gestartet wird die Reaktion durch die Zugabe von 20 μl entkarbonisiertem Bier.

Nach der vorgeschriebenen Reaktionszeit von 3 Minuten wird die Extinktion bestimmt.

Über die Kalibrierung mit Mohr'schen Salz kann man das Ergebnis in mval/l ausdrücken.

3.3.3 Diphenylpicrylhydrazyl-reduzierende Aktivität

Bei der Bestimmung der antiradikalischen Aktivität mit dem freien stabilen Radikal nach Kaneda wird die Reaktion der Bierreduktone mit dem freien stabilen Radikal 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) bestimmt.²

In unvergälltem Ethanol werden $1,86 \times 10^{-4}$ mmol 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) gelöst. Ein Teil dieser Lösung wird mit zwei Teilen 0,1 molaren Acetat-Puffer (pH=4,3) vermischt.

Von dieser Lösung werden 2,8 ml in eine Küvette gegeben und die Ausgangsextinktion bei 525 nm bestimmt. Anschliessend werden 0,2ml entgastes Bier zugeben, gut gemischt und nach 10 min die Extinktion gemessen. Der so ermittelte Extinktionsunterschied ist ein Maß für die antiradikalische Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass diese Extinktionsdifferenzen sich in einem relativ engen Rahmen bewegen, der Test aber einen geringen Fehler hat, sehr gut reproduzierbar ist und deshalb auch schon ein Unterschied zwischen zwei Werten von 0,010 eine Aussage erlaubt.

¹ Chapon, L., Louis, C., Chapon, S., "Estimation du pouvoir réducteur des bières par le complexe fer-dipyridyle", EBC, IRL, Oxford University Press, Oxford, 1971, S.307-322

² Kaneda, H., Kobayashi, N., Furusho, S., Sahara, H., Koshino, S., "Reducing activity and flavour stability of beer", MBBA Technical Quarterly 32, 1995, S.90-94

3.3.4 HPLC-Bestimmung einzelner phenolischer Substanzen

Nachweis von phenolischen Substanzen und Polyphenolen unter Anwendung einer HPLC-Methode¹

Probenvorbereitung mittels Säulenfestphasenextraktion:

Polyamidkartusche mit 5 ml bidest. H₂O konditionieren
10 ml Probe auf Polyamidkartusche aufgeben
mit 20 ml 1 % Essigsäure in bidest. H₂O waschen
mit 80 ml Methanol eluieren
Eluat im Rotationsverdampfer eindampfen
Rückstand in 5 ml Methanol und 5 ml bidest. H₂O aufnehmen
im Ultraschallbad lösen
Aliquot über 0,45 µm Membranfilter in Rollrandfläschen filtrieren
Achtung: Sauerstoffaufnahme vermeiden; Analysen am selben Tag durchführen bzw. bei –20°C lagern.

HPLC-Anlage: Serie 200, Autosampler, quaternäre Pumpe, Diode Array Detektor
Trennsäule: Lichrospher 100-5 RP-18EC, Länge 250 mm
Laufmittel: Puffer A: 1 % Essigsäure in bidest. H₂O
Puffer B: 1 % Essigsäure in Acetonitril
Flußrate: 1,0 ml/ min
Druck: 100 – 120 bar
Temperatur: 30°C
Injektion: 50 µl
Spektrum: 200 - 700 nm

Die Trennung der phenolischen Substanzen erfolgte durch einen nicht linearen Gradienten (vgl. Abb.6) aus Puffer A und B.

¹ Papp,A., Promotion , Technische Universität München, 2000

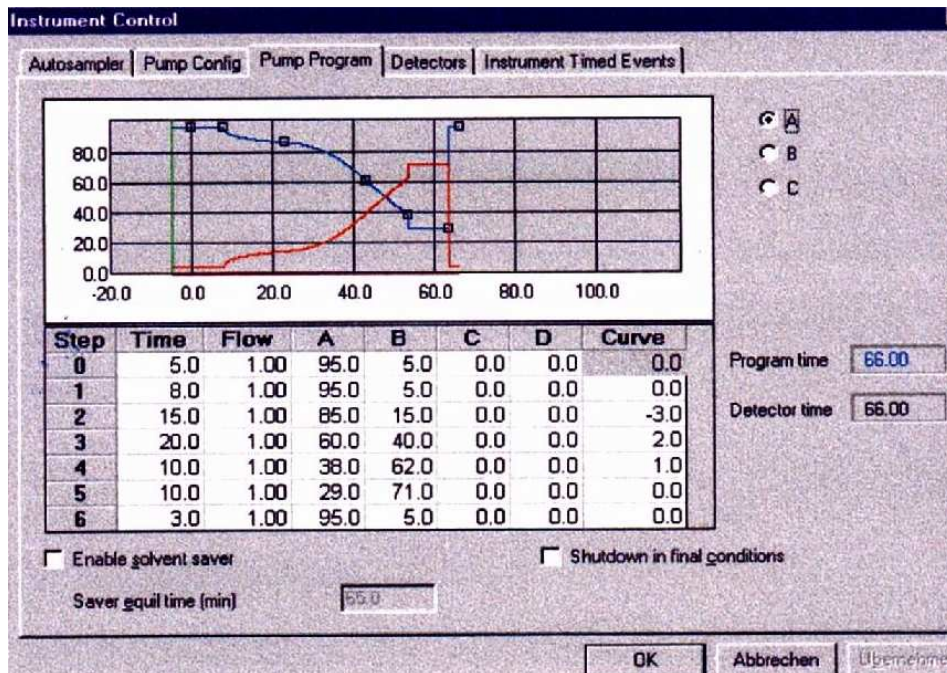


Abb.6: Gradient der Polyphenolanalyse mit HPLC

Wie bereits erwähnt konnten im Laufe dieser Arbeit nicht alle Substanzen identifiziert werden. 13 Polyphenole wurden jedoch mittels Vergleich der Retentionszeit, der resultierenden Spektren und teilweise auch mittels Massenspektroskopie identifiziert. Von diesen konnten 11 phenolische Substanzen kommerziell als Reinsubstanz erworben werden, die eingewogen wurden und als Standard dienten. Für die Berechnung der Konzentrationen wurde anhand einer Zweipunktkalibration die entsprechenden Kalibrationskoeffizienten erstellt. Es entstand kein Unterschied zwischen einer Dreipunkt- und einer Zweipunktkalibration.

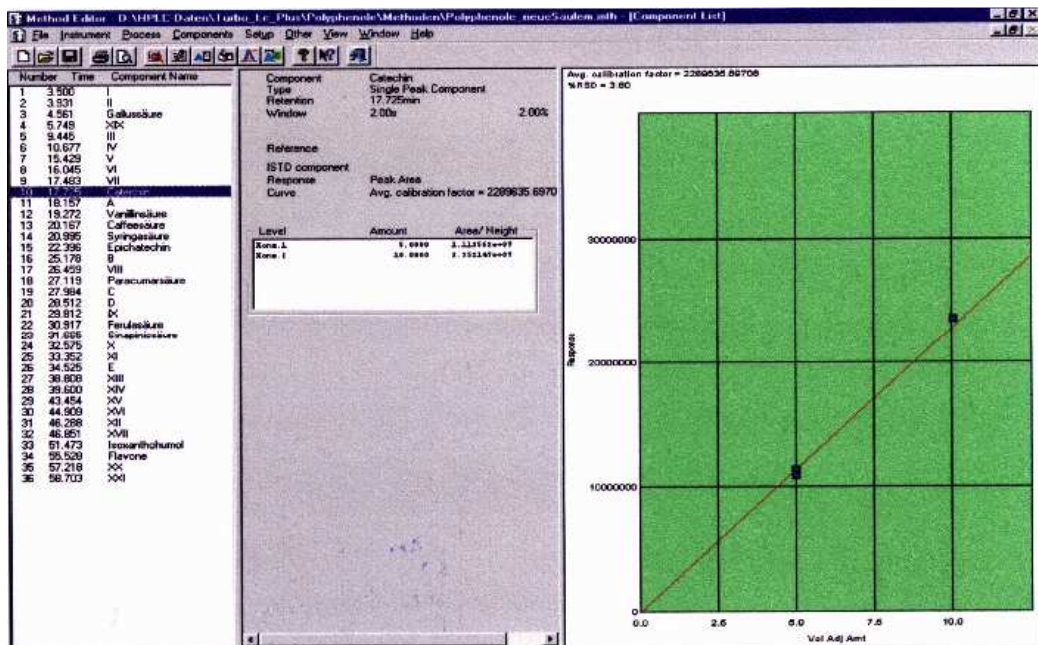


Abb.7: Zweipunkt-Kalibrierung anhand des (+)- Catechins

Bei jeder Festphasenextraktion treten durch die verschiedenen Arbeitsschritte Verluste auf, die mittels einer Wiederfindungsrate definiert wurden.

Für die Berechnung der Wiederfindung wurden in regelmäßigen Abständen Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurde anstelle von Wasser mit Versuchsbier die Stammlösung so verdünnt, dass die selben Konzentrationen wie für die Zweipunktkalibration resultierten.

Berechnung der Wiederfindungsrate:

$$W = \frac{G - B}{S} * 100 \quad \text{(Gleichung 5)}$$

G: Gesamtfläche des Peaks in der Bierprobe mit Zusatz des Standardgemisches

B: Fläche des Peaks in der Bierprobe ohne Standardzusatz

S: Fläche des Peaks im Standardgemisch

W: Wiederfindungsrate in Prozent

3.3.5 Enzymatische Schwefeldioxidbestimmung

Sulfit wird durch Sulfit-Oxidase zu Sulfat oxidiert. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird in Gegenwart von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) durch das Enzym NADH-Peroxidase reduziert. Nach der verbrauchten Menge an NADH kann das Sulfit als Gesamt SO₂ bestimmt werden. Dazu wird die verbrauchte NADH-Menge aufgrund des Absorbtionsunterschieds bei 340 nm bestimmt.¹

Eine Tablette mit ca. 0,4 mg NADH wird in 1 ml Triethanolamin-Puffer (pH=8) gelöst und ergibt das Reaktionsgemisch.

Die Suspension 1 enthält NADH-Peroxidase (NADH-POD) mit der Aktivität 3U

Die Suspension 2 enthält Sulfit-Oxidase (SO₂-OD) mit der Aktivität von 4U

Pipetierschema:

	Leerwert	Probe
Reaktionsgemisch	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung (Bier, entgast)	-	0,100 ml
bidest.Wasser	2,000 ml	1,900 ml
Suspension 1	0,010 ml	0,010 ml
mischen, nach 5 min Extinktionen der Lösungen der Lösungen messen (E ₁), anschliessend		
Zugabe von Suspension 2		
Suspension 2	0,050 ml	0,050 ml
mischen, 30 min Stillstand der Reaktion abwarten, Extinktionen der Lösungen messen (E ₂)		

Berechnung:

$$c = 1,960/6,18 * [(E_1 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_1 - E_2)_{\text{Leerwert}}] \quad \text{(Gleichung 6)}$$

¹ Beutler, H.-O., Schütte, I., "Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln", Deutsche Lebensmittelrundschaue 79, 1983, S. 323-330

3.4 Bierbereitung im Technikum

3.4.1 Substrat

Beim Substrat handelte es sich bei sämtlichen Gärversuchen um helle Anstellwürze der Sorte Original (untergäriges helles Vollbier) der Staatsbrauerei Weihenstephan, die nach dem Würzekühler entnommen wurde.

3.4.2 Gärung und Lagerung

Die Würze wurde aus den Cornelius-Behältern in zylindrokonische Gärtanks mit einem Fassungsvermögen von 20l umgedrückt. Dort wurde sie gegebenenfalls auf die gewünschte Anstelltemperatur gekühlt.

Die Belüftung erfolgte über eine Sinterkerze bei einem Gegendruck von 0,5 bar und, falls nicht anders angegeben, über 15 Minuten. So werden die etwa 8mg/l Sauerstoff gelöst.

Erst anschließend erfolgte die Hefegabe. Es wurde mit Presshefe aus der Hefebank Weihenstephan gearbeitet. 4 g Presshefe wurden in etwa 1 Liter der Würze aufgeschlämmt und zugegeben.

Kurz vor Erreichen des Gärkellervergärungsgrades wird das Jungbier auf 4°C heruntergekühlt und am nächsten Tag die Hefe geerntet.

Anschließend wird das Bier in Cornelius-Behälter umgedrückt und drei Wochen bei 0°C gelagert.

3.4.3 Filtration

Das Bier wurde über einen Seitz-Pilot Anschwemmfilter mit nachgeschalteten Schichtenfilter filtriert. Die Leistung des Filters betrug 10l/h.

Die Voranschwemmung betrug 600g/m² grobe Kieselgur und 600g/m² feine Kieselgur. Das Anschwemmwasser wurde mittels Kohlendioxid vom Sauerstoff weitgehend befreit. Auch die als Drucktanks dienenden Corneliusbehälter wurden mehrmals mit CO₂ vorgespült. Die laufende Dosage betrug 120g/hl und wurde in Unfiltrat angerührt.

3.4.5 Abfüllung

Abgefüllt wurde das Bier mit einem Füller der Firma Esau und Hueber mit Füllrohr. Zur Vermeidung unnötiger Sauerstoffaufnahme wurde stets zweimal mit Kohlendioxid vorgespannt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Zusatz von phenolischen Substanzen

4.1.1 Zusatz von phenolischen Substanzen zum abgefüllten Bier

In den vorangegangenen Arbeiten von Sobiech und Neumann^{1,2} wurde bereits der Einfluß verschiedener Antioxidantien auf die cyclovoltametrischen Messungen und den elektrochemischen Indikator-Time-Test untersucht. Dabei wurden vor allem phenolische Substanzen wie Catechin und Ferulasäure getestet.

Das Ziel war hier zu überprüfen, inwieweit das Messsystem überhaupt auf diese im Bier vorhandenen Polyphenole anspricht. Es wurden selbstverständlich höhere Konzentrationen als die im Bier vorhandenen gewählt, da die Substanzen als Einzelsubstanzen in einer äußerst geringen Konzentration vorliegen.

Um ähnliche Bedingungen wie im Bier zu gewährleisten, wurde ein Acetatpuffer mit 5% Ethanol verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass die phenolischen Substanzen als Reinsubstanzen spezifische Peaks im Cyclovoltogramm aufwiesen. Ebenfalls wurde das Mittlere Nullstrompotential zu deutlich niedrigeren Werten verschoben als beim reinen Puffer.

Auch die im elektrochemischen Indikator-Time-Test bestimmte Reduktionskraft wurde durch die Polyphenole erhöht.

Wie eingangs geschildert, handelt es sich bei Bier um ein deutlich komplexeres Medium als beim reinen Acetatpuffer.

Deshalb sollte in einer Versuchsreihe überprüft werden, wie einzelne phenolische Substanzen in höherer Konzentration in der Matrix Bier sich auf die elektrochemischen Messungen und andere Bestimmungen der Reduktionskraft auswirken.

Die Zugabe der phenolischen Substanzen musste unter Ausschluss von Luft geschehen, da sonst durch zusätzlich gelösten Sauerstoff insbesondere die Messung des 1.Nullstrompotentials beeinflusst worden wäre.

¹ Sobiech,R.,„Elektrochemische Bestimmung von Summenparametern für die Qualitätskontrolle von Bier“,Dissertation,TU München 1997

² Neumann,R.,„Elektrochemische Bestimmungsmethoden für das Reduktionsvermögen von Bier: Ansprechverhalten auf Probenveränderung und Beeinflussung durch Matrixeffekte“, Dissertation, TU München, 2000

Es bestanden grundsätzlich zwei Möglichkeiten der Zugabe der Polyphenole:

Erstens die Polyphenole im Drucktank des Technikums im Bier zu lösen und dann abzufüllen.

Eine zweite Möglichkeit erwies sich jedoch aus mehreren Gründen als zweckmäßig:

Catechin bzw. die Ferulasäure wurde in 10ml Lösung aus 50% unvergälltem Ethanol vorgelöst. Die Ethanollösung wurde vorher in einem Becherglas durch 5minütiges Durchblasen mit Stickstoff vom Sauerstoff befreit und während des Lösens der Polyphenole wurde das Glas stickstoffbegast, um einen neuerlichen Sauerstoffeintrag zu vermeiden.

Mittels einer Spritze mit langer Kanüle wurden jeweils 5ml der so hergestellten Lösung angezogen und unterschichtend in eine erst Sekunden vorher geöffnete Flasche Bier eingespritzt. Die Flasche wurde durch Schütteln zum Überschäumen gebracht und mittels des im Technikum vorhandenen Handverschließers mit einem Kronkorken wieder verschlossen.

Beim Bier handelte es sich um ein drei Tage zuvor abgefülltes großtechnisch hergestelltes helles Vollbier.

Diese Methode hat neben ihrer einfachen Durchführbarkeit gegenüber der Zugabe im Drucktank auch den Vorteil, dass die phenolischen Substanzen genauer dosiert werden können und eine homogene Verteilung stattfindet, sodass jede Probeflasche tatsächlich die gleiche angestrebte Konzentration enthält. Zudem ist hierbei der weitere Unsicherheitsfaktor unterschiedlichen Sauerstoffeintrages bei unserer kleintechnischen Abfüllung nicht gegeben. Messungen des Gesamtsauerstoffs vor und nach der Polyphenolzugabe zeigten bei der Methode des Einspritzens nur eine Zunahme von deutlich unter 0,1 mg/l.

Es wurden so Proben mit 0,1 mmol/l Catechin, 0,5mmol/l Catechin und 0,5 mmol/l Ferulasäure hergestellt, in dem 29 mg bzw. 145 mg Catechin bzw. 90 mg Ferulasäure in jeweils 10ml 50% Ethanollösung vorgelöst wurden und anschließend wie oben beschrieben verfahren wurde.

Die Flaschen wurden sofort nach den eingangs beschriebenen elektrochemischen und Referenz-Methoden zur Bestimmung der Reduktionskraft analysiert.

Tab.1: Messergebnisse für Aufstocken mit Catechin und Ferulasäure

	1.NP	2.NP	MNP	RV	4min	10min	15min	DPPH	Chap.	-15s	-4min	4-10m	10-15m
0-Bier	26,2	792,4	409,3	2,06	87,8	10,7	1,5	0,886	1,36	0,016	0,218	0,061	0,019
								0,961					
Cat.0,1	27,2	787,6	407,4	2,20	86,7	11,2	2,0	0,961	1,60	0,100	0,270	0,061	0,019
								1,017					
Cat.0,5	27,4	764,1	395,8	2,08	93,1	7,7	"-0,8"	1,205	3,05	0,144	0,312	0,107	0,051
								1,208					
Fer.0,5	26,2	775,9	401,3	2,00	92,2	7,7	0,1	1,147	1,70	0,081	0,295	0,107	0,048
								1,195					

Cat. 0,1

Zugabe von 0,1 mmol/l Catechin

Cat. 0,5

Zugabe von 0,5 mmol/l Catechin

Fer. 0,5

Zugabe von 0,5 mmol/l Ferulasäure

1.NP:

1.Nullstrompotential in mV

2.NP:

2.Nullstrompotential in mV

MNP:

Mittleres Nullstrompotential in mV

RV:

Redukton/Vitamin C-Verhältnis (Stromverhältnis)

4;10;15min:

Anteile der Ströme nach 4min, 4-10min und 10-15min

DPPH:

Diphenylpicrylhydrazyl reuzierende Aktivität
(Extinktionsunterschied) nach 5 bzw.10min

Chap.:

reduzierende Substanzen nach Chapon in mval/l

-15s;-4min,4-10min,10-15min:

DCI-Methode photometrisch; Extinktionsunterschiede in
den angegebenen Zeiträumen

Im Rahmen der Messgenauigkeit waren keine Unterschiede beim 1.Nullstrompotential zwischen dem 0-Bier und den mit Catechin versetzten Bieren zu erkennen.

Das 2.Nullstrompotential hingegen fiel mit höherem Gehalt an Catechin deutlich ab.

Misst man beim 0-Bier noch ein Potential von 792,4 mV, so betrug dieses Potential bei einer Konzentration von 0,1 mmol/l Catechin noch 787,6 mV und bei einem Gehalt von 0,5 mmol/l Catechin nur noch 764,1 mV.

Die vergleichbaren Verhältnisse beim Mittleren Nullstrompotential waren durch diese Unterschiede beim 2.Nullstrompotential bedingt.

Besondere Beachtung muss hier dem Verlauf der Cyclovoltgramme geschenkt werden.

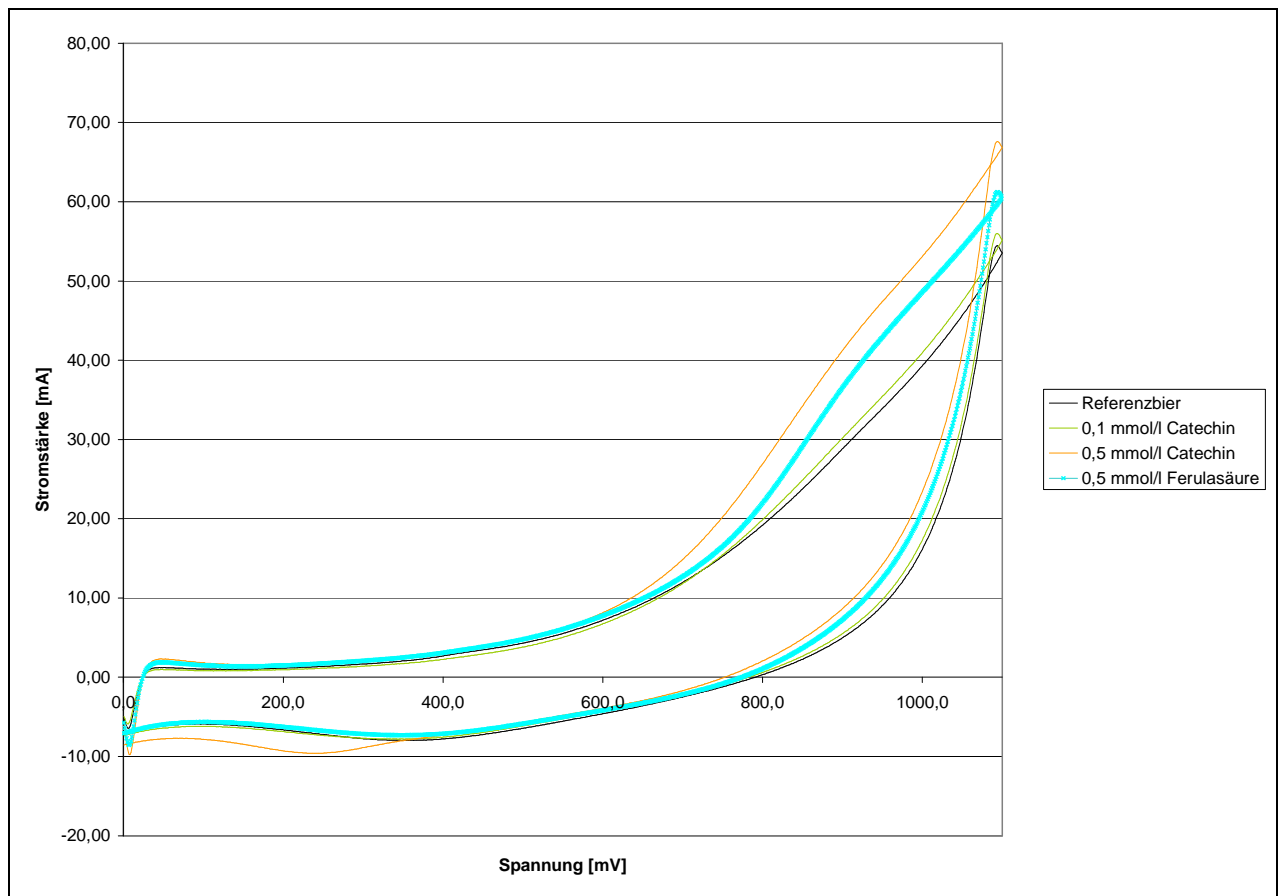


Abb.8: Cyclovoltogramme bei unterschiedlichen Catechin- und Ferulasäuregehalten

Anders als bei der Reinsubstanz Catechin in einer Pufferlösung waren hier bei den relativ hohen Konzentrationen keine Peaks zu erkennen (vgl. Abb.8)

Es fällt ausschließlich eine Ausbuchtung bei etwa 875mV auf, die bei höherer Catechin-Konzentration deutlicher zu erkennen ist.

Elektrochemischer-Indikator-Time-Test

Hier ist zu beobachten, dass bei einer Zugabe von 0,1mmol/l Catechin ein leichter Anstieg des Stromverhältnisses von 2,06 auf 2,20 zu beobachten war. Bei der höheren Konzentration von 0,5 mmol/l hingegen war mit 2,08 ein ähnliches Stromverhältnis wie beim Nullbier festzustellen. (vgl. Tab.1).

Der Anteil der schnellreduzierenden Substanzen war beim höchsten Catechingehalt am größten. In der Zeit zwischen 4-10 Minuten war nur noch ein geringerer Stromzuwachs zu beobachten. Der Strom nach 15 Minuten war sogar geringer als nach 10 Minuten Reaktionszeit.

DPPH-reduzierende Aktivität

Hier ergibt sich eine deutliche Erhöhung der Radikalfängerqualität gegenüber DPPH bei erhöhten Catechingehalten: Während das 0-Bier nur einen Extinktionsunterschied von 0,886 aufwies, betrug dieser bei den mit Catechin aufgestockten Proben 0,961 bzw. 1,205.(vgl.Tab.1)

Die Reduktionskraft gegenüber dreiwertigem Eisen nach Chapon stieg bei der Zugabe von 0,1mmol/l um 0,24 mval/l und bei 0,5mmol/l Catechin um 1,69mval/l an.

Deutlich erhöht war beim photometrischen DCI-Test bei den aufgestockten Bieren der Extinktionsunterschied in den ersten 15 Sekunden. Aber auch bis 4 min Reaktionszeit wirkten die aufgestockten Biere deutlich reduzierender gegenüber DCI als das 0-Bier.

Die Probe mit 0,5mmol/l Catechin reduzierte in allen Zeiträumen deutlich stärker als 0-Bier und die Probe mit 0,1 mmol/l Catechin.

Wie bei den Proben mit Catechin ist beim Aufstocken mit 0,5 mmol/l Ferulasäure gegenüber dem 0-Bier kein Unterschied beim 1.Nullstrompotential zu beobachten.

Das 2.Nullstrompotential hingegen war mit 775,9mV deutlich geringer als das des Nullbieres. Daraus resultiert auch ein niedrigeres Mittleres Nullstrompotential.

Gegenüber der Zugabe der gleichen Menge Catechin ist jedoch die Abnahme des Mittleren Nullstrompotentials deutlich geringer (vgl.Abb.9)

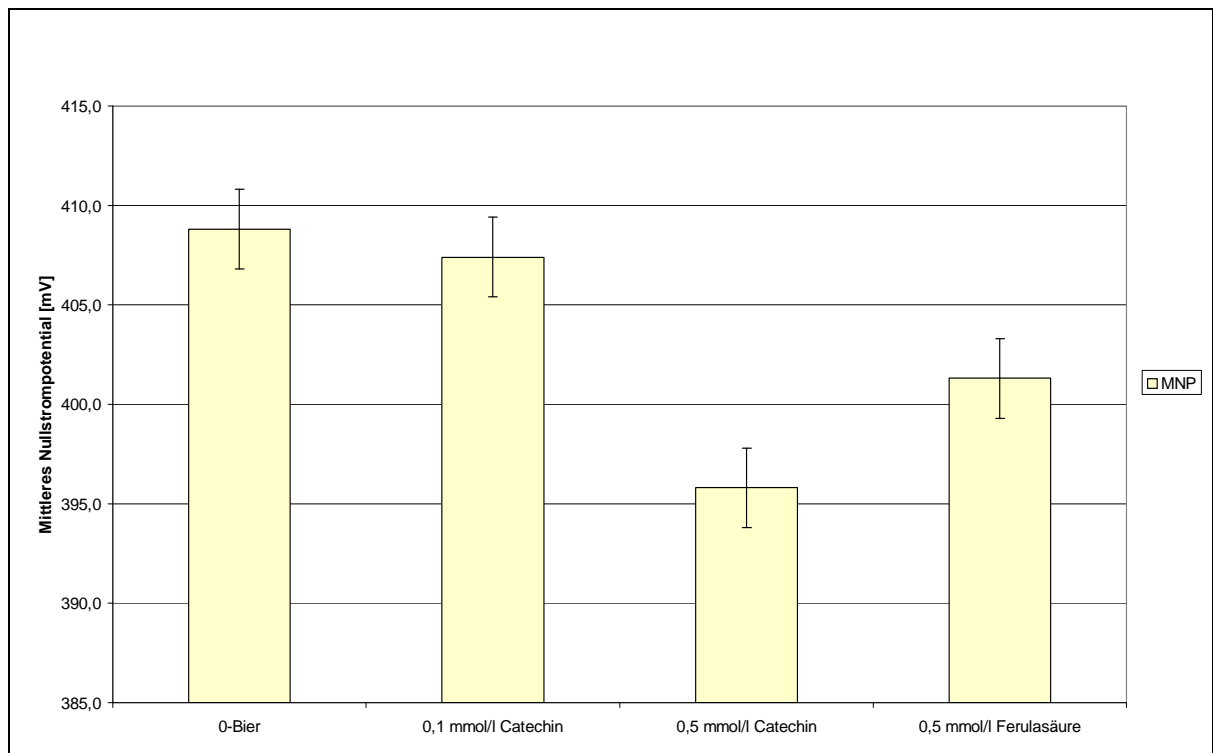


Abb.9: Mittleres Nullstrompotential bei Aufstocken mit Polyphenolen

Auch hier ist bei einem derart hohen Gehalt an einer Reinsubstanz der Verlauf des Cyclovoltagramms von Bedeutung.

Wie beim Aufstocken mit Catechin zeigen sich hier keine spezifischen Peaks (vgl. Abb.8).

Hier ist im CV eine Ausbuchtung bei der Oxidation beim Hinlauf bei etwa 900 mV zu erkennen.

Diese Ausbuchtung ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt, als bei der Aufstockung mit Catechin.

Das Stromverhältnis nach 4 Minuten Reaktionszeit ist in der Größenordnung der Nullprobe, jedoch mit 2,00 gegenüber 2,06 bei der Nullprobe etwas niedriger.

Wie bei der Aufstockung mit Catechin wird beim elektrochemischen Indikator-Time-Test ein sehr hoher Anteil von Reduktionen, die in den ersten 4 Minuten reagieren, ermittelt (92,2%), im Zeitraum zwischen 10 und 15 Minuten ist nahezu kein Stromanstieg zu verzeichnen, sodass nur 0,1% langsamreduzierende Substanzen ermittelt wurden.

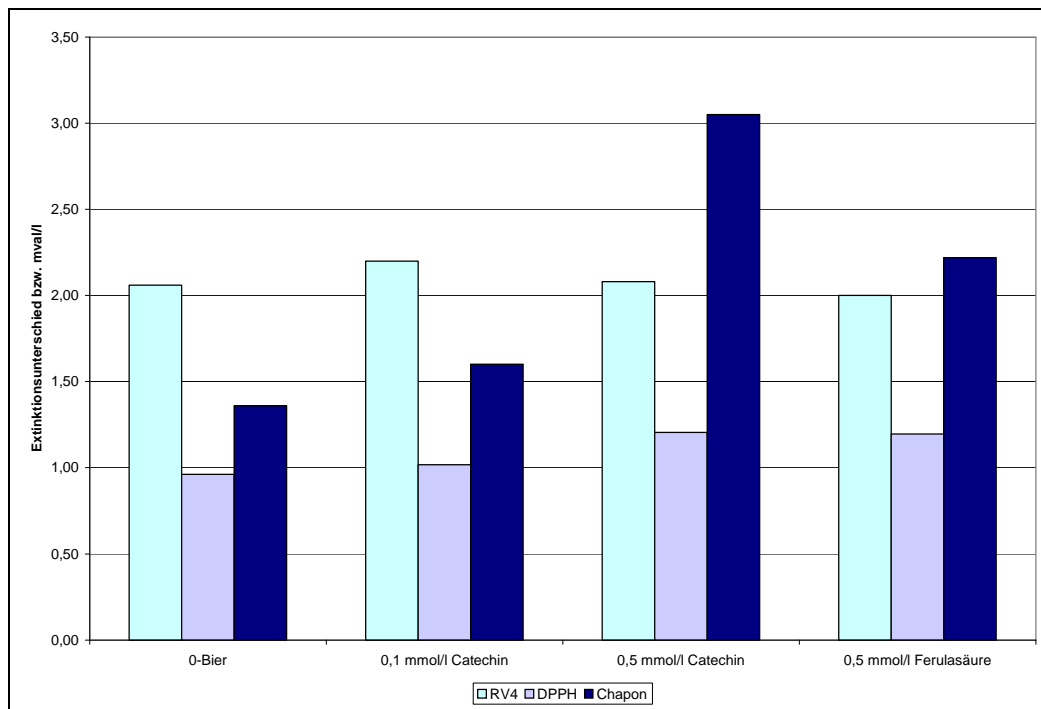


Abb.10: Aufstockung von Bier mit verschiedenen Polyphenolen:
Stromverhältnis, DPPH-reduzierende Aktivität und reduzierende
Substanzen nach Chapon

Der Zusatz der Ferulasäure erhöht den Extinktionsunterschied bei 5 Minuten Reaktionszeit gegenüber der 0-Probe deutlich von 0,961 auf 1,195 (vgl.Abb.10)

Verglichen mit der Wirkung des Catechin ist jedoch der Effekt der Ferulasäure auf die DPPH-reduzierende Aktivität deutlich geringer.

Die Zunahme der reduzierenden Substanzen nach Chapon gegenüber dem 0-Bier beträgt 0,34mval/l und liegt damit deutlich unter der Wirkung des Catechin.

4.1.2 Zusatz zu Würze und Schlauchbier

Nachdem der Einfluss von Ferulasäure und Catechin auf die elektrochemischen Messungen und andere Reduktionseigenschaften bei Zugabe zum fertigen Bier ermittelt wurde, stellte sich die Frage, in wieweit sich die Zugabe einer grossen Menge dieser Polyphenole auf die Redoxeigenschaften und deren Entwicklung im Brauprozess auswirken.

Eine großtechnisch gewonnene Würze wurde im Technikum auf 5 Tanks verteilt und wie eingangs geschildert bei einer Hauptgärtemperatur von 9°C vergoren.

Im ersten Tank wurde die Würze unverändert angestellt. In einem Tank wurde vor dem Anstellen 0,1mmol/l Catechin zugegeben, in einem weiteren 0,5 mol/l Catechin, und schließlich in einem vierten Tank 0,5 mmol/l Ferulasäure.

Ein weiterer Tank wurde ebenfalls mit unveränderter Würze angestellt und die 0,5 mmol/l Catechin vor dem Schlauchen zugegeben

Aufgrund grosser Mengen gelösten Sauerstoffs war eine reproduzierbare cyclovoltametrische Messung des Mittleren Nullstrompotentials in der Würze nicht möglich.

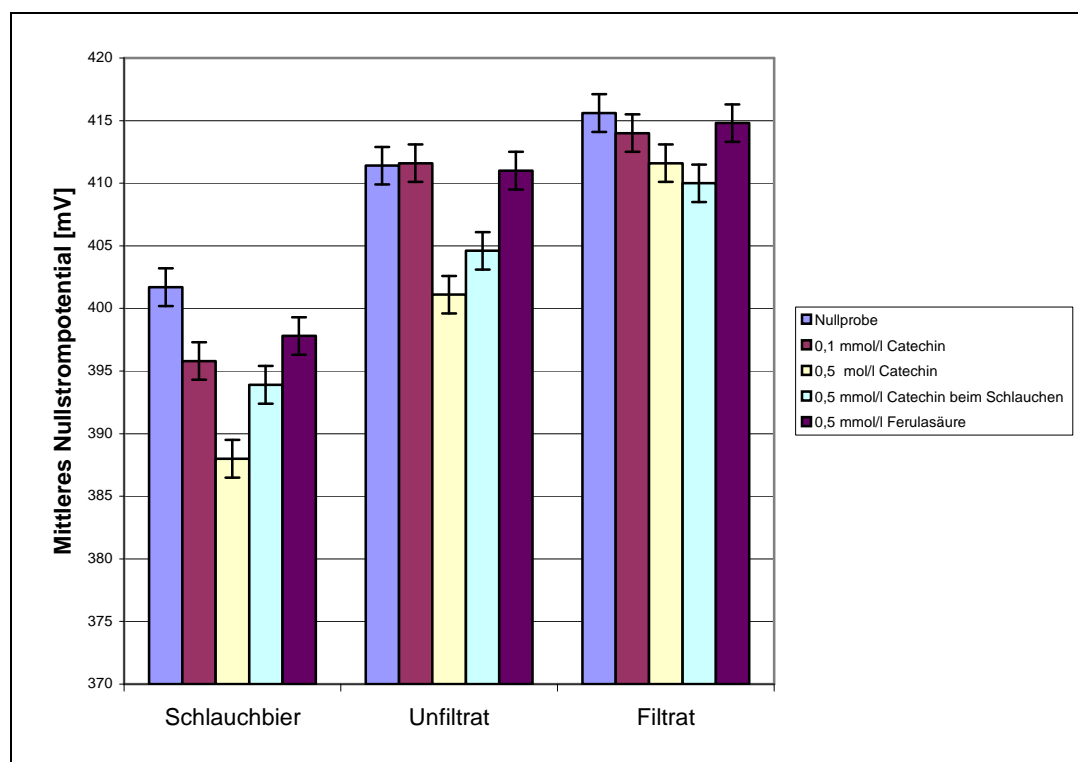


Abb.11: Verlauf des mittleren Nullstrompotentials bei Zusatz von phenolischen Substanzen

Die Zugabe von Catechin brachte die deutlichsten Absenkungen des Mittleren Nullstrompotentials. So wurde durch Zugabe von 0,5 mmol/l Catechin zur Würze ein beträchtlich, um über 15 mV, niedrigeres Mittleres Nullstrompotential als in der Nullprobe, dem Bier ohne Polyphenolzusatz, erreicht. Wie auch beim Aufstocken filtrierten Bieres war die Ferulasäure weniger wirksam. Ihre Zugabe zur Würze in einer Konzentration von ebenfalls 0,5 mmol/l brachte im Jungbier nur eine Absenkung um etwa 5 mV. So wurde mit der Zugabe von 0,1 mmol/l Catechin ein größerer Effekt auf das Nullstrompotential verzeichnet als mit 0,5 mmol/l Ferulasäure. Hier sank das Potenzial um etwa 7 mV.

Interessant war auch, dass die Zugabe von Catechin zum Schlauchbier eine deutlich geringere Senkung des Potentials mit sich brachte.(vgl.Abb.11).

Während der Lagerung trat, wie bei den meisten anderen Versuchsreihen auch, eine deutliche Erhöhung des Potentials auf. Dieser Anstieg war bei den mit phenolischen Substanzen versetzten Bieren größer, sodass es zu einer gewissen Nivellierung der Mittleren Nullstrompotentiale kam. So unterschied sich jetzt nicht mehr das Nullstrompotential des Jungbieres mit Ferulasäure und mit 0,1 mmol/l Catechin vom Nullbier ohne Zugabe der phenolischen Substanzen. Die Jungbiere mit der höheren Catechingabe hatten immer noch ein mittleres Nullstrompotential, das deutlich unter dem des Nullbieres lag, obwohl sich dieser Unterschied gegenüber dem Schlauchbier durch die Lagerung verkleinerte.

Durch die Filtration fand bei allen Proben ein weiterer Anstieg des Nullstrompotentials statt. Auch hier näherten sich die Potentiale der Biere mit hoher Zugabe von phenolischen Substanzen weiter dem Nullstrompotential des Nullbieres an.

Nach der Filtration ist schließlich das Potential des Bieres mit Catechinzugabe beim Schlauchen in der selben Größenordnung wie das des Bieres mit Catechingabe beim Anstellen, was bedeutet, dass bei der Filtration das Potential des letzteren deutlicher zunahm.

Wie bei den meisten anderen Versuchsreihen auch, ist im Verlauf von Gärung und Lagerung die Reduktionskraft deutlich gesunken (vgl.Abb.12).

Wie beim Aufstocken filtrierten Bieres ist der Einfluss dieser Polyphenole auf die Reduktionskraft gegenüber DCI gering. Abgesehen von den dem Bier mit der Gabe von 0,5 mol/l Catechin beim Anstellen, das beim Unfiltrat und Filtrat eine geringfügig höhere Reduktionskraft aufweist und dem Bier mit Catechinzugabe beim Schlauchen, das kurz nach dieser Zugabe eine höhere Reduktionskraft gegenüber DCI hat, liegen die Stromverhältnisse in der Größenordnung der Stromverhältnisse des Nullbieres.

Zusammenfassend kann man hier sagen, dass eine Zugabe dieser Polyphenole keinen oder nur einen äußerst geringen Einfluss auf das Stromverhältnis und damit auf den Gehalt an ITT-Substraten hat, die das DCI innerhalb von 4 Minuten reduzieren.

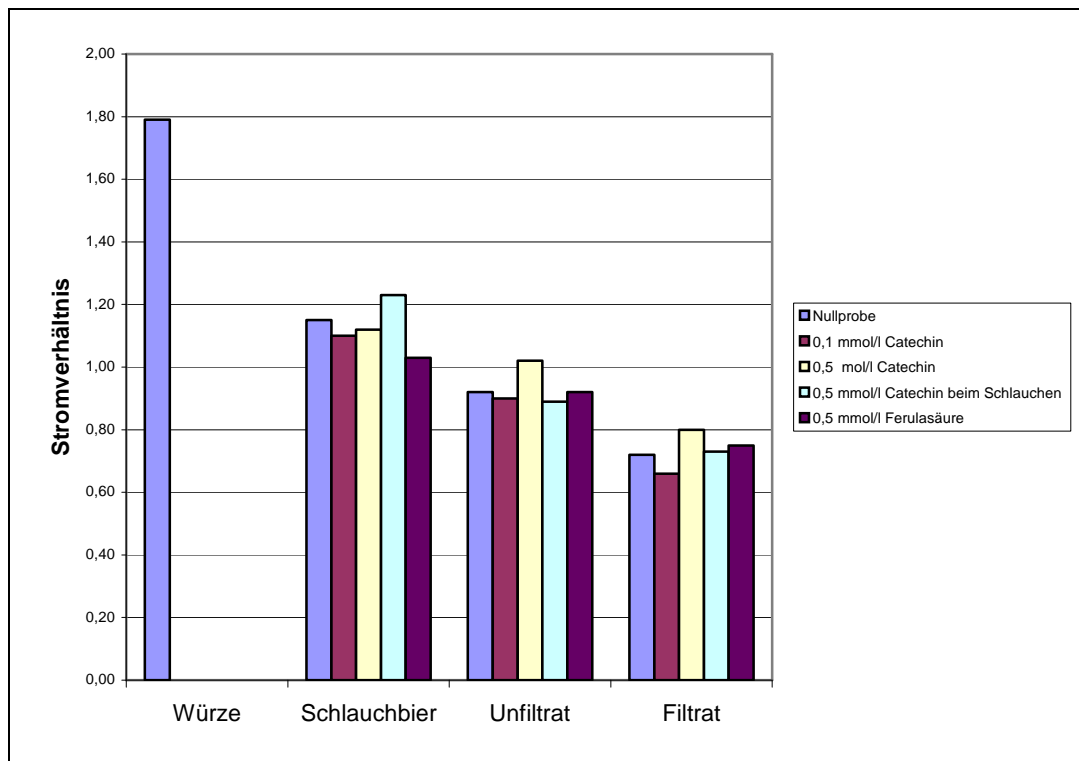


Abb.12: Verlauf des Stromverhältnisses bei Zusatz von phenolischen Substanzen

Schnellreduzierende Substanzen

Beobachtet wurde auch hier eine Abnahme der schnellreduzierenden Substanzen während Gärung, Lagerung und Filtration (vgl. Abb. 13). Deutlicher als das Stromverhältnis, das die absolute Menge der schnellreduzierenden Substanzen beschreibt, ist ein Einfluss hoher Catechingabe auf den relativen Anteil dieser schnellreduzierenden Substanzen zu erkennen. Die deutlichste Steigerung erfolgt bei einer Gabe des Catechins beim Schlauchen. Die Ferulasäure hingegen hatte nur geringen Einfluss auf den Anteil. Er war sogar leicht geringer.

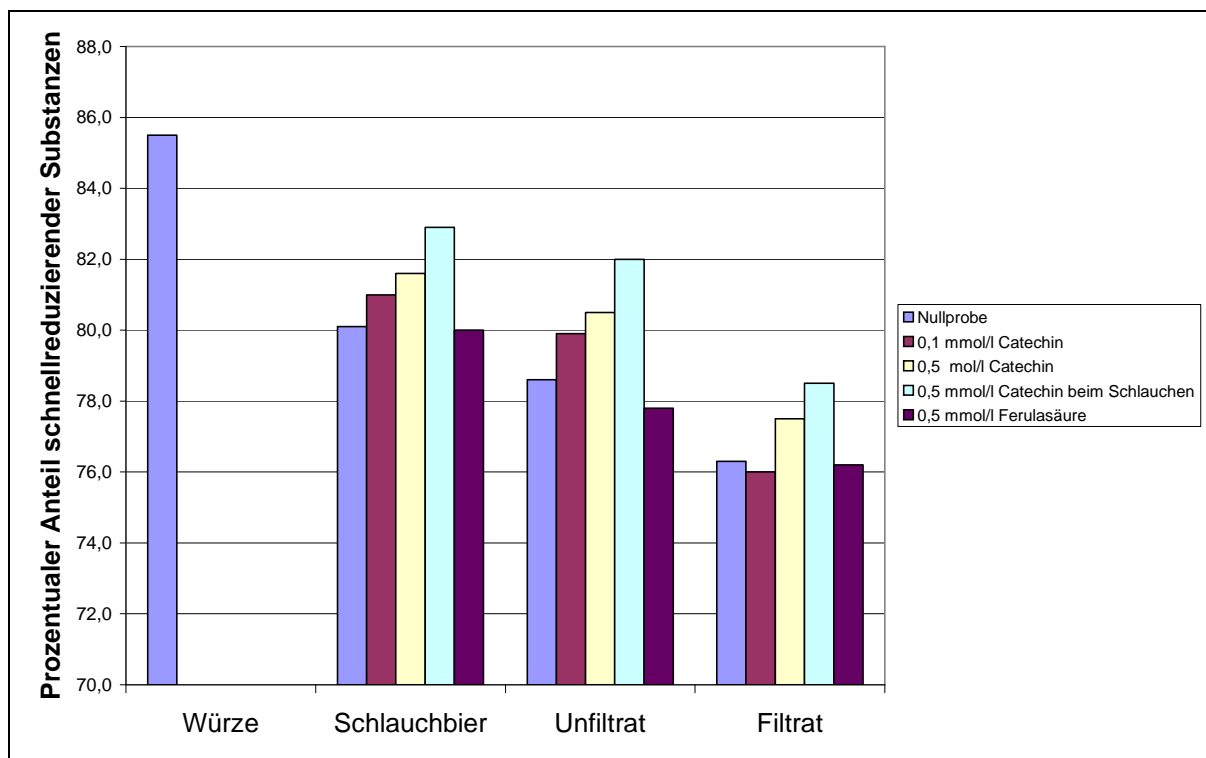


Abb.13: Verlauf der schnellreduzierenden Substanzen bei Zusatz von phenolischen Substanzen

Mittelschnellreduzierende Substanzen

Die mittelschnellreduzierenden Substanzen nehmen bei Gärung, Lagerung und Filtration auf Kosten der schnellreduzierenden Substanzen zu. Ansonsten fällt nur ein etwas geringerer Anteil mittelschnellreduzierender Substanzen in den Bieren mit Catechinzugabe auf (vgl. Abb.14).

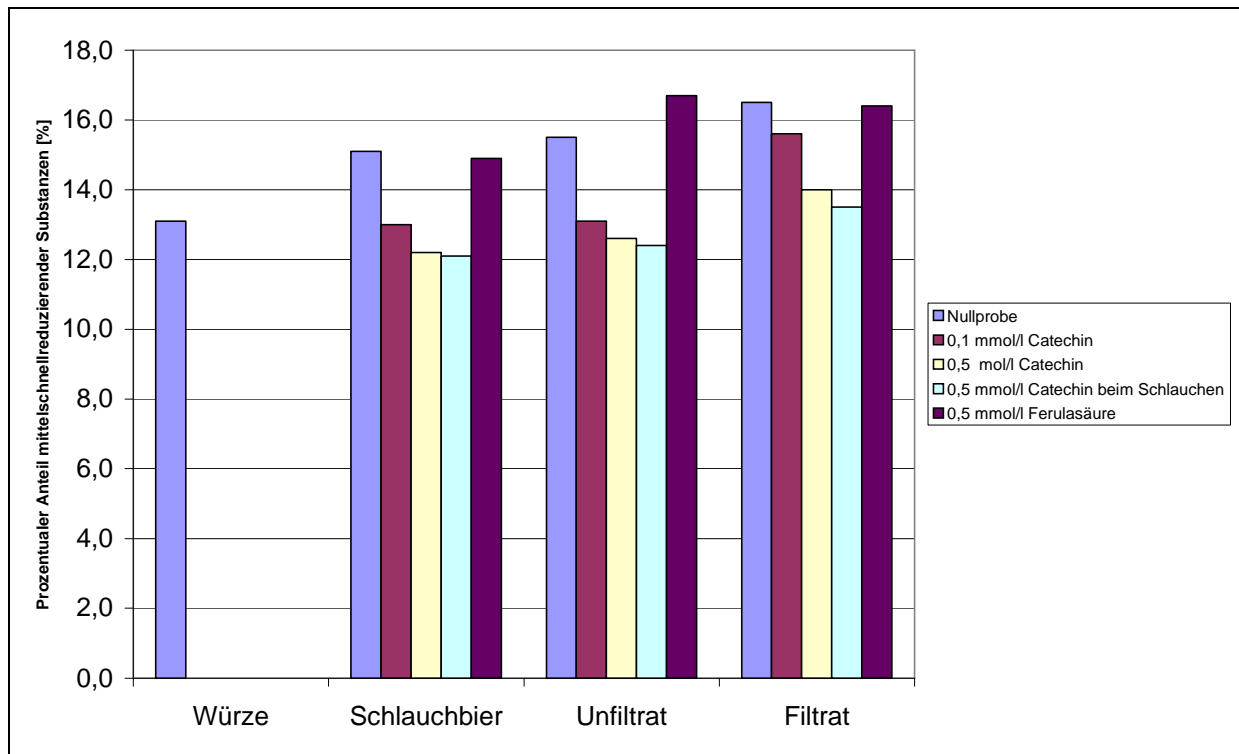


Abb.14: Anteil mittelschnellreduzierender Substanzen bei Zusatz von phenolischen Substanzen

Langsamreduzierende Substanzen

Auch hier fällt eine Zunahme der langsamreduzierenden Substanzen im Verlauf der Bierbereitung auf.

Eine Catechinzugabe führt hier zu einer geringen Steigerung des Anteils langsamreduzierender Substanzen (vgl. Abb.15).

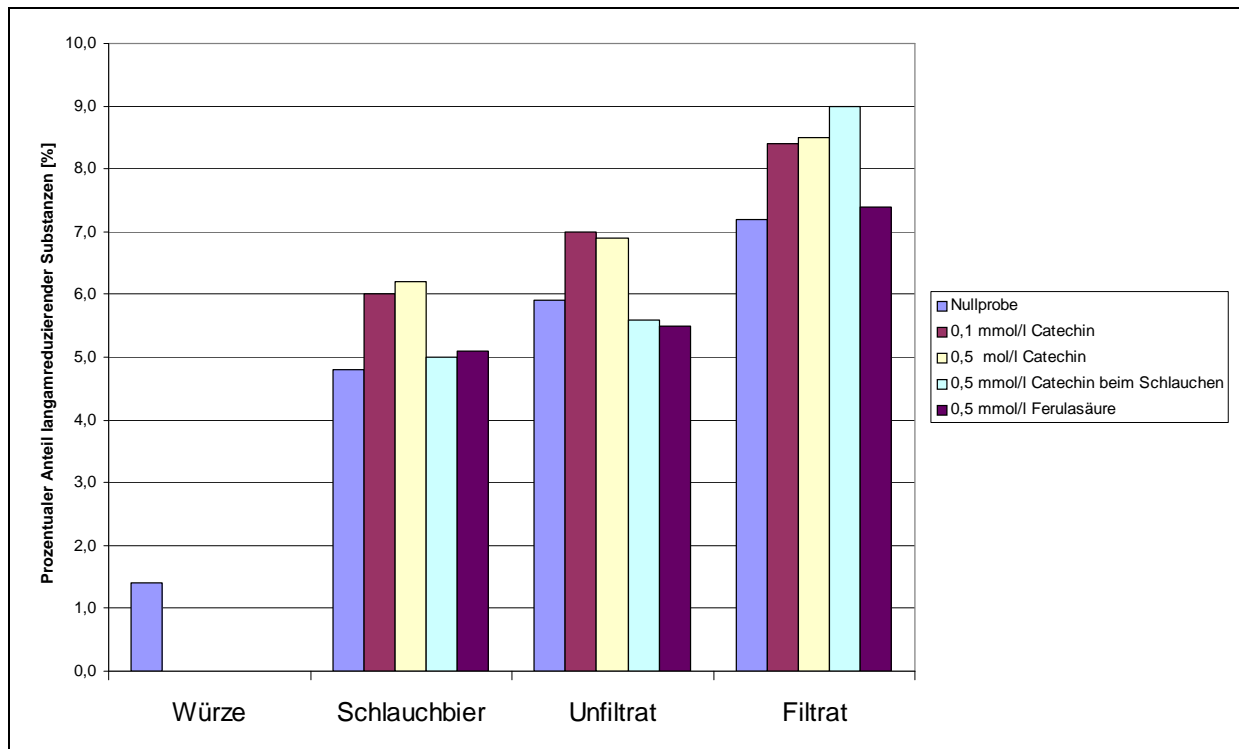


Abb.15: Anteil langsamreduzierender Substanzen bei Zugabe von phenolischen Substanzen

DPPH-reduzierende Aktivität

Bei der Bestimmung der DPPH-reduzierenden Aktivität konnten jedoch eindeutige Abhängigkeiten der Werte von der Gabe an phenolischen Substanzen festgestellt werden (vgl. Abb.16).

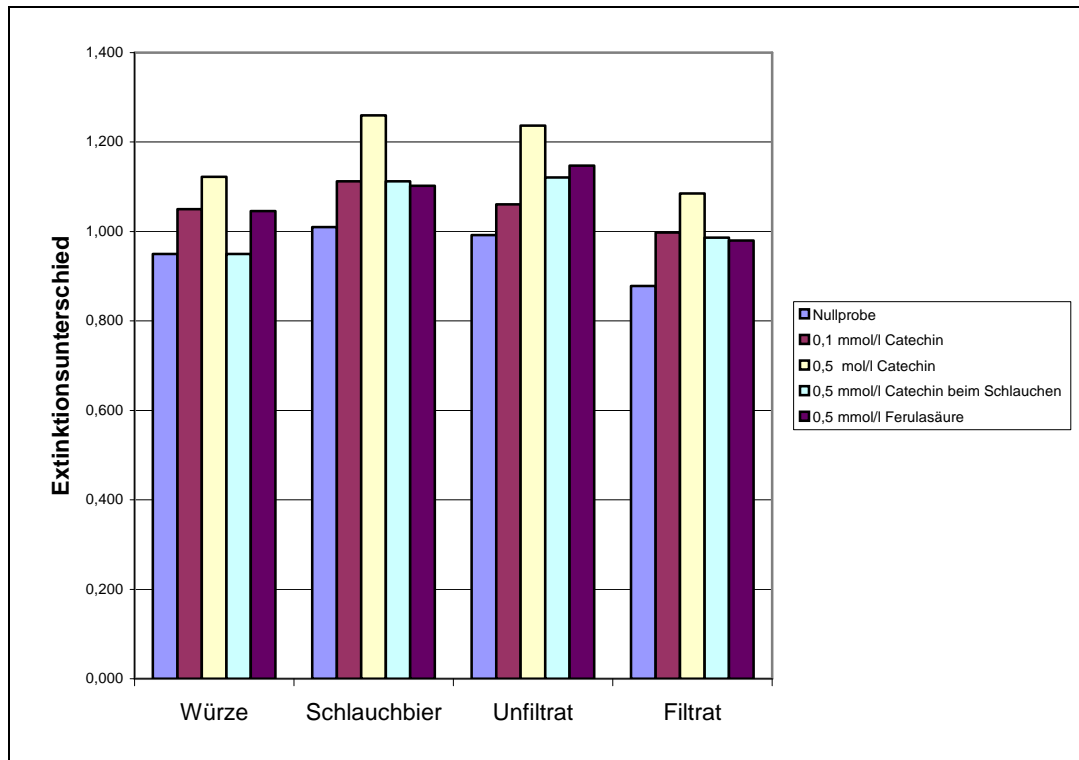


Abb.16: Entwicklung der DPPH-reduzierenden Aktivität beim Zusatz von phenolischen Substanzen

Gesamtpolyphenole

Schon in der Würze war ein deutlicher Einfluss des Zusatzes phenolischer Substanzen zu erkennen. Den deutlichsten Anstieg brachte die Zugabe von 0,5 mmol/l Catechin. Etwa halb so groß war der Anstieg bei der Zugabe von 0,1 mol/l Catechin bzw. 0,5 mmol/l Ferulasäure. Durch die Hauptgärung stieg die DPPH-reduzierende Aktivität in allen Proben gleichermaßen an.

Es fällt hier auf, dass der Zusatz von 0,5 mmol/l erst beim Schlauchen einen deutlich geringeren Extinktionsunterschied hervorrief als der Zusatz in der Würze. Die DPPH-reduzierende Aktivität lag bei der späteren Zugabe des Catechins nur in der Größenordnung der Biere mit Ferulasäure bzw. geringerer Catechinzugabe .

Am Gesamtpolyphenolgehalt wurde sichtbar, wie viel phenolische Substanzen im Bier tatsächlich verblieben sind.

Es fällt hier auf, dass der Gehalt an Gesamtpolyphenolen beim Ferulasäurezusatz nicht steigt (vgl. Abb.17)

Beim Catechinzusatz zur Würze wird deutlich, dass zwar nicht die gesamte Catechinmenge im Bier verbleibt, jedoch der Anstieg etwa proportional zur Gabe ist.

Beim Schlauchbier, dem Catechin zugegeben wurde, war zu diesem Zeitpunkt der Polyphenolgehalt am höchsten.

Während der Lagerung trat jedoch bei diesem Bier ein deutlicher Rückgang auf.

Durch die Filtration nahm der Gesamtpolyphenolgehalt bei den mit 0,5 mmol/l aufgestockten Proben stärker ab als bei den anderen Proben.

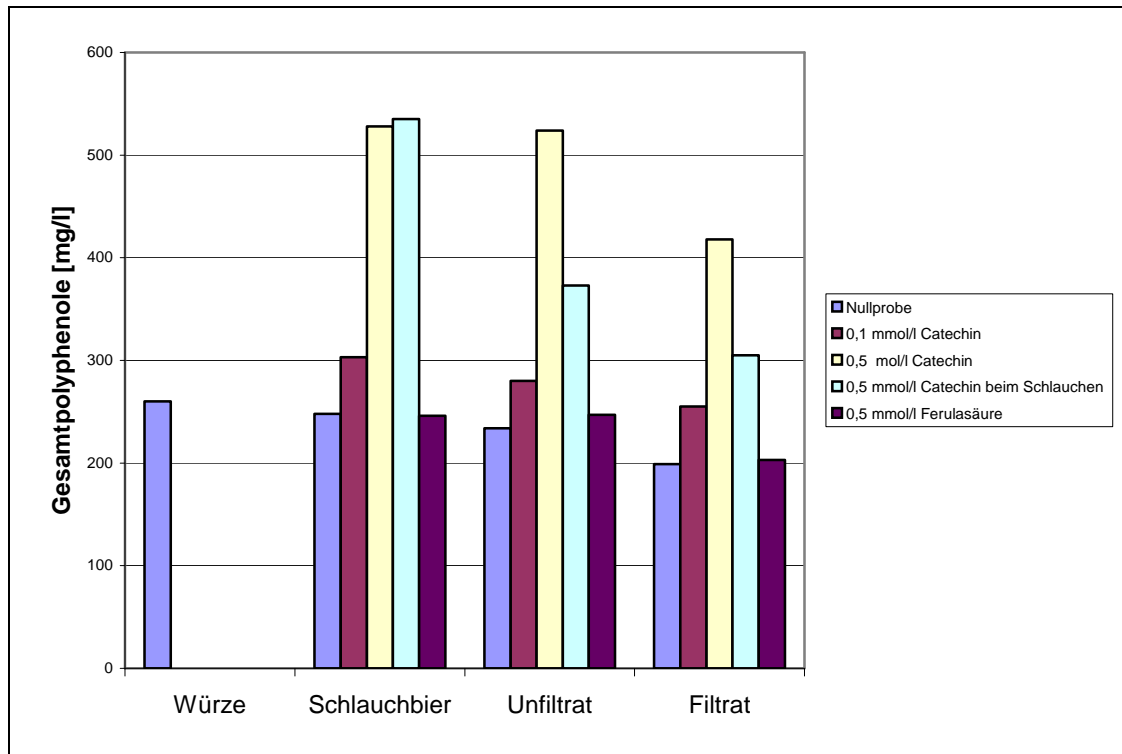


Abb.17: Entwicklung der Gesamtpolyphenole bei Zusatz von phenolischen Substanzen

Wie beim Aufstocken filtrierten Bieres fällt der große Einfluss der zugegebenen Polyphenole auf das mittlere Nullstrompotential auf. Beim Catechin war dieser Einfluss stark abhängig von der zugegebenen Menge und dem Zeitpunkt der Zugabe. Die Cyclovoltametrische Messung spricht sehr stark auf diese phenolischen Substanzen an. Dies sieht man auch an der Abbildung der Cyclovoltogramme bei der Zugabe zum filtrierten Bier (vgl. Abb.8), die Ausbuchtungen bei für die Substanzen spezifischen Potentialen hatten. Spezifische Peaks bei bestimmten Spannungen wie sie von Sobiech¹ bei Cyclovoltogrammen von phenolischen Substanzen in alkoholischem Puffer nachgewiesen wurden, traten in den aufgestockten Bieren nicht auf. Dieser Effekt ist auf den Gehalt des Bieres an unterschiedlichsten Redoxsubstanzen zurückzuführen. Ganz deutlich ist bei diesen Versuchen auch der Zusammenhang zwischen cyclovoltametrischen Messungen und antiradikalischer Aktivität.

¹ Sobiech, R., "Elektrochemische Bestimmung von Summenparametern für die Qualitätskontrolle von Bier", Dissertation, TU München 1997

Wies ein niedriges Mittleres Nullstrompotential bei hohen Gehalten an Catechin auf "günstige" Redoxzustände hin, so korrelierte diese Beobachtung in allen Phasen der Bierbereitung mit einer hohen Radikalfängerqualität nach DPPH-Methode (vgl. Abb. 16). Die Wirkung der Ferulasäure war sowohl auf das Mittlere Nullstrompotential, als auch auf die DPPH-reduzierende Aktivität geringer. Dies deckt sich auch mit Erfahrungen, die mittels verschiedener Tests für die Antioxidative Radikalfängerqualität von Catechin und Ferulasäure gemacht wurden^{1,2,3}.

An dieser Stelle sollte auch auf die PVPP-Stabilisierungsversuche (vgl. Kap. 4.4) hingewiesen werden. Auch hier reagierte die cyclovoltametrische Messung des Mittleren Nullstrompotentials sehr stark auf Änderungen bei relevanten phenolischen Substanzen.

Anders als bei den Versuchen von Neumann und Sobiech, bei denen diese phenolischen Substanzen im alkoholischen Puffer deutliche Erhöhungen des Stromverhältnisses mit sich brachten, wurde hier durch die Zugabe der Substanzen sogar eher eine Absenkung der Reduktionskraft gegenüber dem Nullbier beobachtet. Insofern belegt dies Chapons Feststellung⁴, dass es sich bei den phenolischen Substanzen nicht um ITT-Substrate im eigentlichen Sinn handelt, wenn man von der Reaktivität im Bier ausgeht. Ein etwas besseres Stromverhältnis des Bieres mit einem hohen Catechinzusatz zur Würze weist darauf hin, dass die Bildung oder der Schutz von ITT-Substanzen vor Oxidation durchaus durch einen hohen Gehalt an phenolischen Antioxidantien befördert wird. Am deutlichsten wird durch die Zugabe der phenolischen Substanzen der Anteil langsamreduzierender Substanzen gesteigert (vgl. Abb. 15).

Das weist darauf hin, dass diese starken Radikalfänger den langsamen ITT-Substraten angehören. Auch hier muss auf einen anderen Effekt hingewiesen werden, der diese These stützt: Beim Forcieren von Bieren die mit wenig Sauerstoffaufnahme abgefüllt wurden, war in dieser und den vorausgehenden Arbeiten oft eine Zunahme der schnellreduzierenden und Abnahme der langsamreduzierenden Substanzen zu beobachten. Wichtig war dabei die gleichzeitige Abnahme der antiradikalischen Aktivität. Erklärbar ist dieser Effekt durch die Abnahme aktiver phenolischer Antioxidantien.

¹ Pannala, A.S., Rice-Evans, C., "Rapid-Screening Method for Relative Antioxidant Activities of Flavonoids and Phenolics", *Methods in Enzymology* Vol. 335, 2001, S. 266-295

² Walters, M.T., Heasman, A.P., Hughes, P.S., "Comparison of (+)-Catechin and Ferulic Acid as Natural Antioxidants and their Impact on Beer Flavour Stability", Part 1: "Forced-Aging", Part 2: "Extended Storage Trials", *J. Am. Soc. Brew. Chemists*, 55 (2), 1997, S. 83-89

³ Araki, S., Kimura, T., Shimizu, C., Furusho, S., Takashio, M., Shinotsuka, K., "Estimation of Antioxidative Activity and Its Relationship to Beer Flavour Stability", *J. Am. Soc. Brew. Chemists*, 57 (1), 1999, S34-37

⁴ Chapon, L., "Oxygen and beer", *Brewing Science* Vol. 2, Academic Press, New York 1981, S. 407-455

Die Zugabe von Catechin zur Würze trug am meisten zur Ausbildung günstiger Redoxverhältnisse bei (vgl. Abb. 11 und 12). Die Bildung und der Erhalt antioxidativer Substanzen während der Gärung wurden positiv beeinflusst und gleichzeitig weniger phenolische Substanzen während der Gärung ausgeschieden als bei Zugabe von Catechin beim Schlauchen, das eine starke Ausscheidung phenolischer Substanzen während der Lagerung bewirkte (vgl. Abb. 17).

Hier wird deutlich, dass die Gruppe der "Reduktone" neu zu bewerten ist. Eine schnelle Reaktion beim elektrochemischen Indikator-Time-Test, also eine hohe Reaktivität mit DCI, allein hat keine Bedeutung für die tatsächliche antiradikalische Aktivität. Vielmehr zeigten die Versuche, dass gerade gute Radikalfängereigenschaften verbunden sind mit einem hohem Anteil an langsamreduzierenden ITT-Substraten. Phenolische Substanzen wie Catechin und Ferulasäure reagieren im Medium Bier als langsamreduzierende Substanzen, obwohl sie in Hinblick auf das Abfangen aktiven Sauerstoffes sowohl als Reinsubstanz als auch im Medium Bier sehr hohe Aktivitäten haben. Ein weiterer Punkt, der auf die große praktische Bedeutung der langsamreduzierenden Substanzen hinweist, ist die Zunahme der schnellreduzierenden Substanzen bei Alterung und forcierter Alterung. Die Radikalfängereigenschaften nehmen parallel zu den langsamreduzierenden Substanzen zu. Das eigentliche für die Abwehr des radikalischen Sauerstoffes wichtige Potential ist also eher bei den langsamreduzierenden Substanzen zu vermuten. Es gilt also geeignete technologische Maßnahmen zu ergreifen, die diesen Anteil erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur zur Gärung und Lagerung große Mengen phenolischer Substanzen gegeben. Interessant wäre auch die Zugabe zu einem früheren Zeitpunkt der Bierbereitung. Das Verhalten dieser Antioxidantien in Maische und heißer Würze wird sich möglicherweise stark vom Verhalten in kalter Würze oder gärendem Substrat unterscheiden, da erstens aufgrund der höheren Temperaturen und zweitens aufgrund des permanenten Sauerstoffzutritts eine massive Beeinflussung der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der phenolischen Substanzen eintritt. Zahlreiche Untersuchungen v.a. im Hinblick auf den Polymerisationsindex wie von Narziß und Bellmer zeigen diese Zusammenhänge.^{1 2}

¹ Narziß, L., Bellmer, H.-G., "Studie über die Polyphenole und deren Polymerisationsindex in den Rohstoffen des Bieres und ihre Veränderung während der Bierbereitung", Brauwissenschaft 28, 1975, S. 271-274

² Bellmer, H.-G., "Über den Einfluss der Malzqualität auf Polymerisationsindex, kolloidale Haltbarkeit und Geschmacksstabilität der Biere", Brauwelt 116, 1976, S. 789-797

Da sich während der Würzebereitung schnelle Veränderungen vollziehen, die nicht mit den Veränderungen während der Gärung vergleichbar sind, wäre es interessant, die Auswirkungen der phenolischen Substanzen zu diesem Zeitpunkt zu untersuchen. Von grosser Bedeutung ist jedoch hierbei die Problematik des gelösten Sauerstoffes. So gelang es bisher nicht reproduzierbar das Mittlere Nullstrompotential von Maische- oder Würzeproben zu bestimmen.

4.2 Einfluss von Sauerstoff bei Drucktankbier

In der Arbeit von Neumann wurde der Einfluss von Luft und Wärme auf die elektrochemischen Parameter untersucht.

Eine Belüftung mit anschließender Erwärmung brachte eindeutige Veränderungen:

Das Mittlere Nullstrompotential wurde erhöht, das Stromverhältnis sank, ebenso wie der Anteil schnellreduzierender Substanzen.¹

In der vorliegenden Arbeit wurde die Versuchsanordnung so gewählt, dass ein definiertes Bier durch unterschiedliche Belüftungszeiten auf unterschiedliche Sauerstoffgehalte gebracht wurde.

Dazu wurde ein Helles Vollbier aus dem Drucktank einer Großbrauerei, das PVPP stabilisiert war, verwendet.

Dieses wurde zum Transport in Cornelius-Behälter umgedrückt. Um eine Sauerstoffaufnahme zu verhindern, wurden die Cornelius-Behälter mehrmals mit Kohlendioxid unterschichtend gespült und anschließend vorgespannt.

In der Pilotbrauerei wurden dieses Bier aus den Cornelius-Behältern, die jeweils ca. 20 l fassen, in fünf, ebenfalls mit Kohlendioxid vorgespülte Gärtanks umgedrückt.

Die Tanks wurden über eine Sinterkerze, die normalerweise der Belüftung der Würze beim Anstellen dient, unterschiedliche lang bei einem Gegendruck von etwa 1 bar (bei 4°C) belüftet:

¹ Neumann, R., Elektrochemische Bestimmungsmethoden für das Reduktionsvermögen von Bier: Ansprechverhalten auf Probenveränderung und Beeinflussung durch Matrixeffekte", Dissertation, TU München, 2000

Tank 1: keine Belüftung

Tank 2: 5 Minuten Belüftung

Tank 3: 10 Minuten Belüftung

Tank 4: 20 Minuten Belüftung

Tank 5: 30 Minuten Belüftung

Anschließend wurde das Bier in zweimal vorgespante (um eine zusätzliche Sauerstoffaufnahme zu vermeiden) Flaschen abgefüllt.

Diese werden etwa eine Stunde über Kopf geschüttelt und anschließend mit der O₂-Messsonde der Gesamtsauerstoff bestimmt.

Dabei ergaben sich folgende Gesamt-O₂-Werte:

Tank 1: 0,2 mg/l

Tank 2: 0,2 mg/l

Tank 3: 0,6 mg/l

Tank 4: 1,1 mg/l

Tank 5: 2,8 mg/l,

Tab.2: Messergebnisse für belüftetes Bier (frisch ca.16h nach Abfüllung, Aufbewahrung kühl, kein Schütteln)

	O ₂	1.NP	2.NP	MNP	RV4	%4min	%10min	%15min	DPPH5	DPPH	Chapon
1	0,2	34,9	820,2	427,5	1,57	81,3	15,1	3,9	0,806	0,901	0,82
2	0,2	27,7	816,2	422,0	1,61	80,5	15,5	3,9	0,802	0,894	0,85
3	0,6	39,1	820,3	429,8	1,50	79,8	16,3	4,0	0,783	0,869	0,74
4	1,1	50,9	822,4	436,6	1,55	81,3	14,6	4,0	0,785	0,870	0,78
5	2,8	143,2	834,6	489,8	1,35	76,1	18,6	5,2	0,635	0,720	0,70

	Gesamtpoly- phenole.	Anthocyano- gene	Flavanoide	Catechin	Ferulasäure	Vanilinsre.
1	85,7	19,1	16,2	1,28	0,89	0,68
2	82,0	18,2	10,1	1,30	0,92	0,63
3	86,5	19,3	18,8	1,31	0,98	0,65
4	85,2	19,0	7,2	1,42	1,06	0,63
5	85,1	19,1	6,5			

O₂: Gesamtsauerstoff nach Abfüllung in mg/l

1.NP: 1.Nullstrompotential in mV

2.NP: 2.Nullstrompotential in mV

MNP: Mittleres Nullstrompotential in mV

RV4: Redukton-Vitamin C-Verhältnis (Stromverhältnis)

%4,10,15min: Prozentuale Verhältnisse der DCI-Ströme nach 4,10 bzw.15min Reaktionszeit (Anteil schnellreduzierender, mittelschnellreduzierender und langsamreduzierender Substanzen)

DPPH5,DPPH: Diphenylpicryl-Hydrazyl reduzierende Aktivität; Extinktionsunterschied nach 5 bzw.10 Minuten

Chapon: Reduzierende Substanzen nach Chapon in mval/l

Das 1.Nullstrompotential steigt ab einem erhöhten Sauerstoffgehalt von 0,6 mg/l an.

Das zweite Nullstrompotential erfährt erst bei Sauerstoffwerten über 1mg/l eine deutliche Erhöhung (vgl.Tab.2).

Das sich ergebende Mittlere Nullstrompotential steigt mit höheren Sauerstoffwerten.

Bei Sauerstoffgehalten bis zu 1,1 mg/l veränderte sich das Stromverhältnis (4 Minuten Reaktionszeit) kaum. Erst die Belüftung auf 2,8 mg/l ließ den Gehalt dieser Reduktone absinken. Das Stromverhältnis betrug 1,35, während es sich bei niedrigeren Sauerstoffwerten um die 1,55 bewegte.

Ein ähnliches Ergebnis lag auch bei dem prozentualen Anteil schnell reduzierender Reduktone vor:

Bei einem Sauerstoffgehalt von 0,2 mg/l erhielt man 81,3% bzw. 80,5%.

Bei 1,1 mg/l Sauerstoffgehalt betrug der Anteil ebenfalls 81,3%.

Eine deutliche Absenkung des prozentualen Anteils an schnell reduzierenden Substanzen auf 76,1% brachte erst ein Gesamtsauerstoffgehalt von 2,8 mg/l.

Radikalfängereigenschaften nach DPPH-Methode

Bei 0,6 mg/l sinkt der Extinktionsunterschied deutlich ab. Bei 0,6mg/l und 1,1mg/l erhält man etwa den selben Wert (vgl.Tab.2).

Erst bei einem hohen Sauerstoffgehalt von 2,8 mg/l gibt es einen deutlichen Abfall auf einen Extinktionsunterschied von 0,635

Die Abnahme ist aber bei geringeren Sauerstoffwerten unter 1,1 mg/l nicht eindeutig zu beobachten. Erst beim extrem hohen Sauerstoffgehalt von 2,8 mg/l tritt eine vergleichbar geringe Abnahme dieser durch die Eisen-Dipyrridyl-Methode bestimmten Substanzen auf 0,70 mval/l auf.

Die Substanzen nehmen also bei leicht erhöhter Sauerstoffbelastung innerhalb der 16-stündigen Aufbewahrungszeit kaum ab.

Der Gehalt an Gesamtpolyphenolen liegt zwischen 82,0 und 86,5 mg/l. Dabei ist der höchste Wert bei einer Belüftung auf 0,6 mg/l Sauerstoff zu verzeichnen.

Insgesamt ergibt sich bei der Bestimmung der Gesamtpolyphenole kein Zusammenhang mit einer erhöhten Sauerstoffbelastung.

Die bei der Bestimmung der Anthocyanogene erfaßten niedermolekularen phenolischen Substanzen ändern sich durch die unterschiedliche Sauerstoffbelastung kaum. Unabhängig von der Belüftung 16 Stunden vor der Bestimmung enthielten alle Biere etwa 19 mg/l Anthocyanogene.

Anders als beiden anderen summarischen Bestimmungen der Gesamtpolyphenole und der Anthocyanogene wurde bei der Bestimmung der Flavanoide durchaus eine Abhängigkeit von der Sauerstoffbelastung gefunden. Bei niedrigeren Sauerstoffbelastungen lagen der Gehalt an Flavonoiden bei 10,1 bis 18,8 mg/l, wobei der höchste Gehalt bei einem relativ leicht erhöhten Sauerstoffgehalt von 0,6 mg/l auftrat.

Bei Sauerstoffbelastungen über 1mg/l trat eine deutliche Abnahme der Flavanoide auf: Bei 1,1mg/l Sauerstoffgehalt auf 7,2mg/l, bei 2,8 mg Sauerstoffgehalt auf 6,5 mg/l.

Eine Veränderung bei den einzelnen Polyphenolen, der Zusammensetzung der phenolischen Substanzen zeigte sich nicht. Exemplarisch sind hier Catechin, Ferulasäure und Vanillinsäure aufgeführt. Diese Monomere nehmen durch oxidative Polymerisation nicht ab.

Es wurden die Biere nach der Durchführung des eingangs beschriebenen Forciertests nachdem sie eine Trübung über 2,5 EBC Einheiten erreicht hatten, analysiert.

Tab.3: Messergebnisse für belüftetes Bier (forciert bis Trübung größer 2,5 EBC)

	O2	1.NP	2.NP	MNP	RV4	%4min	%10mi n	%15mi n	DPPH5	DPPH	Chapon
1	0,2	31,7	816,3	424,0	1,85	81,5	14,6	3,9	0,670	0,746	0,83
2	0,2	33,6	818,3	425,9	1,86	82,2	13,9	3,8	0,666	0,742	0,83
3	0,6	34,5	827,7	431,1	1,13	74,9	19,0	6,1	0,722	0,803	0,69
4	1,1	34,2	830,6	432,4	0,90	68,1	23,6	8,4	0,654	0,734	0,60
5	2,8	44,2	834,1	439,2	0,64	62,9	26,8	10,3	0,589	0,669	0,49

	Gesamtpoly- phenole	Anthocyano- gene	Flavanoide
1	109,6	19,0	6,6
2	109,8	18,9	5,6
3	109,5	14,9	1,7
4	107,0	17,8	1,8
5	98,0	16,9	1,7

Das erste Nullstrompotential steigt erst bei einem Sauerstoffwert von 2,8 mg/l deutlich an (vgl. Tab.3). Bei den anderen Proben war mit der Erhöhung der Sauerstoffgehalte nur eine äußerst geringe Erhöhung des ersten Nullstrompotentials verbunden.

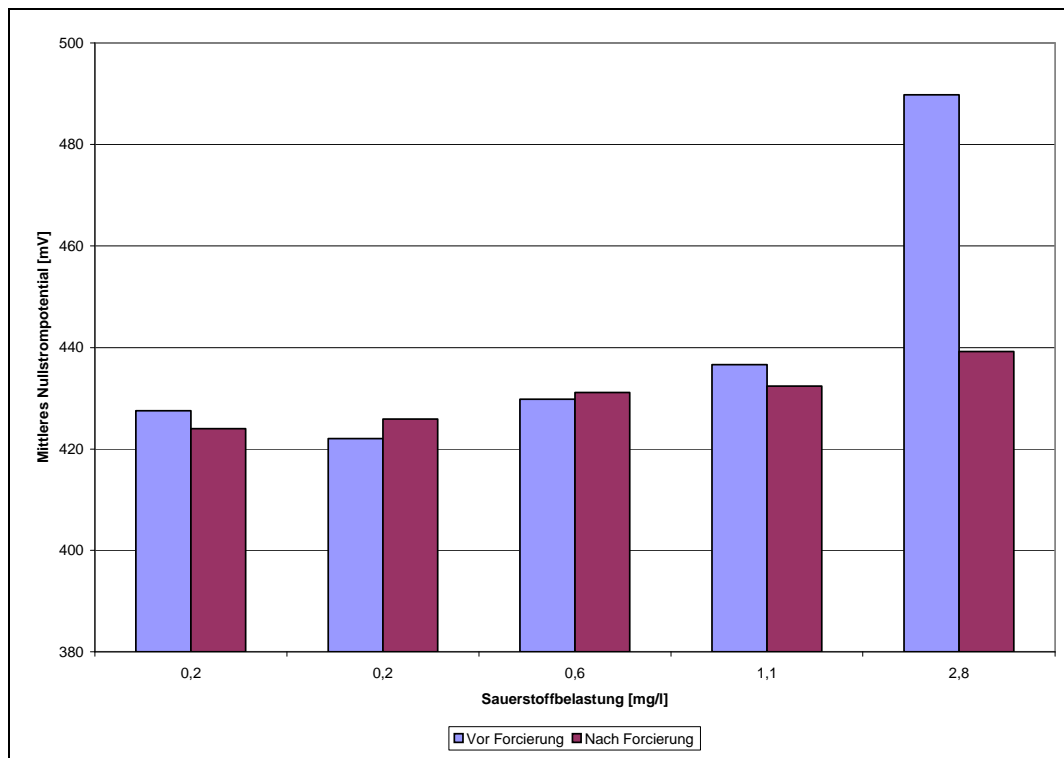


Abb.18: Mittleres Nullstrompotential in Abhängigkeit von der Sauerstoffbelastung vor und nach der Forcierung

Vergleicht man die Werte des forcierten Bieres mit denen der frischen Biere, fällt auf, dass mit Ausnahme der schwach sauerstoffbelasteten Probe 1, bei der Forcierung ein deutlicher Abfall des 1.Nullstrompotentials stattfindet (vgl.Tab 2 und 3). Abhängig ist die Größenordnung eindeutig von der Menge des ursprünglich eingebrachten Sauerstoffes. Während bei einem Sauerstoffgehalt von 0,6 mg/l nur ein Abfall von 39,1 auf 34,5 mV stattfindet, ist der Unterschied bei einer Belastung mit 2,8 mg/l mit 143,2 mV, die bei der forcierten Alterung auf 44,2 mV abnehmen, deutlich größer.

Insgesamt ist also eine Abnahme des ersten Nullstrompotentials bei der forcierten Alterung festzustellen. Erhöhte Sauerstoffgehalte bewirken beim frischen Bier einen deutlichen Anstieg des 1.Nullstrompotentials. Bei der Alterung nehmen diese Potentiale hingegen ab, sodass das 1.Nullstrompotential eines stärker belüfteten Bieres nach der Forcierung nicht mehr so deutlich über dem Potential der Proben mit geringerem Sauerstoffgehalt liegt (vgl.Abb.18).

Das zweite Nullstrompotential steigt mit erhöhter Sauerstoffbelastung auch bei den forcierten Bieren an. Vergleicht man Probe 2 und 0, so wird deutlich, dass 0,4mg/l Unterschied im Sauerstoffgehalt eine Erhöhung des 2.Nullstrompotentials um fast 10 mV bewirken. Bei einem Sauerstoffgehalt von 2,8 mg/l ist bei den forcierten Bieren sogar eine

Erhöhung des 2.Nullstrompotentials um fast 20 mV gegenüber den unbelüfteten Bieren zu beobachten.

Vergleicht man das 2.Nullstrompotential der einzelnen Proben vor und nach der Forcierung, so kann man feststellen, dass sich diese kaum unterscheiden.

Das mittlere Nullstrompotential unterscheidet sich bei den forcierten Proben weniger deutlich als bei den frischen Proben, bedingt durch den starken Abfall des 1.Nullstrompotentials während der forcierten Alterung bei den Proben mit höherer Sauerstoffbelastung.

Dennoch ist auch hier eine klare Abhängigkeit des Mittleren Nullstrompotentials vom ursprünglichen Sauerstoffgehalt zu erkennen, wobei das Potential des am meisten belasteten Bieres um etwa 15 mV höher liegt als das der unbelasteten Biere (vgl.Abb.18).

Das beim elektrochemischen Indikator-Time-Test bestimmte Reduktionsvermögen gegenüber DCI war bei den gering mit 0,2mg/l belasteten Proben 0 und 1 mit 1,85 bzw.1,86 äußerst hoch.

Bei erhöhter Sauerstoffbelastung sinkt diese Reduktionskraft deutlich ab. Bei Probe 4 auf ein Stromverhältnis von 0,64.

Vergleicht man die Reduktionskraft vor und nach der Forcierung, so ist festzustellen, dass bei Probe 1 und 2 also bei geringeren Sauerstoffgehalten ein Anstieg des Stromverhältnisses vorliegt von 1,57 auf 1,85 bzw. 1,61 auf 1,86 (vgl.Abb.19).

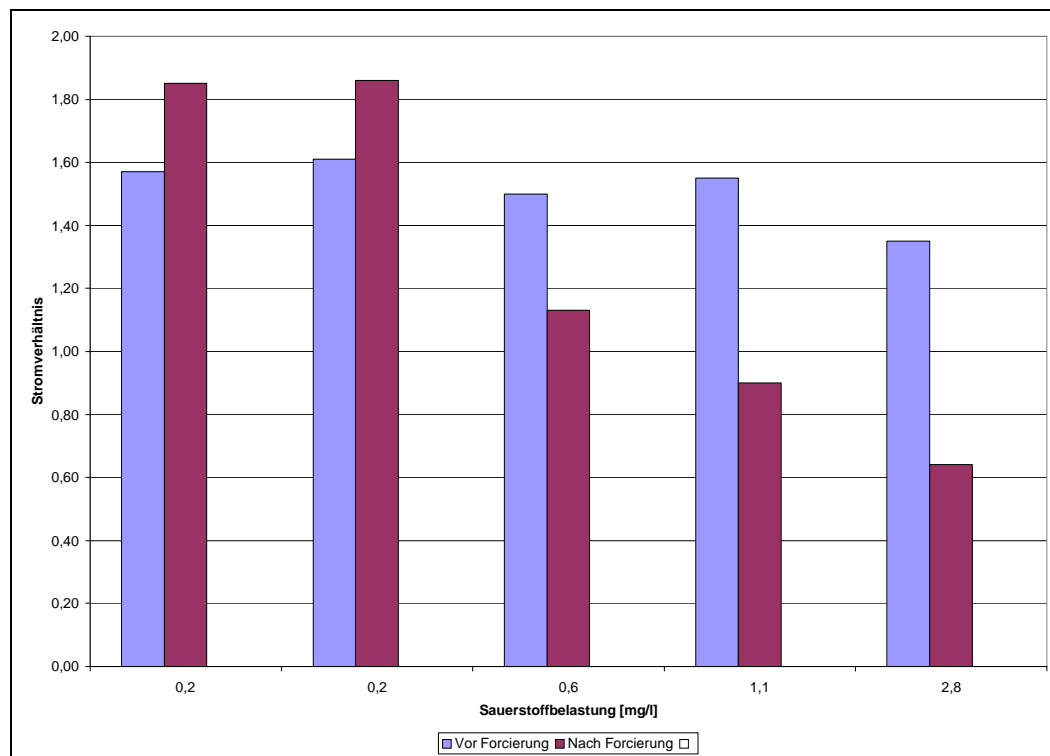


Abb.19: Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis vor und nach forcierter Alterung

Bei höheren Sauerstoffgehalten liegt jedoch eine deutliche Abnahme vor:

Bei Probe 4 sogar von über 50% von 1,35 auf 0,64.

Die entscheidende Abnahme der schnell, d.h. innerhalb von 4 Minuten reduzierenden Substanzen findet also bei höheren Sauerstoffgehalten bei der Alterung statt. Bei geringen Sauerstoffgehalten ist diese Entwicklung nicht zu beobachten.

Deutlicher wird die Entwicklung der schnellreduzierenden Substanzen, wenn man den prozentualen Anteil der schnellreduzierenden Substanzen an dem gesamten Reduktionsvermögen betrachtet:

Sind bei der Probe 0 noch 81,5% der Reduktionen den schnellreduzierenden Reduktionen zugehörig, so beträgt dieser Anteil bei der Probe 4 nur noch 62,9% (vgl.Abb.20).

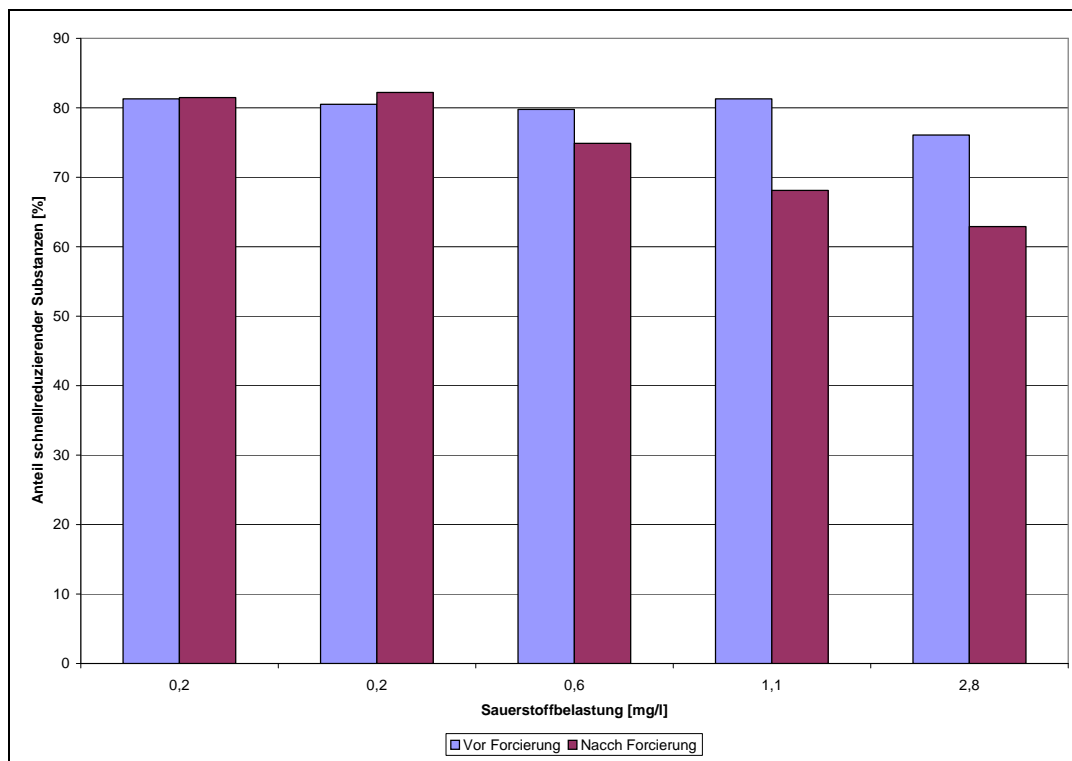


Abb.20: Sauerstoffbelastung und Anteil schnellreduzierender Substanzen vor und nach Forcierung

Im Vergleich der forcierten und frischen Proben ist bei den kaum belasteten Proben ein gleichbleibender Anteil schnellreduzierender Substanzen zu beobachten. Es steigt also nicht nur die absolute Menge schnellreduzierender (d.h. innerhalb von 4 Minuten mit DCI reagierender) Substanzen durch die Forcierung an, sondern auch der relative Anteil an den gesamten innerhalb 15 Minuten reduzierenden Substanzen steigt.

Das heißt also, dass bei weniger stark mit Sauerstoff belasteten Proben durch die Alterungsreaktionen¹ die schnellreduzierenden Substanzen zunehmen, während die mittelschnell- und langsamreduzierenden Substanzen etwa auf gleichem Niveau bleiben. Anders dagegen bei höheren Sauerstoffgehalten: Hier fällt die Menge der schnellreduzierenden Substanzen bei der Forcierung ab., sowohl absolut, als auch relativ. Dadurch steigt der prozentuelle Anteil der mittelschnell- und langsamreduzierenden Substanzen an. Absolut bleiben sie dadurch also eher unbeeinflusst. Zu- bzw. Abnahme der reduzierenden Substanzen sind demnach abhängig von der Sauerstoffbelastung. Dabei werden in erster Linie die schnell, d.h. in 4 Minuten reduzierenden Substanzen beeinflusst. Die mittelschnell- und langsamreduzierenden Substanzen ändern sich kaum.

Die Extinktionsunterschiede nach der DPPH-Methode nahmen bei geringeren Sauerstoffbelastungen nicht, wie bei den frischen Proben mit der Höhe der Sauerstoffzufuhr ab, sondern erreichten bei einer Belastung von 0,6 mg/l sogar den höchsten Wert. Erst bei der extremen Belastung von 2,8 mg/l war ein um über 0,100 niedrigerer Wert zu verzeichnen.(vgl.Abb.21)

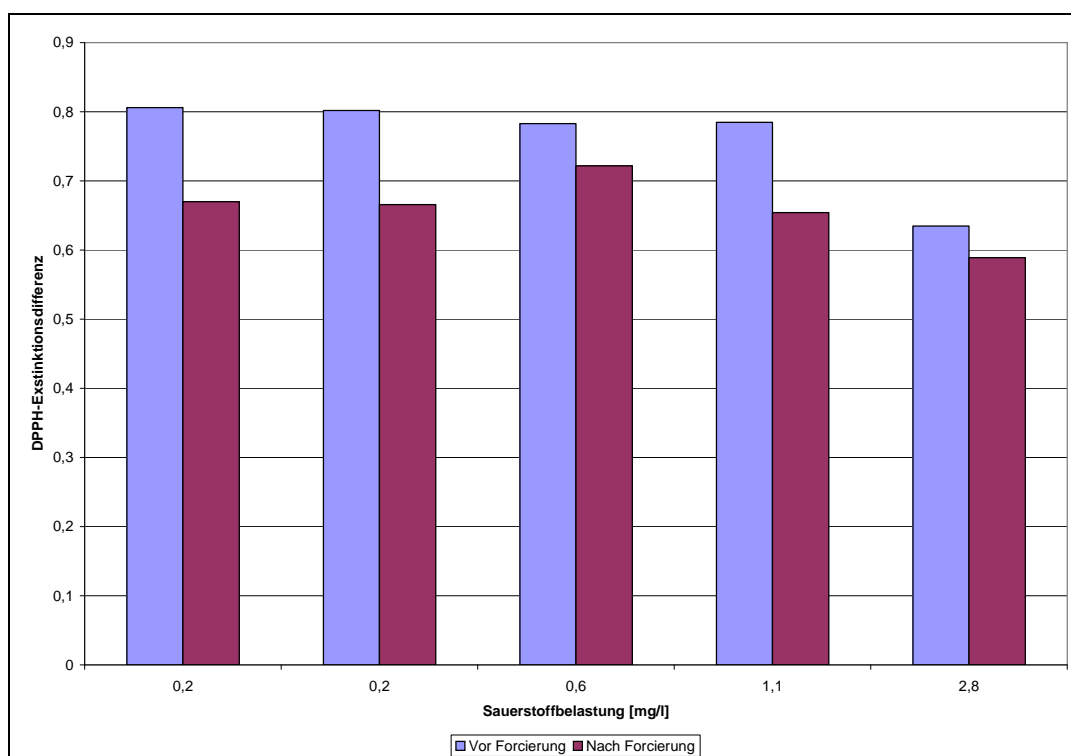


Abb.21: Sauerstoffbelastung und DPPH-reduzierende Kraft

¹ Savel,J., "Thermal Sugar Degradation During Beer Agening", Brewing Science Group Bulletin 2000, 3rd technical meeting, Pilsen,CR,2000, S.26-31

Vergleicht man die Werte vor und nach der forcierten Alterung, so fällt auf, dass der Extinktionsunterschied während der Forcierung bei den geringbelasteten Proben stärker abfiel als bei der stark belüfteten Probe. Dort vollzog sich die Abnahme schon in der kurzen Zeit der Aufbewahrung bei 4°C ohne den Einfluss von Wärme.

Bei geringer Sauerstoffbelastung fiel also der Wert für das DPPH-Reduktionsvermögen erst durch den Einfluss von Wärme und Aufbewahrungszeit auf.

Anders als bei den frischen Bieren ist bei den forciert gealterten Proben eine deutliche Tendenz in Abhängigkeit von der Sauerstoffbelastung zu erkennen.

Während bei den Proben mit nur 0,2 mg/l Sauerstoffbelastung 0,83 mval/l reduzierende Substanzen nachzuweisen waren, waren bei 0,6 mg/l nur noch 0,69 mval/l, bei 2,8 mg/l nur noch 0,49 mval/l reduzierende Substanzen vorhanden (vgl. Abb.22).

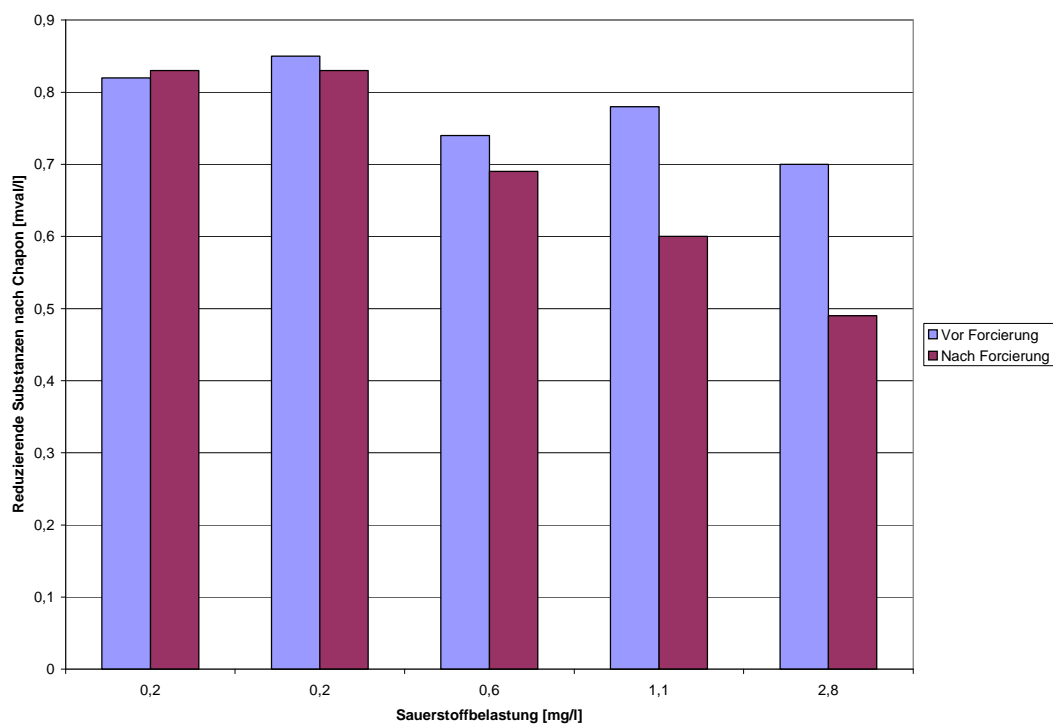


Abb.22: Sauerstoffbelastung und reduzierende Substanzen nach Chapon vor und nach Forcierung

Ein Vergleich mit den Werten der frischen Biere zeigt, dass ähnlich wie beim elektrochemischen Indikator-Time-Test die Reduktionskraft erst bei höheren Sauerstoffbelastungen und forciertem Alterung, d.h. hier dem Einfluss von Wärme abnimmt.

Anders als bei den schnellreduzierenden Substanzen, beim elektrochemischen Indikator-Time-Test bleiben die reduzierenden Substanzen bei geringer Sauerstoffbelastung etwa auf dem selben Niveau.

Anders als bei den frischen Bieren besteht ein Zusammenhang zwischen Gesamtpolyphenolen und Sauerstoffbelastung.

Während die gering belasteten Proben (bis 0,6 mg/l Sauerstoff) Gesamtpolyphenolgehalte in der Größenordnung von 109 mg/l aufwiesen, fiel der Gehalt bei den stärker belüfteten Proben auf 107,0 bzw. 98,0 mg/l (vgl.Tab 2 und 3).

Beachtenswert ist, dass bei der Forcierung die bei erfassten Gesamtpolyphenole anstiegen. Auch bei den Anthocyanogenen ist bei höheren Sauerstoffbelastungen ein verminderter Gehalt zu verzeichnen; etwa um 2-3mg/l. Diese Abnahme ist aber nicht direkt abhängig von der Höhe der Belastung, so ist der Gehalt bei einer Sauerstoffbelastung von 2,8mg/l höher als bei mittlerer Belastung (vgl Tab.2 und 3)

Anders als bei den Gesamtpolyphenolen nimmt der Gehalt an Anthocyanogenen bei der forcierten Alterung ab.

Diskussion des Einflusses erhöhter Sauerstoffgehalte

Von großem Interesse war das Verhalten der Mittleren Nullstrompotentials. Vorallem das Verhalten beim frischen Bier brachte entscheidende neue Erkenntnisse. Obwohl das Bier kühl aufbewahrt wurde und etwa 16h nach Belüftung gemessen wurde, stellten sich schon große Unterschiede ein. Wie Tabelle 3 zeigt, war das höhere Mittlere Nullstrompotential bei den stärker sauerstoffbelasteten Bieren hauptsächlich nicht durch ein erhöhtes 1.Nullstrompotential, sondern durch ein deutlich erhöhtes 2.Nullstrompotential bedingt. Wie schon in Arbeiten von Gebhard und Sobiech^{1,2} gezeigt wurde, führt der im Substrat gelöste Sauerstoff in erster Linie zu einer deutlichen Erhöhung des Mittleren Nullstrompotentials, teilweise auf dreistellige Werte. Aus diesen Grunde musste auch die Stickstoff- oder Kohlendioxidbegasung eingeführt werden, um eine Sauerstoffaufnahme bei der Messung zu minimieren.

¹ Gebhardt,E., "Elektrochemische Bestimmungen von Reduktionen im Bier", Dissertation, TU München, 1993

² Sobiech,R., "Elektrochemische Bestimmung von Summenparametern für die Qualitätskontrolle von Bier",Dissertation,TU München 1997

Die relativ niedrigen 1.Nullstrompotentiale und die starke Beeinflussung des 2.Nullstrompotentials bei starker Sauerstoffbelastung weisen darauf hin, dass ein Grossteil des gelösten Sauerstoffes innerhalb dieser kurzen Zeit nicht mehr als Sauerstoffmolekül vorliegt und bereits abreagiert hat. Dieser Effekt ist der Grund dafür, dass Gesamtsauerstoffmessungen innerhalb von 2 Stunden nach Abfüllung des Bieres durchgeführt werden sollten¹. Neu an diesen Ergebnissen ist, dass der Sauerstoff so abreagiert hat, dass er potentialbestimmend das Substrat verändert. Vor allem die kurze Reaktionszeit und niedrigen Temperaturen zeigen, dass die Substrate in der Brauerei sehr oxidationsanfällig sind.

Bei der forcierten Alterung zeigten sich, wie auch schon in den vorangegangenen Arbeiten, keine Gesetzmäßigkeiten für das Verhalten des Nullstrompotentials bei der Alterung.

Vermutungen, dass sich durch die cyclovoltametrischen Messungen Rückschlüsse auf Alter oder Aufbewahrungsbedingungen des Bieres ziehen lassen könnten, konnten hier und in anderen Versuchsreihen, in denen die Bierproben gealtert wurden, nicht festgestellt werden. Hier zeigten nicht einmal deutliche Unterschiede bei den ursprünglichen Sauerstoffgehalten eine eindeutige Tendenz zu Zu- oder Abnahme des Potentials. So zeigen sich die Grenzen dieser Methode, den Redoxzustand eines gealterten Bieres aussagekräftig darzustellen. Da in der Mehrzahl der Versuche eine Absenkung des Potentials durch die Alterung eintrat, schienen diese Biere auf den ersten Blick einen günstigeren Redoxzustand zu haben. Mit einem "günstigeren Redoxzustand" ist hier gemeint, dass im Bier eine hohe Konzentration an elektroaktiven reduzierenden Substanzen vorliegt, die als Antioxidantien wirken können. Da aber die Radikalfängereigenschaften eines Bieres mit zunehmender Alterung stets abnehmen (vgl.Abb.21), hat dieses Potential keine praktische technologische Bedeutung. Es nehmen demnach während der Alterung elektroaktive durch unsere cyclovoltametrisches Verfahren erfasste Reduktone zu. Savel zeigt die Möglichkeit der Bildung von Melanoidinen oder anderen Abbauprodukten des Streckerabbaus während der Alterung auf², die nachweislich den Redoxzustand beeinflussen. Eine andere Gruppe beobachtete, dass infolge der Wiederherstellung bereits oxidiertes Endiolgruppen durch Wasseranlagerung wieder reduzierende elektroaktive Substanzen entstehen³.

¹ Brautechnische Analysenmethoden Band II, Methodensammlung der MEBAK, Pfenninger, H. (Hrsg.), Selbstverlag der MEBAK, Freising -Weihenstephan 1993

² Savel, J., "Thermal Sugar Degradation During Beer Ageing", Brewing Science Group Bulletin 2000, 3rd technical meeting, Pilsen, CR, 2000, S.26-31

³ Hendrickson, H.P., Kaufmann, A.D., Lunte, C.E., "Elektrochemistry of catechol-containing flavonoids", J.Pharm.Biomed.Anal. 12, 1994, S.325-334

Wie im Kapitel "Wahl anderer Potentialfenster" dargestellt wird, gelang es auch nicht durch die Wahl anderer Start- und Umkehrpotentiale die cyclovoltametrischen Meßbedingungen in der Weise zu verändern, dass hauptsächlich Radikalfänger erfasst würden.

Ebenfalls auf eine starke oxidative Schädigung in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt weist der Rückgang des Stromverhältnisses hin. Diese ITT-Substrate nehmen mit steigender Sauerstoffbelastung stark ab. Gleichzeitig vermindert der eingebrachte Sauerstoff auch den prozentualen Anteil schnellreduzierender Substanzen. Die klassischen ITT-Substrate erfüllen unter diesen Reaktionsbedingungen (niedrige Temperaturen, hohe Sauerstoffkonzentrationen) ihre Aufgabe als sog. Beschwerungsstoffe und reagieren mit dem Sauerstoffmolekül. Sie reagieren teilweise schneller mit dem gelösten molekularen Sauerstoff, als die Ascorbinsäure¹. Dies ist auch der Grund, warum auf die DCI-schnellreduzierenden Substanzen in der Zeit, als sich der ITT in der Brauereianalytik durchsetzte, soviel Wert gelegt wurde. Es galt nicht, im Verlauf der Alterung den radikalischen Angriff kleiner Mengen aktiven Sauerstoffs oder anderer freier Radikale abzuwehren, sondern die aufgrund der damaligen Technik unvermeidlich bei der Abfüllung eingebrachten großen Sauerstoffmengen abzufangen. Die radikalischen Mechanismen waren damals wenig bekannt und wurden deshalb nicht untersucht.

Wegen der schnellen und deutlichen Verminderung der schnellreduzierenden Substanzen durch höheren Sauerstoffeintrag, bietet der Elektrochemische Indikator-Time-Test eine gute Möglichkeit, in der laufenden Betriebskontrolle die Belastung des Bieres mit Luftsauerstoff zu überprüfen. Vorallem besteht hier auch die Möglichkeit, vermeidbaren übermäßigen Sauerstoffeintrag im Nachhinein aufzuspüren und so Fehler im Filtrations-, Drucktankbereich oder auch in der Füllerei festzustellen.

¹ von Euler, H., Eisert, B., "Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate", Ferdinand Enke, Stuttgart, 1957

4.3 Einfluss der Belüftungstechnologie

4.3.1 Einfluss intensiver Belüftung (Flotation)

Wie im Versuch mit belüfteten Bieren gezeigt wurde, reagiert der Sauerstoff mit dem Substrat, wobei sich Potential und Reduktionskraft zu Werten hin verändern, die auf eine stärkere Oxidation hinweisen.

Bei der Flotation wird ebenfalls O_2 in die Würze über mehrere Stunden bei der Anstelltemperatur eingebracht. Ziel dieser Flotation ist es, durch möglichst feine aufsteigende Bläschen an der Grenzfläche zwischen Gasphase und Flüssigkeit viele Kühltrubpartikel zu sammeln und auf die Oberfläche zu treiben .

Dabei werden statt 3-10l/hl Luft wie bei der konventionellen Belüftung 30-70l/hl Luft aufgewendet.¹

Dazu wird Luft fein verdüst von unten in das Flotationsgefäß eingeblasen. Dieser Vorgang dauert mehrere Stunden, bis schließlich die so von großen Teilen des Kühltrubs befreite Würze abgelassen wird und die "Decke" mit den Trubpartikeln im Tank verbleibt .

Gerade die extrem feine Verdüstung der Luft und die sehr langen Flotationszeiten können Oxidationsreaktionen sehr stark begünstigen. Durch die große Oberfläche der Luftbläschen sind die Würzeinhaltsstoffe stark dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Möglicherweise abreagierter gelöster Sauerstoff kann so wieder nachgeliefert werden.

Es wird teilweise auch ohne Hefegabe flotiert. Das bedeutet, dass die Veratmung des Sauerstoffes durch die Hefe und die möglichen Oxidationsreaktionen nicht gleichzeitig ablaufen, sondern der gelöste Sauerstoff ausschließlich mit den Würzeinhaltsstoffen reagieren kann.

Der Versuch zu längerer, intensiverer Sauerstoffbelastung konnte kleintechnisch nicht als Flotation durchgeführt werden, da die entsprechenden Einrichtungen nicht vorhanden sind.

Deshalb wurde vor der Hefegabe mittels der Sinterkerze, die auch für die konventionelle Belüftung verwendet wird, die Würze 3 Stunden intensiv belüftet.

Dabei wird ein Gegendruck von 0,5 bar eingestellt.

¹Narziß,L.,Kieninger,H.,Reicheneder,E., "Die Kühltrubabtrennung mittels Flotation im Vergleich zu anderen Verfahren", Proceedings of the 13th Congress of European Brewery Convention Estoril, 1971, S.197-210

Das Referenzbier hingegen wurde wie in den übrigen Versuchen 10 Minuten bei einem Gegendruck von 0,5 bar belüftet.

Verwendet wurde eine grosstechnisch hergestellte Vollbierwürze.

Angestellt wurde mit 6°C. Die intensive Belüftung fand also bei einer Temperatur von 6°C statt.

Nach Erreichen des Gärkellervergärungsgrades wurde das Jungbier geschlaucht, eine Woche bei 4°C und 2 Wochen bei 0°C gelagert.

Anschließend wurden die Biere wie eingangs beschrieben filtriert.

Jungbier

Beim intensiv belüfteten Jungbier aus intensiver Belüftung betrug das Mittlere Nullstrompotential in der ersten Versuchsreihe 401,8 mV. Das Mittlere Nullstrompotential des Referenzbieres lag mit 390,9mV deutlich niedriger (vgl. Abb.23).

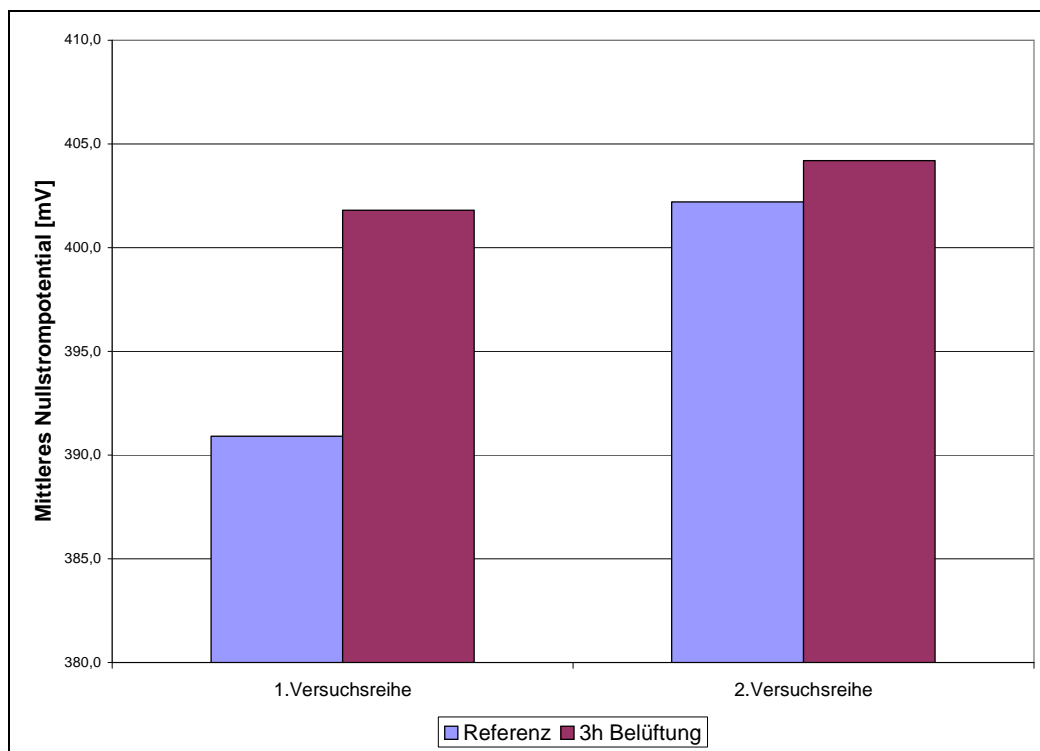


Abb.23: Einfluss intensiver Belüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Jungbier

Auch in der zweiten Versuchsreihe war das Mittlere Nullstrompotential des Jungbieres aus intensiver Belüftung gegenüber dem des Referenzbieres erhöht.

Dieser Unterschied war hier jedoch nicht so deutlich: Beim Jungbier aus intensiver Belüftung wurde ein Mittleres Nullstrompotential von 404,2mV ermittelt, beim Referenzbier von 402,2 mV.

Beim elektrochemischen Indikator-Time-Test wies das Referenzbier mit einem Stromverhältnis von 1,15 einen deutlich höheren Wert auf als das Jungbier aus der intensiven Belüftung mit einem Stromverhältnis von 0,98 (vgl.Abb.24). Das Jungbier, das mit intensiver Belüftung hergestellt wurde, enthielt demnach deutlich weniger reduzierende Substanzen, die DCI innerhalb von 4 Minuten reduzieren können.

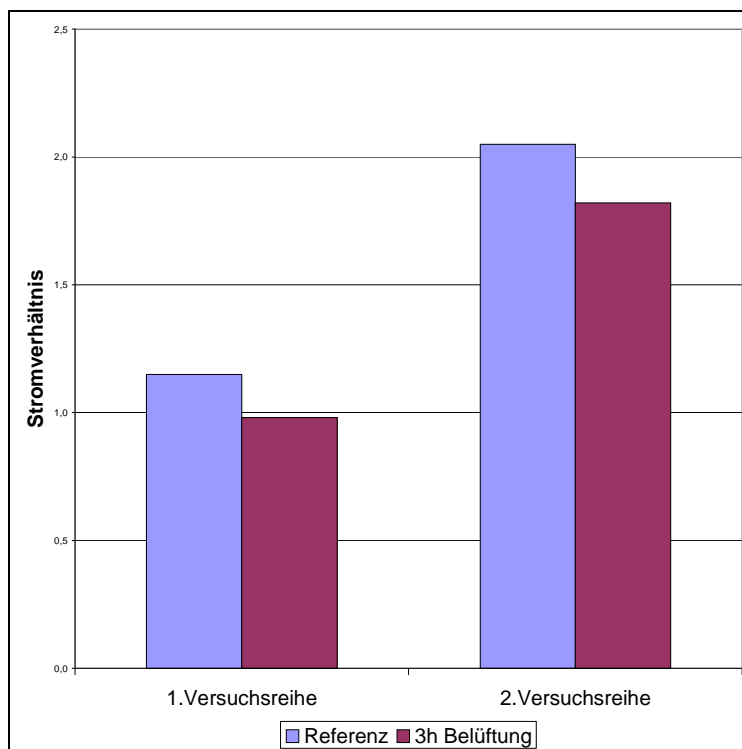


Abb.24: Einfluss intensiver Belüftung auf das Stromverhältnis im Jungbier

Auch in der zweiten Versuchsreihe war dieser Unterschied ähnlich deutlich, mit einem Stromverhältnis von 2,05 beim Referenzbier und 1,82 beim Jungbier aus intensiver Belüftung.

Der Anteil schnellreduzierender Substanzen unterschied sich in der ersten Versuchsreihe kaum (vgl. Abb.25).

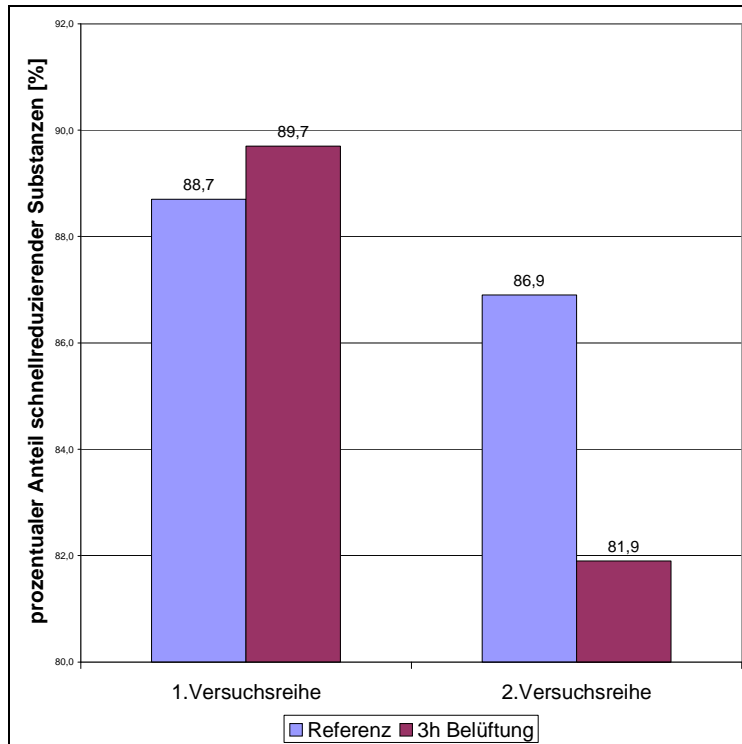


Abb.25: Einfluss intensiver Belüftung auf den prozentualen Anteil schnellreduzierender Reduktone im Jungbier

In der zweiten Versuchreihe zeigte sich bei dem Jungbier aus intensiver Belüftung nicht nur eine geringere absolute Menge an schnellreduzierenden Substanzen, sondern auch ein geringerer prozentualer Anteil der schnellreduzierenden Substanzen.

So betrug der Anteil beim Referenzbier 86,9%, beim Jungbier aus intensiver Belüftung dagegen nur 81,9%.

In der ersten Versuchsreihe war der Gehalt an Gesamtpolyphenolen mit 243 mg/l beim Referenzbier und 242 mg/l beim Bier aus intensiv belüfteter Würze fast gleich hoch (vgl. Abb.26).

In der zweiten Versuchsreihe hingegen lag der Gesamtpolyphenolgehalt beim Referenzbier mit 231 mg/l deutlich höher als beim Bier aus intensivbelüfteter Würze mit 213 mg/l.

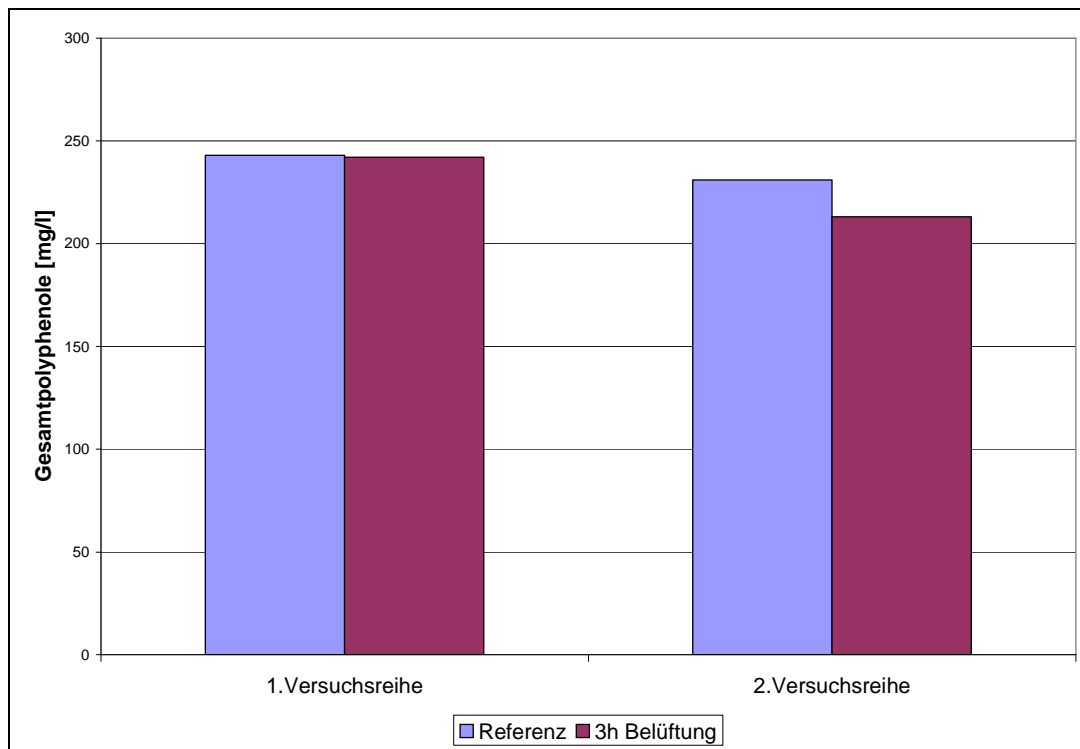


Abb.26: Einfluss intensiver Belüftung auf den Polyphenolgehalt im Jungbier

Durch die unterschiedliche Behandlung der Würze ergaben sich bei den Anthocyanogenen kaum Unterschiede: In der ersten Versuchsreihe enthielt das Referenzbier 53,0 mg/l Anthocyanogene, das Jungbier aus der intensiv belüfteten Würze enthielt 54,6 mg (vgl. Abb.27).

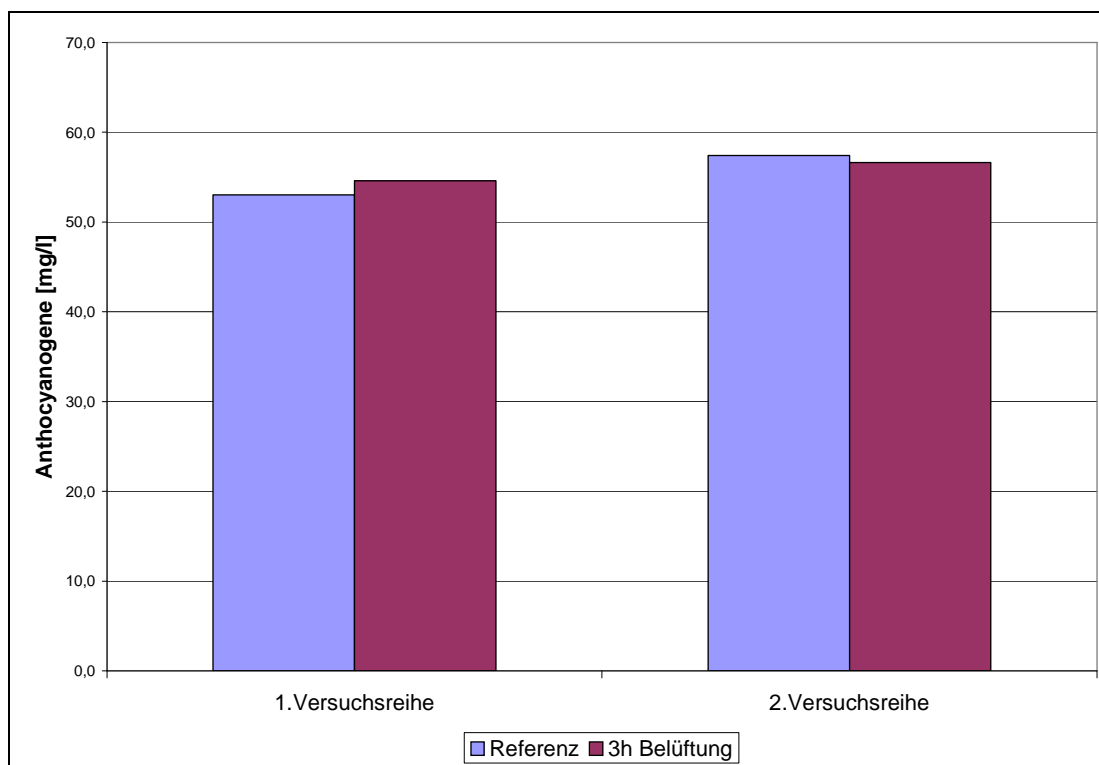


Abb.27: Einfluss intensiver Belüftung auf den Anthocyanogengehalt im Jungbier

Auch in der zweiten Versuchsreihe waren die Werte etwa gleich hoch: 57,4 mg/l für das Referenzbier, 56,6 mg/l für das aus Jungbier aus intensivbelüfteter Würze.

Die DPPH-reduzierende Aktivität ist bei den Referenzbieren deutlich höher als bei den Jungbieren aus intensiver belüfteter Würze: In der ersten Versuchsreihe betrug der Extinktionsunterschied für das Referenzbier nach 10 Minuten Reaktionszeit mit DPPH 1,112, beim Jungbier aus der intensivbelüfteten Würze nur 1,043 (vgl. Abb.28).

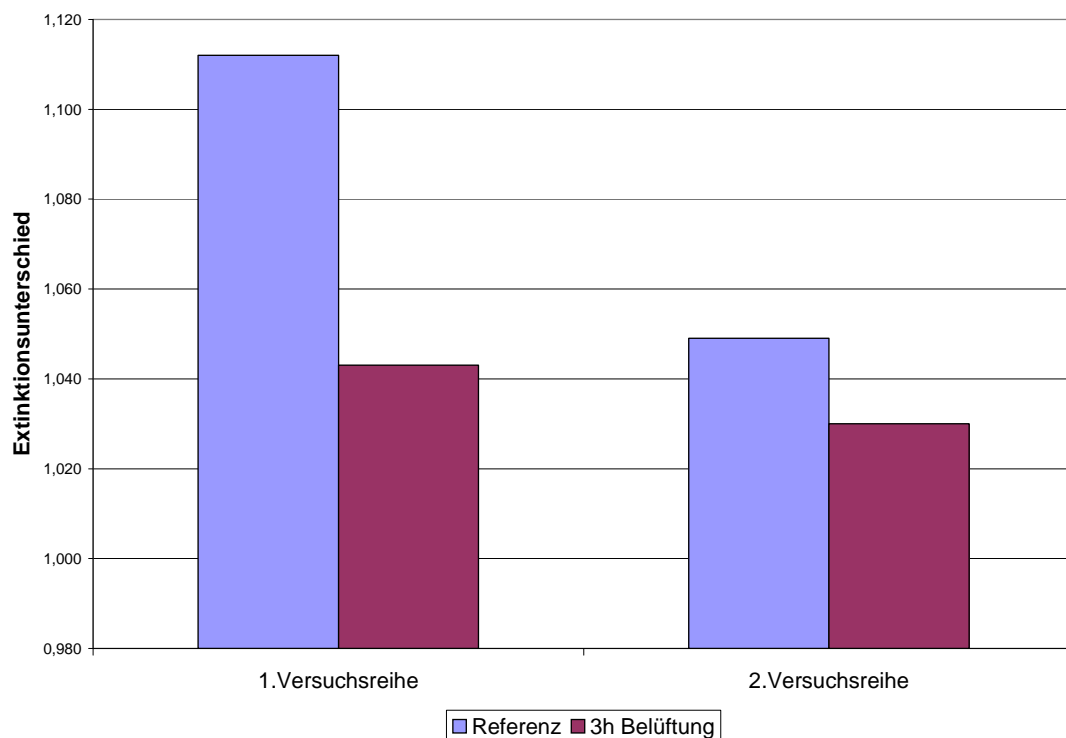


Abb.28: Einfluss intensiver Belüftung auf die DPPH reduzierende Aktivität im Jungbier

In der zweiten Versuchsreihe waren es 1,049 beim Referenzbier und 1,030 beim Jungbier aus intensiv belüfteter Würze.

Unfiltrat

Nach der Lagerung war im Unfiltrat bei einer intensiveren Belüftung der Würze ein erhöhtes Nullstrompotential festzustellen. So betrug das Mittlere Nullstrompotential beim Referenzbier nur 404,2mV , während beim Unfiltrat aus intensivbelüfteter Würze 410,4 mV gemessen wurden (Abb.29).

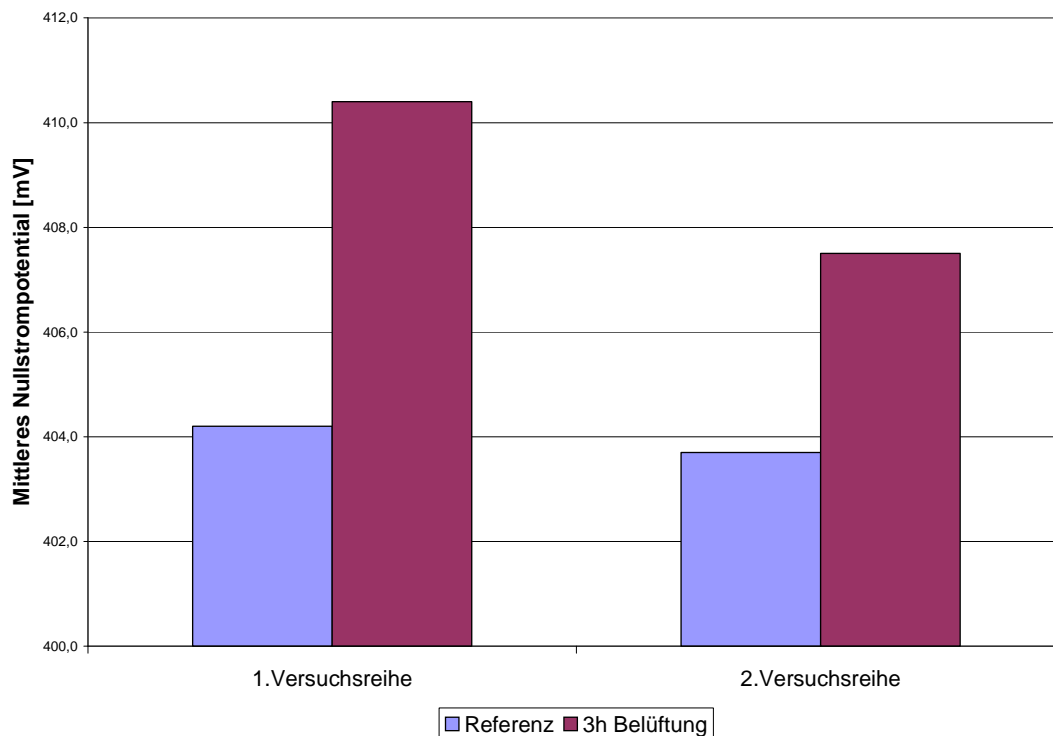


Abb.29: Einfluss intensiver Belüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Unfiltrat

In der zweiten Versuchsreihe war ebenfalls das Mittlere Nullstrompotential des Unfiltrats aus intensivbelüfteter Würze mit 407,5 mV gegenüber dem Referenzbier mit 403,9 mV erhöht.

Das Stromverhältnis nach 4 Minuten betrug beim Referenzbier 0,92 (vgl. Abb.30). Durch die intensive Belüftung waren die reduzierenden Substanzen im Unfiltrat etwas zurückgegangen, was ein Stromverhältnis von nur 0,84 bedingte.

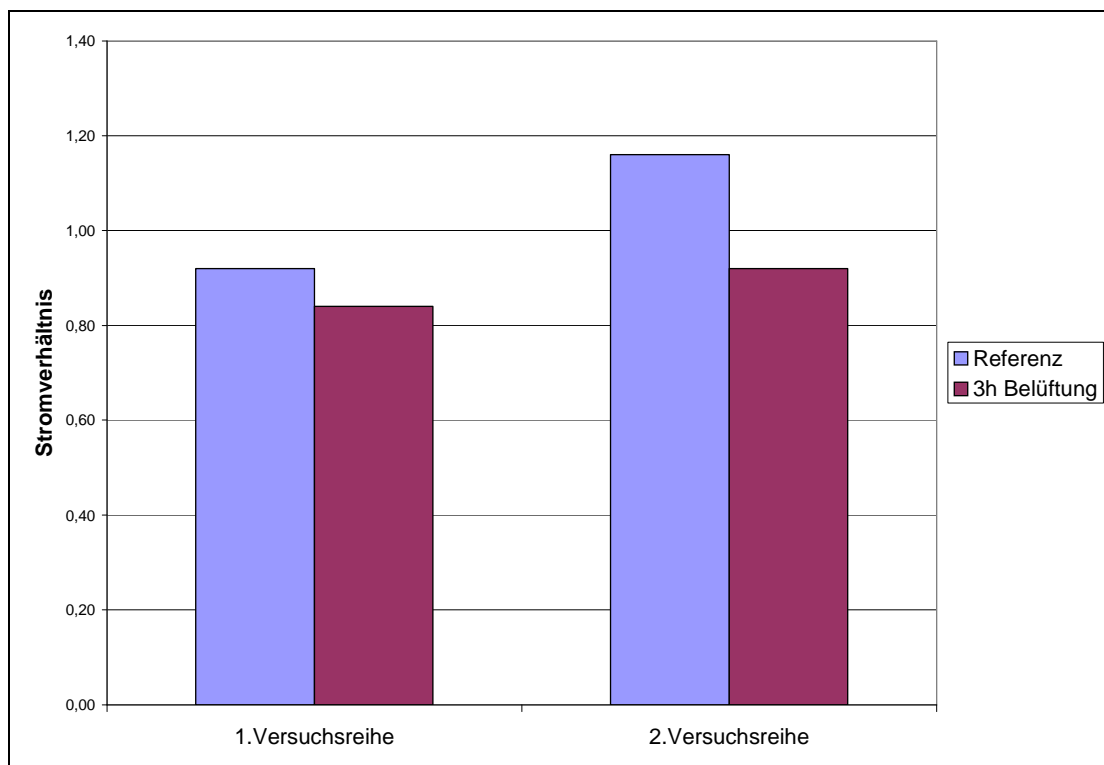


Abb.30: Einfluss intensiver Belüftung auf das Stromverhältnis im Unfiltrat

In der zweiten Versuchsreihe war das Stromverhältnis beim Unfiltrat des Referenzbieres 1,16 und das des Unfiltrats aus intensiv belüfteter Würze nur 0,92.

Zu den schnellreduzierenden Reduktionen der Gesamtheit aller Reduktionen gehörten beim Unfiltrat des Referenzbieres 86,1%, bei intensiverer Belüftung mit 86,6% etwa der gleiche Prozentsatz (vgl. Abb.31).

In der zweiten Versuchreihe war der Anteil an schnellreduzierenden Substanzen mit 96,8% beim Referenzbier etwas höher als beim Unfiltrat des Bieres aus intensiv belüfteter Würze mit 93,4%.

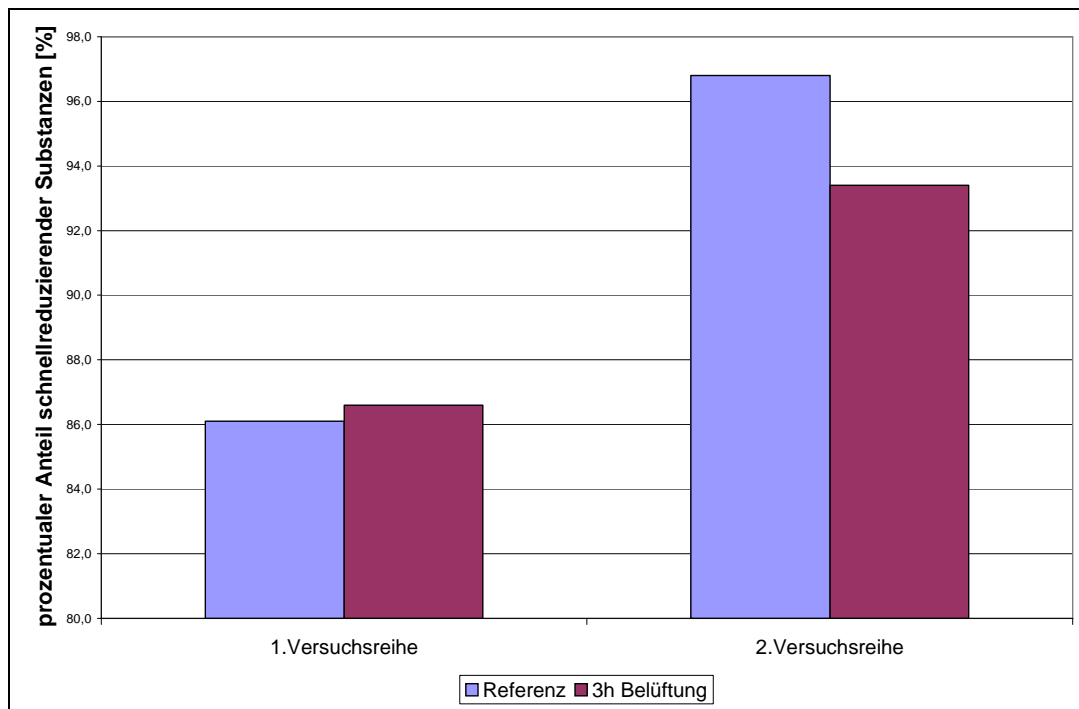


Abb.31 : Einfluss intensiver Belüftung auf den prozentualen Anteil schnellreduzierender Substanzen im Unfiltrat

In beiden Versuchsreihen unterschieden sich die Werte für die Gesamtpolyphenole nicht. In der ersten Versuchsreihe waren im Unfiltrat des Referenzbieres 229mg/l Gesamtpolyphenole nachzuweisen, im Unfiltrat des Bieres aus intensivbelüfteter Würze 226 mg. In der zweiten Versuchsreihe waren 222mg/l bzw. 218 mg/l Gesamtpolyphenole enthalten (vgl.Abb.32).

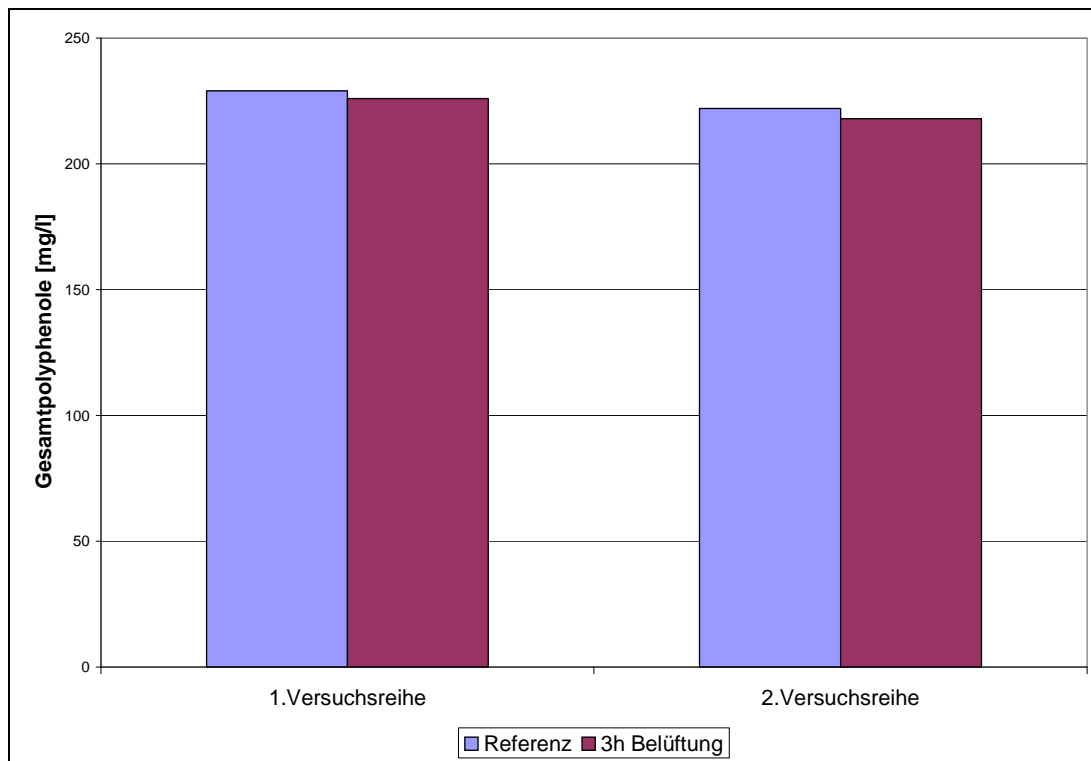


Abb.32: Einfluss intensiver Belüftung auf den Gehalt an Gesamtpolyphenolen im Unfiltrat

In der ersten Versuchsreihe waren im Referenzbier nur 36,6 mg/l Anthocyanogene enthalten, im Unfiltrat aus der intensivbelüfteten Würze hingegen 43,8 mg/l (vgl.Abb.33).

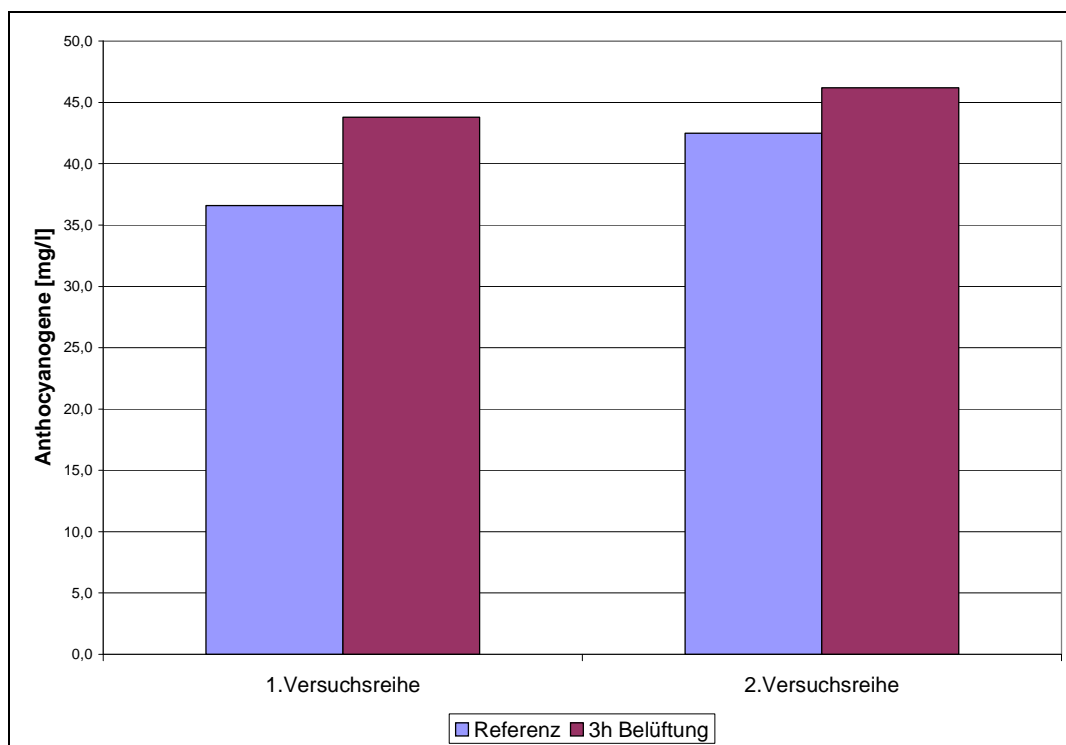


Abb.33: Einfluss intensiver Belüftung auf den Gehalt an Anthocyanogenen im Unfiltrat

Auch in der zweiten Versuchsreihe enthielt das Bier aus intensivbelüfteter Würze mit 42,2 mg/l etwas mehr Anthocyanogene als das Referenzbier mit 46,2 mg/l.

Sowohl in der ersten, als auch in der zweiten Versuchsreihe litt die DPPH-reduzierende Aktivität unter der intensiven Würzebelüftung (vgl.Abb.32).

In der ersten Versuchsreihe ergab sich beim Unfiltrat dieses Bieres nach 10 Minuten Reaktionszeit ein Extinktionsunterschied von 1,035, während sich beim Referenzbier 1,085 ergaben.

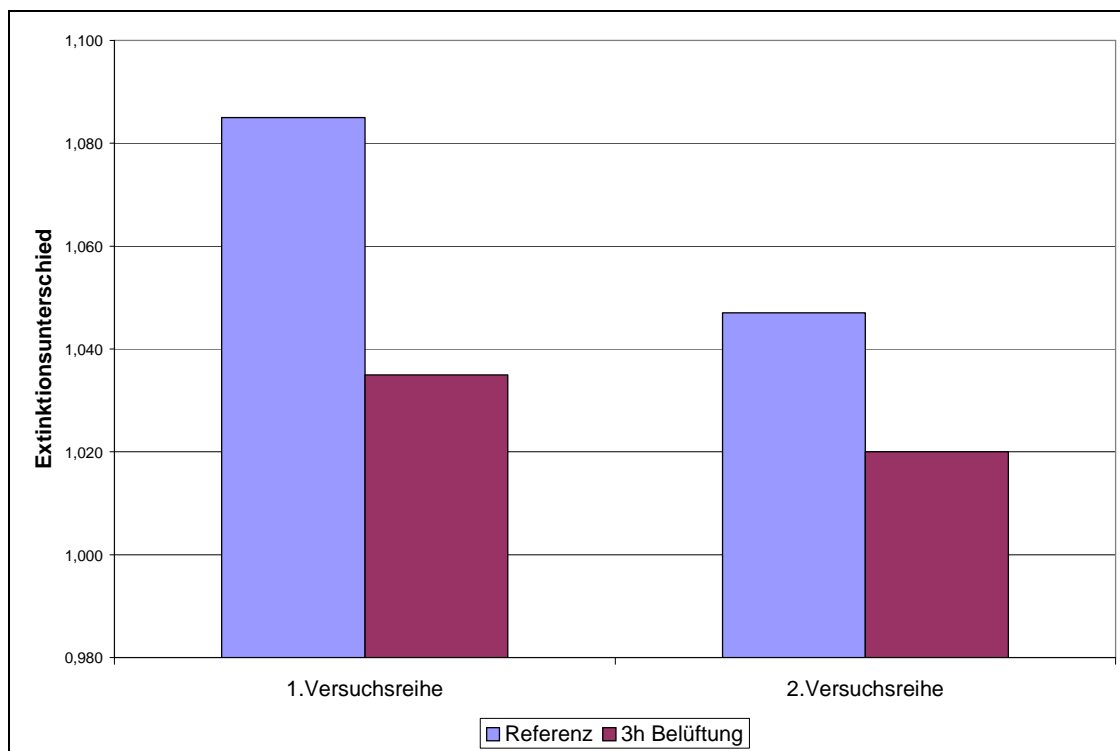


Abb.34: Einfluss intensiver Belüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im Unfiltrat

In der zweiten Versuchsreihe wies ebenfalls das Referenzbier mit einem Extinktionsunterschied von 1,045 eine deutlich höhere DPPH-reduzierende Aktivität als das Unfiltrat des Bieres aus intensivbelüfteter Würze mit 1,020 auf.

Filtrat

In der ersten Versuchreihe war das Mittlere Nullstrompotential beim filtrierten Bier aus intensivbelüfteter Würze mit 414,7mV gegenüber dem Referenzbier mit 412,3 mV leicht erhöht (vgl.Abb.35)

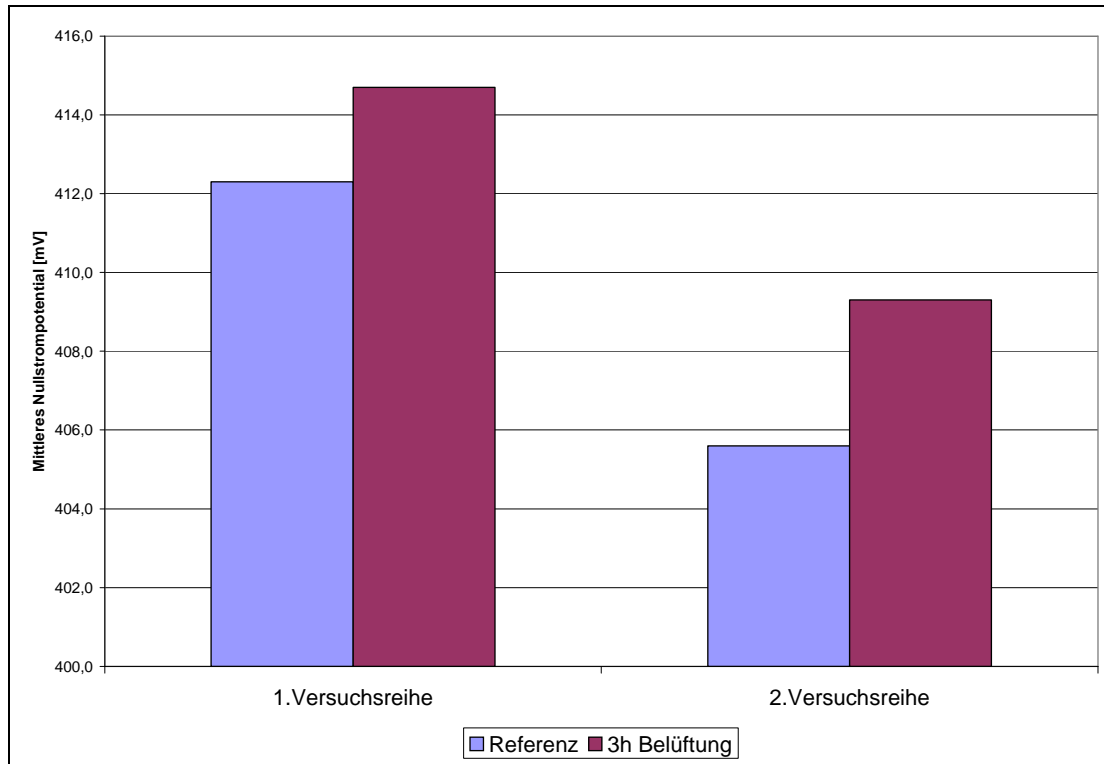


Abb.35: Einfluss intensiver Belüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im filtrierten Bier

In der zweiten Versuchreihe war dieser Unterschied deutlicher:

409,3mV beim Filtrat aus intensivbelüfteter Würze und 405,6 mV beim filtrierten Referenzbier.

Die Reduktionskraft gegenüber DCI innerhalb von 4 Minuten, ausgedrückt durch das Stromverhältnis, unterschied sich im Filtrat der beiden Biere kaum:

So betrug das Stromverhältnis im filtrierten Referenzbier 0,85, im Filtrat des Bieres aus intensivbelüfteter Würze 0,81 (vgl.Abb.36).

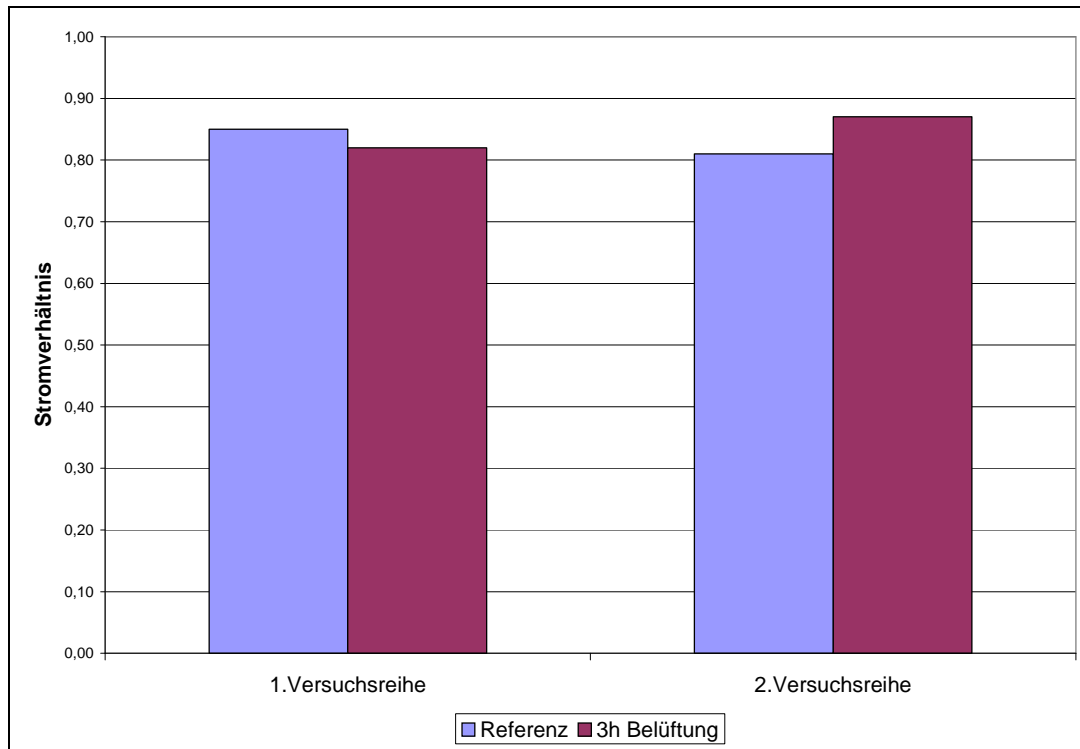


Abb.36: Einfluss intensiver Belüftung auf das Stromverhältnis im filtrierten Bier

In der zweiten Versuchsreihe lag das Bier aus intensivbelüfteter Würze mit einem Stromverhältnis von 0,87 etwas höher als das filtrierte Referenzbier mit 0,81.

In der ersten Versuchsreihe unterschied sich der prozentuale Gehalt an schnellreduzierenden Substanzen bei den beiden Bieren kaum:

85,0% an schnellreduzierenden Reduktionen im Referenzbier und 85,3% im filtrierten Bier aus intensivbelüfteter Würze (vgl. Abb.37).

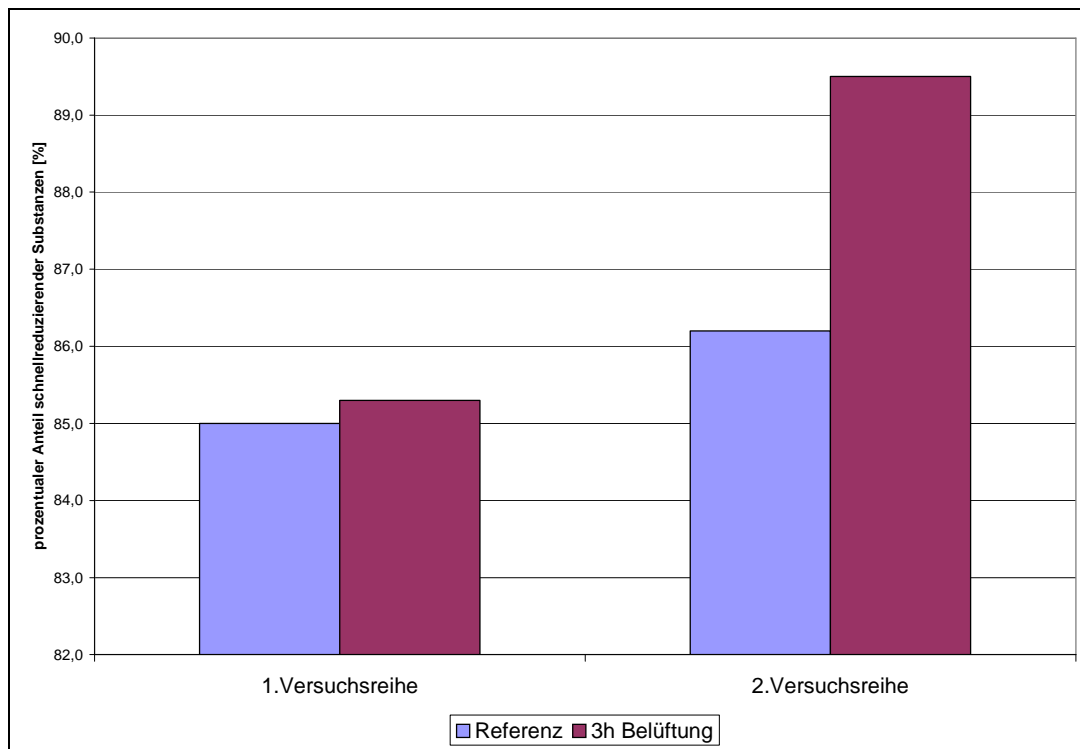


Abb.37: Einfluss intensiver Belüftung auf den prozentualen Anteil schnellreduzierender Substanzen im filtrierten Bier

In der zweiten Versuchsreihe waren bei der Intensivbelüftung mit 89,5% etwas mehr schnellreduzierende Substanzen enthalten als beim Referenzbier mit 86,2%.

In bei den Versuchsreihen waren in den filtrierten Bieren im Bier aus Intensivbelüftung mehr Polyphenole enthalten:

In der ersten Versuchsreihe waren es 217mg/l gegenüber 208mg/l beim Referenzbier, in der zweiten Versuchsreihe 205 mg/l gegenüber 144 mg/l (vgl.Abb.38).

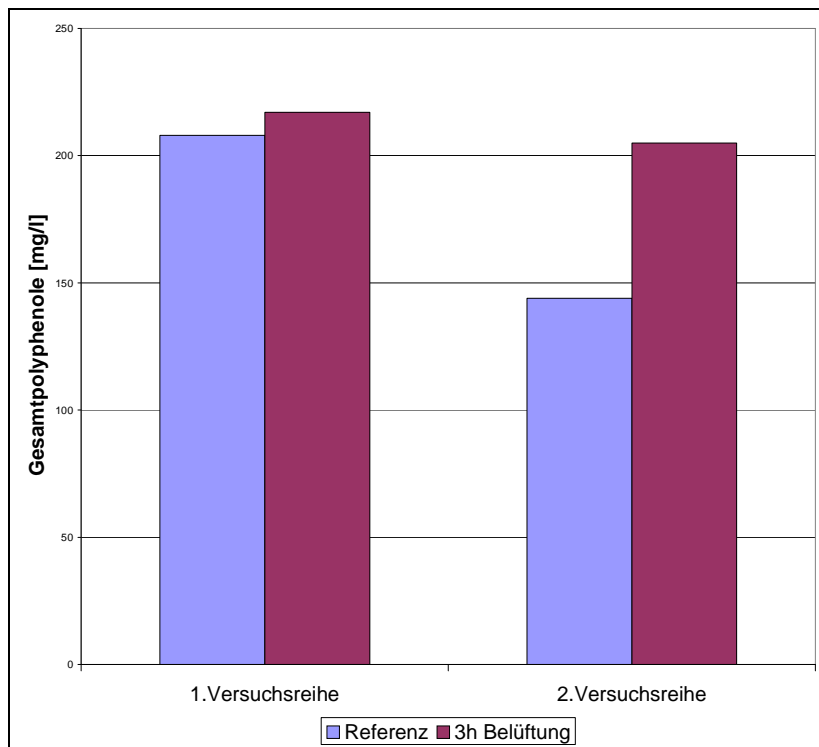


Abb.38: Einfluss intensiver Belüftung auf den Gehalt an Gesamtpolyphenolen im filtrierten Bier

Es waren in der ersten Versuchsreihe mit 48,0 mg/l im Referenzbier gegenüber 37,8mg/l beim Filtrat aus intensivbelüfteter Würze enthalten (vgl.Abb.39).

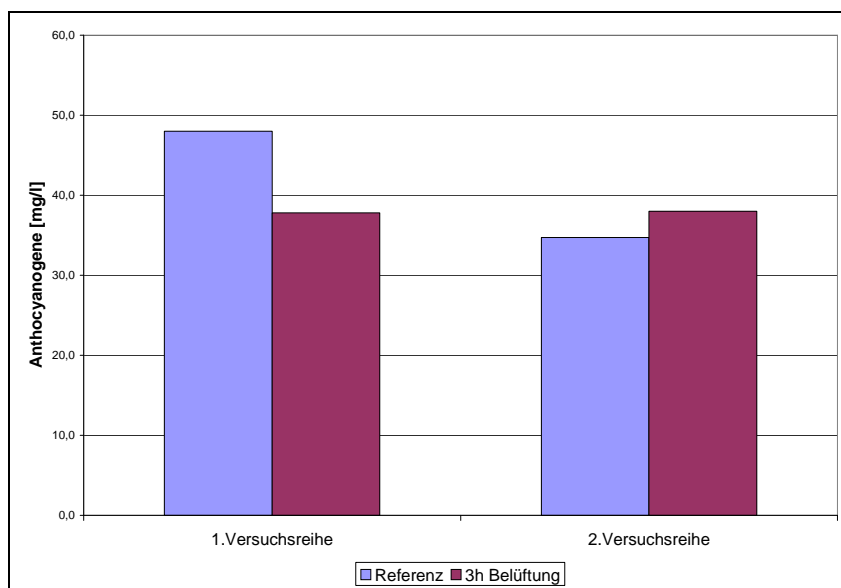


Abb.39: Einfluss intensiver Belüftung auf den Gehalt an Anthocyanogenen im filtrierten Bier

In der zweiten Versuchsreihe hingegen enthielt das Bier aus intensivbelüfteter Würze mit 38,0 mg/l etwas mehr Anthocyanogene als das Referenzbier.

Die DPPH-reduzierende Aktivität unterschied sich bei intensiver und konventioneller Belüftung kaum(vgl.Abb.40).

So wurde in der ersten Versuchsreihe beim Referenzbier ein Extinktionsunterschied von 1,030 ermittelt, während das Filtrat aus der intensiven Belüftung einen Extinktionsunterschied von 1,024 aufwies.

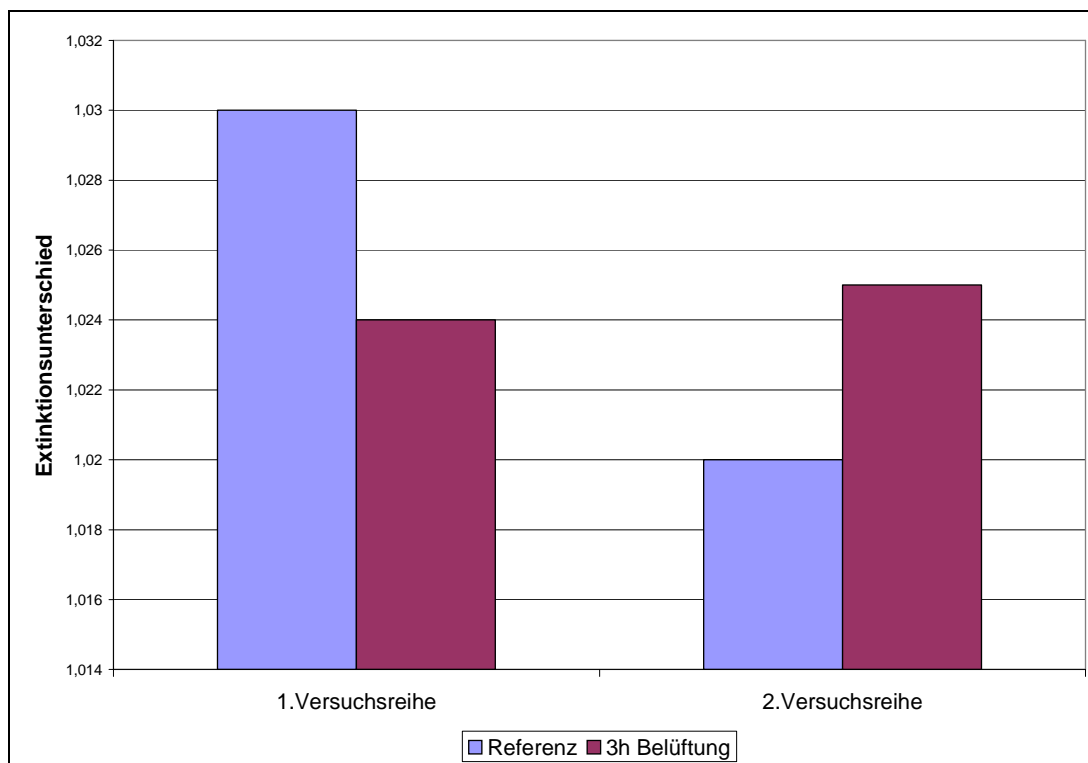


Abb.40: Einfluss intensiver Belüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im filtrierten Bier

In der zweiten Versuchsreihe betrug der Extintionsunterschied 1,020 beim Referenzbier und 1,024 beim Filtrat des aus intensivbelüfteter Würze hergestellten Bier .

Gesamtverlauf

Es ist von hohem Interesse, wie sich die elektrochemischen Ergebnisse auch bei der intensiven Belüftung während der Gärung, Lagerung und Filtration verändern.

Deshalb wird im folgenden die Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials, der elektrochemisch bestimmten Reduktionskraft, des prozentualen Anteils schnellreduzierender Substanzen, des Gesamtpolyphenolgehaltes, des Gehaltes an Anthocyanogenen und der DPPH-reduzierenden Aktivität aufgezeigt.

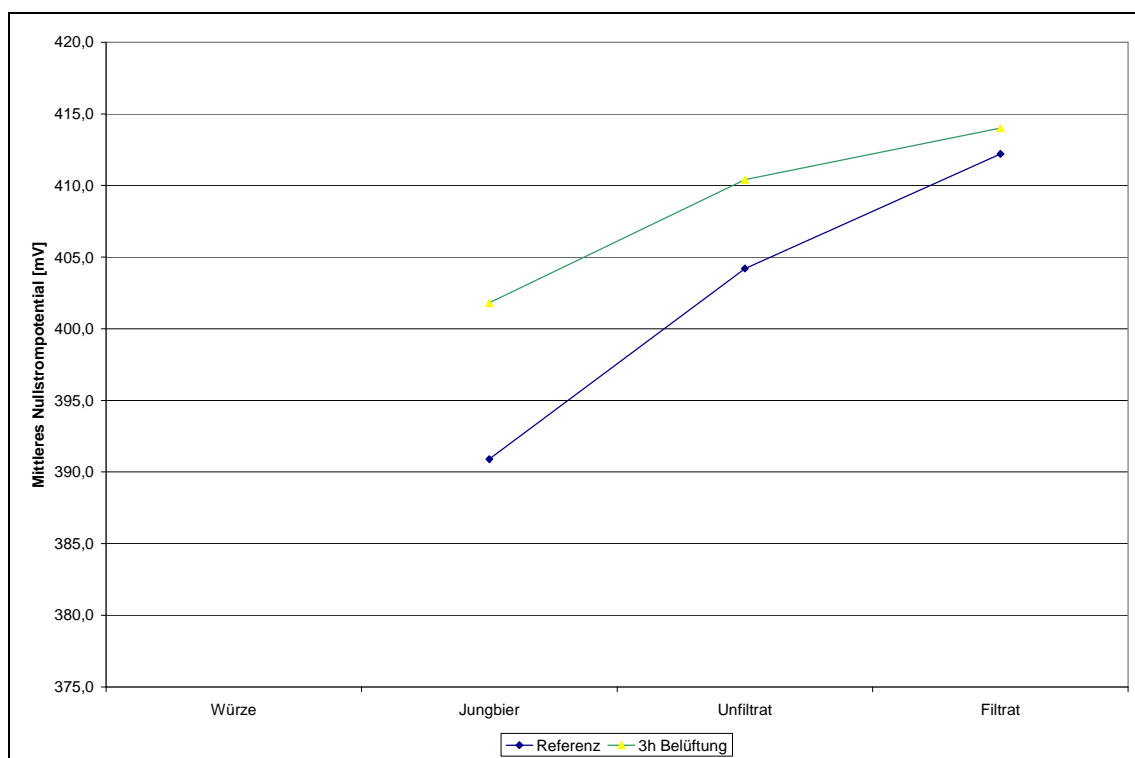


Abb.41: Verhalten des Mittleren Nullstrompotentials bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1

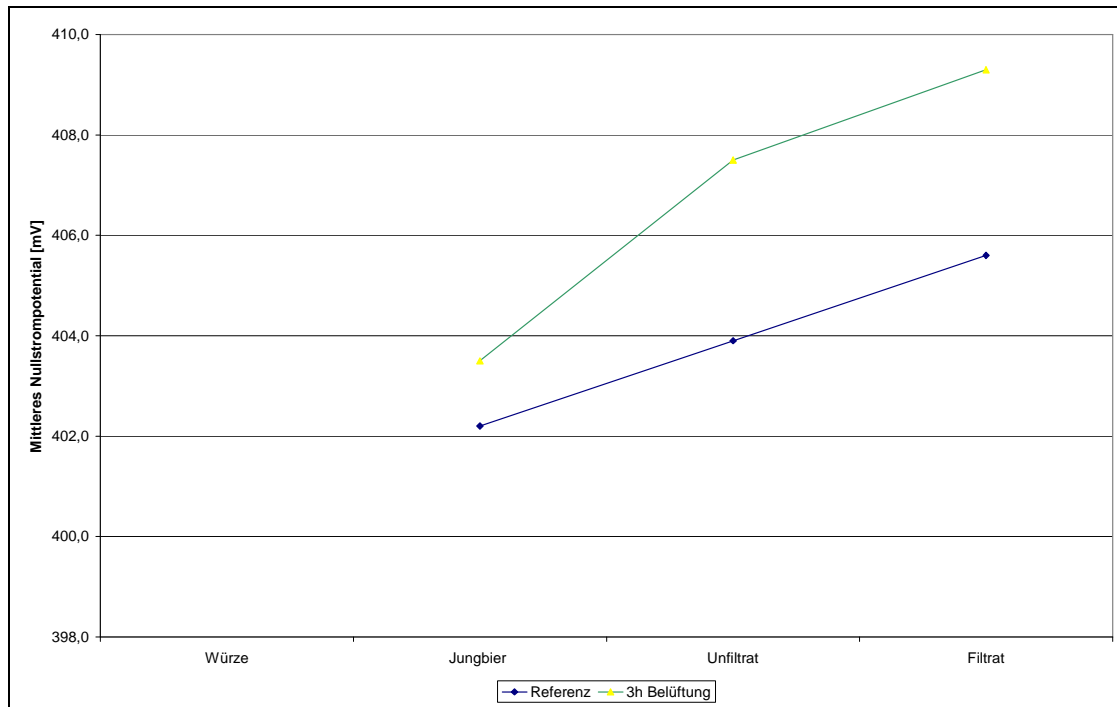


Abb.42: Verhalten des Mittleren Nullstrompotentials bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2

Auch hier war es nicht möglich, in der Würze ein reproduzierbares Mittleres Nullstrompotential zu bestimmen.

Das Potential stieg bei der Lagerung, wie bei der Filtration deutlich an (vgl. Abb.41,42)

In sämtlichen Phasen lag das mittlere Nullstrompotential beim Bier aus intensiver Belüftung deutlich über dem des konventionell belüfteten Bier.

Durch die Filtration näherten sich die Werte etwas an.

Durch die intensive Belüftung ist das Stromverhältnis nach 4 Minuten in allen Phasen geringer als beim Referenzbier.

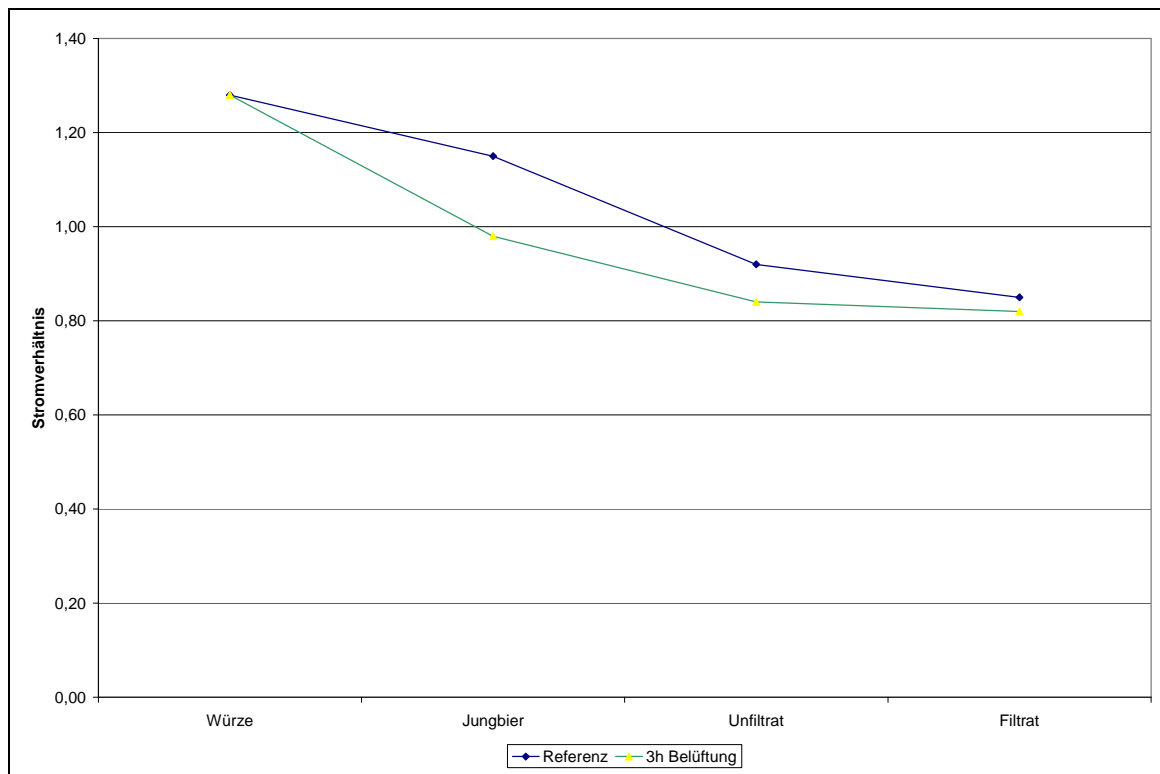


Abb.43: Verhalten des Stromverhältnisses bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1

Insgesamt beobachten wir einen Abfall während der Lagerung ebenso wie einen Anstieg während der Hauptgärung in der zweiten Versuchsreihe(vgl.Abb.43 und 44).

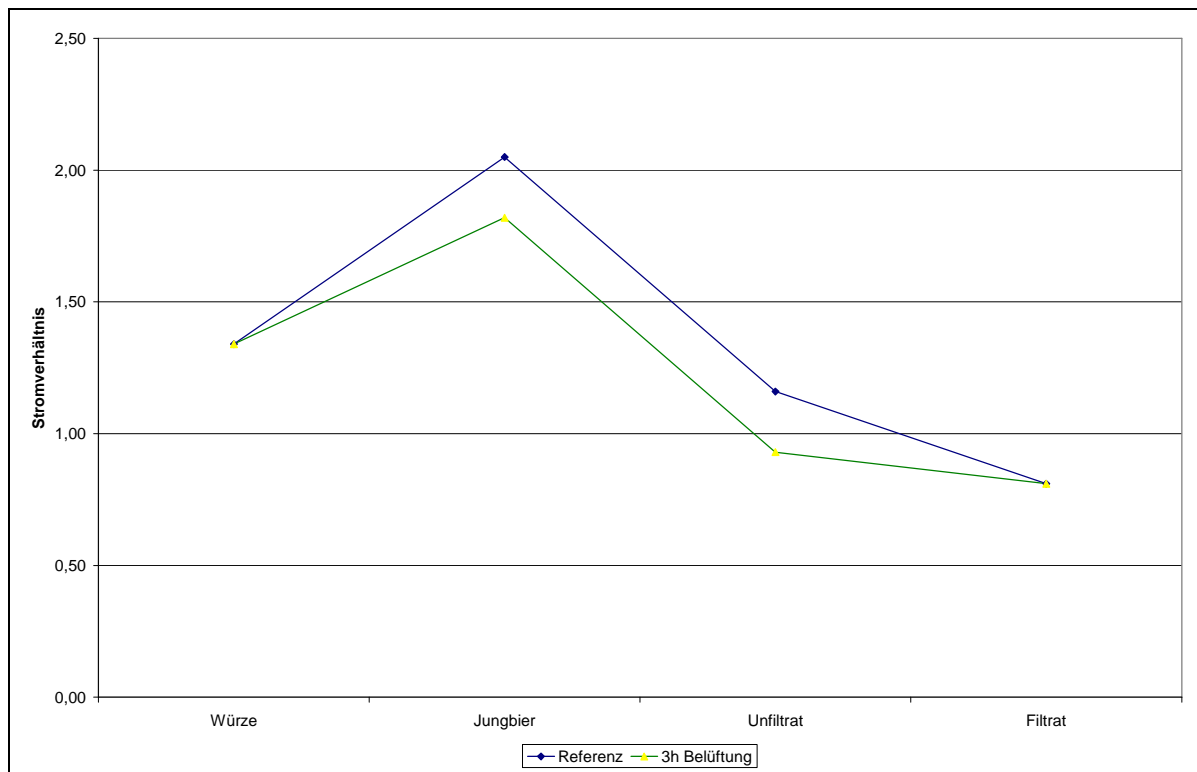


Abb.44: Verhalten des Stromverhältnisses bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2

Insgesamt lag in der ersten Versuchsreihe der Anteil schnellreduzierender Reduktone nach der Hauptgärung am höchsten (vgl. Abb 45).

Während Lagerung und Filtration nahm dieser Anteil deutlich ab

Bemerkenswert ist, dass der Anteil schnellreduzierender Reduktonen in allen Phasen im Referenzbier deutlich über dem des intensivbelüfteten Bieres lag.

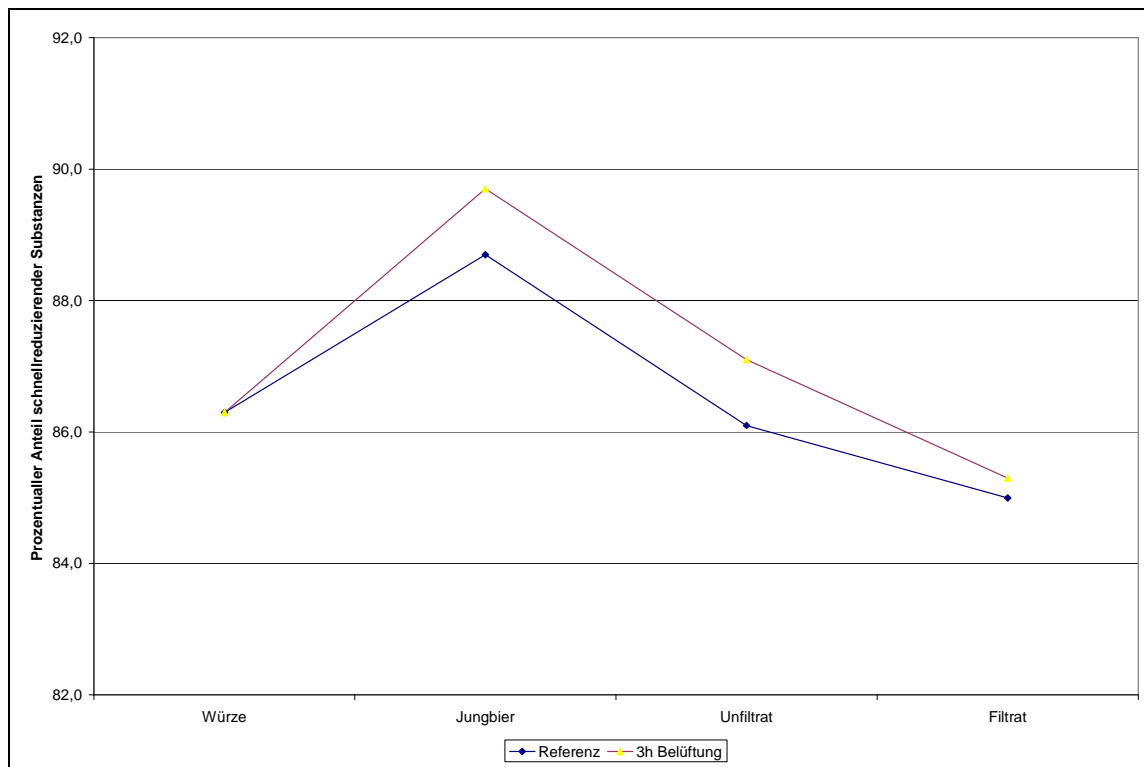


Abb.45: Verhalten des Anteils schnellreduzierender Substanzen bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1

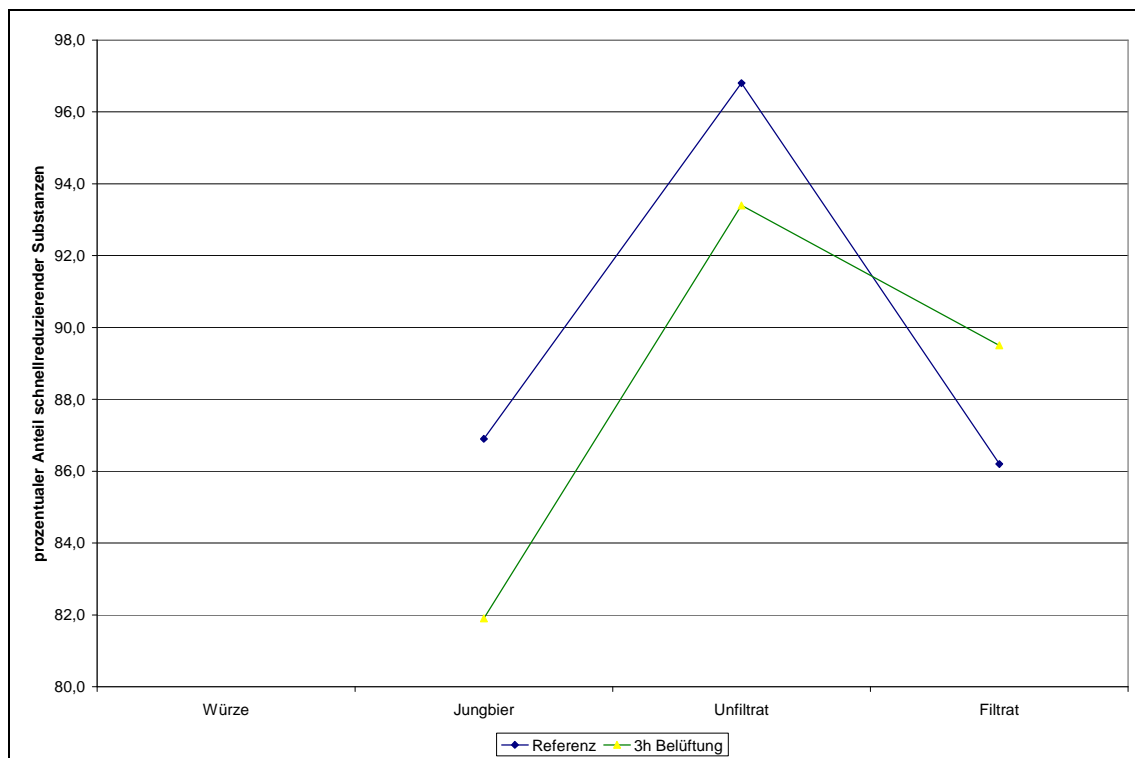


Abb.46: Verhalten des Anteils schnellreduzierender Substanzen bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2

Auch hier beobachteten wir in der zweiten Versuchsreihe einen Anstieg des Anteils der schnellreduzierenden Substanzen bei der Lagerung (vgl. Abb. 46).

Durch die Filtration nahm die Reduktionskraft in unterschiedlichem Maße ab.

Auch bei einer intensiven Belüftung ist die stärkste Abnahme der Gesamtpolyphenole bei der Hauptgärung zu beobachten (vgl. Abb. 47 und 48).

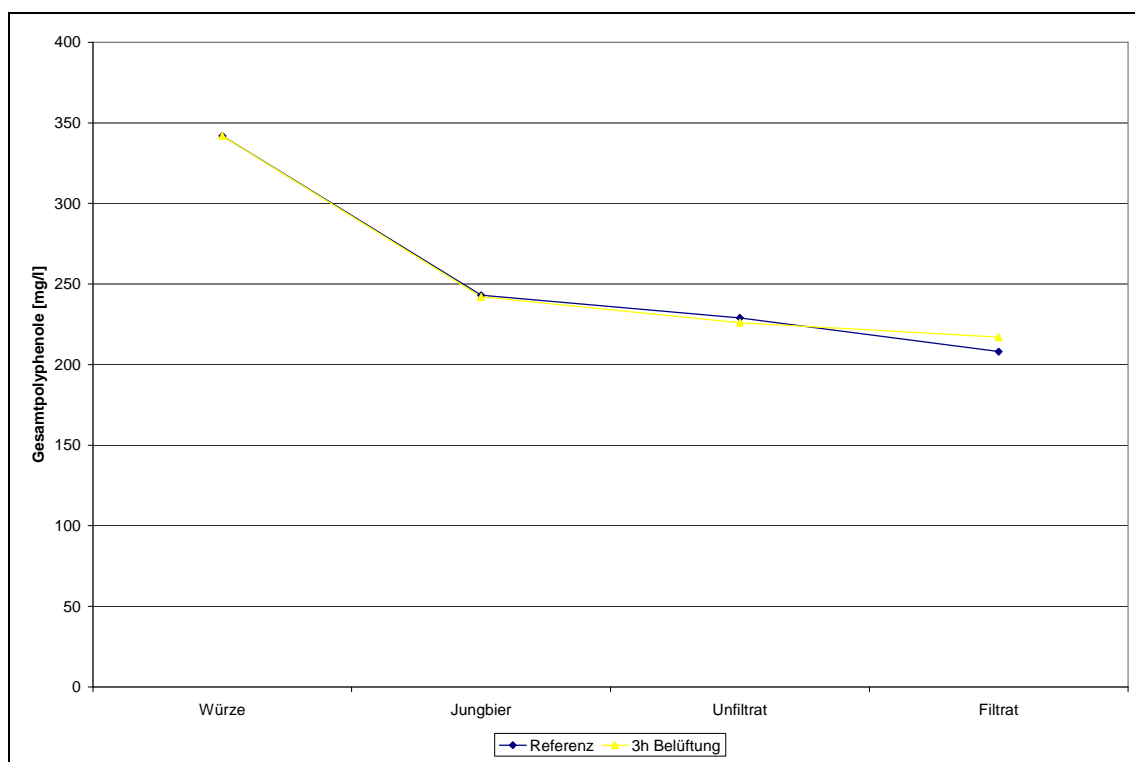


Abb.47: Verhalten der Gesamtpolyphenole bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1

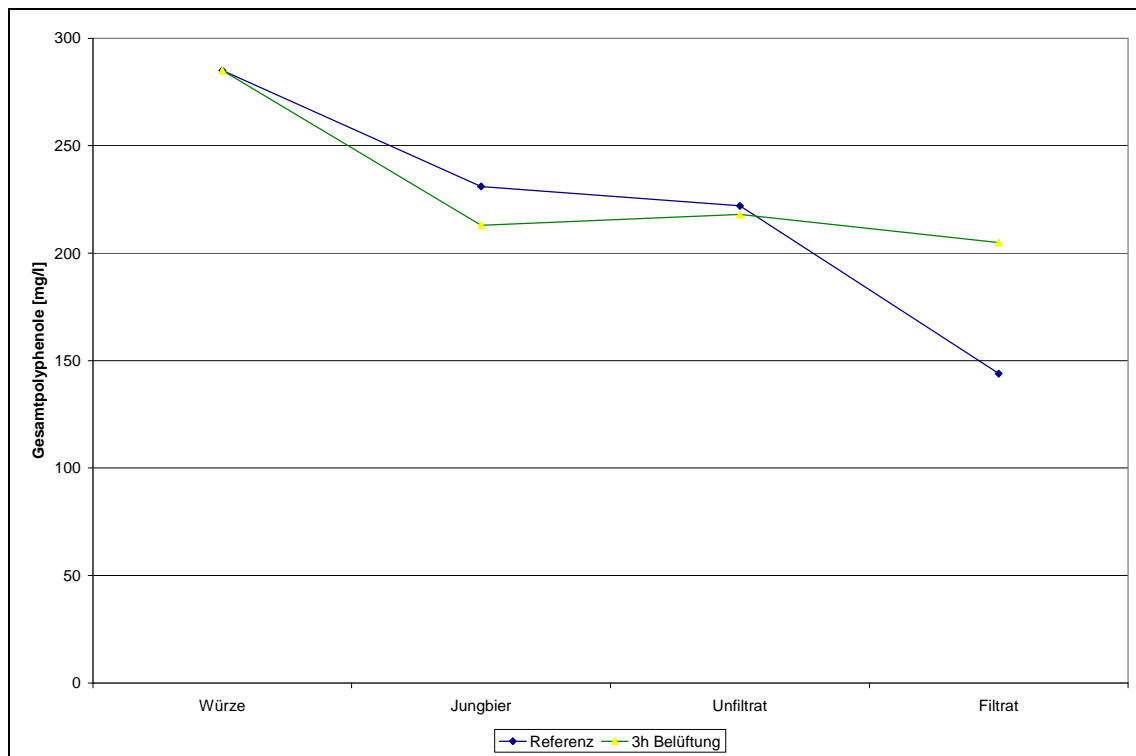


Abb.48: Verhalten der Gesamtpolyphenole bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2

Die Abnahme während Lagerung und Filtration war hingegen beim intensivbelüfteten Bier nicht so deutlich.

Für die Anthocyanogene ergibt sich ebenfalls ein ähnliches Bild wie bei der Zweitbelüftung: Das Niveau der Anthocyanogene liegt ebenfalls in allen Phasen beim intensiv belüfteten Bier über dem konventionell belüfteten Bier (vgl.Abb.49)

Die deutliche Abnahme vollzieht sich auch hier hauptsächlich bei der Gärung und Lagerung (vgl.Abb.49 und 50)

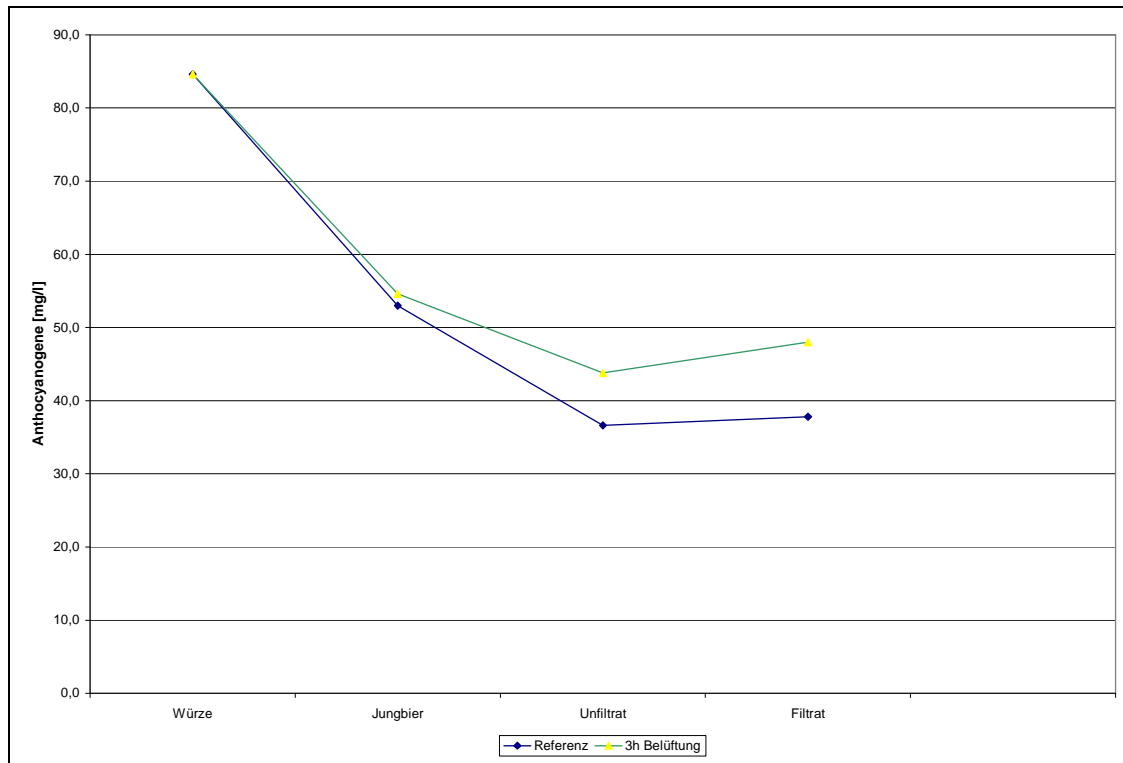


Abb.49: Verhalten der Anthocyanogene bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1

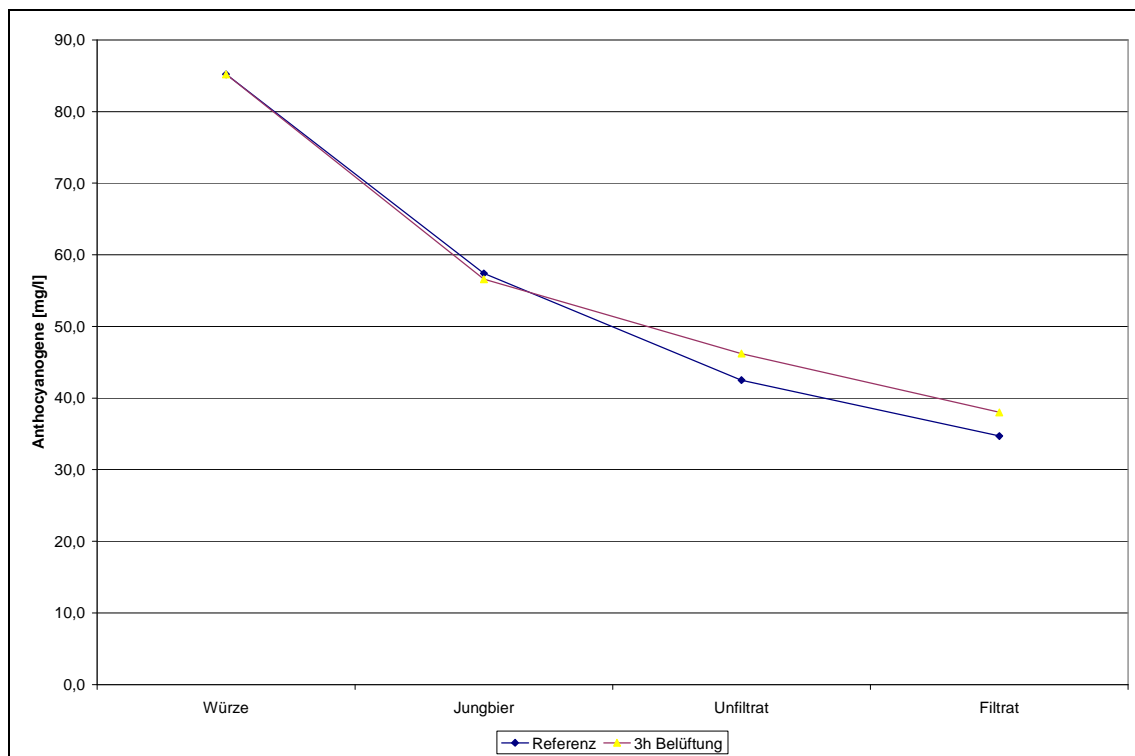


Abb.50: Verhalten der Anthocyanogene bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2

Die intensive Belüftung verhinderte wie auch die Zweitbelüftung einen deutlichen Anstieg der Reduktionskraft gegenüber dem freien Radikal DPPH (vgl. Abb. 51 und 52)

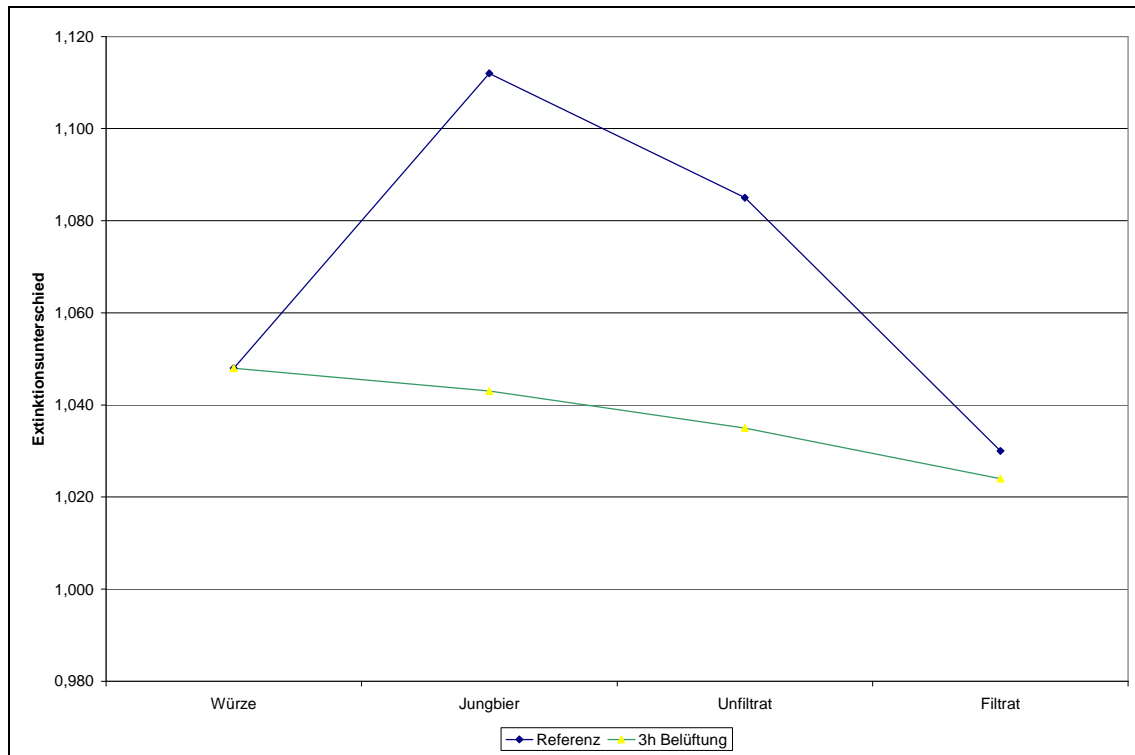


Abb.51: Verhalten der DPPH-reduzierenden Aktivität bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1

Durch das Ausbleiben der Steigerung dieser Radikalfängereigenschaften während der Hauptgärung blieb die DPPH-reduzierende Aktivität bis zur Filtration, wo eine gewisse Nivellierung stattfand beim Bier aus intensiver Belüftung auf deutlich niedrigerem Niveau.

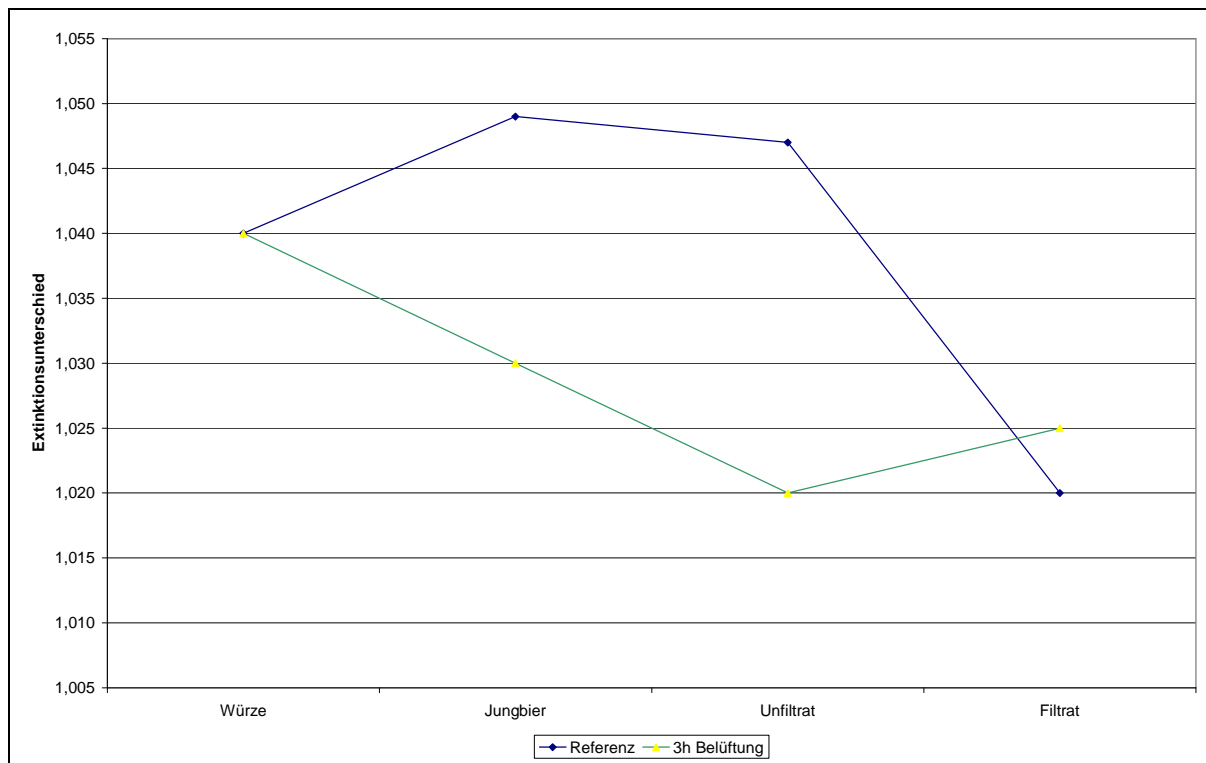


Abb.52: Verhalten der DPPH reduzierenden Aktivität bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich mit den Auswirkungen der Flotation auf Bierqualität und analytische Eigenschaften^{1,1}. Hier stand in älteren Arbeiten in der Diskussion vor allem die Qualität der Kühltrubabtrennung im Vordergrund, wenn Flotation, Kaltwürzefiltration oder ein Verzicht auf Kühltrubabscheidung verglichen wurden. Negative Auswirkungen auf die Geschmacksstabilität wurden auf das verstärkte Einbringen von Vorläufern von Alterungssubstanzen bei schlechter Kühltrubabtrennung zurückgeführt.

Wie wir in der Versuchsreihe mit der Sauerstoffbelastung gesehen haben, reagiert jedoch der Sauerstoff innerhalb weniger Stunden sogar bei Temperaturen, die deutlich niedriger sind als die übliche Anstelltemperatur, mit dem Bier. Dabei wird das Mittlere Nullstrompotential deutlich erhöht, was eine Veränderung des gesamten Redoxzustandes zu einem stärker oxidierten Zustand bedeutet. Auch die elektrochemisch bestimmbaren reduzierenden Substanzen wurden deutlich vermindert.

Die Vermutung einer elektrochemisch nachweisbaren oxidativen Schädigung des Substrats wurde bestätigt. Die deutlichen Unterschiede beim Mittleren Nullstrompotential zeigten sich

¹ Narziß, L., Kieninger, H., Reicheneder, E., "Die Kühltrubabtrennung mittels Flotation im Vergleich zu anderen Verfahren", Proceedings of the 13th Congress of European Brewery Convention Estoril, 1971, S.197-210

beim Schlauchbier, Unfiltrat und Filtrat. Dabei fällt auf, dass im fertigen Bier durch diese intensive Belüftung ein Potentialunterschied auftritt, der einer Belastung des fertigen Bieres mit über 1 mg Sauerstoff pro Liter entspricht. Andere Untersuchungen führten bessere antioxidative Eigenschaften in erster Linie auf einen erhöhten Schwefeldioxidgehalt zurück, der sich aber erst nach mehreren Führungen der Hefe herauskristallisierte.² In diesen Versuchsreihen wurde hingegen stets mit Presshefe gearbeitet. Auch das Stromverhältnis im Schlauchbier und Unfiltrat wurde durch die intensive Belüftung deutlich abgesenkt. Die intensive Belüftung der Würze führte im Schlauchbier und Unfiltrat zu einer Absenkung des Gehalts an schnellreduzierenden Substanzen. Auf das unterschiedliche Verhalten im Filtrat, bei dem eine leichte Ab- bzw. Zunahme des Stromverhältnisses festgestellt wurde, wird später im Zusammenhang mit den anderen Analysenwerten eingegangen werden. Mit den Ergebnissen dieser Versuchsreihe ist es nicht möglich, die Abnahme der Reduktone mit einer bestimmten Reduktonklasse im Sinne des Elektrochemischen Indikator-Time-Tests zuzuordnen. Wie die Abbildungen 45 und 46 zeigen, kann die intensive Belüftung sowohl zu einer Zunahme, als auch einer Abnahme des Anteiles der schnellreduzierenden Substanzen führen.

Man kann also davon ausgehen, dass eine intensive Belüftung der Würze die ITT-Substrate insgesamt schädigt, doch innerhalb dieser Substanzen keine Gruppe von Reduktionen spezifisch durch den in die Würze eingebrachten Sauerstoff geschädigt wird.

Die deutlichen Unterschiede in der DPPH-reduzierenden Aktivität bei Schlauchbier und Unfiltrat zeigen (vgl. Abb.28), dass durch die intensive Belüftung auch die Gruppe der als Radikalfänger wirkenden Reduktone abnahm. Auch hier wurde durch die Filtration der Einfluss der intensiven Belüftung nivelliert.

Die beiden Chargen (konventionelle Belüftung und intensive Belüftung) wurden stets hintereinander filtriert. So ist es möglich, dass durch die Kieselgur adsorbierte reduzierende Substanzen der ersten Charge im Verlauf der Filtration an die Zweite Charge abgegeben wurden. Dies führt notwendigerweise zur Angleichung der Analysenwerte im Filtrat.

¹ Isenberg,R., "Kaltwürze Filtration und Kaltwürzeflotation-Ein Systemvergleich",Diplomarbeit, TU München, 1997

² Dickel,T., Krottentaler,M., Back,W., "Untersuchungen zum Einfluss des Kühltrubeintrags auf die Bierqualität", Brauwelt , 2000, S.1330-1332

Insgesamt bleibt bei diesen Versuchsreihen festzuhalten:

Eine intensive Belüftung der Würze ohne Hefe, wie sie hier in den Gärtanks durchgeführt wurde, führt zu einer "Verschlechterung" des Redoxpotentials, gemessen als Mittleres Nullstrompotential, also der elektroaktiven reduzierenden Substanzen, der Radikalfängereigenschaften (DPPH-reduzierende Aktivität) und zu einem Rückgang der DCI-reduzierenden ITT-Substrate. So ist eine oxidative Schädigung der Würze durch die intensive Belüftung nachgewiesen. Eine tatsächliche Flotation im grosstechnischen Maßstab führt mindestens zu einer genauso großen oxidativen Schädigung des Bieres, da erstens die Dauer der Sauerstoffbelastung länger ist und zweitens die Luft feiner verdüst wird als bei der Sinterkerze, die bei unseren kleintechnischen Versuchen verwendet wird. Dabei ist der tatsächliche Kontakt der Gasbläschen mit dem Substrat deutlich größer und dadurch auch die Aufnahme von Sauerstoff erhöht.

4.3.2 Einfluss der Zweitbelüftung

Der einzige Prozessschritt, bei dem bei der Bierbereitung bewusst Sauerstoff eingebracht wird, ist die Würzebelüftung. Nach bisherigen Erkenntnissen ist die Würzebelüftung für eine optimale Hefevitalität und damit günstigen Gärverlauf unerlässlich.

Inwieweit sich eine Zweitbelüftung günstig auf verschiedene Eigenschaften auswirkt, ist umstritten. Es stellt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß der eingebrachte Sauerstoff mit den Inhaltsstoffen der Würze reagiert anstatt, wie beabsichtigt, von der Hefe veratmet zu werden. Daher war das Ziel der folgenden Versuchsreihe, den Einfluss der Zweitbelüftung auf das Potential und andere Indikatoren für den Redoxzustand des Bieres zu untersuchen.

Eine großtechnisch hergestellte Würze wurde im Technikum auf zwei 20 l Gärtanks aufgeteilt. Je Liter Anstellwürze wurden 4g Presshefe Stamm 34/70 gegeben. Die für jeden Tank berechnete Hefemenge wurde vorher in 1 Liter Würze aufgeschlämmt und anschließend gegeben. Mit der Hefe wurden die Tanks konventionell über eine Sinterkerze 10 min bei einem Gegendruck von 0,5 bar belüftet.

Angestellt wurde mit 6°C, die Hauptgärtemperatur betrug 9°C.

Der zweite Tank wurde nach 16h zweitbelüftet. Hierbei wurde ebenfalls mit einer Sinterkerze 10 min bei 0,5bar Gegendruck belüftet.

Nach Erreichen des Gärkellervergärungsgrades wurde das Jungbier geschlaucht, eine Woche bei 4°C und 3 Wochen bei 0°C in Corneliusbehältern gereift und gelagert.

Anschließend wurde das Bier kieselgurfiltriert.

Untersucht wurden die Würze bzw. die Biere mit dem elektrochemischen Analysenautomaten und den eingangs beschriebenen Referenzanalysen.

Jungbier

In der ersten Versuchsreihe betrug das Mittlere Nullstrompotential beim konventionell belüfteten Jungbier 390,9mV.

Beim zweitbelüfteten Jungbier war es deutlich erhöht auf 396,7mV (vgl. Abb.53).

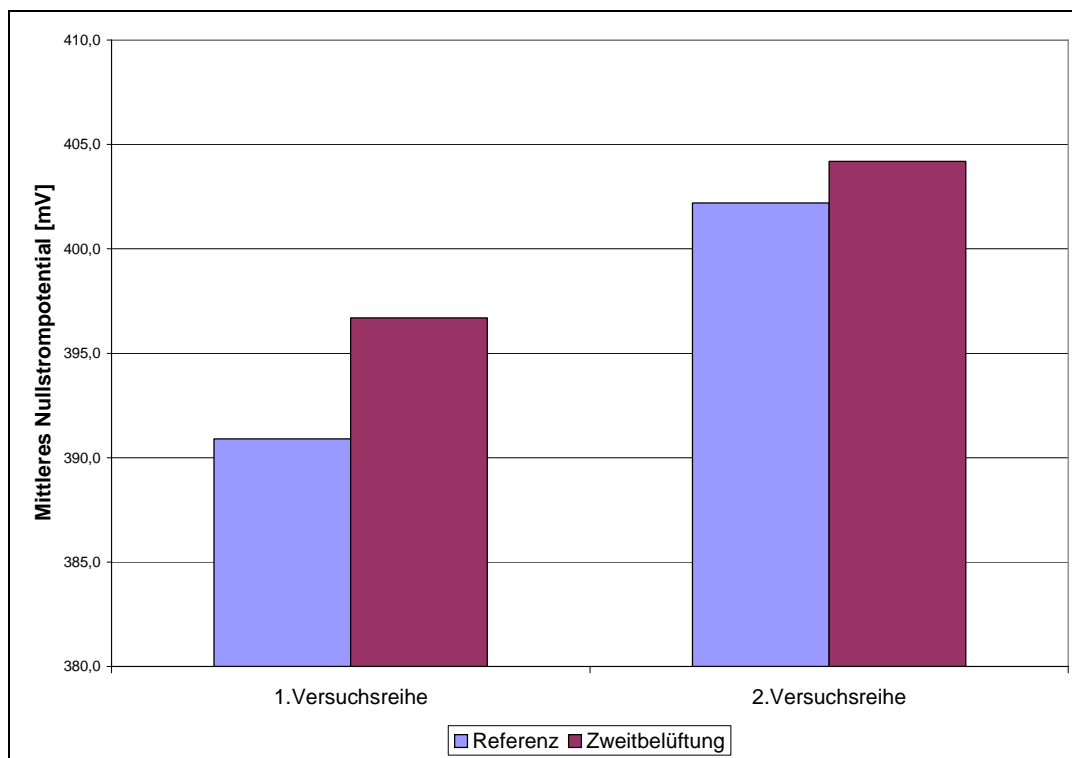


Abb.53: Einfluß der Zweitbelüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Jungbier

In der zweiten Versuchsreihe war ein ähnlicher, wenn auch geringerer, Unterschied zu beobachten:

Beim Referenzbier betrug das mittlere Nullstrompotential 402,2mV, während es beim zweitbelüfteten Jungbier auf 404,2 mV erhöht war.

Beim Stromverhältnis nach 4 Minuten Reaktionszeit mit DCI ergab sich beim Referenzbier ein Wert von 1,15, während es beim zweitbelüfteten Bier mit 1,07 etwas niedriger lag (vgl.Abb.54).

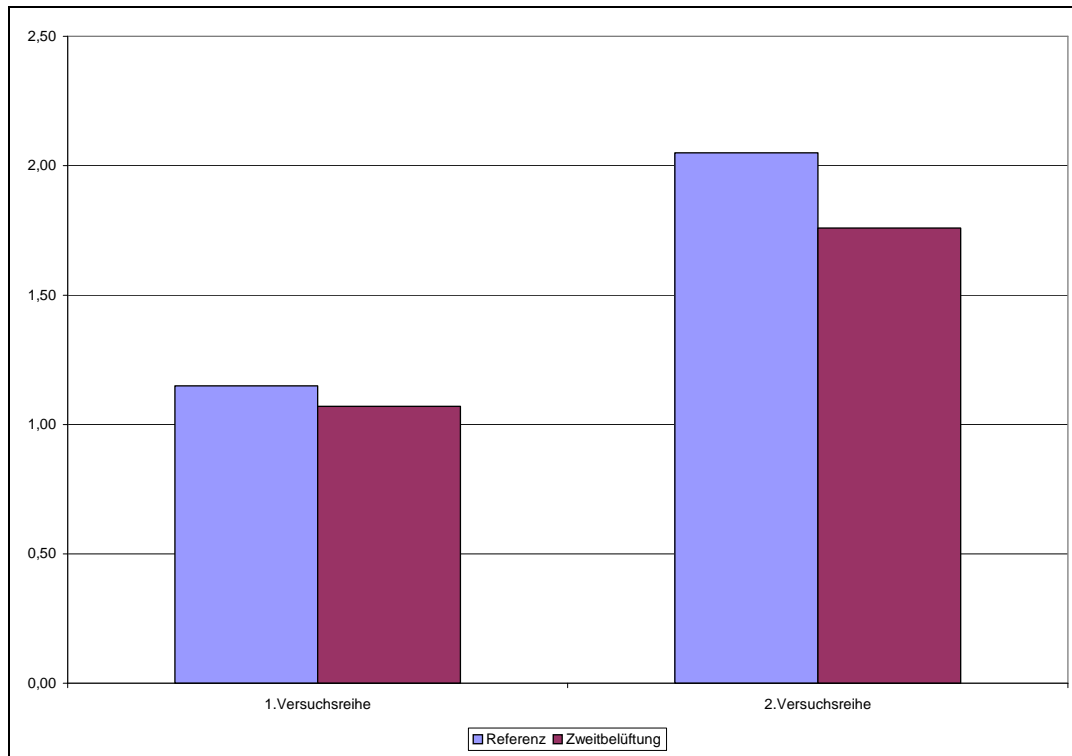


Abb.54:Einfluß der Zweitbelüftung auf das Stromverhältnis im Jungbier

In der zweiten Versuchsreihe ließ sich ein ähnlich großer relativer Unterschied beobachten: Das Referenzbier wies ein Stromverhältnis von 2,05 auf, während beim zweitbelüfteten Bier nur 1,76 ermittelt wurden.

Beim Anteil schnell reduzierender Substanzen war jedoch bei der ersten Versuchsreihe kein deutlicher Unterschied festzustellen. Beim Referenzbier betrug der Anteil der in 4 min das DCI reduzierenden Reduktone an der Gesamtheit aller innerhalb von 15 Minuten reduzierenden Reduktone 88,7%, beim zweitbelüfteten Jungbier 89,0%.

Das bedeutet, dass die schnell reduzierenden Reduktone beim nur einfach belüfteten Bier zwar absolut höher vertreten waren, jedoch die prozentuale Verteilung der verschiedenen Reduktonklassen in konventionell und zweitbelüfteten Bier etwa gleich war (vgl.Abb.55).

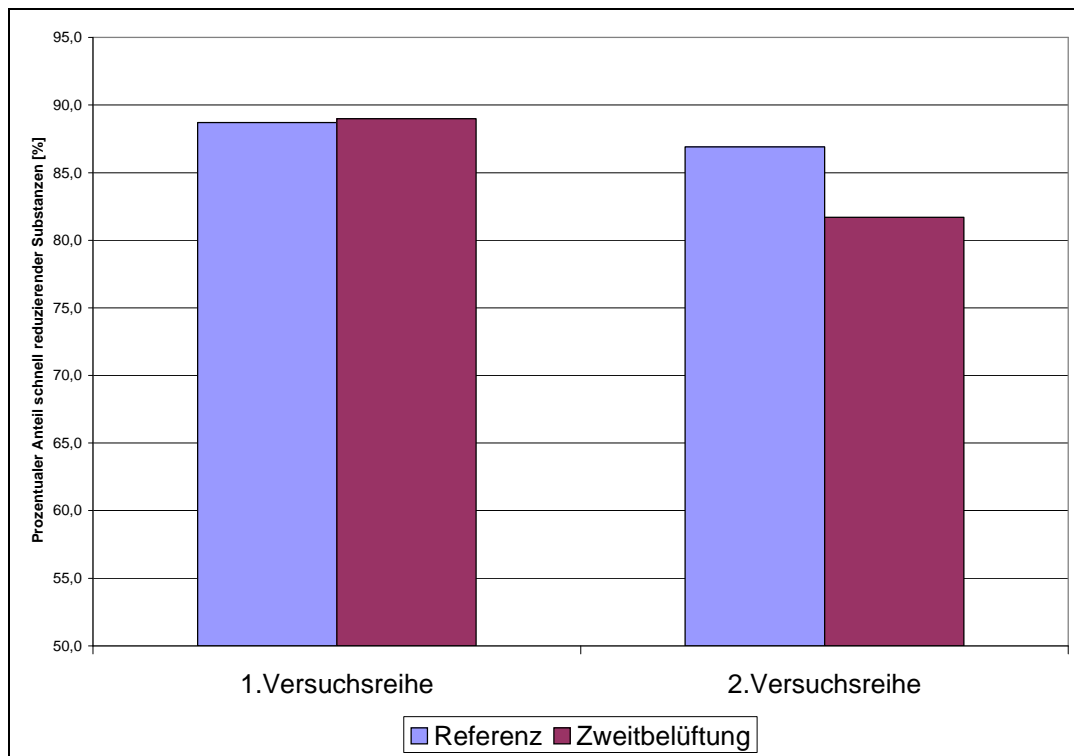


Abb.55: Einfluss der Zweitbelüftung auf den prozentualen Anteil schnellreduzierender Substanzen im Jungbier

In der zweiten Versuchsreihe hingegen war eine leichte Abnahme des Anteils der schnellreduzierenden Substanzen durch die Zweitbelüftung zu beobachten:

Gehörten beim konventionell belüfteten Bier noch 86,9% der innerhalb von 15 min DCI-reduzierenden Substanzen zu den schnellreduzierenden Substanzen, so ist dieser Anteil bei Zweitbelüftung zu Ungunsten der schnellreduzierenden Substanzen verschoben: Nur noch 81,7% gehören zu dieser Klasse.

Auch die Radikalfängerqualität nach DPPH-Methode unterschied sich deutlich.

In der ersten Versuchsreihe lag der Extinktionsunterschied nach 10 min Reaktionszeit beim Referenzbier bei 1,112. Beim zweitbelüfteten Bier hingegen betrug der Extinktionsunterschied nur 1,053 (vgl.Abb.56)

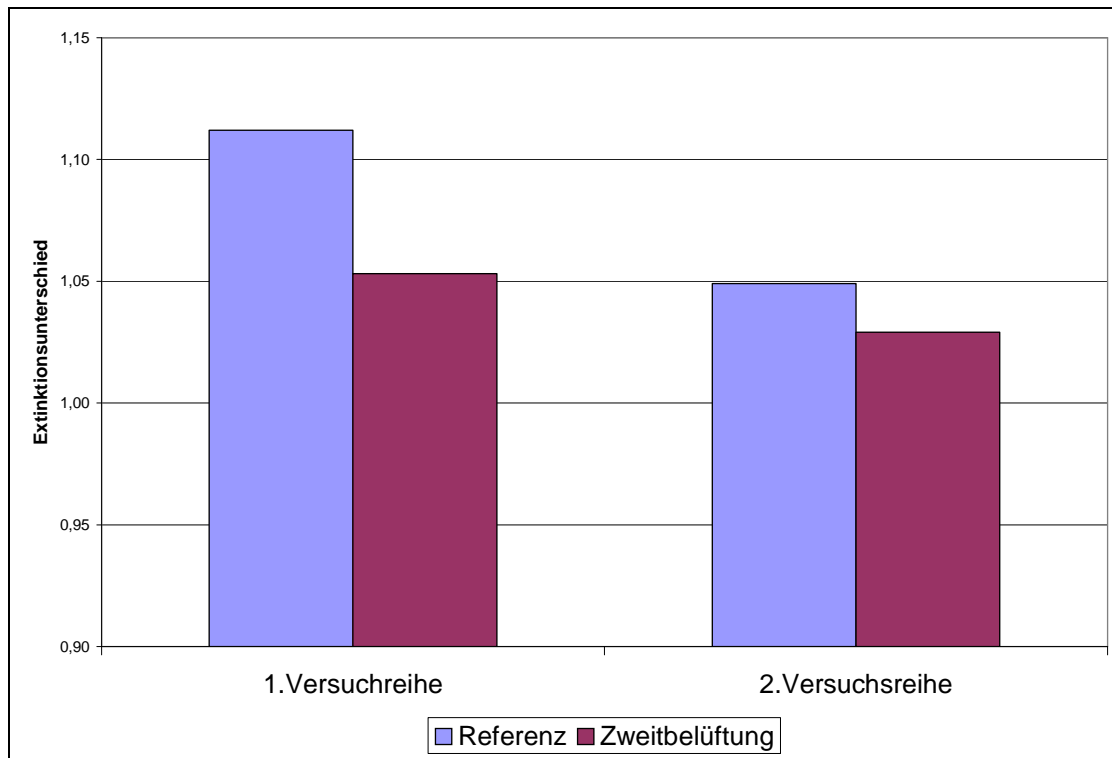


Abb.56: Einfluß der Zweitbelüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im Jungbier

Eine ähnliche Tendenz war auch in der zweiten Versuchsreihe zu beobachten:

Beim Referenzbier ein Extinktionsunterschied von 1,049 und beim zweitbelüfteten Bier 1,029.

Bei dem Gehalt an Gesamtpolyphenolen im Jungbier ergab sich beim konventionell belüfteten Bier nahezu der gleiche Wert wie mit Zweitbelüftung.

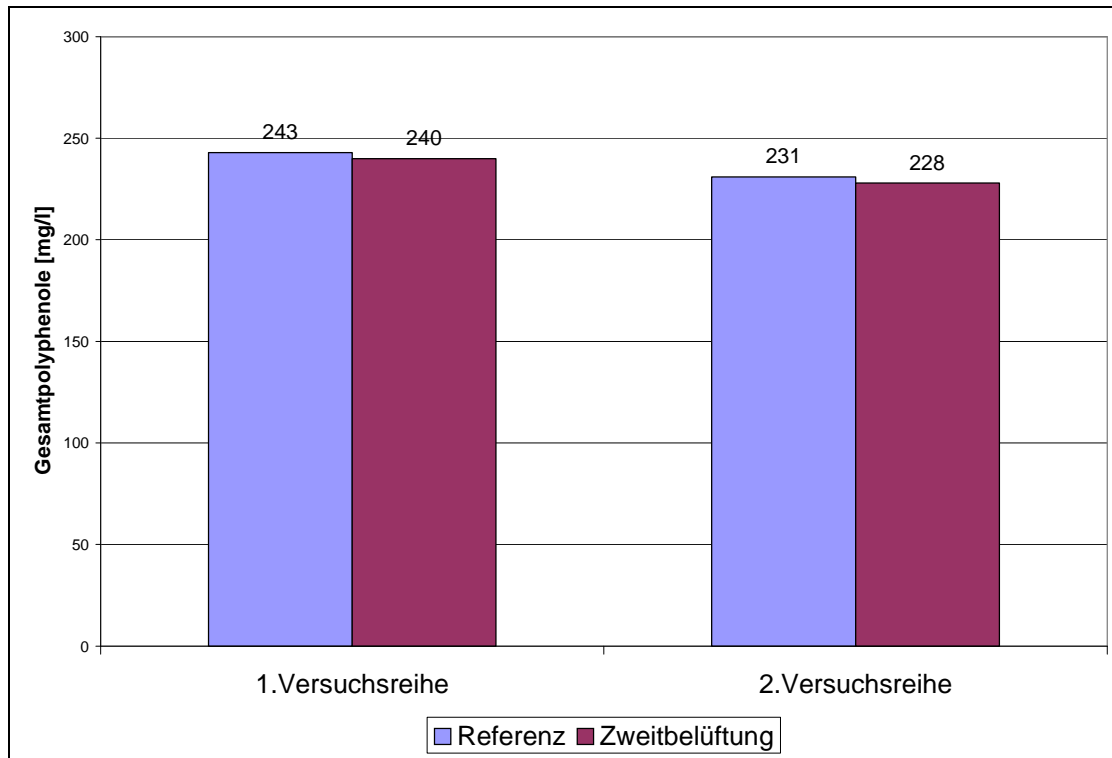


Abb. 57: Einfluss der Zweitbelüftung auf den Gesamtpolyphenolgehalt im Jungbier

In der zweiten Versuchsreihe war ebenfalls kein deutlicher Unterschied im Gehalt an Gesamtpolyphenolen zu ermitteln.

Der Gehalt an Anthocyanogenen betrug in der ersten Versuchsreihe beim konventionell hergestellten Jungbier 53,0 mg/l, beim zweitbelüfteten 60,0 mg/l (Abb.58).

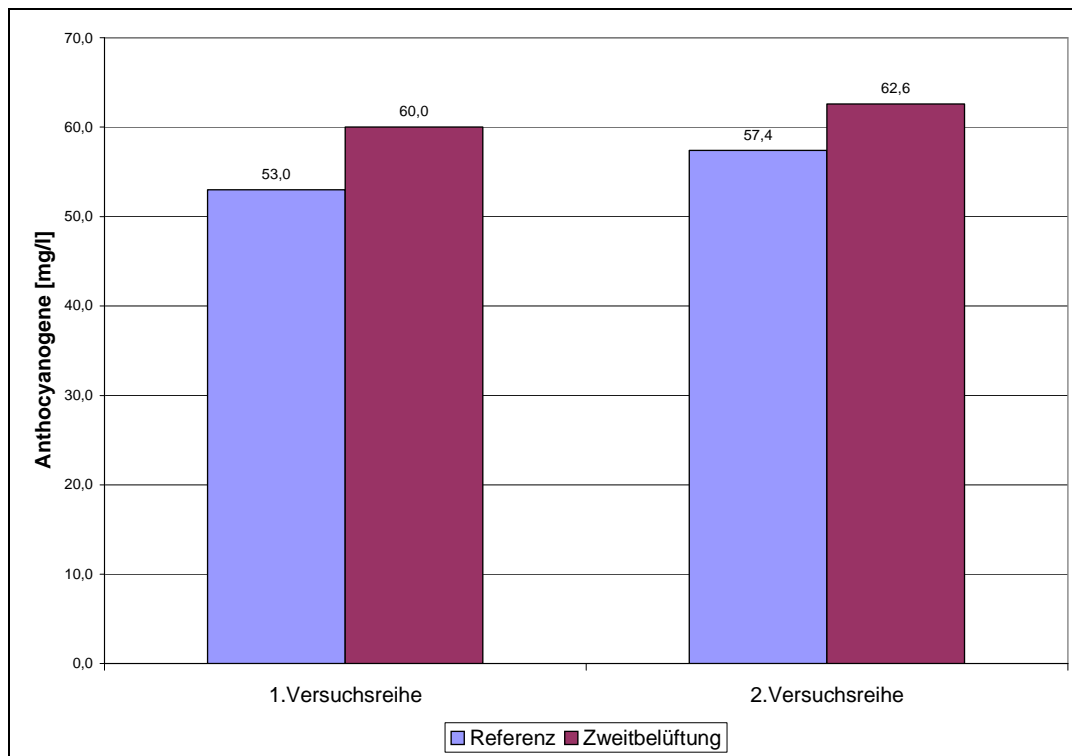


Abb.58: Einfluss der Zweitbelüftung auf den Anthocyanogengehalt im Jungbier

In der zweiten Versuchsreihe zeigte sich die selbe Tendenz zu höheren Anthocyanogehalten bei dem zweitbelüfteten Bier:

57,4 mg/l enthielt das Referenzbier, 62,6 mg/l das zweitbelüftete.

Unfiltrat

Nach der Lagerung lag das Mittlere Nullstrompotential des zweitbelüfteten Bieres bei 410,5 mV, das des Referenzbieres bei 404,2 mV (vgl. Abb.59).

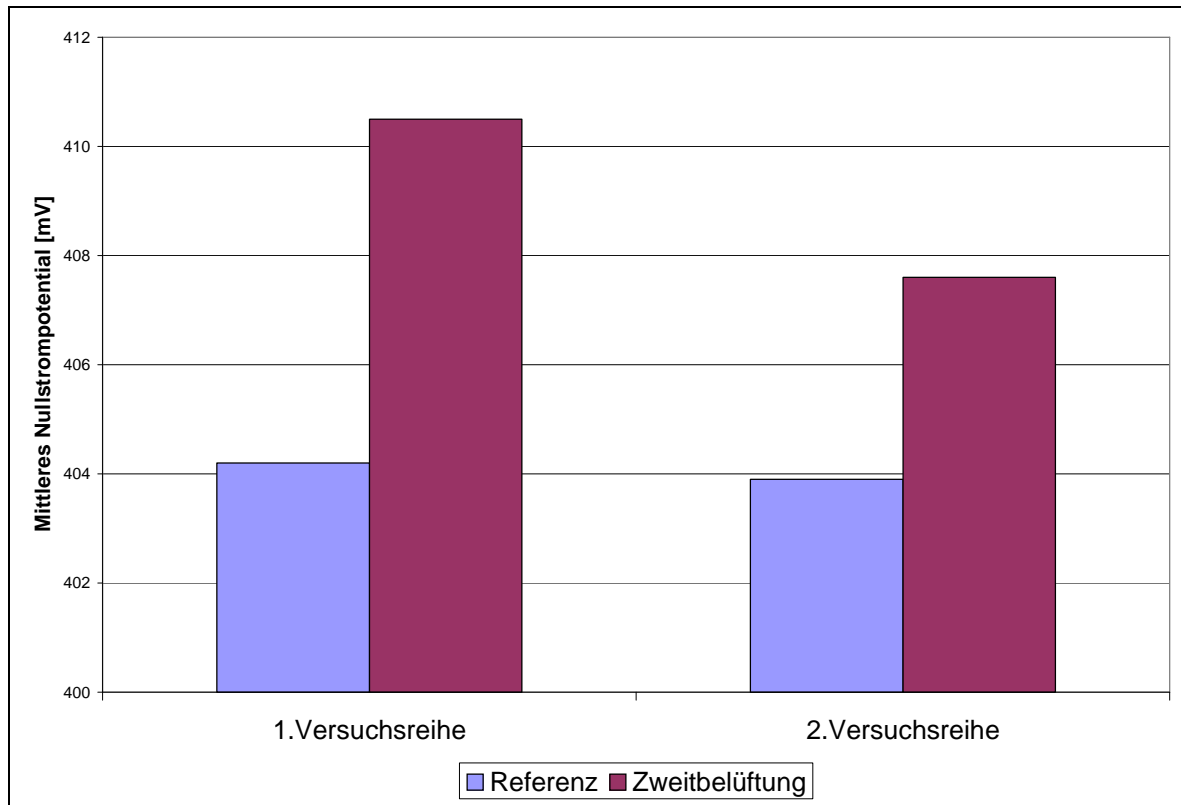


Abb.59: Einfluss der Zweitbelüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Unfiltrat

In der zweiten Versuchreihe war das Mittlere Nullstrompotential des Unfiltrates des zweitbelüfteten Bieres um einen etwas geringeren Betrag gegenüber dem Referenzbier erhöht als in der ersten Versuchreihe:

Das Potential des Referenzbieres betrug 403,9mV, das des zweitbelüfteten 407,6 mV.

Die im elektrochemischen Indikator-Time-Test ermittelte Reduktionskraft nach 4 Minuten Reaktionszeit mit DCI war beim Unfiltrat des Referenzbieres mit einem Stromverhältnis von 0,92 höher als die Reduktionskraft des Unfiltrates des zweitbelüfteten Bieres mit 0,84 (vgl.Abb.60).

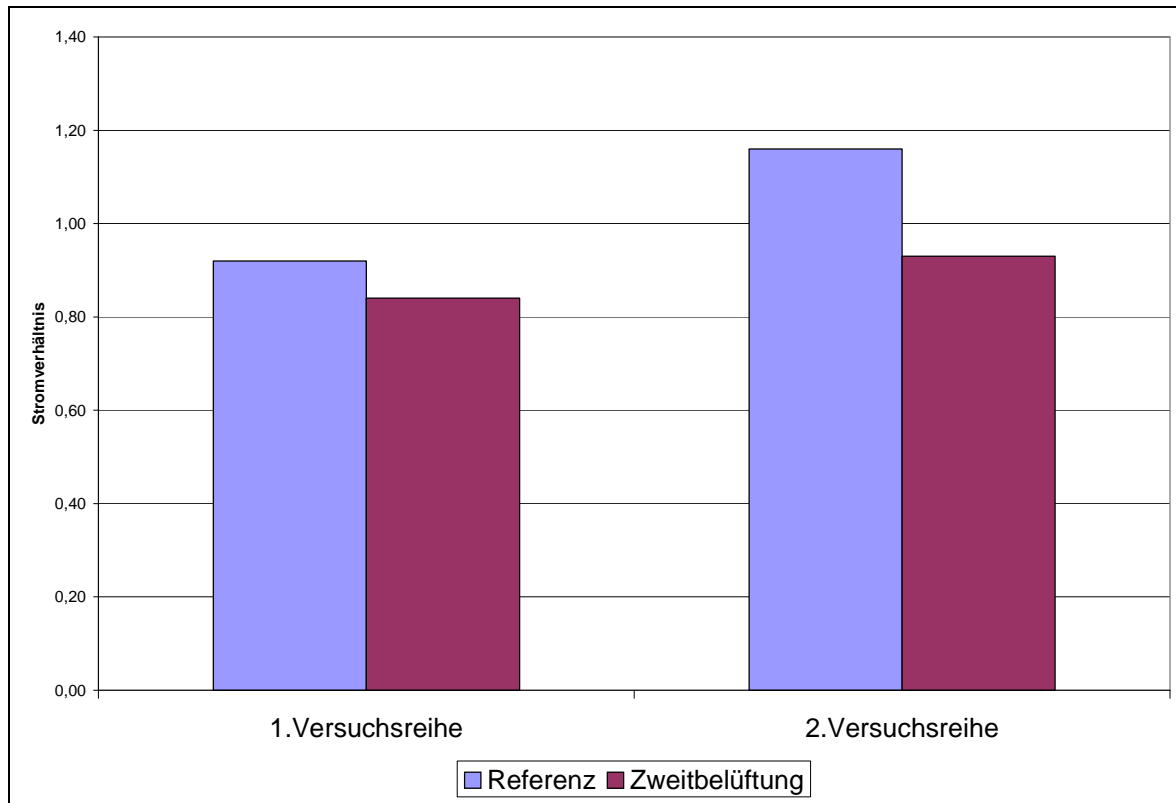


Abb.60: Einfluss der Zweitbelüftung auf das Stromverhältnis im Unfiltrat

Bestätigt wurde dieses Ergebnis in der zweiten Versuchsreihe, wobei hier der Unterschied zwischen dem zweitbelüfteten und nicht zweitbelüfteten Bier deutlicher ausfiel:

Beim Referenzbier-Unfiltrat betrug das Stromverhältnis 1,16, beim Unfiltrat des zweitbelüfteten Bieres 0,93.

Der Anteil schnell reduzierender Substanzen und damit die Zusammensetzung der Reduktone im Unfiltrat unterschied sich in der ersten Versuchsreihe kaum (vgl. Abb. 61).

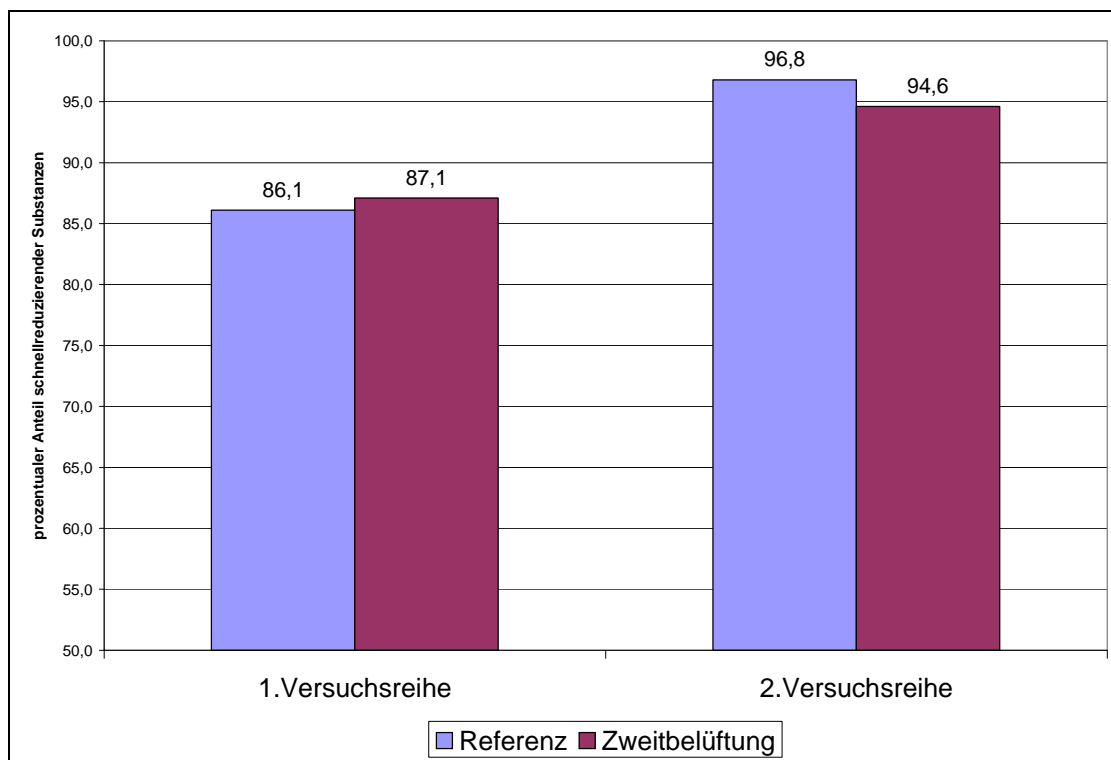


Abb. 61: Einfluss der Zweitbelüftung auf den Anteil schnellreduzierender Substanzen im Unfiltrat

In der zweiten Versuchsreihe waren die Anteile ebenfalls nahezu gleich groß.

Der Extinktionsunterschied beim Abfangen des freien Radikals betrug beim Unfiltrat des Referenzbieres 1,085, während der Wert beim Unfiltrat des zweitbelüfteten Bieres mit 1,042 deutlich niedriger lag (vgl. Abb. 62).

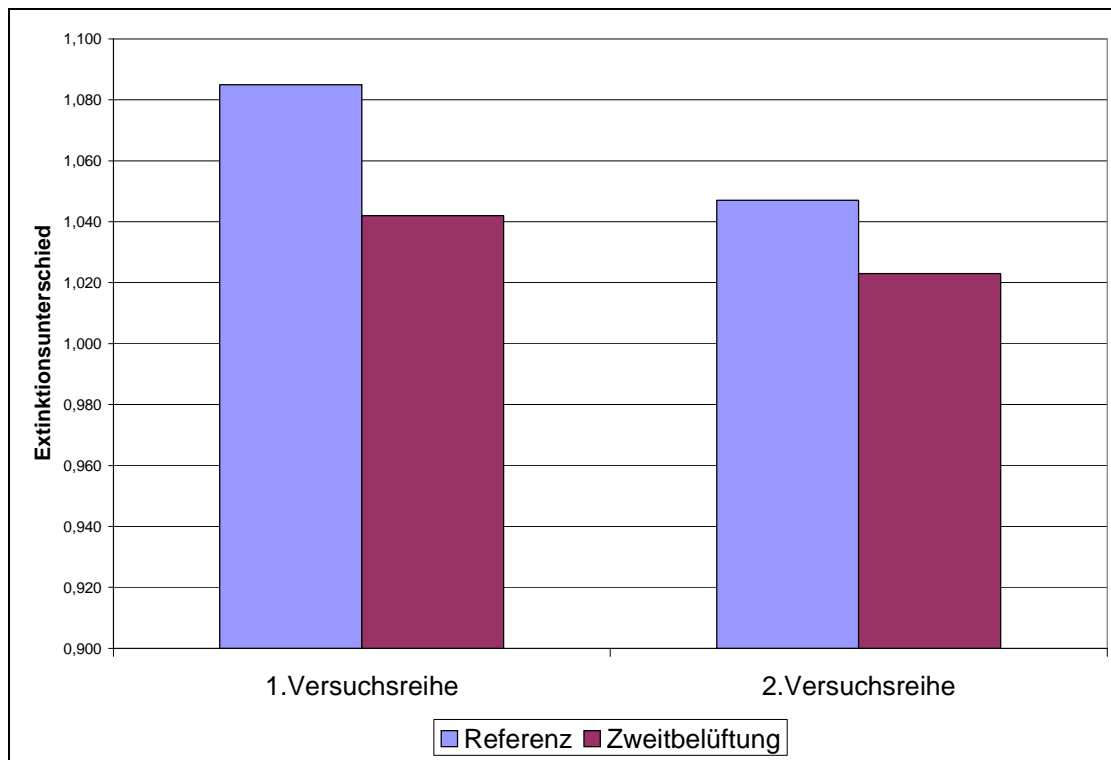


Abb 62: Einfluss der Zweitbelüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im Unfiltrat

Das bestätigte sich auch in der zweiten Versuchreihe, wo die Werte bei 1,047 und 1,023 lagen.

In der ersten Versuchreihe lag der Gehalt an Gesamtpolyphenolen beim Referenzbier mit 229 mg/l höher als beim Unfiltrat des zweitbelüfteten Bieres mit 215 mg/l (vgl. Abb. 63)

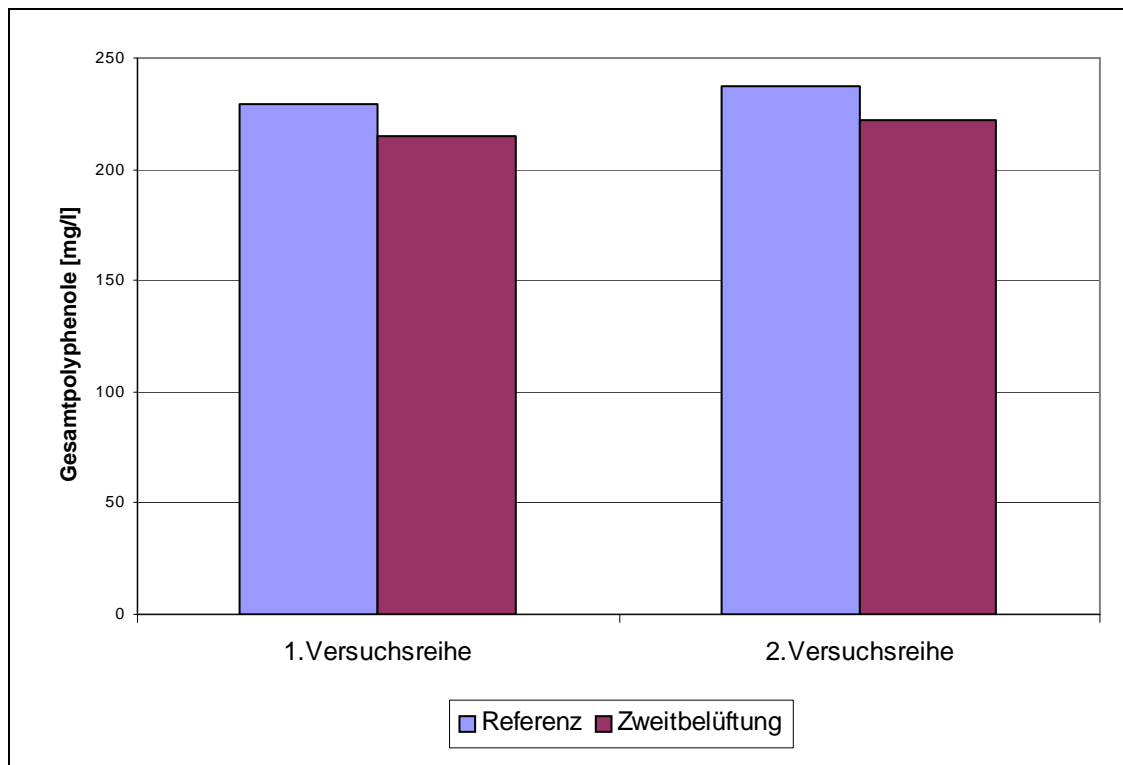


Abb.63: Einfluss der Zweitbelüftung auf den Gesamtpolyphenolgehalt im Unfiltrat

In der zweiten Versuchsreihe war ein ähnliches Verhältnis zu beobachten:

Das Unfiltrat des konventionell belüfteten Bieres enthielt 237 mg/l Gesamtpolyphenole, während im Bier aus Zweitbelüftung 222 mg/l nachzuweisen waren.

Wie schon beim Jungbier gezeigt wurde, führte eine Zweitbelüftung zu einer leichten Steigerung der Anthocyanogene (vgl Abb.64):

In der ersten Versuchsreihe enthielt das Referenzbier 36,6 mg/l Anthocyanogene, das zweitbelüftete Bier hingegen 44,2mg/l Anthocyanogene.

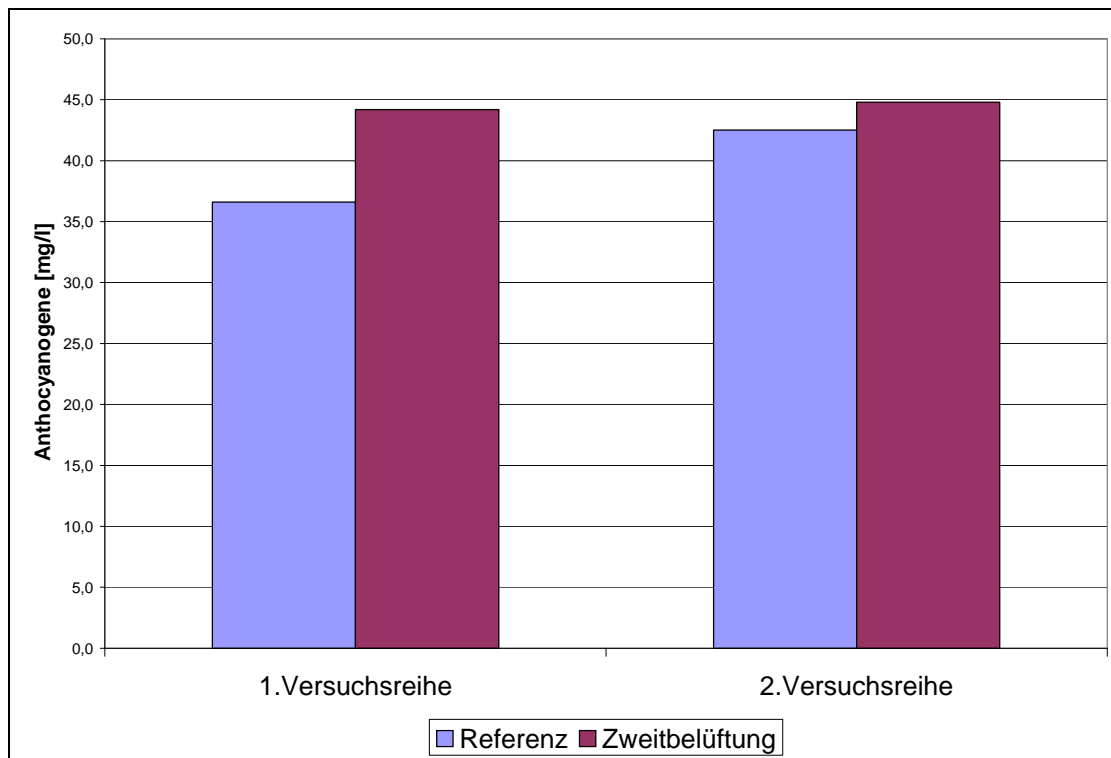


Abb.64: Einfluss der Zweitbelüftung auf den Anthocyanogehalt im Unfiltrat

Bei der zweiten Versuchsreihe waren es 42,5 mg/l beim Unfiltrat des Referenzbieres und 44,8 mg/l beim Unfiltrat des zweitbelüfteten Bieres.

Filtrat

Im Filtrat waren die Mittleren Nullstrompotentiale für Referenzbier und zweitbelüftetes Bier in der ersten Versuchsreihe nahezu gleich hoch (vgl. Abb.65)

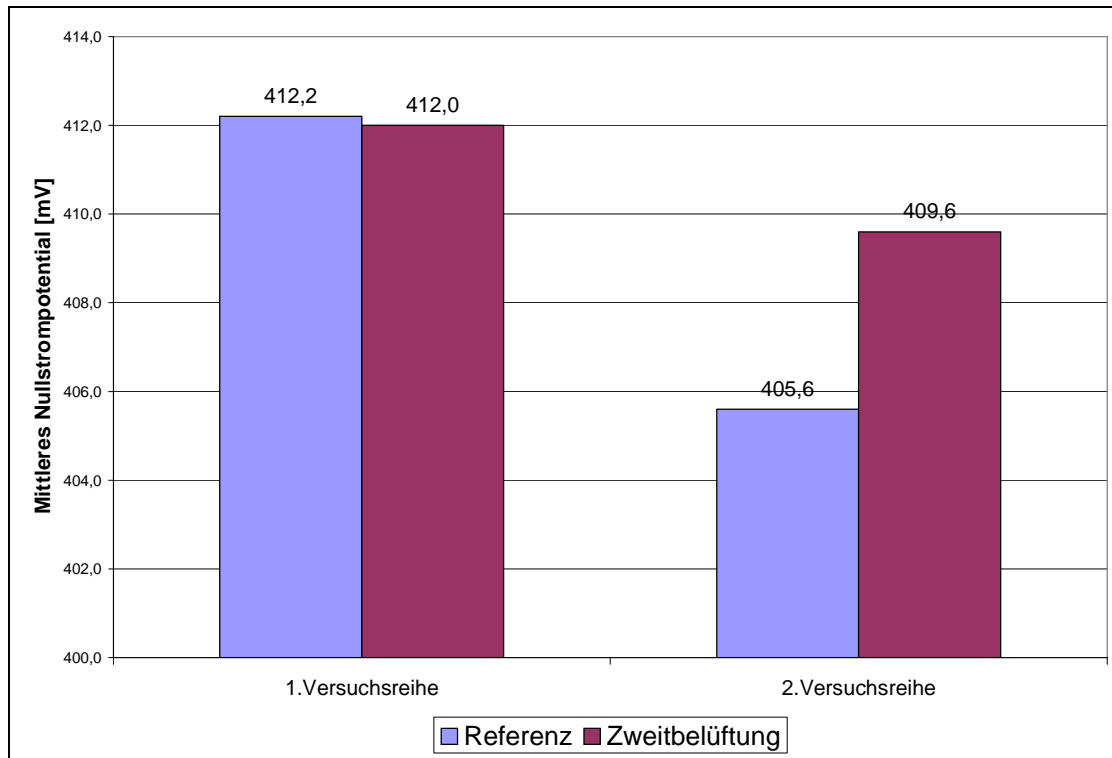


Abb.65: Einfluss der Zweitbelüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Filtrat

In der zweiten Versuchsreihe hingegen zeigte sich beim Filtrat des zweitbelüfteten Bieres ein erhöhtes Mittleres Nullstrompotential von 409,6 mV gegenüber 405,6 mV beim Referenzbier.

Die Reduktionskraft des filtrierten Referenzbieres gegenüber DCI innerhalb von 4 Minuten, ausgedrückt durch das Stromverhältnis, lag mit 0,85 etwas über der des filtrierten zweitbelüfteten Bieres mit 0,78 (vgl. Abb.66).

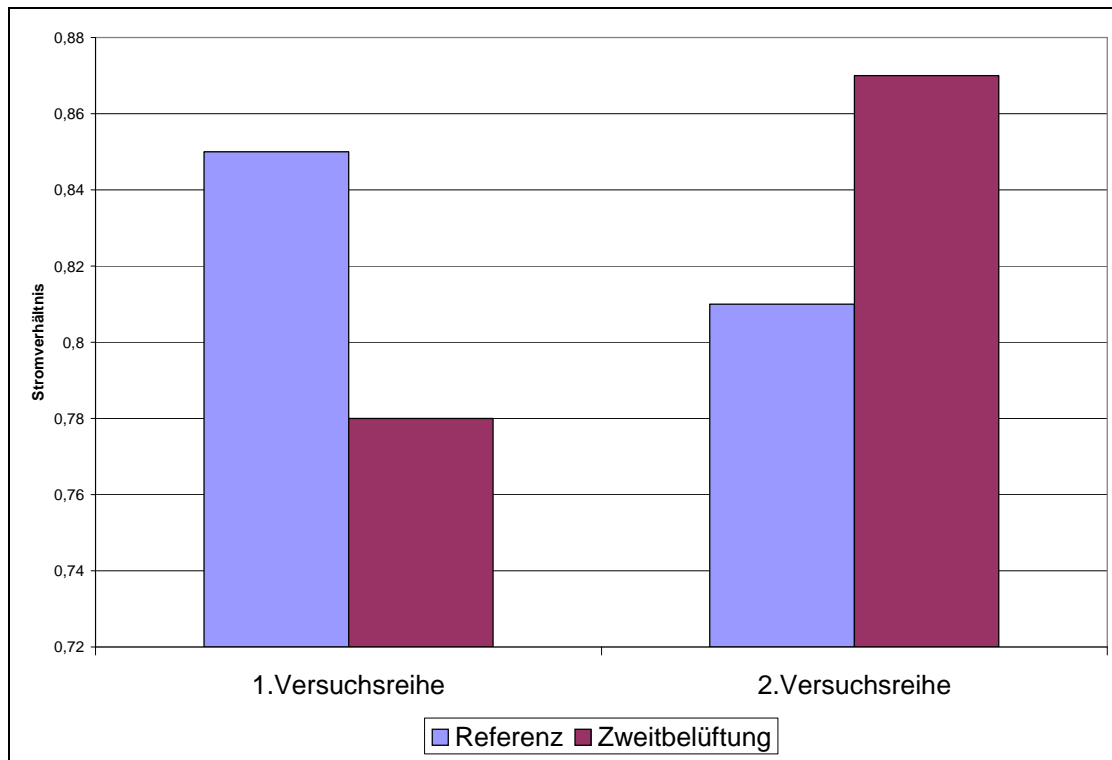


Abb.66: Einfluss der Zweitbelüftung auf das Stromverhältnis im Filtrat

In der zweiten Versuchsreihe dagegen lag die Reduktionskraft des filtrierten zweitbelüfteten Bieres mit einem Stromverhältnis von 0,87 etwas über der des Referenzbieres mit 0,81.

Bezüglich der verschiedenen Reduktonklassen zeigte sich bei den beiden filtrierten Proben kein Unterschied (vgl.Abb.67).

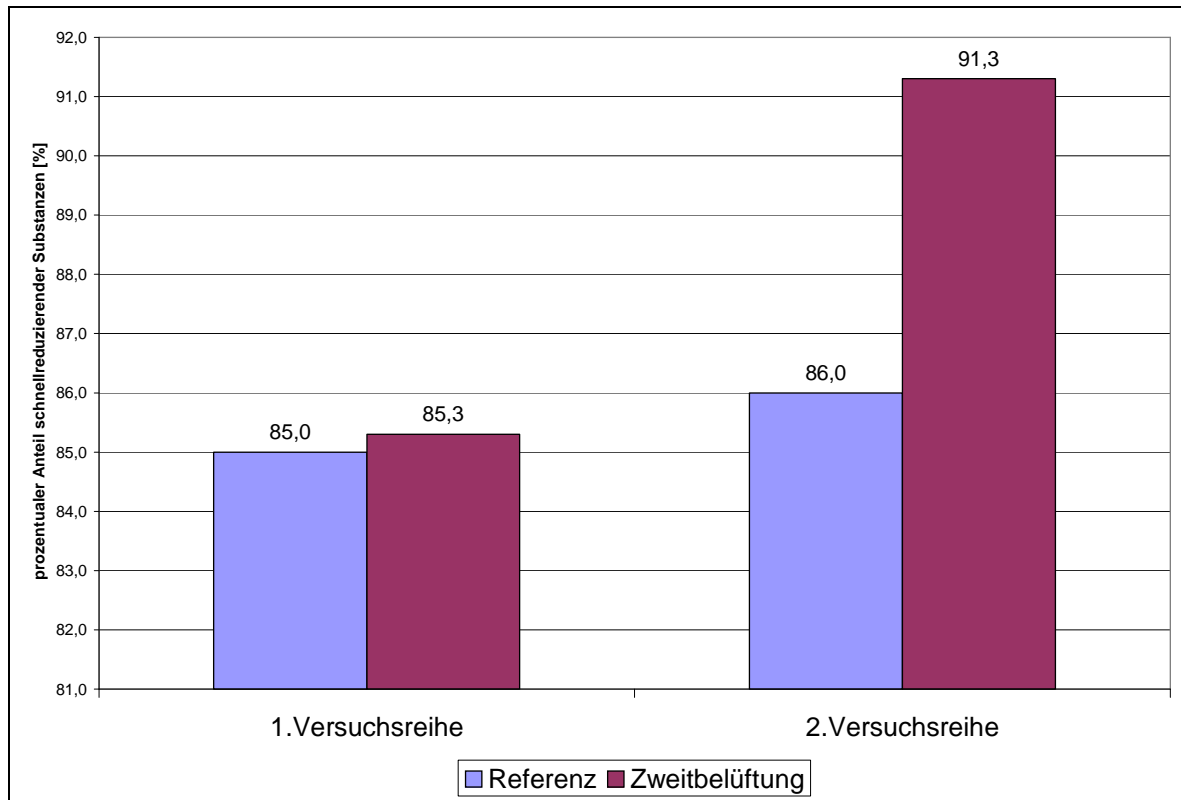


Abb.67: Einfluss der Zweibelüftung auf den prozentualen Anteil schnellreduzierender Substanzen im Filtrat

In der zweiten Versuchsreihe war der Anteil schnell reduzierender Substanzen im Filtrat des zweibelüfteten Bieres mit 91,1% gegenüber dem des Referenzbieres mit 86,0% deutlich erhöht.

In der ersten Versuchsreihe war die DPPH-reduzierende Aktivität des Filtrats des Referenzbieres mit 1,027 etwas höher als beim zweitbelüfteten Bier mit 1,020 (vgl. Abb.68).

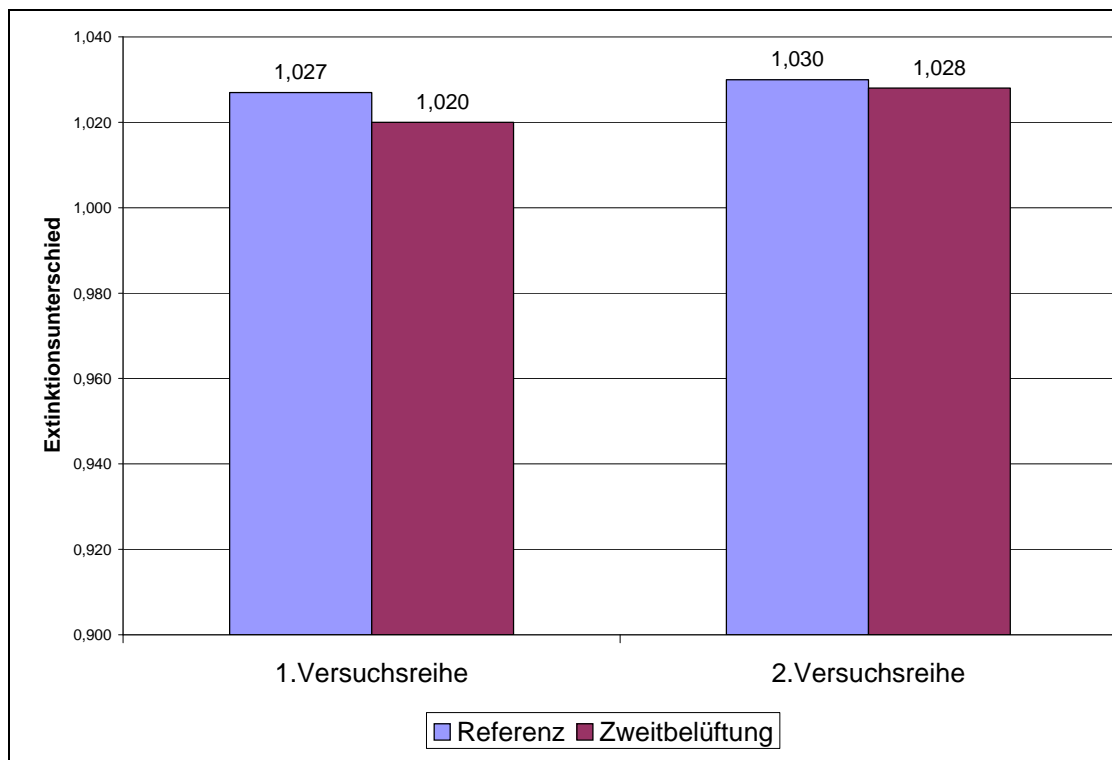


Abb.68: Einfluss der Zweitbelüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im Filtrat

In der zweiten Versuchsreihe unterschied sich die DPPH-reduzierende Aktivität zwischen dem Filtrat des Referenzbieres und des zweitbelüfteten Bieres kaum.

Im Referenzbier waren 208 mg/l Gesamtpolyphenole nachzuweisen. Das Filtrat des zweitbelüfteten Bieres hingegen lag mit 183 mg/l deutlich darunter (vgl. Abb.69).

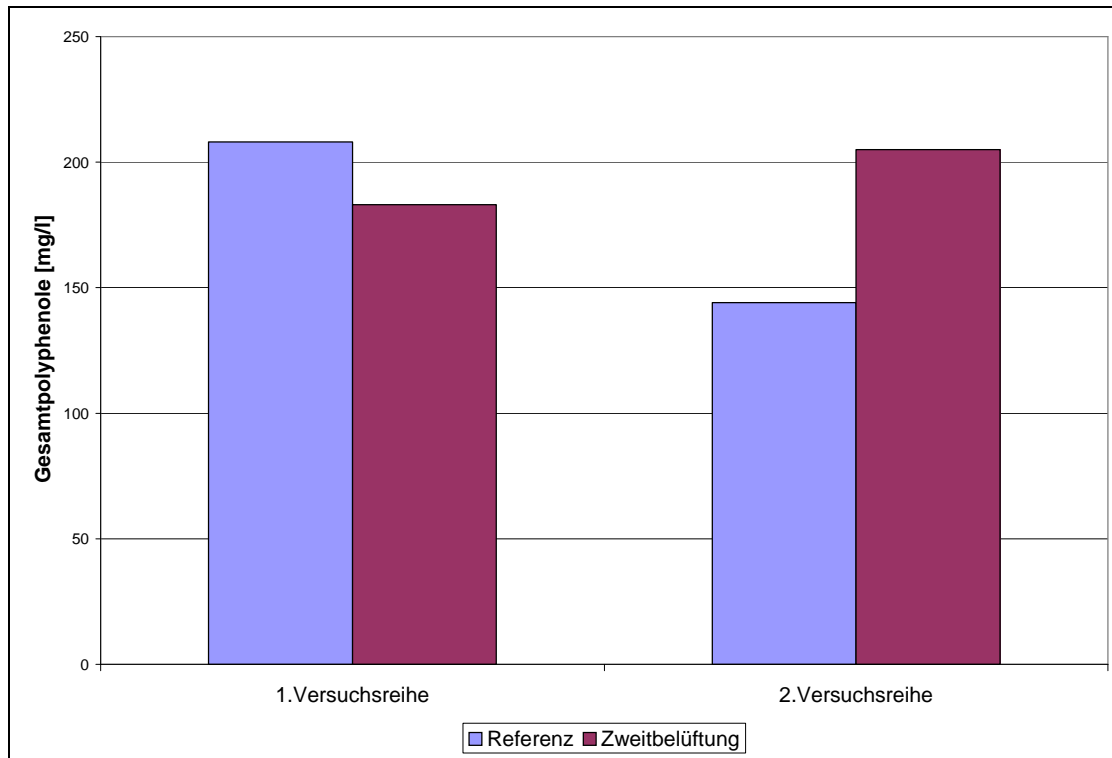


Abb.69: Einfluss der Zweitbelüftung auf den Gesamtpolyphenolgehalt im Filtrat

In der zweiten Versuchsreihe dagegen lag das Filtrat des zweitbelüfteten Bieres mit 205 mg/l deutlich höher als beim Filtrat des Referenzbieres mit 144 mg/l.

Das filtrierte zweitbelüftete Bier hat einen etwas erhöhten Anthocyanogehalt von 43,6 mg/l gegenüber 37,8mg/l beim Filtrat des Referenzbieres (Abb.70).

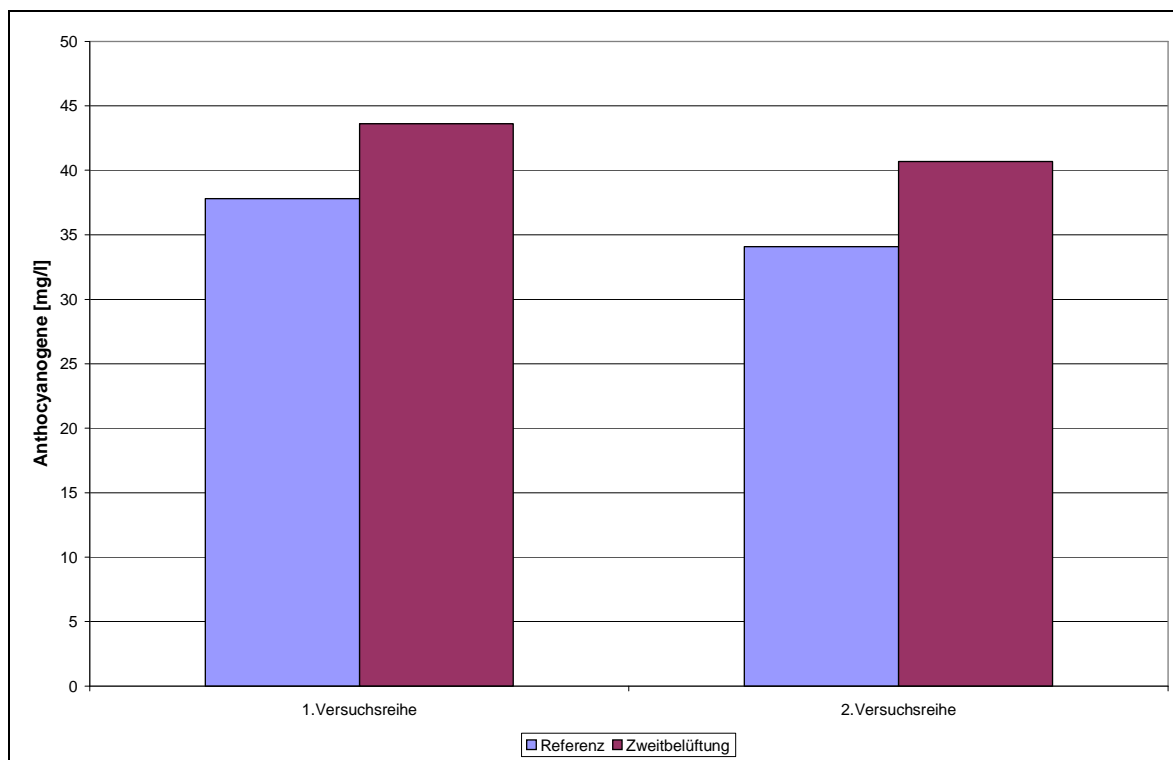


Abb.70: Einfluss der Zweitbelüftung auf den Anthocyanogengehalt im Filtrat

In der zweiten Versuchsreihe herrschten ähnliche Verhältnisse vor: 40,7mg/l Anthocyanogene im filtrierten zweitbelüfteten Bier, dagegen 34,1mg/l im Filtrat des Referenzbieres.

Es ist von hohem Interesse, wie sich die elektrochemischen Werte während der Gärung, Lagerung und Filtration verändern.

Deshalb wird im folgenden die Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials, der elektrochemisch bestimmten Reduktionskraft, des prozentualen Anteils schnellreduzierender Substanzen, des Gesamtpolyphenolgehaltes, des Gehaltes an Anthocyanogenen und der DPPH-reduzierenden Aktivität aufgezeigt.

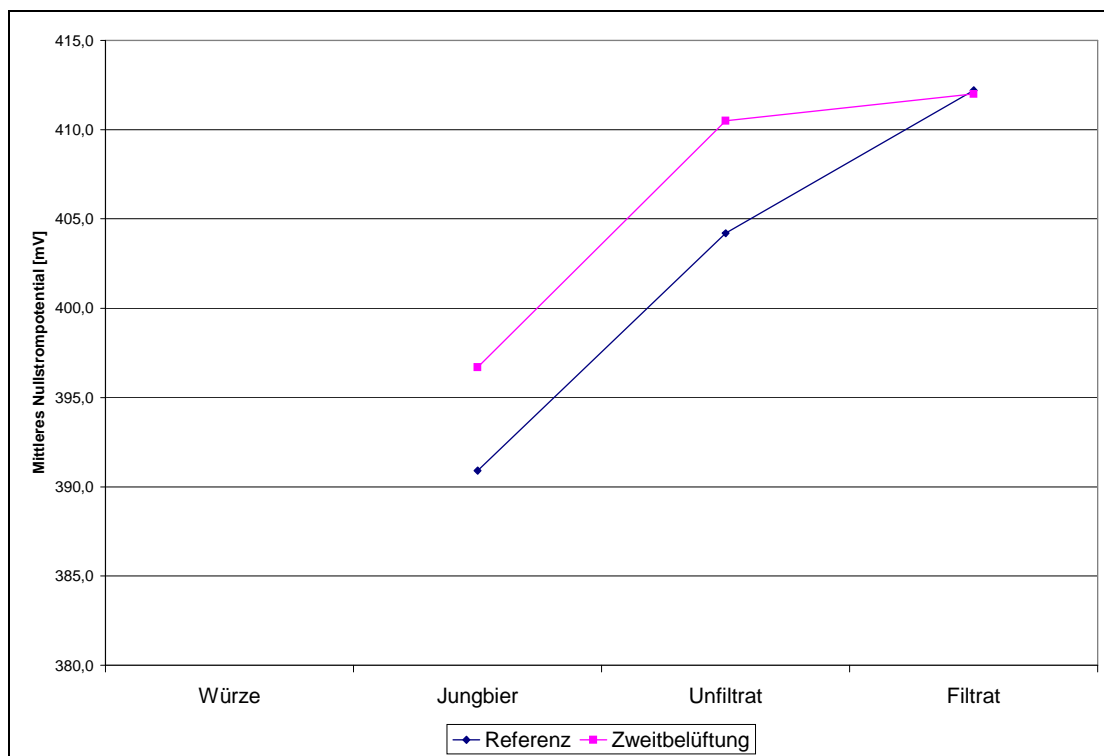


Abb.71: Verhalten des Mittleren Nullstrompotentials bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 1

Ein reproduzierbares Mittleres Nullstrompotential konnte in der Würze nicht bestimmt werden, da unterschiedliche Mengen an Sauerstoff gelöst waren.

Es wurde deutlich, dass das zweitbelüftete Bier in allen Stadien der Bierbereitung ein höheres Nullstrompotential aufwies (vgl Abb.71 und 72).

Das niedrigste Nullstrompotential weist das Bier stets nach der Hauptgärung auf. Die Lagerung bracht einen deutlichen Anstieg, ähnlich wie die Filtration, die in unserem Fall in der ersten Versuchsreihe eine Nivellierung der Potentiale zwischen Referenzbier und Bier aus Zweitbelüftung bewirkte.

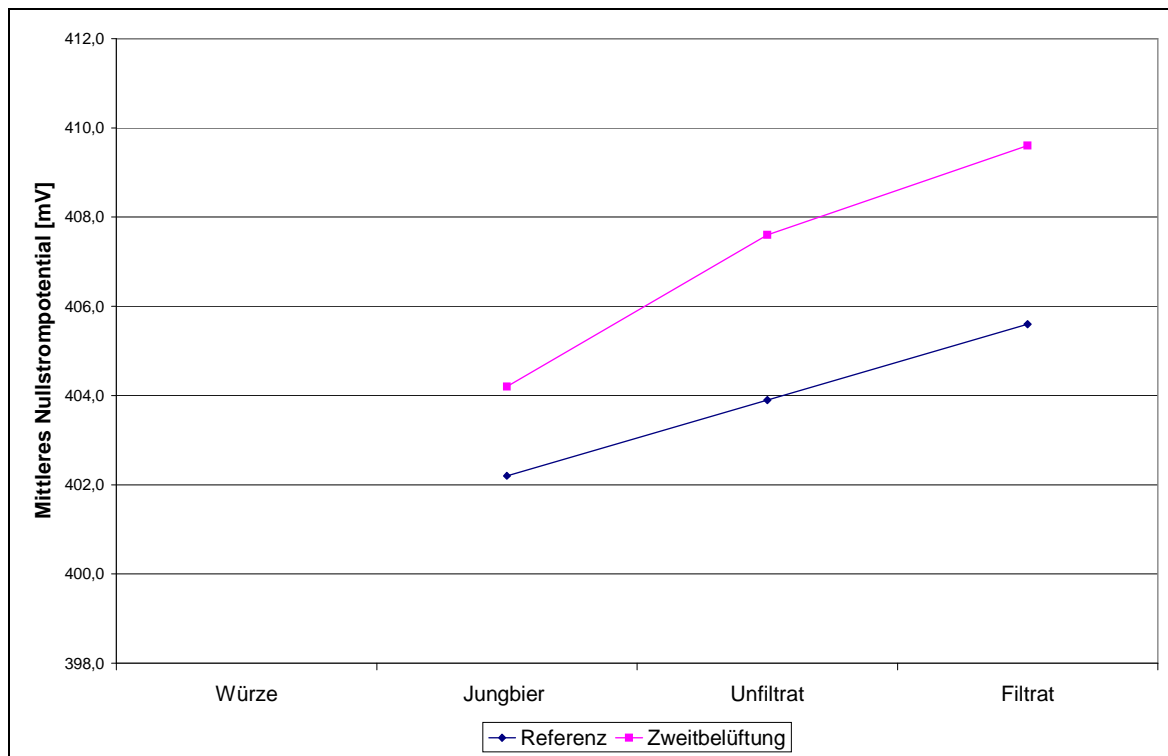


Abb.72: Verhalten des Mittleren Nullstrompotentials bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 2

Das Stromverhältnis, das die Reduktionskraft nach 4 Minuten ausdrückt, fiel in der ersten Versuchsreihe sowohl bei Referenz-, als auch bei dem zweitbelüfteten Bier während der Hauptgärung deutlich ab (vgl. Abb.73). In der zweiten Versuchsreihe hingegen war ein Anstieg zu verzeichnen (vgl. Abb.74).

Die Lagerung führte stets zu einem deutlichen Abfall der Reduktionskraft.

Ähnlich wie beim Nullstrompotential wurden durch die Filtration die Unterschiede in der Reduktionskraft zwischen Referenzbier und Bier aus zweitbelüfteter Würze geringer und hier im Falle der ersten Versuchsreihe fast aufgehoben.

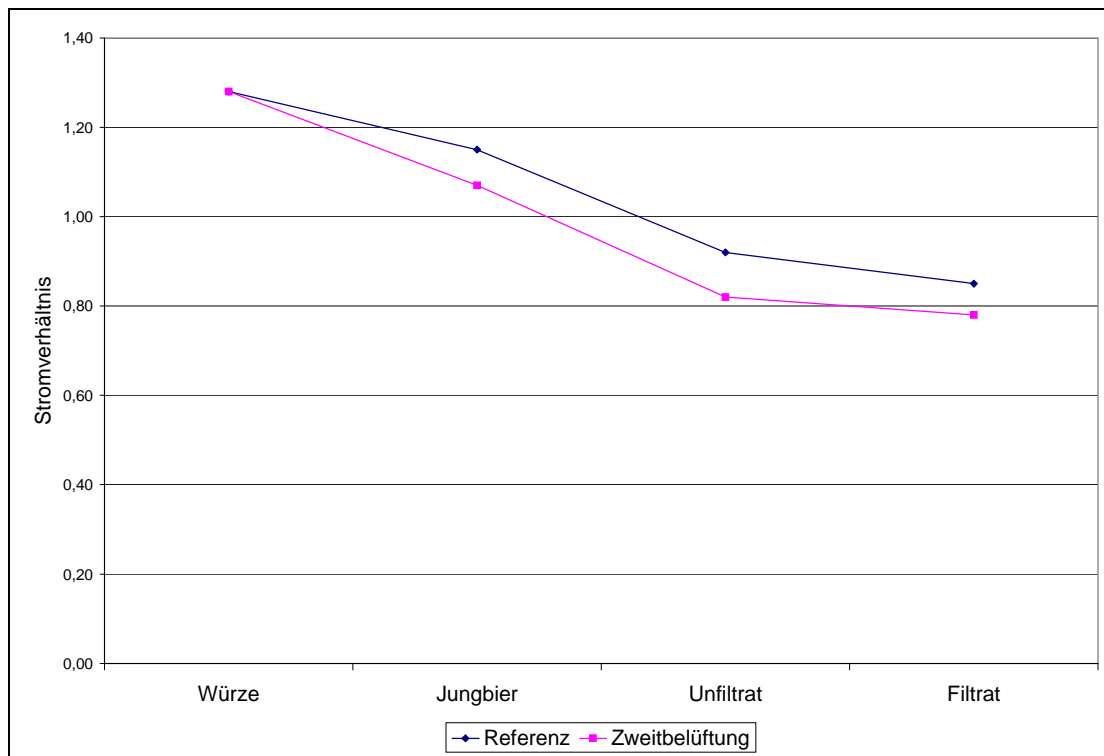


Abb.73: Verhalten des Stromverhältnisses bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 1

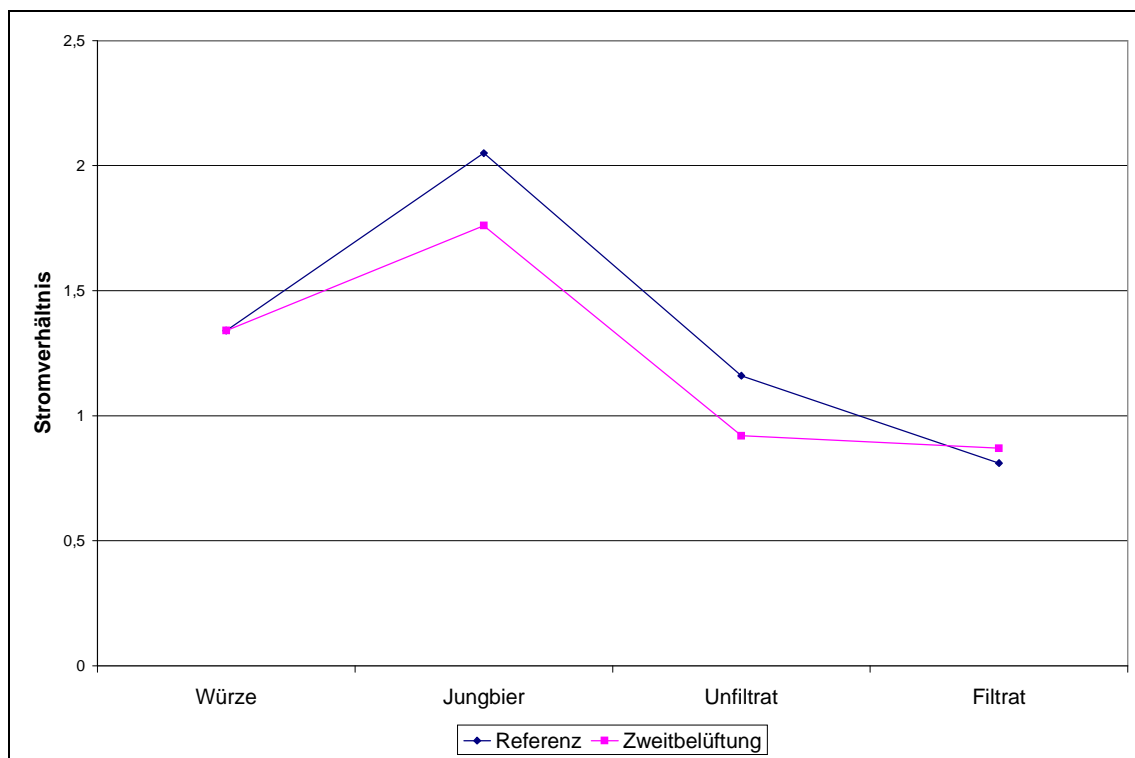


Abb.74: Verhalten des Stromverhältnisses bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 2

In der ersten Versuchsreihe war der Anteil schnellreduzierender Reduktone nach der Hauptgärung am höchsten (vgl. Abb. 75).

Durch die Hauptgärung stieg dieser Anteil also deutlich an.

Während Lagerung und Filtration nahm dieser Anteil deutlich ab.

Bemerkenswert ist, dass der Anteil schnellreduzierender Reduktonen in allen Phasen im Referenzbier deutlich höher liegt als beim Bier aus Zweitbelüftung.

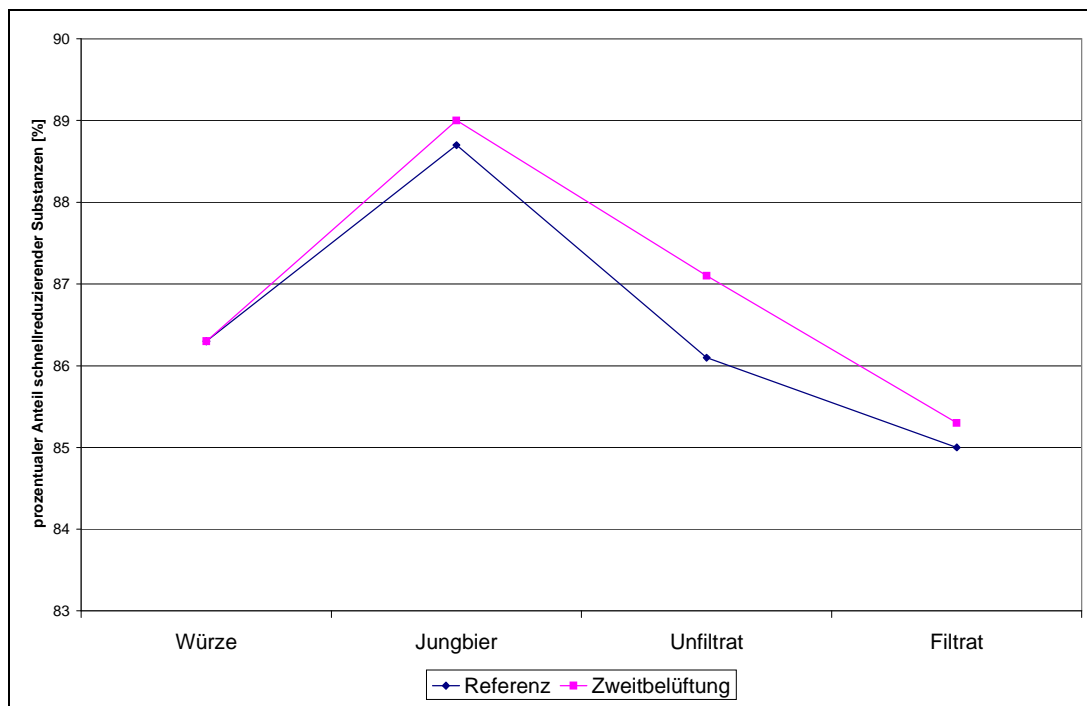


Abb.75: Verhalten des Anteils schnellreduzierender Substanzen bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 1

In der zweiten Versuchsreihe war hingegen ein Anstieg des prozentualen Anteils der schnellreduzierenden Substanzen während der Lagerung zu beobachten (vgl. Abb. 76).

Bei der Filtration nahm auch hier dieser Anteil ab. Wobei diese Abnahme beim Referenzbier deutlicher ausfiel, als beim Bier aus Zweitbelüftung.

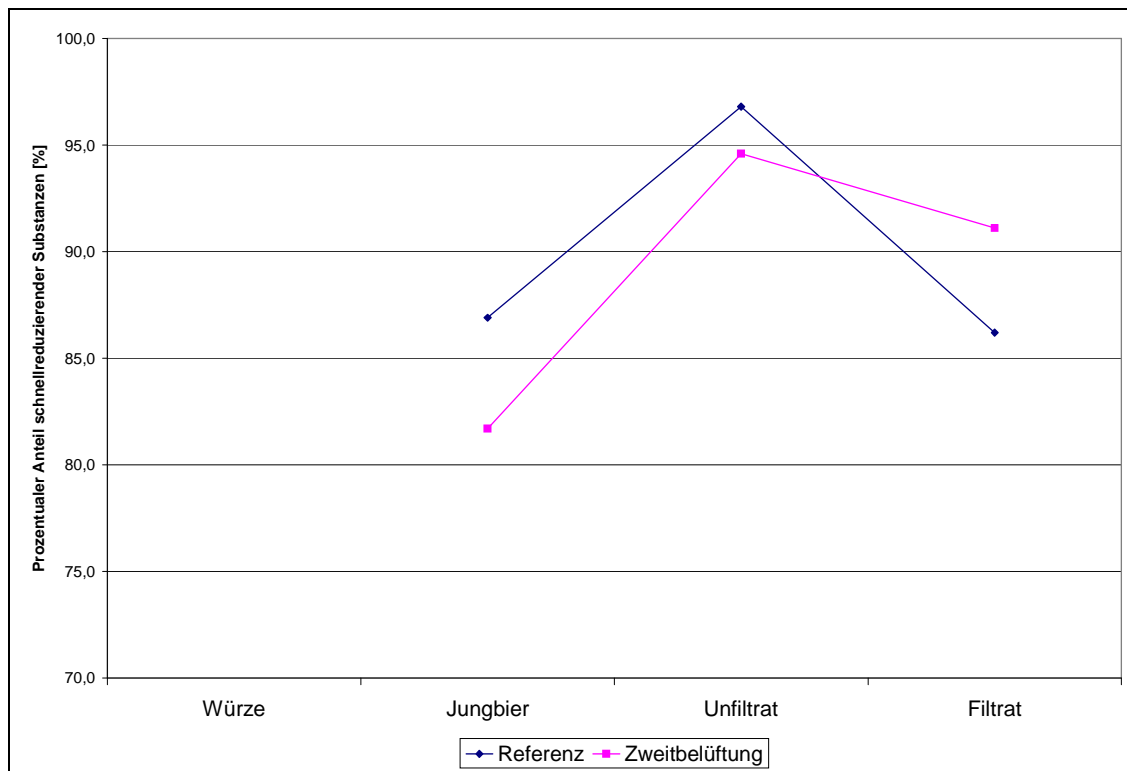


Abb.76: Verhalten des Anteils schnellreduzierender Substanzen bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 2

In der ersten, wie zweiten Versuchsreihe war die deutlichste Abnahme der Gesamtpolyphenole während der Hauptgärung zu verzeichnen (vgl. Abb.77 und 78).

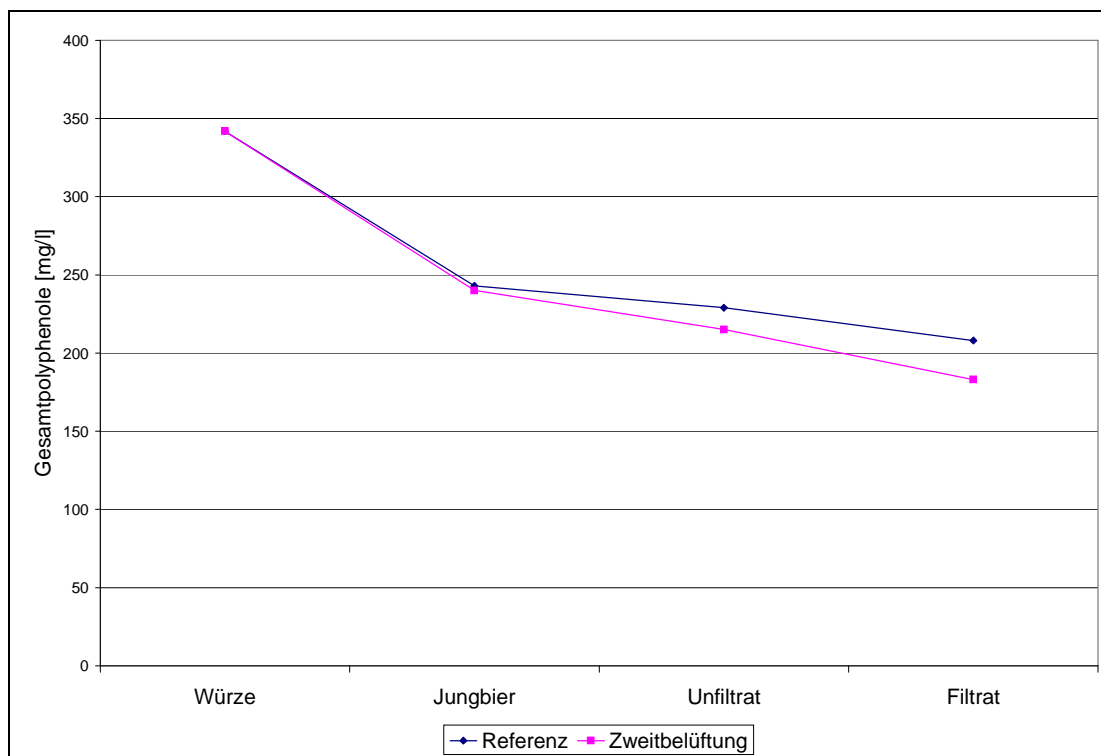


Abb.77: Verhalten der Gesamtpolyphenole bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 1

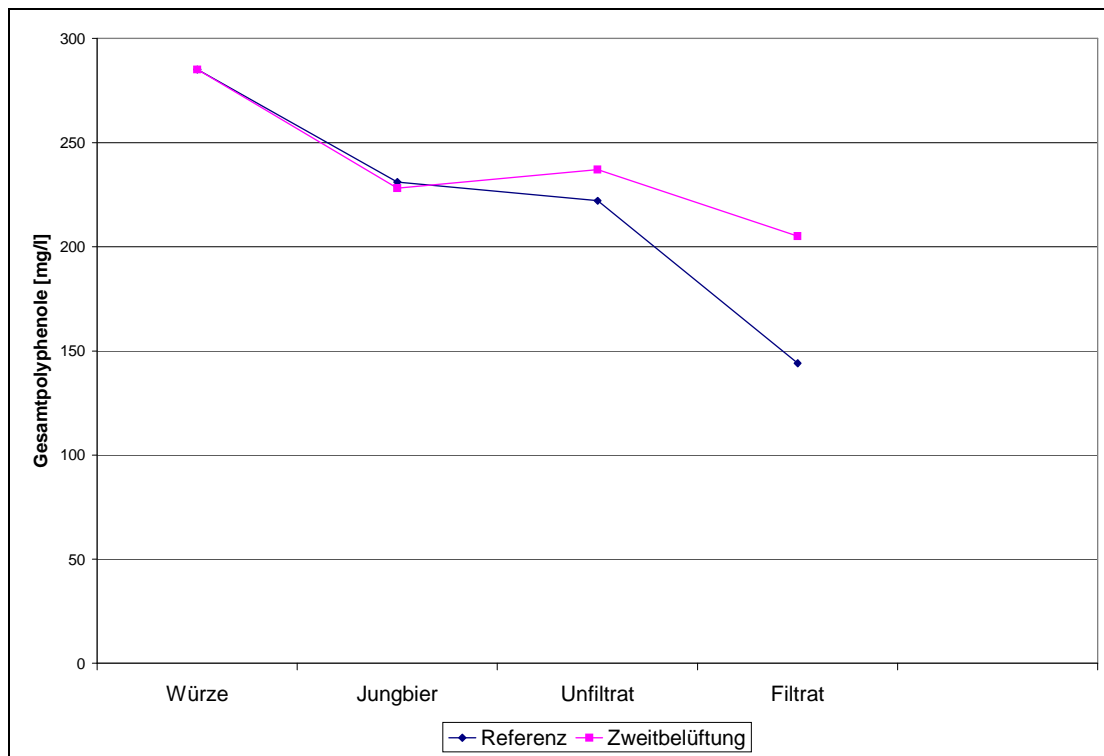


Abb.78: Verhalten der Gesamtpolyphenole bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 2

In der zweiten Versuchsreihe hingegen war eine deutlichere Abnahme der Gesamtpolyphenole bei der Filtration zu beobachten (vgl.Abb.78).

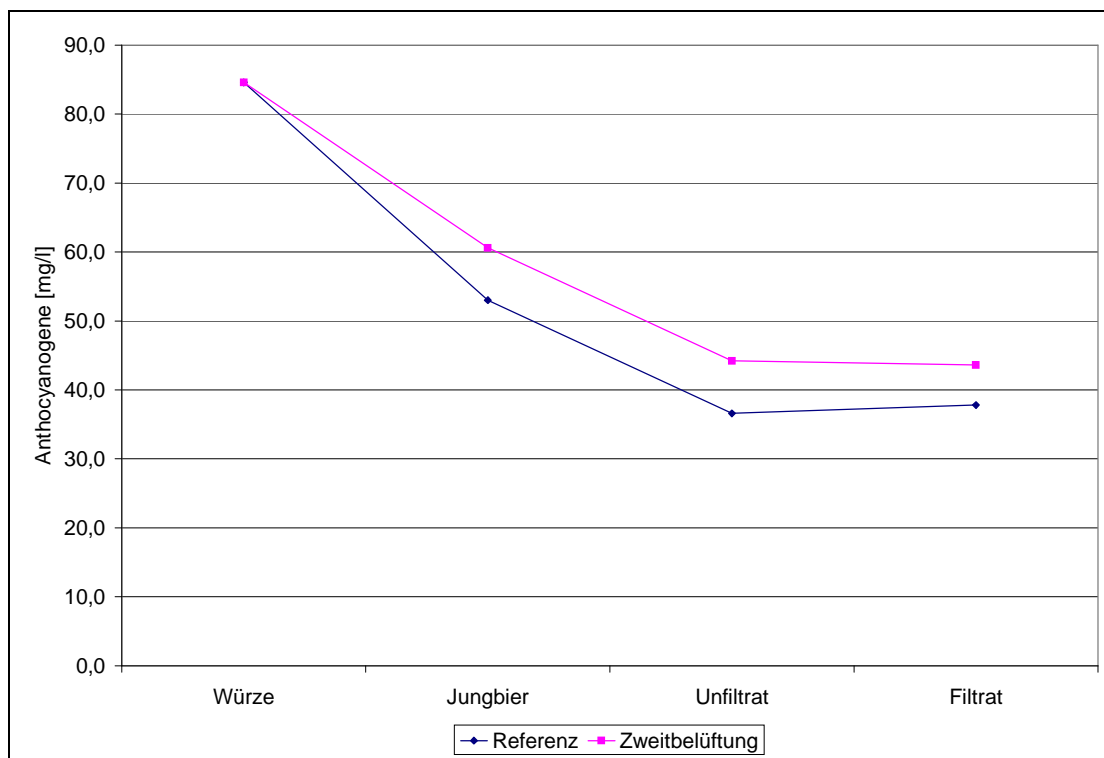


Abb.79: Verhalten der Anthocyanogene bei Zweitbelüftung, Versuchsreihe 1

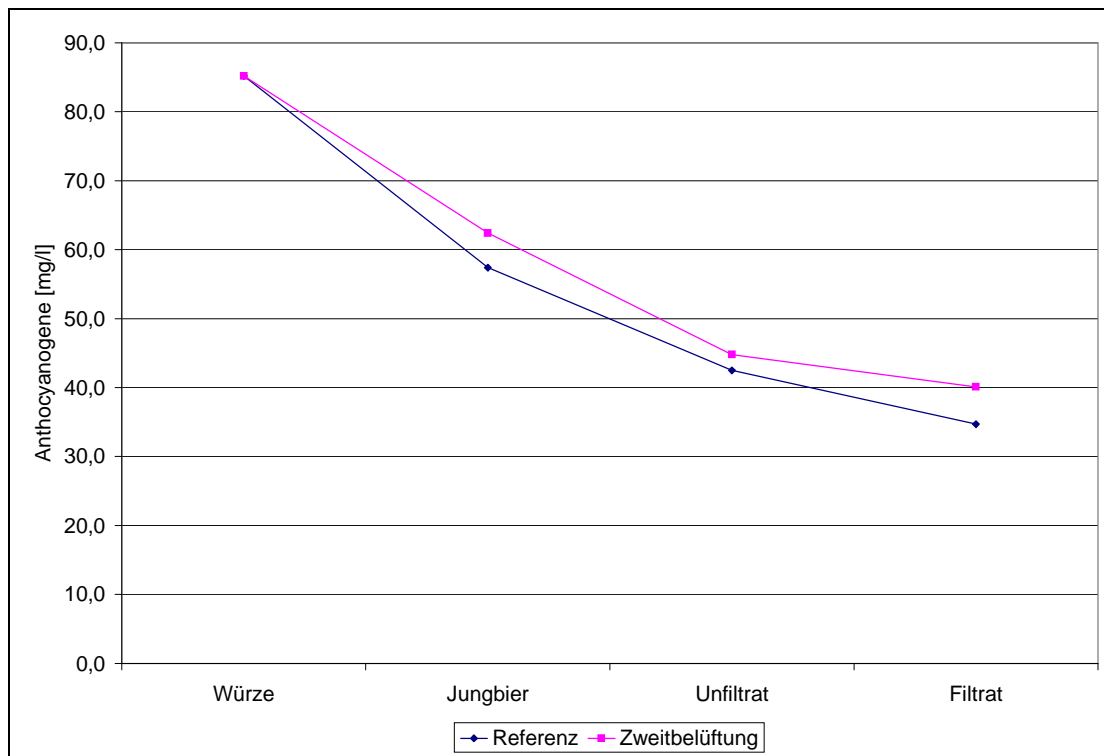


Abb.80: Verhalten der Anthocyanogene bei Zweitbelüftung, Versuchreihe 2

In beiden Versuchsreihen nahmen die Anthocyanogene während der Gärung und Lagerung um gut 50 Prozent ab (vgl. Abb 79 und 80).

Interessanterweise war der Gehalt an Anthocyanogenen in allen Phasen beim Bier aus Zweitbelüftung deutlich etwas höher als beim Referenzbier.

Wie bei den Gesamtpolyphenolen auch, war in der zweiten Versuchsreihe bei der Filtration eine deutliche Abnahme zu beobachten.

Die DPPH-reduzierende Aktivität stieg in beiden Versuchsreihen beim konventionell belüfteten Bier bei der Hauptgärung deutlich an.(vgl.Abb.81 und 82)

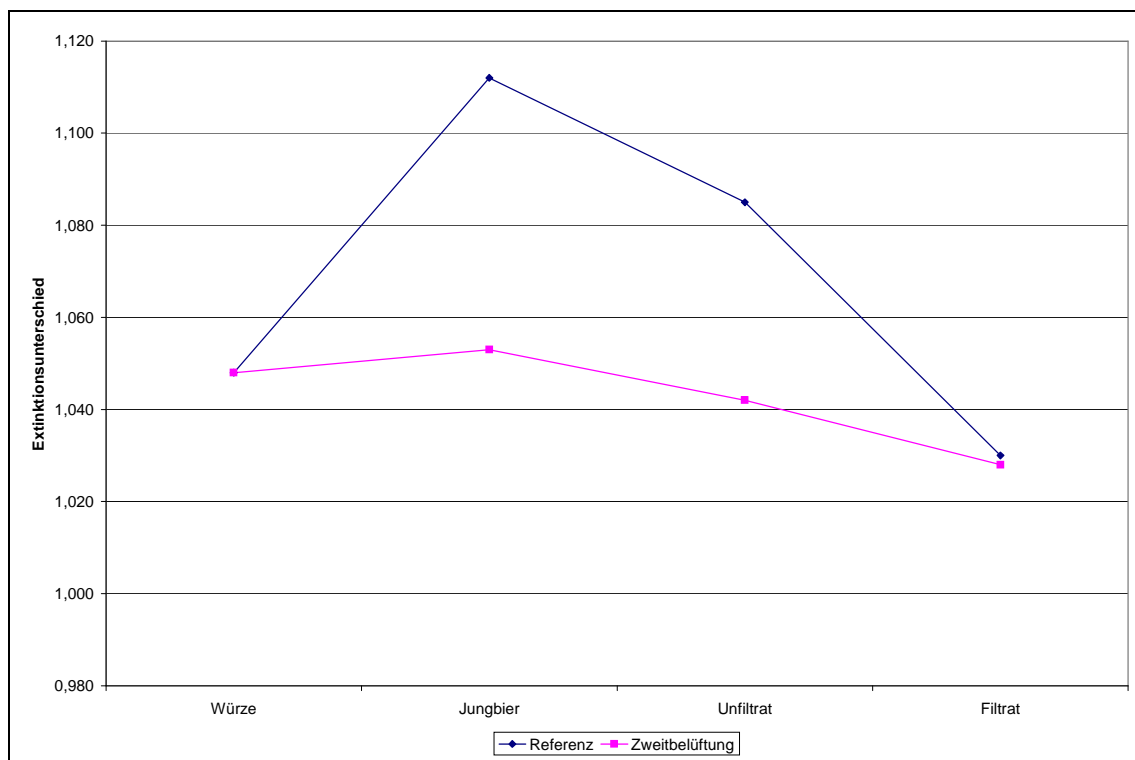


Abb.81: Verhalten der DPPH-reduzierenden Aktivität bei Zweitbelüftung, Versuchssreihe 1

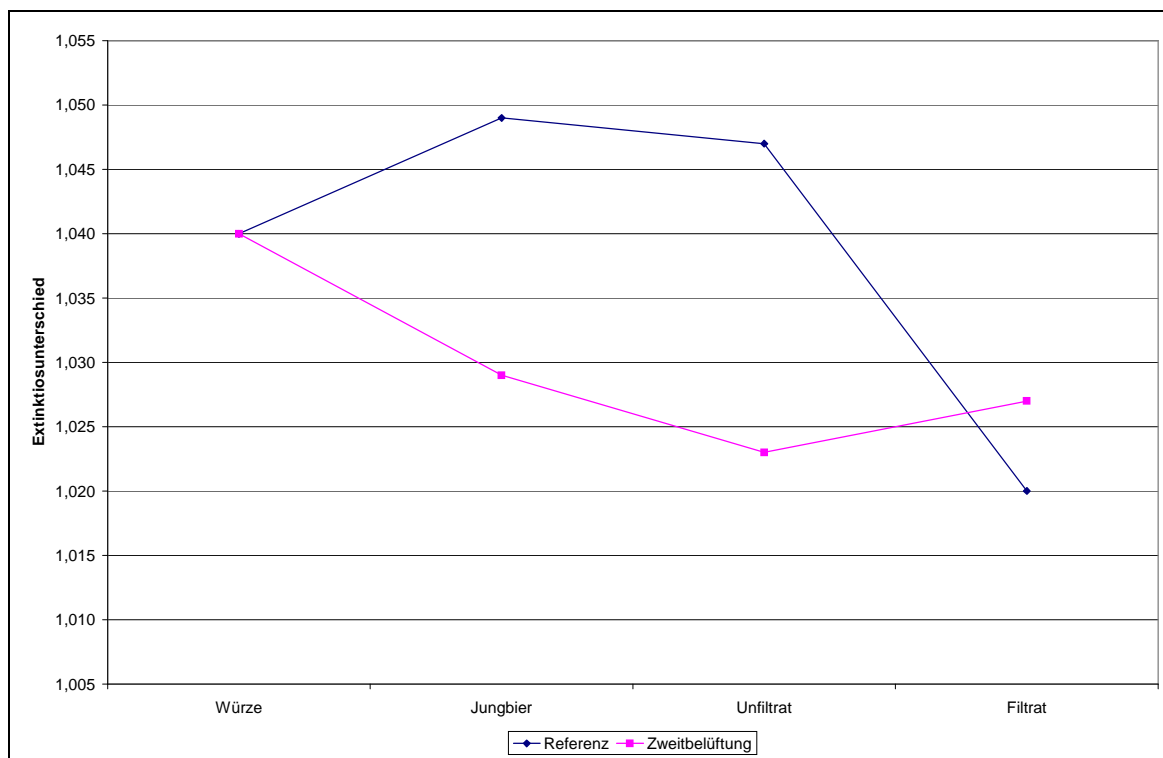


Abb.82: Verhalten der DPPH-reduzierenden Aktivität bei Zweitbelüftung, Versuchssreihe 2

Beim Bier aus Zweitbelüftung hingegen war dieser Anstieg während der Gärung nicht zu beobachten, in der zweiten Versuchsreihe war sogar ein Rückgang zu verzeichnen.

Die Lagerung senkte in allen Fällen die antiradikalische Aktivität.

Diese Aktivität litt auch unter der Filtration.

Wie auch die intensive Belüftung brachte die Zweitbelüftung eine oxidative Schädigung des Substrats mit sich. Auch hier lag die Steigerung des Mittleren Nullstrompotentials in der selben Größenordnung wie bei intensiver Belüftung. Demnach ist die oxidative Schädigung des Bieres etwa vergleichbar mit der bei einer Belastung von etwa 1 mg/l im Drucktank, was die Erhöhung des Mittleren Nullstrompotentials betrifft. Aber auch an den anderen Werten wird der Einfluss der Zweitbelüftung deutlich: Das Stromverhältnis sinkt. Es werden also Reduktone oxidiert. Diese oxidierende Wirkung der Zweitbelüftung wurde schon einmal mittels photometrischen ITT von Thum nachgewiesen¹. Die relative Zusammensetzung nach einzelnen Reduktonklassen ändert sich kaum. Die Zweitbelüftung hat demnach eine oxidierende Wirkung auf alle Reduktonklassen. An der Aufnahme des bei der Zweitbelüftung eingebrachten Sauerstoffes sind also schnell-, mittelschnell- und langsamreduzierende Substanzen entsprechend ihren Anteilen gleichermaßen beteiligt. Hier fällt ein deutlicher Unterschied zur Sauerstoffbelastung im abgefüllten Bier auf: Dort konnten wir nachweisen, dass vor allem die schnellreduzierenden DCI-Substrate abnahmen. Es zeigt sich also auch hier wieder, dass das Verhalten der einzelnen Reduktonklassen sehr stark vom Zeitpunkt der Sauerstoffbelastung abhängig ist.

Auch andere Untersuchungen konnten deutliche Wirkungen der Zweitbelüftung oder des Drauflassverfahrens auf das Bier nachweisen. Entscheidend war auch hier, wann und wieviel belüftet wurde.² Auch wenn dort die Hauptrolle bei der antioxidativen Aktivität dem Schwefeldioxid zugeschrieben wurde, so waren doch ähnliche Tendenzen wie in dieser Arbeit erkennbar, nämlich dass ein Verzicht auf unnötige Belüftung die antioxidativen Eigenschaften des Bieres verbessert.

Ursache für die relativ starke oxidative Wirkung der Zweitbelüftung ist, ähnlich wie bei der Flotation, die relativ lange Zeit, in der der Sauerstoff im Substrat verbleibt. Anders als bei der ursprünglichen Belüftung hat hier die Hefe schon auf Gärung umgestellt. Während der Sauerstoff der ursprünglichen Belüftung innerhalb weniger Stunden veratmet wird, stellt die Hefe ihren Stoffwechsel auf Gärung, also anaerobe Verhältnisse um.

¹ Thum, B., "Modellversuche zur Bildung von Carbonylen", Dissertation, TU-München-Weihenstephan 1997

² Forster, C., Back, W., "Pitching and Filling Procedures of Cylindro-Conical Fermentation Tanks and its Influence on the Anti-Oxidative Activity of beer", MBAA Quartely, 37, 2000, S. 59-64

Die Aktivität von Schlüsselenzymen der Gärung wie der Alkoholdehydrogenase steigt an, während die Aktivität der an der Atmungskette beteiligten Enzyme deutlich nachlässt. Wird dann in das gärende Substrat über die Zweitbelüftung Sauerstoff eingebracht, wird dieser nicht so schnell veratmet, sondern verbleibt länger im Substrat und oxidiert dort Substanzen. Eine deutlicher Hinweis, dass tatsächlich die Unterschiede zwischen konventionell und zweitbelüfteten Bier nicht nur durch physiologische Unterschiede bei der Hefe bedingt sind, sondern durch eine oxidative Schädigung des Substrates durch den Sauerstoff ist der Rückgang der Gesamtpolyphenole bei dieser Technologie (vgl. Abb.76,77).

4.3.3 Verzicht auf Belüftung

Aufgrund der Erfahrungen die mit Zweitbelüftung und intensiver Belüftung gemacht wurden, stellte sich die Frage, inwieweit auch die gewöhnliche Belüftung eine oxidative Schädigung des Substrates hervorruft. Andererseits wurde im Rahmen einer Diplomarbeit überprüft, ob ein völliger Verzicht auf die Würzebelüftung nicht auch Nachteile mit sich bringt¹.

Insgesamt wurden drei Versuchsreihen durchgeführt.

In der ersten Versuchsreihe wurde eine großtechnisch hergestellte Würze nach dem Würzekühler in mit Kohlendioxid vorgespülte Keg-Fässer entnommen, um eine unkontrollierte Sauerstoffaufnahme zu verhindern. Für die beiden Gärungen, bei denen völlig auf Belüftung verzichtet wurde, wurde diese Würze mittels Stickstoffbegasung im Propagator auf einen Sauerstoffgehalt deutlich unter 0,1 mg/l gebracht und anschließend in die mit Kohlensäure vorgespülten Tanks umgedrückt.

Die Würze für den konventionell belüfteten Ansatz wurde direkt aus den Kegs in den Gärtank umgedrückt.

Insgesamt worden drei Gärtanks angestellt:

- a) unbelüftete Würze mit Propagatorhefe
- b) unbelüftete Würze mit Erntehefe
- c) belüftete Würze mit Erntehefe

Die Propagatorhefe wurde im Pilot-Propagator bei 16°C und einer kontinuierlichen Belüftung auf 2 mg/l hergeführt.

Beim belüfteten Ansatz wurde 10 Minuten bei einem Gegendruck von 0,5 bar belüftet.

Angestellt wurde mit 6°C, die Temperatur der Hauptgärung betrug 10°C.

In einem weiteren Gärtank wurde das übriggebliebene Propagat unter den selben Bedingungen weitergeführt, wie die übrigen Tanks.

¹ Wittek, D., Diplomarbeit, Technische Universität München, 2002

Jungbier

Die mit Erntehefe angestellten Versuche hatten das niedrigste Nullstrompotential.

Die Werte waren etwa gleich niedrig: 403,9 mV für die Gärung ohne Belüftung und 404,9 mV für die Gärung mit konventioneller Belüftung (vgl.Abb.83).

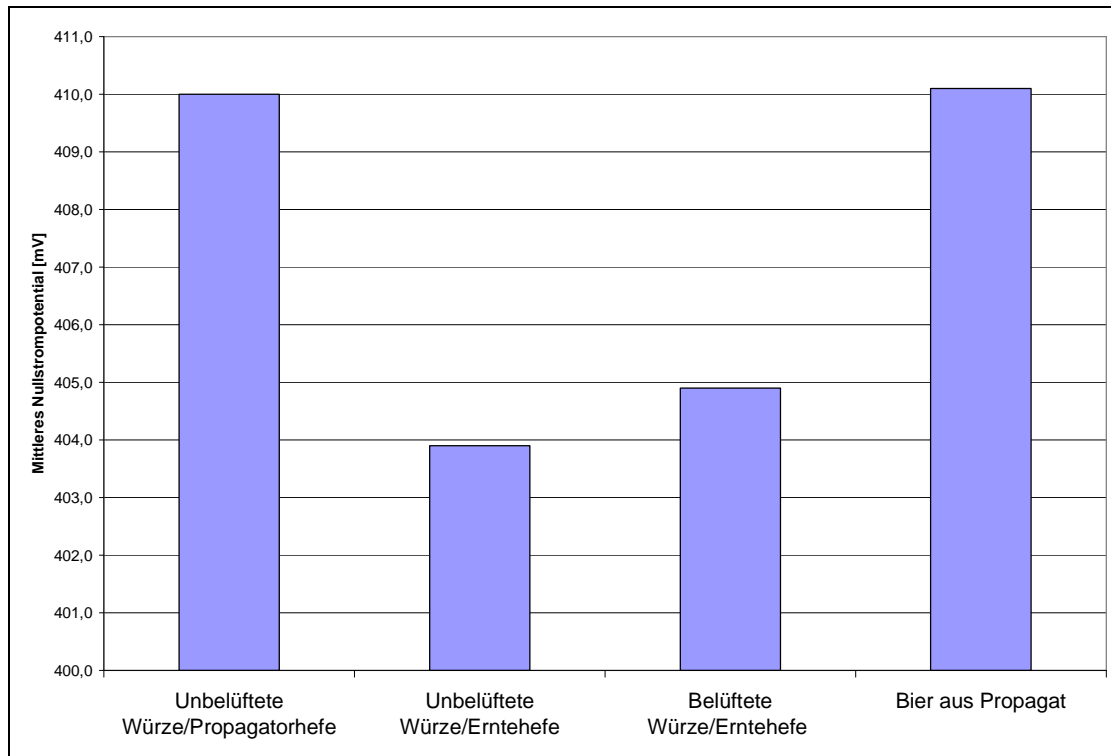


Abb.83: Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Jungbier

Das aus der unbelüfteten Würze mit Propagatorhefe hergestellte Jungbier wies ein mittleres Nullstrompotential von 410,0 mV auf. Bei dem im Gärtank weitergeführten Propagat war das Mittlere Nullstrompotential mit 410,1 mV etwa gleich hoch (vgl.Abb.83).

Im Jungbier war die Reduktionskraft bei der unbelüfteten Würze mit Erntehefe mit 2,22 am höchsten. Die Werte für den belüfteten Ansatz mit Erntehefe und unbelüfteten Ansatz mit Propagatorhefe lagen mit 2,13 bzw. 2,15 knapp darunter, jedoch in der selben Größenordnung (vgl.Abb.84).

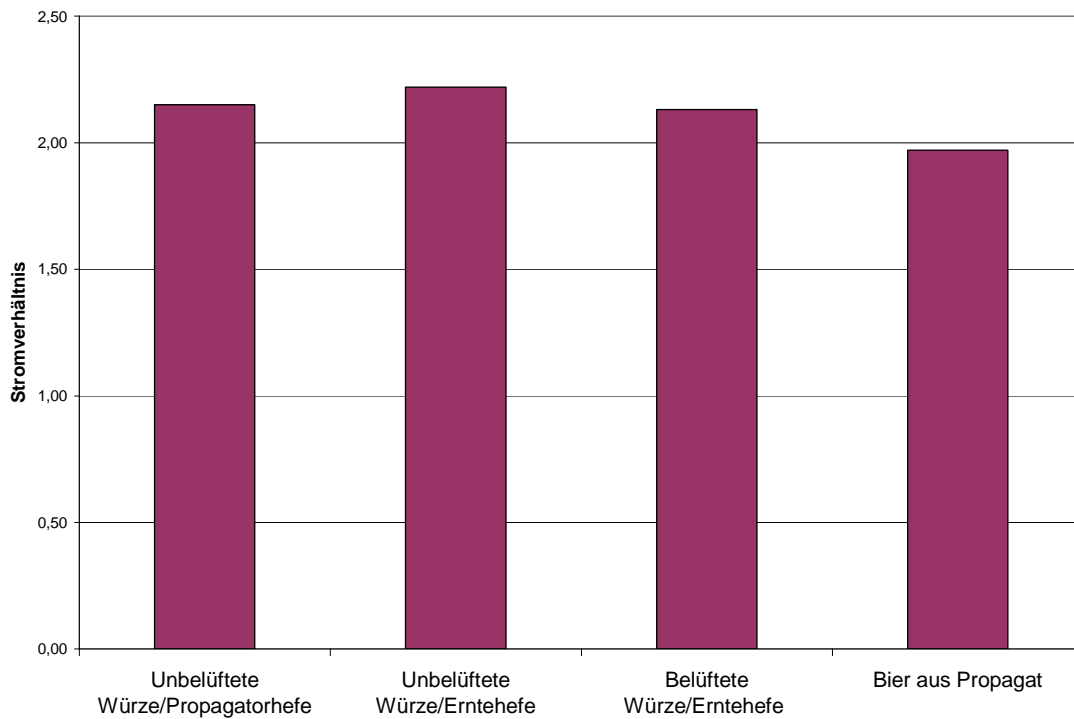


Abb.84: Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Jungbier

Ausschliesslich der Ansatz aus dem Propagatorbier hatte mit einem Stromverhältnis von 1,97 eine deutlich geringere Reduktionskraft.

Tab.4: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Jungbier (Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe)

	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]
Unbelüftete Würze/ Propagatorhefe	201	65
Unbelüftete Würze/ Erntehefe	197	55
Belüftete Würze/ Erntehefe	198	52
Bier aus Propagat	203	65

Im Jungbier war kein Unterschied bei den Gesamtpolyphenolen festzustellen (vgl.Tab.4).

Den höchsten Gehalt an Anthocyanogenen hatte das Propagatorbier mit 65 mg/l. Ebenso hoch war der Anteil beim Bier aus entgaster Würze mit Propagatorhefe (vgl.Tab.4)

Bei den mit Erntehefe angestellten Ansätzen betrug der Anthocyanogengehalt 55 mg/l bei der Verwendung entgaster Würze und 52 mg/l bei konventioneller Belüftung.

Unfiltrat

Auch im Unfiltrat wurde bei den Gärungen mit Erntehefe das niedrigste Mittlere Nullstrompotential erreicht. Bei dem aus unbelüfteter Würze mit Erntehefe hergestellten Bier waren es 408,6 mV und beim belüfteten Ansatz und 407,1 mV beim unbelüfteten (vgl.Abb.85)

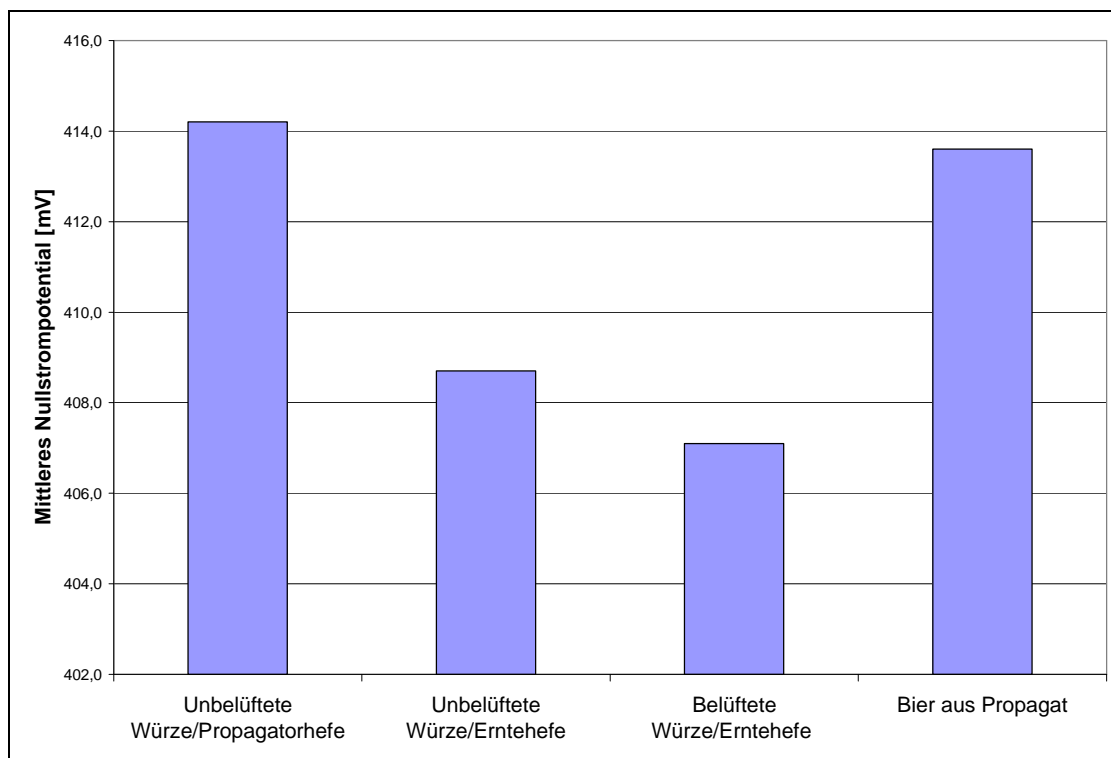


Abb.85: Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Unfiltrat

Wie auch beim Schlauchbier war das Mittlere Nullstrompotential der beiden anderen Ansätze erhöht:

Beim unbelüfteten Ansatz mit Propagatorhefe 414,2 mV und beim weitergeführten Propagat 413,6 mV.

Beim Stromverhältnis waren die Werte für die mit Erntehefe hergestellten Biere im Unfiltrat hoch. Von diesen wurde beim belüfteten Ansatz ein Stromverhältnis von 2,27 ermittelt, beim unbelüfteten 2,16 (vgl. Abb.86).

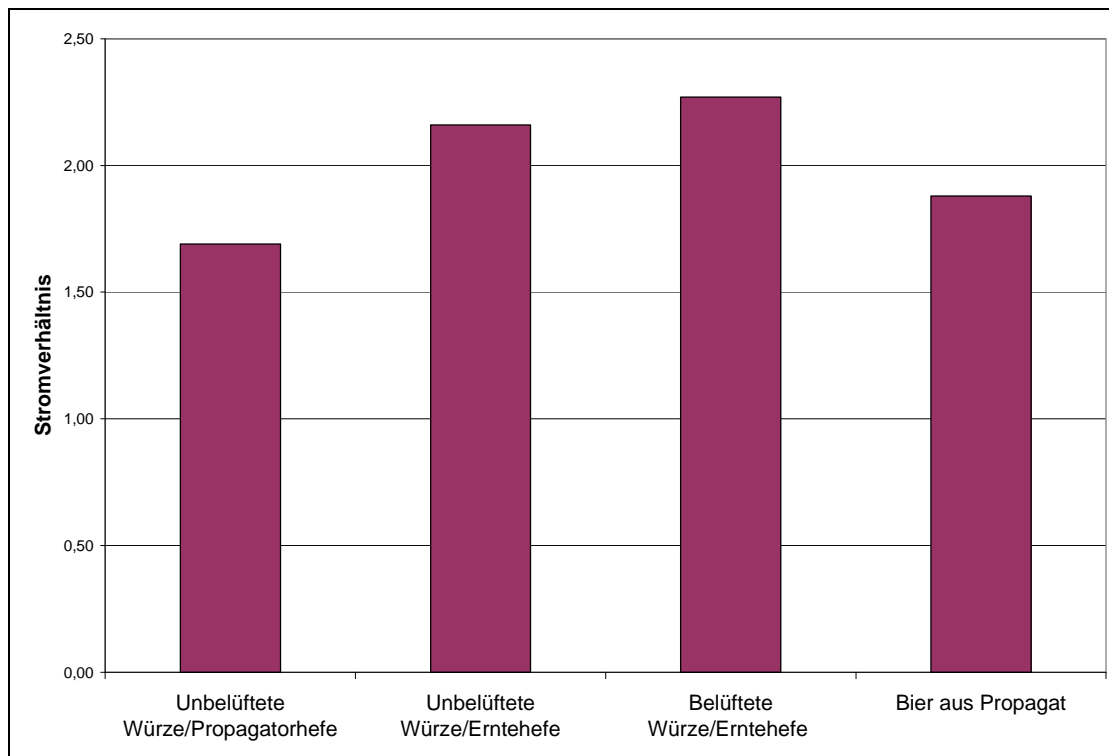


Abb.86: Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Unfiltrat

Dagegen war die Reduktionskraft beim unbelüfteten Ansatz mit Propagatorhefe mit 1,69 deutlich geringer.

Auch das Unfiltrat des aus dem Propagat hergestellten Bieres hatte mit einem Stromverhältnis von 1,88 eine geringere Reduktionskraft als die mit Erntehefe hergestellten Biere.

Auch im Unfiltrat war der Gehalt an Gesamtpolyphenolen bei allen vier Bieren etwa gleich groß (vgl.Tab.5).

Tab.5: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Unfiltrat (Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe)

	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]
Unbelüfte Würze/ Propagatorhefe	200	46
Unbelüftete Würze/ Erntehefe	203	36
Belüftete Würze/ Erntehefe	208	46
Bier aus Propagat	199	39

Im Unfiltrat war der Gehalt an Anthocyanogenen mit 46 mg/l beim Bier aus entgaster Würze mit Propagatorhefe und beim Bier aus belüfteter Würze mit Erntehefe am höchsten.

Niedriger war der Gehalt an Anthocyanogenen beim Propagatorbier mit 39 mg/l und beim unbelüfteten Ansatz mit Erntehefe mit 36 mg/l.

Fitrat

Nach der Filtration wurden bei den mit Erntehefe hergestellten Bieren das niedrigste Mittlere Nullstrompotential mit 410,1 mV beim Bier aus Würze ohne Belüftung und 410,6 mV beim Bier aus Würze mit Belüftung (vgl.Abb.87) gemessen.

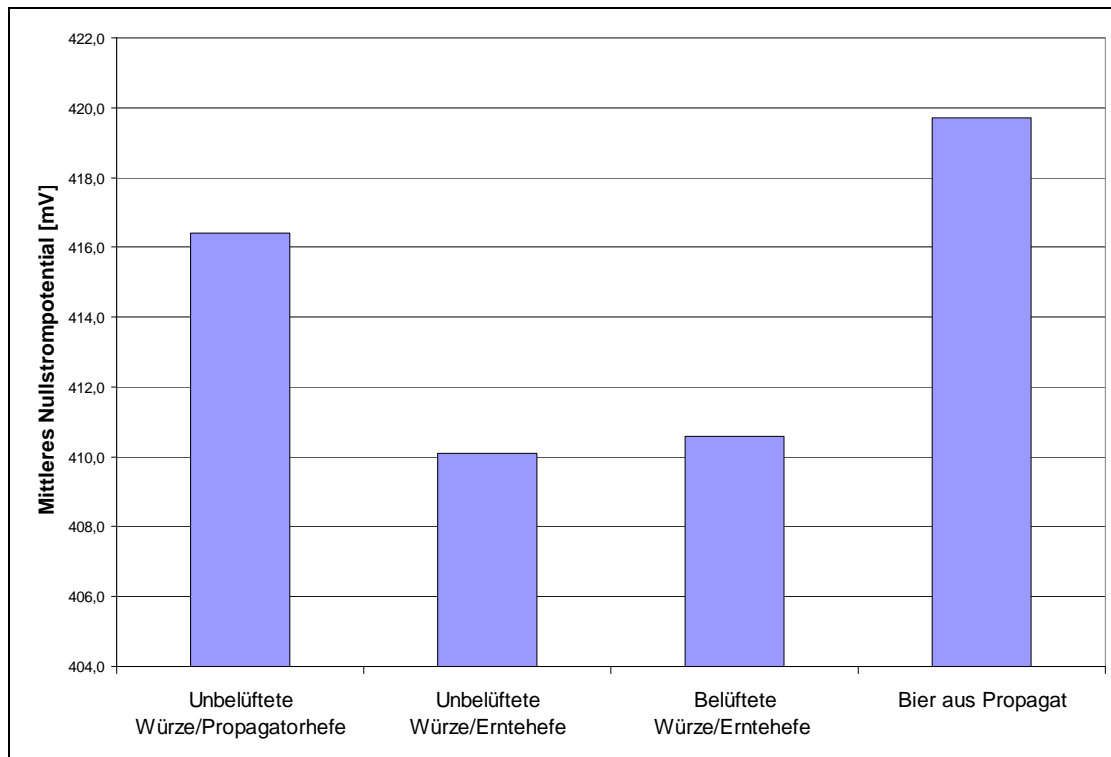


Abb.87: Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Filtrat

Äußerst hoch war das Potential beim Bier aus Propagatorsubstrat mit 419,7 mV.

Auch beim Bier aus unbelüfteter mit Propagatorhefe angestellter Würze wurde mit 416,4 mV ein deutlich höheres Potential bestimmt als bei den mit Erntehefe hergestellten Bieren.

Das höchste Stromverhältnis war bei dem Bier aus belüfteter Würze und Erntehefe mit 2,17 zu beobachten. Etwas niedriger lag die Reduktionskraft beim Bier aus unbelüfteter Würze mit 1,95 (vgl.Abb.88).

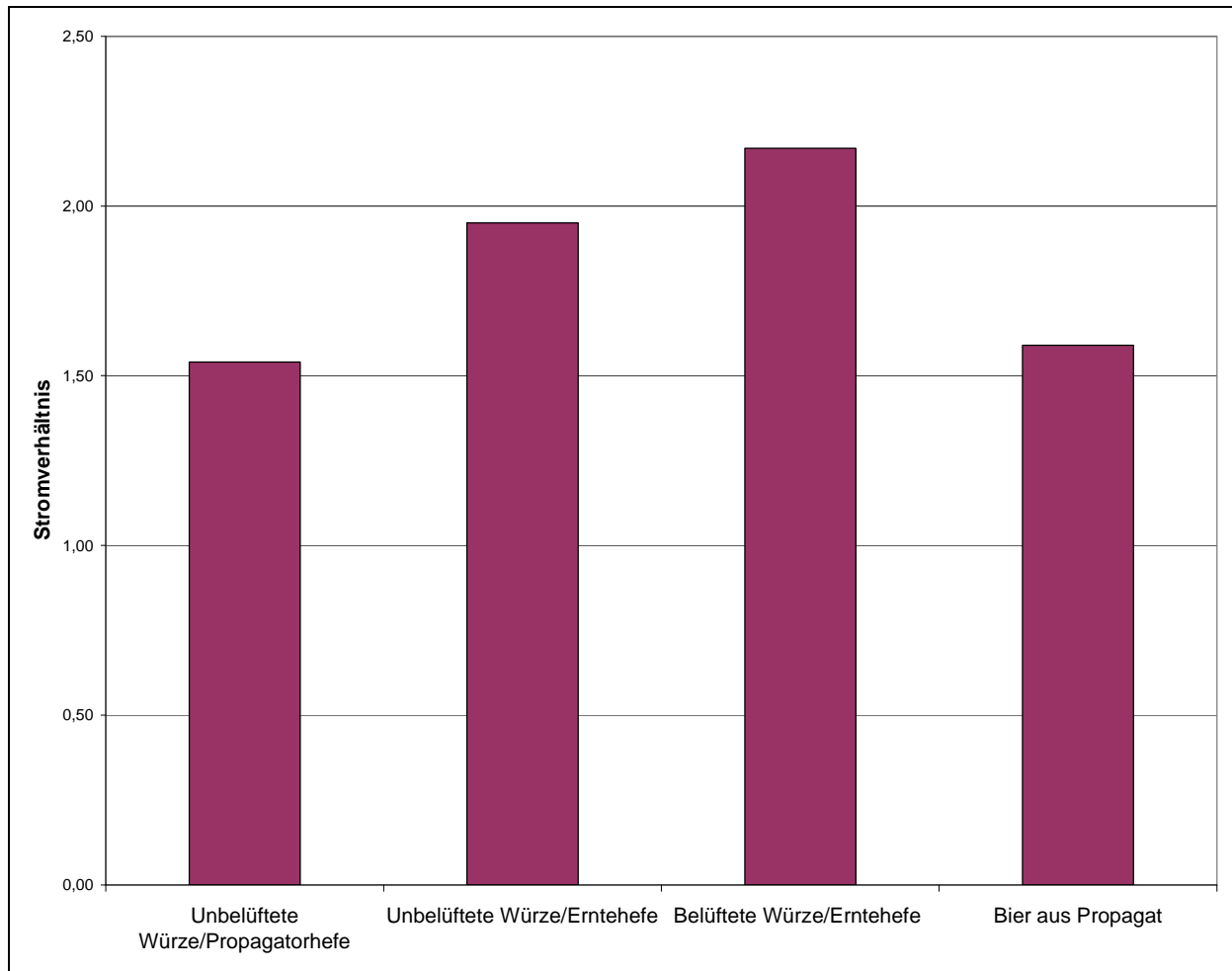


Abb.88:Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Filtrat

Am niedrigsten war die Reduktionskraft bei der unbelüfteten Würze mit Propagatorhefe mit einem Stromverhältnis von 1,54.

Etwa genauso niedrig war das Stromverhältnis beim Bier aus Propagat mit 1,59.

Auch im Filtrat war der Gehalt an Gesamtpolyphenolen ähnlich hoch (vgl.Tab.6).

Den tendenziell höchsten Gehalt an Gesamtpolyphenolen hatten das Bier aus entgaster Würze mit Propagatorhefe und die belüftete Würze mit Erntehefe.

Etwas darunter lagen die Werte für das Propagatorbier und das Bier aus entgaster Würze mit Erntehefe.

Tab.6: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Filtrat (Verzicht auf Belüftung, Versuchsreihe 1)

	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]
Unbelüftete Würze/ Propagatorhefe	181	41
Unbelüftete Würze/ Erntehefe	161	36
Belüftete Würze/ Erntehefe	181	43
Bier aus Propagat	174	43

Der Gehalt an Anthocyanogenen war bei allen Ansätzen, außer bei dem Ansatz mit unbelüfteter Würze mit Erntehefe ähnlich hoch.

Den höchsten Schwefeldioxidgehalt hatte das aus entgaster Würze mit Erntehefe hergestellte Bier mit 12,9 mg/l. Fast genauso hoch war der Schwefeldioxidgehalt beim Bier aus der belüfteten Würze mit 10,9 mg/l (vgl.Abb.89).

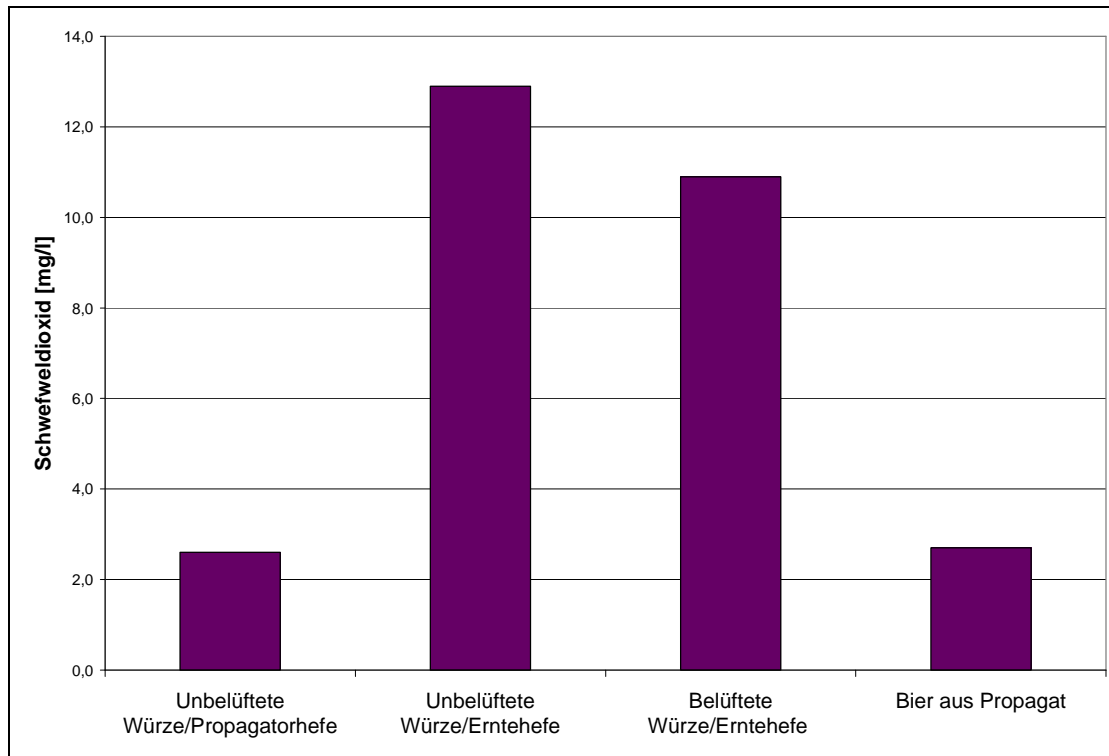


Abb.89: Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Schwefeldioxidgehalt im Filtrat

Niedrig waren die Schwefeldioxidgehalte bei dem Bier aus unbelüfteter Würze mit Propagatorhefe mit 2,6 mg/l und dem aus dem Propagat gewonnenen Bier mit 2,7 mg/l.

Zweite Versuchsreihe

Hier wurde unter den selben Bedingungen wie in der ersten Versuchsreihe gearbeitet. Zusätzlich wurde noch ein Gärtank mit entgaster Würze und Propagatorhefe angestellt.

Unfiltrat

Das niedrigste Mittlere Nullstrompotential hatte das Unfiltrat der mit Erntehefe hergestellten Bier: Aus entgaster Würze 408,9mV und aus belüfteter Würze 408,8 mV (vgl.Abb.90).

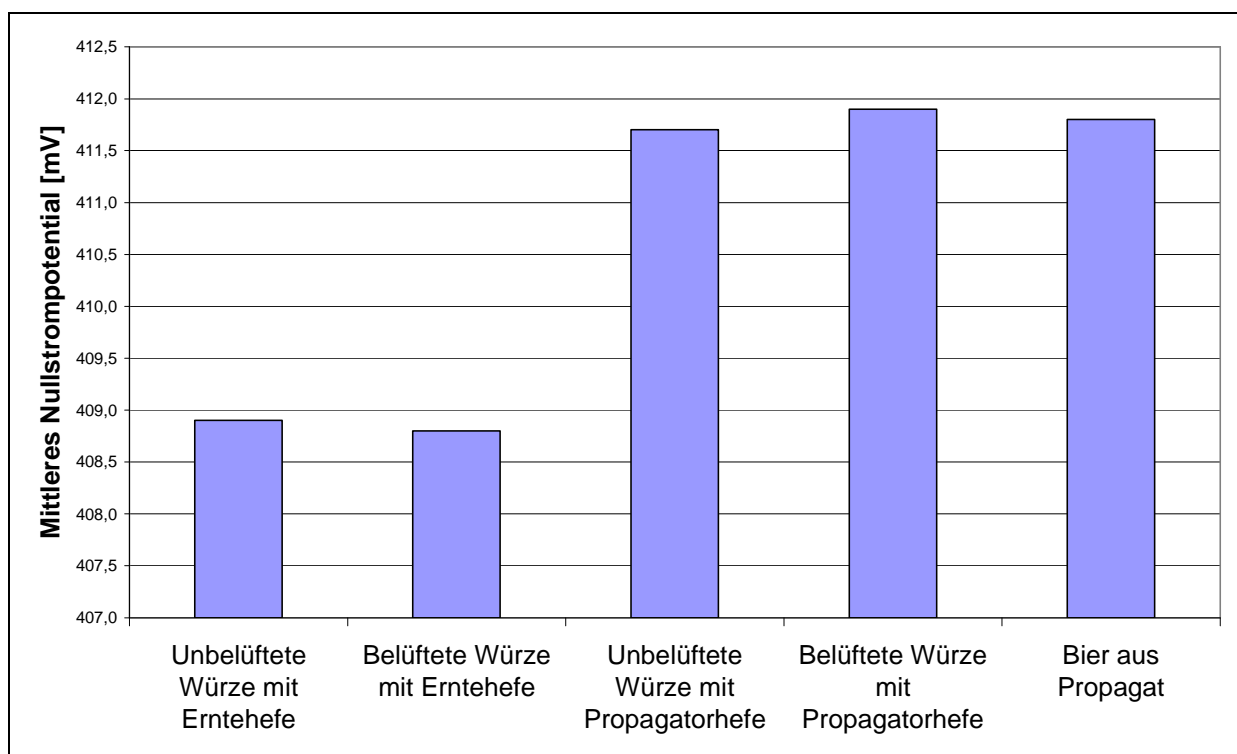


Abb.90: Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Unfiltrat

Die Ansätze mit Propagatorhefe lagen höher: 411,7 mV bei entgaster Würze, 411,9 mV bei konventioneller Belüftung und 411,8 mV beim Bier aus Propagat.

Das höchste Stromverhältnis wies das Unfiltrat aus belüfteter Würze mit Erntehefe mit 1,87 auf (vgl.Abb.91).

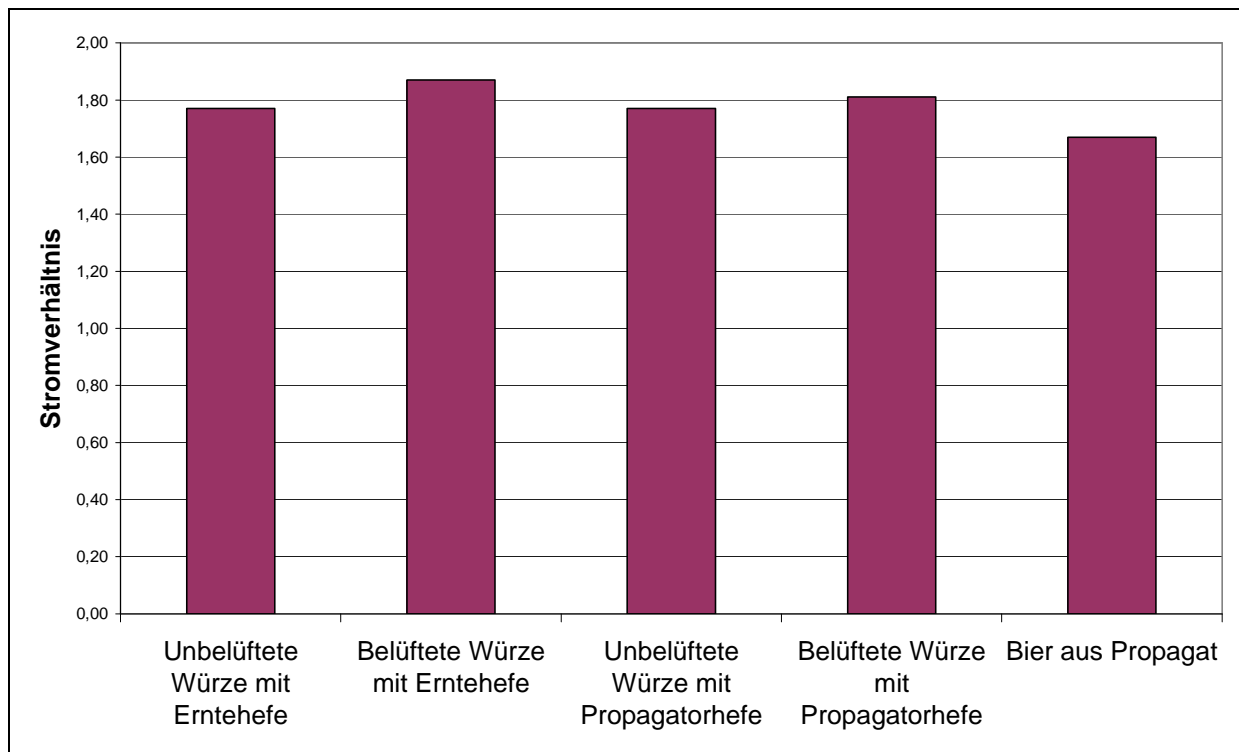


Abb.91: Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Unfiltrat

Die anderen Biere lagen knapp darunter, nur das Unfiltrat des Bieres aus Propagat fiel mit 1,67 etwas ab.

Den höchsten Anteil an Gesamtpolyphenolen hatte das Bier aus belüfteter Würze mit Propagatorhefe mit 182 mg/l (vgl.Tab.7).

Tab.7: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Unfiltrat (Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe)

	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]
Unbelüftete Würze/ Erntehefe	176	62
Belüftete Würze/ Erntehefe	160	61
Unbelüftete Würze/ Propagatorhefe	171	66
Belüftete Würze/ Propagatorhefe	182	65
Bier aus Propagat	168	63

Am niedrigsten war der Anteil beim Bier aus der belüfteten Würze mit Erntehefe mit 160 mg/l. Insgesamt waren die Unterschiede bei den Gesamtpolyphenolen also nicht sehr gross.

Wie Tab.7 zeigt, ist im Unfiltrat bei den Anthocyanogenen kein Einfluss der Belüftungs- oder Hefetechnologie zu erkennen.

Filtrat

Das deutlich höchste Mittlere Nullstrompotential hatte das Filtrat des Bieres aus Propagat mit 418,0 mV. Es folgt das Bier aus belüfteter Würze mit Propagatorhefe mit 416,1 mV (vgl.Abb.92)

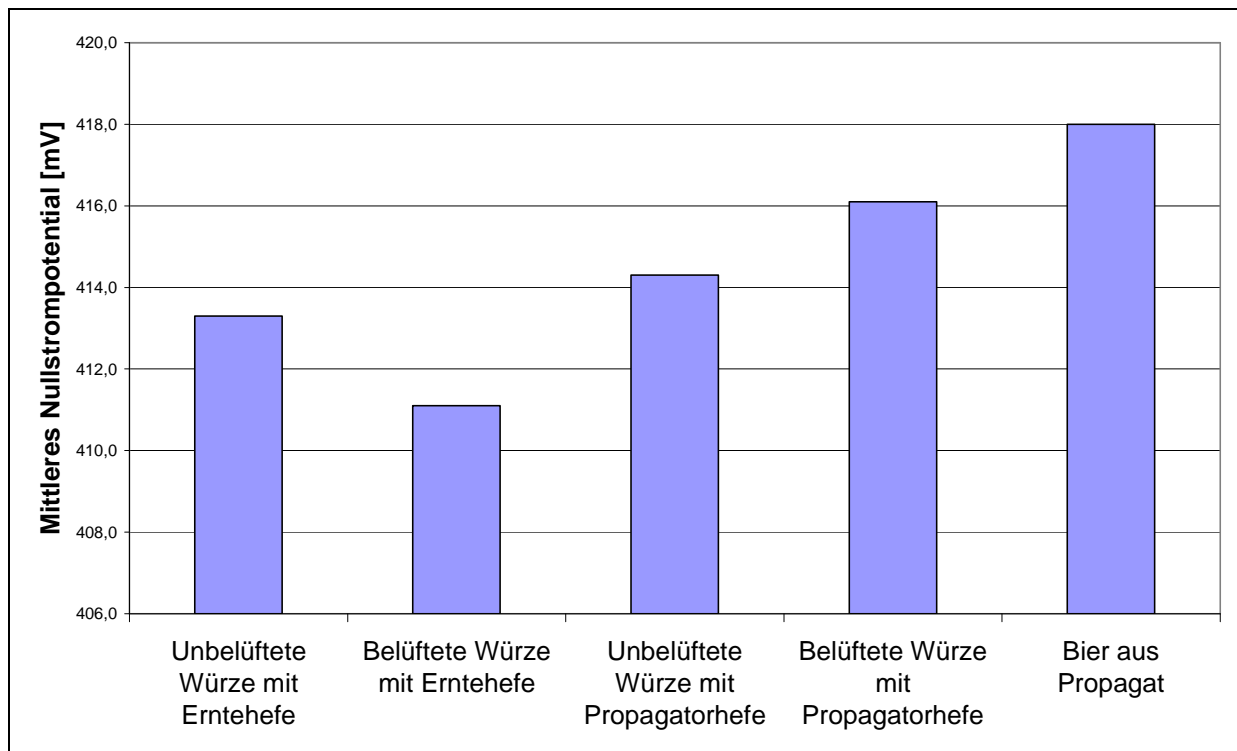


Abb.92: Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Filtrat

Etwas darunter liegt der Wert für das Bier aus entgaster Würze mit Propagatorhefe mit 414,3 mV. Die mit Erntehefe hergestellten Biere hatten mit 413,3 mV (entgaste Würze) und 411,1 mV (belüftete Würze) die niedrigsten Werte.

Ein ähnlich hohes Stromverhältnis zeigten das Bier aus belüfteter Würze mit Erntehefe (1,91), mit Propagatorhefe (1,86) und entgaster Würze mit Propagatorhefe (1,85) (vgl.Abb.93)

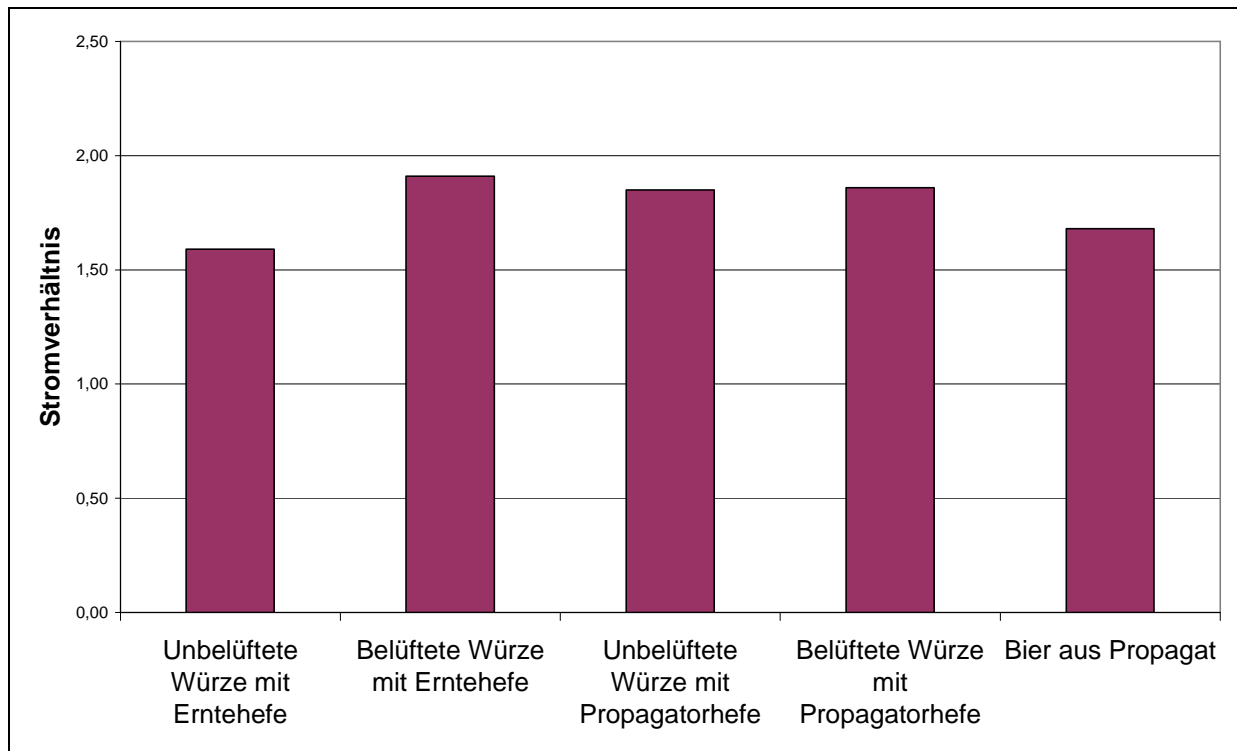


Abb.93: Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Filtrat

Deutlich niedriger lagen das Bier aus Propagat (1,68) und das Bier aus entgaster Würze mit Erntehefe (1,59).

Etwas höhere Gehalte an Gesamtpolyphenolen waren bei den belüfteten Ansätzen zu beobachten:

192 mg/l mit Erntehefe, 188 mg/l mit Propagatorhefe und 180 mg/l beim Bier aus Propagat (vgl.Tab.8).

Tab.8: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Filtrat (Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe)

	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]
Unbelüftete Würze/ Erntehefe	166	58
Belüftete Würze/ Erntehefe	192	61
Unbelüftete Würze/ Propagatorhefe	171	60
Belüftete Würze/ Propagatorhefe	188	65
Bier aus Propagat	180	61

Die Biere aus unbelüfteter Würze hatten hingegen etwas niedrigere Werte: Das Bier aus entgaster Würze mit Propagatorhefe 171 mg/l und das Bier aus entgaster Würze mit Erntehefe 166 mg/l.

Auch in den Filtraten unterschied sich der Gehalt an Anthocyanogenen kaum.

So wurden Werte von 58 mg/l bis 65 mg/l ermittelt.

Auch in dieser Versuchsreihe haben die Biere, bei denen mit Erntehefe angestellt wurde, deutlich die höchsten Gehalte an Schwefeldioxid. Am höchsten war der Gehalt im Ansatz mit belüfteter Würze (6,4 mg/l), dann im Ansatz mit Erntehefe und unbelüfteter Würze (5,4 mg/l) (vgl.Abb.94).

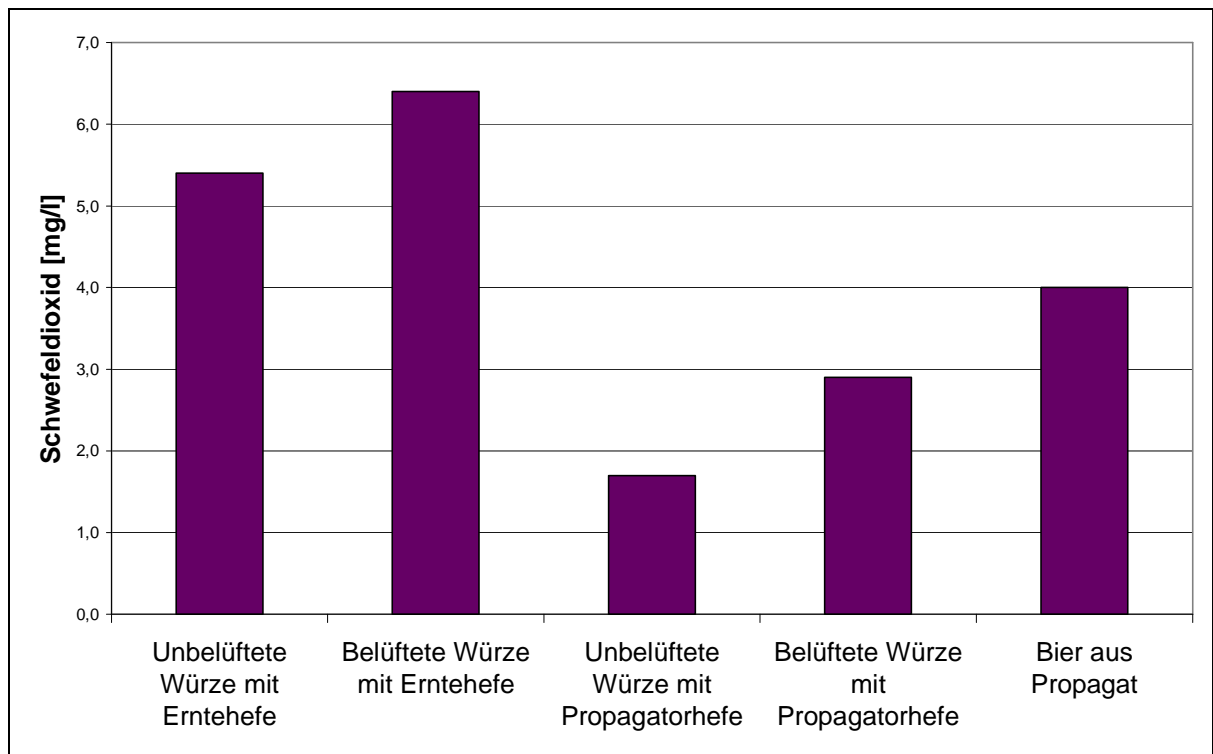


Abb.94: Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe: Schwefeldioxidgehalt im Filtrat

Beim Bier aus Propagat betrug der Gehalt 4,0 mg/l.

Die Biere, bei denen Propagatorhefe verwendet wurde, hatten einen Gehalt von 1,7 mg/l (entgaste Würze) und 2,9 mg/l (belüftete Würze).

Anstellen mit Erntehefe aus erster Versuchsreihe

Um die Auswirkung der Propagation bei der nächsten Führung zu beobachten, wurde die Hefe aus den beiden unbelüftet angestellten Tanks geerntet und zum Anstellen konventionell belüfteter Würze verwendet.

Es wurde also die Propagatorhefe und die Erntehefe aus dem ersten Versuch ein weiteres Mal geführt.

Das Mittlere Nullstrompotential im Unfiltrat betrug beim Ansatz, der mit Erntehefe aus dem Versuch mit Propagatorhefe angestellt wurde, 405,7 mV. Bei Verwendung von Erntehefe aus dem Versuch, bei dem mit Erntehefe angestellt wurde, 407,1 mV.

Das Stromverhältnis lag bei beiden Ansätzen bei 2,10 (vgl.Tab.9)

Die Gesamtpolyphenolgehalt unterschied sich kaum.

Tab.9: Werte für das Unfiltrat (Verzicht auf Belüftung, 3.Versuchsreihe)

	MNP [mV]	Stromverhältnis	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]
Weitere Führung Propagatorhefe	405,7	2,10	209	63
Weitere Führung Erntehefe	407,1	2,10	206	61

Das Unfiltrat des Bieres aus der weiteren Führung der Propagationshefe des unbelüfteten Ansatzes enthielt 63mg/l, das andere 58 mg/l Anthocyanogene.

Das Mittlere Nullstrompotential der beiden Unfiltrate unterschied sich kaum und lag bei bei 411,7 mV bzw. 411,2 mV.

Das Filtrat aus der weiteren Führung der Erntehefe aus dem unbelüfteten Ansatz mit Propagatorhefe hatte mit 1,72 ein deutlich niedrigeres Stromverhältnis als das aus der Erntehefe aus dem mit Erntehefe angestellten Ansatz hergestellte Bier mit 1,92.

Auch im Filtrat ergaben sich mit 180 mg/l zu 191 mg/l keine grossen Unterschiede.

Der Gehalt an Anthocyanogenen unterscheidet sich nicht (vgl.Tab.10)

Tab .10: Werte für das Filtrat (Verzicht auf Belüftung, 3.Versuchsreihe)

	MNP [mV]	Stromverhältnis	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]	Schwefeldioxid [mg/l]
Weitere Führung Propagatorhefe	411,7	1,72	180	55	4,7
Weitere Führung Erntehefe	411,2	1,92	191	54	8,6

Schwefeldioxid wurde verstärkt von der Erntehefe aus dem Ansatz mit Erntehefe gebildet. So war hier der End-SO₂-Gehalt mit 8,6 mg/l deutlich höher als beim Bier aus Erntehefe aus dem Ansatz mit Propagatorhefe mit 4,7 mg/l.

Diese Versuchsreihe bringt als eindeutiges Ergebnis, dass sich in erster Linie Biere, die aus Propagationshefe einerseits und Biere, die aus Erntehefe andererseits hergestellt wurden, in ihren Redoxeigenschaften stark unterscheiden. Diese Unterschiede sind deutlicher als die durch unterschiedliche Belüftung der Würze bedingten Veränderungen in den Redoxeigenschaften. Dadurch wird deutlich, dass für die Oxidations- und Reduktionsvorgänge der physiologische Zustand der Hefe in einem ähnlichen Ausmass wie die Sauerstoffbelastung und die durch die Rohstoffe eingebrachten Antioxidantien von Bedeutung ist.

Weniger die schnellreduzierenden Substanzen, die nur in der ersten Versuchsreihe vermindert waren, als vielmehr das Mittlere Nullstrompotential, wurde stark durch die Art der Vorbehandlung der Hefe beeinflusst. Auch in der zweiten Versuchsreihe, bei der das Stromverhältnis im Filtrat bei der unbelüfteten Würze mit Erntehefe deutlich am niedrigsten lag, lagen die Potentiale der Propagatorhefe hingegen stets einige mV höher. Dabei ist kein Zusammenhang mit dem Gehalt an Gesamtpolyphenolen und Anthocyanogenen zu erkennen. Der grosse Unterschied zwischen den Bieren aus Propagatorhefe und Erntehefe bestand im Schwefeldioxidgehalt. Die Biere, die mit Erntehefe angestellt wurden, enthielten deutlich mehr Schwefeldioxid. Die unterschiedliche Schwefeldioxidbildung war bedingt durch den unterschiedlichen physiologischen Zustand der Hefe. Generell wird von einer erhöhten Schwefeldioxidbildung bei schwacher Hefevermehrung ausgegangen¹. Die Belüftung beeinflusste in unseren Versuchen die Hefevermehrung kaum, weshalb sogar in den unbelüfteten Ansätzen ein niedrigerer Schwefeldioxidgehalt feststellbar war. Die Propagatorhefe schied wahrscheinlich aufgrund ihres besseren physiologischen Zustandes weniger Schwefeldioxid aus.

Zum Einfluß der Belüftung auf den Ansatz mit Erntehefe in der ersten Versuchsreihe ist zu sagen, dass durch den Verzicht auf Belüftung ausschließlich im Jungbier eine tendenzielle Verbesserung der Reduktionskraft aufgetreten ist.

Im Unfiltrat und Filtrat dagegen waren die Reduktionseigenschaften der belüfteten Variante leicht besser. Im Filtrat der Biere, die mit Erntehefe hergestellt wurden, ist beachtlich, dass trotz höherem Schwefeldioxidgehalt, der durch einen schlechteren physiologischen Zustand der Hefe im unbelüfteten Ansatz bedingt ist, der unbelüftete Ansatz ein etwas höheres Mittleres Nullstrompotential und niedrigeres Stromverhältnis, also ungünstigere Redoxverhältnisse aufwies. Anders als bei der Zweitbelüftung oder Intensiv-Belüftung

¹ Narziss, L., "Über den Schwefeldioxidgehalt des Bieres", Brauwelt 122, 1982, S. 502-519

wurden die Reduktionseigenschaften durch den eingebrachten Sauerstoff nicht in der Weise beeinflusst, dass im Unfiltrat oder fertigen Bier ein Vorteil dieser Maßnahme nachweisbar wäre. Demnach war die Schädigung durch den Luftsauerstoff etwas geringer als die durch den unterschiedlichen physiologischen Zustand der Hefe bedingten Unterschiede. Vorallem während der Lagerung änderten sich Stromverhältnis und Nullstrompotential zu Ungunsten des unbelüfteten Bieres.

Beim Bier aus Propagat wird deutlich, dass die Hefe in ähnlicher Größenordnung Schwefeldioxid bildet wie die mit Propagatorhefe angestellten Biere. Vorallem im Filtrat ist das Nullstrompotential gegenüber den anderen Proben in beiden Versuchsreihen erhöht. In der zweiten Versuchsreihe wurde deutlich, dass das höhere Nullstrompotential beim Propagatorbier (trotz des in diesem Fall höheren Schwefeldioxidgehalts) auf eine Schädigung des Substrats durch die kontinuierliche Belüftung auf einen Sauerstoffgehalt von 2mg/l zurückzuführen ist. Diese Schädigung wirkt sich weniger auf das Stromverhältnis, also die Reduktionskraft als auf das Potential aus. Andererseits muß darauf hingewiesen werden, dass die Erhöhung des Nullstrompotentials und damit die oxidative Schädigung des Propagationssubstrates durch diese aerobe Herführung deutlich geringer ausgefallen ist als nach den Ergebnissen für Zweit- und Intensive-Belüftung eigentlich zu erwarten war, da hier über 24h eine starke Sauerstoffbelastung herrschte.

Vergleicht man die Biere der zweiten Versuchsreihe, die mit Propagatorhefe angestellt wurden, ist beim Unfiltrat kein Unterschied bei den elektrochemischen Messergebnissen festzustellen.

Beim Filtrat ist das Mittlere Nullstrompotential des belüfteten Ansatzes um etwa 2mV erhöht. Vergleicht man die Schwefeldioxidgehalte, wird deutlich, dass sich beim belüfteten Ansatz mehr Schwefeldioxid bildete. Trotz dieses deutlich erhöhten Schwefeldioxidgehaltes war das Stromverhältnis nicht höher als beim Bier aus belüfteter Würze. Daraus folgt, dass die Belüftung einen oxidativen Schaden hervorgerufen hat, der durch Unterschiede bei Gärung und Lagerung nicht oder nur teilweise ausgeglichen werden konnte. Auch die Gärung verlief beim Verzicht auf Belüftung sehr gut, wenn Propagatorhefe verwendet wurde. Analytisch waren die Biere, bei denen auf Belüftung verzichtet wurde, den Bieren aus belüfteter Würze ebenbürtig¹.

Aufgrund dieser Erkenntnisse kann klar gesagt werden, dass bei der Verwendung von Propagatorhefe durchaus auf Belüftung verzichtet werden kann. Der physiologische Zustand der Hefe ist nach der Propagation sehr gut, sodass ohne Würzebelüftung angestellt werden kann. Von den elektrochemisch bestimmten Redoxeigenschaften her ist der Vorteil des Verzichtes auf Belüftung deutlich geringer als beispielsweise der Nachteil bei intensiver Belüftung. Vorallem beim Anstellen mit Erntehefe entwickelte sich beim unbelüfteten Ansatz

¹ Wittek, D., Diplomarbeit, TU-München-Weihenstephan, 2002

teilweise höheres Mittleres Nullstrompotential und ein niedrigeres Stromverhältnis. Das weist auch auf den grossen Einfluss der Hefe bzw. ihres physiologischen Zustand hin. Die oxidative Schädigung der Würze ist demnach nicht mehr nachweisbar im Unfiltrat und fertigen Bier.

Das konventionelle Anstellen mit Erntehefe aus der ersten Versuchsreihe brachte keine grossen Unterschiede zwischen der Verwendung von Erntehefe aus dem Ansatz mit Propagatorhefe und von Erntehefe aus dem Ansatz mit Erntehefe. Da beide Würzen gleich behandelt wurden, also konventionell belüftet, sind zu dieser Versuchsreihe keine Aussagen zu oxidativen Einflüssen durch Belüftungstechnologien zu machen.

Die Propagatorhefe bildete auch bei der zweiten Führung weniger Schwefeldioxid. Ein etwas höheres Stromverhältnis im Filtrat der zweiten Führung der Erntehefe war vor allem auf diesen höheren Schwefeldioxidgehalt zurückzuführen.

4.4 Stabilisierung

4.4.1 Verhalten der Reduktone im Verlauf der PVPP-Stabilisierung

Einfluss verschiedener Stabilisierungsmittel auf das Redoxverhalten von Bier

In einer mittelständischen Brauerei wurde Bier auf verschiedene Weise stabilisiert.

Eine Charge wurde nur eiweißseitig stabilisiert. Dazu wurde als Stabilisierungsmittel Kieselgel der Firma Hoesch (BK 75) verwendet.

Eine zweite Charge hingegen wurde polyphenolseitig stabilisiert, wobei 20 g/hl Polyphenolpolypyrrolidon (PVPP) der Firma BASF (Divergan F) zum Einsatz kamen.

Voranschwemmung und laufende Dosage der Kieselgur waren bei beiden Versuchen identisch:

1.Voranschwemmung	Grobgur 444 g/m ²
2.Voranschwemmung	Grobgur 139 g/m ²
3.Laufende Dosage	Grobgur 25g/hl
	Feingur 100g/hl

Stündlich wurden am Filterauslauf Filtratproben in sauerstofffreie Corneliusbehälter (Probe 1,2,3) genommen und außerdem vom Lagertank eine Unfiltratprobe und vom Drucktank eine Drucktankprobe (bei der gerbstoffseitigen Stabilisierung stand keine Drucktankprobe zur Verfügung).

Zur Ermittlung des Einflusses der großtechnischen Abfüllung (v.a. Sauerstoffbelastung) wurde auch das in der Brauerei in Flaschen abgefüllte Bier bestimmt.

4.4.1.1 Eiweißseitige Stabilisierung

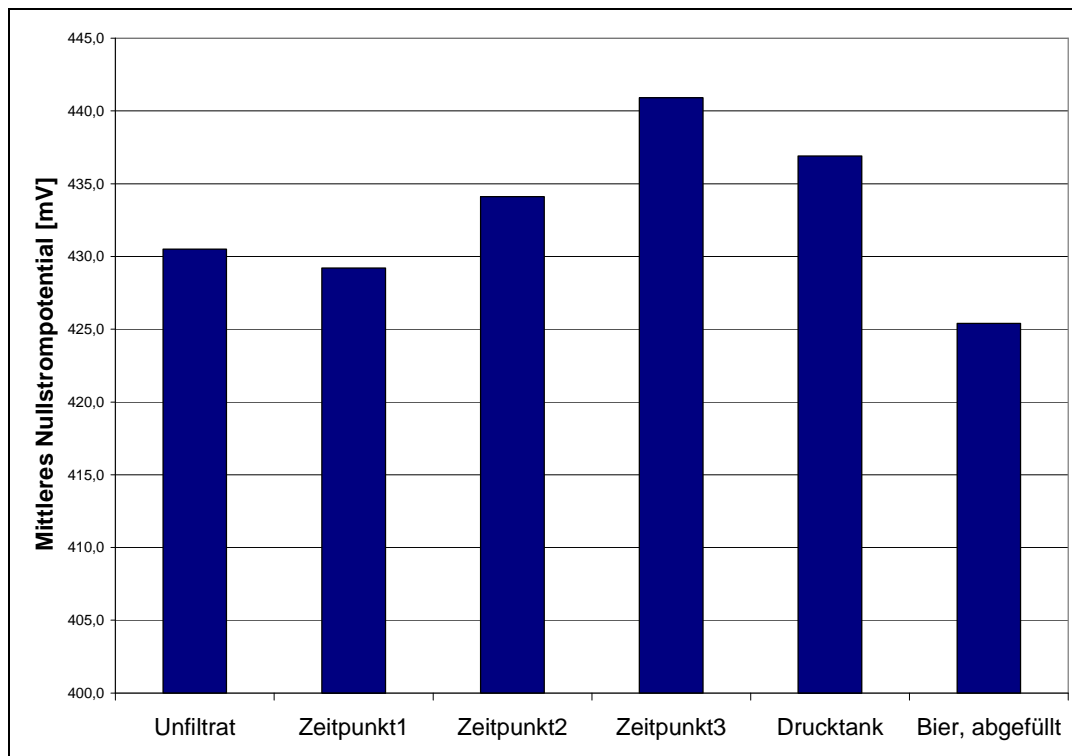


Abb.95: Mittleres Nullstrompotential bei eiweißseitiger Stabilisierung

Die niedrigsten Werte für das mittlere Nullstrompotential waren bei dem in der Brauerei entnommenen und am Lehrstuhl abgefüllten Proben Unfiltrat und eine Stunde nach Filtrationsbeginn zu beobachten. Noch niedriger, etwa in der Größenordnung von 5mV, lag die Brauereiabfüllung des filtrierten Bieres (vgl.Abb.95).

Während der Filtration stieg das Mittlere Nullstrompotential um etwa 10 mV an. Diese Steigerung jedoch war, wie sich bei genauerer Betrachtung herausstellt, nicht durch einen Anstieg des 2.Nullstrompotentials bedingt, sondern durch den Anstieg des 1.Nullstrompotentials (vgl. Tab.11). Gerade im Verlauf der Filtration stieg dieser Wert deutlich an. Wie eingangs in der Beschreibung der cyclovoltametrischen Methode ausgeführt wurde, ist ein wichtiger Grund für einen starken Anstieg des 1.Nullstrompotentials ein deutlich erhöhter Sauerstoffgehalt im Substrat, nicht jedoch eine tatsächliche Abnahme elektroaktiver reduzierender Substanzen.

Tab.11: Nullstrompotentiale bei eiweißseitiger Stabilisierung

	1.Nullstrompotential [mV]	2.Nullstrompotential [mV]	Mittleres Nullstrompotential [mV]
Unfiltrat	53,9	807,2	430,5
Zeitpunkt 1	51,6	806,8	429,2
Zeitpunkt 2	60,3	807,8	434,1
Zeitpunkt 3	70,9	810,9	440,9
Drucktank	64,7	809,1	436,9
Abgefülltes Bier	50,9	800,5	425,4

Die Werte für das Stromverhältnis nach 4 Minuten Reaktionszeit unterschieden sich bei den in der Brauerei gezogenen Proben nicht wesentlich (1,47-1,54)(vgl.Abb.95).

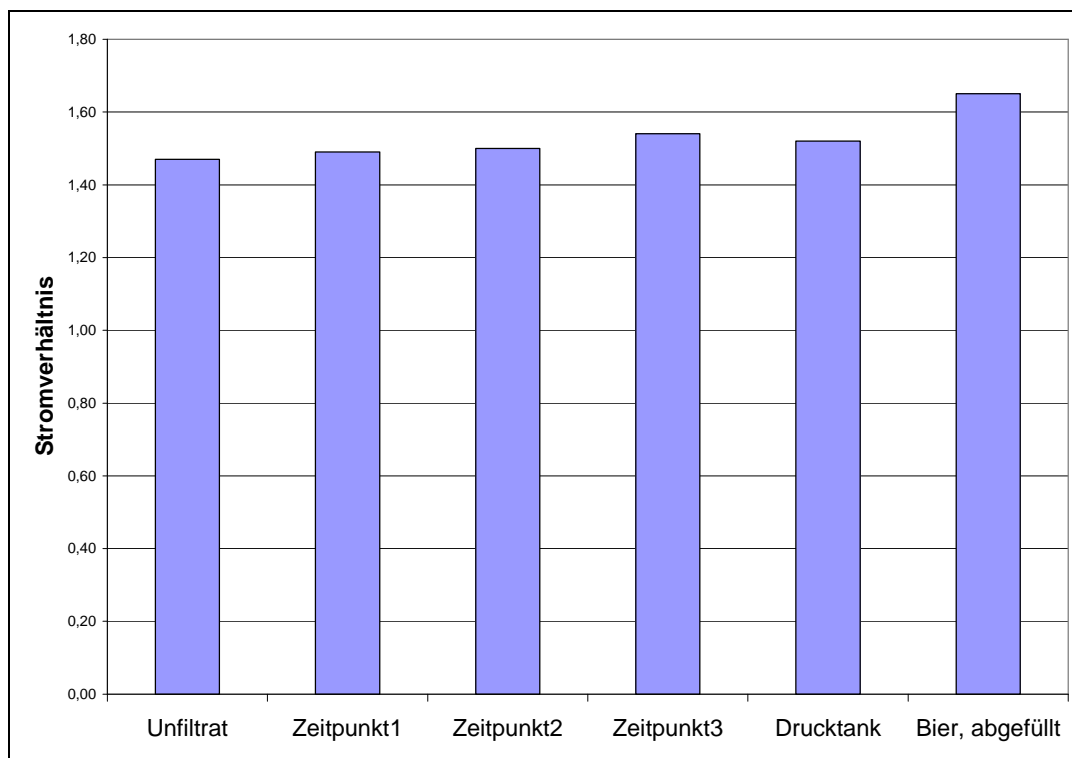


Abb.96: Stromverhältnis bei eiweißseitiger Stabilisierung

Etwas erhöht war nur der Wert für das in der Brauerei abgefüllte Bier mit 1,65.

Bei den schnellreduzierenden Substanzen tritt bei Filtrationsbeginn ein Abfall um etwa 2 Prozentpunkte auf. Ansonsten sind keine reproduzierbaren Unterschiede auszumachen (vgl.Abb.97).

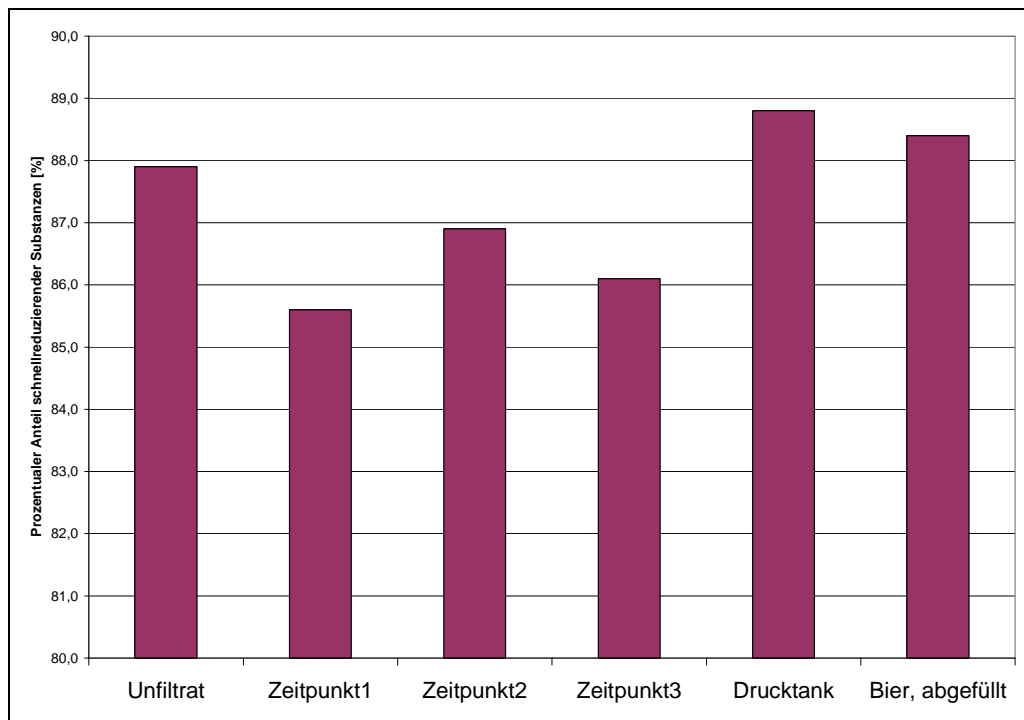


Abb.97: Anteil schnellreduzierender Substanzen bei eiweißseitiger Stabilisierung

Die mittelschnellreduzierenden Substanzen erreichen den höchsten Anteil nach 2 Stunden Filtrationszeit mit 12,4% (vgl.Abb.98).

Gleichzeitig ist nach dieser Zeit der Anteil langsamreduzierender Substanzen mit 0,7% am geringsten.

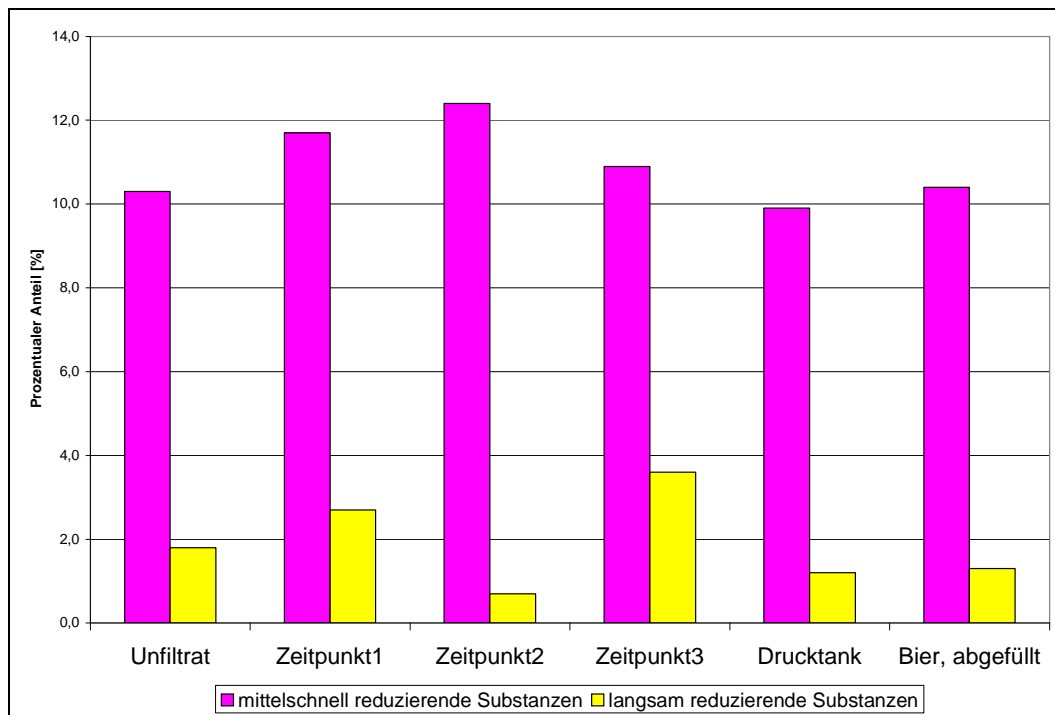


Abb.98: Anteil mittelschnell- und langsamreduzierender Substanzen bei eiweißseitiger Stabilisierung

Wie erwartet, lag die DPPH-reduzierende Aktivität beim Unfiltrat nur geringfügig höher als bei den anderen in der Brauerei entnommenen Proben.

Im Verlauf der Filtration stieg der Wert wieder leicht an, erreichte aber nicht den Wert des Unfiltrates (vgl. Abb.99).

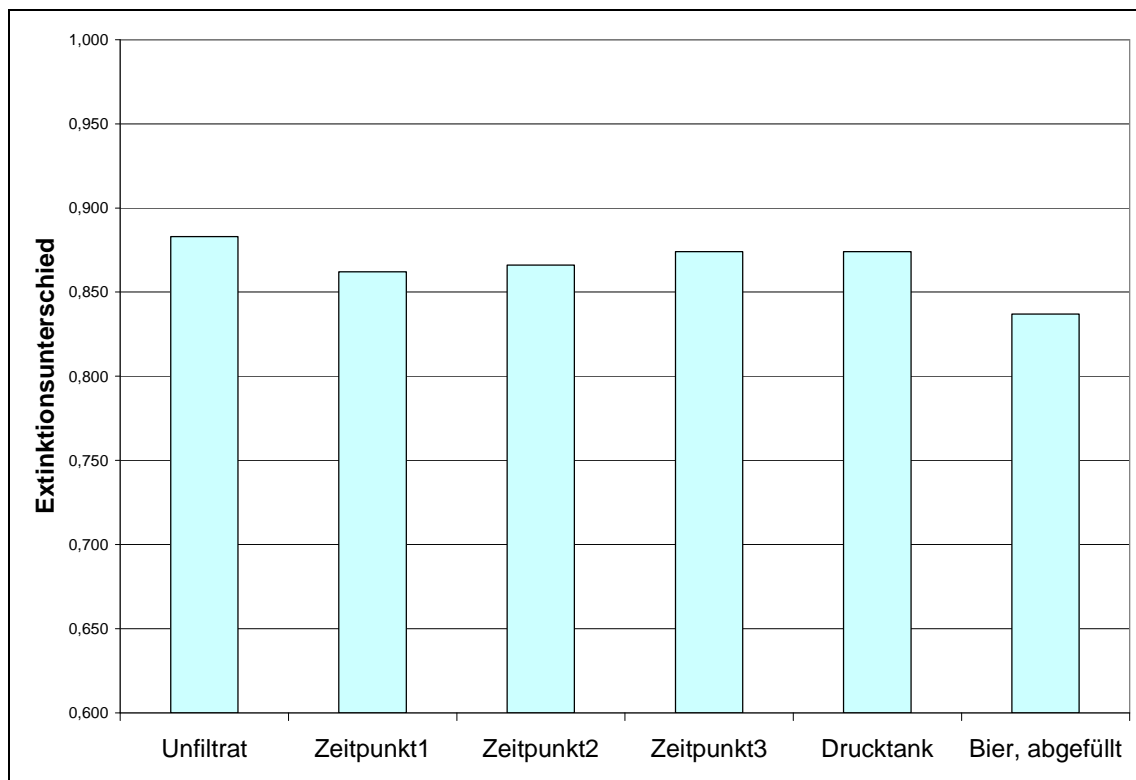


Abb.99: DPPH-reduzierende Aktivität bei eiweißseitiger Stabilisierung

Gegenüber diesen Proben fiel jedoch der äußerst geringe Extinktionsunterschied bei dem in der Brauerei abgefüllten Filtrat auf.

Auch nach Filtration mit ausschließlich eiweißseitiger Stabilisierung nahmen die reduzierenden Substanzen nach Chapon deutlich ab (vgl. Abb.100).

Waren im Unfiltrat noch 1,95 mval/l nachzuweisen, so waren es im Filtrat nach einer bzw. zwei Stunden nur noch 1,39 bzw. 1,30 mval/l. Anschließend stieg der Gehalt wieder leicht an.

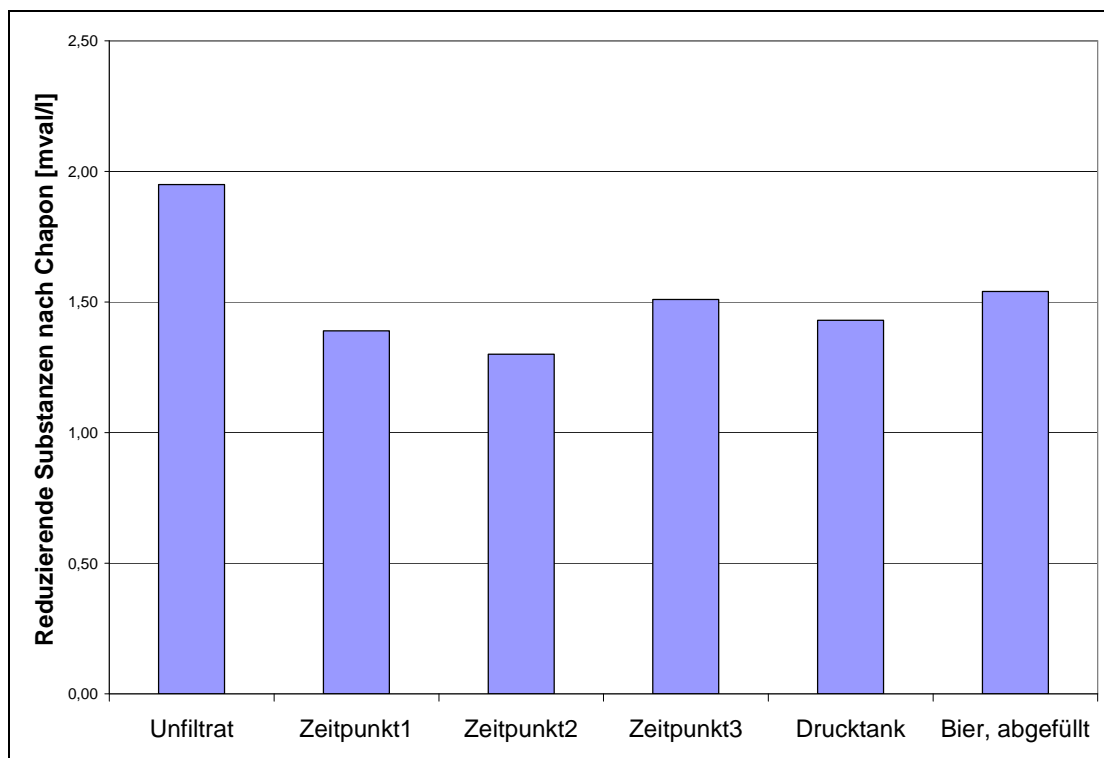


Abb.100: Reduzierende Substanzen nach Chapon bei eiweißseitiger Stabilisierung

Am höchsten war der Wert im in der Brauerei abgefüllten filtrierten Bier mit 1,54. Dieser Gehalt lag aber immer noch etwa 25% unter dem Ausgangsgehalt.

Bei der rein eiweißseitigen Stabilisierung war keine Veränderung des Gesamtpolyphenolgehaltes durch die Filtration zu erkennen (vgl.Tab.12).

Tab.12:Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene bei eiweißseitiger Stabilisierung

	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]
Unfiltrat	128	24,6
Zeitpunkt 1	126	20,2
Zeitpunkt 2	127	23,2
Zeitpunkt 3	127	24,1
Drucktank	129	22,2
Bier,abgefüllt	122	22,0

Anders als bei den Polyphenolen war bei den Anthocyanogenen eine leichte Abnahme gerade am Beginn der Filtration zu beobachten. Nach längerer Filtrationsdauer stieg der Gehalt wieder an, liegt aber auch noch niedriger als der Anfangsgehalt.

Der Anthocyanogengehalt der Proben Drucktank und großtechnisch abgefülltes Bier lag ebenfalls etwas unter dem Unfiltrat.

Bei den einzelnen phenolischen Substanzen war kein einheitliches Verhalten während der Filtration feststellbar.

4.4.1.2 Polyphenolseitige Stabilisierung

Anders als bei der eiweißseitigen Stabilisierung zeigte das Mittlere Nullstrompotential einen eindeutigen Verlauf:

Im Unfiltrat ist ein mit 412,3 mV äußerst niedriges Mittleres Nullstrompotential ermittelt worden (vgl. Abb.101).

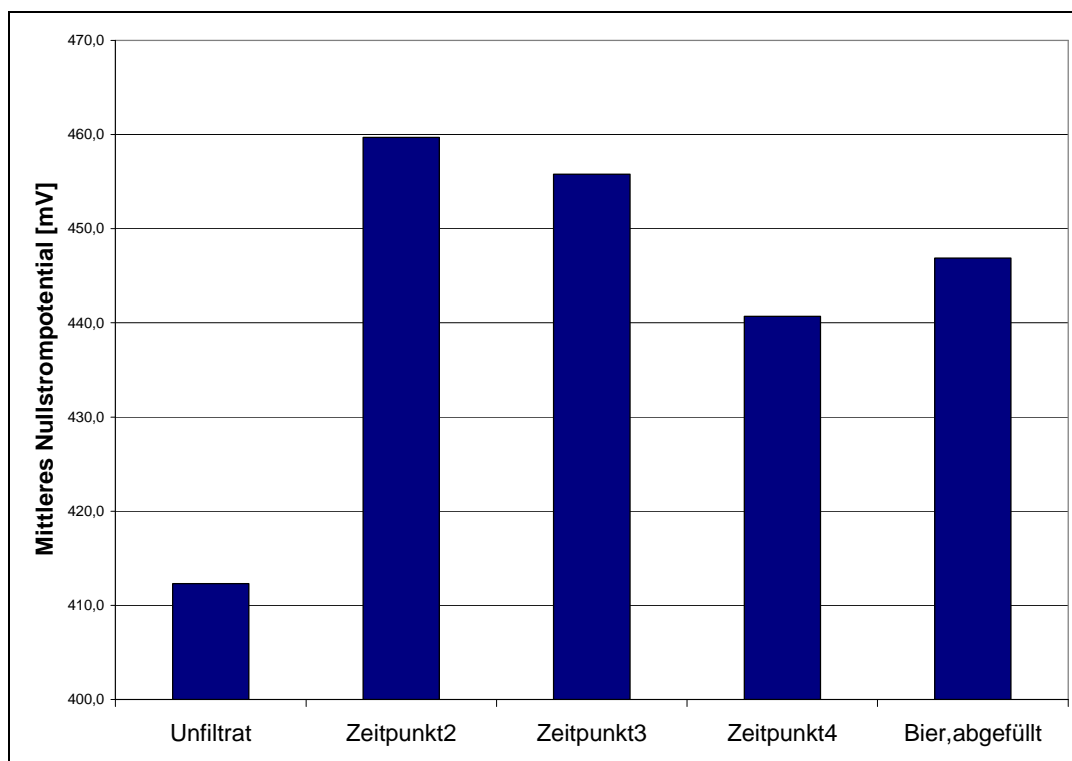


Abb.101: Mittleres Nullstrompotential bei gerbstoffseitiger Stabilisierung

Eine Stunde nach Filtrationsbeginn wurde mit 459,7 mV das höchste Mittlere Nullstrompotential ermittelt.

Im Verlauf der Filtration sank das Potential wieder auf 440,7 mV. Das Potential des abgefüllten Bieres war mit 446,9 mV gegenüber dem Unfiltrat deutlich um über 34 mV erhöht.

Das Stromverhältnis nach 2 Stunden Filtrationsdauer lag etwas unter dem Stromverhältnis des Unfiltrates (vgl.Abb.102). Während der Filtration stieg das Stromverhältnis wieder an auf Werte, die wieder in der Größenordnung des Unfiltrates lagen.

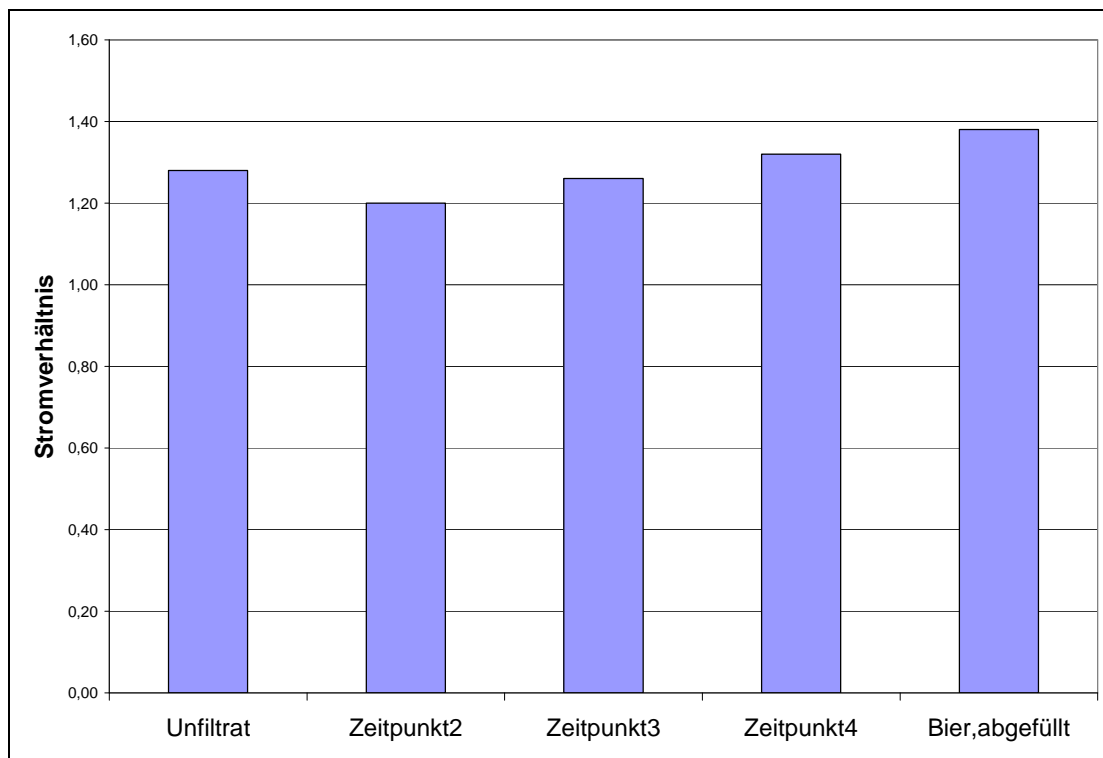


Abb.102: Stromverhältnis bei gerbstoffseitiger Stabilisierung

Auch hier wurde das höchste Stromverhältnis beim in der Brauerei abgefüllten filtrierten Bier ermittelt.

Das Unfiltrat enthielt mit 89,9% den höchsten Anteil schnellreduzierender Substanzen. Deutlich vermindert ist dieser Anteil nach 2 Stunden Filtrationsdauer mit 82,7%.

Im weiteren Verlauf der Filtration steigt der Anteil wieder auf 87,4% bzw. 86,4% an (vgl.Abb.103).

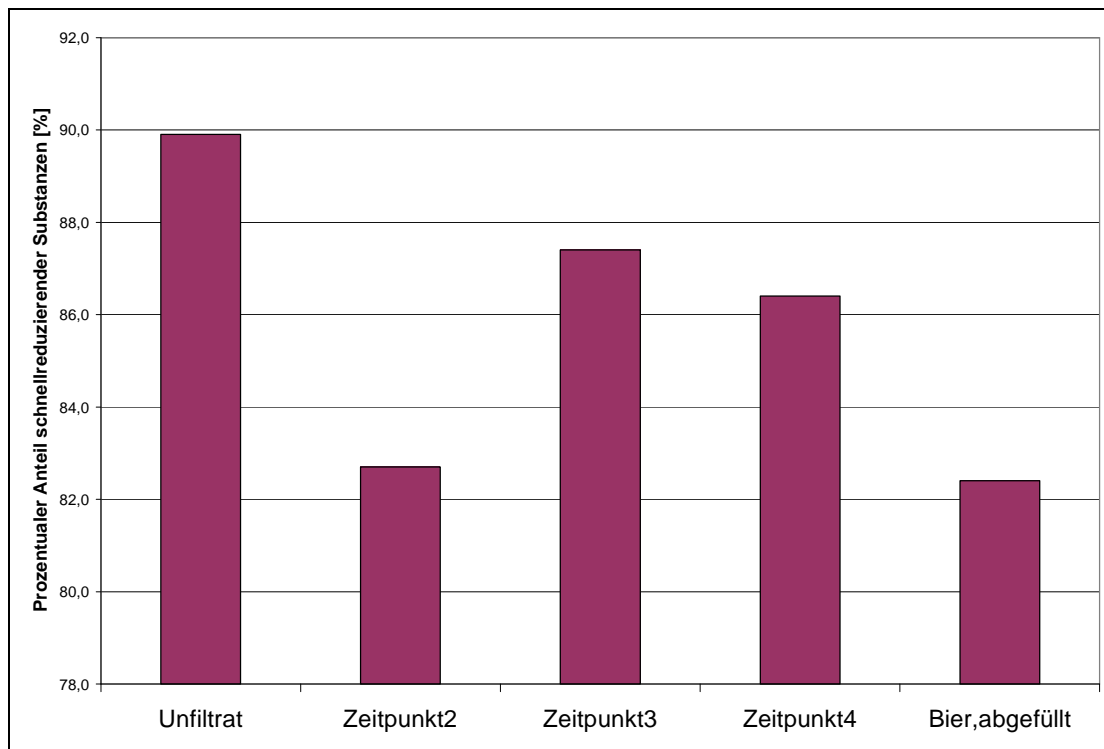


Abb.103: Anteil schnellreduzierender Substanzen bei gerbstoffseitiger Stabilisierung

Auffällig niedrig war der Anteil schnellreduzierender Substanzen im abgefüllten Bier.

So wie im Unfiltrat der Anteil schnellreduzierender Substanzen am höchsten war, so war auch der Anteil mittelschnell- und langsamreduzierender Substanzen hier am niedrigsten (vgl.Abb.104).

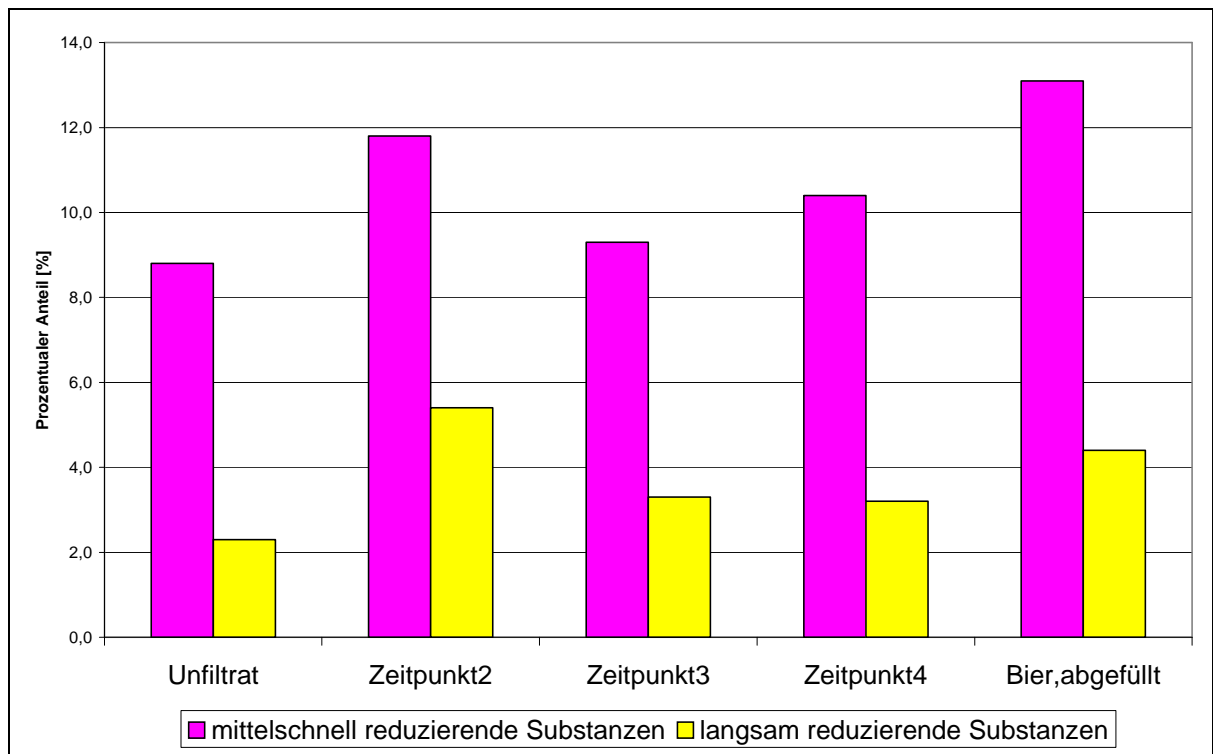


Abb.104: Anteil mittelschnellschnell- und langsamreduzierender Substanzen bei gerbstoffseitiger Stabilisierung

In der Probe zwei Stunden nach Filtrationsbeginn war dieser Anteil auf Kosten der schnellreduzierenden Substanzen deutlich erhöht. Im weiteren Verlauf der Filtration sank der Anteil der mittelschnell- und langsamreduzierenden Substanzen wieder.

Ähnlich wie beim Mittleren Nullstrompotential unterschieden sich auch die DPPH-reduzierenden Aktivitäten der einzelnen Proben, wobei hier eine eindeutige Tendenz zu erkennen war (vgl.Abb.105).

Durch die PVPP-Stabilisierung sank der Extinktionsunterschied nach zwei Stunden Filtrationsdauer um 0,139, was einen deutlich höheren Abfall der Aktivität durch die PVPP-Stabilisierung bedeutete als bei der eiweißseitigen Stabilisierung.

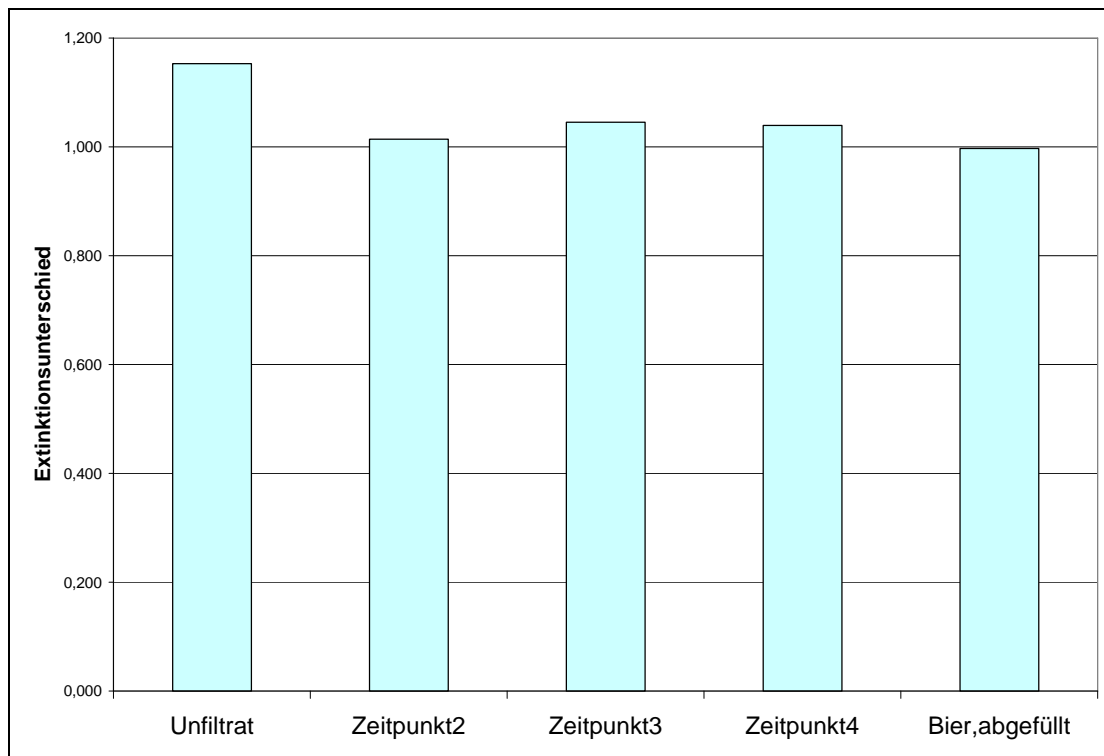


Abb.105: DPPH-reduzierende Aktivität bei gerbstoffseitiger Stabilisierung

Im Verlauf der Filtration hingegen stieg der Extinktionsunterschied wieder an.

Niedriger war auch hier der Extinktionsunterschied beim in der Brauerei abgefüllten Bier.

Bei der Entwicklung der reduzierenden Substanzen nach Chapon war ein ähnliches Verhalten wie bei rein eiweißseitiger Stabilisierung zu beobachten:

Eine deutliche Abnahme im Filtrat gegenüber dem Unfiltrat, etwa in der selben Größenordnung wie bei der eiweißseitigen Stabilisierung, etwa um 0,7 mval/l (vgl.Abb.106).

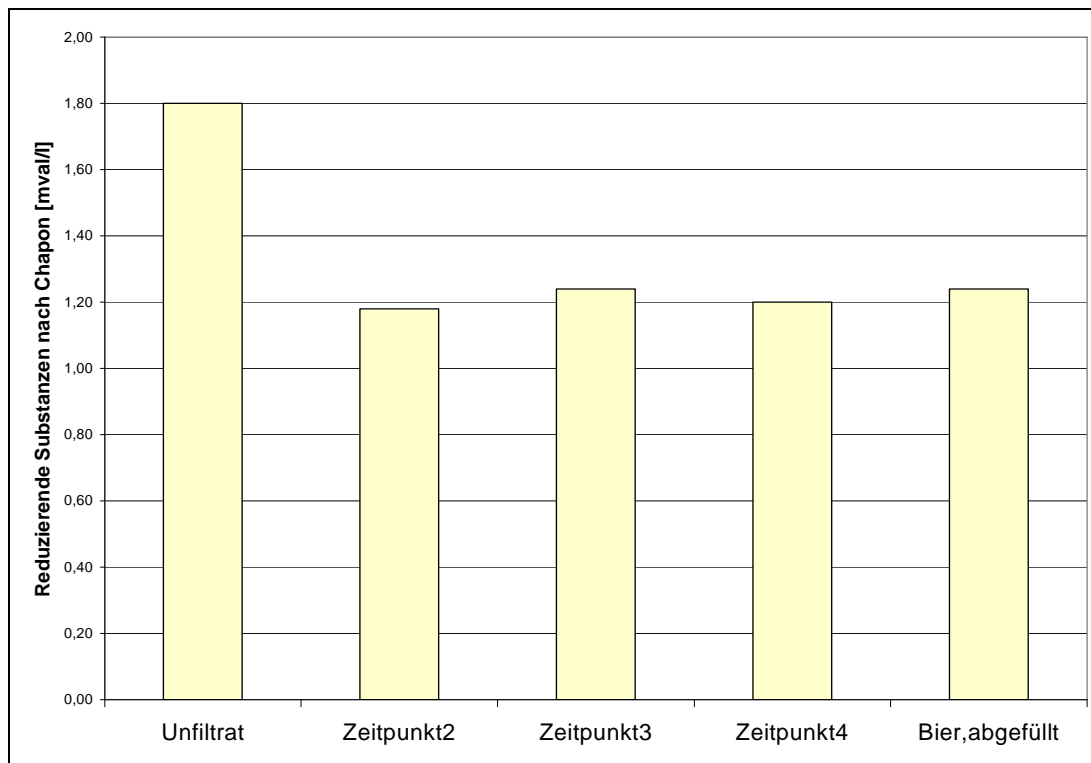


Abb.106: Reduzierende Substanzen nach Chapon bei gerbstoffseitiger Stabilisierung

Der Gehalt an Gesamtpolyphenolen wurde durch die PVPP-Stabilisierung erwartungsgemäß stark herabgesetzt (vgl.Tab.13). So wurden nach zwei Stunden Filtrationsdauer nur noch 74 mg/l gegenüber 96 mg/l im Unfiltrat bestimmt. Im weiteren Verlauf der Filtration stieg der Gesamtpolyphenolgehalt wieder auf 80 mg/l an. Auch hier fiel das in der Brauerei abgefüllte Bier mit dem niedrigsten Polyphenolgehalt von 64 mg/l aus der Reihe.

Tab.13: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene bei PVPP-Stabilisierung

	Gesamtpolyphenole [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]
Unfiltrat	96	23,6
Zeitpunkt 2	74	16,1
Zeitpunkt 3	75	18,1
Zeitpunkt 4	80	18,8
Bier, abgefüllt	64	14,7

Deutlich war auch die Abnahme der Anthocyanogene zu beobachten:

Von 23,6 mg/l auf 16,1 mg/l bei der Probe nach zwei Stunden Filtrationsdauer. Im weiteren Verlauf stieg der Gehalt auf 18,1 mg/l bzw. 18,7 mg/l an.

Diskussion zum Einfluss verschiedener Stabilisierungsmittel

Deutlich wurde in dieser Versuchsreihe, dass sich ohne PVPP-Stabilisierung während der Filtration keine durch den Gehalt an elektroaktiven Reduktionen bedingten Unterschiede ergaben. In diesem Zusammenhang muß noch einmal auf die Zusammensetzung des Mittleren Nullstrompotentials hingewiesen werden: Problematisch war stets die Messung des 1.Nullstrompotentials, da dieses stark durch den Gehalt an gelösten Sauerstoff beeinflusst wurde. Wie Tabelle 13 zeigt, war die ermittelte Erhöhung des Potentials im Verlaufe der Filtration nicht etwa auf einen Rückgang der elektrochemisch wirksamen Antioxidantien zurückzuführen, sondern auf Zutritt von Sauerstoff bei der Filtration oder Probenahme. Wären Antioxidantien bei der Filtration adsorbiert worden, hätte dies auch zu einer Erhöhung des 2.Nullstrompotentials führen müssen. Die Werte für das 2.Nullstrompotential blieben jedoch relativ konstant, weshalb von keiner grossen Adsorption elektroaktiver Substanzen ausgegangen werden kann. Parallel dazu führte die Filtration auch zu keinem Rückgang bei Polyphenolen und Anthocyanogenen.

Die PVPP-Stabilisierung hingegen hat einen grossen Einfluss auf das Potential, wie auch den Gehalt an phenolischen Substanzen.¹ Zu Beginn der Stabilisierung ist die Adsorption der phenolischen Substanzen am Stabilisierungsmittel PVPP deutlich am stärksten. Dies führte zu einem deutlichen Rückgang der Gesamtpolyphenole und noch stärker der Anthocyanogene gegenüber dem Unfiltrat. Begleitet ist dieser Stabilisierungseffekt von einem deutlichen Anstieg des Mittleren Nullstrompotentials. Hier spricht das Nullstrompotential, wie auch bei der Zugabe von phenolischen Substanzen, sehr stark auf Veränderungen bei antioxidativ wirkenden phenolischen Substanzen an. Der Rückgang wichtiger Radikalfänger durch gerbstoffseitige Stabilisierung war hier einfach mittels des Mittleren Nullstrompotentials nachweisbar. Je mehr phenolische Substanzen also adsorbiert wurden, desto höher war das Mittlere Nullstrompotential.

Es konnte auch kein Einfluß der rein eiweißseitigen Stabilisierung auf das Stromverhältnis festgestellt werden. Wenn wir hingegen die Werte für unsere kleintechnischen Versuche betrachten, wird deutlich, dass sich dort sowohl beim Nullstrompotential als auch beim Stromverhältnis eine Verschlechterung der antioxidativen Eigenschaften zeigte.

¹ Mc Murrough, I., Madigan, D., Kelly, R.J., "The Role of Flavanoid Polyphenols in Beer Stability", J. Am. Soc. Brew. Chem, 54(3), 1996, S.141-148

Zurückzuführen ist dieser Effekt auf die höhere Sauerstoffaufnahme bei der kleintechnischen Filtration. Trotz Maßnahmen wie längerem Spülen der verwendeten Corneliusbehälter ist durch die relativ grossen Oberflächen in unseren kleintechnischen Versuchen eine größere Sauerstoffaufnahme unvermeidlich.

Bei der polyphenolseitigen Stabilisierung wurde nur eine äußerst geringe Abnahme des Stromverhältnisses beobachtet. Diese geringe Beeinflussung des Stromverhältnisses durch die PVPP-Stabilisierung weist darauf hin, dass die durch die Stabilisierung entfernten phenolischen Substanzen hinsichtlich des elektrochemischen Indikator-Time-Tests zu den gegenüber DCI äußerst langsam reduzierenden Substanzen gehören.

Was auffällt, ist der grosse Einfluss der Filtration auf die reduzierenden Substanzen nach Chapon. Unabhängig davon ob stabilisiert wurde oder nicht, sank die Reduktionskraft gegenüber dreiwertigem Eisen deutlich ab. Da weder DPPH-reduzierende Aktivität, Potential oder Stromverhältnis durch die Filtration ohne Stabilisierung stark beeinflusst wurden, kann ein erhöhter Sauerstoffeintrag als Ursache für diesen Rückgang ausgeschlossen werden, da diese Analysenwerte sonst auch sehr stark beeinflusst werden würden. Insofern muss eine Adsorption von Reduktionen am Filterhilfsmittel bzw. an der entfernten Hefe oder Trübungsteilchen vorliegen.

4.4.2 Einfluss von unterschiedlichen Stabilisierungsmethoden und Sauerstoff

Vom Unfiltrat eines grosstechnische hergestellten Bieres wurde ein Teil mit dem Anschwemmfilter der Pilotbrauerei zum einen ausschließlich kieselgurfiltriert (120g/hl Dosage), der andere Teil eiweiß- und polyphenolseitig stabilisiert (50g/l Xerogel und 50g/hl PVPP). Anschließend wurden durch Belüftung des Filtrats unterschiedliche Sauerstoffgehalte eingestellt. Die Biere wurden kurz darauf analysiert. Weitere Proben wurden einem 40°C/0°C Forciertest unterzogen. Nach dem Überschreiten einer Trübung von 2 EBC Einheiten wurden diese forcierten Biere untersucht.

4.4.2.1 Reine Kieselgurfiltration

In der unbelüfteten Probe wurde gleich nach dem Abfüllen ein Gesamtsauerstoffgehalt von 0,06 mg/l festgestellt. Der Gesamtsauerstoffgehalt bei den belüfteten Proben betrug 0,18 mg/l bzw. 0,57 mg/l.

Frische kieselgurfiltrierte Biere

Bei den frischen Bierchen wiesen die belüfteten Biere mit 402,5 mV bzw. 401,7 mV ein etwas niedrigeres Mittleres Nullstrompotential auf als das unbelüftete Bier mit 406,4 mV (vgl. Abb. 107).

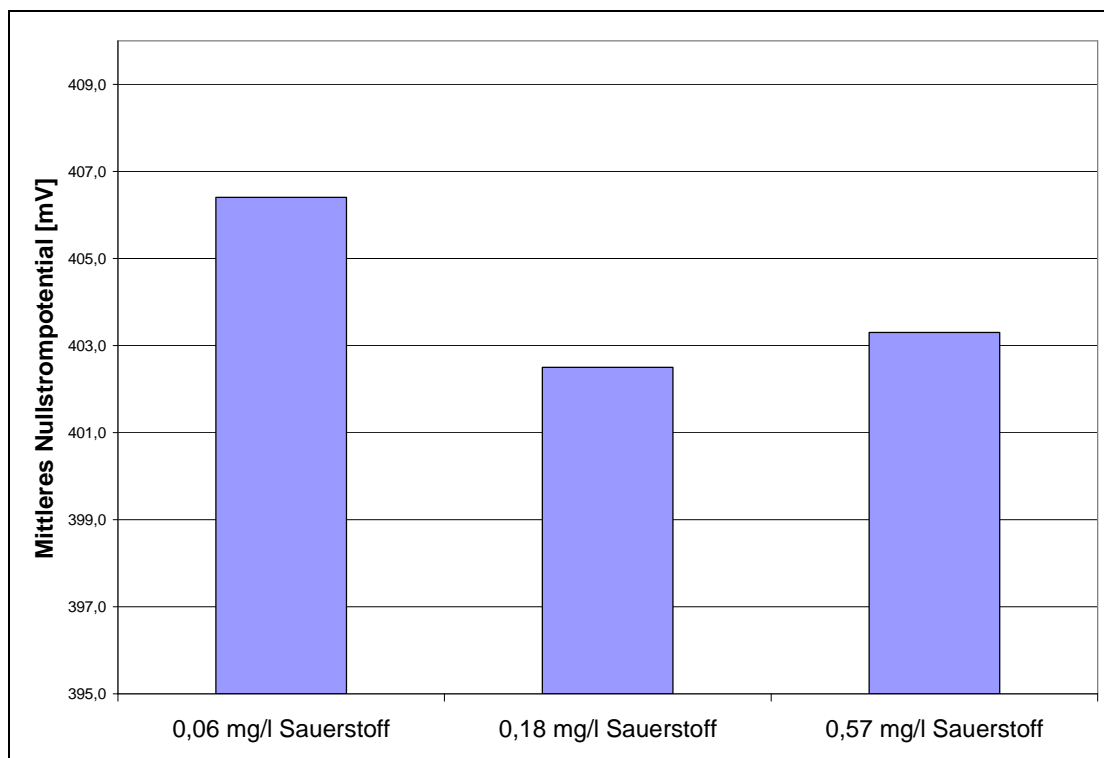


Abb 107: Sauerstoffbelastung und Mittleres Nullstrompotential bei Bier ohne PVPP-Stabilisierung

Das höchste Stromverhältnis war beim unbelüfteten Bier mit 1,83 zu beobachten. Etwas geringer war das Stromverhältnis bei einem Gesamtsauerstoffgehalt von 0,18mg/l mit 1,76 und bei 0,57 mg/l mit 1,70 (vgl. Abb.108).

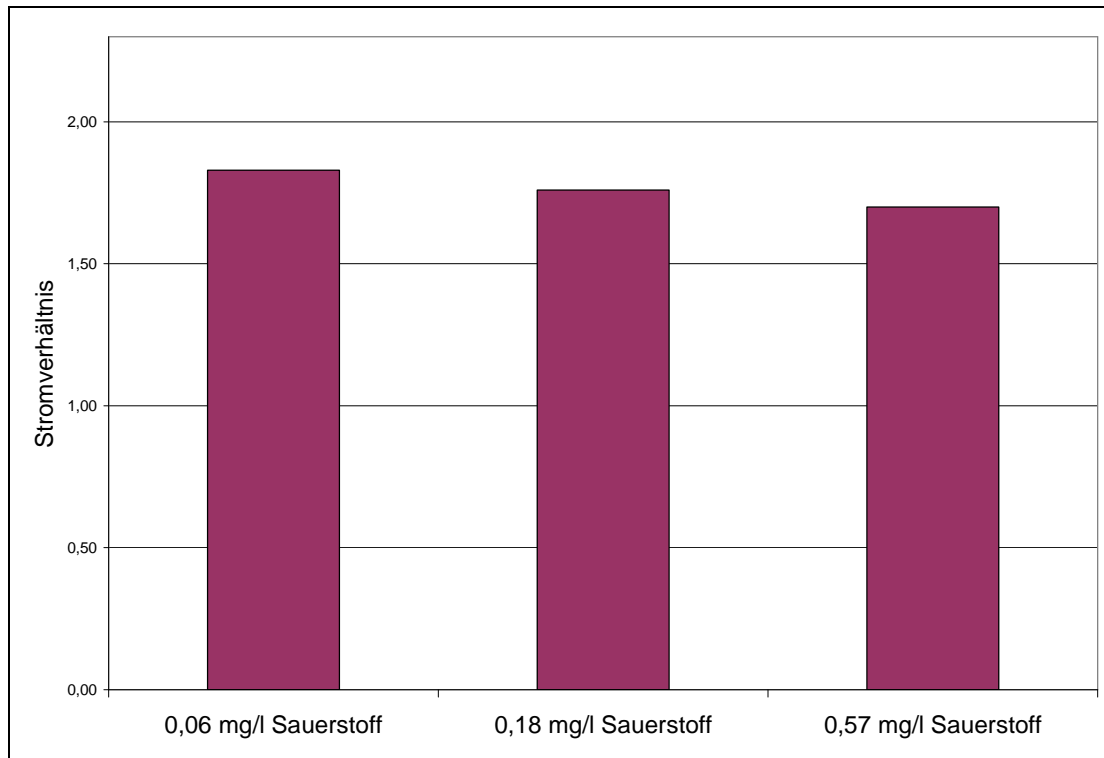


Abb.108: Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis bei Bier ohne PVPP-Stabilisierung

Die frischen Bieren wiesen keinen Unterschied beim Gehalt an Gesamtpolyphenolen auf (vgl.Tab.14)

Tab.14: Sauerstoffbelastung und Gesamtpolyphenolgehalt ohne PVPP-Behandlung

Gesamtsauerstoff [mg/l]	Gesamtpolyphenole [mg/l]	
	Frisches Bier	Forciertes Bier
0,06	197	206
0,18	196	205
0,57	195	202

Tab.15: Sauerstoffbelastung und Anthocyanogengehalt ohne PVPP-Behandlung

Gesamtsauerstoff [mg/l]	Anthocyanogene [mg/l]	
	Frisches Bier	Forciertes Bier
0,06	41,1	48,2
0,18	40,0	48,2
0,57	42,5	52,1

Auch der Gehalt an Anthocyanogenen unterschied sich nicht (vgl. Tab.15).

Forcierte kieselgurfiltrierte Biere

Nach dem Forcieren lag beim unbelüfteten Bier das mit 398,8 mV niedrigste Mittlere Nullstrompotential vor. Mit steigendem ursprünglichen Gesamtsauerstoffgehalt nahm auch das Mittlere Nullstrompotential der forcierten Biere zu. 399,9 mV betrug das Mittlere Nullstrompotential beim auf 0,18 mg/l belüfteten Bier, 401,7mV beim auf 0,57 mg/l belüfteten Bier(vgl.Abb.109).

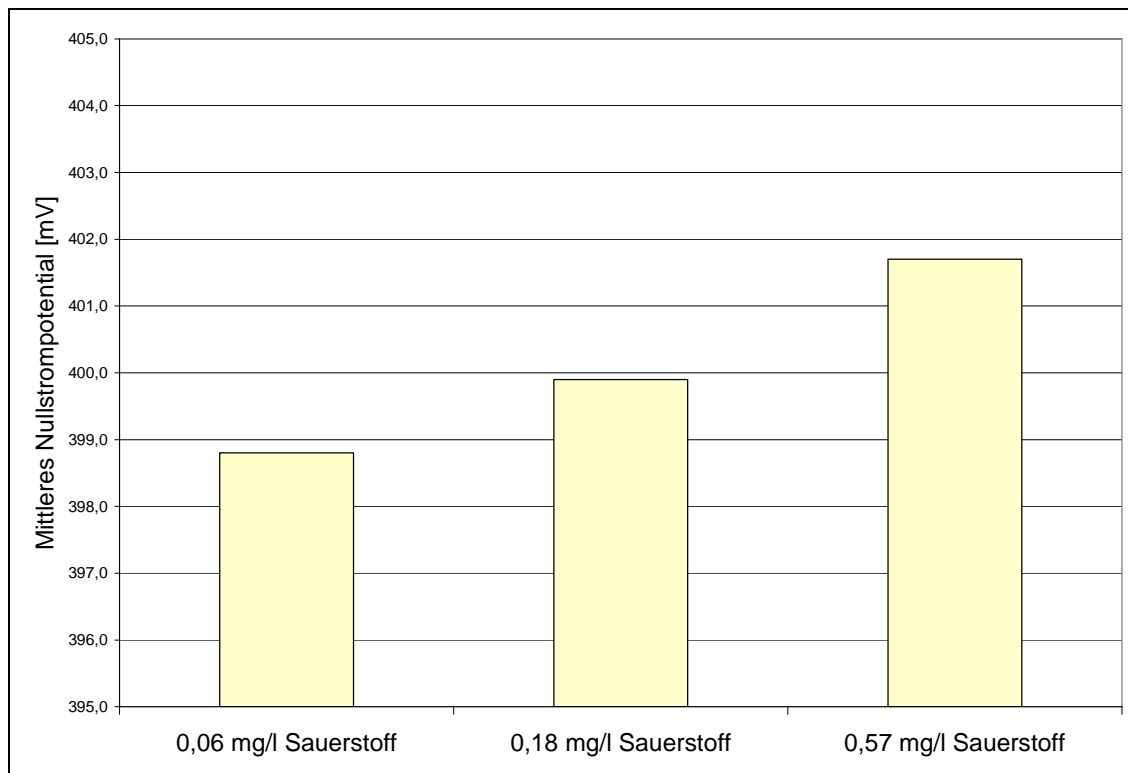


Abb.109: Sauerstoffbelastung und Mittleres Nullstrompotential bei forciertem Bier ohne PVPP-Stabilisierung

Auch das Stromverhältnis war bei den forcierten Bieren abhängig vom ursprünglichen Sauerstoffgehalt. Das mit Abstand niedrigste Stromverhältnis wurde beim Bier mit dem ursprünglichen Sauerstoffgehalt von 0,57 mg/l gemessen(vgl.Abb.110).

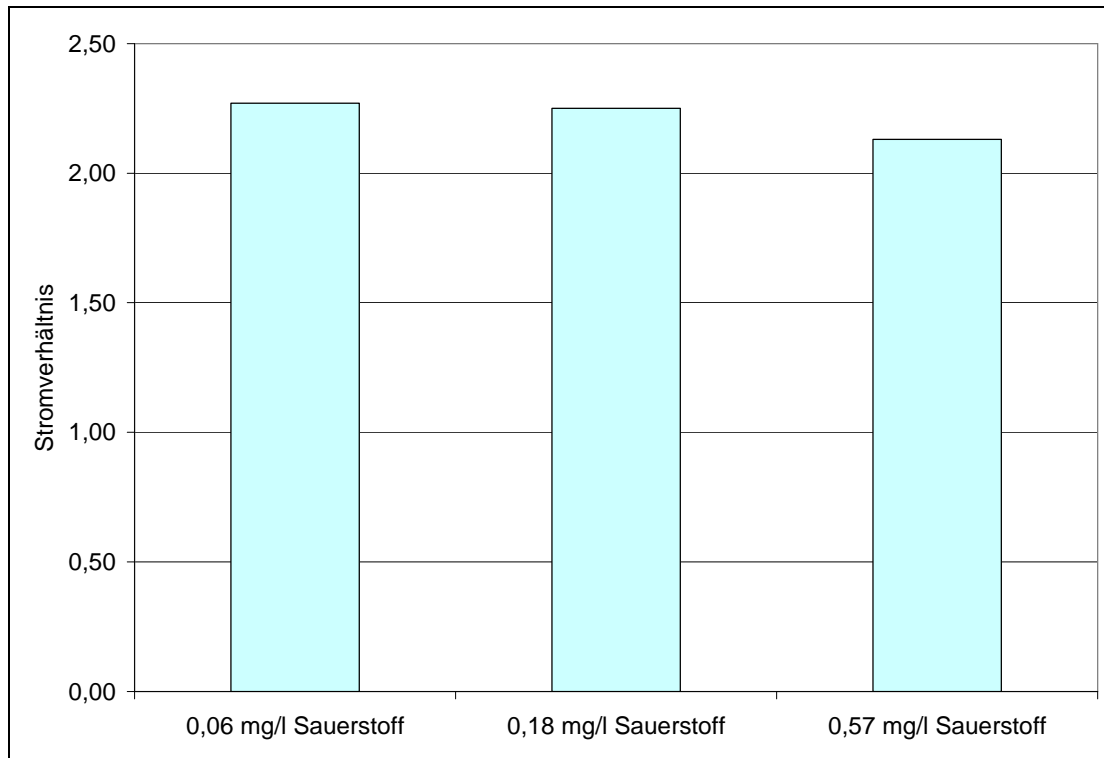


Abb.110: Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis bei forciertem Bier ohne PVPP-Stabilisierung

Bei den forcierten Bieren ließ sich bei den Gesamtpolyphenolen kein Unterschied feststellen (vgl.Tab.14).

Es lag auch bei den Anthocyanogenen ebenfalls kein Unterschied vor (vgl.Tab.15)

4.2.2.2 PVPP-stabilisiertes Bier

Frisches PVPP-stabilisiertes Bier

Im unbelüfteten PVPP-stabilisierten Bier wurde ein Gesamtsauerstoffgehalt von 0,06 mg/l bestimmt. In den belüfteten Proben wurden 0,31 mg/l bzw. 0,59 mg/l Gesamtsauerstoff gemessen.

Beim dem frischen Bieren besteht kein Zusammenhang zwischen Sauerstoffgehalt und Mittlerem Nullstrompotential (vgl.Abb.111)

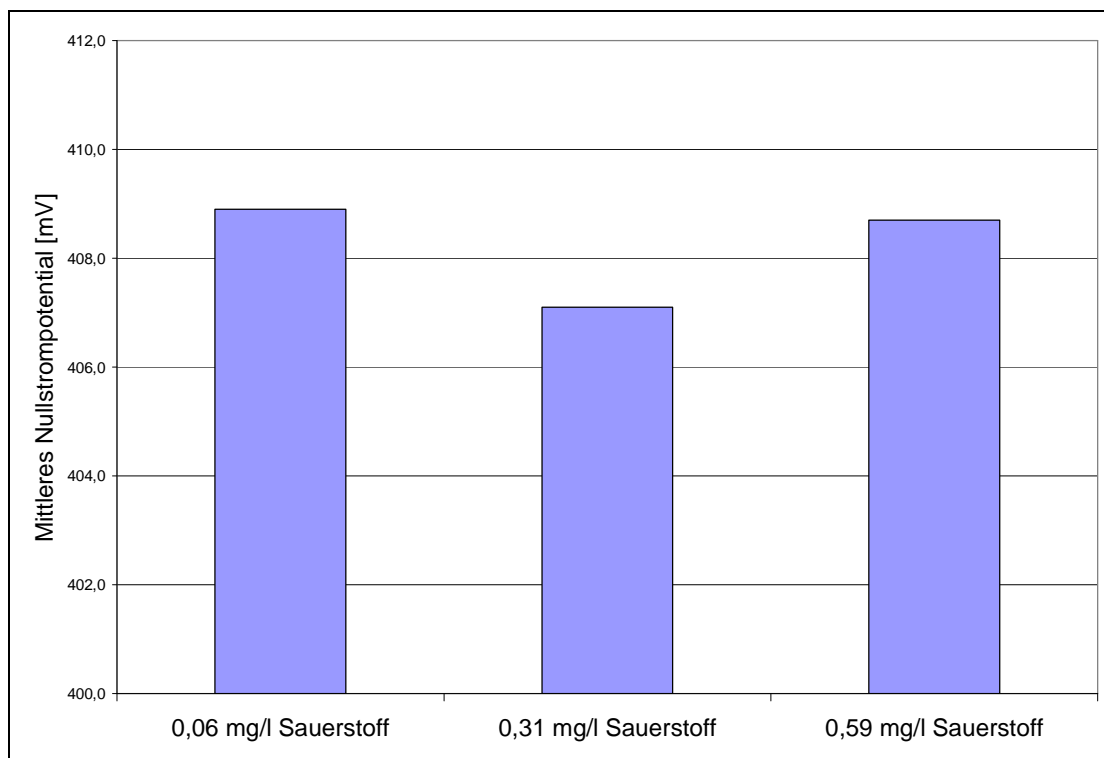


Abb.111: Sauerstoffbelastung und Mittleres Nullstrompotential bei Bier mit PVPP-Stabilisierung

Wie bei den frischen nur kieselgurfiltrierten Bieren ließ sich eine leichte Abnahme des Stromverhältnisses mit steigenden Sauerstoffgehalten beobachten:

1,84 beim unbelüfteten Bier, 1,75 beim Bier mit 0,31 mg/l Gesamtsauerstoffgehalt und 1,69 beim Bier mit 0,59 mg/l (vgl.Abb.112).

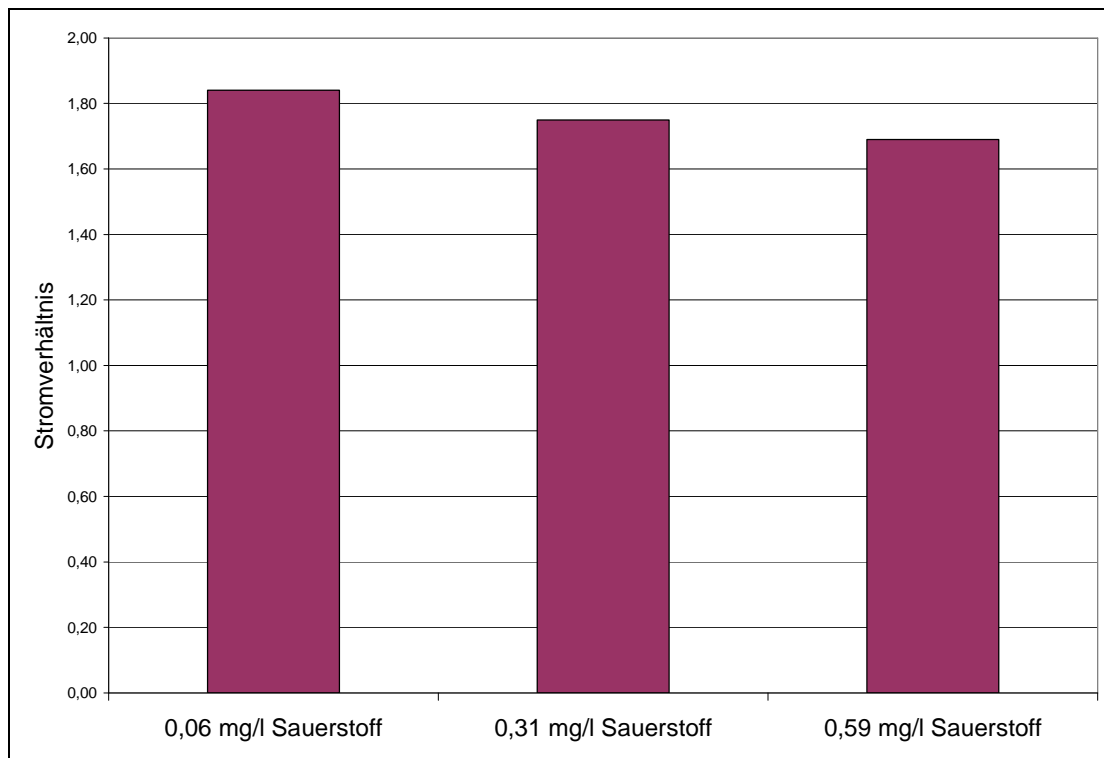


Abb.112: Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis bei Bier mit PVPP-Stabilisierung

Tab.16: Sauerstoffbelastung und Gesamtpolyphenolgehalt mit PVPP-Behandlung

Gesamtsauerstoff [mg/l]	Gesamtpolyphenole[mg/l]	
	frisches Bier	forciertes Bier
0,06	128	134
0,31	131	135
0,59	128	129

Die Gesamtpolyphenole bewegten sich in einem Bereich von ungefähr 130 mg/l (vgl.Tab.16).

Damit war der Gehalt gegenüber den nicht PVPP-stabilisierten Proben um etwa 70 mg/l vermindert (vgl. Tab.14)

Auch bei den Anthocyanogenen war kein Unterschied in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt zu beobachten (vgl.Tab.17). Im Vergleich zum nicht mit PVPP-stabilisierten Bier war jedoch eine Abnahme um etwa 50% zu beobachten(vgl.Tab.15)

Tab.17: Sauerstoffbelastung und Anthocyanogehalt mit PVPP-Behandlung

Gesamtsauerstoff [mg/l]	Anthocyanogene[mg/l] frisches Bier	Anthocyanogene[mg/l] forciertes Bier
0,06	22,9	23,2
0,31	23,9	22,8
0,59	24,0	24,4

Forciertes PVPP-stabilisiertes Bier

Das niedrigste Mittlere Nullstrompotential wurde beim unbelüfteten forcierten Bier mit 437,9 mV gemessen. Die belüfteten Biere hatten mit 441,5 mV bzw. 439,9 mV ein etwas höheres Potential (vgl.Abb.113)

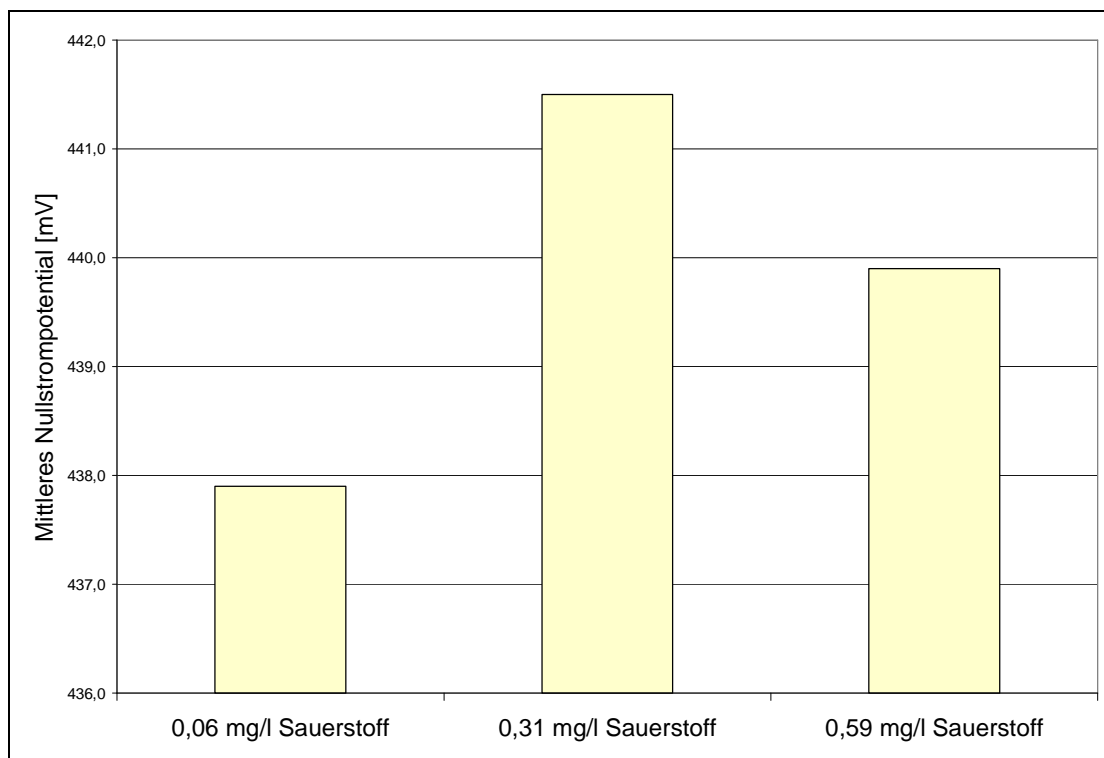


Abb.113 :Sauerstoffbelastung und Mittleres Nullstrompotential bei forciertem Bier mit PVPP-Stabilisierung

Bei den forcierten PVPP-stabilisierten Bieren ist das Stromverhältnis stark abhängig von den Sauerstoffgehalten.

Während im unbelüfteten Bier noch ein Stromverhältnis von 1,60 vorlag, wurde beim Bier mit einem ursprünglichen Gesamtsauerstoffgehalt von 0,59 mg/l ein Stromverhältnis von 0,89 bestimmt (vgl.Abb.114).

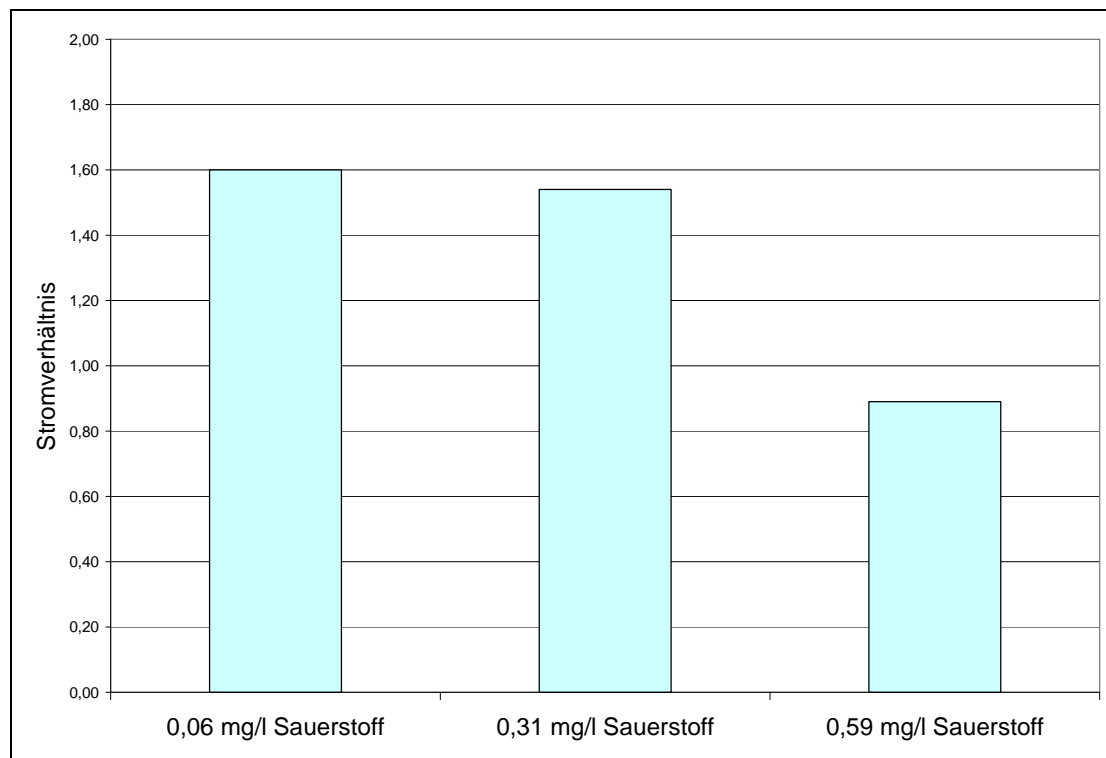


Abb.114: Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis bei forciertem Bier mit PVPP-Stabilisierung

Die Gehalt an Gesamtpolyphenolen war auch im forcierten Bier unabhängig vom ursprünglichen Gesamtsauerstoffgehalt und veränderte sich auch durch das Forcieren nicht gegenüber den frischen Bieren (vgl.Tab.16).

Auch der Gehalt an Anthocyanogenen wurde nicht durch den Sauerstoffgehalt beeinflusst. Es erfolgte auch keine Veränderung im Gehalt durch das Forcieren (vgl.Tab.17).

4.2.2.3 Veränderung der Messwerte durch das Forcieren

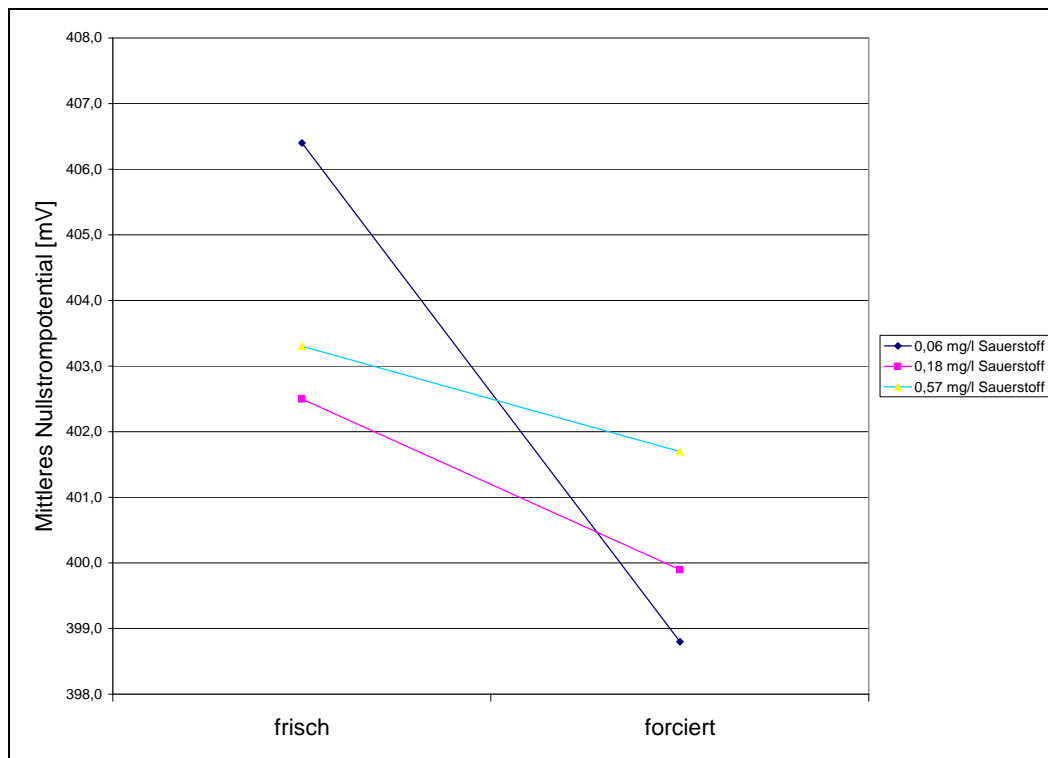


Abb.115: Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials ohne PVPP-Stabilisierung

Bei den nicht PVPP-stabilisierten Proben war eine Abnahme des Mittleren Nullstrompotentials beim Forcieren zu beobachten. Diese Abnahme war stark vom Sauerstoffgehalt beeinflusst. So nahm das Mittlere Nullstrompotential beim unbelüfteten Bier um 7,6 mV ab, beim Bier mit einem ursprünglichen Sauerstoffgehalt von 0,57 mg/l nur um 1,6 mV (vgl. Abb.115).

Eine völlig andere Entwicklung des Potentials war bei den PVPP-stabilisierten Proben zu beobachten. Das Mittlere Nullstrompotential steigt bei allen drei Proben deutlich an, wobei der Anstieg bei der unbelüfteten Probe etwas geringer ausfällt (vgl. Abb.116).

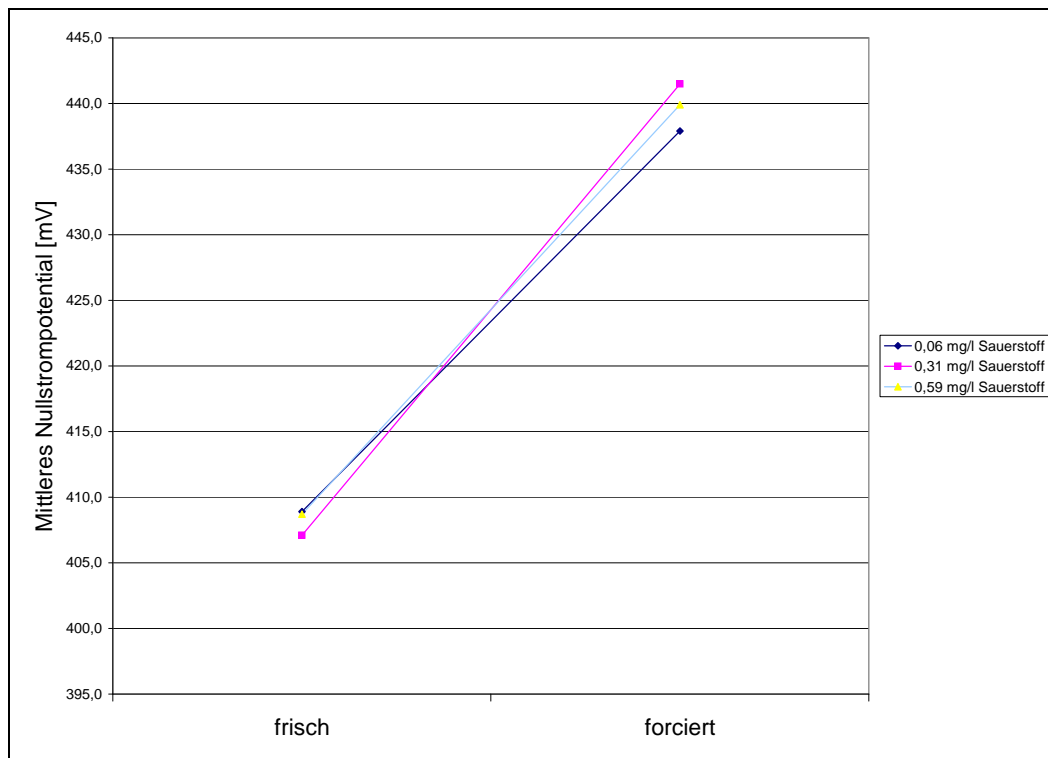


Abb.116: Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials mit PVPP-Stabilisierung

Das Stromverhältnis stieg bei allen drei nicht PVPP-stabilisierten Proben etwa in der Größenordnung von 0,4 an. Dieser Anstieg war nicht abhängig vom Sauerstoffgehalt (vgl.Abb.117). Damit wies auch nach dem Forcieren das Bier mit dem höchsten ursprünglichen Sauerstoffgehalt das etwas geringere Stromverhältnis auf.

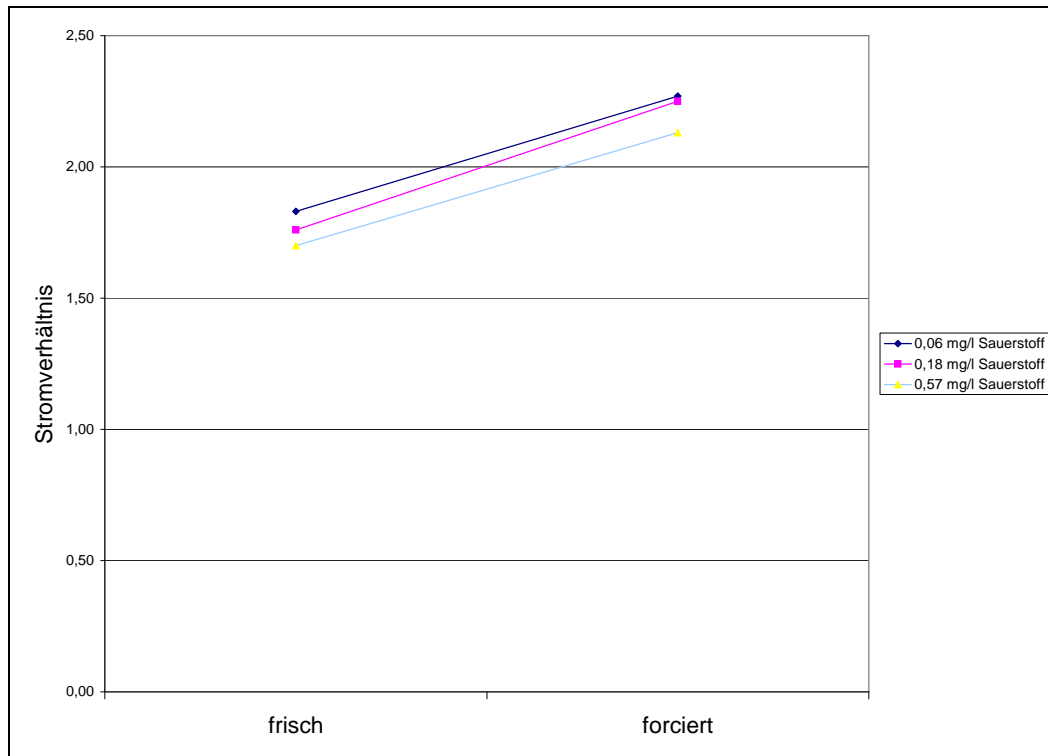


Abb.117: Entwicklung des Stromverhältnisses ohne PVPP-Stabilisierung

Beim PVPP-stabilisierten Bier hingegen ist beim Forcieren ein deutlicher Rückgang des Stromverhältnisses zu beobachten(vgl.Abb.118).

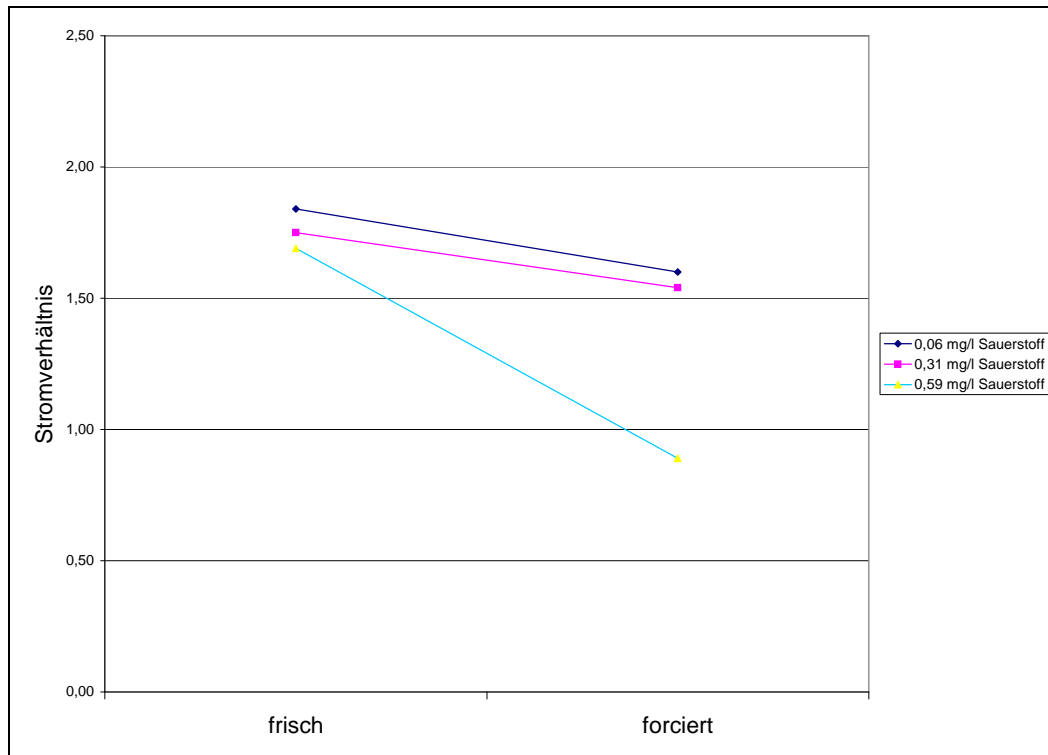


Abb.118: Entwicklung des Stromverhältnisses mit PVPP-Stabilisierung

Am deutlichsten war dieser Rückgang um 0,70 beim Bier mit einem ursprünglichen Sauerstoffgehalt von 0,59 mg/l, während die anderen Stromverhältnisse bei niedrigerer Sauerstoffbelastung nur um 0,24 bzw. 0,19 abnahmen.

Sowohl bei dem PVPP-stabilisierten als auch beim nicht stabilisierten Bier war keine Veränderung des Polyphenolgehaltes zu erkennen.

Bei den PVPP-stabilisierten Bieren konnte man keine Veränderung der Anthocyanogene beobachten.

Bei den nur eiweißseitig stabilisierten Bieren hingegen stieg der Gehalt an Anthocyanogenen bemerkenswerterweise leicht an. Dieser Anstieg war unabhängig vom Sauerstoffgehalt und betrug etwa 8mg/l.

Diskussion zum Einfluss der PVPP-Stabilisierung und des Sauerstoffgehaltes

Bei den frischen Bieren war sowohl beim nur kieselgurfiltrierten, als auch beim PVPP-stabilisierten Bier beim mittleren Nullstrompotential keine Erhöhung durch stärkere Sauerstoffbelastung zu beobachten. Dies steht in keinem Widerspruch zu den Ergebnissen der Versuchsreihe, bei der ein erhöhter Sauerstoffeintrag schon einige Stunden nach der Abfüllung nachgewiesen werden konnte. Die Sauerstoffgehalte waren jedoch mit 0,6-2,8 mg/l deutlich höher als bei dieser Versuchsreihe. Ein Nachweis dieses im Vergleich dazu relativ geringen Sauerstoffeintrags über das Mittlere Nullstrompotential nach kurzer Zeit ist also nicht möglich, wobei keine Unterschiede zwischen polyphenolseitig stabilisiertem und nicht polyphenolseitig stabilisierten Bieren bestehen.

Bemerkenswert sind die niedrigeren Potentiale bei Belüftung des nur eiweißseitig behandelten Bieres bei höheren Sauerstoffwerten, die nicht zu erklären sind (vgl. Abb. 107).

Der Einfluß der PVPP-Stabilisierung ist hingegen deutlich sichtbar.

So ist das Potential beim zusätzlich polyphenolseitig stabilisierten Bier gegenüber dem eiweißseitig stabilisierten um Werte bis zu über 5mV erhöht (vgl. Abb. 115, 116). Die PVPP-Stabilisierung brachte, wie in einer weiteren Versuchsreihe bereits nachgewiesen, eine Reduzierung der elektroaktiven Substanzen. Die deutliche Abnahme von Polyphenolen und Anthocyanogenen durch die PVPP-Stabilisierung zeigt, daß ein enger Zusammenhang besteht zwischen dem Verlust an phenolischen Substanzen und dem cyclovoltammetrisch ermittelten Mittleren Nullstrompotential. Wie auch bei der Zugabe phenolischer Substanzen nachgewiesen wurde, reagiert das Mittlere Nullstrompotential sehr sensibel auf Veränderungen bei phenolischen Substanzen.

Die Abnahme des Stromverhältnisses mit steigenden Sauerstoffgehalten beim frischen Bier weist ein weiteres Mal darauf hin, dass es hauptsächlich die Gruppe der schnellreduzierenden Substanzen im Sinne des ITT ist und weniger die phenolischen Antioxidantien sind, die auch mit kleineren Mengen eingebrachten Sauerstoffs spontan reagieren.

Dies wird besonders deutlich, wenn man die Werte von frischem Bier des PVPP-stabilisierten und des nicht PVPP-stabilisierten Bieres vergleicht. Anders als das Nullstrompotential wurde das Stromverhältnis nicht durch die PVPP-Stabilisierung beeinträchtigt (vgl. Abb. 117, 118). Das bedeutet, daß bei PVPP-Stabilisierung mit eiweißseitiger Stabilisierung in dieser Versuchsreihe nicht mehr schnellreduzierende ITT-Substrate zurückgehalten wurden, als bei ausschließlicher Kieselgurfiltration.

Nach dem Forcieren zeigte sich deutlicher der Einfluß unterschiedlicher Sauerstoffgehalte. Beim rein eiweißseitig stabilisiertem Bier sank das Mittlere Nullstrompotential durch das Forcieren, was bedeutet, dass eine Zunahme elektroaktiver Substanzen durch das Forcieren

stattgefunden haben muß (vgl. Abb. 115). Niedrige Sauerstoffgehalte begünstigten diese Zunahme, sodaß bei dem fast sauerstofffrei abgefüllten Bier die größte Absenkung des Potentials stattfand. Wie oft in anderen Versuchen auch bestand hier ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Absenkung des Potentials bei der forcierten Alterung und einer Steigerung der schnellreduzierenden ITT-Substanzen. Hier ist dieser Effekt zu beobachten als Anstieg des Stromverhältnisses bei der Alterung (vgl. Abb. 117). So kann auch hier von einer gleichzeitigen Zunahme schneller ITT-Reduktone wie auch elektroaktiver Reduktone gesprochen werden. Die Zunahme der schnellreduzierenden Substanzen ist jedoch unabhängig von dem ursprünglichen Sauerstoffgehalt. Einer verstärkten Oxidation dieser Substanzen und damit einem geringeren Anstieg oder gar Rückgang an schnellreduzierenden Reduktonen wird hier durch den ursprünglich hohen Gehalt an Antioxidantien entgegen gewirkt. Vergleicht man die Entwicklung beim nur kieselgurfiltrierten Bier mit der beim PVPP-stabilisierten Bier, sieht man, daß die Alterung bei letzterem genau gegenläufige Effekte auf die elektrochemischen Messungen hatte, als beim nicht PVPP-stabilisiertem Bier (vgl. Abb. 116 und 118). Die Potentiale stiegen bei der Alterung deutlich an, wobei der Anstieg bei niedrigerer Sauerstoffbelastung nur unwesentlich geringer ausfiel. Dieses Ergebnis kann in der Weise interpretiert werden, daß durch das nach der Stabilisierung von vornherein niedrigere Niveau an wirksamen phenolischen Antioxidantien einer Oxidation der elektroaktiven potentialbestimmenden Antioxidantien weniger stark vorbeugen kann. Im Vergleich dazu bewirkte das polyphenolreichere nur eiweißseitig stabilisierte Bier sogar eine Zunahme der Aktivität der durch die Cyclovoltametrie erfaßten Reduktone.

Auch die Entwicklung des Stromverhältnisses und damit der schnellreduzierenden Substanzen durch das Forcieren verlief beim PVPP stabilisierten Bier völlig anders als beim rein eiweißseitig stabilisierten Bier. Es war hier ein Rückgang des Stromverhältnisses bei der forcierten Alterung zu beobachten. Dieser Rückgang trat auch schon bei geringen Sauerstoffwerten auf. Wurden also verstärkt phenolische Substanzen durch PVPP-Stabilisierung entfernt (Rückgang der Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene) überwog im Verlauf der Alterung der Rückgang der schnellreduzierenden Substanzen gegenüber einer Neubildung. Dass dieser Rückgang in erster Linie durch oxidative Prozesse bedingt war, wird an der starken Abhängigkeit des Rückgangs vom ursprünglichen Sauerstoffgehalt deutlich. Ein Sauerstoffeintrag von 0,59 mg/l brachte beim Forcieren des PVPP-stabilisierten Bieres einen Rückgang um fast 50%.

Insgesamt scheint also die Feststellung Noels zuzutreffen, dass eine Entfernung von phenolischen Substanzen durch PVPP-Behandlung die Anfälligkeit des Schwefeldioxids und

des gesamten Bieres für oxidative Prozesse erhöht, was hier eindeutig durch unsere elektrochemischen Messungen nachgewiesen wurde¹.

Die Entwicklung von Nullstrompotential und Stromverhältnis polyphenolseitig-stabilisierten und nicht stabilisierten Bieres ist allein durch diese Messungen nicht voraussehbar. Wie beim Vergleich verschiedener Biere aus verschiedenen Brauereien müssen Informationen über andere Parameter (Stabilisierung, Sauerstoffeintrag, Rohstoffe) vorhanden sein.

Andererseits eignet sich in der innerbetrieblichen Analytik das elektrochemische Messverfahren gut, um die Größenordnung des Einflusses verschiedener Stabilisierungsmaßnahmen auf die Reduktone einzuschätzen.

¹ Noel, S., Methais, N., Bonte, S., Bodart, E., Peladan, F., Dupire, S., Collin, S., "The Use of Oxygen 18 in Appraising the Impact of Oxidation Process during Beer Storage", Journal of the Institute of Brewing, 105 (5), 1999, S.269-274

4.5 Einfluss der Gärtemperatur

Eine großtechnische hergestellte Würze wurde im Technikum mit verschiedenen Hauptgärungstemperaturen vergoren.

Dabei wurden 8°C, 15°C, 18°C und 20°C gewählt.

Mit Abstand das höchste Stromverhältnis wurde bei der Hauptgärtemperatur von 8°C mit 2,74 erreicht. Die geringste Reduktionskraft hingegen wurde im bei 15°C vergorenen Bier mit 2,09 festgestellt (vgl. Abb.119).

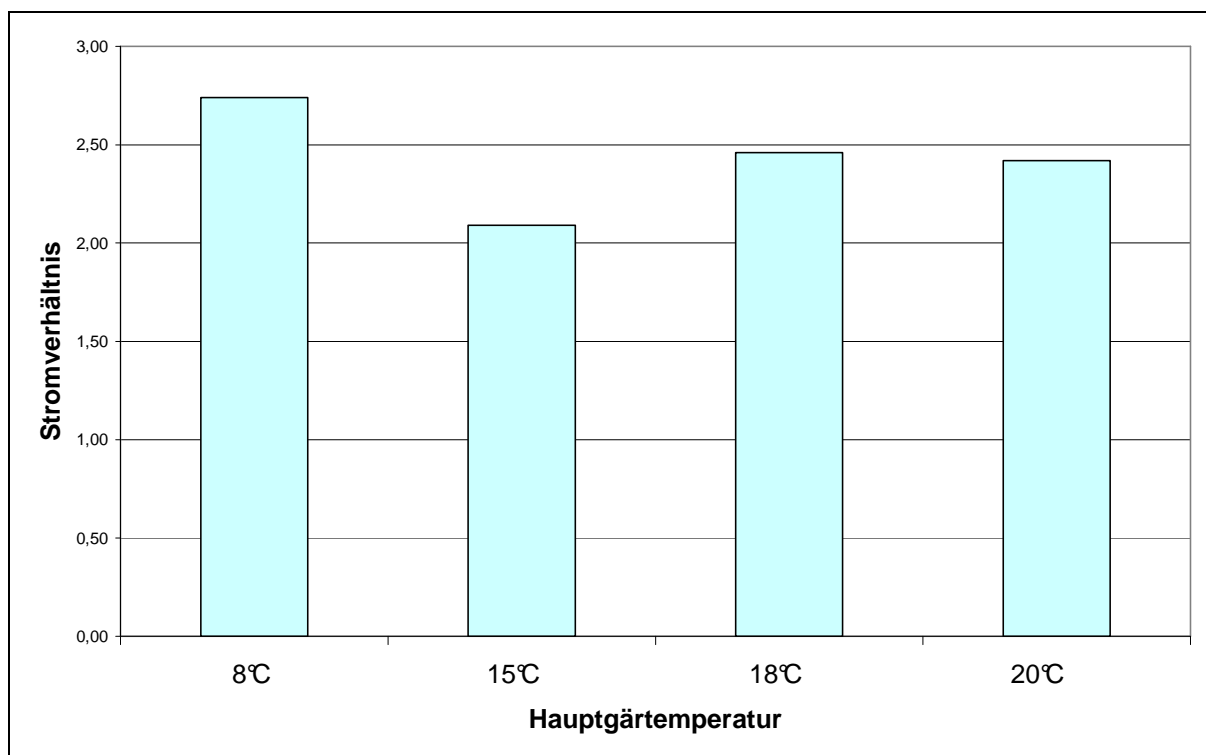


Abb.119: Stromverhältnis bei verschiedenen Hauptgärtemperaturen

Auch der relative Anteil der schnellreduzierenden Substanzen war bei den Proben mit Hauptgärtemperatur 8°C und 20°C am höchsten (vgl. Abb.1 20). Hier betrug der Anteil 84,3%.

Deutlich niedriger war dieser Anteil beim mit 15°C vergorenen Bier.

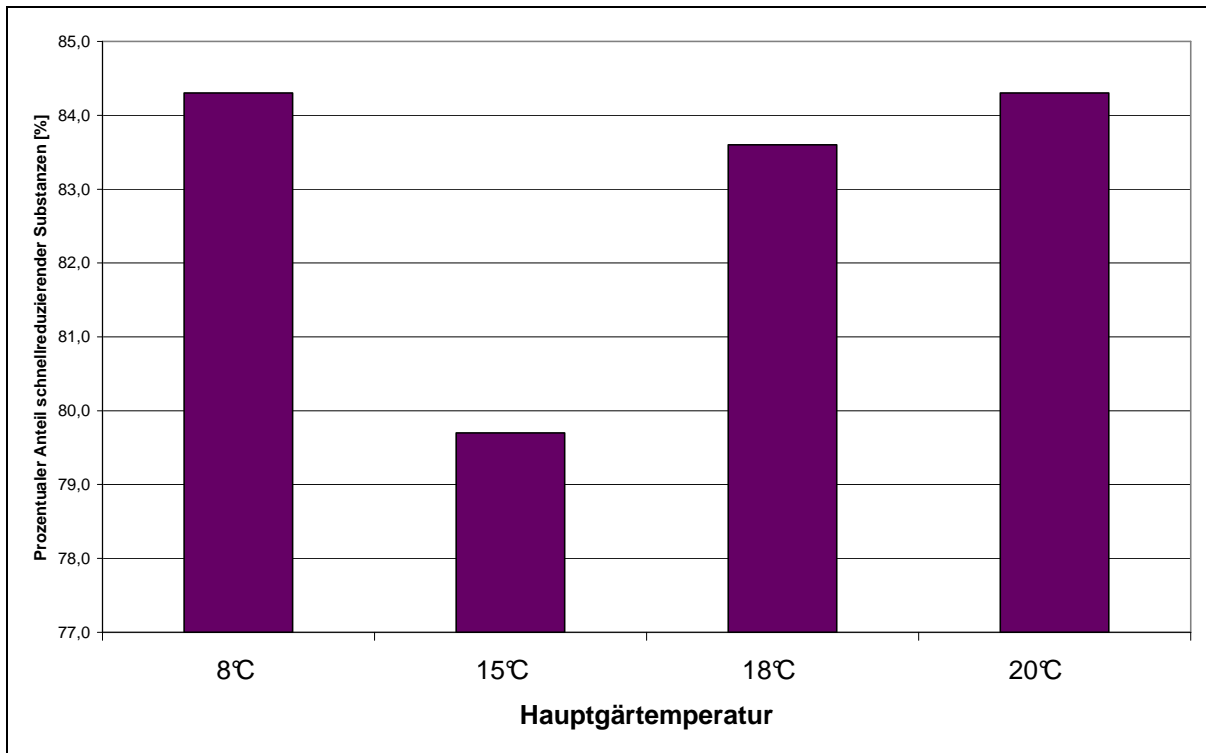


Abb.120: Anteil schnellreduzierender Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

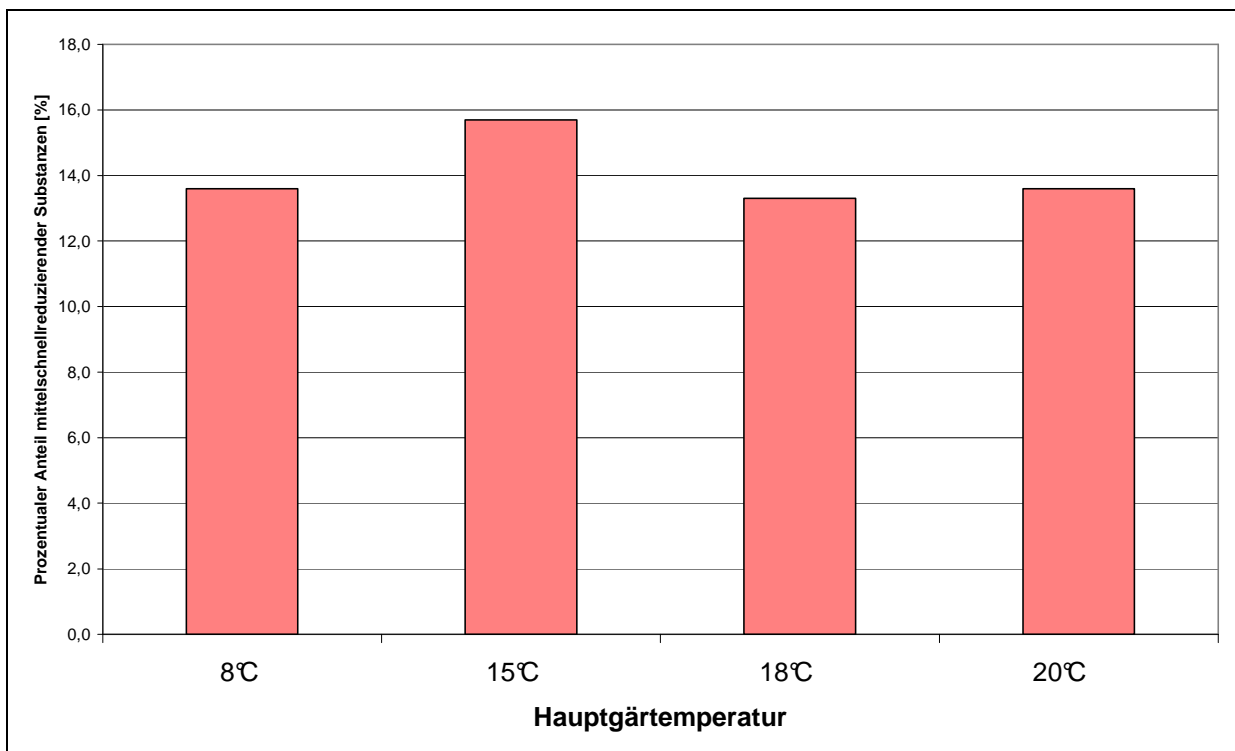


Abb.121: Anteil mittelschnellreduzierender Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

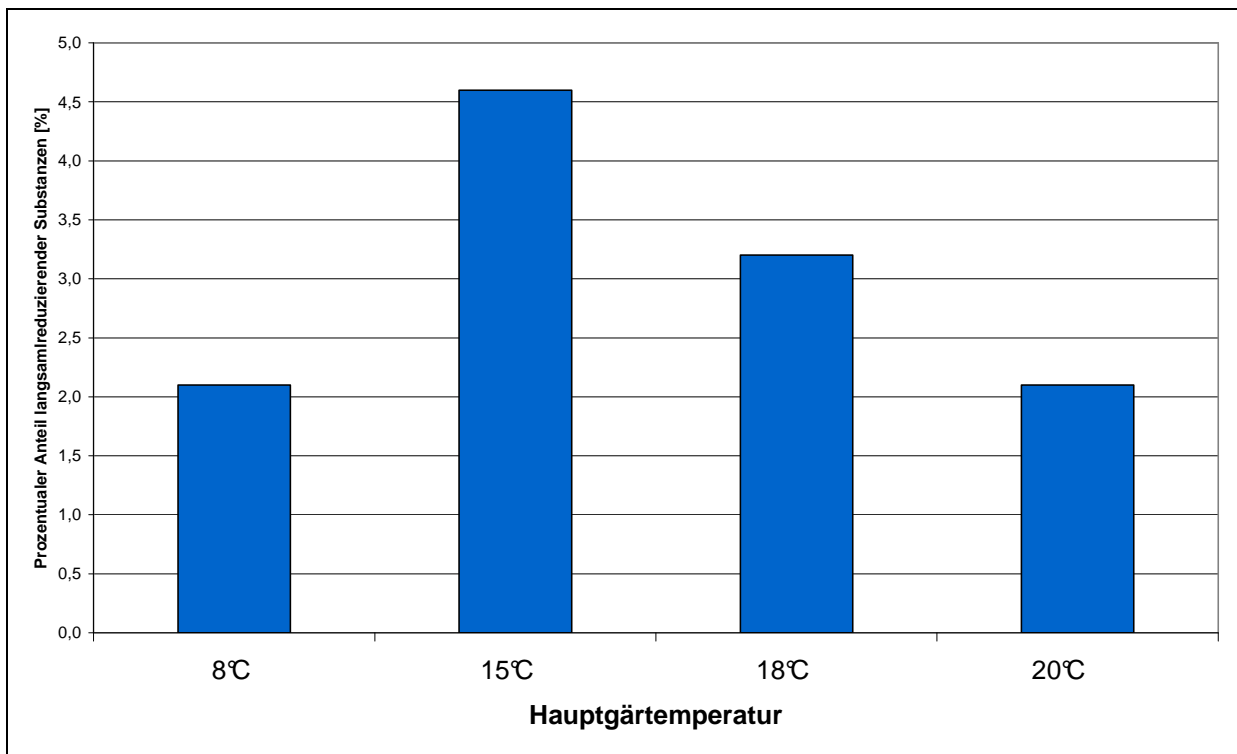


Abb.122: Anteil langsamreduzierender Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

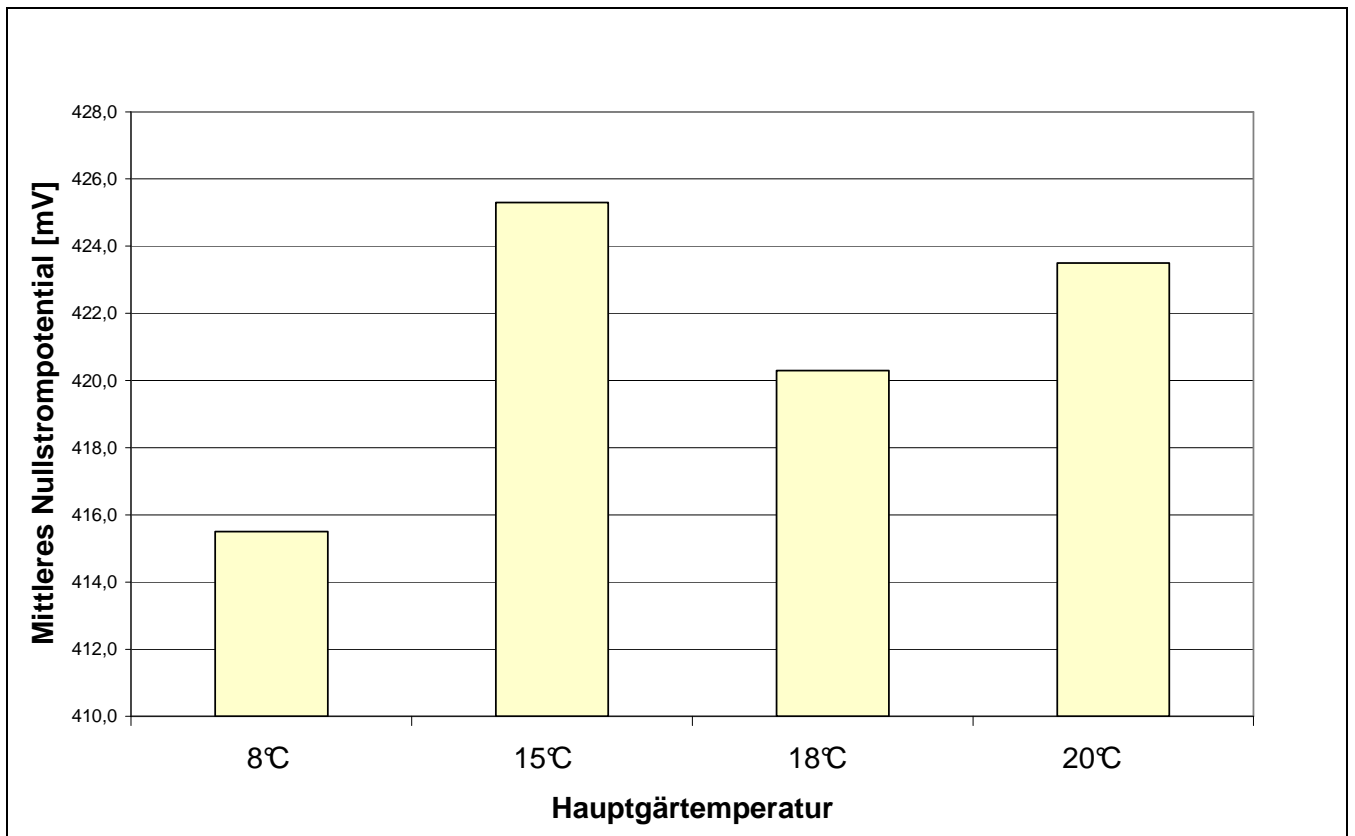


Abb.123: Mittleres Nullstrompotential bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

Das Mittlere Nullstrompotential war bei der Vergärung mit 8°C mit 415,5 mV deutlich am niedrigsten. Das höchste Mittlere Nullstrompotential wurde bei einer Hauptgärtemperatur von 15°C mit 425,3 mV ermittelt (vgl. Abb. 123).

Dazwischen lagen die bei 18°C und 20°C vergorenen Biere mit 420,3 mV bzw. 423,5 mV.

Die besten Radikalfängereigenschaften nach DPPH-Methode wie das bei 8°C vergorene Bier mit einer Extinktionsdifferenz von 1,007 auf. Beim mit 15°C vergorenen Bier hingegen wurde mit einem Extinktionsunterschied von 0,811 eine sehr geringe Reaktivität gegenüber dem stabilen freien Radikal festgestellt (vgl. Abb. 124).

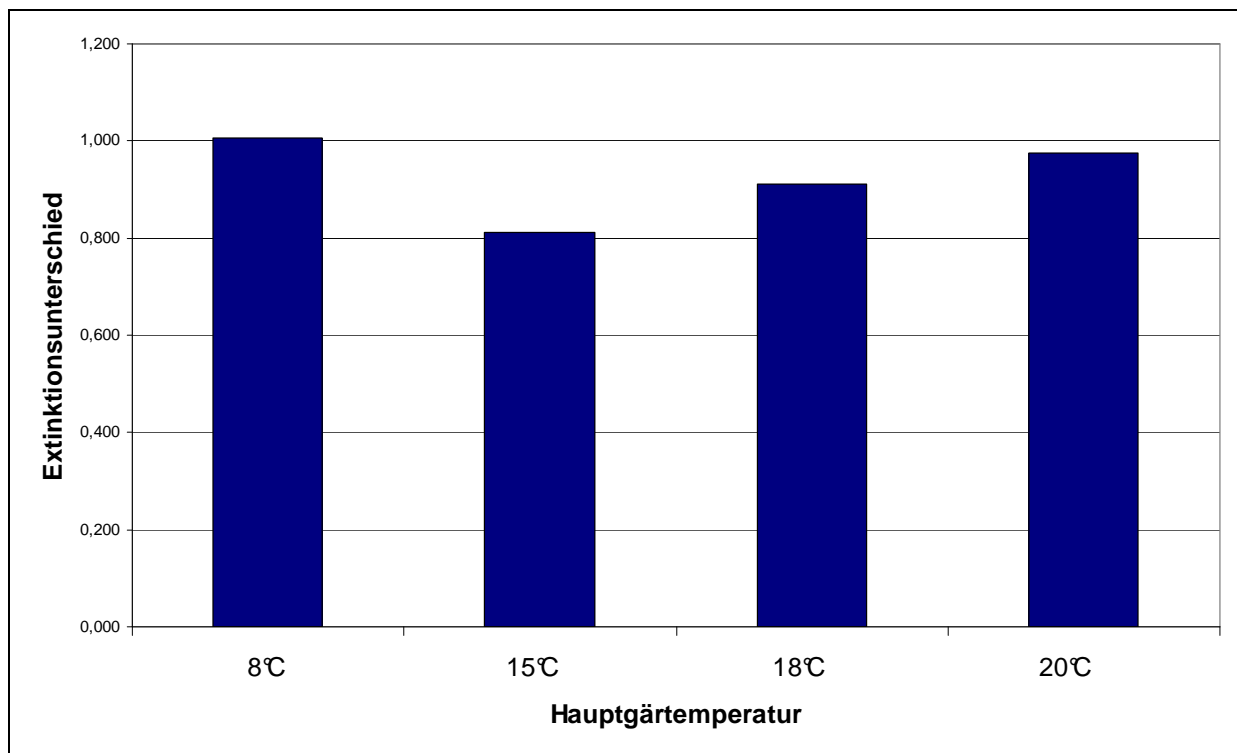


Abb. 124: DPPH-reduzierende Aktivität bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

Bei den reduzierenden Substanzen nach Chapon hingegen war beim bei 15°C vergorenen Bier mit 1,64 mval/l ein etwas höherer Wert als bei den Bieren mit 8°C und 18°C (1,57 mval/l) (vgl. Abb. 125).

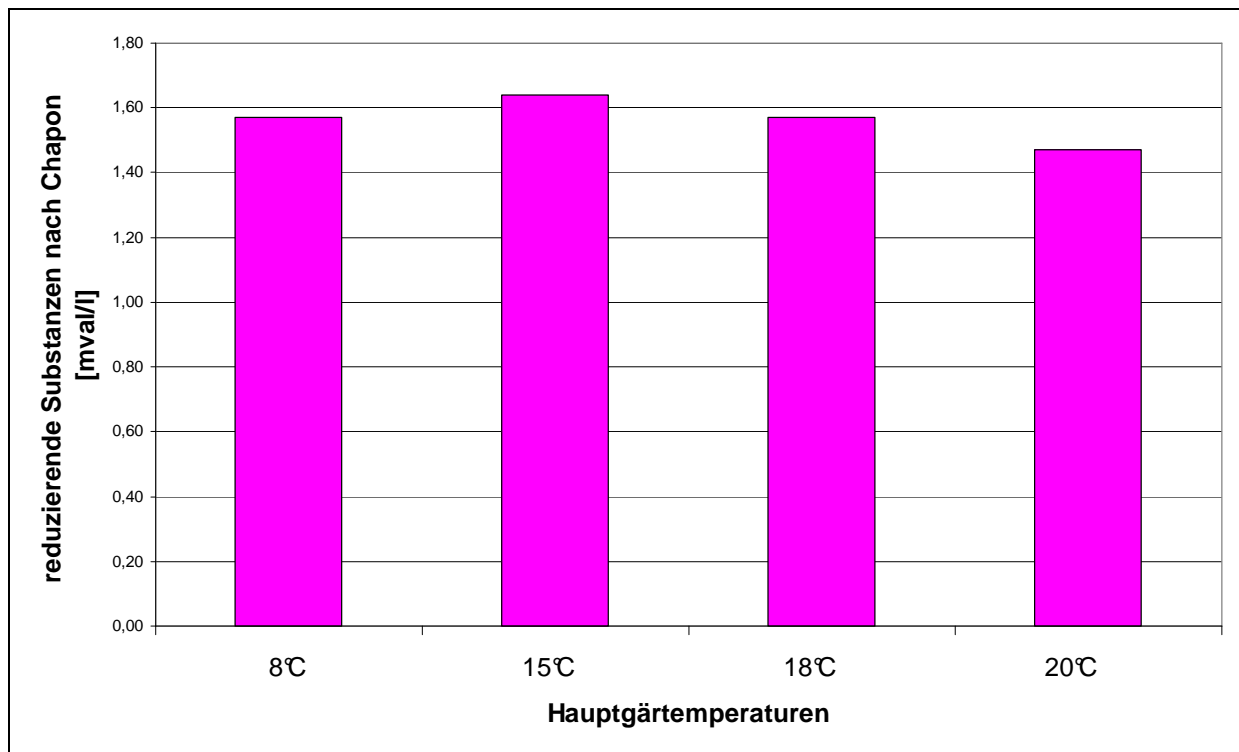


Abb.125: Reduzierende Substanzen nach Chapon bei verschiedenen Hauptgärtemperaturen

Bei dem mit 20°C vergorenen Bier lag der Wert mit 1 ,47 mval/l etwas niedriger.

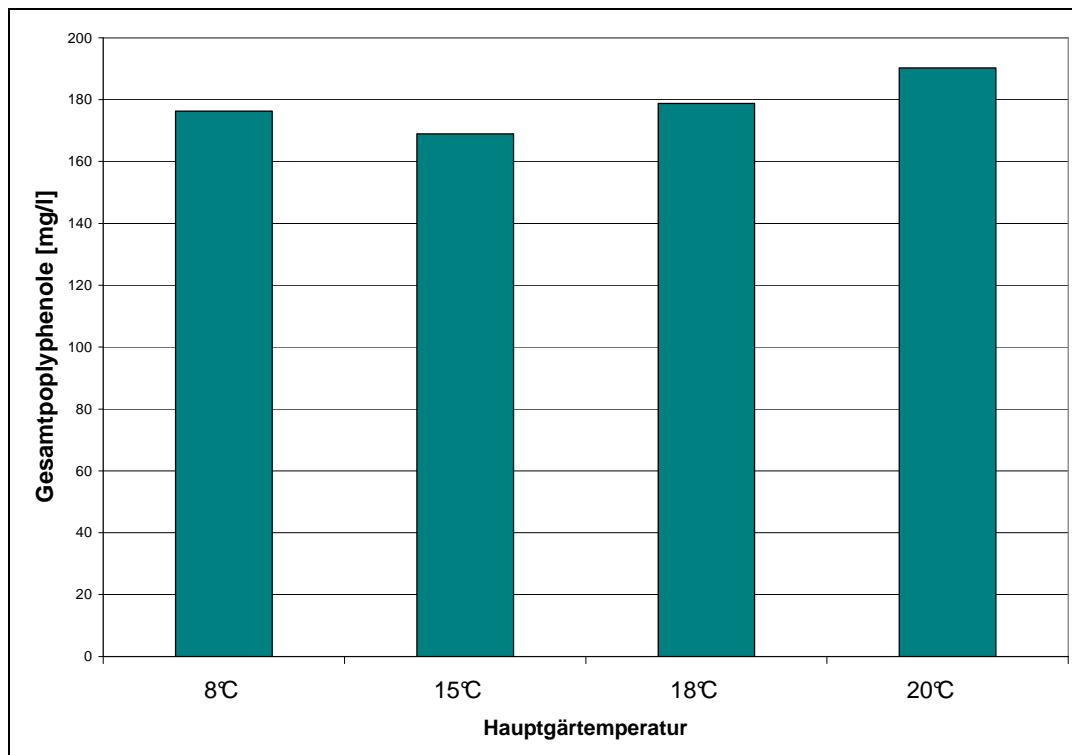


Abb.126: Gesamtpolyphenole bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

Bei den Gesamtpolyphenolen war der Gehalt beim mit 20°C vergorenen Bier am höchsten. Die anderen Werte lagen etwas darunter. Am geringsten war der Gehalt bei dem mit 15°C vergorenen Bier mit 168,9 mg/l (vgl.Abb.126).

Auch bei den Anthocyanogenen fällt ein sehr niedriger Gehalt bei dem mit 15°C vergorenen Bier auf. Dieser Wert ist um etwa 50-70% niedriger als die anderen.

Auch hier hat das mit 20°C vergorene Bier den höchsten Gehalt (vgl.Abb.127).

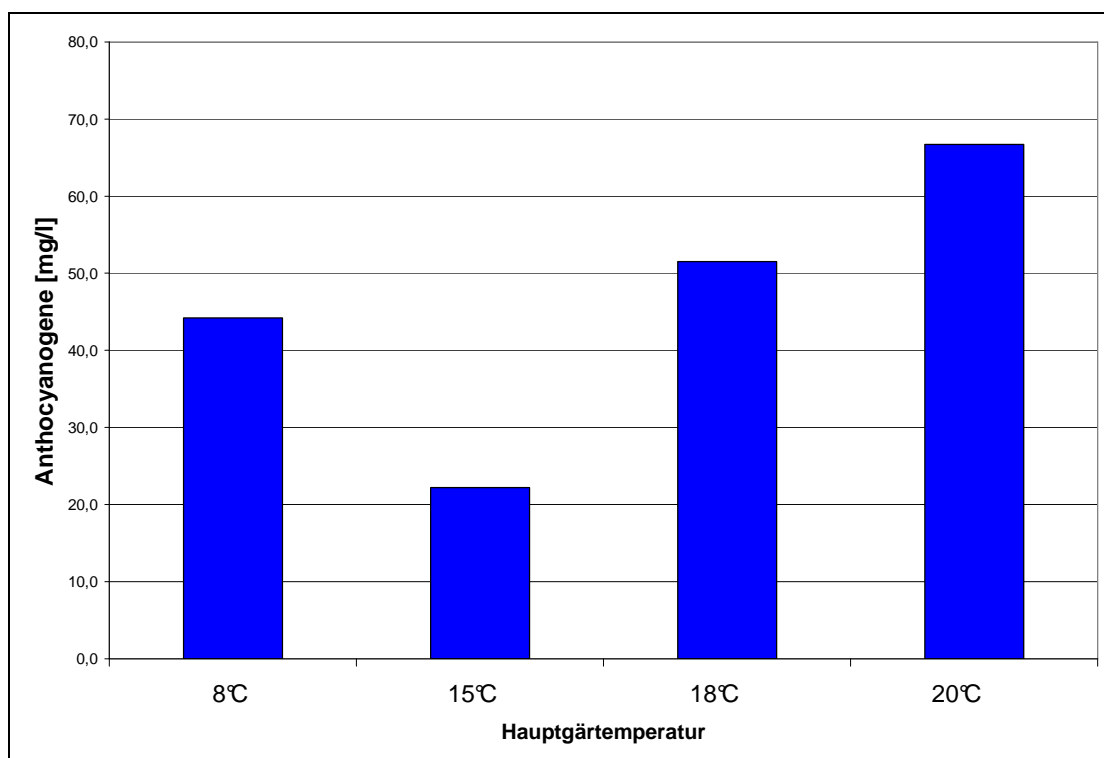


Abb.127: Anthocyanogene bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

Wie Abbildung 128 zeigt, unterscheidet sich der Gehalt an einzelnen phenolischen Substanzen deutlich.

Die mengenmäßig relevanten phenolischen Substanzen bewegen sich beim mit 8°C vergorenen Bier auf dem höchsten Niveau.

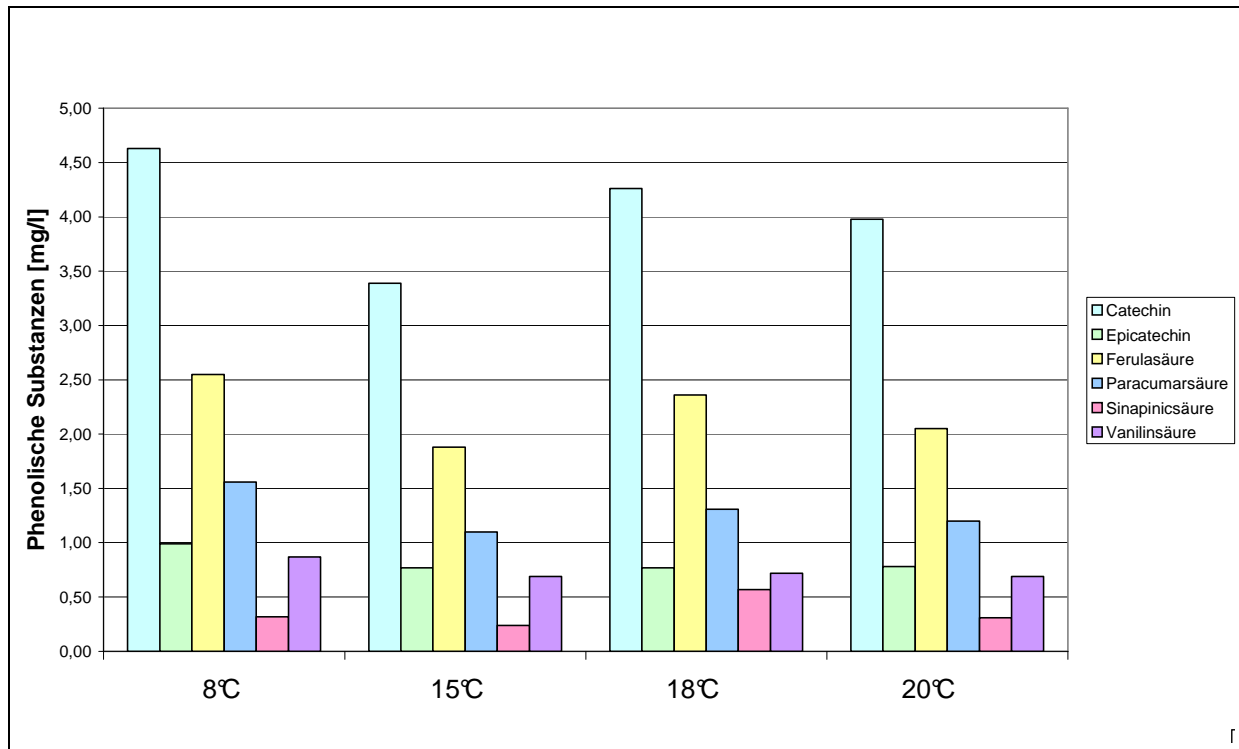


Abb.128: Gehalt an einzelnen phenolischen Substanzen bei unterschiedlichen Gärtemperaturen

Gerade Catechin und Epicatechin sind bei diesem Bier sehr hoch, während sie im mit 15°C vergorenen Bier deutlich, etwa um 20% vermindert sind.

Bemerkenswert ist, daß die Gesamtpolyphenole sich völlig anders verhalten als diese einzelnen phenolischen Substanzen. Ein Zusammenhang zwischen Gesamtpolyphenolen und den elektrochemischen Messungen war nicht erkennbar. Es lassen sich aber durchaus Parallelen ziehen zwischen dem Gehalt an diesen niedermolekularen Polyphenolen und Nullstrompotential und Stromverhältnis.

4.5.2 Veränderung der Reduktone während der Bierbereitung

Elektrochemisch wurde in der ersten Versuchsreihe nur das filtrierte abgefüllte Bier untersucht. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und um zu genaueren Erkenntnissen über das Verhalten der Reduktone über die gesamte Phase der Gärung, Lagerung und Filtration zu gelangen, wurden Proben in allen Produktionsabschnitten genommen und analysiert. Zusätzlich wurde auch noch das bis zu einer Trübung von 2,5 EBC-Einheiten forcierte Bier untersucht.

Es wurden wieder mit den Hauptgärtemperaturen 8°C, 15°C, 18°C und 20°C die gleichen Versuchsbedingungen gewählt.

Auch in dieser Versuchsreihe zeigte das mit 8°C vergorene Bier die niedrigsten Werte für das Mittlere Nullstrompotential (vgl. Abb.129). Beim filtrierten Bier waren die Werte für die höheren Gärtemperaturen (18°C und 20°C) deutlich höher als für die niedrigeren Temperaturen (8°C und 15°C). Ansonsten zeigte das mit 15°C vergorene Bier die höchsten Nullstrompotentiale. Dieses Bier zeigte jedoch auch einen mit anderen Versuchen verglichenen ungewöhnlichen Verlauf: Hier trat eine Absenkung des Mittleren Nullstrompotentials durch die Filtration auf. Auch die unterschiedlich hohe Zunahme des Mittleren Nullstrompotentials fiel hier auf: Während bei dem bei 8°C vergorenen Bier das Potential von einem äußerst niedrigen Wert durch das Forcieren deutlich zunahm, blieb es bei 20°C konstant.

Insgesamt war tendenziell eine Erhöhung des Potentials über den Produktionsprozess zu beobachten.

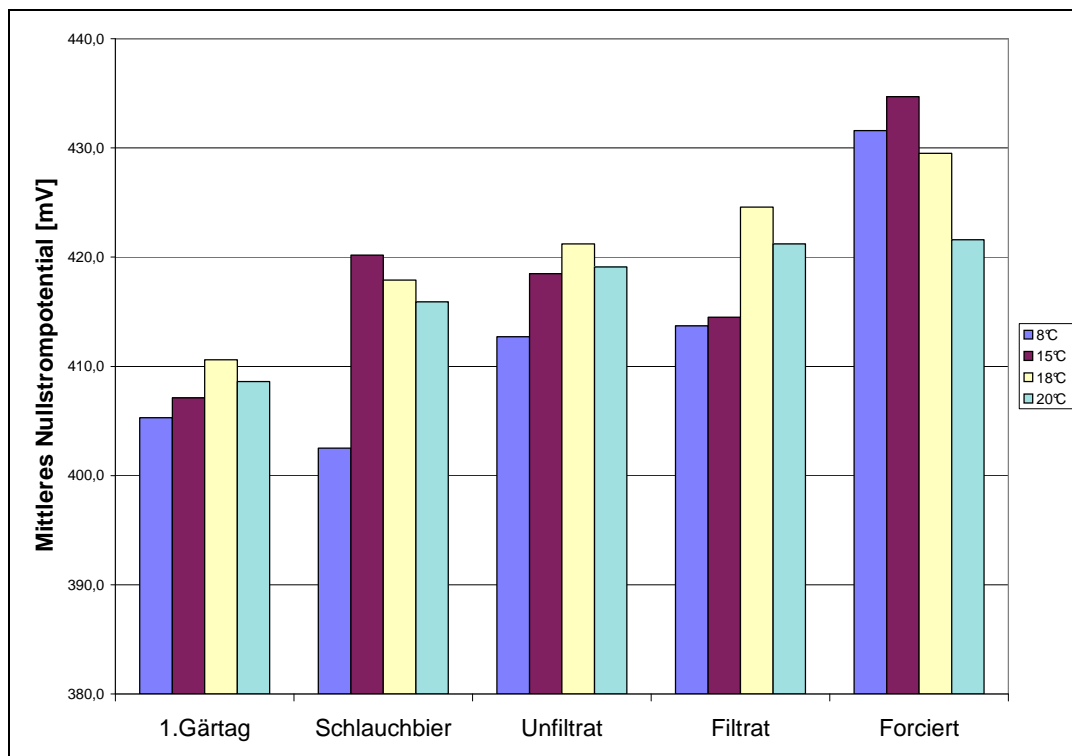


Abb.129: Verlauf des Mittleren Nullstrompotentials bei verschiedenen Hauptgärtemperaturen

Wie bei anderen Versuchen auch beobachtet, nahm das Stromverhältnis während der Hauptgärung deutlich ab. Bei höheren Gärtemperaturen fiel das Stromverhältnis schon am ersten Gärtag. Bei der Gärtemperatur von 8°C war am ersten Gärtag ein leichter Anstieg gegenüber der Würze zu beobachten, am Ende der Hauptgärung jedoch ein deutlicher Abfall.

Die Lagerung hingegen führte bei den niedrigeren Hauptgärtemperaturen zu einer Erhöhung des Stromverhältnisses, nur bei der Vergärung mit 20°C kam es zu einem unerheblichen Rückgang.

Eine gewöhnliche Kieselgurfiltration brachte trotz sauerstoffarmem Arbeiten einen Rückgang des Stromverhältnisses um etwa 0,30, unabhängig von der Gärtemperatur und dem ursprünglichen Niveau der Reduktionskraft.

Bei den forcierten Bieren war keine einheitliche Tendenz zu beobachten: Beim bei einer Hauptgärtemperatur von 8°C vergorenen Bier trat eine deutliche Abnahme auf. Die Stromverhältnisse der mit 15°C und 18°C vergorenen Biere blieben etwa gleich und das Stromverhältnis des mit 20°C vergorenen Bieres fiel deutlich (vgl. Abb.130).

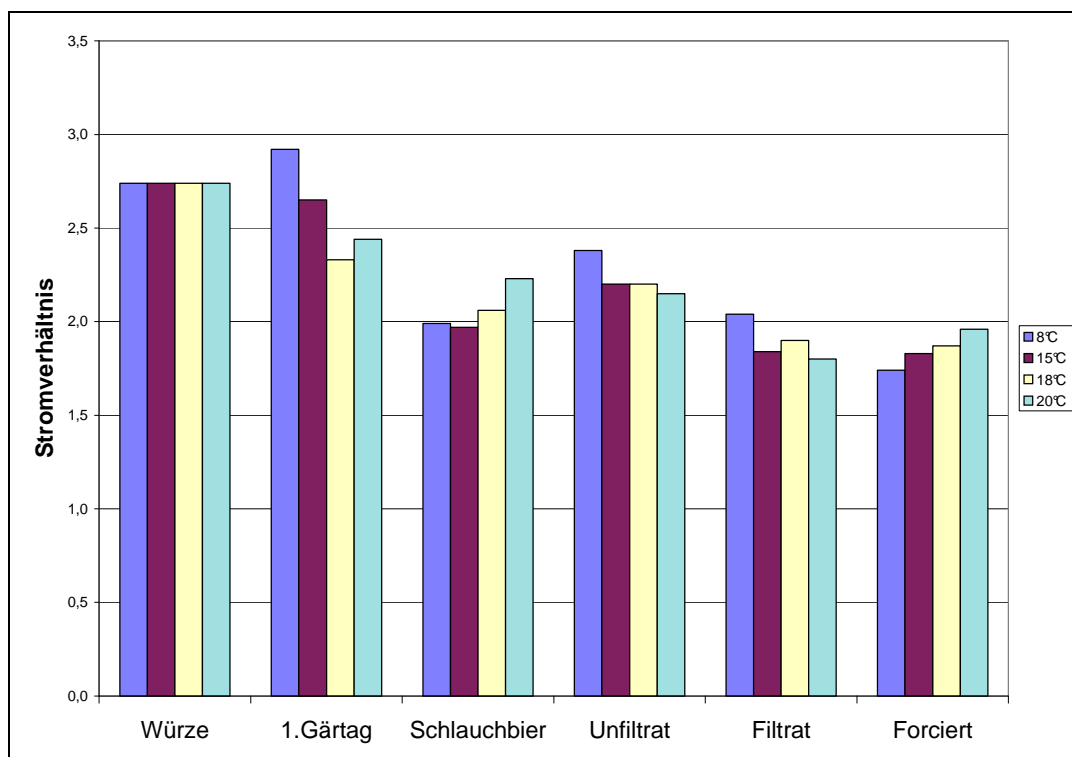


Abb.130: Verlauf des Stromverhältnisses bei unterschiedlichen Gärtemperaturen

Insgesamt fiel die mittels Stromverhältnis ermittelte Reduktionskraft während des Bierbereitungsprozesses von der Würze zum fertigen Bier tendenziell ab, wobei während der Lagerung eine leichte Zunahme zu beobachten war.

Wie bei anderen Gärungsversuchen auch zu beobachten war, findet die größte Abnahme reduzierender Substanzen während der Hauptgärung statt.

Wie das Stromverhältnis nahm der relative Anteil schnellreduzierender Substanzen während der Bierbereitung tendenziell ab (vgl. Abb.131).

Besonders groß war die Abnahme während des ersten Gärtages.

Während der Hauptgärung war sowohl eine Zunahme (8°C und 18°C-Hauptgärtemperatur), als auch eine leichte Abnahme (15°C und 20°C-Hauptgärtemperatur) zu beobachten.

Parallel zum Stromverhältnis wies das mit 8°C vergorene Bier in den späteren Stadien der Bierbereitung einen höheren Anteil schnellreduzierender Substanzen auf als die anderen Proben (vgl. Abb.131).

Das Forcieren hingegen erhöhte den bei den höheren Gärtemperaturen niedrigeren Anteil schnellreduzierender Substanzen sogar auf ein Niveau über dem mit 8°C vergorenen Bier.

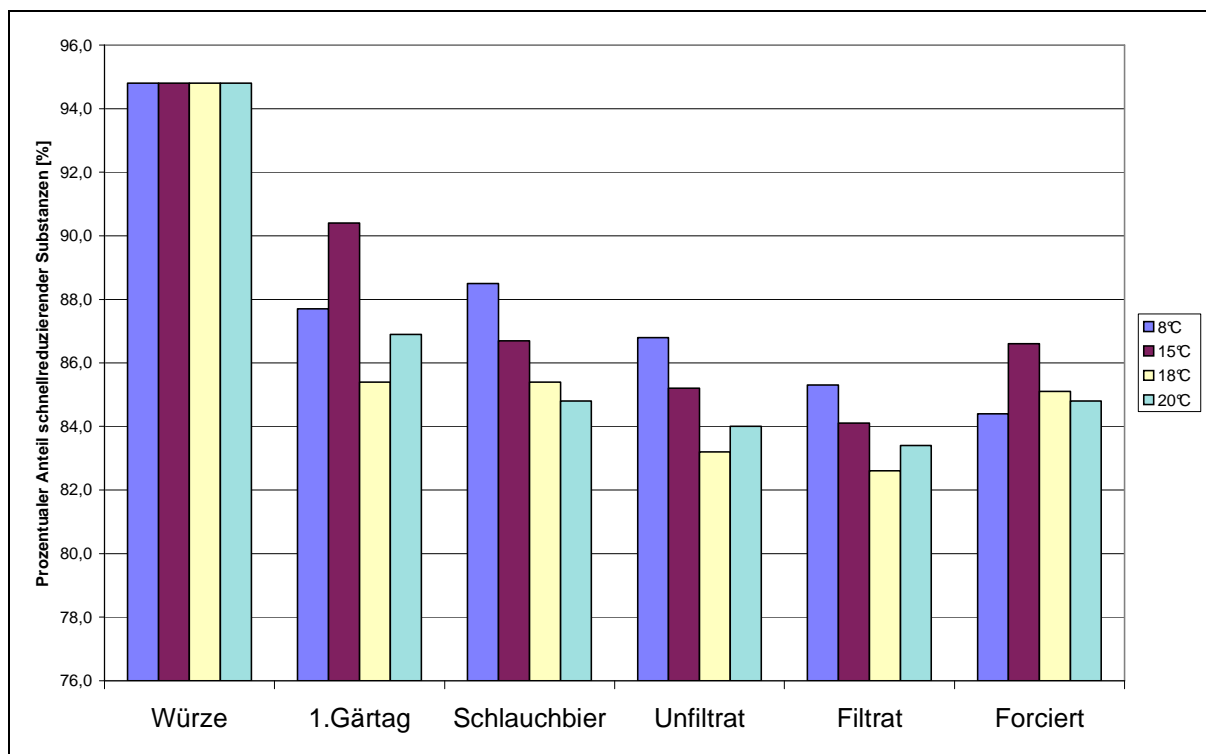


Abb.131: Verlauf der schnellreduzierenden Substanzen unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

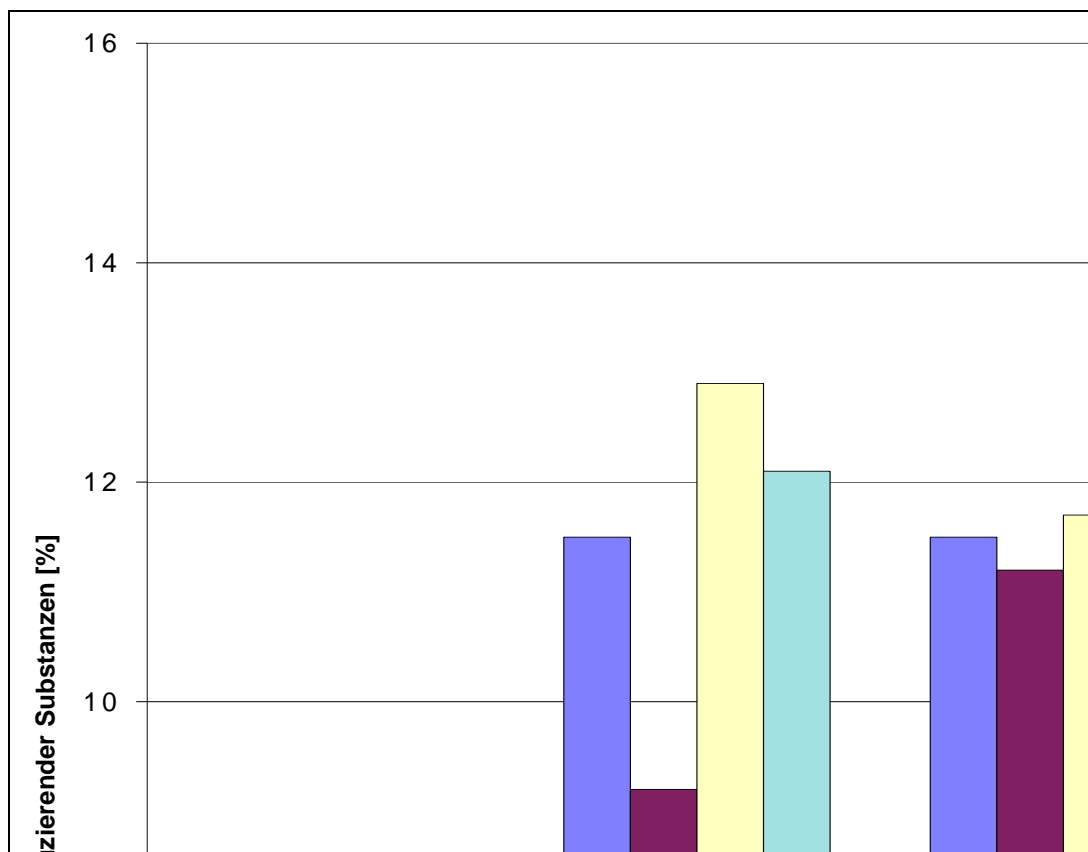


Abb.132: Verlauf der mittelschnellreduzierenden Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen

Am auffälligsten war die deutliche Zunahme der mittelschnellreduzierenden Substanzen am ersten Gärtag bei allen Gärtemperaturen.

Diese Zunahme geschah, vergleicht man mit Abb.131, auf Kosten der schnellreduzierenden Substanzen.

Eine leichte Zunahme dieser Substanzklasse war während der restlichen Hauptgärung und der Lagerung zu beobachten.

Die Filtration hingegen beeinflusste den Gehalt an dieser Substanzklasse kaum.

Auffällig war die deutliche Abnahme des Anteils dieser Substanzen während der Alterung, die wiederum mit einer Zunahme bei den schnellreduzierenden Substanzen verbunden ist.

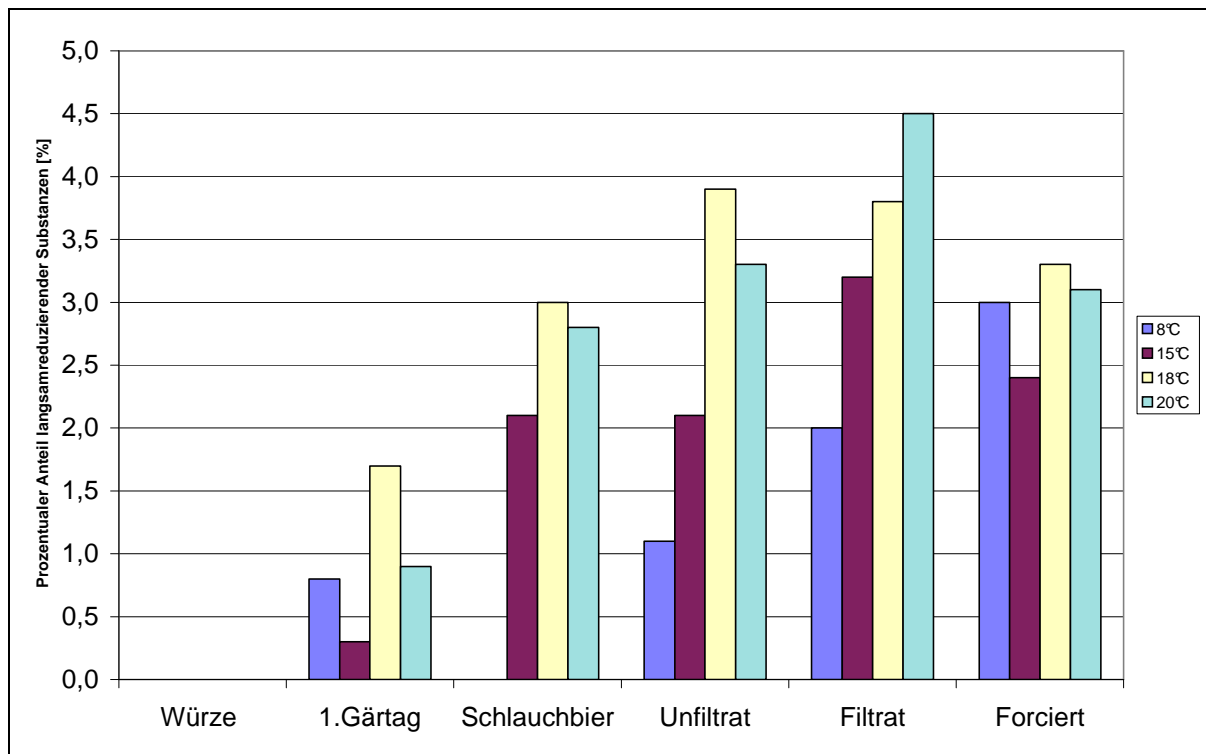


Abb.133: Verlauf des Anteils langsamreduzierender Substanzen bei unterschiedlichen Gärtemperaturen

Der Anteil langsam reduzierender Substanzen veränderte sich noch deutlicher als der der mittelschnellreduzierenden Substanzen (vgl. Abb.133). Hier war eine Zunahme über die Hauptgärung zu beobachten. Während in der Anstellwürze elektrochemisch keine Substanzen nachweisbar waren, die DCI innerhalb von 10-15 Minuten reduzieren, wurden nach dem ersten Gärtag schon bis zu 1,7% bestimmt. Während der Hauptgärung stieg dieser Anteil noch deutlich weiter an, anders als die mittelschnellreduzierenden Substanzen, deren Anteil etwa konstant blieb und die schnellreduzierenden Substanzen, die weiter abnahmen.

Durch die Filtration stieg der Anteil dieser Substanzen weiter an, ebenfalls auf Kosten der schnellreduzierenden Substanzen.

Beim Forcieren fiel auf, dass die langsamreduzierenden Substanzen wieder abnahmen. Auch hier war bei dem mit 8°C vergorenen Bier ein anderer Effekt zu beobachten.

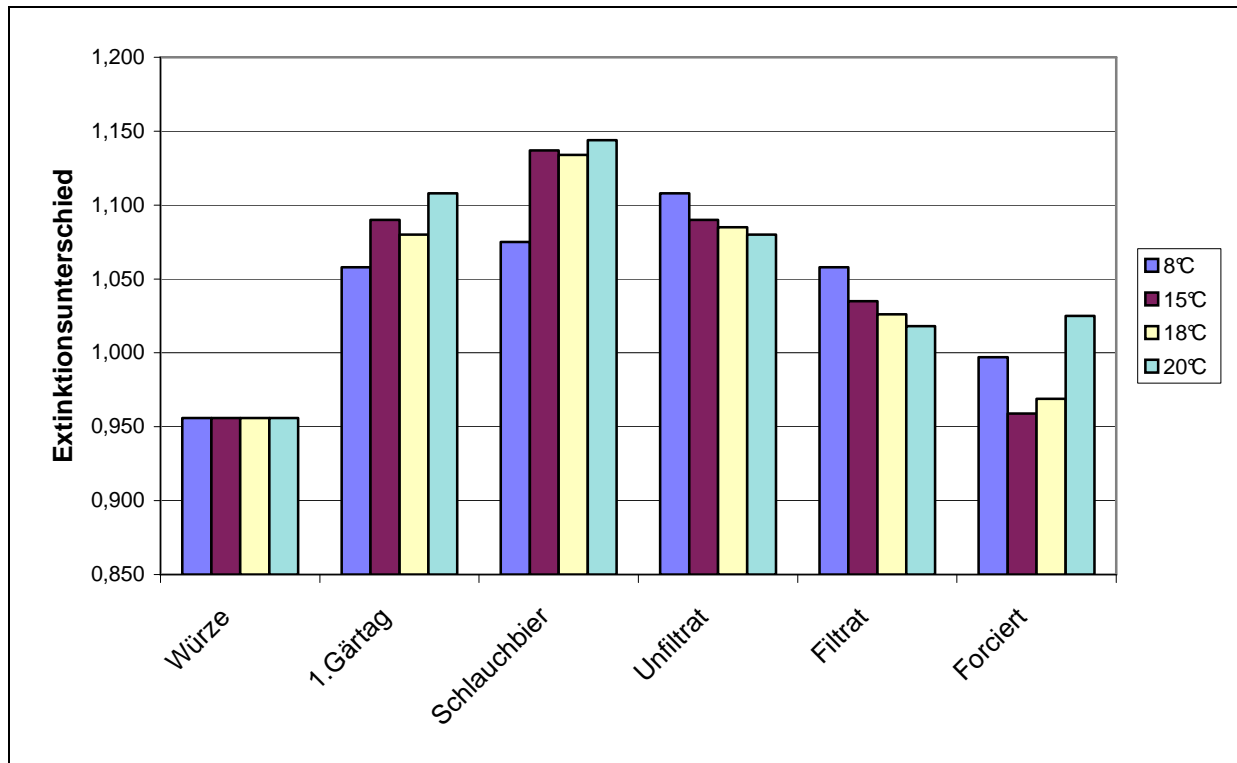


Abb.134: Verlauf der DPPH-reduzierenden Aktivität bei unterschiedlichen Gärtemperaturen

Hier wurde wie bei anderen Versuchen deutlich (vgl. Kapitel Zweitbelüftung), daß die DPPH-reduzierende Aktivität sich während der Gärung erheblich steigerte (vgl. Abb.134). Die Hauptgärung trägt demnach stark zur Bildung von Radikalfängern bei. Selbst das forcierte Bier war ein besserer Radikalfänger als die Würze. Interessant auch, dass die sich die Aktivität beim mit 8°C vergorenen Bier nicht während der Hauptgärung sondern erst bei der Lagerung und Filtration auf das höchste Niveau steigerte. Die anderen Biere verloren während der Lagerung an DPPH-reduzierender Aktivität. Beim Forcieren wurde, wie auch bei den Alterungsversuchen, eine Abnahme der Aktivität beobachtet.

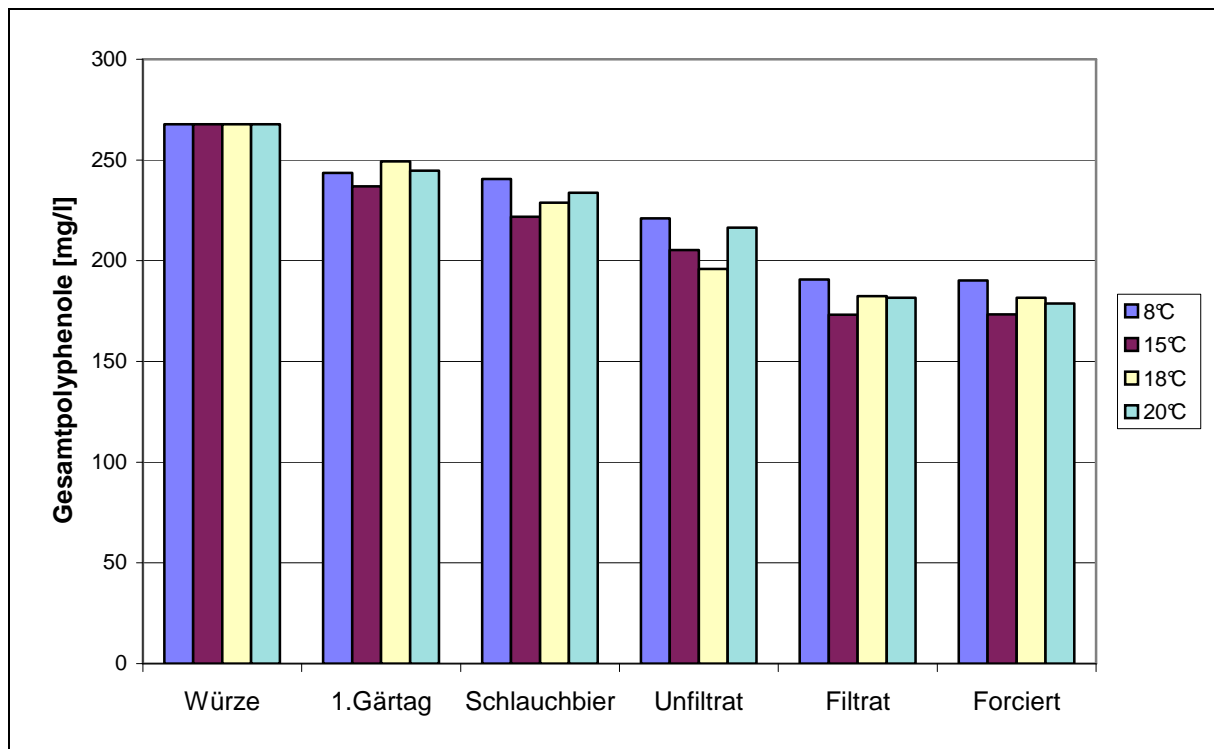


Abb.135: Verlauf der Gesamtpolyphenole bei unterschiedlichen Gärtemperaturen

Zu beobachten ist, dass der Gesamtpolyphenolgehalt über den gesamten Produktionsprozess absank (Abb.135). Steigerungen bei den Radikalfängereigenschaften können demnach kaum auf phenolische Substanzen zurückzuführen sein. Das Forcieren beeinflusste nicht den Gesamtpolyphenolgehalt.

Deutlich wird hier, dass im Verlauf der Hauptgärung beim mit 8°C vergorenen Bier die Abnahme an Polyphenolen nicht so stark war wie bei anderen Gärtemperaturen.

Auch bei Lagerung und Filtration blieb das hohe Niveau der Gesamtpolyphenole bei dem mit 8°C vergorenen Bier erhalten.

Diskussion zu den unterschiedlichen Gärtemperaturen

Aus dem Verlauf des Stromverhältnisses aus den Versuchsreihen wird deutlich, dass die elektrochemisch bestimmbare Reduktionskraft keineswegs durch die Gärung zunimmt. Diese Annahme beruhte auf der Überlegung, dass sich das Substrat während der Gärung in einem äußerst reduzierenden Milieu befindet. Nachdem der Sauerstoff aus der Würzebelüftung nach einigen Stunden veratmet worden ist, ist praktisch kein Sauerstoff im Substrat mehr vorhanden. Die Wasserstoffäquivalente aus dem Citratcyclus können nicht mehr wie bei der Atmung auf den Sauerstoff übertragen werden, sondern reduzieren in erster Linie den Acetaldehyd. In deutlich geringerem Ausmaß verläuft die Bildung von höheren Alkoholen, ebenfalls aus Aldehyden und Ketonen, die jedoch aus dem Aminosäurestoffwechsel stammen. In diesem Zusammenhang wird auch auf die Bildung von

Glycerin durch Übertragung von Wasserstoffäquivalenten während der Gärung hingewiesen. Da jedoch die schnellreduzierenden Substanzen während der Gärung stark abnehmen, liegt es auf der Hand, dass es sich bei den bei der Gärung gebildeten reduzierenden Substanzen in erster Linie nicht um schnellreduzierende Substanzen handelt. Der hohe Gehalt dieser Reduktklasse in der Würze weist auf ein hauptsächliches Einbringen dieser Substanzen durch die Rohstoffe hin. So zeigen dunkle Biere stets ein deutlich höheres Stromverhältnis als helle Biere und auch in anderen Tests verbesserte antioxidative Eigenschaften¹.

Für die Abnahme der Reduktionskraft und den Anteil schnellreduzierender Substanzen während der Hauptgärung können verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht werden: Ausscheidungsprozesse von reduzierenden Substanzen bei der Hauptgärung. Hier muß in erster Linie an Polyphenole gedacht werden. Durch die Gärung und v.a. den pH-Sturz ändert sich das Protein-Polyphenolgleichgewicht und es kommt zu Ausscheidungen. Wir beobachten diesen Effekt bei unseren Versuchsreihen als Abnahme von Gesamtpolyphenolen und Anthocyanogenen (vgl. Abb.135).

Ein anderer Punkt ist die Aufnahme von ITT-Substraten durch die Hefe. Es sollten nicht nur die gebildeten Stoffwechselprodukte der Hefe betrachtet werden sondern auch die Substanzen, die sie aus der Würze aufnimmt. Auch praktische Erfahrungen aus der Elektrochemie könnten einen Hinweis darauf geben, dass reduzierende Substanz von Mikroorganismen bevorzugt wird. So streben Mikroorganismen im elektrischen Feld stets zur Kathode, also zur "Quelle der Reduktion"². Diese Bevorzugung reduzierenden Milieus ließe auch auf eine Bevorzugung reduzierender Substanzen schließen, da in der Umgebung der Kathode diese in besonders hoher Konzentration vorliegen.

Mittelschnell- und vorallem langsam reduzierende Substanzen nehmen während der Hauptgärung relativ und absolut zu. Die relative Zunahme geht natürlich zulasten der schnellreduzierenden Substanzen, die stark abnehmen. Die absolute Zunahme hingegen, weist auf eine Neubildung dieser Substanzen bei der Gärung hin. Eine Neubildung von phenolischen Antioxidantien ist ausgeschlossen, da die phenolischen Substanzen in ihrer Gesamtheit aus den Rohstoffen stammen (etwa 75% aus dem Malz und 25% aus dem Hopfen)³. Auch eine Bildung von Melanoidinen ist bei diesen niedrigen Temperaturen ausgeschlossen. Es muß es sich bei dieser Neubildung reduzierender Substanzen um die oben angesprochene Reduktion durch die Wasserstoffäquivalente handeln. Dabei ist es

¹ Forster, C., Narziss, L., Back, W., "Investigations of Flavor and Flavor Stability of Dark Beers Brewed With Different Kinds of Special Malts", MBAA, 35 (2), 1998, S.73-77

² Wabner, D., Persönliche Mitteilung 2001

³ Brautechnische Analysemethoden Band II, Methodensammlung der MEBAK, Pfenninger, H. (Hrsg.), Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weißenstephan 1993

durchaus möglich, dass auch stärker oxidierte phenolische Verbindungen wieder reduziert werden. Diese Reduktion führt also eher zu langsamreduzierenden Substanzen. Mit dieser Zunahme steigt auch die DPPH-reduzierende Aktivität an, was darauf hinweist, dass hier auch ein Teil der langsamen ITT-Substrate die wirksamen Radikalfänger stellt. Zurückzuführen ist diese Steigerung der Radikalfängerqualität bei der Hauptgärung also nicht nur auf Schwefeldioxid, da dieses zwar ein guter Radikalfänger ist¹ und in mehr oder weniger großem Ausmaß von der Hefe gebildet wird², aber nach Chapon³ zu den schnellreduzierenden Substanzen im ITT-Test gehört.

Die Erhöhung des Mittleren Nullstrompotentials während der Lagerung weist vielmehr auf einen Abbau oder eine Aufnahme (also Verstoffwechslung) elektroaktiver reduzierender Stoffe durch die Hefe, aber auch auf Ausscheidung durch kolloidale Veränderungen hin, die jedoch in einem geringeren Maßstab stattfinden müssen als oben beschriebene reduktive Neubildung von Antioxidantien. Der grosse Teil dieser im reduktiven Milieu bei Hauptgärung und Lagerung gebildeten Reduktone sind also, wie schon vorhin angesprochen, keine schnellreduzierenden Substanzen, aber auch keine elektroaktiven im Sinne der Cyclovoltametrie.

Möglich ist auch hier eine Ausscheidung bei der Gärung durch Milieuänderungen wie pH-Sturz oder steigende Alkoholkonzentrationen. Insofern sind die cyclovoltametrischen Messungen nicht mit klassischen rH-Messungen zu vergleichen, da bei dieser Messmethode stets durch die Gärung günstigere rH-Werte erzielt wurden⁴.

Dennoch, um jetzt auf diese speziellen Versuchsreihen verschiedener Hauptgärtemperaturen zurückzukommen, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den Radikalfängereigenschaften und cyclovoltametrisch ermitteltem Mittleren Nullstrompotential. Vergleicht man bei den Produkten Schlauchbier, Unfiltrat und Filtrat die verschiedenen Gärtemperaturen untereinander, so wird deutlich, dass ein niedrigeres Nullstrompotential in Zusammenhang mit einer hohen DPPH-reduzierenden Aktivität steht.

Insgesamt besteht also eine Verbindung des Niveaus der elektroaktiven Stoffe mit der Radikalfängerqualität. Diese nimmt zwar im Laufe der Gärung und Lagerung zu, während das Nullstrompotential sich zu einem "ungünstigeren" Wert verschiebt. Jedoch unabhängig davon bleibt beim Vergleich nur der Schlauchbiere, Unfiltrate usw. der Zusammenhang bestehen.

Das weist darauf hin, daß doch deutliche Überschneidungen zwischen den mit DPPH als Radikalfänger reagierenden und den elektroaktiven Substanzen bestehen. Wenn wir uns an

¹ Kaneda,H.,Kobayashi,N.,Furusho,S.,Sahara,H.,Koshino,S.,"Chemical Evaluation of Flavour Stability", MBAA Technical Quarterly, 32 (2), 1995, S.76-80

² Narziss,L., "Über den Schwefeldioxidgehalt des Bieres", Brauwelt 122, 1982, S. 502-519

³ Chapon,L., "Oxygen and Beer", Brewing Science, Vol.2, Academic Press, New York 1981, S.407-455

⁴ Kretschmer,K.-F., "Die Reduktonkraft als Qualitätsmerkmal für Gerste und Malz", Der Brauereitechniker 22, 1970, S.146-152

die Stabilisierungsversuche und den Zusatz von phenolischen Substanzen erinnern, war dieser Zusammenhang stark auf den Gehalt an reduzierenden phenolischen Substanzen zurückzuführen. Insgesamt werden also bei niedrigeren Gärtemperaturen trotz eines Rückgangs elektroaktiver Substanzen bei der Gärung insgesamt die als Radikalfänger wirkenden elektroaktiven Stoffe mehr erhalten als bei höheren Gärtemperaturen. Hier sei auf die deutlichen Unterschiede im Gesamtpolyphenolgehalt bei den einzelnen Gärtemperaturen (vgl. Abb.135) hingewiesen. Möglich ist auch ein gegenseitiger Schutzmechanismus, dass bei einem insgesamt "günstigeren" Redoxpotential also im elektrochemischen Sinne Redoxverhältnisse vorherrschen, die eine Oxidation der Radikalfänger verhindern. Andererseits verhindern die Radikalfänger eine Oxidation der elektroaktiven Reduktone durch den aktiven Sauerstoff.

Beim Anteil der schnell-, mittelschnell- und langsamreduzierenden Substanzen war hier bei den unterschiedlichen Gärtemperaturen festzustellen, dass das mit 8°C vergorene Bier den höchsten Anteil schnellreduzierender Substanzen besitzt..(vgl.Abb.131-133) Wie schon vorher angedeutet, ist hier keine klare Zuordnung der DPPH-reduzierenden und cyclovoltametrisch erfassbaren Reduktone zu den drei Reduktonklassen möglich. Anders als bei den Versuchsreihen mit Sauerstoffbelastung filtrierter abgefüllter Biere oder Zugabe von phenolischen Substanzen oder Stabislisierungsversuchen sind die Unterschiede hier durch komplizierte Umsetzungen bei der Gärung bedingt. So besitzen die Biere mit höheren Gärtemperaturen niedrige Anteile an schnellreduzierenden Substanzen und hohe Anteile an langsamreduzierenden Substanzen.(vgl.Abb.131-133). Diese langsamreduzierende Wirkung tritt erst während der Gärung auf. Diese verstärkte Bildung langsamreduzierender Substanzen durch die Gärung führt also nicht ausschließlich zu langsamreduzierenden Substanzen, die wie in den anderen Versuchsreihen gezeigt, eine hohe Reaktivität gegenüber DPPH und hohe Elektroaktivität besitzen. Gerade bei höheren Hauptgärtemperaturen führt eine verstärkte Bildung langsamreduzierender Substanzen nicht zu einem insgesamt verbesserten Redoxzustand. Es werden also verstärkt langsamreduzierende Substanzen gebildet, die anders als phenolische Substanzen, keine oder nur geringen Einfluss auf die tatsächliche antioxidative Aktivität im Substrat Bier haben.

Zusammenfassend kann man hierzu sagen, dass zu einer Kontrolle der Gärung deshalb die Bestimmung des Stromverhältnisses und der verschiedenen Reduktonklassen mittels elektrochemischem ITT nicht ausreicht. Zusätzlich mit der cyclovoltametrischen Methode kann aber von einem hohen Stromverhältnis und einem niedrigen Potential auf günstige Redoxverhältnisse geschlossen werden. Wie so oft, zeigt sich, dass bestimmte traditionelle Technologien, wie hier die klassische kalte Hauptgärung, ihre Berechtigung haben. Auch andere Untersuchungen aus dem Gebiet Antioxidantien/ Geschmacksstabilität zeigten mit den jeweils angewandten Methoden ebenfalls den Vorteil niedriger Hauptgärtemperaturen^{1,2,3}.

¹ Kaneda,H.,Kimura,T.,Kanu,Y.,Koshino,S.,Osawa,T.,Kawakishi,S.,"Role of Fermentation Conditions on Flavour Stability of Beer",Journal of Fermentation and Bioengineering,72(1),1991, S.26-30

² Kaneda,H.,Kobayashi,N.,Furusho,S.,Sahara,H.,Koshino,S.,"Chemical Evaluation of Flavour Stability", MBAA Technical Quarterly, 32 (2), 1995, S.76-80

³ Ono,M.,Uchida,M.,"Technological Approach to Improve Beer Flavour Stability: Analysis of the Effect of Brewing Processes on Beer Flavour Stability by the Electron Spin Resonance Method", J.Am.Soc.Brew.Chem.,58 (1), 2000, S.8-13

4.6 Alterung grosstechnisch hergestellter Biere

Proben aus verschiedenen Brauereien wurden direkt nach der Abfüllung entnommen und der Gesamtsauerstoff bestimmt. Die frischen Proben wurden innerhalb von maximal zwei Tagen analysiert, wobei das Bier kühl und dunkel bei 10°C aufbewahrt wurde.

Dabei handelte es sich um 9 helle Vollbiere (Hell 1-7), 2 Pilsener Biere (Pils 1-2) und 3 Kristallweizen (Weizen 1-3)

Zusätzlich wurden die Biere einmal 0°C/40°C Kalt-warm forciert bis zur Überschreitung von 2,5 EBC-Trübungseinheiten und auch eine forcierte Alterung 5 Tage bei 60°C durchgeführt. Dieser gealterten Biere wurden dann nach DLG-Schema verkostet.

Bei den Messungen des Sauerstoffgehaltes ergaben sich bei allen Proben, außer den Proben Hell 3 und Hell 4, Sauerstoffwerte unter 0,1 mg/l, Werte also ,die nur einen äußerst geringen Einfluss auf die verwendeten Analysemethoden haben. (vgl. Kapitel Einfluss von Sauerstoff). Bei der Probe Hell 3 und Hell 4 waren mit 1,06 bzw. 1,02 mg/l hingegen die Sauerstoffwerte stark erhöht.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Analysen dargestellt.

Tab.18: Analysenergebnisse von grosstechnisch hergestellten Bieren (frisch)

	Hell 1	Hell 2	Hell 3	Hell 4	Hell 5	Hell 6	Hell 7	Pils 1	Pils 2	Weizen 1	Weizen 2	Weizen 3
Stromverhältnis	1,64	1,88	2,06	2,02	1,89	2,07	1,72	1,66	1,83	2,42	1,57	1,23
MNP [mV]	418,3	418,5	418,0	419,4	417,2	410,9	415,8	418,7	416,5	410,1	420,4	428,3
schnell	79,1	80,0	84,7	83,4	79,9	84,2	80,5	82,5	81,3	86,4	78,7	80,8
mittelschnell	15,8	15,9	13,1	13,8	15,8	13,0	15,0	13,2	14,8	10,6	16,0	14,1
langsam	5,1	4,1	2,2	2,8	4,3	2,7	4,5	4,3	3,6	3,0	5,3	5,1
DPPH	0,868	1,020	0,945	1,016	0,746	1,078	0,922	0,906	0,770	0,773	0,805	0,643
Chapon [mval/l]	1,04	1,20	1,28	1,23	1,01	1,71	1,27	1,06	1,03	1,36	0,97	0,89
Gesamtpoly-phenole [mg/l]	133	205	185	184	114	184	133	136	140	70	63	71
Anthocyanogene [mg/l]	22,2	49,7	40,4	44,0	20,5	44,2	26,3	22,4	20,6	15,2	17,6	9,7

MNP: Mittleres Nullstrompotential [mV]
 schnell: Prozentualer Anteil schnellreduzierender Substanzen
 mittel: Prozentualer Anteil mittelschnellreduzierender Substanzen
 langsam: Prozentualer Anteil langsamreduzierender Substanzen
 DPPH: Diphenylpicrylhydrazyl reduzierende Aktivität, Extinktionsunterschied
 Chapon: Reduzierende Substanzen nach Chapon [mval/l]

Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse für die Kalt-Warm forcierten Biere

Tab.19: Analysenergebnisse für die forciert gealterten Biere

	Hell 1	Hell 2	Hell 3	Hell 4	Hell 5	Hell 6	Hell 7	Pils 1	Pils 2	Weizen 1	Weizen 2	Weizen 3
Stromverhältnis	1,48	2,02	1,97	1,99	1,90	2,02	1,58	1,70	1,59	2,07	1,38	1,30
MNP [mV]	418,8	416,2	409,3	411,4	419,9	409,7	419,0	423,1	431,4	410,5	420,6	428,3
schnell	79,9	82,0	86,5	85,6	82,5	85,2	81,9	84,6	83,3	86,6	80,2	81,1
mittelschnell	15,5	15,8	12,4	12,7	13,4	12,4	15,5	13,4	14,8	10,6	15,0	14,0
langsam	4,6	2,2	1,1	1,7	4,1	2,4	2,6	2,0	1,9	2,8	4,8	4,9
DPPH	0,760	0,908	0,899	0,895	0,706	0,816	0,799	0,750	0,689	0,685	0,704	0,619
Chapon [mval/l]	0,98	1,02	1,27	1,33	0,97	1,28	1,20	1,00	0,97	0,80	0,77	0,77
Gesamtpoly-phenole [mg/l]	123	57	192	142	119,	159	139	112	120	65	61	65
Anthocyanogene [mg/l]	11,2	30,1	42,8	23,5	17,9	24,7	21,6	19,5	19,7	15,0	17,0	5,7

MNP: Mittleres Nullstrompotential [mV]
 schnell: Prozentualer Anteil schnellreduzierender Substanzen
 mittel: Prozentualer Anteil mittelschnellreduzierender Substanzen
 langsam: Prozentualer Anteil langsamreduzierender Substanzen
 DPPH: Diphenylpicrylhydrazyl reduzierende Aktivität, Extinktionsunterschied
 Chapon: Reduzierende Substanzen nach Chapon [mval/l]

Diskussion

Ein direkter Zusammenhang zwischen den elektrochemischen Ergebnissen und anderen Werten war beim frischen Bier nicht festzustellen. Anders als bei den Versuchsreihen bei denen von der gleichen Würze, also gleichen Rohstoffen oder der selben Charge Bier ausgegangen wurde, bestehen hier in den verschiedenen Brauereien unterschiedlichste Parameter, die Menge und Art der Reduktone beeinflussen, beginnend beim Melanoidingehalt des Malzes. Wenn wir das Weizen 1 betrachten, so hat dieses sowohl eine sehr hohe Reduktionskraft als auch ein niedriges Nullstrompotential. Der Gehalt an phenolischen Substanzen und auch die Radikalfängereigenschaften nach DPPH sind aber

gering (etwa in der selben Größenordnung wie bei den anderen Weizenbieren). Auffällig war dieses Bier durch die sehr kräftige Farbe. Unsere elektrochemischen Messungen haben hier stark auf diesen hohen Gehalt an Melanoidinen angesprochen, die durch das Malz eingebracht wurden. Deutlich wird das auch wenn man den äußerst hohen Anteil an schnellreduzierenden Substanzen betrachtet. Wiederum zeigt sich, dass die schnellen ITT-Substrate eine andere Gruppe als die tatsächlich wirkenden Radikalfänger bilden.

Auch die prozentuale Verteilung von schnell-, langsam- und mittelschnellreduzierenden Substanzen stand nicht im Zusammenhang mit dem Gehalt an phenolischen Substanzen oder der antiradikalischen Aktivität.

Technologische Unterschiede können die unterschiedlichsten Auswirkung auf die verschiedenen Reduktonklassen haben: Sauerstoffeintrag, die Kochung (Melanoidinbildung) oder unterschiedliche Hopfung. So werden die elektrochemischen Messungen durch eine große Menge an Parametern beeinflusst.

Ein zwischenbetrieblicher Vergleich von Nullstrompotential und elektrochemischem ITT allein kann noch keinerlei Aufschlüsse über Bierqualität und Alterungsstabilität geben. Die Alterungsverkostung ergab deshalb auch keine Beziehung zu diesen Werten.

Hingegen ermöglichen die elektrochemischen Messungen, wie unsere kleintechnischen Versuche gezeigt haben, innerhalb eines Betriebes bei der Variation einer überschaubaren Anzahl von Parametern, den jeweiligen Redoxzustand des Bieres abzuschätzen.

Was jedoch leicht zu erkennen ist, ist der Zusammenhang von Polyphenol- und Anthocyanogengehalt und Radikalfängereigenschaften. Die nicht oder weniger stark stabilisierten Biere (mit Anthocyanogengehalten von über 40 mg/l) hatten allesamt eine höhere DPPH-reduzierende Aktivität. Diese Unterschiede im Polyphenolgehalt beeinflussen dagegen das Nullstrompotential nicht allein, da wie oben schon ausgeführt, die cyclovoltammetrische Messung auch verschiedene andere Reduktone erfaßt.

Beim Forcieren zeigte sich beim Nullstrompotential kein einheitliches Verhalten. Teilweise stieg es an, fiel aber auch erstaunlicherweise bei den am stärksten mit Sauerstoff belasteten Bieren ab, was praktisch eine Zunahme elektroaktiver Stoffe bei der Alterung bedeutet.

Auch hier fällt wie beim Versuch mit PVPP-Stabilisierung auf, dass die Biere mit einem hohen Ausgangsgehalt an Polyphenolen und Anthocyanogenen durch das Forcieren eher eine Absenkung des Potentials erfahren, also eine Bildung elektroaktiver Substanzen begünstigt wird.

Diese Beobachtung wurde auch bei anderen Versuchsreihen gemacht. Praktisch bedeutet das, dass über das Nullstrompotential oder die Veränderung des Nullstrompotentials während der Alterung keine Aussage über Alter oder Aufbewahrungsbedingung des Bieres

gemacht werden kann. In einer weiteren Versuchsreihe (vgl. Kapitel 4.7) wurde deshalb versucht, das Potentialfenster dermaßen zu verändern, daß spezifisch die bei der Alterung abnehmenden Radikalfänger erfaßt werden, was aber nicht gelang. Während das Stromverhältnis tendenziell konstant blieb, änderte sich deutlich die relative Zusammensetzung: Die schnellreduzierenden Substanzen nahmen fast ausnahmslos zu und die langsamreduzierenden ab. Gleichzeitig nahm bei allen Bieren die antiradikalische DPPH-reduzierende Aktivität ab. Dies ist wiederum ein weiterer Hinweis, dass der Klasse der langsamreduzierenden Reduktone mehr Beachtung geschenkt werden muss.

4.7 Veränderung des Potentialfensters bei der cyclovoltametrischen Messung zur Erhöhung der Spezifität gegenüber Radikalfängern

In unseren Versuchen wurde festgestellt, dass bei Alterung der Biere oft eine Senkung des Potentials auftritt. Es werden also mehr elektroaktive Reduktone erfasst. Da aber antiradikalisch wirkende phenolische Substanzen und damit auch die antiradikalische Aktivität bei der Alterung stets abnehmen (vgl.Kap.4.6), werden also hier unspezifisch verstärkt Substanzen erfasst, die mit der tatsächlichen antiradikalischen Qualität nichts zu tun haben.

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurde das Potentialfenster, d.h. eine Spannungsrampe, von 0-1100 mV gewählt. In dieser Versuchsreihe wurden zur Messung eines Bieres in frischem und in forciert gealtertem Zustand (5Tage, 60°C) verschiedene Potentialfenster getestet.

Das frische Bier hatte eine DPPH-reduzierende Aktivität, die mit einem Extinktionsunterschied von 0,977 bestimmt wurde. Mit der Alterung nahm die antiradikalische Aktivität deutlich ab. Es wurde nur noch ein Extinktionsunterschied von 0,809 ermittelt (vgl.Tab.20).

Tab.20: Änderung von antiradikalischer Aktivität und Stromverhältnis bei forcierter Alterung

	DPPH-Extinktionsdifferenz	Stromverhältnis
Frisches Bier	0,977	1,84
Gealtertes Bier	0,809	2,12

Auch hier waren es schnellreduzierende ITT-Substrate, die zunahmen, wie aus dem deutlichen Anstieg des Stromverhältnisses sichtbar wird.

Das Mittlere Nullstrompotential bestimmt bei einer Spannungsrampe von 0-1100 mV sank durch das Forcieren deutlich von 434,8 mV auf 421,8 mV ab.

Auch die anderen Spannungsrampen (0-1000mV, 0-900mV, 0-850mV und 0-600mV) ergaben stets für das forcierte Bier ein niedrigeres Potential (vgl. Tabelle 22). Die Potentiale näherten sich zwar bei einer Senkung des Umkehrpotentials auf 850 mV an, bei einer weiteren Senkung auf 600mV wuchs die Differenz wieder.

Tab.21: Mittleres Nullstrompotential bei unterschiedlichen Potentialfenstern

Potentialfenster [mV]	Frisches Bier [mV]	Gealtertes Bier [mV]
0-1100	434,8	421,8
0-1000	428,8	420,8
0- 900	425,8	421,8
0- 850	422,9	421,0
0- 600	206,4	203,5

An dieser Versuchsreihe wurde deutlich, dass das Erfassen von Summenparametern problematisch für die komplexen Vorgänge bei der Bieralterung ist, da bei diesen elektrochemisch bestimmten Summenparametern verschiedenste Reduktone, mit den verschiedensten Wirkungsmechanismen erfasst werden. Sichtbar wird hier die Neubildung elektroaktiver Substanzen bei der Alterung, die nicht als Radikalfänger wirken und deshalb keinen Einfluss auf die DPHH-reduzierende Aktivität haben. Es gelang nicht, durch die Wahl anderer Meßbedingungen die Spezifität der cyclovoltametrischen Messungen in der Weise zu steigern, dass sie die Abnahme der Radikalfänger durch Alterung in jedem Fall als Zunahme des Potentials anzeigt. Wie bei diesem Testbier wurde jedoch bei allen Potentialfenstern eine Abnahme des Potentials ermittelt. Deshalb können cyclovoltametrische Messungen auch unter Variation der Meßbedingungen alleine keinen Aufschluß über die Alterung eines Bieres geben. Vorallem die Gruppe der schnellreduzierenden Substanzen, die bei der Bieralterung oft absolut und relativ zunimmt stellt elektroaktive Reduktone, die potentialsenkend wirken.

Die Potentialunterschiede nehmen zwar bei einer Absenkung des Umkehrpotentials auf 850mV etwas ab, jedoch es tritt keine Umkehrung der Verhältnisse ein in der Weise, dass durch die Alterung bedingte niedrige Gehalte an Radikalfängern auch zu einem Anstieg des Potentials führen.

Aus zwei zusätzlichen entscheidenden Gründen wurde deshalb auf eine Veränderung der Spannungsrampe für die weiteren Versuchsreihen verzichtet: Erstens die gute Reproduzierbarkeit bei 0-1100mV und zweitens die hohe Aussagekraft unter diesen Bedingungen bei den meisten anderen Fragestellungen, die auch daher rührt, dass wichtige im Bier enthaltene phenolische Antioxidantien genau in diesem Bereich das Oxidationspotential der Endiolgruppen besitzen.

5 Untersuchungen an Äpfeln von unterschiedlich gedüngten Bäumen

5.1 Hintergrund

In diesem Kapitel soll kurz gezeigt werden, wie schon begonnen wurde, die eigentlich für die Brauereianalytik entwickelten elektrochemischen Methoden anzuwenden.

Von Univ. Doz. Dipl. Ing. Dr. Herbert Keppel vom Landwirtschaftlichen Versuchszentrum Steiermark wurde uns "Apfelsaft" zur elektrochemischen Messung zur Verfügung gestellt. Bei diesem Saft handelt es sich um jeweils eine Probe aus drei Äpfeln desselben Baumes. Jeweils eine Gruppe von Apfelbäumen wurde auf dieselbe Weise gedüngt. Alle Bäume gehören der selben Sorte an.

Ziel war es die die Abhängigkeit unterschiedlichster Qualitätsparameter von der Art der Düngung zu ermitteln.

Dabei sollte auch der Einsatz der elektrochemischen Messmethoden Cyclovoltametrie und elektrochemischer Indikator-Time-Test für diese Fragestellungen überprüft werden, indem Beziehungen zwischen diesen Messergebnissen und anderen Parametern gesucht werden.

5.2 Material und Methoden

Die einzelnen Äpfel wurden so ausgepreßt, daß der Saft noch die Pulpe enthielt.

Im Versuchszentrum wurden Eigenschaften der Äpfel, wie Masse, Volumen, pH, rH-Wert und Grad Brix (Dichte) des Saftes des Saftes bestimmt.

5.2.1 Bestimmungen im Landwirtschaftlichen Versuchszentrum

Im Rahme einer Diplomarbeit wurden im Landwirtschaftlichen Versuchszentrum Graz zahlreiche Parameter bestimmt¹

5.2.1.1 pH-Wert

Die pH-Messungen des Saftes erfolgten mittels eines geeichten pH-Meters der Firma Orion Model 420.

5.2.1.2 rH-Wert

Da in biologischen Proben eine Vielzahl von Redoxsystemen vorliegt, die nebeneinander wirken, können nicht die einzelnen Potentiale bestimmt werden.

Deswegen wird ein Mischpotential bestimmt.

Der rH Wert leitet sich aus dem negativen Logarithmus des Wasserstoffpartialdrucks an der Elektrode ab.

RH-Werte von unter 20 bedeuten eine stärker reduzierende Probe, rH-Werte über 30 eine stärker oxidierende Probe.

Bestimmt wurde der rH-Wert mittels des Bioionostaten der Firma Lautenschläger.

Das Messprinzip ist eine stromlose Potentialbestimmung gegen eine Silber-/Silberchloridelektrode.

40ml des Saftes mussten genau 2 Minuten nach dem Pressen des Saftes (Wartezeit zum Absetzen der Feststoffe) in ein 100ml Gefäß pipetiert werden. Dieses wurde dann mit einem Deckel verschlossen, der drei Öffnungen enthält. Je eine für eine Silber-/Silberchlorid-Elektrode als Bezugselektrode zur Messung des Redoxpotentials, eine Platin-Arbeitslektrode für die Redoxprozesse in der Probe und ein Thermometer zur Bestimmung der Temperatur.

Nach weiteren (sehr genau eingehaltenen) 2 min erfolgte die Ablesung des rH-Wertes am Bioionostaten.

¹ Bodiselitsch, Bernd, „Auswirkungen verschiedener Düngemittel auf den Boden und die Fruchtqualität der Apfelsorte „Golden Delicious“, Diplomarbeit, Graz, 2002

Geeicht wurde der Bioionostat gemäß der Betriebsanleitung der Firma Lautenschläger. Dazu wird eine Redox-Puffer-Lösung mit dem Potential von 220mV und pH 7 der Firma Mettler Toledo verwendet.

5.2.1.3 Extrakt

Die Bestimmung des Extrakts erfolgte refraktometrisch mit einem ATAGO Digitalrefraktometer.

Es wurde ein Tropfen des klaren Apfelsaftes in die Messkammer gegeben und nach Verschliessen der Kammer der Wert in Brix-Graden abgelesen.

5.2.1.4 Titrierbare Säure

10ml Saft wurden mit 0,1 M NaOH bis pH 8,1 titriert. Bei Obstsaften liegt eine starke Pufferung im pH-Bereich 7-8 vor. Um die gesamte titrierbare Säure zu erfassen, wird deshalb bis pH 8,1 titriert¹.

5.2.1.5 Leitfähigkeit

Der elektrische Widerstand wurde ebenfalls mittels des Bioionostaten bestimmt.

Der reziproke Wert bezeichnet die Leitfähigkeit.

2.1.6 p-Wert

Der p-Wert wird aus den elektrochemischen Merkmalen rH-Wert, pH-Wert und spezifischer Widerstand nach folgender Gleichung errechnet:

$$p = \frac{[(rH - 2 \cdot pH) \cdot 28,85]^2}{\text{spezifischer Widerstand}} \quad (\text{Gleichung 7})$$

¹ Bruger, A.H., „Beobachtungen über die Wirkung von Bodentausch bei der Bekämpfung von Apfelmüdigkeit“, Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur Wien, 1990

Nach Hoffmann liegt der p-Wert umso niedriger, je höher die Qualität eines Lebensmittels ist. Diese Einschätzung wurde dadurch gewonnen, dass bei für den menschlichen Organismus gesünderen Lebensmitteln ein niedrigerer rH-Wert und ein höherer spezifischer Widerstand beobachtet wurde¹

Zum Transport zur Messung nach Weihenstephan wurde der Apfelsaft in kleine Kunststoffflaschen abgefüllt und tiefgekühlt.

Am Messtag wurde jeweils eine Reihe entnommen und vorsichtig unter lauwarmen Wasser aufgetaut.

Als Problem für die Messungen im EAA erwies sich die enthaltene Pulpe, da diese die dünnen Schläuche verstopfen würde.

In einem Vorversuch wurde versucht, die Pulpe durch Zentrifugieren abzutrennen, wie dies am Lehrstuhl zur Klärung hefetrüber Proben üblich ist. Es gelang jedoch nicht die Pulpe quantitativ abzutrennen. Gerade beim Abdekantieren haftete die Pulpe nicht ausreichend an der Wand des Zentrifugenbechers.

Auch eine Klärung über ein Faltenfilter, ob mit oder Kieselgur, war nicht möglich, da das Filter schnell verstopfte.

Deshalb wurde ein Wattebausch in den Trichter eingebracht, an dem die Pulpe dann hängen bleibt.

Das Probevolumen wurde so in NRW-Bierflaschen filtriert, da aus diesen die Dosierung unter Schutzgasatmosphäre möglich ist.

Das zur Verfügung gestellte Probenvolumen reichte nur für zwei Wiederholungen anstatt der bei den bisherigen Messungen üblichen drei aus.

In einem Vorversuch wurde mit kommerziell erhältlichem Apfelsaft (Direktsaft) die Grössenordnung der Reduktionskraft von Apfelsaft ermittelt, da bisher keine Erfahrungen für dieses Substrat vorlagen. Wichtig war hier, zu ermitteln, ob die Reduktionskraft des Saftes eventuell höher liegt, als die des Bieres, für das die dosierten Mengen Probe und Dichlorophenolindophenol eigentlich bestimmt war. In diesem Fall müsste wie bei dunklen oder Stark-Bieren eine Verdünnung durchgeführt werden. Wie aber im folgenden Kapitel dargestellt, war diese Verdünnung bei den vorliegenden Apfelsaftproben nicht nötig.

¹ Hofmann, H.; "Vom lebendigen Lebensmittel", Deukalion, Holm 1997, S.184

5.3 Ergebnisse und Diskussion der Messungen an Äpfeln

5.3.1 Vorversuch zur Abschätzung der Reduktionskraft von Apfelsaft

Der Vorversuch ergab beim kommerziell hergestellten Apfelsaft ein Stromverhältnis von 0,2. Falls das Stromverhältnis 2,5 übersteigt, bedeutet das, daß das DCI durch die Reduzierung durch die Inhaltsstoffe der Probe und die zugegebene Ascorbinsäure völlig aufgebraucht ist. Für die "Eichung" durch den Standard Ascorbinsäure steht also nicht mehr genug DCI zur Verfügung. Der Wert lag aber mit 0,2 auf einem im Vergleich zu Bier sehr niedrigen Niveau. Demnach ist die Reduktionskraft von Apfelsaft gegenüber DCI deutlich geringer als die von Bier. Es wird also innerhalb von 4 min nur ein kleiner Teil des zudosierten DCI reduziert. Das DCI ist also doch im Überschuss vorhanden, und eine Verdünnung des Apfelsaftes ist nicht notwendig.

5.3.2 Reproduzierbarkeit der cyclovoltametrischen Messungen im Apfelsaft

Bei der Bestimmung des ersten Nullstrompotentials ergaben sich zwischen dem in der ersten und zweiten Messung bestimmten mittleren Nullstrompotential deutliche Abweichungen. Exemplarisch sind hier die Werte für die Versuchsreihe Dünger 2 dargestellt.

Baum Nr.	1.Nullstrompotential [mV] 1.Messung	1.Nullstrompotential [mV] Wiederholung
5	450,6	447,0
6	446,6	437,0
7	423,0	449,9
8	293,5	434,8
10	418,1	457,2
11	398,5	453,4

Damit gilt das erste Nullstrompotential als nicht reproduzierbar. Eine Berechnung des "Mittleren Nullstrompotentials" ist also nicht sinnvoll. Eine Angabe des zweiten Nullstrompotentials ist hier, weil es sich um die besser reproduzierbare Grösse handelt sinnvoll.

5.3.3 Einzelergebnisse der verschiedenen Bäume

Jeweils drei Äpfel jeweils eines Baumes wurden, wie oben beschrieben, zu Saft gepresst. In der folgenden Abbildungen werden alle für den Saft bestimmten Grössen wie Grad Brix, pH, Titrationsacidität, rH-Wert, p-Wert, Leitfähigkeit, 2.Nullstrompotential, Stromverhältnis und "Korrigiertes Stromverhältnis" (Division durch die Leitfähigkeit) aufgeführt.

5.3.3.1 Zusammenhang 2.Nullstrompotential und Extraktgehalt

Zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Extraktgehalt (in Grad Brix) und 2.Nullstrompotential wurden die Messwerte sämtlicher Proben einander gegenübergestellt.

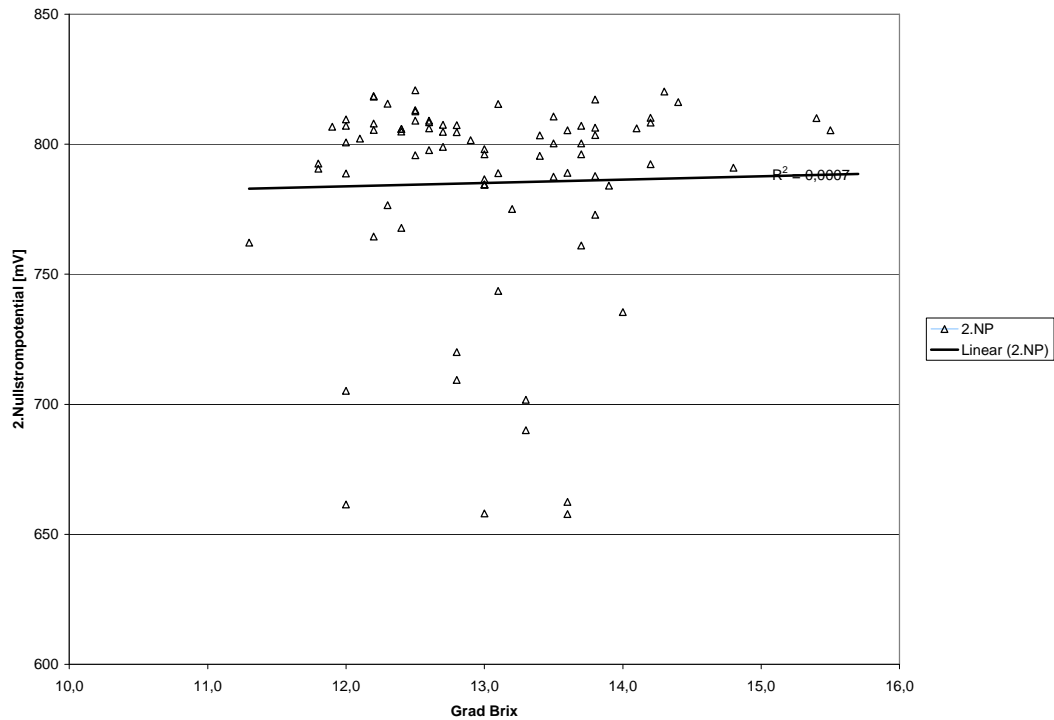


Abb. 136: 2.Nullstrompotential in Abhängigkeit vom Extraktgehaltes des Apfelsafts

Anders als bei der Messung von Bieren, bei denen ein höherer Stammwürzegehalt mit niedrigeren Nullstrompotentialen verbunden war, ist hier bei höheren Extraktgehalten (in Grad Brix) keine eindeutige Tendenz festzustellen.

5.3.3.2 Titrationsacidität und 2.Nullstrompotential

In der folgenden Abbildung sind das 2.Nullstrompotential und der Verbrauch an Lauge bei der Bestimmung der Titrationsacidität dargestellt.

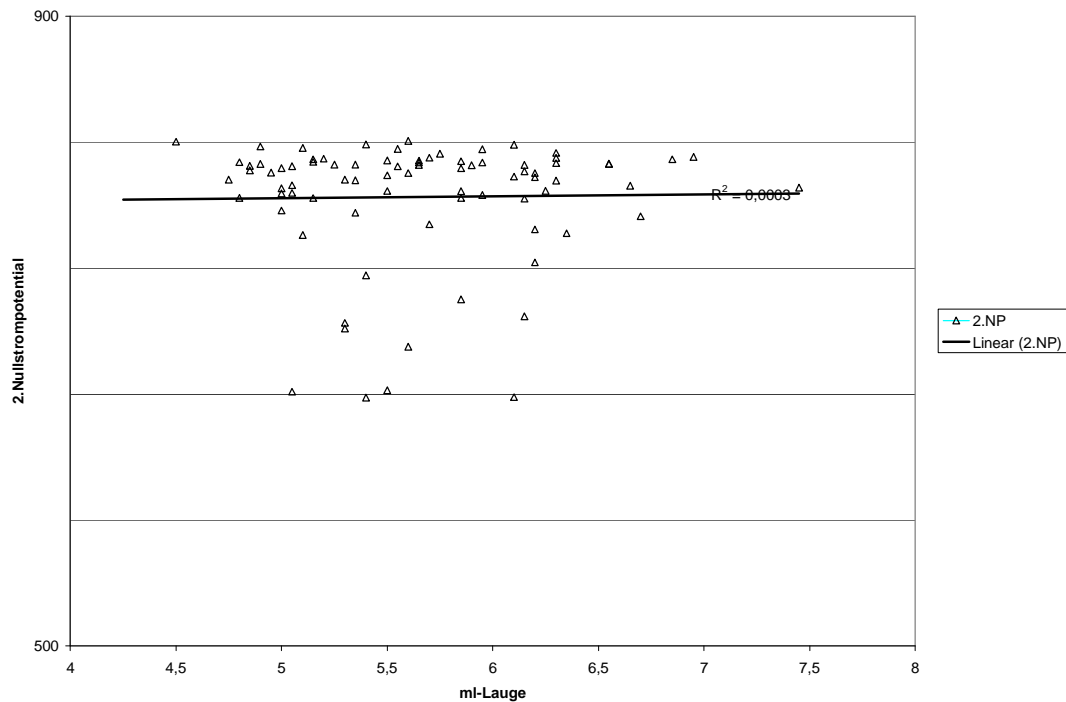


Abb.137: 2.Nullstrompotential in Abhängigkeit von der Titrationsacidität des Apfelsafts

Zwischen der Titrationsacidität und der Höhe des 2.Nullstrompotentials konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

5.3.3.3 p-Wert und 2.Nullstrompotential

Um eventuelle Zusammenhänge zwischen diesen beiden Möglichkeiten der Redoxpotentialbestimmung aufzuzeigen, wurden für alle Proben der errechnete p-Wert gegen das 2.Nullstrompotential aufgetragen.

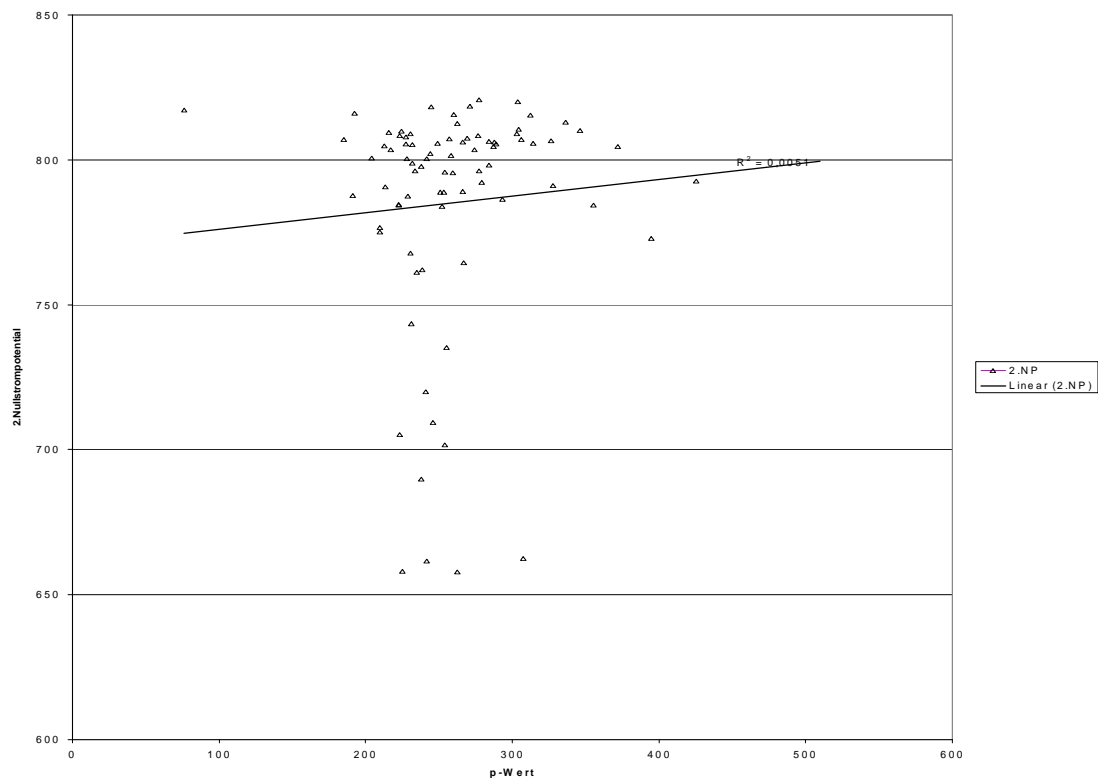


Abb.138 : 2.Nullstrompotential in Abhängigkeit vom p-Wert des Apfelsafts

Tendenziell ist ein höherer p-Wert mit einem höheren mittleren Nullstrompotential verbunden. Dieser Zusammenhang lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei der p-Wert-Bestimmung im Prinzip um eine korrigierte Potentialmessung handelt. Es zeigen sich jedoch bei p-Werten zwischen 200 und 300 einige Ausreisser, bei denen das "Mittlere Nullstrompotential" sehr niedrige Werte zwischen 660mV und 750mV annimmt. Die grossen Abweichungen zeigen jedoch deutlich, dass bei der p-Wert-Bestimmung andere Substanzen und andere Wirkungsmechanismen erfasst werden, als bei der Cyclovoltametrischen Potentialbestimmung.

5.3.3.4 Korrigiertes Stromverhältnis und Titrationsacidität

In der folgenden Darstellung wird das Korrigierte Stromverhältnis, d.h. das mittels Division durch die Leitfähigkeit standardisierte Stromverhältnis, gegen die Menge an verbrauchter Lauge aufgetragen.

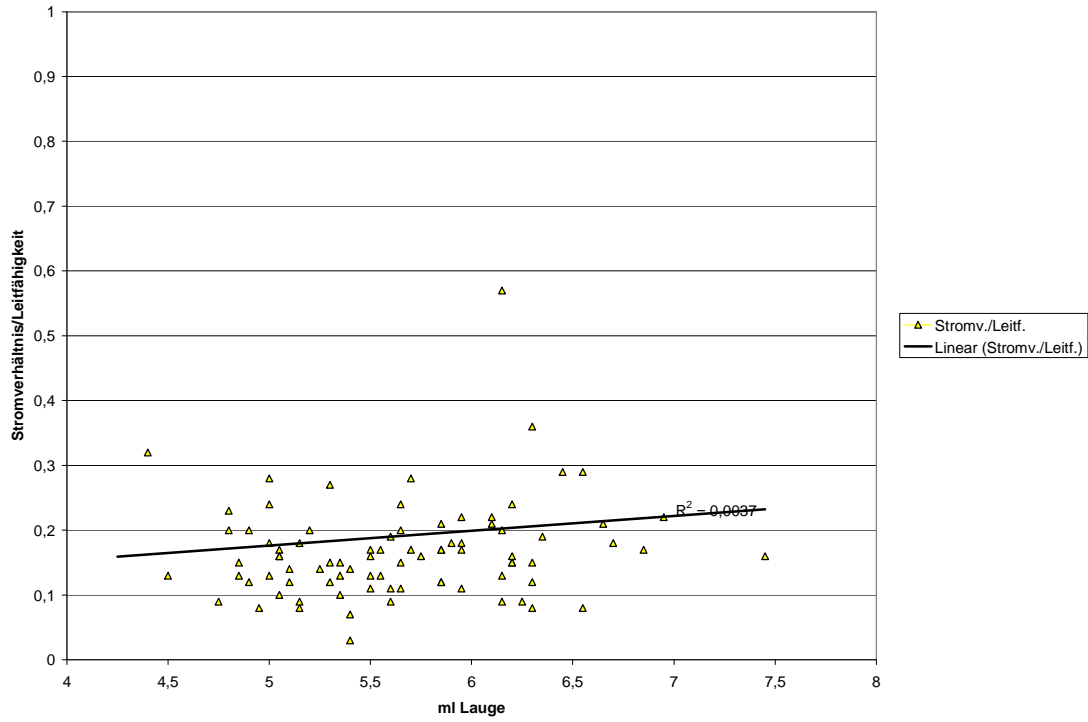


Abb.139: Korrigiertes Stromverhältnis in Abhängigkeit von der Titrationsacidität des Apfelsafts

Auch hier zeigt sich eine sehr grosse Streuung der Werte. Tendenziell ist ein höheres korrigiertes Stromverhältnis mit einer höheren Titrationsacidität verbunden.

5.3.3.5 Korrigiertes Stromverhältnis und Extraktgehalt

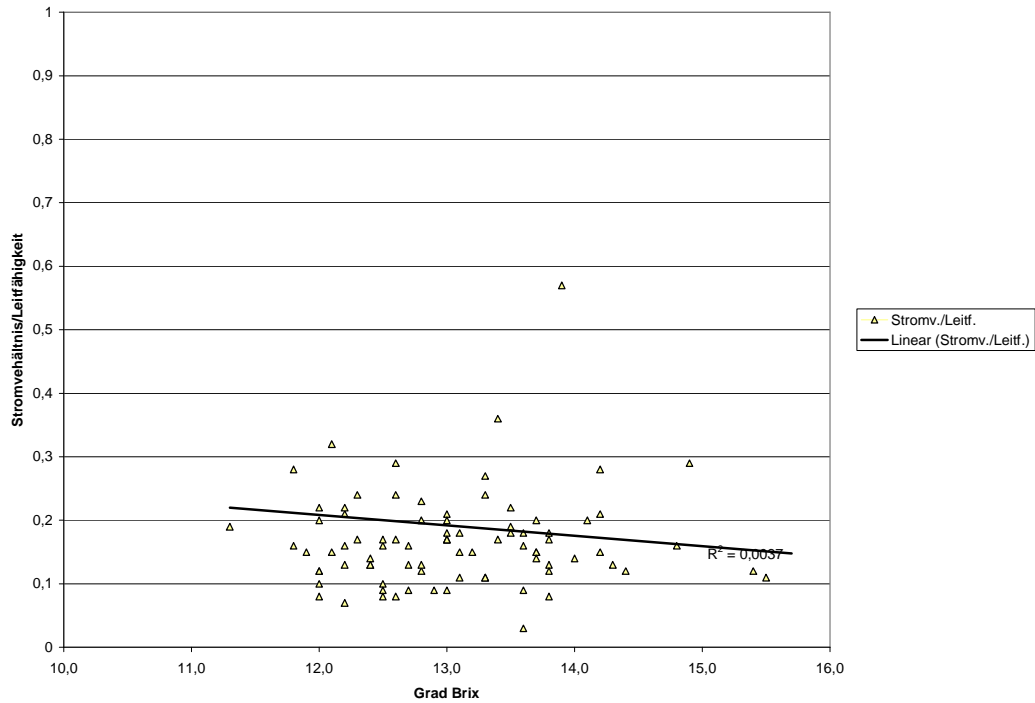


Abb. 140: Korrigiertes Stromverhältnis in Abhängigkeit vom Extraktgehalt des Apfelsafts

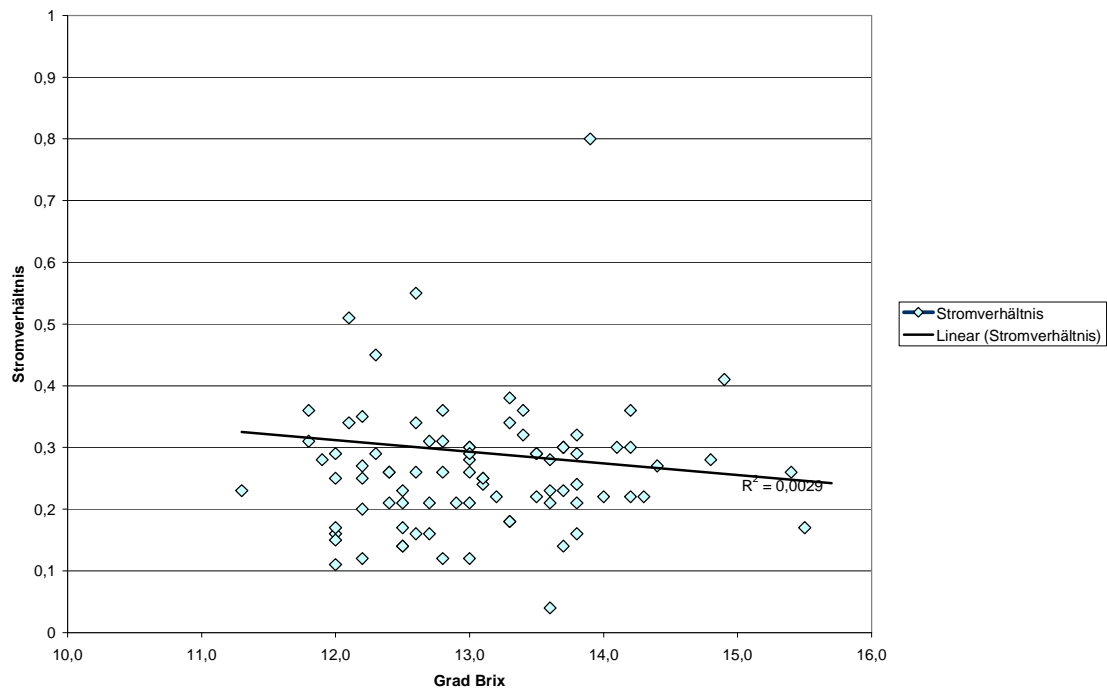


Abb. 141: Stromverhältnis in Abhängigkeit vom Extraktgehalt des Apfelsafts

Ein hoher Extraktgehalt ist tendenziell mit einem niedrigen Stromverhältnis verbunden.

Ein höherer Gehalt an gelösten Stoffen hat also weniger reduzierende Stoffe zur Folge. Der Anteil reduzierender Stoffe an der Gesamtmenge des gelösten Extrakts ist also bei hohen Extraktwerten noch niedriger.

Diese Abhängigkeit ändert sich auch nicht bei der Korrektur um die Leitfähigkeit.

Ein erhöhter Extraktgehalt ist auch nicht mit einer erhöhten Leitfähigkeit verbunden.

Mit einer verstärkten Bildung von Extrakt in der Frucht ist also tendenziell eine schwächere Bildung von Antioxidantien verbunden.

5.3.3.6 Korrigiertes Stromverhältnis und 2.Nullstrompotential

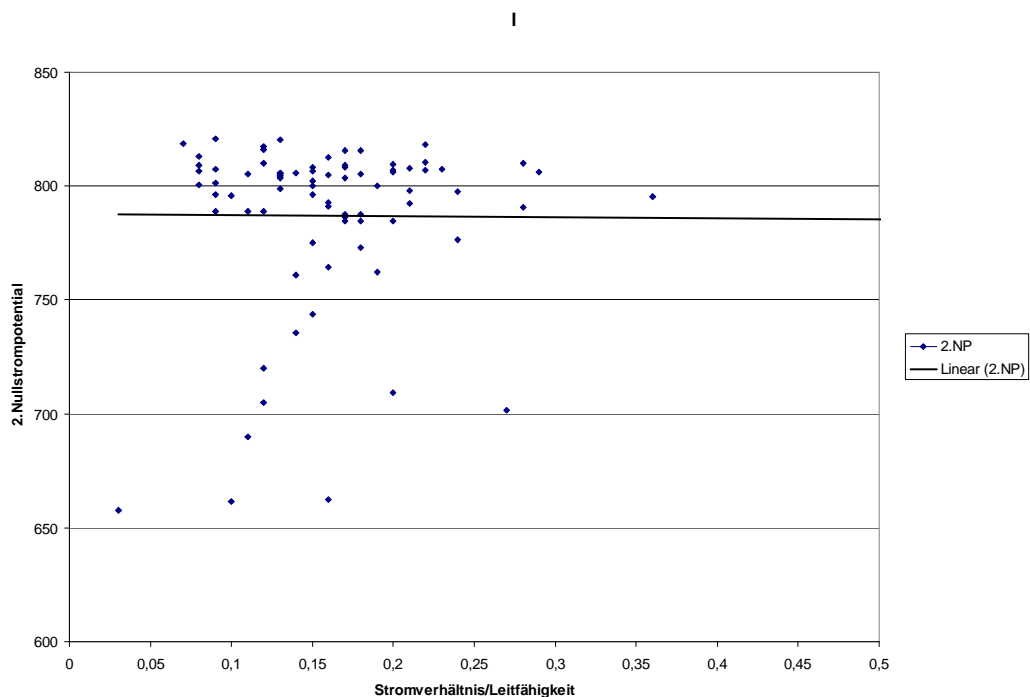


Abb.142: 2.Nullstrompotential in Abhängigkeit vom korrigiertem Stromverhältnis des Apfelsafts

Ein eindeutiger Trend beim Zusammenhang zwischen korrigiertem Stromverhältnis und 2.Nullstrompotential konnte nicht festgestellt werden. Gerade bei korrigierten Stromverhältnissen zwischen 0,1 und 0,2 waren einige Ausreisser mit äusserst niedrigen 2. Nullstrompotential festzustellen. Während der größte Anteil der Werte für das 2.Nullstrompotential bei etwa 780-820mV liegt, bewegten sich diese Werte um 660-750mV. Anders als bei den Messungen in Bier, wo hohe Potentiale mit einer niedrigen Reduktionskraft (ausgedrückt durch das Stromverhältnis) verbunden waren, scheint hier

beim Apfelsaft das Potential weniger stark von den DCI-reduzierenden Substanzen bestimmt zu werden.

Es konnten nur einige tendenzielle Zusammenhänge der elektrochemischen Messungen mit anderen Parametern gefunden werden.

Wichtig ist hier, dass eine hohe Titrationsacidität auch mit einer höheren Reduktionskraft verbunden ist. Umgekehrt war mit einem höheren Extraktgehalt eher eine niedrigere Reduktionskraft verbunden.

Insgesamt wird hier deutlich, dass aus zahlreichen Gründen noch keine eindeutigen Ergebnisse (anders als beim Einsatz der elektrochemischen Methoden in der Brauereianalytik) interpretiert werden können. Das ist auf den ersten Blick erstaunlich, da der Apfelsaft eigentlich eine deutlich weniger komplexe Matrix darstellt als Bier. Doch die Gründe für die noch ernüchternden Ergebnisse sind folgende: Da der Apfelsaft frei von Kohlendioxid ist, kann sich äusserst leicht undefiniert Sauerstoff bereits beim Pressen der Äpfel lösen. Der Apfelsaft wurde vor dem Transport nach Weihenstephan eingefroren. Bis zur Tiefkühlung konnte aber der gelöste Sauerstoff Reduktone oxidieren, was ebenfalls beim Auftauen der Fall war. Tatsächlich wurden demnach statt frischer Proben undefiniert gealterte Proben analysiert. Auch die notwendige Filtration begünstigte Oxidationsreaktionen vor der Messung und gelöster Sauerstoff verhinderte eine reproduzierbare Bestimmung des 1.Nullstrompotentials. Ausserdem konnte mangels ausreichendem Probenvolumen nur eine Zweifach- statt Dreifachbestimmung durchgeführt werden.

Obwohl hier also starke Abweichungen zu beobachten sind, wird aus diesen Ergebnissen deutlich, dass die elektrochemischen Messungen durchaus auch Summenparameter ermitteln, die in Zusammenhang mit bestimmten Eigenschaften des Rohstoffes stehen. So könnten weitere Untersuchungen, bei verbesserter Probenahme und Probenbehandlung durchaus ein deutlicheres Ergebnis bringen, welche Aussage hier die Messungen hinsichtlich der tatsächlichen Qualität des Rohstoffes machen können. Man könnte an einen Index für die Qualität denken, in den viele klassische Parameter, aber auch die elektrochemisch ermittelte Reduktionskraft und das cyclovoltametrisch ermittelte Redoxpotential eingehen.

6 Gesamtdiskussion

6.1 Ergebnisse der elektrochemischen Messungen in Bezug zu den redoxrelevanten Stoffklassen

Die einzelnen Versuchreihen haben Anhaltspunkte dafür gegeben, welche Substanzgruppen mit welchen Wirkungsmechanismen welchen Reduktonklassen zuzuordnen sind.

6.1.1 Phenolische Substanzen

Deutlich wurde hier, dass die niedermolekularen phenolischen Substanzen im Medium Bier nicht zu den schnellreduzierenden Substanzen beim elektrochemischen Indikator-Time-Test gehörten, wie auch Hlavacek schon mittels des photometrischen Indikator-Time-Tests zeigen konnte, als er die Oxidations- und Reduktionsvorgänge bei der Bierherstellung untersuchte¹. Hingegen ergaben Versuche in alkoholischem Acetatpuffer in vorausgegangenen Untersuchungen eine Wirkung auf das Stromverhältnis². Bei Zugabe von Catechin bzw. Ferulasäure zu Bier wurde jedoch nicht die Reduktonklasse der schnellreduzierenden Substanzen erhöht. Bei der Zugabe zu Würze oder zum Schlauchen ergaben sich geringfügige Erhöhungen der langsamreduzierenden Substanzen. Insofern kann man davon ausgehen, dass der elektrochemische Indikator-Time-Test nur bei einer Reaktionszeit von 10-15 min auf Catechin und Ferulasäure anspricht. Für den photometrischen ITT wurde schon von Chapon festgestellt, dass die meisten phenolischen Substanzen zu den eher langsam reduzierenden Substanzen im Sinne des ITT gehören³. Gleichzeitig betonen jedoch Chapon und Kretschmer, dass eine Gruppe phenolischer Substanzen einen besonders großen Einfluss auf die Reduktonkraft nach der Eisen-Dipyridyl-Methode hat⁴, nämlich die Gruppe der Tannoide, die sie mittels Tannometer

¹ Hlavacek, I., "Oxidations- und Reduktionsvorgänge bei der Bierherstellung", II.Intern.Symposium der Gärungs-Industrie Leipzig, 1968, S.429-442

² Neumann,R., Elektrochemische Bestimmungsmethoden für das Reduktionsvermögen von Bier: Ansprechverhalten auf Probenveränderungen und Beeinflussung durch Matrixeffekte", Dissertation, TU-München, 2000

³ Chapon,L., "Oxygen and beer", Brewing Science Vol.2, Academic Press, New York 1981, S.407-455

⁴ Chapon,L., Kretschmer,,K.F., „Über die Bedeutung der reduzierenden Kraft bei hellen Bieren“, Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, 2001, S.185-195

bestimmten. Sie konnten auch mittels einer speziellen Variante des Indikator-Time-Tests, der DCI-Einspritzmethode zeigen, dass diese Gruppe der Tannoide zu den bedeutenden „mäßig-schnellreduzierenden Substanzen“ (Chapon) gehören, was nach ihrer Methode und Definition eine Reaktionszeit von 10-20 Minuten bedeutet. Diese Erfahrung deckt sich mit dem Ergebnis unseres elektrochemischen ITT, der die wirksamen phenolischen Antioxidantien als langsamreduzierende Substanzen erfasst. Die Tannoide umfassen niedermolekulare, reduzierende phenolische Komponenten, die sich positiv auf den Trinkanreiz, die Antioxidationskraft und Geschmacksstabilität auswirken¹.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass während der Bieralterung meist die schnellreduzierenden Substanzen zunehmen (vgl. Kapitel 4.6) und die langsamreduzierenden Substanzen abnehmen. Da erfahrungsgemäß die antiradikalische Aktivität mit der Alterung des Bieres sinkt, was hier auch mit der DPPH-Methode gezeigt wurde, ist wahrscheinlich, dass diese Abnahme eben auf die Oxidation phenolischer Radikalfänger zurückzuführen ist. Der Mechanismus dafür sind Abfolgen von Oxidationsvorgängen. Der eingebrachte Sauerstoff wird schnell aufgenommen über Substanzen, die spontan mit Sauerstoff reagieren. Hierbei handelt es sich um die "Beschwerungssubstanzen" im eigentlichen Sinne, die eine gewisse "Pufferung" gegenüber erhöhten Sauerstoffbelastungen darstellen. "Pufferung" ist in diesem Zusammenhang als Abfangen des Sauerstoffs durch diese Substanzen zu verstehen, das zumindest vorläufig geschmacksrelevante Oxidationsvorgänge verhindert, die zu Alterungssubstanzen führen. Die oxidierten Formen dieser Beschwerungssubstanzen, wie z.B. auch die Dehydroascorbinsäure, oxidierte Melanoidine oder auch oxidierte phenolische Substanzen selbst können dann über einen längeren Zeitraum gegenüber den phenolischen Substanzen und den Vorläufern der Alterungssubstanzen als Oxidantien wirken^{2,3}. Ames weist in ihren Arbeiten auf diese komplexen Zusammenhänge im Bezug auf Melanoidine hin, während Cos ähnliche Phänomene bei phenolischen Substanzen beobachtet⁴. Entscheidend für eine mögliche „prooxidative“ Wirkung sind die Bedingungen in der Matrix. Wichtig dabei sind Redoxkatalysatoren wie Eisen- und Kupfer-Ionen und damit auch Komplexbildner, die eine Ausfällung der Ionen bewirken können. Eisen und Kupferionen können durch Valenzwechsel Oxidationsreaktionen katalysieren oder auch als Bestandteil von Enzymen in enzymatischen Oxidationsprozessen eine große Rolle spielen. Auch der pH-Wert hat einen großen Einfluss auf den Verlauf der Redoxreaktionen.

¹ Kretschmer, K.F., „Die Tannometeranalyse heller Biere“, Brauwelt 140, 2000, S.1083-1084

² Lacan, F., Soulet, S., "Polyphenols and the Oxygen Paradox in the Brewing Process", Cerevisia 25 (4), 2000, S.35-50

³ Ames, J.M., "Melanoidins as Pro- or Antioxidants", Cerevisia 26 (4), 2001, S.210-216

⁴ Cos, P., Calomme, M., Pieters, A., "Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Antioxidant and Pro-Oxidant Compounds", Studies in Natural Products Chemistry 22, 2000, S.307-341

Die Oxidation bei den phenolischen Substanzen läuft nach Cos und Mitarbeitern in der Weise ab, dass die Substanzen mit der höchsten Radikalfängerqualität, also Di- bis Tetramere unter Bildung höhermolekularer Polyphenole polymerisieren und dadurch sowohl die Anzahl, als auch die Aktivität der reduzierenden OH-Gruppen abnehmen¹.

In unseren Versuchsreihen ließ sich der Gehalt an Anthocyanogenen, also nach Narziß niedrigmolekularer stärker reduzierender Substanzen², bei Oxidationsreaktionen nicht in Verbindung mit dem Grad der Oxidation (ausgedrückt durch Potential oder DPPH-reduzierende Aktivität) bringen. Eine generelle Zunahme des sogenannten Polymerisationsindex (PI), bei dem das Verhältnis der Gesamtpolyphenole zu den Anthocyanogenen angegeben wird, war mit zunehmender Oxidation des Bieres nicht zu beobachten. Hier stellt sich die Frage, ob bei der Analyse oxidierten Bieres die niedermolekularen, reduzierenden phenolischen Substanzen als Anthocyanogene erfasst werden.

Insgesamt kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass mit der Bestimmung der Anthocyanogene und Polyphenole durchaus reduzierende Substanzen erfasst werden. Deutlich wird das bei der Herausnahme oder Zugabe phenolischer Substanzen. Andererseits wurde deutlich, dass diese Bestimmungen auch unspezifisch Substanzen erfasst, die im Bier nicht reduzierend wirken. Es werden zwar die Endiol-Gruppen bestimmt, jedoch die tatsächlich reduzierende Wirkung dieser Hydroxylgruppen wird nicht erfasst. Einerseits kann durch die Struktur die reduzierende Kraft dieser Gruppen eingeschränkt sein, andererseits bilden gerade phenolische Substanzen Komplexe. Die Hydroxylgruppen können durch Komplexbildung mit Proteinen blockiert sein (Dieser Mechanismus findet in der Brauereitechnologie vor allem hinsichtlich der Bildung kolloidaler Trübungen Beachtung) und so nicht für Redoxreaktionen zur Verfügung stehen. Auch an Phenolat-Komplexe wie Kalium-Phenolat ist zu denken. Die Bildung solcher Komplexe ist stark abhängig von der Matrix, beispielsweise vom pH. Deshalb sind summarische Bestimmungen, bei denen eine starke Veränderung der Matrix durch Zugabe von Reagenzien oder Erhitzen auftritt ungeeignet phenolische Substanzen in ihrer tatsächlichen reduzierenden Wirkung zu erfassen. Im Gegensatz dazu wird bei der chemikalienfreien cyclovoltametrischen Messung die Matrix außer durch die Oxidation und Reduktion an der Arbeitselektrode nicht verändert. Eine Reaktion ist unter diesen Bedingungen also nur möglich, wenn die reduzierenden Gruppen tatsächlich zur Verfügung stehen. So sind die Mechanismen der

¹ Cos, P., Calomme, M., Pieters, A., "Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Antioxidant and Pro-Oxidant Compounds", *Studies in Natural Products Chemistry* 22, 2000, S.307-341

² Narziß, L., Bellmer, H.-G., "Studie über die Polyphenole und deren Polymerisationsindex in den Rohstoffen des Bieres und ihre Veränderung während der Bierbereitung", *Brauwissenschaft* 28, 1975, S.271-274

cyclovoltametrischen Messungen das beste Modell für die tatsächliche „in vivo“-Wirkung in der unveränderten Matrix Bier.

Gegenüber DCI besitzen die phenolischen Antioxidantien in der Matrix Bier eine geringe Reaktivität. Der Zusatz von Ferulasäure und Catechin, die durch die cyclovoltametrische Messung oder andere Methoden als starke Antioxidantien nachweisbar sind, lässt sich durch den elektrochemischen Indikator-Time-Test auch innerhalb einer Reaktionszeit von 15 Minuten nicht nachweisen. Reduzierende Gruppen dieser und anderer phenolischer Reduktone reagieren mit DCI also sehr langsam.

Es muss auch einige schnellreduzierende phenolische Substanzen geben, die durch die PVPP-Stabilisierung entfernt werden, wodurch dabei ein leichter Rückgang der Reduktionskraft zu beobachten ist. Die Reduktionskraft steht hier im Zusammenhang mit dem Gehalt an Polyphenolen und Anthocyanogenen, wenn auch der Einfluss gering ist.

Der Einfluss der Stabilisierung ist mittels der reduzierenden Substanzen nach Chapon besser zu beobachten, wie schon bei der Besprechung der Tannoide angedeutet wurde. So konnte auch Mc Murrough bei Versuchen zur kolloidalen Stabilität einen deutlichen Rückgang der Reduktionskraft nach Chapon durch polyphenolseitige Stabilisierungsmaßnahmen feststellen¹.

Ganz deutlich wurde hingegen, dass sowohl die Zugabe der einzelnen phenolischen Substanzen, als auch die Entfernung von phenolischen Substanzen durch die Stabilisierung einen deutlichen Einfluss auf das cyclovoltametrisch bestimmte Potential haben. So resultierte bei der Zugabe phenolischer Substanzen zum Bier ein niedrigeres und bei der Entfernung eines Teiles dieser Verbindungen ein höheres Potential. Die elektrochemische Messung spricht also ganz deutlich auf Veränderungen bei den phenolischen Radikalfängern an. Wird als einziger Parameter der Gehalt an phenolischen Substanzen verändert, ist das Potential eine schnelle und einfache Bestimmung, die Veränderung der antioxidativen Aktivität abzuschätzen. Phenolische Substanzen werden durch die Cyclovoltametrie so gut erfasst, da an der Arbeitselektrode als Anode durch Oxidationsprozesse die Bildung radikalischer Formen initiiert werden kann, und so Reaktionsmechanismen wie beim radikalischen Angriff reaktiven Sauerstoffs bei der Bieralterung auftreten können². Auch deshalb ist gerade die Cyclovoltametrie zur Detektion phenolischer Reinsubstanzen besonders geeignet.

Der Zusatz von Ferulasäure und Catechin zu abgefülltem Bier ist im Cyclovoltogramm erkennbar(vgl.Abb.8). Deutliche Ausbuchtungen sind bei spezifischen Spannungen

¹ McMurrough,I.,Madigan,D.,Kelly,R.J., "The Role of Flavanoid Polyphenols in Beer Stability", J.Am.Soc.Brew.Chem. 54 (3),1996,S.141-148

² Hendrickson,H.P.,Kaufmann,A.D.,Lunte,C.E.,"Electrochemistry of Catechol-Containing Flavonoids", J.PharmBiomed.Anal.12, 1994, S.325-334

erkennbar. Es bestätigte sich, dass der Zusatz von Catechin, das auch eine nachgewiesene größere antioxidative Wirkung als Ferulasäure hat, das Cyclovoltogramm stärker beeinflusst als die Ferulasäure. Insgesamt wird die Fläche innerhalb des Cyclovoltogramms größer, was gleichbedeutend ist mit vermehrter Ladungsübertragung bei den Oxidations- und Reduktionsvorgängen an der Arbeitselektrode.

Auch in der Versuchsreihe mit unterschiedlichen Gärtemperaturen waren die einzelnen relevanten niedermolekularen phenolischen Substanzen bei den günstigeren Redoxbedingungen erhöht. Begleitet war das günstige Redoxpotential bei den niedrigeren Temperaturen von einer erhöhten Menge schnellreduzierender Substanzen. Wie oben ausgeführt, handelt es sich bei diesen schnellreduzierenden Substanzen nicht um phenolische Antioxidantien. Diese Ergebnisse unterstreichen die Schutzwirkung der Beschwerungsstoffe gegen eine Oxidation der phenolischen Radikalfänger. So wird wieder deutlich, dass unsere elektrochemischen Summenparameter einen guten Überblick über die Oxidationsanfälligkeit eines Bieres geben können.

Bei anderen Versuchsreihen, bei denen sich weitere Parameter unterschieden, wie z.B. beim Vergleich verschiedener Biere aus unterschiedlichen Brauereien, konnte der Gesamtpolyphenolgehalt oder der Gehalt an Anthocyanogenen nicht in Zusammenhang mit den cyclovoltametrischen Messergebnissen gebracht werden. Grund dafür ist sicherlich das durch verschiedene Rohstoffe und Sudhausarbeit bedingte unterschiedliche Spektrum an phenolischen Substanzen und damit auch die dadurch bedingte unterschiedliche antioxidative Aktivität. Zusätzlich ist auch von einer großen Bandbreite im Gehalt anderer elektroaktiver Substanzen auszugehen. Tatsächlich ist es nicht Aufgabe der cyclovoltametrischen Messung, die Analytik der phenolischen Substanzen, die sehr unspezifisch bestimmte Stoffgruppen (Gesamtpolyphenole, Anthocyanogene) erfasst, zu ersetzen.

Vielmehr geht es bei diesem Summenparameter Potential um die Erfassung der Aktivität der phenolischen Antioxidantien und aller Substanzen mit antioxidativen Wirkungsmechanismen, was eine bessere Aussage über den Redoxzustand des Bieres erlaubt, als die Ermittlung des Gehalts bestimmter Stoffgruppen.

Zusammenfassend kann man die phenolischen Antioxidantien als elektroaktive potentialbestimmende Substanzen sehen. Im Sinne des ITT sind sie den langsamreduzierenden Substanzen, also den Substanzen zuzuordnen, die DCI nicht innerhalb von 15 min reduzieren können.

6.1.2 Melanoidine

Melanoidine bilden sich vor allem beim Mälzen und Würzekochen. Ihre Bildung wird über den Streckerabbau erklärt. Höhere Abdarrtemperaturen, wie auch intensivere Kochung steigern den Gehalt an Melanoidinen¹.

Messungen in dunklen Bieren oder Bieren, die teilweise aus dunklen Malzen hergestellt wurden, ergaben eine deutlich höhere Reduktionskraft und ein niedrigeres Potential im Vergleich zu hellen Bieren. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde für den elektrochemischen Indikator-Time-Test eine Verdünnungsroutine eingeführt. Bei dunklen Bieren wurde aufgrund der hohen Reduktionskraft oft das gesamte DCI innerhalb der Reaktionszeit verbraucht, sodass zum einen keine Differenzierung zwischen den Proben möglich ist und zum anderen kein DCI für die anschließende Kalibrierung mit der definierten Ascorbinsäurezugabe zur Verfügung steht. Deshalb wurden zusätzliche Routinen eingeführt, bei denen bei der Dosierung die Probe mit entionisiertem Wasser so verdünnt wird, dass der Volumenanteil der Probe 20%, 33%, 50% oder 67% beträgt. Tatsächlich werden die Melanoidine in der Literatur als die eigentlichen Reduktone, die Stoffe betrachtet, die als Beschwerungsstoffe des Bieres beim Sauerstoffeintrag gesehen wurden. Sie werden den schnell- und mittelschnellreduzierenden Substanzen zugeordnet, was ihre Reaktivität gegenüber DCI betrifft. Radikalfängereigenschaften werden ihnen weniger zugeschrieben.

Nach neueren Forschungen könnten die oxidierten Formen der Melanoidine prooxidative Wirkungen haben². Dabei werden einigen Melanoidinen deshalb sogar negative physiologische Eigenschaften für den Menschen zugeschrieben³. Stempfll spricht von der Oxidation der Alkoholgruppen der höhermolekularen Melanoidine zu Carbonyl-Melanoidinen⁴. Ursache der prooxidativen Wirkung der oxidierten Melanoidine ist, dass die Melanoidine reversibel oxidiert werden, und dadurch die oxidierten Formen wiederum als sehr reaktives Oxidationsmittel wirken können. Tatsächlich sind diese prooxidativen Wirkungen der oxidierten Melanoidine stark abhängig von der Matrix (pH, Schwermetalle).

¹ Kuntchewa, M.J., Obretenov, T.D., "Isolation and Characterisation of Melanoidins in Beer, Z.Lebensm.Unters.Forsch, 202, 1996, S.238-243

² Ames, J.M., "Melanoidins as Pro- or Antioxidants", Cerevisia 26 (4), 2001, S.210-216

³ Namiki, M., "Chemistry of Maillard Reactions: Recent Studies on the Browning Reaction Mechanism and the Development of Antioxidants and Mutagens", Advances in Food Research, 32, 1988, S.115-167

⁴ Stempfll, W., „Bierflavour und Geschmacksstabilität, Sensorische und Analytische Überprüfung“ Folge 2, Brauindustrie, 1995, S.120-125

Hier könnte Kritik ansetzen, ob ein hoher Anteil schnellreduzierender Reduktone, der auch immer durch Melanoidine bedingt ist, überhaupt erstrebenswert ist. Dazu kann ganz deutlich gesagt werden, dass sowohl ein hohes Niveau an schnellreduzierenden Substanzen als auch ein niedriges Potential einen Hinweis auf einen hohen Anteil der reduzierten Form dieser Reduktone geben. Denn nicht die Melanoidine selbst sind prooxidativ, sondern nur deren oxidierte Formen haben möglicherweise prooxidative Eigenschaften. Der Gehalt an der oxidierten Form ist aber nicht vom Gesamtgehalt an Melanoidinen abhängig, sondern einzig davon, wieviel Sauerstoff eingebracht wurde. Die Brauereitechnologie kann mit Hilfe dieser Messung gerade Maßnahmen unterstützen, die den Anteil der oxidierten Form begrenzen. Da melanoidinreiche Biere allgemein als weniger oxidationsanfällig und damit als geschmacksstabiler gelten¹, scheint ein möglicher prooxidativer Effekt der oxidierten Melanoidine keine so große Rolle im Bier zu spielen bzw. scheinen die antioxidativen Eigenschaften der reduzierenden Melanoidine bei weitem zu überwiegen. Zudem ist ein angemessener Melanoidingehalt beim jeweiligen Biertyp für Geschmack und Farbe unentbehrlich.

Es wurden nur wenige Melanoidine aus dem Bier isoliert, und die Verbindungen sind bei den vielen Variationen des Streckerabbaus dabei sehr vielfältig. Aussagekräftige Versuche über das Redoxverhalten wurden deshalb zumeist nur über Modellreaktionen gemacht, bei denen unter definierten Bedingungen aus Aminosäuren und Zuckern Melanoidingemische hergestellt wurden¹.

Zu den elektrochemischen Messungen ist hier zu sagen, dass die Melanoidine die Substanzen sind, die zu den schnellreduzierenden Substanzen beim elektrochemischen, wie auch, nach Chapon, photometrischen ITT gehören², und gleichzeitig auch das Potential bei der cyclovoltametrischen Messung absenken. Dies wird auch beim Versuch deutlich, bei dem großtechnisch hergestellte Biere verglichen wurden und in Vorversuchen zu dieser und vorangegangenen Arbeiten auch dunkle Biere untersucht wurden. Die Biere, die kräftiger in der Farbe waren, hatten mehr schnellreduzierende Substanzen und ein sehr niedriges Nullstrompotential, aber keine verbesserten Radikalfängereigenschaften.

Diese Substanzen werden also sowohl vom elektrochemischen ITT (als schnellreduzierende Reduktone), als auch von der cyclovoltametrischen Messung erfasst.

Die häufig beobachtete Steigerung der schnellreduzierenden Substanzen bei der Bieralterung kann bei forcierter Alterung durchaus auf die Bildung von Melanoidinen

¹ Chapon,L., Kretschmer,,K.F., „Über die Bedeutung der reduzierenden Kraft bei hellen Bieren“, Monatschrift für Brauwissenschaft 54, 2001, S.185-195

² Chapon,L.,Chapon,S., "Beitrag zum Mechanismus der Bieroxidation, Verhalten der reduzierenden Substanzen",Proc.EBC-Congress Berlin 1979, S.341-354

zurückzuführen sein, die sich bei diesen Temperaturen bilden. Aber auch bei gewöhnlicher Alterung könnte, wenn auch in geringerem Umfang die Bildung von Melanoidinen stattfinden. Ein wichtiges Zwischenprodukt, das Furfural, erhöht sich auch bei der Bieralterung¹. Insgesamt nehmen bei der Bieralterung Ketone und Aldehyde zu. Diese entstehen einerseits durch die Oxidation von höheren Alkoholen und andererseits durch Mechanismen wie die Oxidation und Spaltung von Fettsäuren. Diesen Substanzen wird auch ein großer Anteil am Alterungsgeschmack zugeschrieben. Über Aldolkondensationen oder Maillard-Reaktionen können hier zusätzliche Verbindungen mit reduzierenden Hydroxylgruppen gebildet werden.

6.1.3 Schwefeldioxid

Gerade bei den Propagations- und Gärversuchen waren die Unterschiede bei den elektrochemischen Messergebnissen durch erhöhte Schwefeldioxidgehalte bedingt. Bei niedrigeren Gärtemperaturen beispielsweise scheidet die Hefe durch langsamere Vermehrung mehr Schwefeldioxid aus. Ebenso gab die propagierte Hefe, vermutlich aufgrund ihres besseren physiologischen Zustands deutlich weniger Schwefeldioxid ab als eine Erntehefe. In neueren Forschungen wird wieder sehr stark der Schwefeldioxidgehalt als wichtiger Radikalfänger betont, der möglicherweise für die Geschmackstabilität eine größere Rolle spielt als die phenolischen Substanzen².

In Deutschland versuchen die Brauer deshalb oft einen möglichst hohen Schwefeldioxidgehalt zu erreichen, der knapp unter der gesetzlichen Grenze von 10 mg/l liegt. Bei Bockbieren liegt dieser Wert meist knapp unter der Grenze und wird bisweilen überschritten.

Durch Auswahl eines geeigneten Hefestammes und auch durch Veränderung der Gärungsparameter kann der Schwefeldioxidgehalt gesteigert werden. Bei der Veränderung der Gärparameter darf aber keinesfalls eine, die Schwefeldioxidbildung begünstigende schlechte Angärung mit all ihren Nachteilen in Kauf genommen werden, nur um den Sulfitgehalt zu steigern. Äußerst vorteilhaft hingegen ist eine Hefe, die unter Umständen durch eine geeignete Vorbehandlung gleichzeitig eine gute Gärleistung besitzt und dabei auch noch verstärkt Schwefeldioxid bildet.

Im Ausland wird Schwefeldioxid in Form von Kaliummetabisulfit als Antioxidans zugesetzt.

¹ Ames, J.M., "Melanoidins as Pro- or Antioxidants", *Cerevisia* 26 (4), 2001, S.210-216

² Back, W.Franz, O., "Das antioxidative Potential von Bier", *Brauwelt* 141, 2001, S.209-219

Das Schwefeldioxid gehört im ITT zu den schnellreduzierenden Substanzen und beeinflusst auch stark das Potential. Auch die reduzierende Wirkung gegenüber DPPH ist sehr groß. Kaneda und seine Mitarbeiter stellten eine hohe Korrelation zwischen Radikalfängereigenschaften und Schwefeldioxidgehalt verschiedener Biere fest¹. Der häufig beobachtete Anstieg der DPPH-reduzierenden Aktivität während der Hauptgärung ist auch sehr stark durch die Bildung des Schwefeldioxids bedingt.

6.1.4 Andere Reduktone

Zu den übrigen Reduktonen gehören Substanzen, die weder über den Streckerabbau (Melanoidine) gebildet wurden, noch phenolischer Struktur sind. Ein Beispiel ist die Ascorbinsäure, die im Bier in Spuren vorkommt. Mögliche Bildungsmechanismen sind reduzierende Vorgänge bei der Hauptgärung. Diese Substanzen sind schnellreduzierende Substanzen. Stempfll spricht in diesem Zusammenhang von bestimmten schnellreduzierenden Substanzen, „mit aktiven Wasserstoffatomen, die in der Lage sind, Hydroperoxide zu bilden“. Diese Substanzen sind maßgeblich am Abfangen des freien Sauerstoffes beteiligt².

¹ Kaneda,H., Kobayashi,N., Furusho,S., Sahara,H., Koshino,S.,"Chemical Evaluation of Flavour Stability", MBAA Technical Quarterly, 32 (2), 1995, S.76-80

² Stempfll,W., „Bierflavour und Geschmacksstabilität, Sensorische und Analytische Überprüfung“ Folge 2, Brauindustrie, 1995, S.120-125

6.2 Der Begriff der Reduktone

In der Brauereitechnologie wurde der Begriff Beschwerungs-substanzen im allgemeinen als Synonym für Reduktone verwendet, die eine hohe Reaktivität mit Sauerstoff besitzen und diesen somit abfangen können. Ziel der entwickelten Tests war es, mit Modellreaktionen (DCI oder Eisenionen) die Größenordnung dieser sauerstoffempfindlichen Substanzen abzuschätzen. Diese Gesamtparameter von Reduktonkraft (Reduzierende Substanzen nach Chapon; nicht zu verwechseln mit der „Reduktionskraft“ gegenüber DCI) oder photometrischem Indikator-Time-Test sind anerkannte Werte zur Beurteilung von Rohstoffen (Gerste, Malz), aber auch von technologischen Maßnahmen.

So ermittelt Kretschmer Werte für die Reduktonkraft verschiedener handelsüblicher Biere und veröffentlicht diese regelmäßig. Dabei gelten diese Reduktonkraftwerte als objektiver Maßstab für die Qualität der Biere. Biere mit durch bestimmte technologische Maßnahmen verringerter Reduktonkraft werden als eher „fahl und charakterlos“ beschrieben¹.

Kretschmer und Chapon betonen hier die Vielfältigkeit der Einflüsse auf die Reduktonkraft, wie die „Tannoide“ (vgl. Kap. 5.1) aber auch die Bildung von Melanoidinen beim Mälzen, wobei sie die Abnahme letzterer durch Energieeinsparungsmaßnahmen beklagen.

Mittels des elektrochemischen Indikator-Time-Tests konnte man hier ebenfalls zwischen verschiedenen Reduktonklassen, nämlich schnell-, mittelschnell- und langsamreduzierenden Substanzen unterscheiden.

Wie man vor allem bei der definierten Sauerstoffbelastung im Drucktank zeigen konnte, sind gerade die schnellreduzierenden Substanzen die besonders sauerstoffsensitiven Reduktone, die bei starken Belastungen sowohl absolut als auch relativ am deutlichsten abnehmen. Somit gibt der elektrochemische Indikator-Time-Test durch die zusätzliche Bestimmung des Anteils der innerhalb von 4 Minuten mit dem DCI reagierenden Substanzen dem Brauer einen sehr guten Überblick über die sauerstoffsensitiven schnellreduzierenden Reduktone. Demnach ist diese Bestimmung zum Aufspüren betrieblicher Gefahrenstellen, an denen unkontrolliert Sauerstoff ins Bier gerät, bestens geeignet.

Wie die Versuche mit Zweitbelüftung und Flotation gezeigt haben, besteht auch hier ein deutlicher Zusammenhang zwischen Sauerstoffbelastung und der Reduktionskraft gegenüber DCI nach 4 Minuten Reaktionszeit. Die schnellreduzierenden Substanzen sind auch hier ein deutlicher Indikator für oxidative Schädigung des Substrates.

¹ Chapon, L., Kretschmer, K.F., „Über die Bedeutung der reduzierenden Kraft bei hellen Bieren“, Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, 2001, S.185-195

Wichtig für die Bierqualität ist auch ein schnellreduzierendes Reduktionsmittel, das nahezu vollständig während der Gärung gebildet wird, das Schwefeldioxid. Gerade bei den Fermentationsversuchen zeigte sich, daß die Messung des elektrochemischen Indikator-Time-Tests stark auf erhöhte Anteile dieser Substanz anspricht. Schon Chapon betont diese Substanz als eines der wichtigsten schnellreduzierenden Reduktionsmittel. So besteht für die praktische Brauereitechnologie die Möglichkeit, die Gärungsparameter zu verändern, um Schwefeldioxid und andere schnellreduzierende Reduktionsmittel zu steigern. Dabei muss aber beachtet werden, dass keine Nachteile, wie eine schlechte Gärleistung in Kauf genommen werden müssen.

Wie aus den Versuchsreihen mit Sauerstoffbelastung hervorgeht, war diese beschriebene Abnahme der schnellreduzierenden Substanzen von einer Erhöhung des Potentials begleitet. Alle schnellreduzierenden Reduktionsmittel müssen demnach auch an der Arbeitselektrode elektrochemisch oxidierbar sein und damit mitbestimmend für das Elektrochemische Potential. Eine Abnahme oder Zunahme der schnellreduzierenden und sauerstoffempfindlichen Reduktionsmittel ist also auch durch die chemikalienfreie Potentialmessung möglich.

Die phenolischen Substanzen gehören eindeutig nicht zu den schnellreduzierenden Reduktionsmitteln. Durch Zugabe oder Entfernung durch Stabilisierungsmaßnahmen konnten wir nachweisen, dass diese Substanzen auf keinen Fall zu den schnellreduzierenden Substanzen gehören und auch nur in kleinem Ausmaß DCI innerhalb von 15 Minuten reduzieren können. Auch in der Literatur wird den phenolischen Substanzen eine langsame Reaktionsgeschwindigkeit zugeschrieben, und sie spielen deshalb als Beschwerungs-substanzen, also als klassische Reduktionsmittel eine untergeordnete Rolle. Auch bei hoher Sauerstoffbelastung nahmen Polyphenole und Anthocyanogene in unseren Versuchsreihen nicht ab.

Obwohl also diese phenolischen Substanzen gegenüber DCI und auch molekularem Sauerstoff eine äußerst geringe Reaktivität besitzen, werden, wie die deutliche Beeinflussung des Potentials durch Maßnahmen, die den Gehalt an phenolischen Substanzen verändern, diese phenolischen Substanzen ebenfalls elektrochemisch detektiert. Diese phenolischen langsamreduzierenden Substanzen besitzen also keine hohe Reaktivität gegenüber molekularem Sauerstoff oder DCI, sind aber doch als potentialbestimmende Reduktionsmittel anzusehen.

Im Gegensatz zu den meisten brautechnischen Veröffentlichungen, die den Begriff der Reduktionsmittel meist als Synonym für sämtliche Beschwerungs-substanzen verwenden, die im

Biermedium in definierten Zeitabschnitten mit Sauerstoff bzw. Testoxidationsmitteln reagieren, verwenden viele Autoren aus dem chemischen und medizinischen Bereich einen engeren Reduktionbegriff¹. Hier spielt die chemische Struktur eine große Rolle. Als Reduktone werden hier nur Substanzen mit Endiol-Bindung und benachbarter Carbonylgruppe bezeichnet. Das bekannteste Beispiel für ein derartiges Redukton ist Ascorbinsäure. Durch diese Struktur kann die Endiol-Gruppe leicht zu einer Diketogruppe oxidiert werden.

Grosse Bedeutung bei den Reduktionen nach der engeren Definition haben Produkte aus der Maillard-Reaktion, die Melanoidine, auf die im vorherigen Kapitel schon ausführlich eingegangen wurde.

Aufgrund dieser Auffassungen zu den Reduktionen und unseren Ergebnissen kann man sagen, dass der elektrochemische Indikator-Time-Test gerade mittels der schnellreduzierenden Substanzen einen guten Überblick über die Beschwerung gibt und damit auch ein äußerst geeigneter Summenparameter zur Kontrolle von Sauerstoffeintrag, aber auch der Gärung (z.B. Schwefeldioxidbildung) ist. Die Cyclovoltametrie ergänzt diese Messungen hervorragend, da hier auch Schwankungen bei Antioxidantien erfasst werden können, die aufgrund ihrer langsamen Reaktion mit DCI und Sauerstoff eher zu den langsamreduzierenden Reduktionen gehören. Hier sind auch die phenolischen Substanzen zuzuordnen. Aufgrund ihrer im vorherigen Kapitel beschriebenen antiradikalischen Mechanismen würde sich der Begriff "Radikalfängerreduktone" für die langsamreduzierenden Reduktone, im Gegensatz zu "Beschwerungsreduktone" (im Sinne einer Abpufferung größerer Sauerstoffmengen) für die schnellreduzierenden Reduktone sehr gut eignen.

Mit der Cyclovoltametrischen Messung kann man zum ersten Mal global alle im Bier enthaltenen Reduktone als Summenparameter Potential erfassen. Dabei ist unerheblich, ob eine Wirkungsweise als „Beschwerungsreduktone“ oder „Radikalfängerreduktone“ vorliegt. Wie zu sehen war, bestimmen diese Reduktone gemeinsam die antioxidative Aktivität im Bier. Bei Modellreaktionen mit einem Oxidationsmittel hängt das Ergebnis stark von der Reaktivität jeder einzelnen Substanz mit dem gewählten Oxidationsmittel ab. Es wurde ganz deutlich, dass trotz vieler Überschneidungen bei dem ITT, den reduzierenden Substanzen nach Chapon oder auch bei der DPPH-Methode nach Kaneda unterschiedliche Reduktone erfasst wurden. Gerade die Reaktionszeit war entscheidend, da für den Verlauf der Modellreaktionen die unterschiedliche Kinetik für die einzelnen Reduktone maßgeblich ist. Die cyclovoltametrische Messung hingegen detektiert an der Arbeitselektrode alle Arten von Reduktionen, unabhängig davon, welche Wirkungsweise sie besitzen und welcher

¹ von Euler, H., Eisert, B., "Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate", Ferdinand Enke, Stuttgart, 1957

Stoffklasse sie angehören. Wir können also den Wert des Potentials als einen objektiven Maßstab für den Gehalt an allen relevanten Reduktoren ansehen. Wichtig hierbei ist, dass die cyclovoltametrische Messung chemikalienfrei arbeitet. Die Matrix (Bier, Würze oder andere Zwischenprodukte) wird also nicht durch Zugabe von Reagenzien verändert. Es werden an der Arbeitselektrode die tatsächlich unter den Substratbedingungen wirksamen reduzierenden Substanzen erfasst.

Hier setzt die neue Definition des Begriffes der Reduktore an:

Reduktore sind Substanzen, die unter den Bedingungen in der Matrix (Bier, Würze oder andere Zwischenprodukte) eine tatsächliche reduzierende Wirkung besitzen, wobei die genauen Wirkungsmechanismen oder die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Stoffklasse unerheblich sind.

Da also nur die tatsächliche reduzierende Wirkung interessiert, liefert die cyclovoltametrische Messung eine einfache Aussage über die summarische reduzierende Wirkung der Gesamtheit aller in der Probe enthaltenen Reduktore.

6.3 Verhalten der Reduktore während des Brauprozesses

In den meisten Versuchsreihen nahm die Reduktionskraft während der Hauptgärung ab. Parallel dazu nahm das Potential zu. Das ist ein erstaunliches Ergebnis, da bisher oft angenommen wurde, dass während der Gärung im reduzierenden Milieu verstärkt reduzierende Substanzen gebildet werden. Mögliche Erklärungen für diese Abnahme der reduzierenden Substanzen sind einerseits die Aufnahme reduzierender Substanzen durch die Hefe und andererseits die Ausfällung reduzierender Substanzen. Diese Ausscheidung kann durch den pH-Sturz bedingt sein. In der Versuchsreihe mit 8°C Hauptgärtemperatur war am ersten Gärtag eine Zunahme der schnellreduzierenden Substanzen zu verzeichnen. Wichtig für den Verlauf der Reduktionskraft sind demnach ganz klar die Bedingungen der Hauptgärung. Ein Anstieg schnellreduzierender Substanzen könnte hier auf verstärkte Schwefeldioxidbildung bei niedrigeren Gärtemperaturen zurückzuführen sein, da dieser Anstieg bei höheren Gärtemperaturen nicht zu beobachten war (vgl. Abb.143).

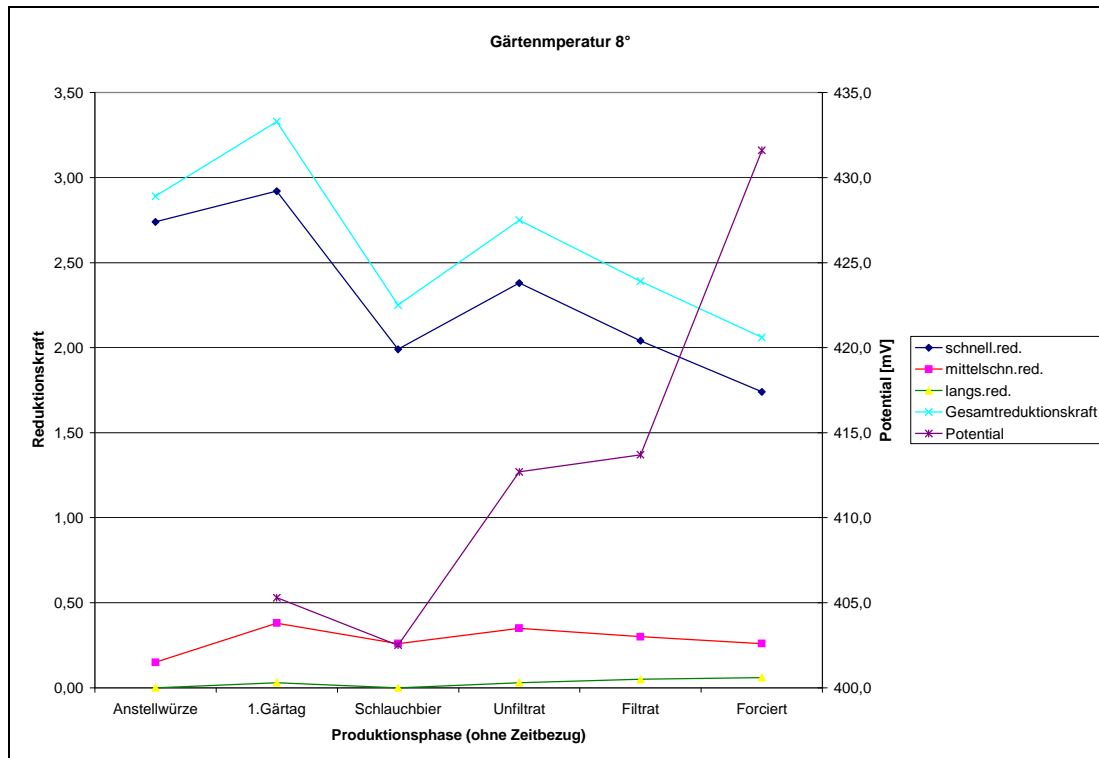


Abb.143: Entwicklung der verschiedenen Reduktonklassen und des Potentials bei 8°C Hauptgärtenperatur

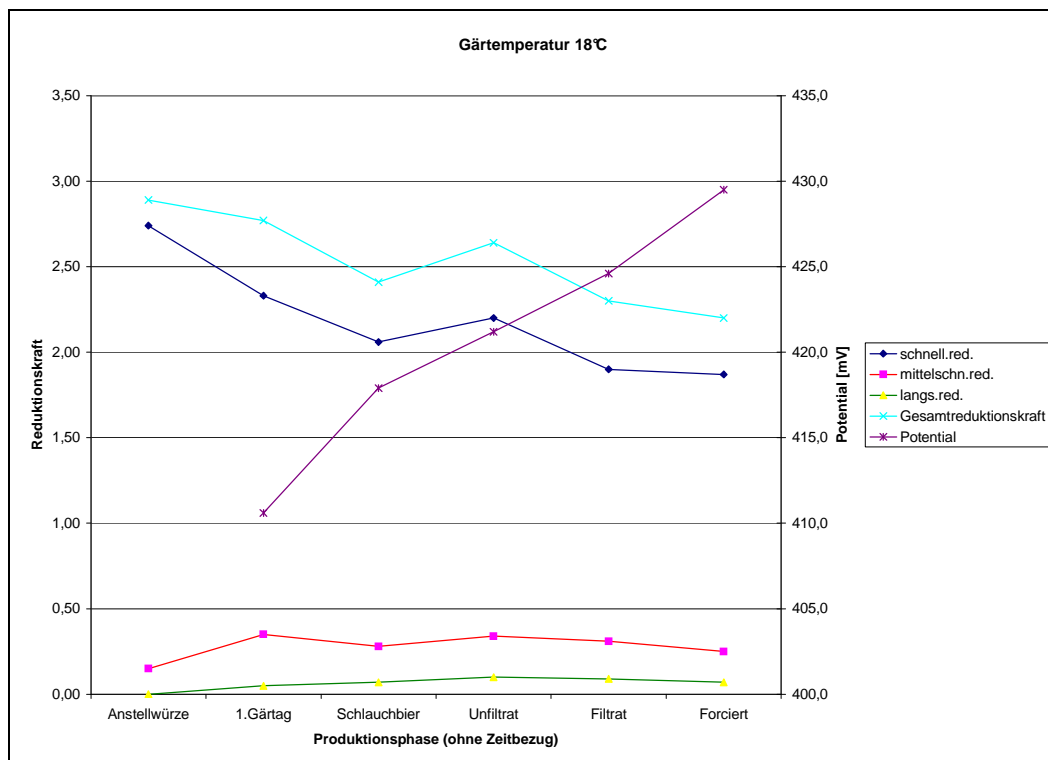


Abb.144: Entwicklung der verschiedenen Reduktonklassen und des Potentials bei einer Hauptgärtenperatur von 18°C

Phenolische Substanzen, bestimmt als Anthocyanogene und Gesamtpolyphenole, nehmen während der Hauptgärung deutlich ab. Begleitet ist diese Abnahme von einer Steigerung des Potentials. Der gleichzeitige Rückgang von Gesamtpolyphenolen und Anthocyanogenen belegt die These, dass die Redoxverhältnisse stark von diesen Substanzen beeinflusst werden.

Meist ist auch während der Lagerung eine leichte Abnahme der Reduktionskraft zu beobachten. Hier können ähnliche Mechanismen wie während der Hauptgärung eine Rolle spielen. Doch auch eine leichte Zunahme der schnellreduzierenden Substanzen war bei einigen Versuchsreihen zu beobachten.

Mittelschnell- und langsamreduzierende Reduktone spielen in der Würze praktisch keine Rolle. Erst bei der Hauptgärung können diese Substanzen bestimmt werden. Sowohl der relative Anteil als auch die absolute Menge der langsamreduzierenden Substanzen ist sehr gering und übersteigt selten 5%. Nach dem deutlichen Anstieg bei der Hauptgärung sind keine relevanten Änderungen bei den langsamreduzierenden Substanzen festzustellen. Obwohl der prozentuale Anteil und auch der absolute Gehalt an mittelschnellreduzierenden Substanzen deutlich höher ist, sind diese Substanzen im Vergleich zu den schnellreduzierenden mengenmäßig wenig relevant. Während des Brauprozesses verändern sich die mittelschnellreduzierenden Substanzen ähnlich wie die langsamreduzierenden. In der Würze nicht vorhanden, steigt der Gehalt an diesen mittelschnellreduzierenden Reduktonen auf etwas über 10% und bleibt dann relativ konstant. Eine deutliche Abnahme der schnell- und mittelschnellreduzierenden Substanzen während der Filtration ist eher auf den Sauerstoffeintrag bei der kleintechnischen Filtration zurückzuführen. Es fällt hier auf, dass bei den langsamreduzierenden Reduktonen keine Abnahme stattfindet, da diese auch weniger schnell mit Sauerstoff reagieren. Bei einigen Filtrationen war gar keine oder nur eine geringfügige Abnahme der schnellreduzierenden Substanzen zu beobachten, was auf sauerstoffarmes Arbeiten hinweist.

Anders bei der PVPP-Stabilisierung: Hier nahm die Reduktionskraft kaum ab, das Potential hingegen stieg stark an, selbst bei geringer Sauerstoffbelastung. Diese Abnahme ist durch die Herausnahme phenolischer Antioxidantien bedingt.

Bei der Alterung war bei geringer Sauerstoffbelastung meist eine Zunahme der Reduktionskraft und eine Abnahme des Potentials zu beobachten. Bei hoher Sauerstoffbelastung hingegen war insbesondere bei starker PVPP-Stabilisierung der umgekehrte Effekt aufgetreten: Ein Anstieg des Potentials und eine Absenkung der Reduktionskraft. Im Falle unserer Versuche mit unterschiedlichen Gärtemperaturen zeigte sich bei der Alterung tendenziell ebenfalls eine Abnahme der Reduktionskraft und Steigerung des Potentials, was auf eine erhöhte Sauerstoffbelastung bei der Abfüllung hinweist (vg. Abb. 143 und 144).

6.4 Technologische Bedeutung der elektrochemischen Messergebnisse und praktische Einsatzmöglichkeiten

Wie bei allen anderen Verfahren zur Bestimmung von Reduktionskraft und Redoxpotential sind die Ergebnisse der elektrochemischen Messungen Summenparameter. Potential und Reduktionskraft können einen Überblick über den Oxidationszustand der Rohstoffe, von Zwischenprodukten und des fertigen Bieres geben.

Der photometrische ITT ist sehr stark abhängig von der tatsächlichen Konzentration des schwerlöslichen DCI. Eine weitere Fehlerquelle kann der unterschiedliche Wassergehalt des hygroskopischen DCI sein. Diese Faktoren bedingen unterschiedliche Ausgangs- und Endextinktionen, die laborspezifisch zu deutlich unterschiedlichen Extinktionsdifferenzen (beim photometrischen ITT) oder ITT-Zeiten (beim optischen ITT) führen können. Beim elektrochemischen Indikator-Time-Test hingegen wird bei jeder Messung eine Kalibrierung mit Ascorbinsäure durchgeführt, so dass das Stromverhältnis (Reduktionskraft) objektiv die tatsächliche reduzierende Kraft einer Probe im Vergleich zu einer definierten Menge Ascorbinsäure ausdrückt. Zusätzlich ist die Ascorbinsäure mittels Oxalsäure gegen die Oxidation vor gelöstem Sauerstoff geschützt, so dass die Kalibrierlösung auch bei hohen Sauerstoffgehalten des Lösungswassers über einen langen Zeitraum eine konstante Reduktionskraft hat. Das Stromverhältnis ist demnach ein allgemeingültiger, gut reproduzierbarer objektiver Wert für die Reduktionskraft. Mittels einer einfachen Formel kann man einen Wert für die Reduktionskraft -angegeben in Vitamin-C-Äquivalenten- errechnen. Beim Indikator-Time-Test ist es zudem dringend erforderlich, dass die Reaktionszeiten genau eingehalten werden und die Durchmischung von Probe und Substrat optimal ist. Diese Anforderungen können beim Elektrochemischen Analysenautomaten durch die Automatisierung der Messvorrichtung bestens erfüllt werden. Die elektrochemische Detektion ermöglicht eine sekundengenaue Bestimmung des reduzierten DCI. Im Gegensatz zur photometrischen Detektion können auch dunkle und trübe Proben bestimmt werden. Eine Probenvorbereitung, wie Filtration oder Zentrifugation, bei der undefiniert Sauerstoff eingetragen wird, der die Ergebnisse verfälscht, ist beim Elektrochemischen Analysenautomaten nicht notwendig. Die Proben werden unter Schutzgasatmosphäre dosiert und analysiert. Das Dosieren unter Schutzgasatmosphäre hat den weiteren Vorteil, dass auch der Rest der Probe vor Sauerstoffzutritt geschützt wird und gegebenenfalls auch für andere Analytik verwendet werden kann. Durch alle diese Vorzüge des Messsystems sind Ergebnisse verschiedener Labors gut vergleichbar.

Auch bei der cyclovoltametrischen Messung, die chemikalienfrei arbeitet, kann mit dem Parameter „Potential“ ein objektiver Wert für den Redoxzustand ermittelt werden. Bisherige „klassische“ stromlose Potentialmessungen benötigten Stunden zur –schlecht reproduzierbaren- Einstellung eines Gleichgewichts mit konstantem Potential. Automatisiert und unter Schutzgasatmosphäre kann hier dagegen zum ersten Mal sekundenschnell und reproduzierbar ein Potentialwert für ein komplexes Medium wie Bier ermittelt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass hier keine Modellreaktion abläuft, für die beispielsweise ein Oxidationsmittel wie DCI oder DPPH zugegeben werden muss, sondern die Bierreduktone im unveränderten Biermilieu direkt an der Arbeitselektrode reagieren. So gewinnt man einen unverfälschten Summenparameter für die tatsächliche Wirkung der Reduktone in der Matrix Bier. Dieses chemikalienfreie und schnelle Verfahren hat den zusätzlichen Vorteil, dass auch an eine Variante gedacht werden kann, bei der das Potential online an verschiedenen besonders relevanten Punkten im Brauprozess gemessen werden kann.

Der entscheidende Vorteil dieser elektrochemischen Messmethoden besteht also darin, dass sie eine objektive Aussage über den Oxidationszustand einer Probe treffen können. So werden Werte für den Redoxzustand erstmals universell vergleichbar.

Deutlich wird der hohe Aussagewert der Messungen, wenn technologische Verfahren, die den Oxidationszustand beeinflussen, verändert wurden oder beispielsweise übermäßige Sauerstoffaufnahme vorlag. Interessant ist für die Praxis im Brauereilabor, ob sich im laufenden Betrieb Veränderungen ergeben und wie die Messergebnisse bei Veränderungen der Technologie oder der Rohstoffe beeinflusst werden. Mit Hilfe der elektrochemischen Messungen in Kombination mit weiterer Analytik kann im Betrieb dann Ursachenforschung betrieben werden. Bisher häufig angewandte Globalbestimmungen wie die der Gesamtpolyphenole oder der Anthocyanogene, die bisher als Indikatoren für den Oxidationszustand angesehen wurden, besitzen, wie nachgewiesen werden konnte, hingegen für den Oxidationszustand nicht annähernd die Aussagekraft der elektrochemischen Messungen. Einzelne niedermolekulare phenolische Verbindungen könnten dagegen eher ein Anhaltspunkt für den Oxidationszustand sein. Es ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht, wie der Gehalt an jeder dieser Substanzen zu gewichten ist. Vorallem ist die Durchführung einer aufwendigen HPLC-Analytik für die allgemeine Brauerei-Betriebskontrolle nicht lohnend, wenn über einfache elektrochemische Messungen mit den Summenparametern wertvollere Ergebnisse über den Oxidationszustand gewonnen werden können. Auch bei Bieren, die mit unterschiedlichsten Technologien und Rohstoffen hergestellt wurden, können objektiv Reduktionskraft und Potential als Maß für den Oxidationszustand angegeben werden. Selbstverständlich gestaltet sich hier die Ursachenforschung für die Unterschiede schwieriger, da verschiedene Reduktone mit

unterschiedlichen Wirkungsmechanismen unterschiedlichster Herkunft in sehr verschiedenen Konzentrationen vorliegen. Hier müssen alle Parameter wie v.a. Rohstoffe, Sudhaustechnologie, Gärungstechnologie und auch betrieblich bedingte unterschiedliche Sauerstoffbelastungen in anderen Bereichen berücksichtigt werden. Auch wenn so die genauen Ursachen für den Unterschied von Reduktionskraft und Redoxpotential zwischen den einzelnen Brauereien schwer zu ermitteln sind, ist es für den Brauer äußerst sinnvoll, Werte seiner Biere mit denen von Konkurrenzprodukten zu vergleichen. Mittels dieser objektiven Summenparameter kann er nämlich sehen, wo seine Produkte hinsichtlich des Oxidationszustand stehen. Bei vergleichsweise ungünstigen eigenen Werten, muss sich der Brauer überlegen, wie er Potentiale zur Verbesserung des Redoxzustandes ausschöpft. Einen großen praktischen Nutzen für den einzelnen Betrieb besitzen hier die elektrochemischen Messungen, wenn dann nur wenige überschaubare Parameter verändert werden. In unseren Versuchsreihen konnten technologische Veränderungen wie Gärtemperatur, Belüftungstechnologie oder unterschiedliche Stabilisierungsmethoden elektrochemisch interpretiert werden.

Es können bei Änderungen der Technologie die Einflüsse der veränderten Parameter auf den Redoxzustand nachvollzogen werden. Im Kap.4.3.2 konnte man sehen, dass eine Zweitbelüftung kritisch zu betrachten ist hinsichtlich des Oxidationszustandes des Substrates. Auch die Versuchsreihen mit PVPP-Stabilisierung zeigten, wie sich diese Maßnahme auf den Oxidationszustand auswirkt.

Die elektrochemischen Messungen können also eine Entscheidungshilfe dafür sein, ob diese Maßnahmen ergriffen werden oder nicht.

Wie oben angedeutet, kann der Einsatz der elektrochemischen Messungen in der Routineanalytik viele Vorteile bringen. Grundlegend ist hier, dass jeder Betrieb mit der Messung des Potentials und der Reduktionskraft einen Rahmen festlegen kann, welche Spezifikationen er hinsichtlich der Reduktione unter seinen spezifischen betrieblichen Bedingungen erreichen kann. So können diese Messungen auch dazu beitragen, dass durch die ständige Kontrolle des Oxidationszustandes die Beschäftigten für die Problematik von Antioxidantien und Sauerstoffbelastung sensibilisiert werden. Die Messungen stellen hier ein einfaches Frühwarnsystem bei den einzelnen Produktionsschritten dar. Werden die Vorgaben bei bestimmten Zwischenprodukten oder dem Endprodukt nicht erreicht, also ein zu hohes Potential oder eine zu niedrige Reduktionskraft gemessen, muss Ursachenforschung bei den vorangegangenen Produktionsschritten in den verantwortlichen Abteilungen gemacht werden. So kann eine Art „Stufenkontrolle“ bezüglich der Redoxeigenschaften eingerichtet werden. Gerade zur Kontrolle des Gärverlaufs sind Potential und Reduktionskraft wichtige Parameter, da wir nachweisen konnten, dass

veränderte Gärbedingungen und damit der physiologische Zustand der Hefe einen großen Einfluss auf den Gehalt an Reduktionen haben.

Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes ist auch die Kontrolle der Rohstoffe. So wurde das Verfahren in einer Großbrauerei unter anderem zur Kontrolle des Malzes verwendet¹. Es können Veränderungen aufgezeigt werden und dann eventuell mit dem Lieferanten über Ursachen in seiner Technologie gesprochen werden. Diese Messung ist also ein Beitrag zur Sicherung gleichbleibender Qualität.

¹ Gromus, J., Lustig, S., "Einfluss von Polyphenolen und reduzierenden Verbindungen auf die Bierqualität und ihr Verhalten im Brauprozess", Brauwelt 139, 1999, S.2028-2034

6.5 Verbesserungen am Elektrochemischen Analysenautomaten

Die Messungen mit dem Elektrochemischen Analysenautomaten funktionieren bei richtiger Handhabung nahezu störungsfrei.

Problematisch ist, dass bei Fehlern das gesamte Programm gestoppt und der Messrechner neu gestartet werden muss.

Auch eventuelle Probleme mit der Bezugselektrode können einen Neustart des Rechners notwendig machen. Erkennen kann man beispielsweise ein verstopftes Diaphragma an einem verrauschten Cyclovoltogramm. Das Programm zeigt zwar während der Elektrodenreinigung durch Cyclisierung des Acetatpuffers das Cyclovoltogramm dieses Vorganges kurz an, jedoch muß der Bediener in dieser Zeit den Ablauf beobachten, um eventuell die Messung abbrechen zu können. Auch soll das Standard-Cyclovoltogramm des Acetatpuffers gespeichert werden und mit jedem Cyclus vor der eigentlichen Messung verglichen werden, um den Anwender so bei Abweichungen, die beispielsweise durch ein falsch eingegebenes Potential der Bezugselektrode bedingt sind, sofort zu informieren, damit dieser die Messung abbrechen und den Fehler korrigieren kann. Die Software wird dahingehend geändert, dass solche und andere Störungen sofort dauerhaft angezeigt werden und die Messung gegebenenfalls gestoppt wird. Besonders wichtig ist dieser Punkt vor allem, wenn mittels Probenwechsler bis zu 7 Proben hintereinander gemessen werden.

Auch sollte es möglich sein, während einer Messreihe die bereits ermittelten Ergebnisse abrufen zu können. Treten bei der Messung Stromverhältnisse größer als 2,5 auf, bedeutet das, dass praktisch alles DCI von den Bierreduktionen reduziert wurde und für die Reaktion mit der definierten Menge Ascorbinsäure nicht mehr zur Verfügung steht. Dadurch sind keine reproduzierbaren Ergebnisse mehr möglich. Sollte dieser Fall eintreten, ist es von Vorteil, wenn ein Warnhinweis an den Anwender gerichtet wird. So kann dieser die Messung rechtzeitig abbrechen und eine neue Messreihe mit dem geeigneten Verdünnungsverhältnis starten.

Insgesamt wird das Programm für den praktischen Einsatz in Brauereilabors eine benutzerfreundlichere Oberfläche erhalten, sodass für die Messroutinen keine aufwendigen DOS-Befehle mehr nötig sind.

Gleichzeitig würden ein Kopieren und Bearbeiten und die Integration der Messdaten in die Labor-EDV dadurch deutlich vereinfacht werden.

7 Ausblick

In dieser Arbeit konnten konkrete Aussagen über die Bedeutung und Interpretation der elektrochemischen Messergebnisse für den Brauprozess und das fertige Bier gemacht werden. Auch die Beurteilung technologischer Maßnahmen hinsichtlich des Oxidationszustandes ist mittels der Cyclovoltametrie und elektrochemischen ITT bei vielen Fragestellungen gut möglich.

Vielversprechend ist vor allem die Begleitung neuer Fermentations- und Anstelltechnologien mittels der elektrochemischen Messungen, da hier, wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, Oxidationsprozesse eine große Rolle spielen. Verbesserte Methoden zur „Gesunderhaltung“ und Vitalisierung der Hefe müssen auch hinsichtlich ihres Einflusses auf den Oxidationszustand betrachtet werden. Dabei können die elektrochemischen Messungen bezüglich der Optimierungsarbeit einer möglichst geringen oxidativen Schädigung des Substrats bei gleichzeitig optimaler Hefevitalität einen großen Beitrag leisten.

Im Ausland wäre es möglich, den Effekt des Zusatzes einzelner Antioxidantien mittels der elektrochemischen Messungen besser einzuschätzen und so eine sinnvolle Dosierung dieser Substanzen durchzuführen. Gerade bei Rohfruchtbiere, die oft sehr arm an natürlichen Antioxidantien sind, könnte mittels der elektrochemischen Messungen eine Kombination aus verschiedenen Antioxidantien gefunden werden, die in ihrer summarischen Wirkung (ausgedrückt durch Potential und Reduktionskraft) einem Reinheitsgebot-Bier mit hohem Gehalt an natürlichen Antioxidantien entsprechen.

Ein anderes weites Gebiet, auf dem Untersuchungen mittels elektrochemischer Messungen angestellt werden sollten, ist der Einfluss der Brauereirohstoffstoffe.

Die aktuelle Forschung zu den Antioxidantien im Hopfen könnte durch die elektrochemischen Verfahren unterstützt werden.

Aber auch im Brauereilabor kann der Einfluss verschiedener Chargen auf das fertige Bier abgeschätzt werden.

Auch die Mälzung und der Rohstoff Malz könnte nach den elektrochemischen Ergebnissen beurteilt werden.

Gleichzeitig muss auch noch dem Einfluss der Sudhausarbeit mehr Beachtung geschenkt werden. Das ist aber erst ausführlich mittels cyclovoltametrischer Messungen möglich, wenn das Problem undefinierter Sauerstoffaufnahme gelöst wird und andere Widrigkeiten bei der Probenahme, wie die nicht genau definierten Abkühlzeiten beseitigt werden.

Auch bei der Probenahme in Gär-, Lager- und Filterkeller stellt sich das Problem der sauerstofffreien Arbeitsweise. Hier könnte Abhilfe geschaffen werden, wenn das Gerät für Online-Messungen umgebaut werden würde. Dieser Umbau bietet sich gerade für die cyclovoltmetrische Messung an, da hier –abgesehen von der Elektrodenreinigung- ein chemikalienfreies Verfahren vorliegt. So könnte im geschlossenen System einfacher und schneller sauerstofffrei gemessen werden.

Bei weiteren Arbeiten ist an die Anwendung der elektrochemischen Messungen auf andere Gebiete als ausschließlich die Brauwissenschaft zu denken. Insgesamt ist in der Lebensmittelindustrie das Interesse an Antioxidantien groß, denkt man nur an „Functional Food“ oder den Grünen Tee. Auch in der Beurteilung landwirtschaftlicher Produkte gewinnt der Gehalt an wirksamen Antioxidantien zunehmend an Bedeutung, wie schon im Kapitel „Apfelsaft“ angedeutet wurde.

Auch auf diesen Gebieten wären also Forschungen, aber auch Routineanalytik mittels elektrochemischer Messungen sinnvoll.

Darüberhinaus sind in der humanmedizinischen Forschung Anwendungsmöglichkeiten vorstellbar, da gerade in den aktuellen Diskussionen das Gleichgewicht von oxidierenden und reduzierenden Stoffen eine wichtige Rolle spielt. In Vorversuchen wurde bereits Urin von Probanden mittels Cyclovoltmetrie und elektrochemischem ITT untersucht, wobei interessante und vielversprechende Ergebnisse ermittelt wurden. Es konnte tendenziell ein Zusammenhang zwischen Reduktionskraft und Gesundheitszustand der Patienten hergestellt werden. Interessant, vor allem in Hinblick auf die Diskussion um die physiologischen Eigenschaften des Bieres, war das Ergebnis, dass Bierkonsum die Reduktionskraft im Urin der Probanden deutlich steigerte.

Auch an einer Weiterentwicklung des Gerätes vor hinsichtlich der Software, wie im Kapitel „Verbesserungen am Analysenautomaten“ beschrieben, wird bereits gearbeitet, um ein noch benutzerfreundlicheres Gerät anzubieten.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Spannungsverlauf bei der Cyclovoltametrie	S. 13
Abb.2:	Ermittlung des Mittleren Nullstrompotentials	S. 14
Abb.3:	Darstellung der Flächen, die den geflossenen Ladungen entsprechen	S. 15
Abb.4:	Ermittlung des Stromverhältnisses	S. 18
Abb.5:	Bestimmung der Reduktonverteilung	S. 19
Abb.6:	Gradient der Polyphenolanalyse mit HPLC	S. 31
Abb.7:	Zweipunkt-Kalibrierung anhand des (+)- Catechins	S.32
Abb.8:	Cyclovoltogramme bei unterschiedlichen Catechin- und Ferulasäuregehalten	S. 39
Abb.9:	Mittleres Nullstrompotential bei Aufstocken mit Polyphenolen	S. 41
Abb.10:	Aufstockung von Bier mit verschiedenen Polyphenolen: Stromverhältnis, DPPH-reduzierende Aktivität und reduzierende Substanzen	S. 42
Abb.11:	Verlauf des mittleren Nullstrompotentials bei Zusatz von phenolischen Substanzen	S. 43
Abb.12:	Verlauf des Stromverhältnisses bei Zusatz von phenolischen Substanzen	S. 45
Abb.13:	Verlauf der schnellreduzierenden Substanzen bei Zusatz von phenolischen Substanzen	S. 46
Abb.14:	Anteil mittelschnellreduzierender Substanzen bei Zusatz von phenolischen Substanzen	S. 47
Abb.15:	Anteil langsamreduzierender Substanzen bei Zugabe von phenolischen Substanzen	S. 48
Abb.16:	Verhalten der DPPH-reduzierenden Aktivität beim Zusatz von phenolischen Substanzen	S. 49
Abb.17:	Verhalten der Gesamtpolyphenole bei Zusatz von phenolischen Substanzen	S. 51
Abb.18:	Mittleres Nullstrompotential in Abhängigkeit von der Sauerstoffbelastung vor und nach der Forcierung	S. 59
Abb.19:	Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis vor und nach forcierter Alterung	S. 60
Abb.20:	Sauerstoffbelastung und Anteil schnellreduzierender Substanzen vor und nach der Forcierung	S. 61
Abb.21:	Sauerstoffbelastung und DPPH-reduzierende Kraft	S. 62

Abb.22:	Sauerstoffbelastung und reduzierende Substanzen nach Chapon vor und nach der Forcierung	S. 63
Abb.23:	Einfluss intensiver Belüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Jungbier	S. 68
Abb.24:	Einfluss intensiver Belüftung auf das Stromverhältnis im Jungbier	S. 69
Abb.25:	Einfluss intensiver Belüftung auf den prozentualen Anteil schnellreduzierender Reduktone im Jungbier	S. 70
Abb.26:	Einfluss intensiver Belüftung auf den Polyphenolgehalt im Jungbier	S. 71
Abb.27:	Einfluss intensiver Belüftung auf den Anthocyanogengehalt im Jungbier	S. 71
Abb.28:	Einfluss intensiver Belüftung auf die DPPH reduzierende Aktivität im Jungbier	S. 72
Abb.29:	Einfluss intensiver Belüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Unfiltrat	S. 73
Abb.30:	Einfluss intensiver Belüftung auf das Stromverhältnis im Unfiltrat	S. 74
Abb.31 :	Einfluss intensiver Belüftung auf den prozentualen Anteil schnellreduzierender Substanzen im Unfiltrat	S. 75
Abb.32:	Einfluss intensiver Belüftung auf den Gehalt an Gesamtpolyphenolen im Unfiltrat	S. 76
Abb.33:	Einfluss intensiver Belüftung auf den Gehalt an Anthocyanogenen im Unfiltrat	S.76
Abb.34:	Einfluss intensiver Belüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im Unfiltrat	S. 77
Abb.35:	Einfluss intensiver Belüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im filtrierten Bier	S.78
Abb.36:	Einfluss intensiver Belüftung auf das Stromverhältnis im filtrierten Bier	S. 79
Abb.37:	Einfluss intensiver Belüftung auf den prozentualen Anteil schnellreduzierender Substanzen im filtrierten Bier	S. 80
Abb.38:	Einfluss intensiver Belüftung auf den Gehalt an Gesamtpolyphenolen im filtrierten Bier	S. 81
Abb.39:	Einfluss intensiver Belüftung auf den Gehalt an Anthocyanogenen im filtrierten Bier	S. 81
Abb.40:	Einfluss intensiver Belüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im filtrierten Bier	S. 82
Abb.41:	Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials bei intensiver	

	Belüftung, Versuchsreihe 1	S. 83
Abb.42:	Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2	S. 84
Abb.43:	Entwicklung des Stromverhältnisses bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1	S. 85
Abb.44:	Entwicklung des Stromverhältnisses bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2	S. 86
Abb.45:	Entwicklung des Anteils schnellreduzierender Substanzen bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1:	S. 87
Abb.46:	Entwicklung des Anteils schnellreduzierender Substanzen bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2	S. 87
Abb.47:	Entwicklung der Gesamtpolyphenole bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1	S. 88
Abb.48:	Entwicklung der Gesamtpolyphenole bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2	S. 89
Abb.49:	Entwicklung der Anthocyanogene bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1	S. 90
Abb.50:	Entwicklung der Anthocyanogene bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2	S. 90
Abb.51:	Entwicklung der DPPH-reduzierenden Aktivität bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 1	S. 91
Abb.52:	Entwicklung der DPPH reduzierenden Aktivität bei intensiver Belüftung, Versuchsreihe 2	S. 92
Abb.53:	Einfluß der Zweitbelüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Jungbier	S. 95
Abb.54:	Einfluß der Zweitbelüftung auf das Stromverhältnis im Jungbier	S. 96
Abb.55:	Einfluss der Zweitbelüftung auf den prozentualen Anteil schnell Reduzierender Substanzen im Jungbier	S. 97
Abb.56:	Einfluß der Zweitbelüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im Jungbier	S. 98
Abb.57:	Einfluss der Zweitbelüftung auf den Gesamtpolyphenolgehalt im Jungbier	S. 99
Abb.58:	Einfluss der Zweitbelüftung auf den Anthocyanogengehalt im Jungbier	S.100
Abb.59:	Einfluss der Zweitbelüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Unfiltrat	S.101
Abb.60:	Einfluss der Zweitbelüftung auf das Stromverhältnis im Unfiltrat	S.102

Abb.61:	Einfluss der Zweitbelüftung auf den Anteil schnellreduzierender Substanzen im Unfiltrat	S.103
Abb 62:	Einfluss der Zweitbelüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im Unfiltrat	S.104
Abb.63:	Einfluss der Zweitbelüftung auf den Gesamtpolyphenolgehalt im Unfiltrat	S.105
Abb.64	Einfluss der Zweitbelüftung auf den Anthocyanogengehalt im Unfiltrat	S.106
Abb.65:	Einfluss der Zweitbelüftung auf das Mittlere Nullstrompotential im Filtrat	S.107
Abb.66:	Einfluss der Zweitbelüftung auf das Stromverhältnis im Filtrat	S.108
Abb.67:	Einfluss der Zweitbelüftung auf den prozentualen Anteil Schnellreduzierender Substanzen im Filtrat	S.109
Abb.68:	Einfluss der Zweitbelüftung auf die DPPH-reduzierende Aktivität im Filtrat	S.110
Abb.69:	Einfluss der Zweitbelüftung auf den Gesamtpolyphenolgehalt im Filtrat	S.111
Abb.70:	Einfluss der Zweitbelüftung auf den Anthocyanogengehalt im Filtrat	S.112
Abb.71:	Versuchsreihe 1: Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials bei Zweitbelüftung	S.113
Abb.72:	Versuchsreihe 2: Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials bei Zweitbelüftung	S.114
Abb.73:	Versuchsreihe 1: Entwicklung des Stromverhältnisses bei Zweitbelüftung	S.115
Abb.74:	Versuchsreihe 2: Entwicklung des Stromverhältnisses bei Zweitbelüftung	S.115
Abb.75:	Versuchsreihe 1: Entwicklung des Anteils schnellreduzierender Substanzen bei Zweitbelüftung	S.116
Abb.76:	Versuchsreihe 2: Entwicklung des Anteils schnellreduzierender Substanzen bei Zweitbelüftung	S.117
Abb.77:	Versuchsreihe 1: Entwicklung der Gesamtpolyphenole bei Zweitbelüftung	S.117
Abb.78:	Versuchsreihe 2: Entwicklung der Gesamtpolyphenole bei Zweitbelüftung	S.118
Abb.79:	Versuchsreihe 1: Entwicklung der Anthocyanogene bei Zweitbelüftung	S.118
Abb.80:	Versuchsreihe 2: Entwicklung der Anthocyanogene bei Zweitbelüftung	S.119
Abb.81:	Versuchsreihe 1: Entwicklung der DPPH-reduzierenden Aktivität bei Zweitbelüftung	S.120

Abb.82:	Versuchsreihe 2: Entwicklung der DPPH reduzierenden Aktivität bei Zweitbelüftung	S.120
Abb.83:	Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Jungbier	S.124
Abb.84:	Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Jungbier	S.125
Abb.85:	Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Unfiltrat	S.126
Abb.86:	Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Unfiltrat	S.127
Abb.87:	Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Filtrat	S.129
Abb.88:	Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Filtrat	S.130
Abb.89:	Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Schwefeldioxidgehalt im Filtrat	S.132
Abb.90:	Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Unfiltrat	S.133
Abb.91:	Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Unfiltrat	S.134
Abb.92:	Verzicht auf Belüftung, 1.Versuchsreihe: Mittleres Nullstrompotential im Filtrat	S.135
Abb.93:	Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe: Stromverhältnis im Filtrat	S.136
Abb.94:	Verzicht auf Belüftung, 2.Versuchsreihe: Schwefeldioxidgehalt im Filtrat	S.138
Abb.95:	Mittleres Nullstrompotential bei eiweißseitiger Stabilisierung	S.144
Abb.96:	Stromverhältnis bei eiweißseitiger Stabilisierung	S.145
Abb.97:	Anteil schnellreduzierender Substanzen bei eiweißseitiger Stabilisierung	S.146
Abb.98:	Anteil mittelschnell- und langsamreduzierender Substanzen bei eiweißseitiger Stabilisierung	S.146
Abb.99:	DPPH-reduzierende Aktivität bei eiweißseitiger Stabilisierung	S.147
Abb.100:	Reduzierende Substanzen nach Chapon bei eiweißseitiger Stabilisierung	S.148
Abb.101:	Mittleres Nullstrompotential bei gerbstoffseitiger Stabilisierung	S.149
Abb.102:	Stromverhältnis bei gerbstoffseitiger Stabilisierung	S.150
Abb.103:	Anteil schnellreduzierender Substanzen bei gerbstoffseitiger Stabilisierung	S.151
Abb.104:	Anteil mittelschnellschnell- und langsamreduzierender Substanzen bei gerbstoffseitiger Stabilisierung	S.152
Abb.105:	DPPH-reduzierende Aktivität bei gerbstoffseitiger Stabilisierung	S.153

Abb.106:	Reduzierende Substanzen nach Chapon bei gerbstoffseitiger Stabilisierung	S.154
Abb 107:	Sauerstoffbelastung und Mittleres Nullstrompotential bei Bier ohne PVPP-Stabilisierung	S.158
Abb.108:	Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis bei Bier ohne PVPP-Stabilisierung	S.159
Abb.109:	Sauerstoffbelastung und Mittleres Nullstrompotential bei forciertem Bier ohne PVPP-Stabilisierung	S.160
Abb.110:	Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis bei forciertem Bier ohne PVPP-Stabilisierung	S.161
Abb.111:	Sauerstoffbelastung und Mittleres Nullstrompotential bei Bier mit PVPP-Stabilisierung	S.162
Abb.112:	Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis bei Bier mit PVPP-Stabilisierung	S.163
Abb.113 :	Sauerstoffbelastung und Mittleres Nullstrompotential bei forciertem Bier mit PVPP-Stabilisierung	S.164
Abb.114:	Sauerstoffbelastung und Stromverhältnis bei forciertem Bier mit PVPP-Stabilisierung	S.165
Abb.115:	Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials ohne PVPP-Stabilisierung	S.166
Abb.116:	Entwicklung des Mittleren Nullstrompotentials mit PVPP-Stabilisierung	S.167
Abb.117:	Entwicklung des Stromverhältnisses ohne PVPP-Stabilisierung	S.168
Abb.118:	Entwicklung des Stromverhältnisses mit PVPP-Stabilisierung	S.179
Abb.119:	Stromverhältnis bei verschiedenen Hauptgärtemperaturen	S.173
Abb.120:	Anteil schnellreduzierender Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.174
Abb.121:	Anteil mittelschnellreduzierender Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.174
Abb.122:	Anteil langsamreduzierender Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.175
Abb.123:	Mittleres Nullstrompotential bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.175
Abb.124:	DPPH-reduzierende Aktivität bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.176
Abb.125:	Reduzierende Substanzen nach Chapon bei verschiedenen Hauptgärtemperaturen	S.177
Abb.126:	Gesamtpolyphenole bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.177

Abb.127:	Anthocyanogene bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.178
Abb.128:	Gehalt an einzelnen phenolischen Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.179
Abb.129:	Verlauf des Mittleren Nullstrompotentials bei verschiedenen Hauptgärtemperaturen	S.180
Abb.130:	Verlauf des Stromverhältnisses bei unterschiedlichen Gärtemperaturen	S.181
Abb.131:	Verlauf der schnellreduzierenden Substanzen unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	
Abb.132:	Verlauf der mittelschnellreduzierenden Substanzen bei unterschiedlichen Hauptgärtemperaturen	S.183
Abb.133:	Verlauf des Anteils langsamreduzierender Substanzen bei unterschiedlichen Gärtemperaturen	S.184
Abb.134:	Verlauf der DPPH-reduzierenden Aktivität bei unterschiedlichen Gärtemperaturen	S.185
Abb.135:	Verlauf der Gesamtpolyphenole bei unterschiedlichen Gärtemperaturen	S.186
Abb.136:	2.Nullstrompotential in Abhängigkeit vom Extraktgehalt des Apfelsafts	S.203
Abb.137:	2.Nullstrompotential in Abhängigkeit von der Titrationsacidität des Apfelsafts	S.204
Abb.138 :	2.Nullstrompotential in Abhängigkeit vom p-Wert des Apfelsafts	S.205
Abb.139:	Korrigiertes Stromverhältnis in Abhängigkeit von der Titrationsacidität des Apfelsafts	S.206
Abb.140:	Korrigiertes Stromverhältnis in Abhängigkeit vom Extraktgehalt des Apfelsafts	S.207
Abb.141:	Stromverhältnis in Abhängigkeit vom Extraktgehalt des Apfelsafts	S.207
Abb.142:	2.Nullstrompotential in Abhängigkeit vom korrigiertem Stromverhältnis des Apfelsafts	S.208
Abb.143:	Entwicklung der verschiedenen Reduktonklassen und des Potentials bei 8°C Hauptgärtemperatur	S.223
Abb.144:	Entwicklung der verschiedenen Reduktonklassen und des Potentials bei einer Hauptgärtemperatur von 18°C	S.223

9 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Messergebnisse für Aufstocken mit Catechin und Ferulasäure	S. 38
Tab.2: Messergebnisse für belüftetes Bier (frisch)	S. 55
Tab.3: Messergebnisse für belüftetes Bier (forciert)	S. 58
Tab.4: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Jungbier (Verzicht auf Belüftung, 1. Versuchsreihe)	S.125
Tab.5: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Unfiltrat (Verzicht auf Belüftung, 1. Versuchsreihe)	S.128
Tab.6: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Filtrat (Verzicht auf Belüftung, Versuchsreihe 1)	S.131
Tab.7: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Unfiltrat (Verzicht auf Belüftung, 2. Versuchsreihe)	S.134
Tab.8: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene im Filtrat (Verzicht auf Belüftung, 2. Versuchsreihe)	S.137
Tab.9: Werte für das Unfiltrat (Verzicht auf Belüftung, 3. Versuchsreihe)	S.139
Tab.10: Werte für das Filtrat (Verzicht auf Belüftung, 3. Versuchsreihe)	S.139
Tab.11: Nullstrompotentiale bei eiweißseitiger Stabilisierung	S.145
Tab.12: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene bei eiweißseitiger Stabilisierung	S.148
Tab.13: Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene bei PVPP-Stabilisierung	S.154
Tab.14: Sauerstoffbelastung und Gesamtpolyphenolgehalt ohne PVPP-Behandlung	S.159
Tab.15: Sauerstoffbelastung und Anthocyanogengehalt ohne PVPP-Behandlung	S.160
Tab.16: Sauerstoffbelastung und Gesamtpolyphenolgehalt mit PVPP-Behandlung	S.163
Tab.17: Sauerstoffbelastung und Anthocyanogengehalt mit PVPP-Behandlung	S.164
Tab.18: Analysenergebnisse von grosstechnisch hergestellten Bieren (frisch)	S.191
Tab.19: Analysenergebnisse für die forciert gealterten Biere	S.192
Tab.20: Änderung von Antiradikalischer Aktivität und Stromverhältnis bei forcierter Alterung	S.194
Tab.21: Mittleres Nullstrompotential bei unterschiedlichen Potentialfenstern	S.195

10 Abkürzungsverzeichnis

AH	Anodisch übertragene Ladung bei Erhöhung der Spannung
AR	Anodisch übertragene Ladung bei Absenkung der Spannung
APP	Gerätebezeichnung für tragbares Pumpenphotometer
CMC-EDTA	Carboxymethylcellulose-Ethylendiamintetraessigsäure
CV	Cyclovoltogramm
DCI	2,6 Dichlorophenol-Indophenol
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
DPPH5	Diphenylpicrylhydrazylreduzierende Aktivität bei 5Minuten Reaktionszeit
E	Extinktion
EBC	European Brewery Convention
EAA	Elektrochemischer Analysenautomat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Δ DCI	Stromanstieg durch durch Bierreduktone reduziertes DCI
ITT	Indikator-Time-Test
Δ IVC	Stromanstieg durch von Ascorbinsäure reduziertes DCI
NADH-POD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Peroxidase
NP	Nullstrompotential
KH	Kathodisch übertragene Ladung bei Erhöhung der Spannung
KR	Kathodisch übertragene Ladung bei Absenkung der Spannung
MEBAK	Mitteuropäische Brautechnische Analysenkommision
MNP	Mittleres Nullstrompotential
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
PI	Polymerisationsindex
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidión
RV	Redukton-Vitamin C-Verhältnis
RV4	Redukton-Vitamin C-Verhältnis nach 4 min Reaktionszeit
s	Scanrate
SO ₂ -OD	Sulfit-Oxidase
SV	Stromverhältnis (Reduktionskraft)
U ₁	1.Nullstrompotential
U ₂	2.Nullstrompotential

11 Literatur

Ames, J.M., "Melanoidins as Pro- or Antioxidants", *Cerevisia* 26 (4), 2001, S.210-216

Analyseautomat APP 5003, Handbuch und Steuerprogramm, ME Instrument GmbH, Trappenkamp, 1992

Araki, S., Kimura, T., Shimizu, C., Furusho, S., Takashio, M., Shinotsuka, K., "Estimation of Antioxidative Activity and Its Relationship to Beer Flavour Stability", *J. Am. Soc. Brew. Chemists*, 57 (1), 1999, S34-37

Back, W., Franz, O., "Das antioxidative Potential von Bier", *Brauwelt* 141, 2001, S.209-219

Bellmer, H.-G., "Über den Einfluss der Malzqualität auf Polymerisationsindex, kolloidale Haltbarkeit und Geschmacksstabilität der Biere", *Brauwelt* 116, 1976, S.789-797

Beutler, H.-O., Schütte, I., "Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln", *Deutsche Lebensmittelrundschau* 79, 1983, S.323-330

Böhm, H., Boenig, H.; Hempel, J., Raab, Kroke, A., "Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien in der der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Krankheiten, *Ernährungswiss.* 37 (2), 1998, S.147-163

Bodiselitsch, B., „Auswirkungen verschiedener Düngemittel auf den Boden und die Fruchtqualität der Apfelsorte „Golden Delicious““, Diplomarbeit, Graz, 2002

Brautechnische Analysenmethoden Band II, Methodensammlung der MEBAK, Pfenninger, H. (Hrsg.), Selbstverlag der MEBAK, Freising -Weihenstephan 1993

Bruger, A.H., „Beobachtungen über die Wirkung von Bodentauschn bei der Bekämpfung von Apfelmüdigkeit“, Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur Wien, 1990

Chapon, L., C., Chapon, S., "Estimation du pouvrier réducteur des bières par le complexe fer-dipiridyle", EBC, IRL, Oxford University Press, Oxford, 1971, S.307-322

Chapon, L., "Oxygen and beer", *Brewing Science Vol.2*, Academic Press, New York 1981, S.407-455

Chapon,L., Kretschmer,,K.F., „Über die Bedeutung der reduzierenden Kraft bei hellen Bieren“, Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, 2001, S.185-195

Chapon,L., Chapon,S.,"Beitrag zum Mechanismus der Bieroxidation, Verhalten der reduzierenden Substanzen",Proc.EBC-Congress Berlin 1979, S.341-354

Chiavari,G., Vitali,P., Galletti,G.C., "Elektrochemical detection in the high-performance liquid chromatography of polyphenols (vegetable tannins)", Journal of Chromatography Vol 392,1987, S.426-434

Cos,P., Calomme,M., Pieters,A.,"Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Antioxidant and Pro-Oxidant Compounds",Studies in Natural Products Chemistry 22, 2000, S.307-341

Dickel,T., Krottentaler,M., Back,W., "Untersuchungen zum Einfluss des Kühltrubeintrags auf die Bierqualität", Brauwelt , 2000, S.1330-1332

Drawert,F., Krempf,H., Sipos,S., "Ein potentiometrisches Verfahren zur Bestimmung der Reduktone im Bier", Brauwissenschaft 30, 1977, S.245-250

von Euler,H., Eisert,B.,"Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate", Ferdinand Enke,Stuttgart,1957

Forster,C., Back,W., "Pitching and Filling Procedures of Cylindro-Conical Fermentation Tanks and its Influence on the Anti-Oxidative Activity of beer",MBAA Quartely,37,2000,S.59-64

Forster,C., Narziss,L., Back,W.,"Investigations of Flavor and Flavor Stability of Dark Beers Brewed With Different Kinds of Special Malts", MBAA,35 (2),1998, S.73-77

Gebhardt,E., "Elektrochemische Bestimmungen von Reduktonen im Bier", Dissertation, TU München, 1993

Gosser,D.K., "Cyclic voltametry:simulation and analysis of reaction mechanism",VCM,Weinheim 1990

Gray,P.P., Stone,I.M., "Oxidation in beers. A simplified method for measurement", J.Inst.Brewing 45, 1939, S.253-263

Gromus,J., Lustig,S., "Einfluss von Polyphenolen und reduzierenden Verbindungen auf die Bierqualität und ihr Verhalten im Brauprozess", Brauwelt 139,1999, S.2028-2034

Hendrickson,H.P., Kaufmann,A.D., Lunte,C.E., "Elektrochemistry of catechol-containing flavonoids", J.Pharm.Biomed.Anal. 12,1994,S.325-334

Hofmann,H.; "Vom lebendigen Lebensmittel", Deukalion, Holm 1997,

Hlavacek, I, "Oxidations- und Reduktionsvorgänge bei der Bierherstellung",
II.Intern.Symposium der Gärungs-Industrie Leipzig, 1968, S.429-442

Hollmann,P,"Bioavailability of flavanoids",International Congress and Symposium Series 226,
The Royal Society of Medicine Press, 1999, S.45-52

Isenberg,R.,"Kaltwürzefiltration und Kaltwürzeflotation-Ein Systemvergleich",Diplomarbeit,
1997

Kaneda,H., Kobayashi,N., Furusho,S., Sahara,H., Koshino,S.,"Reducing activity and flavour stability of beer",MBBA Technical Quarterly 32,1995,S.90-94

Kaneda,H., Kobayashi,N., Furusho,S., Sahara,H., Koshino,S.,"Chemical Evaluation of Flavour Stability", MBAA Technical Quarterly, 32 (2), 1995, S.76-80

Kretschmer,K.F., „Die Tannometeranalyse heller Biere“, Brauwelt 140, 2000, S.1083-1084

Kretschmer,K.-F.,"Die Reduktionkraft als Qualitätsmerkmal für Gerste und Malz", Der Brauereitechniker 22, 1970, S.146-152

Kuntchewa,M.J., Obretenov,T.D.,"Isolation and Characterisation of Melanoidins in Beer,
Z.Lebensm.Unters.Forsch, 202,1996, S.238-243

Lacan,F., Soulet,S.,"Polyphenols and the Oxygen Paradox in the Brewing Process",
Cerevisia 25 (4),2000, S.35-50

Mc Murrough,I., Madigan,D., Kelly,R.J.,"The Role of Flavanoid Polyphenols in Beer Stability",J.Am.Soc.Brew.Chem, 54(3), 1996, S.141-148

Moll,M., "Determination of antioxidants in brewing, Part 1: Chemical methods", Monatsschrift für Brauwissenschaft 54,2001,S.28-32

Moll,M., "Determination of antioxidants in brewing, Part 2: Physical methods", Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, 2001,

Namiki,M., "Chemistry of Maillard Reactions:Recent Studies on the Browning Reaction Mechanism and the Development of Antioxidants and Mutagens", Advances in Food Research, 32, 1988, S.115-167

Narziß,L., Bellmer,H.-G., "Einfluss der Stabilisierung des Bieres mit PVPP und Betonit auf den Polyphenolgehalt und den Polymerisationsindex, Brauwissenschaft 29, 1976, S.256-261

Narziß,L., Bellmer,H.-G., "Studie über die Polyphenole und deren Polymerisationsindex in den Rohstoffen des Bieres und ihre Veränderung während der Bierbereitung",Brauwissenschaft 28, 1975, S.271-274

Narziß,L., Kieninger,H., Reicheneder,E., "Die Kühltrubabtrennung mittels Flotation im Vergleich zu anderen Verfahren", Proceedings of the 13th Congress of European Brewery Convention Estoril, 1971, S.197-210

Narziß,L., "Über den Schwefeldioxidgehalt des Bieres", Brauwelt 122, 1982, S. 502-519

Neumann,R., "Elektrochemische Bestimmungsmethoden für das Reduktionsvermögen von Bier: Ansprechverhalten auf Probenveränderung und Beeinflussung durch Matrixeffekte", Dissertation, TU München, 2000

Noel,S., Methais,N., Bonte,S., Bodart,E., Peladan,F.,Dupire,S.,Collin,S., "The Use of Oxigen 18 in Appraising the Impact of Oxidation Process during Beer Storage", Journal of the Institute of Brewing, 105 (5), 1999, S.269-274

Pannala,A.S., Rice-Evans,C., "Rapid-Screening Method for Relative Antioxidant Activities of Flavonoids and Phenolics", Methods in Enzymology Vol.335, 2001, S.266-295

Papp,A., Dissertation, TU München 2001

- Savel,J., "Thermal Sugar Degradation During Beer Agening", Brewing Science Group Bulletin 2000, 3rd technical meeting, Pilsen, CR, 2000, S.26-31
- Sobiech,R., "Elektrochemische Bestimmung von Summenparametern für die Qualitätskontrolle von Bier",Dissertation,TU München, 1997
- Steiner,K., Länzlinger,U., "Zur Redoxpotentialmessung von Würze und Bier",Brauerei- und allgemeine Getränke-Rundschau 97,Nr.4,1986, S.69-92
- Stempfl,W., „Bierflavour und Geschmacksstabilität, Sensorische und Analytische Überprüfung“ Folge 2, Brauindustrie, 1995, S.120-125
- van Strien,J., de Jong,R.L., "A new method for the determination of redox conditions of beer and wort", Brauwissenschaft 35, 1982, S.13-17
- Thum,B., "Modellversuche zur Bildung von Carbonylen",Dissertation, TU-München-Weihenstephan, 1997
- Wabner,D., Persönliche Mitteilung 2001
- Wackerbauer,K.,Hardt,R., "Radikalreaktionen und die Geschmacksstabilität des Bieres", Brauwelt 136,1996,S.1880-1888
- Walters,M.T., Heasman,A.P., Hughes,P.S., "Comparison of (+)-Catechin and Ferulic Acid as Natural Antioxidants and their Impact on Beer Flavour Stability",Part 1:"Forced-Aging",Part 2:"Extended Storage Trials", J.Am.Soc.Brew.Chemists, 55 (2),1997, S.83-89
- Wearne,S., "Estimating dietary intakes of flavanoids", International Congress and Symposium Series 226,The Royal Society of Medicine Press,1999, S.35-44
- Wittek,D., Diplomarbeit, TU-München-Weihenstephan, 2002
- Zhao,K.,et al., "DNA-Damage by Nitrite and Peroxynitrite Protection by dietary Phenols", Methods in Enzymology 335, 2001, S.296-307

