

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

Die kolloidale Stabilität untergäriger Biere – Einflussmöglichkeiten und Vorhersagbarkeit

Moritz R. Pöschl

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

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H.-Chr. Langowski

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Back

2. Univ.-Prof. Dr. H. Nirschl, Universität Karlsruhe (TH)

Die Dissertation wurde am 01.12.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.02.2009 angenommen.

Meinen Eltern

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei...

Meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu promovieren. Auf diesem Wege gute Besserung!

Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Back, der sich aufgrund der schweren Krankheit meines Doktorvaters spontan dazu bereit erklärt hat, als mein Erstprüfer zu fungieren.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Horst-Christian Langowski und Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl für Ihre Bereitschaft, sich als Prüfungsvorsitzender bzw. als Zweitprüfer zur Verfügung zu stellen.

Den Verantwortlichen der InBev-Baillet-Latour Stiftung, ohne deren finanzielle Unterstützung diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Meinen beiden Vorgängern Andreas Papp und Marc Kusche für die exzellente Vorarbeit im Bereich kolloidale Bierstabilität.

Meinen Ex-Doktorandenkollegen Andi Brandl, Johnny Burkert, Urs Wellhoener und Beate Laible sowie meinen aktuellen Kollegen Henning Kötke, Mathias Hutzler, Kathrin Mathmann und Sven Schönenberg für die schöne Zeit. Danke auch an Dr. Christoph Tenge, Dr. Reiner Springer, Martin Koch, Hubertus Schneiderbanger und alle anderen Mitarbeiter des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II.

Den Studenten, die ich im Rahmen von Semester- und Diplomarbeiten betreuen durfte und die damit einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leisteten:

Danke an Alexander Nikitin, Andreas Schumacher, Anna Treleano, Ben Bailey, Christoph Kurek, Daniel Sander, Diana Kirova, Dominic Wimmer, Frank Metzler, Georg Drexler, Heiko Grimm, Jenny Koob, Jörg Kreß, Kilian Garus, Lucero Gonzalez-Castro, Luis Leal, Martina Braun, Roland Hübner, Sandro Coccuzza, Sebastian Kannengießer, Simon Bauer, Thomas Haberland, Udo Zimmermann und Uli Ferstl. Euch allen nur das Beste für die Zukunft!

Besonderen Dank schulde ich...

Meinen beiden Lieblings-Sekretärinnen Christl Volkhart und Hildegard Giebels nicht nur für das Erledigen lästiger bürokratischer Notwendigkeiten, sondern vor allem für die netten Gespräche und die entgegengebrachte Sympathie.

Konrad Lacknermeier und Susan Illing für die unschätzbare Hilfe bei Versuchsdurchführungen und Analysen.

Meinen beiden Hiwis aus dem „wilden Osten“ Marcus Müller und Thomas Haberland. Ich hätte mir keine besseren Mitarbeiter wünschen können. Bleibt so wie Ihr seid und weiterhin viel Erfolg!

Hubert Walter und Tanja Spranger, stellvertretend für alle Mitarbeiter des Forschungszentrums für Brau- und Lebensmittelqualität, die mich auf großartige Art und Weise unterstützt haben.

Julie Rothe für die vielen schönen Jahre, die wir gemeinsam verbringen durften.

Unersetzlich sind für mich...

Meine Eltern Monika und Rainer sowie meine Schwester Sophia. Danke für alles und bleibt mir gesund!

Alle meine Freunde. Besonders einer ist mir in den vergangenen Jahren ans Herz gewachsen – ohne Dominique wäre es am Lehrstuhl nur halb so lustig gewesen. Danke für die geile Zeit, mein Bruder im Geiste!

Und natürlich Jacqueline. Danke für Deine tolle Unterstützung in der Endphase meiner Promotion! Ich freue mich, dass ich Dich näher kennenlernen durfte. Und noch mehr freue ich mich auf das, was noch vor uns liegt!

Abkürzungsverzeichnis

AW	Anstellwürze
Bzw.	Beziehungsweise
Co-Mfg	Co-Multifidolglucosid
°dh	Grad deutscher Härte
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DPI	Dichlorphenolindophenol
DPPH	Diphenylpicrylhydrazil
EBC	European Brewery Convention
FAN	Freier Aminostickstoff
GG%	Gewichtsprozent
HG	High Gravity
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hrsg.	Herausgeber
IP	Isoelektrischer Punkt
LDL	Low Density Lipoprotein
Min.	Minuten
MNP	Mittleres Nullstrompotential
2MPPG	Co-Multifidolglucosid
NRW	Nordrhein-Westfalen
PCB3	Procyanidin B3
PDB3	Prodelphinidin B3
PfvW	Pfannevollwürze

PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RA	Restalkalität
SV	Stromverhältnis
TCA	Trichloressigsäure
U.a.	Unter anderem
U/Min	Umdrehungen pro Minute
Vgl.	Vergleiche
Vol%	Volumenprozent
WT	Warttage

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen und Stand des Wissens	4
2.1	Grundlagen zum Thema kolloidale Bierstabilität	4
2.1.1	Definitionen	4
2.1.2	Trübungsmessung in Bier	5
2.1.3	Zusammensetzung kolloidaler Trübungen	7
2.2	Polyphenole in Bier	9
2.2.1	Klassifizierung der Polyphenole	10
2.2.2	Trübungsrelevante Polyphenole	11
2.2.3	Polyphenole bei der Malz- und Bierherstellung	15
2.2.4	Ernährungsphysiologische Bedeutung	18
2.3	Proteine in Bier	21
2.3.1	Proteinspektrum	21
2.3.2	Trübungsrelevante und schaumpositive Proteine	24
2.4	Sekundäre Trübungsbildner und Einflussfaktoren	28
2.4.1	Kohlenhydrate und anorganische Bestandteile	28
2.4.2	Einflussfaktoren auf die kolloidale Stabilität	30
2.5	Verbesserung der kolloidalen Stabilität	32
2.5.1	Auswahl der Rohstoffe	32
2.5.2	Prozesstechnischer Einfluss	34
2.5.3	Einsatz von Stabilisierungsmitteln – Historie und Stand der Technik	37
2.5.3.1	<i>Stabilisierung mittels Fällungsmitteln</i>	37
2.5.3.2	<i>Stabilisierung durch Adsorption</i>	39
2.5.3.3	<i>Enzymatische Stabilisierung</i>	47
2.5.3.4	<i>Antioxidative Stabilisierungsmaßnahmen</i>	49

2.5.3.5	<i>Kombinierte Stabilisierung</i>	50
2.6	Methoden zur Bestimmung der kolloidalen Stabilität	52
2.6.1	Detektion ausgewählter Substanzen und Stoffgruppen.....	52
2.6.2	Beurteilung der Kälte- und Dauertrübung.....	55
2.6.3	Beurteilung der kolloidalen Stabilität anhand von Vorhersagemodellen.....	57
3	Material und Methoden	59
3.1	Probenmaterial und Rohstoffe.....	59
3.2	Die Pilotbrauerei.....	59
3.3	Polyphenolanalytik.....	60
3.3.1	Polyphenolspektrum mittels HPLC.....	60
3.3.2	Gesamtpolyphenole.....	61
3.3.3	Flavanoide.....	61
3.3.4	Anthocyanogene.....	62
3.4	Proteinanalytik.....	62
3.4.1	Gesamtlöslicher Stickstoff.....	62
3.4.2	Fraktionierung der Proteine nach Pawlowski-Schild.....	62
3.4.3	Freier Aminostickstoff (FAN).....	62
3.4.4	Analyse des proteingebundenen Prolins.....	62
3.5	Sauerstoffmessung.....	64
3.6	Reduktionsvermögen.....	64
3.6.1	Bestimmung des Redoxpotentials mittels EAA.....	64
3.6.2	Bestimmung der DPPH-reduzierenden Aktivität.....	64
3.6.3	Spektralphotometrischer Indikatortimetest (ITT).....	65
3.7	Bestimmung der kolloidalen Stabilität.....	65
3.8	Weitere Analysen in Bier.....	65
3.8.1	SCABA-Analytik.....	65
3.8.2	Bestimmung der Schaumhaltbarkeit.....	65

3.8.3	Messung der Bierbittere.....	65
3.8.4	Messung der Bierfarbe.....	66
3.8.5	Analyse der Gärungsnebenprodukte.....	66
3.9	Durchführung von Verkostungen.....	66
3.10	Statistik.....	66
3.10.1	Durchführung und Auswertung der Versuche.....	66
3.10.2	Auswertung der Verkostungsergebnisse.....	66
3.10.3	Die Anwendung statistischer Programme zur Korrelationsuche.....	67
3.11	Geräte.....	67
3.12	Verbrauchsmaterialien.....	68
4	Ergebnisse und Diskussion.....	71
4.1	Allgemeine Untersuchungen zum Thema kolloidale Bierstabilität.....	71
4.1.1	Die Auswirkungen von Intensivstabilisierung.....	71
4.1.2	Der Einfluss von Alkohol und pH in unterschiedlich stabilisiertem Bier.....	78
4.1.3	Das Zusammenspiel von Sauerstoff, Redoxpotential und kolloidaler Stabilität.....	83
4.1.4	Das Trübungspotential ausgewählter phenolischer Substanzen.....	89
4.2	Möglichkeiten der Einflussnahme auf die kolloidale Bierstabilität.....	94
4.2.1	Der Einfluss des Brauwassers.....	94
4.2.2	Die Wahl des Hopfenprodukts.....	105
4.2.2.1	<i>Der Einsatz von Gerbstoffextrakten.....</i>	<i>105</i>
4.2.2.2	<i>Vergleich verschiedener Hopfenprodukte.....</i>	<i>111</i>
4.2.3	Der Einfluss hoher Extraktgehalte unter Verwendung von Glucosesirup beim Würzekochen.....	118
4.2.4	Der Einfluss der Gärführung auf die kolloidale Stabilität.....	123
4.2.4.1	<i>Die Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen.....</i>	<i>124</i>
4.2.4.2	<i>Variation der Hefe-Anstellmenge.....</i>	<i>127</i>
4.2.4.3	<i>Die Verwendung von Hefe unterschiedlicher Führungszahl.....</i>	<i>131</i>

4.2.4.4	<i>Die Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck</i>	134
4.3	Untersuchungen zur Verbesserung der Vorhersagbarkeit der kolloidalen Stabilität	139
4.3.1	Korrelationssuche auf Basis der Forciertest-Trübung.....	140
4.3.1.1	<i>Die Erstellung von Regressionsgeraden zur Vorhersage der Forciertest-Stabilität</i>	140
4.3.1.2	<i>Klassifizierung der Forciertest-Ergebnisse mittels „decision tree“</i>	142
4.3.2	Korrelationssuche anhand der realen Trübung in den Rückstellproben.....	145
4.3.2.1	<i>Die Erstellung von Regressionsgeraden zur Vorhersage der realen Trübung</i>	145
4.3.2.2	<i>Klassifizierung der realen Trübung mittels „decision tree“</i>	148
5	Zusammenfassung	151
6	Abstract	157
7	Literaturverzeichnis	163
8	Anhang	182

1 Einleitung

Die Erhaltung der Glanzfeinheit untergäriger, filtrierter Biere über den Zeitraum des Mindesthaltbarkeitsdatums stellt aus Sicht der Brauereien eine der größten Herausforderungen der heutigen Zeit dar. Aufgrund zunehmender Globalisierung und Konzentrierung auf Großkonzerne werden die Distributionswege immer länger und die Anforderungen an die Haltbarkeit der Biere immer höher. Einerseits soll die kolloidale Stabilität, also die Resistenz des Bieres gegenüber der Ausbildung kolloidaler Trübungen, gewährleistet sein – auf der anderen Seite sind die Brauereien (besonders in den rückläufigen Biermärkten) gut beraten, ihre Marke durch die Herstellung möglichst naturbelassener Biere aufzuwerten. Um ein über mehrere Monate stabiles, glanzfeines Bier zu erhalten, ist der Einsatz diverser Stabilisierungsmittel unumgänglich, welcher gleichzeitig jedoch zu einem Verlust physiologisch relevanter Bierinhaltsstoffe wie z.B. der Polyphenole führt. Dazu kommt noch erschwerend die Tatsache, dass es bis zum heutigen Tage kein adäquates Vorhersagemodell der zu erwartenden kolloidalen Stabilität gibt, wodurch die Brauereien gezwungen sind, gewissermaßen „blind“ zu stabilisieren. Dies führt häufig zu einer Überstabilisierung der Biere, was nicht nur aus ernährungsphysiologischen Gründen unerwünscht ist, sondern auch einen nicht unerheblichen finanziellen Mehraufwand bedeutet.

Als Haupttrübungsbildner gelten kondensierbare Polyphenole, die Fällungsreaktionen zusammen mit Proteinen eingehen können [DADIC und BELLEAU 1980, WACKERBAUER und ANGER 1984a, BATCHVAROV und CHAPON 1985, ERDAL 1986, LUCK et al. 1994, SIEBERT et al. 1996a, SIEBERT et al. 1996b, CHARLTON et al. 2002]. Ferner können mitunter auch Polysaccharide und Mineralstoffe bzw. Metallionen in Trübungen nachgewiesen werden [DADIC und BELLEAU 1980, BELLEAU und DADIC 1981, PFENNINGER 1987, ANGER 1995]. Die Konzentration dieser Substanzen im Bier hängt in erster Linie von den verwendeten Rohstoffen, aber auch von den Herstellungsverfahren und technologischen Gegebenheiten in der Brauerei ab. Außer den Konzentrationen oben genannter Stoffgruppen beeinflussen auch pH-Wert und Ethanol-Gehalt des Bieres, vor allem aber äußere Faktoren wie Temperatur, mechanische Einflüsse und Licht die Trübungsneigung der abgefüllten Biere [GOMEZ und LEWIS 1969, SCHUR 1979, MADIGAN 2000, YANG und SIEBERT 2001, SIEBERT und LYNN 2003]. Erhöhte Sauerstoffbelastungen des abgefüllten Bieres führen zu einer gravierenden Verschlechterung der kolloidalen Stabilität. Ursachen sind in erster Linie die Oxidation und Polymerisierung niedermolekularer Phenole zu höhermolekularen und eiweißfällenden Polyphenolen, den sogenannten Gerbstoffen [MCFARLANE 1968, POSADA 1969, DREW 1981, MCMURROUGH 1984, STEWART 2004, KUSCHE und

GEIGER 2007]. In diesem Zusammenhang spielt auch das Redoxpotential des Bieres, also die Widerstandsfähigkeit (durch Reduktion) gegenüber dem oxidativen Einfluss des Sauerstoffs eine Rolle, deren Bedeutung noch zu klären ist.

Diese Arbeit baut auf den Ergebnissen von Papp und Kusche [PAPP 2000, KUSCHE 2005] auf, wobei die Schwerpunkte vor allem auf die Problemlösung in der Praxis gelegt werden. Dazu zählt die Optimierung der kolloidalen Stabilität auf natürliche bzw. technologische Weise, um so durch gezielte Rohstoffauswahl sowie auf prozesstechnischem Wege den Einsatz von Stabilisierungsmitteln zu minimieren oder gar zu vermeiden. Als weiteres Hauptziel kann die Verbesserung der Vorhersagbarkeit der Trübungsbildung angesehen werden, denn bedingt durch die Vielzahl an trübungsbildenden Substanzen und den Faktoren, welche die Kinetik der Trübungsbildung beeinflussen, gestaltet sich eine Vorhersage als äußerst schwierig. Gängige Forciertests im abgefüllten Bier liefern zwar akzeptable, also hinreichend realitätsnahe Ergebnisse, erlauben jedoch keinen Eingriff mehr in den Filtrations- bzw. Stabilisierungsprozess. Um eine „Blindstabilisierung“ zu vermeiden, ist es deshalb nötig, die trübungsrelevanten Parameter bereits im Unfiltrat zu quantifizieren.

Die unter Papp und Kusche etablierte HPLC-Analytik zur Bestimmung der trübungsrelevanten Polyphenole wird um die Erfassung der phenolischen Säuren sowie ausgewählter Hopfeninhaltsstoffe erweitert, um einen tieferen Einblick über die Veränderungen während des Brauprozesses und deren Einfluss auf die kolloidale Stabilität zu gewinnen. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch das Maß der Reduktion der phenolischen und zum Teil ernährungsphysiologisch relevanten Substanzen durch künstliche Stabilisierungsmaßnahmen.

Im Bereich der Proteinanalytik kommen neue Methoden mit der Zielsetzung zur Anwendung, die sehr schwer zu klassifizierenden trübungsbildenden Eiweiße in spezifischer Weise zu erfassen.

Als neuer Ansatz wird das mittels elektrochemischer Methoden gemessene Redoxpotential des Bieres miteinbezogen, um neue Erkenntnisse über den Einfluss des Zusammenspiels zwischen den im Bier vorhandenen Reduktionen und der aufgenommenen Menge an Sauerstoff auf die resultierende kolloidale Stabilität zu gewinnen.

Im Rahmen einer Verbesserung der Vorhersagbarkeit geht es in erster Linie um die Gewinnung von Erfahrungswerten bezüglich der Konzentrationen der relevanten Trübungsbildner im abgefüllten Bier und der zu erwartenden kolloidalen Stabilität. Diesbezüglich werden erstmals sämtliche obligaten und potentiellen Trübungsbildner sowie die Einflussfaktoren auf die Trübungsbildung in ihrer Gesamtheit berücksichtigt. Anhand mathematischer Vorher-

sagemodelle und unter Zuhilfenahme eines speziellen Statistikprogramms im Rahmen der Methoden des „data minings“ werden diese Parameter auf Korrelationen zur resultierenden kolloidalen Stabilität untersucht. Im Sinne einer zukünftigen Anwendung in der Brauerei kommen hier nicht nur hochspezifische Messmethoden (wie HPLC) zum Einsatz, sondern auch „Schnellmethoden“, die zum großen Teil mit normaler Bierlabor-Ausstattung durchgeführt werden können.

2 Theoretische Grundlagen und Stand des Wissens

2.1 Grundlagen zum Thema kolloidale Bierstabilität

2.1.1 Definitionen

Kolloide weisen eine trübe, leimartige Beschaffenheit auf, was bereits in dem Wort „Kolloid“ (griechisch = Leim) zum Ausdruck kommt. Ein kolloidales System besteht aus einer dispersen Phase (z.B. Feststoffe, Luft, Wasser), welche in einem Dispersionsmedium (meist Luft oder Wasser) gleichmäßig verteilt ist. Kolloidale Systeme können nach der Bindungsart zwischen den Atomen der Kolloidteilchen in drei Gruppen eingeteilt werden – die Dispersionskolloide (z.B. mineralische Kolloide in Wasser), die Molekülkolloide (u.a. Polymere und natürliche organische Makromoleküle) und die Assoziationskolloide (z.B. Tenside und Waschmittel). Weitere Einteilungsvarianten richten sich nach der Anzahl der Kettenglieder, dem Aggregatzustand der dispergierten Substanz und des Dispersionsmittels, nach geometrischen Abmessungen, der Teilchenform, der chemischen Zusammensetzung, der Herkunft, dem Verhalten gegenüber dem Dispersionsmittel oder nach der beliebigen Wiederherstellbarkeit des kolloidalen Zustandes nach Entfernung des Dispersionsmittels. Gemäß IUPAC sind Kolloide als Objekte definiert, die in einem Bereich von mindestens 1 nm und höchstens 1000 nm liegen. Gleichzeitig zeichnen sich kolloidale Systeme durch eine gleichmäßige Verteilung aus, die sich in einem definierten Beobachtungszeitraum nicht verändert, da sie durch die Brownsche Molekularbewegung stabilisiert wird [DROST 1999, HOFMANN 2004].

Die *kolloidale Bierstabilität*, auch chemisch-physikalische Stabilität genannt, steht für die Resistenz filtrierter Biere gegenüber der Ausbildung kolloidaler Trübungen. In diesem Zusammenhang wird zwischen zweierlei Erscheinungsformen unterschieden: Der reversiblen Kältetrübung, die sich in einem Temperaturbereich zwischen -8 °C und +5 °C manifestiert, die sich aber nach Erwärmung des Bieres auf 20 °C oder mehr wieder auflöst und der irreversiblen Dauertrübung, welche temperaturstabil ist. Die Reversibilität der Kältetrübung ist durch die verhältnismäßig schwache Bindung (Wasserstoffbrücken, hydrophobe Bindungen) zwischen den Komponenten der Biertrübung bedingt, wohingegen das Entstehen einer Dauertrübung in der Regel eine Oxidation sowie die Bildung kovalenter Bindungen voraussetzt, was üblicherweise in der Entstehung größerer Partikeln resultiert (vgl. Abbildung 1). Die Kältetrübung wird allgemein als Vorläufer der Dauertrübung angesehen, was man sich im Rahmen von Forciertests zur Bestimmung der Trübungsneigung filtrierter Biere zunutze macht, indem das Bier einem Wechsel von Warm- und Kaltphasen ausgesetzt wird

[WAINWRIGHT 1974, DADIC 1976, PFENNINGER 1987, SCHUR 1987, BAMFORTH 1999].

Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass aus der Kälte­trübung alleine nicht auf die Haltbarkeit des Bieres unter normalen Bedingungen geschlossen werden kann [Curtis 1963].

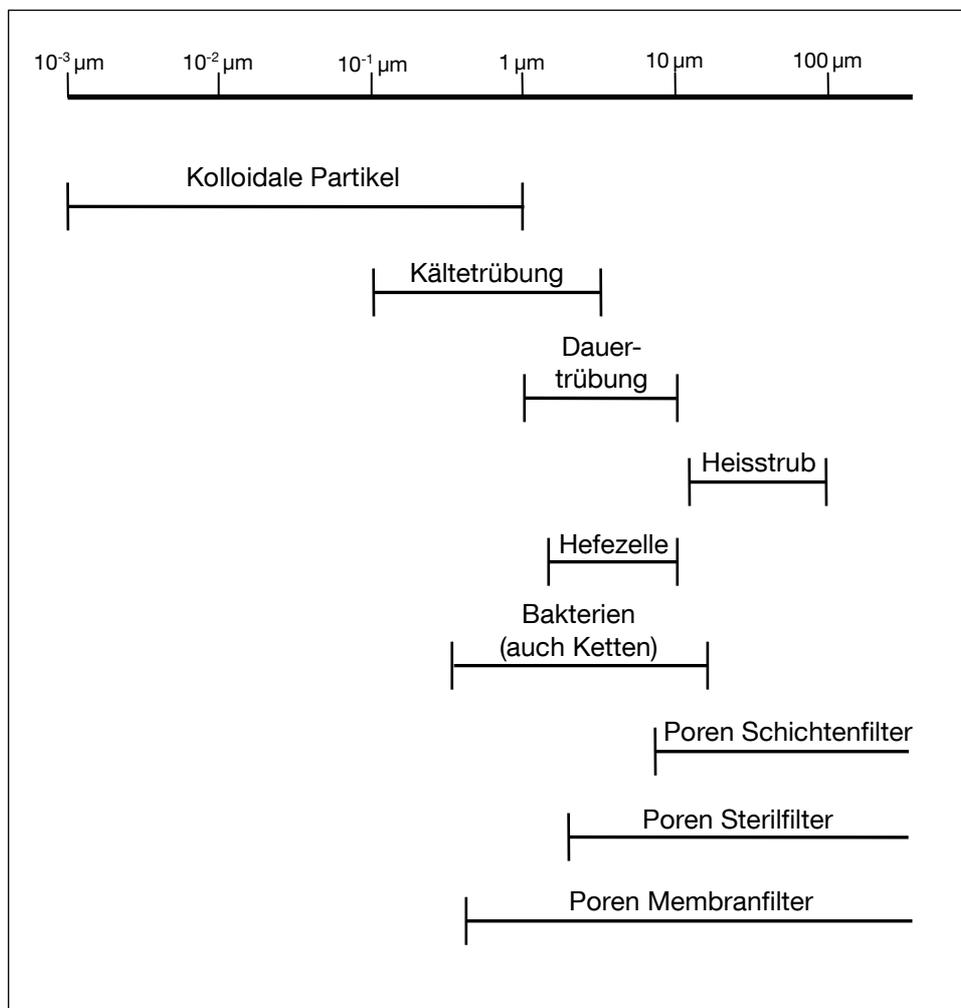


Abbildung 1: Partikeldurchmesser kolloidaler Trübungen in Bier im Vergleich zu anderen Trübungs­partikeln und Poren­größen verschiedener Filterschichten [WAINWRIGHT 1974]

2.1.2 Trübungsmessung in Bier

Biertrübungen können sowohl visuell als auch messtechnisch nachgewiesen werden. Die messtechnische Bestimmung der Lichtabsorption oder der Lichtstreuung (Tyndall-Effekt) durch die Trübungs­partikel erlaubt eine objektive und quantitative Analyse des Trübungs­grades und korreliert in der Regel mit der visuellen Wahrnehmung. Es sei jedoch darauf hin­gewiesen, dass ein apparativ gemessener hoher Trübungswert nicht in jedem Fall auch mit

dem menschlichen Auge wahrgenommen werden kann. Dieses Phänomen hängt damit zusammen, dass die Trübungswerte nicht nur von der Menge, sondern auch von der Größe und Zusammensetzung der Partikel abhängen [FRIES und GANZLIN 1969, MORRIS 1987]. In diesen Fällen spricht man von den sogenannten „unsichtbaren bzw. Pseudo-Trübungen“, verursacht durch Partikel $< 0,1 \mu\text{m}$ [BAMFORTH 1999].

In der Brauerei wird die Absorptionsmessung in erster Linie zur Erfassung hoher Partikelkonzentrationen, z.B. zur Messung der Hefekonzentrationen in den Gär- und Lagertanks oder bei der Propagation, angewandt. Die Streulichtmessung dagegen wird bevorzugt zur Detektion niedriger Konzentrationen, z.B. am Filter, genutzt. Kombinierte Messungen des Vorwärtstreulichts in einem Winkel von $11\text{-}13^\circ$ bzw. 25° (Messwinkel abhängig vom Hersteller) und des seitwärts gestreuten Lichts in einem Winkel von 90° ermöglichen eine differenziertere Betrachtung der Partikelgrößen der jeweiligen Biertrübung und neutralisieren auf diese Weise das Problem der „unsichtbaren Trübungen“ [MORRIS 1987]. So zeigt Vorwärtstreulicht eine sehr hohe Empfindlichkeit gegenüber größeren Partikeln (z.B. Kieselgur), während mit der 90° - Messung selbst bei Anwesenheit einer gewissen Menge an größeren Partikeln bevorzugt kolloidale Trübungen erfasst werden (vgl. Abbildung 2) [Philipp 2006]. Der Partikeldurchmesser mit der höchsten Empfindlichkeit gegenüber der 90° - Streuung liegt bei $0,3 \mu\text{m}$, während mit der 13° - Streuung besonders Partikel zwischen $1,0$ und $1,5 \mu\text{m}$ erfasst werden [MORRIS 1987]. In vereinfachter Weise ausgedrückt, lässt sich Folgendes konstatieren: Ist der Messwert der 90° - Messung größer als der Messwert der Vorwärtstreueung, liegt die durchschnittliche Partikelgrößenverteilung unterhalb von $0,3 \mu\text{m}$, verhält es sich umgekehrt, liegt diese oberhalb dieses Wertes.

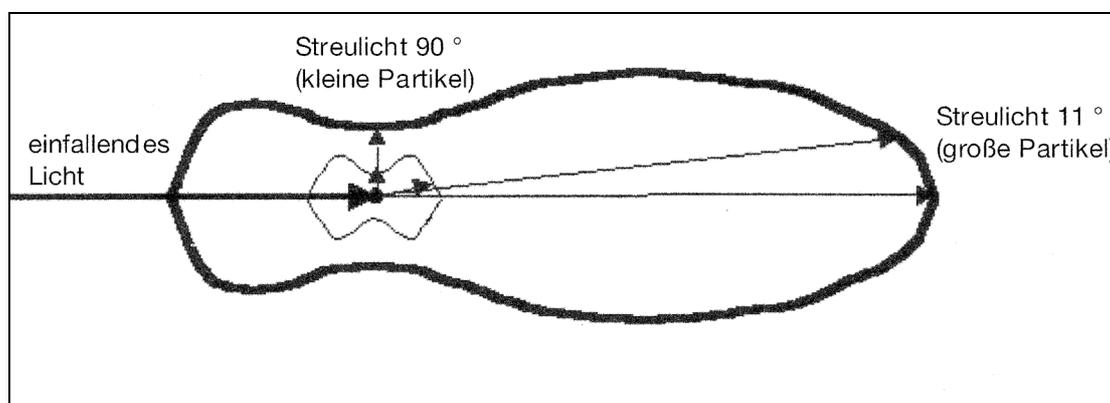


Abbildung 2: Erfassung von Partikeln durch Vorwärts- und Seitwärtsstreuung [Philipp 2006]

Um Streulichtmessungen vergleichbar zu machen, werden die Messgeräte mit einer Standard-Trübungssuspension (üblicherweise Formazin) kalibriert. Die in Brauereien übliche Trübungseinheit ist das „EBC“ [MEBAK 2000].

2.1.3 Zusammensetzung kolloidaler Trübungen

Wie in vielen Forschungsberichten einvernehmlich publiziert, gelten Polyphenole und Proteine als die Hauptverursacher kolloidaler Trübungen [GOMEZ und LEWIS 1969, GRAMSHAW 1969b, GRAMSHAW 1970a, GRAMSHAW 1970b, DADIC und BELLEAU 1980, WACKERBAUER und ANGER 1984a, LUCK et al. 1994, CHARLTON et al. 2002, SIEBERT 2006]. Auch Polysaccharide und anorganische Substanzen können in Trübungen wiedergefunden werden, sind aber von vergleichsweise untergeordneter Bedeutung [GRAMSHAW 1970a, BELLEAU und DADIC 1981, PFENNINGER 1987, ANGER 1995, SIEBERT 2004]. Die Kapitel 2.2-2.4 befassen sich in detaillierter Weise mit den Vertretern der genannten Substanzgruppen, die in den Prozess der Trübungsbildung involviert sind.

Tabelle 1: Prozentuale Zusammensetzung kolloidaler Trübungen gemäß den Angaben unterschiedlicher Autoren

	[GRAMSHAW 1970a]	[WAINWRIGHT 1974]	[NARZISS 1994]	[REHMANJI et al. 2000]
Polyphenole	17-55	15-75	---	ca. 17
Proteine	58-77	40-77	40-75	40-75
Kohlenhydrate	2-12	0-13	2-15	3-13
Anorganische Bestandteile	2-14	1-14	1-14	1-5

Einen Ansatzpunkt zum besseren Verständnis der kolloidalen Bierstabilität stellt die gezielte Untersuchung von Biertrübungen (Kälte- und/oder Dauertrübungen) dar. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die von verschiedenen Forschungsgruppen veröffentlichten Ergebnisse bezüglich der Zusammensetzung kolloidaler Trübungen. Obgleich die prozentuale Verteilung der einzelnen Komponenten mitunter stark schwanken kann, machen die Proteine mit 40-77% den Hauptanteil aus, gefolgt von den Polyphenolen (15-75%). Die Schwankungen sind

sowohl auf Unterschiede bezüglich der Rohstoffzusammensetzung (Malz, Hopfen) als auch auf die durchgeführten Stabilisierungsmaßnahmen zurückzuführen. Ein gerbstoffseitig stabilisiertes Bier wird demnach einen entsprechend geringeren prozentualen Polyphenolanteil an der Trübung aufweisen als ein unstabiliertes Bier. Der Anteil an Kohlenhydraten und anorganischen Bestandteilen liegt in der Regel bei maximal 1-14%. Laut WAINWRIGHT kann der Anteil an Kohlenhydraten in seltenen Fällen bis zu 80% betragen (Beispiel einer Verteilung: Polyphenole 1-3%, Proteine 14-45%, Kohlenhydrate 40-80%) [WAINWRIGHT 1974]. Hierbei handelt es sich jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach um sehr intensiv stabilisierte Biere, bei denen sowohl die Proteine als auch die Polyphenole zu großen Teilen reduziert wurden. Als weitere Ursache wäre zudem die Verwendung von Rohfrucht oder eine mangelhafte Verzuckerung während des Maischens denkbar.

Eine Analyse der Zusammensetzung isolierter Biertrübungen mag zwar Informationen bezüglich der ungefähren Verteilung der jeweiligen Substanzgruppen liefern, allerdings sind diese Erkenntnisse von eher allgemeinem Charakter und lassen nur begrenzte Schlüsse auf die Trübungsrelevanz einzelner Parameter zu. Die in der Trübung detektierten Bestandteile können sich deutlich von den ursprünglich Trübungs-auslösenden Substanzen unterscheiden. So werden beispielsweise die als Vorläufer fungierenden Flavan-3-ole (siehe Kapitel 2.3) durch Kondensations- bzw. Polymerisationsvorgänge während der Bieralterung zu höhermolekularen Gerbstoffen und sind somit nicht mehr in ihrer ursprünglichen Form in der Trübung wiederzufinden. Ein adäquates Verfahren zur selektiven Erfassung der in die Trübung übergehenden Precursor ist die Durchführung von Differenzanalysen zwischen frischem Bier und gealtertem trübem Bier (Messung im Überstand nach Entfernung der Trübung).

Hinsichtlich der Mechanismen der Trübungsbildung wurden in der Vergangenheit von mehreren Forschungsgruppen theoretische Modellreaktionen vorgestellt, die alle auf der Komplexbildung zwischen trübungsrelevanten Polyphenolen und trübungsaktiven Proteinen basieren. Diese Komplexe sind zunächst reversibel (z.B. Kältetrübung), werden aber im Laufe der Zeit unlöslich (Dauertrübung) [CHAPON 1994, LUCK et al. 1994, O'ROURKE 1994, HASLAM 1998, SIEBERT 1999a, SIEBERT 1999b]. Abbildung 3 zeigt, stellvertretend für die Darstellung der Reaktionsmechanismen durch andere Autoren, das Modell von Guzman et al. [GUZMAN et al. 1999]. Eine Erweiterung dieses Ansatzes stammt von Siebert, der zusätzlich zu den Ausgangskonzentrationen an trübungsrelevanten Polyphenolen und Proteinen auch dem Verhältnis dieser beiden Substanzgruppen zueinander eine gewisse Bedeutung zumisst. Aus den beiden Konzentrationsverhältnissen von 1:2 sowie 1:5 von

trübungsaktivem Polyphenol zu trübungsrelevantem Protein resultieren demnach zwei Trübungsmaxima, bedingt durch die gleiche Anzahl an freien Bindungsstellen der Proteine und Polyphenole [SIEBERT et al. 1996b, SIEBERT 1999a, SIEBERT und LYNN 2000, SIEBERT 2004, SIEBERT 2006].

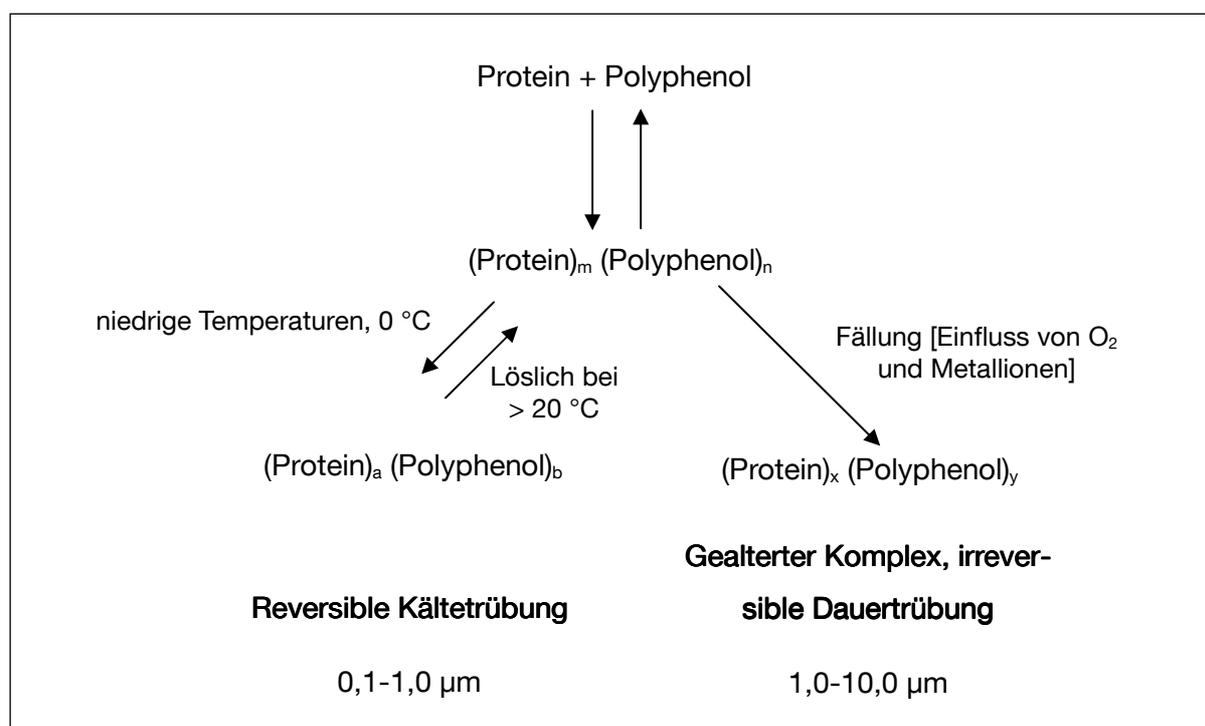


Abbildung 3: Komplexbildung zwischen Polyphenolen und Proteinen bei Kälte- und Dauertrübung [GUZMAN et al. 1999]

2.2 Polyphenole in Bier

Die während des Brauprozesses ins Bier eingebrachten Polyphenole stammen zu etwa 70-80% aus Malz und zu ca. 20-30% aus Hopfen [DELCOUR und TUYTENS 1984, ANGER 1984, PÜSPÖK 1985, FRIEDRICH et al. 2000]. Sie beeinflussen nicht nur die kolloidale Stabilität des Bieres, sondern auch die Filtrierbarkeit, den Schaum, die Farbe, den Geruch und Geschmack sowie das Reduktionsvermögen [NARZISS und BELLMER 1975a, SCHUR 1987]. Als natürliche Antioxidantien besitzen sie zudem ernährungsphysiologische Bedeutung [MONTANARI et al. 1999, MERKEN und BEECHER 2000, MIKYSKA et al. 2002, SZWAJGIER et al. 2005].

2.2.1 Klassifizierung der Polyphenole

Die allgemeine Nomenklatur phenolischer Verbindungen aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanzen sieht die Unterteilung in Phenolcarbonsäuren, Phenylpropane (Lignane), Stilbene und Flavonoide vor. Letztere stellen die mit Abstand größte Gruppe dar – durch Modifizierungen (beispielsweise Hydroxylierung, Methylierung, Glycolysierung) am Flavangrundgerüst ($C_6-C_3-C_6$ -Körper) sind heute über 5000 verschiedene Flavonoide bekannt [FRIEDRICH 2000, FLESCHHUT 2004, MANACH et al. 2004]. Diese können aufgrund ihres Oxidationszustandes im mittleren Pyranring des Grundkörpers in verschiedene Unterklassen eingeteilt werden – in Flavonole, Flavone, Isoflavone, Flavanole (Catechine und Proanthocyanidine), Flavanone und Anthocyanine [MILLER 1996, MANACH et al. 2004].

Zur Einteilung der phenolischen Substanzen im Bier ist es zweckmäßig, zwischen monomeren (Molekulargewicht < 1000) und polymeren Polyphenolen (Molekulargewicht > 1000) zu unterscheiden [GRAMSHAW 1969b]. Zu den monomeren Vertretern zählen einfache Polyphenole (Substitution von OH-Gruppen), Phenolsäuren (Substitution von COOH-Gruppen) und heterocyclische Polyphenole. Letztere Gruppe umfasst die Anthocyanogene, Anthocyanine, Anthocyanidine, Catechine, Flavanole, Flavone und Flavonole. Bei den polymeren Polyphenolen unterscheidet man niedriger- und höher-polymerisierte Formen, also kondensierbare und hydrolysierbare Polyphenole (Tannoide) [PÜSPÖK 1985]. Die Nomenklatur der phenolischen Substanzen in der Brauwissenschaft weist mitunter Überschneidungen und eine etwas verwirrende Verwendung bestimmter Trivialnamen auf – so führten Harris und Rickets beispielsweise die Bezeichnung „Anthocyanogene“ ein, was einen Sammelbegriff für alle farblosen Substanzen darstellt, die bei der Behandlung mit Mineralsäuren zu einem gewissen Anteil in die rot gefärbten Anthocyanidine übergehen. Delcour und McMurrough nannten diese Verbindungsklasse Proanthocyanidine. Die Bestimmung der „Gesamtpolyphenole“ basiert auf der Fähigkeit vieler phenolischer Verbindungen, in alkalischer Lösung mit Eisen bräunliche Komplexe zu bilden. Das Ergebnis der spektralphotometrischen Messung wird häufig vereinfachend der Gesamtmenge aller phenolischen Verbindungen in Würze und Bier gleichgesetzt [WACKERBAUER und ANGER 1984a]. Der von Chapon geprägte Begriff der „Tannoide“ bezeichnet die Vorstufen der Tannine. Diese wiederum bilden sich aus den Tannoide-Vorläufern, den sogenannten „Tanninogenen“ oder oxidierbaren Polyphenolen, die sich durch eine zunächst noch schwache Gerbkraft auszeichnen, welche aber mit steigendem Molekulargewicht zunimmt [FRIEDRICH 2000]. Eine gebräuchliche Einteilung flavanoider Bier- und Würzepolyphenole bezüglich Molekülgröße, Trivialname, Struktur und Gerbvermögen ist Tabelle 2 zu entnehmen [FRIEDRICH 2000, KUSCHE 2005].

Tabelle 2: Einteilung flavanoider Bier- und Würzepolyphenole [FRIEDRICH 2000, KUSCHE 2005]

Hauptklasse	Molekülgröße	Alternativer Trivialname	Struktur/Charakteristika
Freie Polyphenole	Monomer Oligomer	Einfache Polyphenole, einfache Flavanole Oxidierbare Polyphenole Tanninogene, Tannin Precursor	Schwache Gerbkraft, ansteigend mit zunehmendem Molekulargewicht
	Polymer	Tannine, Tannoide, oxidierte Polyphenole	Zwischenprodukt zu größeren Molekular- Gewichten, starke Gerbkraft
Gebundene Polyphenole	Komplex	Lösliche Verbindungen Von Polypeptiden und Polyphenolen	Hohes Molekulargewicht, keine Gerbkraft, beginnende Trübung

2.2.2 Trübungsrelevante Polyphenole

In Bier und Weißwein sind wesentlich weniger trübungsrelevante Polyphenole enthalten als beispielsweise in Rotwein oder auch in Apfel- und Traubensäften. Dies verdeutlichte Siebert durch den Zusatz von Gelatine in unterschiedlichen Konzentrationen zu den jeweiligen Getränken. Die resultierenden Polyphenol-Protein-Trübungen in Bier und Weißwein waren vergleichsweise minimal [SIEBERT et al. 1996a]. Ferner zeichnet sich Bier durch das Vorhandensein wesentlich größerer Mengen an trübungsaktivem Protein als an trübungsbildenden Polyphenolen (Verhältnis ca. 40 zu 1) aus. [SIEBERT 1999a, SIEBERT 2004, SIEBERT und LYNN 2005]. Dieses Wissen ist ausschlaggebend für die Stabilisierung von Bier, sei es nun durch die Auswahl geeigneter Rohstoffe, auf prozesstechnischem Wege oder durch künstliche Stabilisierungsmaßnahmen. Eine Reduktion der Polyphenolkomponente zur Verhinderung der Bildung von Protein-Polyphenol-Komplexen ist zwangsläufig deutlich effektiver als die Verminderung der im Überschuss vorhandenen Bierproteine.

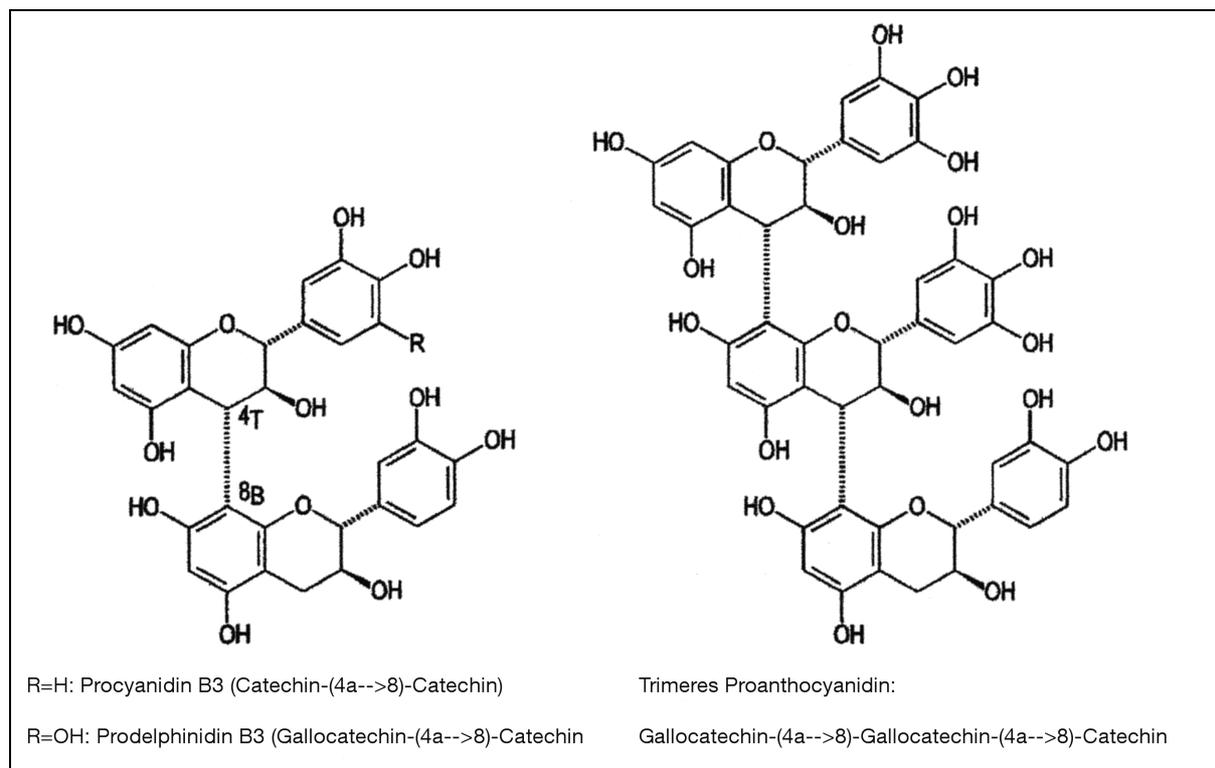


Abbildung 4: Struktur der dimeren Flavan-3-ole Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 sowie eines trimeren Proanthocyanidins [FRIEDRICH et al. 2000]

Im Bier vorhandene einfache Phenole und monomere Polyphenole besitzen in ihrer originären Form praktisch kein Gerbvermögen. Flavanole gelten jedoch durch ihre Neigung zur Polymerisation im Laufe der Bieralterung als Vorläufer und damit als Hauptverursacher sowohl von Kälte- als auch von Dauertrübungen [DADIC 1976, MCMURROUGH und HENNIGAN 1984, MADIGAN und MCMURROUGH 1994, MCMURROUGH und BAERT 1994, SIEBERT 1999a, SIEBERT 1999b, SIEBERT 2006]. Die Neigung zur Trübungsbildung wird mit zunehmender molekularer Komplexität immer größer [GRAMSHAW 1969a, GRAMSHAW 1970b, SIEBERT 1999a, SIEBERT 1999b]. Der Grad der Polymerisierung ist dabei bedeutsamer als die Anzahl und die Position der OH-Gruppen am aromatischen Ring [SIEBERT 1999a, SIEBERT 1999b, SIEBERT 2006].

Die Proanthocyanidin-Dimere (Flavan-3-ol-Dimere) Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 (vgl. Abbildung 4) haben sich in Bier als die Polyphenole mit der größten Trübungsaktivität erwiesen, die mit zunehmender Polymerisierung (Trimer, Oligomer etc.) weiter ansteigt [DELCOUR et al. 1984, SIEBERT et al. 1996b, SIEBERT 2006]. Die Polymerisierung kann

sowohl oxidations- als auch säurekatalysiert ablaufen. Dazu genügen bereits minimale Mengen an Sauerstoff, die während der Filtration und Abfüllung ins Bier gelangen, unterstützt durch den leicht sauren pH-Bereich des Bieres zwischen 4,0–4,6 [GRAMSHAW 1967, GRAMSHAW 1969a, GRAMSHAW 1970b, SCHUR 1980b, ANGER 1983, MCMURROUGH und HENNIGAN 1984, WACKERBAUER und ANGER 1984a]. Abbildung 5 zeigt das Modell kondensierter bzw. hochpolymerisierter Flavanole (Tannine). Die C4-C6 Bindung (gestrichelte Linie) stellt eine alternative Interflavan-Bindung dar.

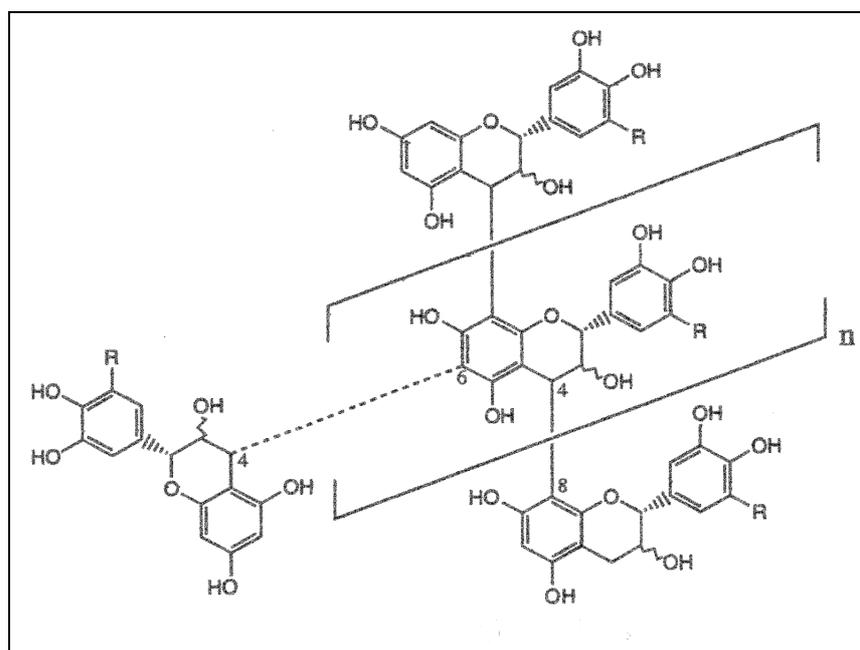


Abbildung 5: Modellhafte Darstellung eines kondensierten Tannins [SCHOFIELD et al. 2001]

Auch die monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin (vgl. Abbildung 6) induzieren, wenn auch in geringerem Ausmaß als die Proanthocyanidine, die Ausbildung kolloidaler Trübungen durch Bindung an Polypeptide [GRAMSHAW 1969a, BELLMER 1977, DELCOUR et al. 1984, SIEBERT 2006]. Siebert wies in Modellversuchen nach, dass Catechin bei einer Temperatur von 25 °C eine beträchtliche Menge an Trübung zusammen mit Polyprolin (das synthetische Polymer von Prolin) bildet, die Reaktion von Epicatechin und Polyprolin fiel dagegen eher moderat aus. Offenbar sind also auch sterische Effekte für das Ausmaß der Trübungsneigung mitverantwortlich, da sich die Monomeren Catechin und Epicatechin alleine durch die unterschiedliche sterische Orientierung einer einzigen OH-Gruppe unterscheiden. Bei einer Temperatur von 80 °C verhielten sich jedoch beide Substanzen sehr ähnlich

[SIEBERT und LYNN 1998, SIEBERT 2006]. Nach McGuinness et al. kommt es im fertigen Bier zu keiner Polymerisierung von Epicatechin, welches offenbar in monomerer Form nur als sekundärer Trübungsbestandteil (in Form von Einschlüssen) an der Bildung löslicher Komplexe beteiligt ist, aber keinen relevanten Faktor in Dauertrübungen darstellt [MCGUINNESS et al. 1975].

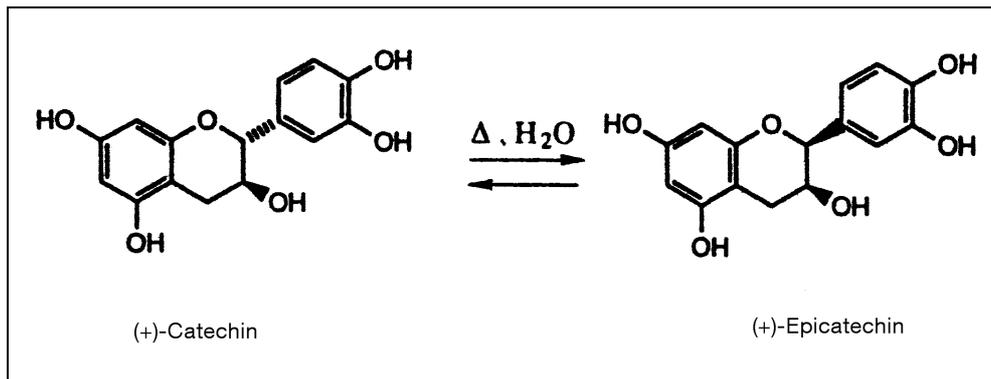


Abbildung 6: Monomere Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin [HASLAM 1998]

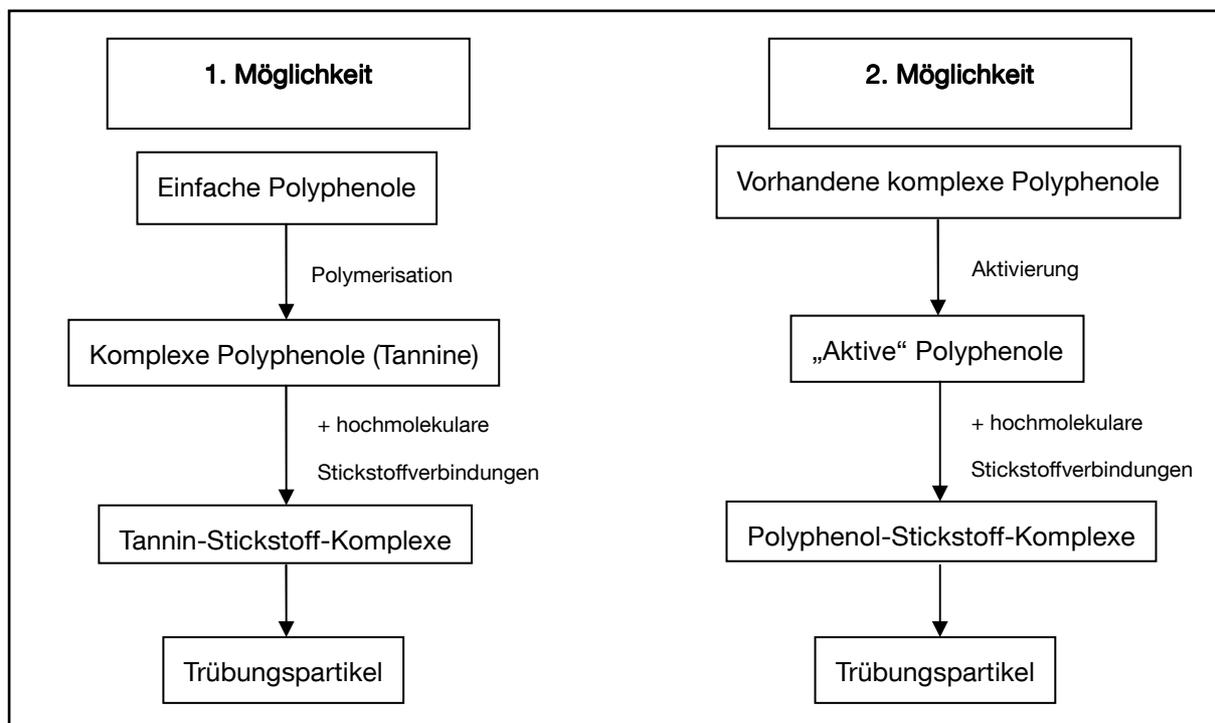


Abbildung 7: Möglichkeiten der Trübungsbildung im abgefüllten Bier [GARDNER und MCGUINNESS 1977]

Es erscheint sinnvoll, nicht nur die im frisch abgefüllten Bier vorhandenen phenolischen Precursor (Flavan-3-ol-Monomere und Dimere) als limitierende Faktoren bezüglich der kolloidalen Stabilität anzusehen, sondern auch die aus den Rohstoffen und dem Herstellungsprozess ins Bier verschleppten kondensierten Polyphenole [GARDNER und MCGUINNESS 1977, ANGER 1983, MOLL et al. 1984, WACKERBAUER und ANGER 1984a]. Nach der Theorie von Gardner und McGuinness werden diese durch den Zutritt von Luftsauerstoff aktiviert, binden an Proteine und bringen diese zur Ausfällung. Abbildung 7 zeigt die beiden Möglichkeiten der Trübungsbildung aus einfachen Polyphenolen (Vorläufern) und den vorhandenen komplexen Polyphenolen [GARDNER und MCGUINNESS 1977].

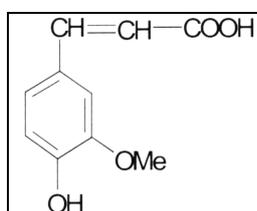


Abbildung 8: Ferulasäure [TCHONE 2003]

Manche Autoren sprechen auch der Ferulasäure (vgl. Abbildung 8), der konzentrationsstärksten phenolischen Säure in Bier, einen Einfluss auf die Trübungsbildung zu. Harris wies bereits im Jahre 1965 auf das Vorhandensein phenolischer Säuren in kolloidalen Trübungen hin. Insbesondere die Ferulasäure könne in relevanten Mengen detektiert werden [HARRIS 1965]. Laut Papp übt diese in höheren Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die kolloidale Stabilität aus, wohingegen niedrige Konzentrationen die Trübungsstabilität bis zu einem gewissen Grad verbessern. [PAPP et al. 2001]. Die Beteiligung der Ferulasäure an der Trübungsbildung hängt dabei nicht nur von der Konzentration an trübungsrelevantem Protein ab, sondern auch vom Vorhandensein anderer phenolischer Substanzen sowie vom Bier-pH [SZWAJGIER et al. 2005].

2.2.3 Polyphenole bei der Malz- und Bierherstellung

Bei den in der Gerste identifizierten Proanthocyanidinen handelt es sich um 2 Dimere (Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3) und 4 Trimere (Procyanidin C2 und Prodelphinidin C2) aus Catechin- und Gallocatechin-Einheiten. Die Bezeichnung Prodelphinidin C2 umfasst hier

drei unterschiedliche Kombinationen der $4\alpha \rightarrow 8$ verknüpften Einheiten [ANGER 1983, FRIEDRICH 2000]. Ferner sind auch die monomeren Flavanole Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin und Gallocatechin nachweisbar, wohingegen oligomere Flavanole quantitativ als eher unbedeutend eingestuft werden. Der Proanthocyanidingehalt der Gerste liegt bei ca. 100-160 mg/100 g Trockensubstanz, wobei die dimeren Haupttrübungsbildner Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 überwiegen. Der Gesamtpolyphenolgehalt wird mit 100-300 mg/100 g Trockensubstanz angegeben, die Konzentration an phenolischen Säuren beträgt etwa 5-12 mg/100 g Trockensubstanz. In struktureller Hinsicht sind die Proanthocyanidine der Gerste mit denen des Malzes identisch und können auch in Bier wiedergefunden werden [FRIEDRICH 2000]. Bezüglich der Veränderungen während des Mälzungsprozesses finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Laut Gramshaw und McMurrough et al. verändert sich der Gehalt an einfachen Flavanolon während der Vermälzung nur geringfügig, Moll et al. wiesen dagegen eine Catechin-Abnahme um 40-70% nach. Die Konzentrationen der dimeren Proanthocyanidine bleiben, so Moll et al., von der Gerste bis ins Malz praktisch gleich, Anger hingegen berichtet von einer Abnahme um bis zu 15% [GRAMSHAW 1969b, ANGER 1983, MCMURROUGH et al. 1983, MOLL et al. 1984]. Bellmer et al. stellten eine Zunahme der Polyphenole, insbesondere der Phenolcarbonsäuren von Gerste zu Malz fest [BELLMER et al. 1995a]. Laut Jerumanis dagegen findet sich im Malz praktisch die gleiche Menge an Polyphenolen wie in der entsprechenden Gerste [JERUMANIS 1972]. Ein zunehmender Lösungsgrad und höhere Abdarrtemperaturen resultieren in ansteigenden Konzentrationen an Polyphenolen, insbesondere an Anthocyanogenen (Proanthocyanidinen) im Malz [KESSLER 1971, ROESSLER 1971, NARZISS und BELLMER 1975b, SCHUR 1987]. Zudem korreliert oft ein höherer Eiweißgehalt des Malzes mit steigendem Anteil an löslichen Anthocyanogenen [SCHUR 1987]. Es bleibt festzuhalten, dass der Gehalt phenolischer Bierinhaltsstoffe signifikant mit dem von Gerste und Malz korreliert [ANGER 1983].

Während des Maischens werden 44-48% der aus der Gerste stammenden dimeren Proanthocyanidine freigesetzt und gelangen in die Würzpfanne. Je intensiver die Maischarbeit und die Spelzenauslaugung während des Abläuterns verläuft, desto mehr Polyphenole gehen in Lösung [ANGER 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a, BELLMER et al. 1995b]. Die Catechin-Lösung liegt bei über 100%, was auf eine Neubildung schließen lässt, offenbar bedingt durch thermische Dissoziation dimerer Polyphenole. Das Vorhandensein von Epicatechin ist eher auf die Erhitzung von Catechin im sauren Medium während des Maischens zurückzuführen, resultierend in sterischer Umorientierung, als auf die Lösung aus dem Malz [MOLL et al. 1984]. Nach Schur fördern Nassschrotung und eine niedrige Restalkalität des

Brauwassers die Freisetzung von Anthocyanogenen [SCHUR 1987]. Die Anwendung dünnerer Maischen, eine Verlängerung der Abläuterzeit und verstärkter Lufteinzug beim Maischen und Abläutern resultieren, so Narziss, in deutlich niedrigeren Gehalten an Anthocyanogenen und Tannoiden in Würze und Bier, wohingegen der Einfluss auf die Gesamtpolyphenole eher gering ist [NARZISS und BELLMER 1975b, NARZISS et al. 1979].

Bei der Würzekochung und Trubabscheidung kommt es aufgrund der Affinität der Gerbstoffe zu Proteinen zu einer Reduktion der Proanthocyanidine um weitere 50%, so dass in der Ausschlagwürze noch ca. 20-25% der Gerstenproanthocyanidine vorhanden sind [ANGER 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a]. Intensive Kochung und gute Trubabtrennung fördern die Abscheidung der Anthocyanogene [SCHUR 1987]. Bedingt durch die Hopfung und das Eindampfen der Würze ist der Gerbstoffgehalt der Ausschlagwürze dennoch höher als in der Pfannevollwürze [ANGER 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a]. Der Anteil an Catechin erhöht sich im Laufe der Kochung bei gleichzeitiger Abnahme dimerer Proanthocyanidine, was einerseits auf die Hopfung, vor allem aber auf weitere Dissoziationsvorgänge zurückzuführen ist. Die Konzentration an Epicatechin, das in erster Linie dem Hopfen entstammt, erreicht ihren Maximalwert zwischen Kochende und erstem Tag der Hauptgärung [MOLL et al. 1984, BELLMER et al. 1995b]. Insbesondere die Hopfung mit Dolden oder Pellets bringt große Mengen an Polyphenolen in die Würze ein. Verglichen mit der Nutzung von Reinharzextrakten erhöht sich auf diese Weise der Gehalt an Procyanidin B3 um 19%, an Catechin um 34% und an Epicatechin um 55%. Die Wahl des Hopfenprodukts übt also signifikanten Einfluss auf die Menge der Polyphenole in Ausschlagwürze und Bier aus [MOLL et al. 1984, PÜSPÖK 1985].

Während der Gärung werden Polyphenole, insbesondere das Catechin durch Adsorption an die Hefezellwände ausgeschieden, die dabei als unlösliche Proteine wirken. Das Absinken des pH-Wertes und der steigende Ethanolgehalt begünstigen dabei die Ausfällung [GRAMSHAW 1970a, GROMUS 1981, ANGER 1983, MOLL et al. 1974, MOLL et al. 1984, WACKERBAUER und ANGER 1984a]. Nach Schunke hingegen sei im Laufe der Hauptgärung nur eine sehr moderate Abnahme an Catechin und Procyanidin zu verzeichnen, während andere phenolische Substanzen gänzlich unverändert blieben [SCHUNKE 1992]. Nach der Ausfällung von Eiweiß-Gerbstoff-Komplexen und nahezu gleichen Reduktionsraten der monomeren und dimeren Flavan-3-ole durch die Kaltlagerung sind im fertigen Bier noch etwa 40% des Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 sowie 45-50% des Catechins und Epicatechins aus der Ausschlagwürze wiederzufinden [ANGER 1983, MOLL et al. 1984, WACKERBAUER und ANGER 1984a]. Schur empfiehlt eine kalte, ausreichende Lagerung

ohne Zusatz von Hefe- und Gelägebier sowie eine scharfe Filtration zur Senkung des Anthocyanogehaltes in Bier [SCHUR 1987]. Die effizienteste Möglichkeit zur Reduktion trübungsaktiver Polyphenole stellt der Einsatz gerbstoffseitiger Stabilisierungsmittel, insbesondere von PVPP, dar [SCHUR 1987, SIEBERT und LYNN 1997, BRIEM und GEIGER 1999]. Auch das frisch filtrierte und stabilisierte Bier enthält noch gewisse Mengen an einfachen Polyphenolen, polymerisierten Polyphenolen sowie geringe Anteile relativ kleiner Komplexe zwischen polymerisierten Polyphenolen und Proteinen, welche jedoch in Lösung bleiben, sofern das Bier nicht unterhalb der Filtrationstemperatur aufbewahrt wird [GRAMSHAW 1970a].

2.2.4 Ernährungsphysiologische Bedeutung

Polyphenole nehmen nicht nur großen Einfluss auf die Bierqualität, sie besitzen aufgrund ihrer vielfältigen gesundheitsfördernden Eigenschaften auch aus ernährungsphysiologischer Sicht einen hohen Stellenwert. So werden ihnen antioxidative, anticancerogene, antientzündliche, antimikrobielle, antithrombotische, antiallergische, immunmodulierende, blutdrucksteuernde und blutzuckerregulierende Effekte zugeschrieben [PIENDL und BIENDL 2000, TCHONE 2003, YAO et al. 2004, BIENDL 2007]. Diesbezüglich kommt speziell der Gruppe der Flavonoide besondere Bedeutung zu. Nach Yao et al. besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der täglichen Aufnahme an Antioxidantien und dem Gehalt der Nahrung an Flavonoiden [YAO et al. 2004]. Als Radikalfänger sind diese in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies abzufangen, die unter bestimmten Bedingungen zu oxidativem Stress im Organismus führen. Erkrankungen, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden können, sind Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen sowie Diabetes und altersbedingte Augenerkrankungen [ENGELHARDT 1999]. Antioxidantien verhindern beispielsweise die Oxidation des über die Nahrung aufgenommenen LDL-Cholesterins und hemmen damit die Entstehung von Kalkablagerungen an den Gefäßwänden (Arteriosklerose) [ENGELHARDT 1999, PIENDL und BIENDL 2000, YAO et al. 2004]. Vinson et al. wiesen im Tierversuch eine signifikante Verringerung der Entstehung von Arteriosklerose durch den Verzehr von Lagerbier selbst bei zehnfacher Verdünnung nach und schrieben diese Wirkung den Bierpolyphenolen zu [VINSON et al. 2003]. Epidemiologische Studien belegen ferner eine geringere Anzahl tödlich verlaufender Herzinfarkte bei höherer Flavonolaufnahme [GERHÄUSER 2001]. Polyphenole sind zudem in der Lage, die Krebsentstehung zu beeinflussen – sie zählen zu den Naturstoffen aus Nahrungs- und Genussmitteln, die im Rahmen der Chemoprävention

als „Krebs-Bremse“ eingesetzt werden. Auf allen Stufen der Krebsentwicklung (Initiation, Promotion und Progression) können sie den Körper dabei unterstützen, den Prozess zu verlangsamen oder anzuhalten. Als Antipromotoren schützen sie die DNS vor dem radikalischen Angriff reaktiven Sauerstoffs, induzieren bestimmte Enzyme, die vor Zellentartung schützen, fördern die normale Zellteilung und –reifung und hemmen das Wachstum von Krebszellen [PIENDL und BIENDL 2000, BECKER und ALT 2001]. Die antioxidative Aktivität der Polyphenole wächst mit zunehmender Zahl an OH-Gruppen sowie fortschreitender Polymerisierung und verringert sich bei höherem Grad an glucosidischer Verknüpfung [LARRAURI et al. 1999, YAO et al. 2004].

Die quantitative Bestimmung der Bierpolyphenole stellt heute kein Problem mehr dar, doch über die Wirkungsweise und vor allem über die Bioverfügbarkeit einzelner Substanzen ist generell noch relativ wenig bekannt [WALKER 2001]. Nach Manach et al. scheinen Isoflavone und Gallussäure vom Menschen am besten resorbiert werden zu können, gefolgt von Catechinen, Flavanonen und Quercetin-Glucosiden. Proanthocyanidine und Anthocyanine seien dagegen nur von begrenzter Bioverfügbarkeit. Ferner scheinen Aglycone besser resorbiert werden zu können als glucosidisch verknüpfte Polyphenole [MANACH et al. 2004, MANACH et al. 2005]. Die Angaben zur Wirkungsweise beziehen sich in der Literatur im Allgemeinen auf die Ergebnisse von Versuchsdurchführungen *in vitro*, woraus noch keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Wirkung *in vivo*, im menschlichen Organismus, gezogen werden können. Tabelle 3 gibt in Anlehnung an Piendl sowie Biendl und Pinzl einen Überblick über die Konzentrationen und Wirkungsweisen (*in vitro*) einiger im Bier vorhandener Polyphenole. Als besonders vielversprechend erweisen sich dabei die aus dem Hopfen eingebrachten Polyphenole. Insbesondere das Prenylflavonoid Xanthohumol weist ein sehr breites Spektrum positiver Wirkungspotenziale auf, dessen Krebs- und Diabetes-hemmende Wirkung mittlerweile auch im Tierversuch bestätigt wurde [BIENDL und PINZL 2007]. Speziell angereicherte Hopfenextrakte (beispielsweise mit hohen Konzentrationen an Prenylflavonoiden), die aus den bei der Ethanolextraktion gewonnenen Fraktionen gewonnen werden, könnten zukünftig als innovative Bestandteile funktioneller Lebensmittel fungieren, so Biendl [BIENDL 2007].

Tabelle 3: Konzentration und Wirkungsweise ausgewählter Polyphenole [PIENDL 2000, BIENDL und PINZL 2007]

Substanz	Konzentration in Bier [mg/l]	Wirkung
Catechin	0,5-20,0	Unterstützung der Herz-Kreislauf-Funktion, antioxidativ, gefäßerweiternd
Epicatechin	0,8-20,0	kapillarstärkend
Quercetin	0,7-20,0	kapillarstärkend, blutdruckregulierend, stark antioxidativ, krebspräventiv
Rutin ¹	< 1,0	kapillarstärkend, blutdruckregulierend, blutstillend
Kämpferol	0,6-2,0	antioxidativ, diuretisch
Myricetin	5,0-20,0	diuretisch
Ferulasäure	1,1-10,8	günstige Beeinflussung der Gallentätigkeit
Kaffeensäure	0,1-1,0	starke choleretische Aktivität, Anregung der Darmbewegung und der Salzsäureabsonderung des Magens
Astragalin ¹	< 1,0	---
Co-Multifidol-glucosid ¹	< 0,3	entzündungshemmend
Xanthohumol ¹	< 1,2	antibakteriell, antiviral, entzündungshemmend, antioxidativ, gegen Malaria-Erreger, gegen krankheitserregende Pilze, gegen Arteriosklerose, gegen Diabetes, gegen Osteoporose, stark Krebschemopräventiv
Isoxanthohumol ¹	< 3,4	Krebs-chemopräventiv, gegen Abnahme der Knochendichte
6-Prenylnaringenin ¹	< 0,6	antibakteriell, gegen krankheitserregende Pilze, krebshemmend
8-Prenylnaringenin ¹	< 0,2	hohe Östrogenaktivität, Osteoporose-inhibierend, krebshemmend

1) ausschließlich aus dem Hopfen stammende Polyphenole

Bedauerlicher Weise liegen die Hopfenpolyphenole im fertigen Bier nur in sehr geringen Konzentrationen vor, was einen merklichen Effekt auf den menschlichen Organismus eher unwahrscheinlich erscheinen lässt. Zudem können speziell in Medien, die ein breites Spekt-

rum an Polyphenolen und anderen ernährungsphysiologisch wirksamen Substanzen aufweisen (z.B. Bier) auch synergistische oder antagonistische Effekte auftreten [LARRAURI et al. 1999, MARTINEZ und SANCHEZ 2004]. Es ist daher nahezu unmöglich, Rückschlüsse von der Konzentration (oder dem bloßen Vorhandensein) einzelner Komponenten in komplexen Medien auf deren tatsächlichen ernährungsphysiologischen Nutzen zu ziehen. Es besteht jedoch kein Zweifel daran, dass gerade die Vielfalt der eingebrachten Malz- und Hopfenpolyphenole einen wesentlichen Beitrag zur Steigerung der ernährungsphysiologischen Bedeutung des Produktes Bier leistet.

2.3 Proteine in Bier

Pflanzliche Proteine sind aus etwa 20 verschiedenen, mittels Peptidbindung verknüpften Aminosäuren aufgebaut und besitzen Molekulargewichte von 10.000 bis zu mehreren Millionen. Aufgrund ihrer Größe besitzen sie kolloidale Eigenschaften, diffundieren nicht durch Membranen und sind sowohl quellbar als auch entquellbar. Am jeweiligen isoelektrischen Punkt (IP) weisen die verschiedenen Proteinfractionen ihre geringste Löslichkeit auf, was vor allem in Bezug auf die Ausbildung kolloidaler Trübungen und die Wirksamkeit von Stabilisierungsmaßnahmen von Bedeutung ist. Die Eiweißstoffe in Würze und Bier wirken als Puffer- und Farbsubstanzen, dienen der Hefeernährung und beeinflussen Vollmundigkeit, Schaum sowie die chemisch physikalische Stabilität. Die Menge und Zusammensetzung des in die Würze eingebrachten Eiweißes ist, abgesehen vom ursprünglich in der Gerste vorhandenen Stickstoff, vor allem von den proteolytischen Vorgängen während des Mälzens abhängig [NARZISS 1992].

2.3.1 Proteinspektrum

Nach älterer Nomenklatur lassen sich die Proteine der Gerste in vier Fraktionen einteilen (Osborne-Fraktionierung): Die *Albumine* sind in Wasser und verdünnten Salzlösungen löslich und besitzen einen IP zwischen 4,6 und 5,8 (je nach Untergruppe). *Globuline* lösen sich in verdünnten Salzlösungen, koagulieren ab 90 °C, liegen im Molekulargewichtsbereich von 26.000-300.000 und weisen einen IP zwischen 4,9 und 5,7 auf. Die *Prolamine*, in der Gerste auch „*Hordeine*“ genannt, sind nur in 50-90%igem Ethanol löslich und besitzen hohe Anteile an den Aminosäuren Prolin und Glutaminsäure. Die hydrophoben *Gluteline* schließlich lassen sich ausschließlich in Alkalien lösen. Ferner beinhaltet die Gerste auch eine Reihe

von Glycoproteiden, also Proteinen, die kovalent an eine Kohlenhydratgruppe gebunden sind. Diese haben ein Molekulargewicht von etwa 10.000. Während der proteolytischen Vorgänge bei der Mälzung verändern sich die erwähnten Fraktionen in unterschiedlichem Ausmaß, wobei die Prolamine und Gluteline den intensivsten Abbau erfahren. Gleichzeitig bilden sich lösliche Abbauprodukte, die aus einem Gemisch aus Peptiden unterschiedlichen Molekulargewichts bestehen. Sie lassen sich einteilen in Oligopeptide (bis zu 10 Aminosäuren), Polypeptide (10-100 Aminosäuren) und Makropeptide (mehr als 100 Aminosäuren). Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Veränderungen der Proteinfractionen beim Mälzen. Der Rohproteingehalt von Braugerste liegt durchschnittlich bei etwa 9,0-11,5%, der von Malz ca. 0,1-0,5% niedriger [NARZISS 1992, NARZISS 1999].

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der Osborne-Fractionen in Gerste und Malz [NARZISS 1999]

Proteinfraction	Gerste	Malz
Albumine	12	10
Globuline	10	11
Prolamine	37	17
Gluteline	30	21
Abbauprodukte	12	41

Tabelle 5: Prozentuale Verteilung der Lundin-Fractionen in Pfannevollwürze und Ausschlagwürze aus 100% Malz [NARZISS und RÖTTGER 1974, NARZISS 1992]

Stickstoff	Pfannevollwürze	Ausschlagwürze
Hochmolekular	27	22
davon koagulierbar	7	2
Mittelmolekular	20	14
Niedermolekular	60	64
davon Formolstickstoff	33	35
davon freier Aminostickstoff	22	22

Die ursprünglich klar voneinander trennbaren Osborne-Fractionen erfahren während des Maischens und Würzekochens einen weiteren Abbau und verändern sich in einer Art und Weise, die eine Einteilung nach klassischem Muster deutlich erschwert [PAPP 2000]. Zur Fraktionierung des löslichen Stickstoffs in Würze nach Abtrennung der unlöslichen Malzbestandteile wird deshalb bevorzugt die Bestimmung nach Lundin durchgeführt (siehe Tabelle 5).

Nach der Denaturierung und Koagulation der Proteine bei der Kochung und nach der Entfernung des Heisstrubes bewirkt die Gärung eine Verschiebung des pH-Wertes in Richtung des IP der überwiegend sauren Bierproteine, welche dort leicht zur Ausfällung gelangen [PAPP 2000]. Ausflockungen und Sedimentation bei kalter Lagerung resultieren in einer weiteren Verringerung des Proteingehalts [ANGER 1995]. Im fertigen Bier (12% Stammwürze) sind letztlich noch ca. 700-800 mg/l Gesamtstickstoff (nach Kjeldahl), etwa 130-180 mg/l Magnesiumsulfat-fällbarer Stickstoff (hochmolekularer Anteil), ca. 15-25 mg/l koagulierbarer Stickstoff, 120-150 mg/l mittelmolekularer und 420-520 mg/l niedermolekularer Stickstoff nachweisbar [MEBAK 2000]. Tabelle 6 zeigt ergänzend die im Bier detektierbaren Proteinfractionen, gegliedert nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht. Es ist generell zu beachten, dass höhere Eiweißgehalte im Malz zu einer Zunahme aller Fractionen in Bier führen, wodurch der Malzqualität die Schlüsselrolle bezüglich der Eiweißzusammensetzung der Biere zukommt [NARZISS und RÖTTGER 1974, SCHILDBACH 1977].

Tabelle 6: Prozentuale Verteilung der im Bier detektierbaren Molekulargewichts-Fractionen [MUSSCHE 1997].

Molekulargewicht	Prozentuale Verteilung
> 75.000	2
35.000-75.000	8
13.000-35.000	7,5
10.000-13.000	22,5
< 10.000	60

2.3.2 Trübungsrelevante und schaumpositive Proteine

Proteine sind wesentliche Komponenten sowohl kolloidaler Trübungen als auch des Bierschaums, und eine Reduktion der Eiweißkomponente zur Verbesserung der chemisch-physikalischen Stabilität sollte nicht auf Kosten der Schaumhaltbarkeit erfolgen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, die Bierproteine nicht nur in Bezug auf ihre Trübungsrelevanz, sondern auch hinsichtlich ihrer schaumpositiven Eigenschaften zu betrachten.

Laut Mussche sind vor allem Proteine in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 35.000 und 75.000 (Korrelationskoeffizient 0,93) und über 75.000 (Koeffizient 0,95) für die Trübungsbildung verantwortlich. Als besonders schaumpositiv gelten Proteine zwischen 10.000 und 13.000 [MUSSCHE 1997, MUSSCHE und DE PAUW 1999, LEIPER et al. 2003b]. Narziss bezeichnet die Proteine zwischen 10.000 und 60.000 als schaumförderlich und über 60.000 (Koeffizient 0,92) als trübungsaktiv [NARZISS und RÖTTGER 1974, NARZISS 1992]. Nach Angabe anderer Autoren seien hingegen hauptsächlich Proteine bis 40.000 an der Trübungsbildung beteiligt [ASANO et al. 1982, MARSHALL und WILLIAMS 1987, O'REILLY 1994, PAPP 2000, LEIPER et al. 2003a, LEIPER et al 2003b, LEIPER et al. 2005]. In jüngerer Vergangenheit wiesen immunologische Nachweismethoden auf die Trübungsrelevanz einer Malzfraktion im Bereich von 12.000 hin [EVANS et al. 2003, ROBINSON et al. 2007]. Weit verbreitet ist auch die Auffassung, dass eine klare Zuordnung einzelner Gersten-Fraktionen zur Trübungs- und Schaumbildung nicht möglich sei. Es korreliere einzig die Aminosäurezusammensetzung des gesamten Gerstenproteins, nicht aber einzelner Fraktionen mit der Zusammensetzung isolierter Biertrübungen [DJURTOFT 1965, CURTIS 1966, GRAMSHAW 1970a, WAINWRIGHT 1974, DADIC und BELLEAU 1980]. Die abweichenden Angaben unterschiedlicher Autoren bezüglich der Trübungsrelevanz seien, so Papp, auch auf die Unterschiede bei der Herbeiführung der untersuchten Trübungen zurückzuführen. So unterscheidet sich das Wesen einer durch eine Temperatur von 60 °C forcierten Trübung wesentlich von einer 40 °C-Trübung sowie von natürlich entstandenen Trübungen [PAPP 2000].

Neben der Differenzierung nach dem Molekulargewicht hat sich auch die Einteilung der Bierproteine nach dem IP als wenig aussagekräftig bezüglich der Korrelationssuche erwiesen [PAPP 2000]. Generell lässt sich lediglich konstatieren, dass trübungsrelevante Proteine offenbar überwiegend im sauren Bereich ($IP < 6,5$) liegen, schaumpositive dagegen eher oberhalb dieses Wertes zu finden sind [WAINWRIGHT 1974, MUSSCHE 1997, MUSSCHE und DE PAUW 1999, KUSCHE 2005].

Dennoch scheinen die Substanzen, die für das jeweilige Qualitätsmerkmal des Bieres verantwortlich sind, prinzipiell unterschiedlicher Natur zu sein – so seien Trübungsproteine im Allgemeinen hydrophil, Schaumproteine hingegen hydrophob [GUZMAN et al. 1999, APPERSON et al. 2002]. Ferner entstamme das schaumpositive Protein in erster Linie dem Gersten-Albumin, das trübungsaktive Eiweiß dagegen eher dem Hordein [SCHILDBACH 1977, ASANO et al. 1982, ESNAULT 1995, SIEBERT et al. 1996a, SIEBERT et al. 1996b, SIEBERT und LYNN 1997, SIEBERT 2006]. Die Tatsache, dass mehrere Gewichtsfractionen an der Trübungsbildung beteiligt sind, könne möglicherweise damit erklärt werden, dass mehrere unterschiedliche Untergruppen der Hordeine involviert sind oder dass eine oder mehrere dieser Untergruppen während des Maischens teilweise abgebaut werden [SIEBERT 1999b]. Nach Bamforth ist jedoch keine klare Differenzierung zwischen trübungssensitiven und schaumfördernden Proteinen möglich. Auch Peptide aus den Fraktionen der Albumine und Globuline seien an der Trübungsbildung beteiligt, jedoch zeitlich gesehen erst nach den Hordein-Proteinen [ASANO et al. 1982, BAMFORTH 1999]. Dies entspricht der bereits einige Jahre zuvor von Gramshaw aufgestellten Theorie, der aber die wichtige Rolle der Hordeine stärker betonte. Diese bilden, so Gramshaw, bereits in einem früheren Stadium der Trübungsbildung unlösliche Komplexe zusammen mit niedrig polymerisierten Polyphenolen [GRAMSHAW 1970a]. Narziss und Röttger sind der Ansicht, dass nicht nur Hordein, sondern Abbauprodukte aller in der Gerste vorkommenden Eiweißarten zu Trübungen beitragen können [NARZISS und RÖTTGER 1973]. Parallel zur Trübungsbildung verschlechtere sich auch die Schaumbildung der Biere, was ein weiterer Beleg dafür sei, dass es auch schaumpositive Trübungspartikel gebe, so Bamforth. Zudem hätten immunologische Nachweismethoden gezeigt, dass Antikörper gegen Trübungsprotein nicht nur mit Trübungs- sondern auch mit Schaumprotein reagieren, wohingegen die Antikörper gegen Schaumprotein ausschließlich auf schaumbildende Peptide ansprechen [BAMFORTH 1999].

Es herrscht allgemein Einigkeit darüber, dass vor allem Proteine an der Trübungsbildung beteiligt sind, die einen hohen Gehalt an der hydrophoben Aminosäure Prolin aufweisen [ASANO et al. 1982, OUTTRUP et al. 1987, OUTTRUP 1989, MURRAY et al. 1994, SIEBERT und LYNN 1997, BAMFORTH 1999, CHARLTON et al. 2002, SIEBERT 2006]. In Modelllösungen, die das trübungsrelevante Flavan-3-ol Catechin enthielten, entwickelte sich bei der Zugabe von synthetischen Polypeptiden eine Trübung, die in linearem Zusammenhang mit deren prozentualem Prolingehalt stand. Enthielten die Polypeptide dagegen kein Prolin, fand keine Trübungsbildung statt [ASANO et al. 1982, SIEBERT 1999b, YANG und SIEBERT 2001, SIEBERT 2006]. Dies stützt die These, dass trübungsaktive Proteine zu großen Teilen

aus dem Gersten-Hordein ins Bier gelangen, also aus der Fraktion, die hohe Anteile an den Aminosäuren Prolin und Glutaminsäure enthält. Die Affinität prolinreicher Peptide steigt mit wachsender Molekülgröße, wobei offene, lockere Strukturen eher trübungsförderlich sind als zusammengefaltete globuläre Moleküle [LUCK et al. 1994, YANG und SIEBERT 2001]. Prolin fördert dabei die Auffaltung der Proteine, so dass diese in der Regel eine stabförmige, β -Faltblatt-reiche Struktur aufweisen, welche den Zugang und die Bindung zu den Polyphenolen erleichtert. Von Bedeutung ist zudem auch die Aminosäuresequenz im Protein [ASANO et al. 1982, YANG und SIEBERT 2001, SIEBERT 2006]. In den meisten prolinreichen Peptiden wiederholt sich eine prolinreiche Sequenz aus mehreren Aminosäuren einige Male, wobei die Affinität zu den Polyphenolen mit der Zahl der Wiederholungen ansteigt [SIEBERT und LYNN 1997, YANG und SIEBERT 2001]. Aminosäuren, die in freier Form im Bier vorkommen, so auch freies Prolin, haben hingegen keinen Effekt auf die Trübungsbildung [WAINWRIGHT 1974, PAPP 2000].

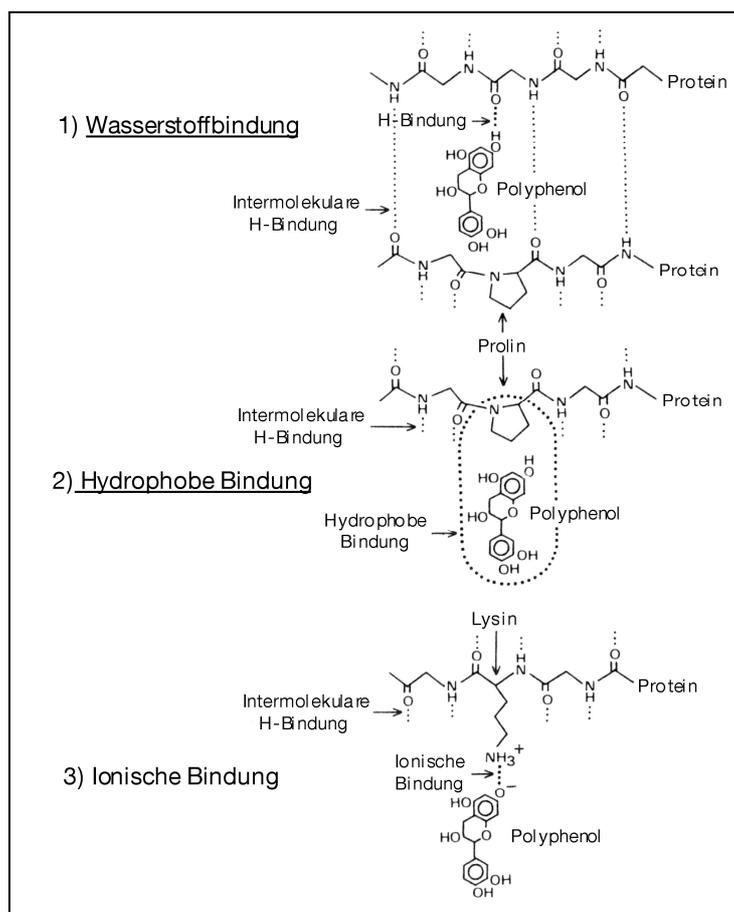


Abbildung 9: Bindungsarten zwischen Proteinen und Polyphenolen [ASANO et al. 1982]

Das Zusammenspiel zwischen trübungsrelevanten Proteinen und Polyphenolen (vgl. Abbildung 9) beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen, vor allem aber auf hydrophoben Bindungen zwischen hydrophoben Aminosäuren (insbesondere Prolin) und der hydrophoben Ringstruktur der Polyphenole. Prinzipiell können auch ionische Bindungen zwischen negativ geladenen OH-Gruppen der Polyphenole und positiv geladenen Gruppen der Proteine (z. B. mit der endständigen Aminogruppe von Lysin) auftreten. Aufgrund des sauren Milieus in Bier spielt diese Bindungsart jedoch keine Rolle in Bezug auf die Trübungsbildung [ASANO et al. 1982, YANG und SIEBERT 2001].

Preaux et al. wiesen in Kältetrübungen, die aus Bieren unterschiedlichen Ursprungs isoliert wurden, nicht nur einen unverhältnismäßig hohen Anteil an Prolin, sondern auch erhöhte Konzentrationen an Glutaminsäure nach [PREAUX et al. 1969]. Dies konnte jedoch weder von Papp noch von Kusche bestätigt werden [PAPP 2000, KUSCHE 2005]. Eine Untersuchung der Aminosäuresequenz prolinreicher Peptide (vgl. Abbildung 10) verdeutlicht das häufige Vorkommen von Glutamin(säure) in unmittelbarer Nähe des Prolins [SIEBERT 2006]. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine Beteiligung von Glutaminsäure an der Trübungsbildung, sofern vorhanden, eher passiver Natur ist.

```
Q Q Q P F P Q Q P I P Q Q P Q P Y
P Q Q P Q P Y P Q Q P F P P Q Q P
F P Q Q P V P Q Q P Q P Y P Q Q P
F P P Q Q P F P Q Q P P F W Q Q K
P F P Q Q P P F G L Q Q P I L S Q Q
Q P C T P Q Q T P L - P Q -
```

Abbildung 10: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz von Hordein (P = Prolin, Q = Glutamin)
[SIEBERT 2006]

In Modellversuchen konnte gezeigt werden, dass nur 2 mg/l trübungsaktives Protein nötig sind, um zusammen mit einer Mischung aus Gerbstoffen eine Trübung von 1 EBC zu erzeugen [CHAPON 1994, BAMFORTH 1999]. Da Bier sehr hohe Proteinkonzentrationen enthält, lässt sich daher schlussfolgern, dass nur ein äußerst geringer Teil dieser Proteine tatsächlich trübungsaktiv ist [CHAPON 1994]. Nach Leiper et al. machen die sensitiven Proteine, die

in hohem Maße glycosidisch verknüpft sind, etwa 3-7% des Gesamtproteins aus. Auch die Schaumproteine seien glycosidisch verknüpft, enthielten aber nur geringe Konzentrationen an Prolin [LEIPER et al. 2003a, LEIPER et al. 2003b, LEIPER et al. 2005].

2.4 Sekundäre Trübungsbildner und Einflussfaktoren

Neben Polyphenolen und Proteinen, die zweifellos die Haupttrübungsbildner darstellen, können mitunter auch Kohlenhydrate und anorganische Bestandteile in Trübungen nachgewiesen werden. Ihr Anteil ist jedoch vergleichsweise gering (siehe Kapitel 2.1.3). Ferner gibt es sowohl interne als auch externe Faktoren, welche den Umfang und die Geschwindigkeit der Trübungsbildung beeinflussen.

2.4.1 Kohlenhydrate und anorganische Bestandteile

Bei der Ausbildung kolloidaler Trübungen kann es zu Assoziationen zwischen Protein-Polyphenol-Komplexen (oder noch ungebundenen Proteinen und Polyphenolen) und Oligosacchariden bzw. hochmolekularen Polysacchariden kommen [LETTERS 1969, WAINWRIGHT 1974, DADIC und BELLEAU 1980]. Dies dürfte vor allem auf die Eigenschaft der aus der Stärke stammenden Polysaccharide zurückzuführen sein, weitverzweigte Ringstrukturen (Cyclodextrine) auszubilden, in deren Innerem es zu Einschlüssen anderer organischer Bestandteile kommen kann [LETTERS 1969]. Speers et al. wiesen nach der Zudosierung von β -Glucanen erhöhte Trübungswerte im Bier nach, die zwar messtechnisch, nicht jedoch visuell erfassbar waren. Die Intensität der Trübungsbildung steige mit höherer Konzentration und höherem Molekulargewicht des β -Glucans [SPEERS et al. 2003, HARTMANN 2006]. Nach Letters spielen die im Bier vorhandenen α -Glucane jedoch eine gewichtigere Rolle bei der Ausbildung kolloidaler Trübungen als die β -Glucane [LETTERS 1969]. Erhöhte Glucan-Gehalte im Bier sind in der Regel auf die Verwendung von schlecht gelöstem Malz oder auf eine unzureichende Maischarbeit zurückzuführen [ANGER 1995]. Es wird aber auch von α -Glucanen berichtet, welche in Abhängigkeit von Hefestamm, physiologischem Zustand der Hefe, Gärtemperatur und Würzekonzentration durch die Hefe ausgeschieden werden. Diese Glycogen-Trübungen sind, ähnlich wie die oben beschriebenen β -Glucan-Trübungen, meist nur messtechnisch erfassbar und können außerdem weder durch die Filtration noch durch Stabilisierungsmaßnahmen eliminiert werden [MALCORPS et al. 2001, KREISZ 2003].

In Hydrolysaten abzentrifugierter Trübungen sind verschiedene Monosaccharide nachweisbar, wobei Glucose, Arabinose und Xylose den Hauptanteil ausmachen [GRAMSHAW 1970a, DADIC und BELLEAU 1980]. Diese können grundsätzlich sowohl aus Dextrinen, aus den Gummistoffen der Gerste als auch aus Glycoproteinen stammen. Pentosane neigen offenbar dazu, lösliche Komplexe mit Polyphenolen zu bilden, was laut Gramshaw der kolloidalen Stabilität zugute kommt, da auf diese Weise trübungsrelevante Polyphenole vor der Bildung unlöslicher Assoziate zusammen mit Proteinen und Polysacchariden bewahrt werden. Auch Luck et al. berichten über das Phänomen der Inhibierung von Polyphenol-Protein-Komplexen durch Polysaccharide [GRAMSHAW 1970a, GRAMSHAW 1970b, LUCK et al. 1994].

Generell scheint die Beteiligung der Kohlenhydrate an der Trübungsbildung eher passiver Natur zu sein, was vor allem damit begründet wird, dass keine kohlenhydratseitige Stabilisierung nötig sei, um die kolloidale Bierstabilität zu verbessern [SIEBERT 1999, SIEBERT 2004].

Nach Gramshaw können die anorganischen Bestandteile kolloidaler Trübungen in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe, bestehend aus Calcium, Magnesium und Mangan, macht in Kältetrübungen einen größeren Anteil aus als in Dauertrübungen. Ihre Konzentration in der Kältetrübung ist bis zu 400-fach höher als der im Bier verbleibende Teil [GRAMSHAW 1970a]. Calcium fällt dabei wohl größtenteils als Calciumoxalat aus und fungiert als Induktionskern bei der Bildung größerer Trübungspartikel [GRAMSHAW 1970a, WAINWRIGHT 1974, DADIC 1976]. Die zweite Gruppe (Aluminium, Kupfer, Eisen, Nickel, Zinn, Blei) tritt in größerem Ausmaß in Dauertrübungen auf, wobei ihre Konzentration bis zu 80.000mal höher als im verbleibenden Bier sein kann. Die Metalle der zweiten Gruppe bilden Chelate mit Amino-, Carboxy-, Sulphydryl- und phenolischen Hydroxy-Gruppen und treten wohl vor allem aufgrund dieser Fähigkeit in Trübungen auf [GRAMSHAW 1970a, ANGER 1995].

Eisen und Kupfer sind, bedingt durch ihre oxidationskatalytische Wirkung, zusätzlich auch aktiv an der Trübungsbildung beteiligt [CHAPON 1965, CURTIS 1966, MCFARLANE 1968, GRAMSHAW 1970a, WAINWRIGHT 1974, De GAULEJAC 2001]. Dabei ist im frisch abgefüllten Bier ausschließlich das freie ionische Kupfer katalytisch aktiv, welches zunächst nur einen geringen Teil ausmacht. Mit zunehmender Oxidation der Sulphydryl-Gruppen und gleichzeitiger Lösung des gebundenen Kupfers im Laufe der Bieralterung steige dessen Aktivität jedoch. Beim Eisen verhalte es sich genau umgekehrt – so wie das komplexierte

Eisen eine größere katalytische Aktivität auf als sein ungebundenes Pendant [CHAPON 1965, CURTIS 1966, MCFARLANE 1968].

2.4.2 Einflussfaktoren auf die kolloidale Stabilität

Seit längerem ist bekannt, dass pH-Wert und Alkoholgehalt des Bieres einen Einfluss auf die Intensität der Trübungsbildung ausüben [CURTIS 1966, GRAMSHAW 1970b, SIEBERT 1999a, SPEERS et al. 2003, SIEBERT 2006]. Nach Gramshaw setzen höhere Ethanolgehalte, bedingt durch die dehydratisierende Wirkung auf die Proteine, die Kältestabilität der Biere herab. Die Ausbildung von Dauertrübungen werde hingegen eher inhibiert, da höhere Ethanolgehalte die Löslichkeit der Protein-Polyphenolkomplexe verbessern. Niedrige pH-Werte fördern die säurekatalysierte Polymerisierung der Polyphenole und damit auch die Ausbildung kolloidaler Trübungen. Die Auswirkungen unterschiedlicher pH-Werte und Ethanolgehalte kämen jedoch bereits bei der Gärung, Reifung und Lagerung zum Tragen, was letztlich durchaus in einer verbesserten (Kälte-)stabilität der Biere resultieren könne, so Gramshaw [GRAMSHAW 1970b].

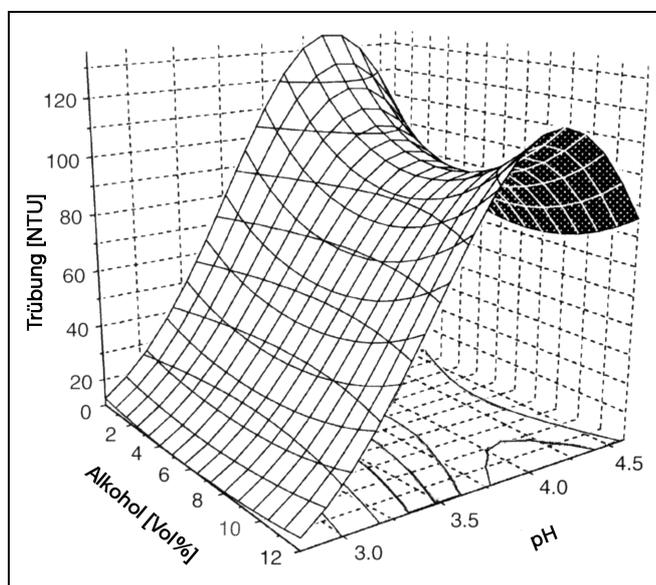


Abbildung 11: Die Auswirkungen von Alkohol und pH auf die Trübungsbildung [SIEBERT 2006]

Siebert wies anhand gepufferter Modelltrübungssuspensionen, bestehend aus 275 mg/l Gliadin und 55 mg/l Tanninsäure (entsprechend dem Verhältnis von 5:1, was eine maximale

Trübungsbildung induziert), den Einfluss von Alkohol und pH nach (vgl. Abbildung 11). Ein Maximum an Trübungsbildung resultiere demnach aus pH-Werten zwischen 4,0 und 4,5. Der exakte Wert sei abhängig von der vorliegenden Ethanol-Konzentration – bei 6,0 Vol% sei die Trübungsbildung minimal, oberhalb (bis 12,0 Vol%) und unterhalb (bis 0 Vol%) dieses Wertes steige sie kontinuierlich an [SIEBERT et al. 1996a, SIEBERT 1999a, SIEBERT 1999b, SIEBERT und LYNN 2003, SIEBERT 2004, SIEBERT 2006].

Den größten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Trübungsbildung nimmt der Sauerstoffgehalt des abgefüllten Bieres, da dieser zur „Aktivierung“ bzw. zur oxidativen Polymerisierung der Polyphenole führt, wodurch sich deren Gerbkraft erhöht. Biere mit erhöhten Sauerstoffgehalten weisen dadurch bereits nach wesentlich kürzerer Zeit eine wahrnehmbare Trübung auf als sauerstoffarme Biere [CURTIS 1963, GRAMSHAW 1967, DREW 1981, BELLMER 1977, KRETSCHMER 1982, ANGER 1983, MCMURROUGH und HENNIGAN 1984, ANGER 1995, STEWART 2004]. Kusche wies nach Zugabe von aktivem Sauerstoff in Form von H_2O_2 zum Bier bereits nach einer Woche eine Trübungszunahme nach, die umso größer ausfiel, je höher die Lagertemperatur war [KUSCHE 2005]. Als Intermediärprodukt sowohl enzymatischer als auch nicht enzymatischer Oxidation der Polyphenole entsteht das hochreaktive ortho-Chinon, welches intramolekulare Kondensationsreaktionen, aber auch Bindungen zu Proteinen und Polysacchariden eingehen kann [MCFARLANE 1968, DADIC und VAN GHELUWE 1971, HASLAM 1995, ROBARDS et al. 1999, DE GAUJELAC et al. 2001]. In diesem Zusammenhang sei nochmals darauf hingewiesen, dass die Bierpolyphenole im Laufe der Zeit selbst bei (theoretischer) Abwesenheit von Sauerstoff einer säurekatalysierten Polymerisation unterworfen sind (siehe Kapitel 2.2.2).

Auch äußere Faktoren beeinflussen die kolloidale Haltbarkeit der Biere. So fördern vor allem höhere Temperaturen die Trübungsbildung, sei es durch Hitzebehandlung oder durch höhere Lagertemperaturen des abgefüllten Bieres [SCHUR 1979, STEWART 2004, KUSCHE und GEIGER 2007]. Auch der Einfall von Sonnenlicht bzw. dem Licht bestimmter Beleuchtungskörper sowie mechanische Beanspruchungen z.B. beim Transport forcieren die Trübungsbildung. Die optimale Aufbewahrung des abgefüllten Bieres erfolgt nach Pfenninger im Dunkeln bei einer Temperatur von 8-10 °C. [BELLMER 1977, SCHUR 1979, SCHUR 1980b, PFENNINGER 1987, STEWART 2004].

2.5 Verbesserung der kolloidalen Stabilität

Die Möglichkeit zur Einflussnahme auf die kolloidale Stabilität besteht nicht erst im Filterkeller mit der Wahl des Filter(hilfs)mittels und dem Einsatz künstlicher Stabilisierungsmittel. Mindestens ebenso wichtig ist die Auswahl geeigneter Rohstoffe, z. B. Polyphenol- und/oder eiweißarmer Malze, die Wahl des Hopfens (Sorte, Art, Aufbereitung), aber auch die Qualität des Brauwassers. Ferner kann die chemisch-physikalische Bierstabilität auch auf prozesstechnischem Wege beeinflusst werden, sei es im Sudhaus oder auf dem Bierweg. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass sich die Auswahl der Rohstoffe sowie prozesstechnische Variationen in der Regel anderen Sachzwängen oder Qualitätsanforderungen unterzuordnen haben, um die hohe Qualität des Produktes Bier zu gewährleisten.

2.5.1 Auswahl der Rohstoffe

Der Gehalt phenolischer Bierinhaltsstoffe korreliert signifikant mit dem von Gerste und Malz [ANGER 1983]. Die Verwendung spezieller proanthocyanidinfreier Gerstenzüchtungen, von der erstmals im Jahre 1976 berichtet wurde, ist daher aus Sicht einer verbesserten kolloidalen Haltbarkeit durchaus Erfolg versprechend. Erdal berichtet in diesem Zusammenhang über den Vergleich eines Bieres aus proanthocyanidinfreier Gerste mit einem aus konventioneller Gerste hergestellten Bier. Die kolloidale Stabilität des „proanthocyanidinfreien“ unstabilierten Bieres liege demnach in signifikant höheren Bereichen als die stabilisierte Vergleichsprobe, einhergehend mit den geringeren Gehalten dimerer Trübungsbildner. Zudem wirke sich die Verwendung dieser Gerstenzüchtung (Sorte „Galant“, Carlsberg Institut Kopenhagen) in keiner Weise nachteilig auf Geschmack und Geschmacksstabilität des Bieres aus [ERDAL 1986]. Heyse hingegen widerspricht dieser Darstellung, basierend auf Untersuchungen von Pfenninger und Schur, die in großtechnischen Versuchen zwar die verbesserte kolloidale Haltbarkeit bestätigten, jedoch eine signifikante Verschlechterung des Biergeschmacks (leichter, leerer im Nachtrunk) feststellten. Weitere Nachteile der Verwendung von „Galant“ seien geringere Sudhausausbeuten und Endvergärungsgrade, höhere Konzentrationen an Gesamtstickstoff, dunklere Würze- und Bierfarben, der stark erhöhte Anteil an β -Glucanen, der zu einer Verlangsamung des Abläuterns sowie zu einer Verschlechterung der Filtrierbarkeit um bis zu 77% führe, größere Bitterstoffverluste und eine Verminderung des Reduktionsvermögens. Die Verwendung proanthocyanidinfreier Gerste in der Praxis sei daher sowohl aus technologischer als auch aus wirtschaftlicher Sicht eher kritisch zu beurteilen [HEYSE 1986, SCHUR 1987]. Auch neuere Züchtungen, z.B. die proanthocyanidinfreie

Gerste Mokkei 92-130 (Forschungslabor Sapporo Breweries), brachten offenbar keine wesentlichen Verbesserungen mit sich, obgleich die Autoren neben der besseren kolloidalen Stabilität auch verbesserte sensorische Eigenschaften, höhere Endvergärungsgrade und eine intensivere cytolytische Malzlösung propagieren [FUKUDA et al. 1999].

Grundsätzlich wird im Sinne einer besseren eiweißseitigen Haltbarkeit die Verwendung von proteinarmen Gersten bzw. Malzen empfohlen [SCHILDBACH 1977, PFENNINGER 1987, O'Rourke 1994, NARZISS 1994, REHMANJI et al. 1998]. Nach Narziss induziere beispielsweise ein Malz mit einem Eiweißgehalt von 11,0% eine dreimal höhere Kälte-trübung als ein Malz mit 9,4% Proteinanteil [NARZISS 1994]. Mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung von Antikörpern gegen Kieselgel-Adsorbat konnte eine Malzproteinfraktion im Molekulargewichtsbereich von 12.000 identifiziert werden, die offenbar in engem Zusammenhang mit der Trübungsbildung steht. So zeigten Malze, die diese spezielle Fraktion nicht enthielten, trotz mitunter höheren Gehaltes an Gesamtprotein, eine deutlich bessere Kältestabilität nach Durchführung einer forcierten Alterung. Die gezielte Selektion dieser Malze (bzw. Gersten) stelle daher eine Möglichkeit dar, die rohstoffbedingte Stabilität zu verbessern, so Robinson et al. [EVANS et al. 2003, ROBINSON et al. 2007].

In Bezug auf eine bessere kolloidale Stabilität ist generell auf einen guten Lösungsgrad des Malzes zu achten. Offenbar dominiert hier der positive Effekt der besseren cytolytischen, proteolytischen und amylolytischen Lösung über die stabilitätsmindernde Wirkung der zusätzlich freigesetzten Anthocyanogene. Es ist jedoch zu beachten, dass sich eine Überlösung der Malze nachteilig auswirkt [BELLMER 1976, DADIC 1976, SCHUR 1980a, PFENNINGER 1987, NARZISS 1994, ANGER 1995]. Höhere Abdarrtemperaturen, vor allem im Bereich von 80-90 °C, verbessern die Trübungsstabilität, was wohl vor allem auf die zunehmende Inaktivierung von Peroxidasen und Polyphenoloxidasen zurückzuführen sei. Die resultierenden höheren Polyphenolgehalte des Malzes fördern die Eiweißfällung im Sudhaus, so Narziss [NARZISS 1994, NARZISS 1999].

Als weitere Alternative nennt Schur den Einsatz von Malzsurrogaten wie Mais, Reis, Weizen oder Stärkesirup, wodurch in erster Linie der Eiweißgehalt der Biere vermindert werden könne [SCHUR 1980a, ANGER 1995]. Dies entspricht jedoch nicht den Vorgaben des Reinheitsgebotes.

Die Hopfung mit Dolden oder Pellets bringt größere Mengen an Polyphenolen, insbesondere auch an trübungsrelevanten Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen (siehe Kapitel 2.2.3) in die Würze ein, als dies bei der Verwendung von extrahiertem Hopfen der Fall ist. Prinzipiell

wird die kolloidale Stabilität daher durch originäre Hopfenprodukte eher verschlechtert [MOLL et al. 1984, PÜSPÖK 1985, ANGER 1995]. Es ist jedoch problematisch, alleine aus der Art des verwendeten Hopfenprodukts Rückschlüsse auf die zu erwartende kolloidale Bierstabilität zu ziehen. Von Bedeutung ist insbesondere auch der Zeitpunkt der Hopfengabe – so wird beispielsweise die Hopfung mit Pellets zu Beginn der Kochung in einer intensiveren Eiweißfällung resultieren als der Einsatz von Reinharzextrakten [BELLMER 1981]. Andererseits sollte bei später Hopfengabe, sei es am Ende der Kochung, im Whirlpool oder erst im Kaltbereich („Hopfenstopfen“), im Sinne einer besseren chemisch-physikalischen Haltbarkeit auf die Verwendung polyphenolreicher Produkte verzichtet werden [SCHUR 1980b, Foster et al. 2000]. Nach McMurrough und Hennigan werden durch den Hopfen vor allem oxidierte Flavanole mit hoher Gerbkraft in die Würze bzw. ins Bier eingebracht, wohingegen die Mehrheit der Gersten-Flavanole zunächst noch schwach gerbend wirkt, aber sehr stark zur oxidativen Polymerisierung neigt [MCMURROUGH und HENNIGAN 1984]. Laut DELCOUR sind die Proanthocyanidine des Hopfens bezüglich ihrer Trübungsaktivität jedoch mit denen aus Malz vergleichbar [DELCOUR et al. 1985].

Das Brauwasser sollte im Sinne einer besseren kolloidalen Stabilität der resultierenden Biere eine Restalkalität von weniger als 5 °dH aufweisen, um den pH-Wert der Maische nicht übermäßig zu erhöhen und damit den Stoffabbau zu verschlechtern. Eine Erhöhung der Nichtcarbonathärte durch die Dosierung von Calciumsalzen wirkt sich positiv aus, da dies der enzymatischen Aktivität der α -Amylase und der Endo- β -Glucanase zugute kommt und da auf diese Weise mehr Oxalate ausgeschieden werden, was einer Bildung von Calciumoxalat-Trübungen im Bier vorbeugt [SCHUR 1980a, PFENNINGER 1987, ANGER 1995]. Nach Narziss wird die beste Stabilität mit einem Brauwasser von 35 ° Gesamthärte und -10 ° Restalkalität erzielt, die Auswirkungen unterschiedlicher Brauwasserzusammensetzung auf die Stabilität seien jedoch allgemein eher gering [NARZISS et al. 1981, NARZISS 1994].

2.5.2 Prozesstechnischer Einfluss

Die Nassschrotung und die damit verbundene Schonung der Spelzen gelten gegenüber der Trockenschrotung als vorteilhaft, die Spelzentrennung und der Einsatz von Pulverschrot verschlechtern jedoch die Stabilität [NARZISS 1994]. Beim Maischen ist auf eine ausreichende Proteolyse, vor allem aber auf einen intensiven Stärkeabbau zu achten, um auf diese Weise wirklich jodnormale Würzen und Biere herzustellen. Der pH-Wert der Maische sollte daher optimaler Weise bei 5,5 liegen [SCHUR 1980a, NARZISS 1994]. High Gravity Brewing wirkt

sich positiv auf die kolloidale Stabilität aus, möglicherweise bedingt durch eine intensivere Stoffumsetzung im Brauprozess, so dass nach der Rückverdünnung der Würzen oder Biere geringere Konzentrationen an Trübungsbildnern vorliegen [NARZISS et al. 1981, NARZISS 1992, REHMANJI et al. 2000]. Eine Variation der Einmischtemperaturen sowie die Anwendung von Infusions- und Dekoktionsverfahren brachten hingegen keine eindeutigen Ergebnisse [NARZISS et al. 1981]. Ähnliche Schlussfolgerungen lassen auch die Versuche von Kusche zu – demnach haben unterschiedliche Einmischtemperaturen und unterschiedlich lange Rasten nur geringe Auswirkungen auf den Flavan-3-ol-Gehalt der Würzen [KUSCHE 2005]. Eine gezielte Belüftung der Maische durch Einblasen von Sauerstoff resultierte, einhergehend mit einer deutlichen Verringerung der Polyphenole, in besseren chemisch-physikalischen Stabilitäten der resultierenden Biere, allerdings auch in längeren Läuterzeiten, dunkleren Farben und einem breiteren, derberen Geschmack. Eine Oxidation der Maische sei ferner auch der Geschmacksstabilität abträglich, so Narziss [NARZISS et al. 1986, PFENNINGER 1987].

Bei der Abtrennung der Würze von den ungelösten Malzbestandteilen darf das Anschwänzwasser die Abmischtemperatur von 78 °C nicht übersteigen, da es sonst zu einer Freisetzung nicht-jodnormaler und trübungsrelevanter Stärkepartikel kommen kann. Ferner sollte auch das Wasser der Nachgüsse eine geringe Restalkalität aufweisen, um ein Auslaugen der Treber und eine Freisetzung von Polyphenolen zu verhindern. Aus demselben Grund ist es wichtig, die Glattwasser-Nutzwelle einzuhalten. Von einer Wiederverwendung des Glattwassers ist im Sinne einer besseren kolloidalen Haltbarkeit abzusehen [DADIC 1976, SCHUR 1980a, DADIC und LAVALLEE 1983, PFENNINGER 1987, O'ROURKE 1994, ANGER 1995]. Auch der Sauerstoffeintrag während des Abläuterns sei zu vermeiden, so Narziss, um auf diese Weise nicht die Eiweißkoagulation zu verschlechtern [NARZISS 1994].

Im Bereich der Würzekochung kommt vor allem eine möglichst weitgehende Abscheidung des hitze-koagulierbaren Eiweißes der Stabilität zugute. Dieser Vorgang kann durch eine Absenkung des Würze-pH auf etwa 5,2, sowie durch eine Verlängerung der Kochzeit gefördert werden. Nach Narziss gelte dies allerdings nur für die konventionelle Würzekochung, bei neueren Kochsystemen brächte eine Verlängerung der Kochzeit über 60 Minuten hinaus keine weitere Verbesserung mit sich. Die Wahl des Hopfengabe-Zeitpunktes hängt dabei vom verwendeten Hopfenprodukt ab (siehe Kapitel 2.5.1). Nach der Kochung ist auf eine vollständige Entfernung des Heißtrubs zu achten [LINKO und ENARI 1969, SCHUR 1980a, PFENNINGER 1987, NARZISS 1994, REHMANJI et al. 2000]. Eine nicht dem Reinheitsgebot

entsprechende Variante zur Verbesserung der Stabilität während der Kochung stellt der Einsatz spezieller adjuncts wie Glucose- oder Maltosesirup dar [REHMANJI et al. 2000].

Der Einsatz frischer Hefe von gutem physiologischem Zustand ist die Voraussetzung für eine gute Hefevermehrung und damit für eine zügige Gärung und einen intensiven pH-Abfall. Ein ausgeprägter pH-Sturz fördert die Ausfällung von Kolloiden, insbesondere von Proteinen, bedingt durch die Ladungsverschiebung in Richtung ihres isoelektrischen Punktes, dem Punkt ihrer geringsten Löslichkeit. Zudem überschreiten durch den bei der Gärung gebildeten Alkohol auch α - und β -Glucane ihre Löslichkeitsgrenze und sedimentieren [MOLL et al. 1974, SCHUR 1980b, ANGER 1995]. Die konventionelle Haupt- und Nachgärung ist prinzipiell günstiger als eine warme Gärung bzw. warme Reifung [NARZISS 1994]. Nach Linko und Enari fördert eine zweite Hefegabe am Ende der Hauptgärung die kolloidale Stabilität, möglicherweise bedingt durch die fortgesetzte Adsorption trübungsrelevanter Partikel durch die eingebrachte aktive Hefe [LINKO und ENARI 1969]. Nach der Gärung ist auf eine rechtzeitige Hefeentfernung zu achten, um eine erneute Freisetzung adsorbierter Trübungsbildner zu verhindern [REHMANJI et al. 2000]. Die Ausfällung potentieller Trübungsbildner setzt sich insbesondere während der Abkühlung, Reifung und Lagerung fort – als positiv gelten hohe Vergärungsgrade, niedrige Temperaturen, ausreichend lange Lagerzeiten und Behälter mit niedrigen Flüssigkeitsständen (liegende Tanks), in denen keine Temperaturgradienten auftreten sollten [SCHUR 1980b]. Periodisches Einblasen von CO_2 in den Lagertank vermag geringe Konvektion auszugleichen und fördert die Aggregation und Ausscheidung von Trübungspartikeln [NARZISS 1994]. Im Allgemeinen genügen bereits relativ kurze Lagerzeiten, sofern die effektive Biertemperatur (nicht nur die Raumtemperatur) unter $0\text{ }^\circ\text{C}$ liegt. McMURROUGH et al. stellten keine Unterschiede zwischen der resultierenden Kältetrübung eines bei $-1\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Bieres fest, unabhängig davon, ob die Lagerdauer nun 1 Tag oder 1 Woche betrug. Rehmanji et al. und Pfenninger propagieren dagegen eine Mindestlagerdauer von 1 Woche bei $-1\text{ }^\circ\text{C}$ - $-2\text{ }^\circ\text{C}$. Die Vermeidung der Erwärmung des Bieres auf dem Weg zum und durch den Filter (Sollwert Filtration $< 0\text{ }^\circ\text{C}$) ist essentiell für die Entfernung eines wesentlichen Anteils kolloidaler Trübungsbildner in Form der Kältetrübung [LINKO und ENARI 1969, ANGER 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a, PFENNINGER 1987, CHAPON 1994, MCMURROUGH et al. 1997, REHMANJI et al. 2000].

Aufgrund der in den Kapiteln 2.4.1 und 2.4.2 besprochenen Problematik gilt es als selbstverständlich, dass das Einbringen von Metallionen (z.B. über Filterhilfsmittel oder Bierleitungen) sowie von Sauerstoff, insbesondere auf dem Bierweg bis in die abgefüllte Flasche, um

jeden Preis vermieden werden muss [DADIC 1976, SCHUR 1980b, ANGER 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a, CHAPON 1994, REHMANJI 2000].

Einen nicht zu unterschätzenden Einflussfaktor stellt neben der Vorklärung des Bieres und der Bierstabilisierung (siehe Kapitel 2.5.3) auch die Klärschärfe der Nachfiltration dar. So zeichnen sich beispielsweise Tiefenfilterschichten durch eine deutlich höhere Sicherheit gegenüber der Permeation 25 °-Streulicht-verursachender Partikel aus als beispielsweise Baumwollwickelkerzen (Trapfänger) [WAIBLINGER und NIßEN 2000]. Ein von Haus aus geringerer Gehalt des frisch abgefüllten Bieres an messbaren Partikeln wird mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Trübungsstabilität positiv beeinflussen.

2.5.3 Einsatz von Stabilisierungsmitteln – Historie und Stand der Technik

Die Stabilisierung durch Zusatzstoffe dient der Entfernung bzw. Blockierung potentieller Trübungsbildner und zielt darauf ab, die Glanzfeinheit des abgefüllten Bieres über den gewählten Mindesthaltbarkeitszeitraum hinweg zu gewährleisten. In Hinblick auf die Wirkungsweise der Stabilisierungsmittel kann zwischen der Anwendung von Fällungsmitteln, Adsorptionsmitteln, dem Einsatz von Enzymen sowie der Anwendung von Antioxidantien unterschieden werden. Manche der in der Vergangenheit angewandten Methoden zur Bierstabilisierung mögen aus heutiger Sicht eher ungewöhnlich erscheinen, andere hingegen sind in zum Teil weiterentwickelter Form noch bis heute gebräuchlich.

2.5.3.1 Stabilisierung mittels Fällungsmitteln

Eine beliebte Methode zur Fällung von im Bier vorhandenen Trübungsbildnern stellte in der Vergangenheit die Klärung mit Leim dar, wobei verschiedenste Leimarten verwendet wurden. Vor allem der Einsatz von Hausenblase, auch als Fischleim bekannt, war weit verbreitet. Dabei handelt es sich um die getrocknete, innere Schwimmblasenhaut des Hausen, eines störrartigen Fisches. Die beste Hausenblase war die Saliansky-Hausenblase von der Insel Salian im Kaspischen Meer [SCHMIDT 1996]. Die Hausenblase wurde vor der Verwendung in fließendem kaltem Wasser 10 Stunden gewässert, um den Fischgeruch zu entfernen, anschließend musste sie unter Zugabe von Weinsteinsäure 15 Stunden quellen. Nach wiederholter mehrmaliger Wässerung zum Zwecke der Entfernung der Weinsteinsäure wurden mit Hilfe eines Hefesiebes alle eventuellen Schwimmblasenreste entfernt. Die nunmehr flüssige Gallerte wurde dann dem Bier beigemischt, wobei die Dosage der Hausenblase

etwa 2,5-8,0 g trockene Hausenblase pro Hektoliter Bier betrug. Die Verwendung von Hausenblase im Lagerkellerbereich (2,5-4,0 g/hl) ist laut Narziss in Deutschland nach wie vor zugelassen, wird jedoch kaum noch praktiziert [DE CLERCK 1964, NARZISS 2004]. Der Fischleim besteht zu 70% aus Kollagen, welches die Klärwirkung bedingt. Durch Wechselwirkungen mit den Gerbstoffen entstehen in Abhängigkeit von pH-Wert und Alkoholgehalt des Bieres unlösliche Verbindungen, die auch andere Schwebstoffe mitreißen. Da gelöstes Kollagen sowohl positiv als auch negativ geladene Bereiche (amphoterer Charakter) aufweist, werden neben negativ geladenen Hefezellen auch positiv geladene Proteine gebunden, was sowohl die kolloidale Stabilität als auch die Filtrierbarkeit verbessere. Zudem fördere der Einsatz von Hausenblase die Schaumhaltbarkeit der Biere, was möglicherweise auf die Entfernung von Lipiden zurückzuführen ist, so Leiper et al. [LIM et al. 1992, LEIPER et al. 2002]. Sowohl Hausenblase als auch die ebenfalls zur Bierklärung eingesetzte Gelatine sind reich an der Aminosäure Prolin und gelten damit als trübungssensitive Proteine. Siebert und Lynn wiesen eine deutliche Reduzierung trübungsrelevanter Proteine durch die Zugabe von Gelatine zum Bier nach. Hierbei handelt es sich um ein bemerkenswertes Resultat, scheint es doch so, als wäre ein trübungssensitives Protein durch ein anderes gefällt worden. Nach Moeller könne dies möglicherweise damit erklärt werden, dass sich der pH-Wert des Bieres durch die Gelatine-Zugabe in Richtung des isoelektrischen Punktes trübungsbildender Proteine verschiebt, welche daraufhin dehydrieren bzw. polymerisieren und zur Ausfällung gelangen. Gleichzeitig konnte in den Versuchen von Siebert und Lynn kein signifikanter Effekt auf die Konzentrationen an schaumpositiven Proteinen und trübungsrelevanten Polyphenolen festgestellt werden. Bei der Weinbereitung und in der Lebensmitteltechnologie wird nach wie vor aus Tierhäuten gewonnene Gelatine als Schönungsmittel eingesetzt [MOELLER 1964, SIEBERT und LYNN 1997, STÜCKLER 1997, SIEBERT 2006].

Der Einsatz von Formaldehyd stellte in der Vergangenheit eine einfache und billige Methode zur Fällung von Polyphenolen dar, wobei nach Gramshaw gleichzeitig auch der Proteingehalt reduziert wird. Die Dosierung erfolgt nach Schur am zweckmäßigsten beim Schroten unter Verwendung des leicht zu handhabenden pulver- bzw. tablettenförmigen Para-Formaldehyds in einer Konzentration von 100-200 mg/kg Schüttung. Der Stabilisierungseffekt beruht auf der Bildung von Kondensationsprodukten zwischen Formaldehyd und Proteinen, welche daraufhin die Fällung von Polyphenolen induzieren, einhergehend mit einer verbesserten Stabilität, helleren Bierfarben und einem geringeren Reduktionsvermögen. Die Schaumhaltbarkeit und Geschmacksstabilität werden jedoch nicht beeinträchtigt, so Schur [GRAMSHAW 1970b, MACEY 1979, SCHUR 1979, SCHUR 1980b, WACKERBAUER und

ANGER 1984a]. Die bis ins fertige Bier gelangenden Rückstände betragen etwa 25% der Ausgangskonzentration und liegen in gebundener Form vor. Toxikologische Untersuchungen belegten, dass unter diesen Voraussetzungen keinerlei Gesundheitsrisiko für den Biertrinker bestehe [MACEY 1979, SCHUR 1979, SCHUR 1980b]. Dennoch kommt ein Einsatz des nicht Reinheitsgebot-konformen und gemäß der EU-Richtlinie 67/548/EG als „möglicherweise Krebs erregend“ (Kategorie 3) eingestuften Formaldehyds in der heutigen Zeit, in der das Produkt Bier ohnehin mit Imageproblemen zu kämpfen hat, nicht mehr in Frage.

Eine Möglichkeit zur Fällung trübungsrelevanter Proteine im sauren Bereich besteht im Zusatz hydrolysierbarer und reduzierend wirkender Gallotannine (Gerbstoffe), welche aus den Galläpfeln der Bäume *Rhus semialata* und *Quercus infectoria* gewonnen werden. Um eine Hydrolyse und den Eintrag von Gallussäure ins Bier zu vermeiden, werden die Tannine erst nach der Würzekühlung zudosiert (in wässriger Lösung), wobei der Stabilisierungseffekt bei einer Dosierung gegen Ende der Lagerung (24 h vor der Filtration) am größten ist. In Konzentrationen von 5-10 g/hl Bier ergeben sich keine Nachteile bezüglich Geschmack und Schaumhaltbarkeit. Generell gilt die Stabilisierung mit Gallotanninen als einfache und kostengünstige Methode, entspricht jedoch nicht dem Reinheitsgebot, da ein Eintrag in das fertige Bier nicht ausgeschlossen werden kann [DE CLERCK 1970, VAN DROMME 1979, SCHUR 1979, SCHUR 1980b]. Neuere Gallotanninpräparate können auch am Ende der Hauptgärung dosiert werden, was zwar den Bierschwand leicht erhöhe, aber der Filtrierbarkeit zugute komme, so Mussche. Auch eine Dosage in den Bierstrom vor dem Filter sei möglich, sofern die Kontaktzeit mindestens 5 Minuten und die Filtrationstemperatur -1,5 bis 0 °C betrage. Zudem sollte in diesem Fall die laufende Dosage mit grober Kieselgur oder mit hohem Anteil an Perlite erfolgen, um Tannin-Protein-Ausflockungen zu ermöglichen. Ein positiver Nebeneffekt der Stabilisierung mit Gallotanninen sei ferner die Bindung von Metallionen, was die Resistenz des Bieres gegenüber dem schädlichen Einfluss von Luftsauerstoff erhöhe [MUSSCHE 1994, BAMFORTH 1999, MUSSCHE und DE PAUW 1999].

2.5.3.2 Stabilisierung durch Adsorption

Als ein ehemals sehr weit verbreitetes Verfahren hat sich das sogenannte Spänen erwiesen. Dabei wurden Holzbretter, die namensgebenden Späne, im Lagerfass beziehungsweise im Lagertank vorgelegt und das Jungbier darauf geschlaucht. Diese Späne wurden aus Haselnuss- oder Weißbuchenholz hergestellt und waren 40-50 cm lang, 3-5 cm breit und 1-2 cm dick, wobei das Holz fehlerfrei und völlig glatt gehobelt sein sollte. Die Späne vergrößerten

die Klärfläche des Fasses und wirkten aufgrund der adsorptiven Eigenschaften ihrer Oberfläche stabilisierend. Nach der Verwendung wurden die Späne zwar gewaschen und sterilisiert, doch trotz dieser Behandlung stellten sie ein hohes Infektionsrisiko dar und erhöhten ferner sowohl den Arbeitsaufwand als auch den Bierschwand [LEBERLE 1937, KAMM 1969, NARZISS 2004]. Als am besten geeignete Methode des Spänens erwiesen sich die Bio- oder Ultraspäne. Sie wurden aus Holzmehl hergestellt, das mit einer feinen Pechschicht überzogen war [HENNIES 1956, KAMM 1969]. Durch ihre große Oberfläche wirkten sie gut und entlasteten den Filter. Sie konnten bereits im Gärkeller in Dosierungen von 2-3 g/hl oder erst im Lagerkeller mit 5-20 g/hl zugegeben werden und beschleunigten sogar den Verlauf der Nachgärung. Nachdem sich die Späne abgesetzt hatten, wurden sie mit dem Geläger entsorgt. Durch die Einführung der Bierfiltration wurde der Einsatz von Spänen zunehmend verdrängt [JAKOB 1908, KAMM 1969, NARZISS 2004].

Außer der unter 2.5.3.1 erwähnten Hausenblase bzw. Gelatine kamen noch weitere leimartige Substanzen im Bier zum Einsatz, die jedoch eher adsorptiv als fällend wirkten. Diese waren pflanzlichen Ursprungs, wie zum Beispiel Karaghenmoos und Isländisch Moos oder auch Agar-Agar, das aus Seetang der Art *Porphyra Laciniata* gewonnen wird [DE CLERCK 1964, KAMM 1969]. Die klärende Wirkung beruht bei allen pflanzlichen Klärmitteln auf einem hochpolymeren Kohlenhydrat, welches Trübungsbestandteile zu adsorbieren vermag. Vor der Verwendung mussten diese Klärmittel lediglich in warmem Wasser aufgelöst werden. Da Karaghenmoos in Bier löslich ist und zudem als Schaumstabilisator wirkt, wurde es nach dem Reinheitsgebot in Deutschland nicht zugelassen [HEYSE 1983].

Die Verwendung der sehr adsorptiv wirkenden Aktivkohle resultierte bereits ab einer Dosage von 10 g/hl in merklichen Aroma-, Farb- und Bitterstoffverlusten, weshalb diese Stabilisierungsmethode keine adäquate Verwendung in der Brauerei fand. In Konzentrationen von 25 g/hl diente die Aktivkohle jedoch der Korrektur von Geschmacksfehlern [DE CLERCK 1964, KAMM 1969].

Beim Protexverfahren, entwickelt von der Protex-GmbH aus Berlin-Schönefeld, wurde dem Bier kurz vor der Filtration Deglutan zudosiert, wobei Deglutan eine Markenbezeichnung für eine Mischung aus verschiedenen Aluminiumsilikaten ist, die zu den Bentoniten gehören. Das Protexverfahren stellte die erste Entwicklung dar, die gezielt in Richtung der heutigen Bierstabilisierungsverfahren ging [WIESER 1941, LEBERLE 1949].

Das stark Eiweiß adsorbierende Bentonit kommt in der Brauerei praktisch nicht mehr zur Anwendung, da dadurch nicht nur trübungsrelevante, sondern auch schaumpositive Protei-

ne entfernt werden. Aufgrund seines großen Quellvermögens und der erforderlichen langen Einwirkzeit ist Bentonit für die Anwendung im Durchlaufkontaktverfahren ungeeignet, eine Stabilisierung im Tank hingegen resultiert in merklichen Bierverlusten. Als weitere Nachteile der Bentonitstabilisierung gelten geringere Bitterstoffgehalte, höhere pH-Werte, hellere Bierfarben und ein Verlust der Vollmundigkeit [NARZISS und REICHENEDER 1977, SCHUR 1979, SCHUR 1980b, DADIC und LAVALLEE 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a, SIEBERT und LYNN 1997, SIEBERT 1999a].

Zur adsorptiven Entfernung proteinischer Trübungsbildner werden heute in erster Linie die selektiver wirkenden Kieselgele oder Kieselsole verwendet. Die Kieselgele werden seit 1961 zur Bierstabilisierung eingesetzt und können in Abhängigkeit von ihrem Wassergehalt in Xerogele (ca. 5%), Medigele bzw. hydratisierte Xerogele (ca. 35%) und Hydrogele (ca. 60%) eingeteilt werden. Als einziger Vorteil der Produkte mit höherem Wasseranteil gilt die geringere Staubentwicklung bei der Anwendung. Die Herstellung basiert auf der Reaktion von Wasserglas mit Mineralsäure, aus der das Kieselsäuresol hervorgeht, das sich nach wenigen Stunden zur Kieselsäuregallerte umwandelt (Sol-Gel-Umwandlungsverfahren). Nach einem intensiven Waschprozess zur Entfernung von Natriumsulfat und Natriumchlorid wird die Gallerte in Abhängigkeit vom gewünschten Wassergehalt getrocknet und vermahlen. Eine alternative Herstellungsmethode ist das Fällverfahren, bei dem ohne das Zwischenprodukt Kieselsole direkt ein Gel im alkalischen Medium ausgefällt wird [RAIBLE 1979, IRMSCHER 1991, NIEMSCH 2000, NIEMSCH 2001, FISCHER und SCHNICK 2004]. Kieselgele sind aufgrund ihrer schnellen Adsorptionswirkung sowohl für die Anwendung im Durchlaufkontaktverfahren (üblicherweise Zumischung zur Kieselgur bei der Grundanschwemmung und zur laufenden Dosage) als auch für die Tankstabilisierung geeignet. Längere Kontaktzeiten (bis 30 Minuten im Stabilisierungstank) fördern den Stabilisierungseffekt, nach Schur sind jedoch bei maximaler Dosierung von 50-100 g/hl bereits 5 Minuten ausreichend. Vorteilhaft ist ferner eine Vorklärung des Bieres z.B. mittels Zentrifuge oder Kieselgurfilter [RÖTTGER 1974, NARZISS und REICHENEDER 1977, SCHUR 1980b, WACKERBAUER und ANGER 1984a, FISCHER und SCHNICK 2004]. Die Wirkung der Kieselgele wird vor allem vom Porendurchmesser bestimmt, aber auch die spezifische Oberfläche und die Partikelgröße spielen eine Rolle. Um die Filterleistung nicht zu beeinträchtigen, dürfen nur maximal 5% der Partikel kleiner als 5 μm sein. Ein optimaler Ablauf der Filtration ist bei d_{50} -Werten von ca. 15 μm gegeben. Mittelporige Kieselgele mit einem mittleren Porenradius von ca. 3 nm und einer resultierenden spezifischen Oberfläche von 380 m^2/g induzieren die beste Adsorptionswirkung gegenüber trübungsrelevanten Proteinen. Aus diesem Grund gelte der Herstellung

möglichst homogener mittelfeiner Produkte mit nur minimalem Anteil an sehr kleinteiligen Partikeln oberste Priorität [HOUGH und LOVELL 1979, SCHUR 1979, SCHUR 1980b, IRMSCHER 1991, FISCHER und SCHNICK 2004]. Kieselgele adsorbieren in spezifischer Art und Weise Proteine (bzw. Protein-Gerbstoffkomplexe), die hohe Anteile an den Aminosäuren Prolin und Glutaminsäure enthalten und mit der Trübungsbildung in Verbindung gebracht werden können (siehe Kapitel 2.3.2). Diese Spezifität ist offenbar dadurch bedingt, dass Kieselgele an dieselben Stellen eines trübungsrelevanten Proteins andocken wie trübungsaktive Polyphenole. Die Schaumhaltbarkeit werde hingegen kaum oder gar nicht beeinträchtigt [SCHUR 1979, SCHUR 1980c, WACKERBAUER und ANGER 1984a, SIEBERT und LYNN 1997, BAMFORTH 1999, SIEBERT 1999a, FISCHER und SCHNICK 2004]. Durch den Einsatz von Kieselgel werden die Eiweißfraktionen mit einem Molekulargewicht zwischen 13.500 und 35.000 um mehr als die Hälfte und diejenigen über 75.000 um etwa ein Drittel reduziert, so Schur. Röttger nennt Adsorptionsspitzen in den Bereichen über 12.000, über 30.000 und über 60.000. Nach Hough hingegen sind vor allem Proteine mit einem Gewicht von 40.000 und mit isoelektrischen Punkten im Bereich zwischen 3,0 und 5,0 betroffen. [RÖTTGER 1974, HOUGH 1976, HOUGH und LOVELL 1979, SCHUR 1979, SCHUR 1980b]. Die abweichenden Angaben unterschiedlicher Autoren bezüglich der adsorbierten Proteinfractionen mögen einerseits auf Unterschiede bezüglich des Porendurchmessers und der Partikelgrößenverteilung der verwendeten Produkte zurückzuführen sein [HOUGH 1976]. Andererseits ist zu berücksichtigen, dass auch die Untersuchung von Trübungsmaterial keine klare Zuordnung einzelner Proteinfractionen zur Trübungsbildung zulässt (siehe Kapitel 2.3.2). Insofern scheint die Wirkung von Kieselgelen weniger fraktionsspezifisch als vielmehr selektiv gegenüber den trübungsrelevanten Polyphenol-Bindungsstellen zu sein. Diese Theorie wird durch die Erfahrungen von Niemsch gestützt, wonach eine gute Übereinstimmung zwischen der Aminosäurezusammensetzung von Kältetrübung und Kieselgeladsorbat bestehe [NIEMSCH 2000].

Bei den Kiesel(säure)solen, dem Zwischenprodukt bei der Kieselgelherstellung, handelt es sich um kolloidale Lösungen von hochreinen amorphen Kieselsäurepartikeln in Wasser. Beim Kontakt mit elektrolythaltigen Flüssigkeiten, so auch mit Bier, kommt es schnell zur irreversiblen Gelierung und zur Ausbildung von Kieselsäurehydrogel-Verbänden, welche dann zur Sedimentation gelangen. Die eiweißstabilisierende Wirkung ergibt sich durch den Einschluss kälteempfindlicher Proteinverbindungen in den Zwischenräumen des Kieselgels. Da bereits geringe Mengen an Kieselgel-Niederschlag sowohl den Kieselgur- als auch den Schichtenfilter verblocken können, ist auf eine vollständige Sedimentation und Abscheidung

zu achten. Nach Raible et al. ist diese Problematik wohl auch der Grund dafür, weshalb sich der Einsatz von Kieselsolen zur Bierstabilisierung nicht durchgesetzt habe. Andererseits lasse sich bei richtiger Anwendung die Filtrierbarkeit des Bieres sogar steigern, bedingt durch die Adsorption filtrationsbeeinflussender Substanzen wie z.B. β -Glucanen an den Niederschlag [RAIBLE et al. 1983]. Pfenninger und Hug sprechen dem Kieselsol neben der eiweißstabilisierenden und filtrationsbeschleunigenden Wirkung noch weitere positive Aspekte zu – dies seien insbesondere die staubfreie Handhabung und die Beschleunigung der Extraktabnahme bei einer Zugabe zur Gärung [PFENNINGER und HUG 1983].

Eine mittlerweile nicht mehr gebräuchliche Methode zur adsorptiven Entfernung von Polyphenolen war die Behandlung des Bieres mit Nylon (Handelsname Nylon-66) oder Perlon. Das unlösliche Polyamid Nylon-66 wurde 1959 durch Harris und Ricketts als eine Möglichkeit zur Bierstabilisierung vorgestellt, erwies sich jedoch in den darauf folgenden Jahren als nur bedingt geeignet und wurde bald darauf vom selektiver wirkenden PVPP abgelöst. Die Einsatzmenge des pulverförmigen Nylons lag bei etwa 100-200 g Nylon pro Hektoliter Bier. In diesen Konzentrationen kam es jedoch außer zur gewünschten Adsorption der Polyphenole auch zu unverhältnismäßig starken Bitterstoff- und Farbverlusten sowie zu einem merklichen Anstieg des pH-Wertes und zu einer Beeinträchtigung des Geschmacks [CURTIS 1966, DADIC 1973, DADIC und VAN GHELUWE 1973, DADIC und LAVALLEE 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a].

Als Vorläufer der PVPP-Stabilisierung kann die Verwendung von PVP (Polyvinylpyrrolidon) gesehen werden. Das Herstellungsverfahren für lösliches PVP wurde 1939 von der Firma BASF entwickelt. Doch erst 1954 erkannte McFarlane die Möglichkeit, PVP als Stabilisierungsmittel für Bier zu verwenden. Nach der Entwicklung der sogenannten „Popcorn-Polymerisation“ im Jahre 1961 und der Einführung von in Wasser unlöslichem PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) in die Brauerei durch McFarlane und Bayne begannen zunächst skandinavische Brauereien mit dessen Einsatz [DADIC und LAVALLEE 1983, OECHSLE und FUSSNEGGER 1995, O'ROURKE 1996, KAIN 2005]. In Deutschland erfolgte die Zulassung als Bierstabilisierungsmittel erst im Jahre 1972 unter folgenden Auflagen: 1,0 g PVPP dürfe innerhalb von 15 h (bei Raumtemperatur) in 500 ml des Lösungsmittelgemisches Essigsäure (3%), Ethanol und Picolin (95:5:0,24) nicht mehr als 15 mg lösliche Bestandteile abgeben. Der Veraschungsrückstand müsse unter 5% liegen und die erlaubte Einsatzkonzentration in Bier betrage maximal 50 g/hl [SCHAFFT 1979]. Das in Bier unlösliche PVPP ist dreidimensional vernetzt und weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zu hochmolekularen Proteinen auf, wie Abbildung 12 verdeutlicht. Die selektive Wirkung der „Proteinatrappe“ PVPP ba-

siert auf der Bildung von Wasserstoffbrücken mit den Hydroxylgruppen trübungsrelevanter Flavan-3-ole. Die Bindung der Polyphenole an PVPP ist damit der Ausbildung von Polyphenol-Protein-Komplexen sehr ähnlich. Nach Siebert und Lynn kommen neben Wasserstoffbrücken auch hydrophobe Bindungen sowie Assoziationen zwischen dem aromatischen Ring der Polyphenole und dem PVPP-Ring (in Form von π -gebundenen Komplexen) als mögliche Bindungsmechanismen in Frage [SCHAFFT 1979, DADIC und LAVALLEE 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a, OECHSLE und FUSSNEGGER 1995, O'ROURKE 1996, SIEBERT und LYNN 1998, SCHLENKER et al. 1999].

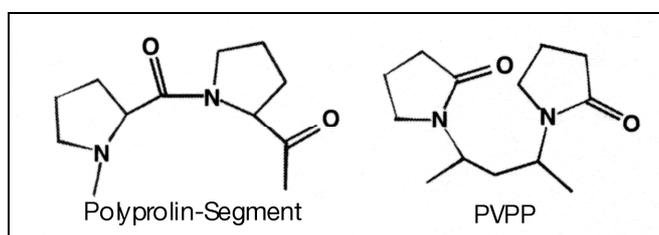


Abbildung 12: Vergleich eines Polyprolin-Segments mit PVPP [SIEBERT und LYNN 1998]

Nach Oechsle und Fussnegger werden durch den Einsatz von 50 g PVPP pro Hektoliter Bier bis zu 65% der Anthocyanogene und bis zu 40% der Gesamtpolyphenole adsorbiert. Wackerbauer und Anger wiesen eine Reduktion dimerer Proanthocyanidine um 81% nach, die Abnahme der monomeren Flavan-3-ole belief sich auf 78%. Der Anteil an Phenolcarbonsäuren verringerte sich unabhängig von der PVPP-Stabilisierung um 15%, offenbar bedingt durch den bloßen Filtrationseffekt. Eine Beeinflussung des Gesamtstickstoffs, des koagulierbaren Stickstoffs sowie des $MgSO_4$ -Stickstoffs konnte hingegen nicht festgestellt werden. Dennoch gilt eine teilweise Entfernung sensitiver Proteine (in Form von Eiweiß-Gerbstoff-Komplexen) als wahrscheinlich, was jedoch nur mittels spezifischerer Analysemethoden nachvollzogen werden könne [WACKERBAUER und ANGER 1984b, OECHSLE und FUSSNEGGER 1995]. Die Entfernung phenolischer Bestandteile bewirkt im Allgemeinen eine geringfügige Farbaufhellung und eine Verringerung des Reduktionsvermögens, was sich jedoch nicht nachteilig auf die Geschmacksstabilität auswirkt. Tatsächlich scheint sich Letztere durch die PVPP-Stabilisierung sogar zu verbessern [SFAT 1974, LEIPNER 1977, WACKERBAUER und ANGER 1984a, MEIER 1986, MCMURROUGH et al. 1996, O'ROURKE 1996, MCMURROUGH 1998, SCHLENKER et al. 1999, MIKYSKA et al. 2002]. Der Stabilisierungseffekt bei der Verwendung von PVPP hängt grundsätzlich vom Grad der Vorklärung,

von der Arbeitstemperatur (optimal ca. $-1-0\text{ }^{\circ}\text{C}$), vom pH-Wert (optimal ca. 3,5-4,0) und von der Kontaktzeit ab. Darüber hinaus sind auch Anzahl und Position der OH-Gruppen am aromatischen Ring der phenolischen Verbindung sowie das Vorhandensein weiterer Substituenten von Bedeutung. PVPP reagiert im Allgemeinen sehr schnell mit den Polyphenolen und wird daher zweckmäßiger Weise während der Filtration im Durchlaufkontaktverfahren angewandt. Laut Oechsle und Fussnegger bzw. McMurrrough genügt eine Kontaktzeit von ca. 5-8 Minuten – darüber hinaus ist der zusätzliche Stabilisierungseffekt nur noch minimal. Durch das Quellvermögen von PVPP ($< 6,0\text{ l/kg}$) und zur Verdrängung von Luft aus den Poren sollte im Sinne einer maximalen Adsorptionswirkung vor der Filtration eine Konditionierungsphase (in Wasser) von ca. einer Stunde eingehalten werden [WACKERBAUER und ANGER 1984a, OECHSLE und FUSSNEGGER 1990, OECHSLE und FUSSNEGGER 1995, MCMURROUGH 1998, SCHLENKER et al. 1999]. Das PVPP kommt meist pulverförmig entweder als Einwegware (verlorenes PVPP) oder in regenerierbarer Form zur Anwendung. Die Regenerierung erfolgt durch den Einsatz in einem eigenen Horizontalanschwemm-schichtenfilter mit anschließender Laugespülung, wobei von etwa 0,5-1% Verlust pro Regeneriervorgang auszugehen ist. Dem PVPP-Filter muss dabei immer eine Filtereinheit zur Vorklärung des Bieres vorgeschaltet sein, um eine adäquate Regeneration des PVPPs zu ermöglichen. Auf die Stabilisier- bzw. Regeneriereinheit folgt ein Trapfilter, der die Rückhaltung eventuell mitgerissener PVPP-Partikel garantieren soll. Die Verwendung der regenerierbaren Variante sei bereits ab einem Jahresausstoß von 30.000 hl wirtschaftlich günstiger als die Stabilisierung mit dem deutlich teureren verlorenen PVPP, so Meier [SCHUR 1979, SCHUR 1980b, MEIER 1986, BAMFORTH 1999, SCHLENKER et al. 1999]. Eine alternative Anwendung dieser Stabilisierungsart besteht in der Verwendung von PVPP-haltigen Filterschichten, die mit 0,5%iger Natronlauge bis zu 30 Mal auf einfache Weise regeneriert werden können. Bei Verwendung solcher Schichten muss allerdings das fortschreitende Nachlassen der Adsorptionswirkung von Anfang bis Ende der Filtration um bis zu 50% berücksichtigt werden, was bei größeren Chargen eine gründliche Durchmischung des unterschiedlich stabilisierten Bieres bzw. die Anwendung von Teilstromregelungen erforderlich macht. Zudem sollte auch hier das Bier vorgeklärt sein, um eine Verschlechterung der Filtrationsleistung zu vermeiden [LEIPNER 1977, SCHUR 1979, SCHUR 1980b, KESSLER 1983, MEIER 1986]. Mit dem Hintergrundwissen, dass im Bier wesentlich größere Mengen an trübungsaktiven Proteinen als an trübungsbildenden Polyphenolen zu finden sind (siehe Kapitel 2.2.2), ist es nicht überraschend, dass Meier eine gerbstoffseitige Behandlung als die effektivere Stabilisierungsmethode bezeichnet [MEIER 1986]. Insofern handelt es sich bei der PVPP-Stabilisierung wohl um die bis heute wirksamste und sicherste Methode zur künstli-

chen Verbesserung der kolloidalen Bierstabilität, insbesondere innerhalb des Reinheitsgebotes.

Die Adsorption von Trübungsbildnern mittels Ionentauschern stellt eine alternative Methode zur Bierklärung, insbesondere zur Entfernung von Proteinen dar. Die adsorbierende Wirkung basiert auf der selektiven Bindung einzelner Aminosäuren bzw. Proteine an die funktionellen Gruppen des Ionentauschers, unter Ausnutzung des amphoteren Charakters der Aminosäuren (Proteine). Als Basismaterial für die Ionentauscherguppen werden Polymere wie beispielsweise Zellulose, Dextran, Agarose oder Kieselgel eingesetzt, was die hydrophilen oder hydrophoben Eigenschaften des Adsorbers bedingt. An diese Polymere werden dissoziierbare Gruppen chemisch gebunden – so enthalten Kationentauscher typischer Weise Carboxyl-, Sulfat- oder Phosphatgruppen (Gegenionen z.B. Natrium- oder Wasserstoffionen) und Anionentauscher beispielsweise quaternäre Ammoniumgruppen (Gegenion z.B. Hydroxid- oder Chloridionen). Katzke et al. stellten 1998 einen neu entwickelten Ionentauscher vor, der sich aufgrund seiner hohen chemischen und physikalischen Stabilität gut für die Bierstabilisierung eignet. Als Basismaterial fungiert das unlösliche, quervernetzte Polysaccharid Agarose, welches in Form speziell angefertigter kugelförmiger Agarose-Perlen, den sogenannten „Beads“ (Durchmesser ca. 100-300 µm), vorliegt. An die in mehreren Adsorbermodulen fixierten Beads werden mittels chemisch stabiler Bindungen Ionentauscherguppen (hier Ammoniumgruppe mit Gegenion Chlorid) gekoppelt [KATZKE et al. 1998a]. Das vorfiltrierte Bier durchströmt die Adsorbermodule (Kontaktzeit ca. 30 sec.), wobei nicht nur Proteine, sondern auch Gerbstoffe zurückgehalten werden. Bei Vergleichen mit Kieselgel- bzw. Kieselgel- und PVPP-stabilisierten Bieren habe sich gezeigt, dass durch den neuen Adsorber mehr Gesamtstickstoff, gleichzeitig aber weniger koagulierbarer Stickstoff entfernt werde, weshalb kein negativer Effekt auf die Schaumhaltbarkeit feststellbar sei. Taylor et al. wiesen ferner eine geringfügige Reduktion sensitiver Proteine nach. Gerbstoffseitig scheinen in erster Linie die trübungsrelevanten Proanthocyanidine Prodelphinidin B3 und Procyanidin B3 adsorbiert zu werden, das monomere Catechin sowie die Anthocyanogene hingegen nur in sehr geringem Maße. Die Bierstabilisierung durch die Adsorbermodule erfolge grundsätzlich in effektiver, schonender und gleichmäßiger Weise, ohne jedoch signifikanten Einfluss auf Geruch und Geschmack zu nehmen. Nach Jany und Katzke werden im Vergleich zur Kieselgel- und PVPP-Stabilisierung zwar weniger Proteine und Polyphenole entfernt, nichtsdestotrotz jedoch vergleichbare kolloidale Stabilitäten erzielt. Da sich die Kapazität des Adsorbers im Laufe der Zeit erschöpft, muss der Bierstrom zur Erhaltung eines gleichmäßig stabilisierten Bieres mittels Bypasssteuerung geregelt werden. Die Regeneration des Adsorbers er-

folgt in mehreren Schritten mittels Kochsalzlösung zur Entfernung adsorbierter Gruppen und zur Neubeladung der Agarose und mit Natronlauge zur Denaturierung der Protein-Gerbstoffverbindungen. Der Regeneriervorgang könne dabei mehrere hundertmal verlustfrei wiederholt werden. Das beschriebene Verfahren wurde im Jahre 2002 durch die Firma Handtmann unter dem Namen Combined Stabilisation System (CSS) vorgestellt. Die Zulassung nach Reinheitsgebot erfolgte im Jahre 2004, nachdem das Verfahren dahingehend geändert wurde, dass nun nicht mehr Chlorid-, sondern Hydroxidionen als Gegenionen verwendet und an das Bier abgegeben werden [KATZKE et al. 1998b, JANY und KATZKE 2002, TAYLOR et al. 2006].

Die neueste Produktentwicklung auf dem Gebiet der adsorptiven Bierstabilisierung stammt von der Firma BASF. Dabei handelt es sich um eine regenerierbare Kombination aus Filterhilfsmittel und gerbstoffseitigem Stabilisierungsmittel, bestehend aus untereinander verknüpftem Polystyrol und PVPP. Der Regenerierungsvorgang des Mischproduktes ähnelt dabei der PVPP-Regeneration (Verlust maximal 2%), beinhaltet jedoch zusätzlich einen enzymatischen Zellwand-Aufschluss der bei der Filtration zurückgehaltenen Hefen. Bei einer Voranschwemmung von maximal 2 kg/m² und einer variablen laufenden Dosage von 50-150 g/hl betrage die Catechinadsorption nach Angabe des Herstellers mindestens 20%. Der entscheidende Vorteil der Verwendung dieses kombinierten Filterhilfs- und Stabilisierungsmittels liege neben der Gerbstoffadsorption vor allem bei dem Ersatz der Kieselgur durch ein voll regenerierbares, staubfreies, nicht abrasiv wirkendes, homogenes künstliches Produkt von gleichbleibender Zusammensetzung. Bestehende Anlagen zur Kieselgurfiltration können weiter genutzt werden, zudem könne im Vergleich zur Verwendung von regenerierbarem PVPP ein Gefäß (PVPP-Filter) eingespart werden. Darüber hinaus werde das Handling erleichtert und der Platzbedarf verringert, bedingt durch die wegfallende Lagerung der frischen bzw. verbrauchten Kieselgur [BASF 2008].

2.5.3.3 Enzymatische Stabilisierung

Eine weitere Möglichkeit zur eiweißseitigen Stabilisierung besteht in der Anwendung proteolytischer Enzyme. Den höchsten Bekanntheitsgrad besitzt diesbezüglich das Papain (aus *Carica papaya*), wohingegen andere Enzyme wie Bromelin (aus Ananas), Ficin (aus Feigen) oder Pepsin (aus dem Magensaft von Schweinen) eine vergleichsweise geringe Bedeutung erlangten [KAMM 1969, SCHUR 1979, SCHUR 1980c, MUSSCHE 1997]. Papain wird bereits seit 1911 zur Stabilisierung von Bier eingesetzt und gilt als vergleichsweise kosten-

günstig. Im Gegensatz zu Schimmelpilz-Proteasen liegt das pH-Optimum von Papain im Bereich des Bier-pH von 4,5. Die stabilisierende Wirkung beruht auf der Hydrolyse der Proteine und/oder der Ausflockung von Molekülen („Clotting“) und erreicht ihr theoretisches Maximum bei einer Temperatur von etwa 65 °C. Die Dosierung in einer Höhe von 1-2 g/hl erfolgt vorzugsweise in das vorfiltrierte Bier, wobei höhere Dosagen den Anfangstrübungswert im Bier erhöhen. Soll bereits im Lagertank stabilisiert werden, so ist die Enzymgabe zu verdoppeln, da hier die proteolytischen Enzyme teilweise auch auf bereits ausgeschiedene Trübungsstoffe einwirken und damit nicht mehr in vollem Umfang zur Reduktion potentieller (zukünftiger) Eiweiß-Trübungsbildner zur Verfügung stehen [HARTMEIER 1979, SCHUR 1979, SCHUR 1980c]. Fukal und Kas wiesen auch nach Zugabe von irreversibel inaktiviertem Papain einen merklichen Stabilisierungseffekt nach. Daraus könne in Übereinstimmung mit Gramshaws Theorie geschlossen werden, dass die stabilisierende Wirkung nicht alleine mit der Hydrolyse hochmolekularer Proteine erklärbar sei, sondern dass es offenbar auch zur Ausbildung eines stabilen Gleichgewichtszustandes zwischen Polyphenolen und Proteinen komme. [GRAMSHAW 1970b, FUKAL und KAS 1984]. Als Cysteinproteinasen verlieren Papain, Bromelin und Ficin ihre Wirkung in Anwesenheit größerer Mengen an Schwermetallen und fördern, bedingt durch die Freisetzung bestimmter Peptide, die Neigung der Biere zu spontanem Übersäumen. Mit ansteigenden Konzentrationen und mit zunehmender Wirkintensität (in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur) kommt es ferner zu einer deutlichen Verschlechterung der Schaumhaltbarkeit, was den Zusatz von Schaumstabilisatoren erforderlich macht. [SCHUR 1979, SCHUR 1980c, DADIC und LAVALLEE 1983].

Die Anwendung von selektiver wirkenden proteolytischen Enzymen stellt einen interessanten Ansatz der jüngeren Vergangenheit dar, Biere auch mittels enzymatischer Methoden auf spezifische Weise zu stabilisieren. So isolierte die holländische Firma DSM Food Specialties eine Prolin-spezifische Endoprotease aus *Aspergillus niger* (pH-Optimum 4-5), welche ihre proteolytische Aktivität ausschließlich auf das proteingebundene Prolin richtet, ohne dabei den Gehalt an freien Aminosäuren im Bier zu erhöhen und ohne signifikant negativen Effekt auf Schaumhaltbarkeit und Geschmack. Die Zugabe des Enzympräparates erfolgt nach Herstellerangaben im Kaltbereich in die Würze kurz vor dem Anstellen (ca. 2 ml/hl) und resultiert in einer besseren Trübungsstabilität bezogen auf eine unstabilierte Referenzprobe. Im Vergleich zu Kieselgel- bzw. PVPP-stabilisierten Bieren zeigt die 90 °-Trübungsmessung der Protease-Biere jedoch deutlich höhere Ausgangswerte, die sich erst im Laufe forcierter Alterung zugunsten letzterer verbessern. Als Ursache der hohen Ausgangstrübung gilt die vergleichsweise größere Konzentration an sehr feinen Partikeln mit einem Durchmesser von

etwa 0,2 µm in den Protease-Bieren. Dabei handele es sich allerdings um „unsichtbare“ Trübungen, die zwar analytisch mittels 90 °-Streulicht, nicht jedoch visuell nachgewiesen werden können. Nach Nguyen et al. stellt der Einsatz Prolin-spezifischer Proteasen eine Alternative zur Kaltstabilisierung dar und ermöglicht eine Reifung bei vergleichsweise höheren Temperaturen und damit eine Verkürzung der Lagerzeit, resultierend in geringeren Investitions- und Energiekosten. Bezüglich der Beeinflussung des Proteinspektrums, des Ablaufs der Gärung, des Filtrationsverhaltens sowie der Vollmundigkeit und Geschmacksstabilität wurden keine Angaben gemacht [LOPEZ et al. 2005, VAN ROON et al. 2007, NGUYEN et al. 2008].

Der Abbau an der Trübung beteiligter Polysaccharide erfolgt ausschließlich auf enzymatischem Wege und geht in der Regel mit einer verbesserten Filtrierbarkeit einher. Ein Zusatz von Amyloglucosidase vermag in hohen Konzentrationen die Schaumhaltbarkeit zu beeinträchtigen. Gleichzeitig verstärkt die beim Abbau freigesetzte Glucose den Süßgeschmack des Bieres und vermindert die mikrobiologische Stabilität. Weitere Enzympräparate enthalten α-Amylasen oder Endo-β-Glucanasen bzw. Enzyme, die aus Kaltauszügen der Maische gewonnen werden [SCHUR 1979, SCHUR 1980c].

Zur Inaktivierung der Enzyme und aufgrund der fehlenden Sterilisierbarkeit von Enzympräparaten (mikrobiologisches Risiko) ist grundsätzlich eine Pasteurisation der Biere unumgänglich. Zudem ist zu beachten, dass die Enzymaktivität mit zunehmender Aufbewahrungszeit der Präparate kontinuierlich sinkt. Als weiterer Nachteil gilt die Tatsache, dass die Enzyme (aktiv oder inaktiviert) im Bier verbleiben, was einem Einsatz im Rahmen des Reinheitsgebotes im Wege steht [SCHUR 1979, SCHUR 1980c, DADIC und LAVALLEE 1983, NIEMSCH 2000].

2.5.3.4 Antioxidative Stabilisierungsmaßnahmen

Die Ascorbinsäure ist das am häufigsten zur sauerstoffseitigen Stabilisierung eingesetzte Antioxidans. Ihre Einsatzkonzentration sollte unter 20 mg/l betragen, da es sonst zu einer Beeinträchtigung des Geschmacks kommen kann. Die oxidierte Form der Ascorbinsäure bewirkt eine Zufärbung und kann außerdem eine Oxidation zahlreicher Bierinhaltsstoffe induzieren. Dieser Vorgang kann allerdings durch den Zusatz von schwefelhaltigen Aminosäurepräparaten wie L-Cystein-HCl oder Lysin-HCl inhibiert werden. Diese erhalten offenbar das chemische Gleichgewicht zwischen der reduzierten und der oxidierten Form der Proteine, so Schur [SCHUR 1979, SCHUR 1980c].

Die Stabilisierung mit Schwefeldioxid oder K- bzw. Na-Sulfit innerhalb lebensmittelrechtlicher Grenzen fördert zwar die mikrobiologische und geschmackliche Stabilität, mindert jedoch Bekömmlichkeit und Geschmack des Bieres. Natriumdithionit wirkt stark sauerstoffreduzierend, muss aber in wässriger Lösung mit Natriumisoascorbat stabilisiert werden und bewirkt einen Anstieg des Schwefeldioxidgehalts im Bier [SCHUR 1979, SCHUR 1980c].

Ein Zusatz von Glucoseoxidase-Katalase-Präparaten (1-2 ml/hl) hat sich aus Kostengründen nicht bewährt [SCHUR 1979, SCHUR 1980c].

Die Verringerung der Schwermetalle ist prinzipiell zu den antioxidativen Stabilisierungsmaßnahmen zu zählen, da diese oxidationskatalytisch wirken (siehe Kapitel 2.4.1). Eine Möglichkeit stellt in diesem Zusammenhang die Komplexierung mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) dar [SCHUR 1979, SCHUR 1980c].

2.5.3.5 Kombinierte Stabilisierung

Die Bierstabilisierung in der Brauerei ist selbstverständlich nicht auf die Anwendung nur einer einzigen Methode begrenzt – so vermag eine Kombination zweier oder mehrerer unterschiedlicher Stabilisierungsmaßnahmen die kolloidale Stabilität um ein beachtliches Maß zu steigern. Dazu ist es jedoch essentiell, die jeweiligen Konzentrationen und Dosagezeitpunkte genau aufeinander abzustimmen.

Nach Raible könne beispielsweise die kolloidale Haltbarkeit eines mit Kieselgel vorstabilisierten Bieres durch den Einsatz von 3-4 g Ascorbinsäure um das Doppelte verlängert werden [RAIBLE 1979].

Eine Kombination aus dem Einsatz (geringer Mengen) proteolytischer Enzyme im Lagertank und der Nachstabilisierung mit Kieselgel bei der Filtration fördere nicht nur die chemisch-physikalische Stabilität, sondern verhindere auch die Enzym-induzierte Verschlechterung von Schaum und Vollmundigkeit und senke die Stabilisierungskosten. Zudem könne auf diese Weise das Enzym nahezu quantitativ aus dem Bier adsorbiert werden [RAIBLE 1979, NIEMSCH 2000].

Ein Tannin-Zusatz beim Schlauchen und eine nachfolgende Kieselgelstabilisierung erlauben die Senkung der Tannin-Konzentration um 75% und des Kieselgels um 60%, bezogen auf den Stabilisierungseffekt der getrennt durchgeführten Stabilisierung [RAIBLE 1979].

In Versuchsdurchführungen von Leiper et al. zeigte sich, dass eine kombinierte Zugabe von Kieselgel (Xerogel) und Hausenblase in den Lagertank eine verbesserte Langzeitstabilität induziert als die Stabilisierung durch die jeweiligen Einzelkomponenten. Die beste Filtrationsleistung resultierte allerdings aus der alleinigen Verwendung von Hausenblase [LEIPER et al. 2002].

In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass eine Kombination von Kieselgel und PVPP, der bis heute gebräuchlichsten Stabilisierungsmittel, die kolloidale Stabilität gegenüber der Einzelstabilisierung deutlich verbessere. Zudem erlaube die kombinierte Anwendung eine Verringerung der eingesetzten PVPP-Menge, was sich sowohl finanziell, als auch hinsichtlich des Reduktionsvermögens der Biere positiv auswirke [RAIBLE 1979, SCHAFFT 1979, OECHSLE und FUSSNEGGER 1990, MCMURROUGH 1998, NIEMSCH 2000]. Bezüglich des optimalen Dosagezeitpunktes der beiden Komponenten bestehen hingegen widersprüchliche Ansichten – so konnte Schafft bei gleichzeitiger Dosierung keinerlei Beeinträchtigung des Stabilisierungseffektes feststellen, wohingegen Raible eine eindeutige Verschlechterung nachwies [RAIBLE 1979, SCHAFFT 1979]. Nach Raible könne die maximale Stabilisierungswirkung nur durch den getrennten Einsatz nacheinander erzielt werden. Zuerst müsse das Kieselgel dosiert werden, beispielsweise in den Lagertank oder zur Vorfiltration mit der Kieselgur und erst im zweiten Schritt das PVPP, welches im vorgeklärten Bier besser zur Geltung komme. Bei der Verwendung von PVPP im Recycling ist diese Vorgehensweise ohnehin obligatorisch. Die Verschlechterung des Stabilisierungsergebnisses bei gleichzeitiger Anwendung bestätigen auch andere Autoren, wobei dies möglicherweise damit erklärt werden könne, dass ein Teil des Kieselgels mit der Eiweißatrappe PVPP reagiert, wodurch sich die Adsorptionsfähigkeit beider Antagonisten zu einem gewissen Teil aufhebt [NARZISS und REICHENEDER 1977, RAIBLE 1979, DADIC und LAVALLEE 1983].

Rehmanji et al. berichtete im Jahre 2000 von einem neu entwickelten Stabilisierungsmittel der Firma ISP, welches eine Mischung aus Xerogel und mikronisiertem PVPP darstellt. Die Dosage des Kombinationsproduktes erfolge wie gehabt über ein Dosagegefäß in den Bierstrom vor dem Kieselgurfilter, erleichtere die Handhabung und reduziere den Verbrauch an Stabilisierungsmitteln. Eine Dosage von 60 g/hl ermögliche einen resultierenden Stabilisierungseffekt, welcher der Zugabe von 20 g/hl PVPP und 95 g/hl Hydrogel (als Einzelkomponenten) entspricht [REHMANJI et al. 2000]. Offen bleibt jedoch die Frage, warum zur Referenzstabilisierung Hydrogel und nicht Xerogel eingesetzt wurde. Von Nachteil sei ferner die Festlegung auf ein bestimmtes Mischungsverhältnis, was die Flexibilität der Stabilisierung mindere, so Niemsch [NIEMSCH 2001].

Rehmanjis Forschungsgruppe stellte zwei Jahre später ein weiteres neuartiges Stabilisierungsmittel auf der Basis von PVPP und Karragen vor, welches 10 Minuten vor Ende der Kochung zugegeben wird. Dieses fördere, verglichen mit einer unstabilierten Referenzprobe bzw. mit der alleinigen Verwendung von Karragen, die Heißtrubabscheidung und Würzeklärung. Ferner senke es die Verluste beim Abziehen der geklärten Würze, beschleunige die Hauptgärung und erhöhe die chemisch-physikalische Stabilität des resultierenden Bieres [REHMANJI et al. 2002].

Leiper et al. sowie Mitchell et al. führten Untersuchungen mit einem Mischprodukt aus amorphem Kieselgel und auf dessen Oberfläche verteiltem PVP durch, das ursprünglich allein zum Zwecke der gerbstoffseitigen Stabilisierung entwickelt wurde. Im Vergleich zu PVPP weist dieses eine geringere Adsorptionskapazität bezüglich im Bier vorhandener monomerer, dimerer und trimerer Flavan-3-ole auf, induziert jedoch dieselbe kolloidale Stabilität sowohl nach forcierter als auch nach natürlicher Alterung. Der Grund für dieses Verhalten dürfte die teilweise Adsorption sensitiver Proteine an das Mischprodukt sein. Auch hier muss die mangelnde Flexibilität im Hinblick auf eine selektive eiweiß- oder polyphenolseitige Stabilisierung berücksichtigt werden [LEIPER et al. 2005, MITCHELL et al. 2005].

2.6 Methoden zur Bestimmung der kolloidalen Stabilität

2.6.1 Detektion ausgewählter Substanzen und Stoffgruppen

Die Bestimmung ausgewählter Substanzen oder Stoffgruppen im Bereich der Proteine und Polyphenole stellt eine Möglichkeit dar, den Stabilisierungseffekt quantitativ zu erfassen bzw. zu protokollieren. Auf diese Weise können jedoch selbst bei Anwendung sehr spezifischer Methoden nur bedingt Rückschlüsse auf die zu erwartende kolloidale Stabilität gezogen werden, da diesbezüglich nicht nur die Konzentration einzelner Trübungsbildner, sondern vielmehr deren Zusammenspiel sowie insbesondere auch der Sauerstoffgehalt und das Reduktionsvermögen des abgefüllten Bieres eine Rolle spielen. Veränderungen wie Oxidation, Polymerisation und Kondensation im Laufe der Bieralterung werden nicht miterfasst, so dass mitunter zwar Teilprognosen im Hinblick auf die Kältetrübung möglich sind, nicht jedoch auf die Dauertrübung. Kombinierte Messungen ausgewählter Trübungsbildner und Trübungsvorläufer der jeweiligen Substanzgruppen dienen allerdings als Grundlage bei der Erstellung von Vorhersagemodellen (siehe Kapitel 2.6.3).

Die spektralphotometrischen Methoden zur quantitativen Bestimmung der Gesamtpolyphenole bzw. der Anthocyanogene (nach Mebak) gelten als relativ unspezifisch in Bezug auf die Erfassung trübungsrelevanter Polyphenole. Die Analyse der Flavanoide nach EBC-Methode erlaubt in diesem Zusammenhang eine etwas detailliertere Aussage [MEBAK 2000, ANALYTIKA-EBC 2008]. Eine selektive Erfassung monomerer, dimerer und trimerer phenolischer Trübungsvorläufer ist jedoch nur durch die Anwendung hochspezifischer Trennverfahren (z.B. HPLC) möglich [MCMURROUGH et al. 1999].

Die Zugabe der Eiweißattrappen PVP (Polyvinylpyrrolidon) oder Cinchoninsulfat, einem stickstoffhaltigen Alkaloid, ermöglicht die Bestimmung „empfindlicher Gerbstoffe“. Cinchoninsulfat reagiert bevorzugt mit höher polymerisierten Polyphenolen, deren Gerbkraft bereits stärker ausgeprägt ist. Bei beiden Tests wird der resultierende Trübungsanstieg zwischen unbehandeltem und behandeltem Bier nephelometrisch gemessen. Eine andere Variante ist der Zusatz von Wasserstoffperoxid und Peroxidase (Peroxidasetest), der zur Oxidation der Polyphenole führt, die dann zusammen mit trübungsrelevantem Protein eine messbare Trübung bilden [MOLL et al. 1976, SCHUR 1980c, BATCHVAROV und CHAPON 1985, BAMFORTH 1999]. Thompson und Forward beschreiben eine Kombination aus Peroxidase- und Cinchoninsulfattest [THOMPSON und FORWARD 1969].

Die Bestimmung sensitiver Proteine durch den Zusatz von Tanninen basiert auf der von Chapon entwickelten Methodik und ist wesentlich aussagekräftiger in Bezug auf den Stabilisierungseffekt und die eiweißseitige Trübungsneigung als die Methoden zur Bestimmung des Gesamtproteins nach Kjeldahl, auf spektralphotometrischem Wege bei 280 nm, mittels BCA-Methode (Bicinchoninsäure) oder durch die CBB-Methode (Bradford Coomassie brilliant blue, gute Empfindlichkeit gegenüber schaumpositiven Proteinen). Nach der Zugabe einer bestimmten Menge an Tanninsäure zum Bier wird die bei Raumtemperatur gebildete Trübung bestimmt, welche aus der Komplexbildung zwischen Gerbstoffen und trübungsrelevanten Proteinen hervorgeht. Alternativ werden einer definierten Menge an Bier ansteigende Konzentrationen an Gallotannin zugesetzt – je mehr Tanninlösung bis zum Erreichen eines gewissen Trübungsgrades nötig ist, desto niedriger ist der Gehalt des Bieres an trübungssensitiven Proteinen. Nach Siebert et al. spricht diese Methodik in besonderer Weise auf die Hordeinfraktion an, wird aber gleichzeitig in geringem Maße durch den Polyphenolgehalt des Bieres beeinflusst. In Kieselgel-stabilisierten Bieren besteht eine gute Korrelation zwischen der Konzentration an sensitiven Proteinen und dem Forciertest bzw. dem Alkohol-Kältetest [THOMPSON und FORWARD 1969, MOLL et al. 1976, SCHUR 1980c,

CHAPON 1994, MCMURROUGH et al. 1999, SIEBERT 1999b, SIEBERT und LYNN 2005, SIEBERT et al. 2005].

Bei der Bestimmung der Ammoniumsulfatfällungsgrenze wird dem Bier solange gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt, bis durch das dadurch ausgefällte Eiweiß eine optisch gerade erkennbare Opaleszenz auftritt. Eine neuere Variante des Tests sieht statt der visuellen Beurteilung eine nephelometrische Titration vor. Nach Batchvarov und Chapon werden dabei vor allem Proteine erfasst, die teilweise schon mit Gerbstoffen komplexiert sind und daher zum Teil bereits dehydratisiert vorliegen. Aus diesem Grund gebe der Ammoniumsulfatfälltest zwar Hinweise auf die im Bier vorhandenen Polyphenol-Protein-Komplexe, nicht jedoch auf die Haltbarkeitsdauer in Bezug auf eine bestimmte Eiweißfraktion. Siebert bestätigte die geringe Korrelation des Tests sowohl zur Trübungsbildung im Forciertest als auch zur Bestimmung der sensitiven Proteine, weshalb die Eignung dieser Methodik eher fraglich sei [THOMPSON und FORWARD 1969, MEBAK 2002, SIEBERT et al. 2005].

Der Esbach-Reaktionstest basiert auf der Fällung höhermolekularer Proteine durch eine Pikrinsäure-Citronensäure-Lösung, wobei die entstehende Trübung spektralphotometrisch erfasst wird. Laut Batchvarov und Chapon besteht eine gute Korrelation zur Kältetrübung [SCHUR 1980c, BATCHVAROV und CHAPON 1985, MEBAK 2002].

Durch Magnesiumsulfat werden hauptsächlich hochmolekulare Proteine gefällt, die eher mit der Schaumhaltbarkeit als mit der kolloidalen Stabilität in Verbindung gebracht werden können. Nach Mebak werden bereits Proteine ab einem Molekulargewicht von 2600 miterfasst [BATCHVAROV und CHAPON 1985, MEBAK 2002].

Trichloressigsäure (TCA) fungiert als spezifisches Fällungsmittel für trübungsrelevante Proteine mit einem Molekulargewicht über 30.000. Zusätzlich werden auch Polypeptide unter 10.000 ausgefällt [BATCHVAROV und CHAPON 1985].

Proteine können außer durch die Anwendung elektrophoretischer und chromatographischer Verfahren auch mittels immunchemischer Methoden erfasst werden, welche sich die ausgeprägte Spezifität von Antigen-Antikörperreaktionen zunutze machen. In Bezug auf die kolloidale Stabilität erscheint besonders die Entwicklung von Antiseren gegen Trübungen oder gegen Adsorbate von Eiweißstabilisierungsmitteln als vielversprechend [PAPP 2000].

Das von Chapon entwickelte „Tannometer“ ermöglicht die automatisierte Messung mehrerer trübungsrelevanter Substanzgruppen sowie die Durchführung des Alkohol-Kältetests (siehe Kapitel 2.6.2). Neben der Messung des Ammoniumsulfat-fällbaren Stickstoffs werden auch

die sensitiven Proteine (mit Gallotannin) und die Tannoide (mit PVP) bestimmt. Darüber hinaus kann durch zwei weitere Methoden mittels Eisendipyridil und 2,6 Dichlorphenolindophenol das Reduktionsvermögen der Biere gemessen werden [O'ROURKE 1994, BAMFORTH 1999].

Schneider stellte im Jahre 1995 ein Gerät zur kombinierten Online-Kontrolle der Bierstabilisierung vor, welches nach dem Prinzip der Streu- und Durchlichtmessung arbeitet und eine kontinuierliche und schnelle Erfassung trübungsbildender Bestandteile während des Filtrations- und Stabilisierungsprozesses ermöglicht. Hierbei werden mittels zweier getrennter Messkanäle gleichzeitig trübungsrelevante Polyphenole und Proteine bestimmt. Zur Fällung trübungsrelevanter Proteine dient das Reagenz P40 (basierend auf Ammoniumsulfat) und zur Kontrolle der Gerbstoffseite das auf PVP basierende Reagenz T125 [SCHNEIDER 1995, NIEMSCH 2001].

2.6.2 Beurteilung der Kälte- und Dauertrübung

Die Kälte- bzw. Alkohol-Kältetests beruhen im Gegensatz zu den unter 2.6.1 genannten Methoden in erster Linie auf dem physikalischen Prinzip der Trübungsbildung durch die Verminderung der Löslichkeit der Trübungsbildner bei Temperaturen von 0 °C oder niedriger. Auf diese Weise wird zwar das Zusammenspiel der bereits im Bier vorhandenen trübungsrelevanten Substanzen berücksichtigt, nicht jedoch das Vorhandensein potentieller Trübungsbildner (Precursor), die erst im Laufe der Bieralterung vor allem unter dem Einfluss des eingebrachten Sauerstoffs, eine mess- und sichtbare Trübung (Dauertrübung) induzieren [SCHUR 1980c]. Beim Alkohol-Kältetest wird das Bier auf -8 °C abgekühlt und mit ansteigenden Mengen an Ethanol (0-6 Vol%) versetzt. Der Alkohol entzieht dabei den Proteinen einen gewissen Wasseranteil, was deren Löslichkeit vermindert und, gefördert durch die Tiefkühlung, zur Ausbildung der nephelometrisch messbaren Kältetrübung führt. Durch den Alkohol-Kältetest werden vor allem die bereits im Bier vorhandenen Polyphenol-Protein-Verbindungen zur Ausfällung gebracht. Als Vorteil dieser Methode gilt die relativ kurze Versuchsdauer von 40 Minuten [MOLL et al. 1976, BATCHVAROV und CHAPON 1985, NARZISS 1994, BAMFORTH 1999].

Die Dauertrübung unter Berücksichtigung sämtlicher im Bier vorhandener obligater und potentieller Trübungsbildner sowie anderer Einflussfaktoren wie Sauerstoff und Bier-pH kann sich in ihrer ursprünglichen Form nur durch normale Lagerbedingungen ausbilden. Die Durchführung der Haltbarkeitsproben (bei 20 °C im Dunklen) erfordert in der Praxis jedoch

zu viel Zeit, weshalb üblicherweise beschleunigte Verfahren zur Anwendung kommen, die einen Wechsel aus Warm- und Kaltphasen beinhalten.

Die am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung der kolloidalen Haltbarkeit des abgefüllten Bieres ist die Durchführung von Forciertests bei 40/0 °C und 60/0 °C, bei denen das Bier abwechselnd für 24 h einer Warm- und einer Kaltphase ausgesetzt wird. Nach der jeweiligen Kaltperiode wird die bei 0 °C entstandene Trübung gemessen, die eine Mischform aus Kälte- und Dauertrübung darstellt. Der Test wird beendet, sobald der Trübungsanstieg über 2 EBC beträgt, oder alternativ, sobald der Absolut-Trübungswert von 2 EBC überschritten wird. Der Ablauf jeweils einer Warm- und einer Kaltphase wird als ein „Warmtag“ bezeichnet. Eine Umrechnung der Warmtage in die tatsächliche Haltbarkeitsdauer, z. B. mittels brauereiiinterner Umrechnungsfaktoren, erscheint wenig sinnvoll, da die Aufbewahrungstemperaturen (z.B. 6 °C im Kühlschrank oder 20 °C bei der Haltbarkeitsprobe) und damit die Geschwindigkeit der Trübungsbildung stark variieren. Bei stark stabilisierten Bieren kann der Test bei 40/0 °C mitunter über 20-30 Warmtage dauern, was als zu zeitaufwändig betrachtet wird. Hier liefert der Test bei 60/0 °C deutlich schnellere Ergebnisse, wobei berücksichtigt werden muss, dass sich das Wesen einer bei 60 °C forcierten Trübung laut Papp wesentlich von einer 40 °C-Trübung bzw. von einer normalen Dauertrübung unterscheidet. Eine zeitsparende Variante des Forciertests ist die Aufbewahrung des Bieres für 5 Tage bei 60 °C, danach 1 Tag bei 0 °C und anschließende Trübungsmessung [SCHUR 1980c, MEBAK 2002, NARZISS 1994, MCMURROUGH et al. 1999, PAPP 2000]. Sämtliche weiteren in der Vergangenheit vorgeschlagenen Modifikationen des Forciertests, wie beispielsweise der Schnellküvettest von Ludwig et al., zielten in erster Linie darauf ab, die Trübungsbildung zu beschleunigen und damit die Analysendauer zu reduzieren [LUDWIG et al. 1986]. Aus unterschiedlichen Gründen, insbesondere wohl aber aufgrund der zum Teil mangelhaften Vergleichbarkeit in Bezug auf die Originalmethode, konnte sich jedoch keine dieser Varianten durchsetzen.

Die Anwendung von Forciertests stellt bis heute die einzige Möglichkeit dar, die Trübungsbildung in hinreichend verlässlicher Weise vorherzusagen. Da die Messung in der abgefüllten Flasche bzw. im filtrierten Bier erfolgt, ist jedoch kein Eingriff in den Stabilisierungsprozess mehr möglich [BRIEM und GEIGER 1999, SIEBERT et al. 2005].

2.6.3 Beurteilung der kolloidalen Stabilität anhand von Vorhersagemodellen

Da nur geringe Korrelationen zwischen dem Gehalt einzelner Trübungsbildner und der kolloidalen Stabilität bestehen, ist es sinnvoll, mehrere Beurteilungsparameter, insbesondere die relevanten Polyphenole und Proteine analytisch zu erfassen und die jeweiligen Ergebnisse im Zusammenhang zu betrachten.

McMurrough et al. erstellten ein Modell, das den Gehalt an den Flavan-3-olen Catechin, Epicatechin, Prodelphinidin B3 und Procyanidin B3 (dargestellt als einfache Flavanoide) sowie die Konzentration an sensitiven Proteinen in Bezug zur Trübungsbildung setzt. In diesem Zusammenhang wurde die Zeit bis zum Anstieg der Gesamttrübung (Dauertrübung + Kälte-trübung) unterschiedlich stabilisierter Einheiten eines Basisbieres auf 2 EBC gemessen. Demnach müsse der Gehalt dieses Bieres an Flavan-3-olen durch PVPP-Stabilisierungsmaßnahmen auf unter 1,5 mg/l abgesenkt werden, um bei einer Proteinsensitivität von über 7 EBC eine kolloidale Haltbarkeit von 12 Monaten zu gewährleisten. Alternativ könne diese Haltbarkeit auch bei Flavan-3-ol-Konzentrationen von über 5 mg/l erreicht werden, sofern die Proteinsensitivität durch Kieselgelstabilisierung auf 0,2 EBC reduziert werde [MCMURROUGH et al. 1999].

Berg berichtet von einer mathematischen Kombination der Ergebnisse aus dem Alkohol-Kältetest und einer vereinfachten Methode zur Bestimmung der Ammoniumsulfatfällungsgrenze, die den Ergebnissen des Forciertests (hier Trübungsmessung nach 5 d bei 60 °C bzw. 2 d bei 1 °C) weit mehr entspricht als die Einzelmethoden per se [BERG 1991]. Mehrere Autoren fanden sehr gute Korrelationen zwischen dem Produkt aus trübungsrelevanten Proteinen und Polyphenolen und der Trübungsbildung. Nach O'Rourke korreliert das Produkt aus sensitiven Proteinen und Proanthocyanidinen ($R^2 = 0,965$) mit der Entwicklung der Dauertrübung. Papps Vorhersagemodell ($R^2 > 0,8$) basiert auf dem Produkt aus Flavan-3-olen, Ferulasäure und der Extinktion eines Trübungs-ELISAS (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay) zur Erfassung empfindlicher Proteine. Kusche verwendete das Produkt aus Flavan-3-olen und dem Gehalt des Bieres an proteingebundenem Prolin [O'ROURKE 1994, PAPP 2000, KUSCHE 2005]. Die von einigen Autoren propagierten sehr guten Korrelationen zwischen Trübungsbildnern und kolloidaler Stabilität sind jedoch vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, dass hier meist nur sehr wenige Basisbiere (oft aus einer einzigen Brauerei) zugrunde lagen, welche zu Untersuchungszwecken auf unterschiedliche Weise stabilisiert wurden. Die auf diese Weise gewonnen Ergebnisse sind aufgrund ihrer fehlenden Allgemeingültigkeit nicht ohne weiteres auf den Brauereisektor übertragbar.

Das von Schneider und Raske vorgestellte Messgerät zur Schnellbestimmung der Trübung setzt die relevanten Eiweiß-Gerbstoffverhältnisse durch die Erstellung eines dreidimensionalen „Massen-Diagramms“ mit der kationischen Ladung des Bieres in Beziehung. Zusätzlich zur nephelometrischen Titration der Trübungsbildner wird mittels Polyelektrolyttitration die kationische Ladung als dritter Parameter bestimmt, welche entscheidenden Einfluss auf die Trübungsbildung nehme, so Schneider und Raske [SCHNEIDER und RASKE 2000]. Über die Korrelation der Ergebnisse dieser Methodik zum Forciertest oder zur Haltbarkeitsprobe liegen keine Angaben vor. Auch die von Titze et al. vorgestellte Ladungstitrationsmethode basiert auf der Messung der Oberflächenladung mittels Polyelektrolytlösung, erlaube jedoch zusätzlich die Messung des Strömungspotentials, welches in linearem Zusammenhang mit dem Zetapotential stehe. Letzteres erhöhe sich parallel zur besseren kolloidalen Haltbarkeit der Biere. Die Anwendung dieser Methode weise im Vergleich zum Forciertest einen entscheidenden Vorteil auf, so Titze et al. – das titrierte Differenzvolumen zeige bereits zu Beginn der Bieralterung eine deutliche Abnahme, wohingegen der Forciertest zunächst eine lag-Phase durchläuft, in welcher noch keine Prognosen im Hinblick auf die zu erwartende Stabilität getroffen werden können [TITZE et al. 2008a, TITZE et al. 2008b]. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch die Anwendung der Ladungstitrationsmethode keine Informationen über die Ursachen einer erhöhten Trübungsbildungs-Wahrscheinlichkeit liefert und somit, im Vergleich zu Vorhersagemodellen auf der Grundlage von Protein- und Polyphenolmessungen, keine selektiven Stabilisierungsmaßnahmen ermöglicht.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial und Rohstoffe

Das Malz zur Herstellung von Versuchsbieren im Pilotmaßstab stammte aus unterschiedlichen Chargen großtechnischer Betriebe. Als Brauwasser wurde, sofern nicht anders angegeben, destilliertes Wasser verwendet.

Für Versuche mit Fokus auf die Würzekochung, Gärung oder Filtration bzw. Stabilisierung wurde die entsprechende Würze bzw. das Bier aus der laufenden Produktion einer Brauerei entnommen. Ferner wurden untergärige Verkaufsbiere verschiedener deutscher Brauereien untersucht.

Sämtliche verwendeten Hopfenprodukte wurden von der Firma Hopsteiner zur Verfügung gestellt.

Zum Anstellen der Würze diente ausschließlich Presshefe vom Stamm W 34/78 der Hefebank Weihenstephan.

3.2 Die Pilotbrauerei

Bei der 60 l-Pilotsudanlage des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II handelt es sich um ein 4-Gerätesudwerk, bestehend aus Maischebottich, Läuterbottich, Würzepfanne und Whirlpool. Die Würzekühlung erfolgt über einen zweistufigen Plattenwärmetauscher.

Die Hauptgärung wird in 20 bzw. 30 l-Gärtanks (zylindrokonisch) durchgeführt. Zur Reifung und Lagerung werden 10 bzw. 20 l-Druckbehälter (Corneliusbehälter) oder Brauerei-KEG-Fässer (30 bzw. 50 l) verwendet.

Zur Filtration dient eine Rahmenfilter-Kombination aus Kieselguranschwemmfilter und Schichtenfilter. Die spezifische Filterleistung beträgt 3,5 l/m²h bzw. 1,2 l/m²h bei einem Durchfluss von maximal 0,34 l/h. Die Voranschwemmung setzt sich zu je 20 g aus grober und feiner Kieselgur zusammen. Für die laufende Dosage werden 120 g/l Feingur veranschlagt. Die in dieser Arbeit verwendeten Stabilisierungsmittel PVPP und Kieselgel wurden zusammen mit der Kieselgur in den Bierstrom dosiert.

Die Abfüllung erfolgt mittels Handfüller in 0,5 l-NRW-Flaschen.

3.3 Polyphenolanalytik

3.3.1 Polyphenolspektrum mittels HPLC

Die Probenaufbereitung durch Festphasenextraktion sowie die HPLC-Analytik erfolgten nach der von Kusche beschriebenen Methodik [KUSCHE 2005].

Neben den trübungsrelevanten Flavan-3-olen Catechin, Epicatechin, Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 wurden in dieser Arbeit auch die phenolischen Säuren Vanillinsäure, Kaffeesäure, p-Cumarsäure, Ferulasäure und Syringasäure detektiert. Zur Auswertung der Ergebnisse (siehe Kapitel 4) wurden die einzelnen Flavan-3-ole und phenolischen Säuren, sofern nicht anders angegeben, jeweils als Summe dargestellt. Als neue Substanzen wurden ferner Isoxanthohumol, Co-Multifidolglucosid (2-MPPG), Astragalin und Rutin in das Polyphenolspektrum integriert. Die Detektion aller Substanzen erfolgte mit Ausnahme von Astragalin und Rutin (350 nm) bei einer Wellenlänge von 275 nm.

Abbildung 13 zeigt das bei einer Wellenlänge von 275 nm aufgenommene Chromatogramm eines unstabilierten Bieres.

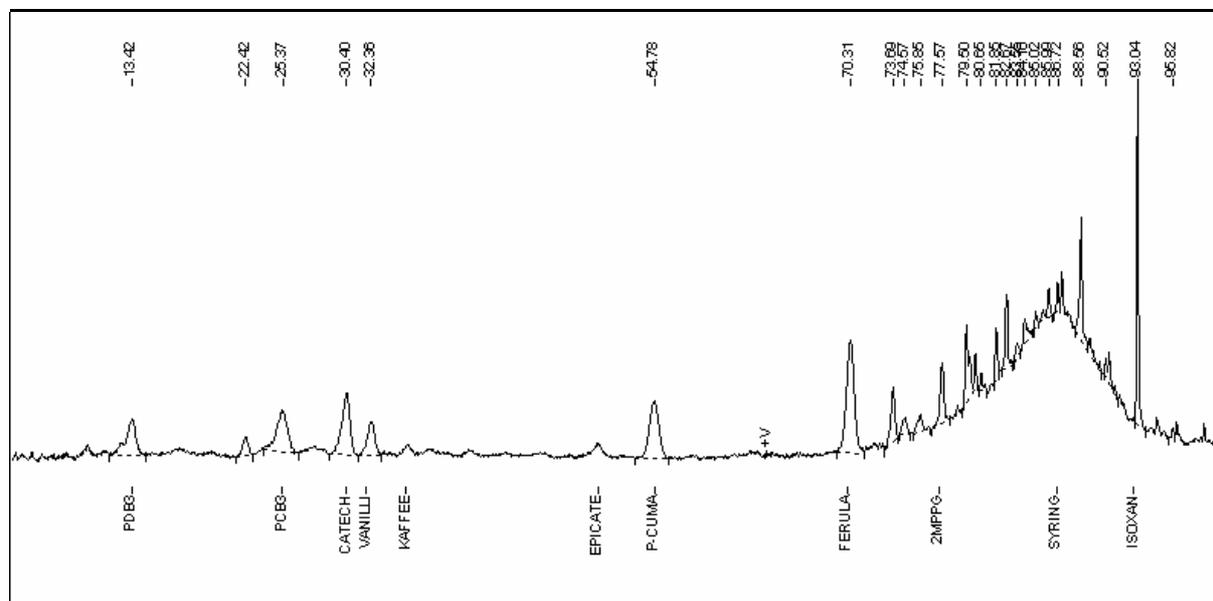


Abbildung 13: Chromatogramm eines unstabilierten Bieres

Tabelle 7 zeigt die Variationskoeffizienten der mittels HPLC-Analytik bestimmbaren Polyphenole (Anzahl der Messungen $n = 20$). Die ermittelten Werte lassen allgemein auf eine sehr

gute Reproduzierbarkeit schließen. Die verhältnismäßig hohen Variationskoeffizienten von Vanillinsäure, Kaffeesäure und Co-Multifidolglucosid werden durch die sehr geringen Konzentrationen dieser Substanzen in Bier (< 0,5 mg/l) relativiert.

Tabelle 7: Reproduzierbarkeit der mittels HPLC-Analytik detektierbaren Substanzen

Substanz	Variationskoeffizient [%]
Prodelphinidin B3	2,2
Procyanidin B3	3,5
Catechin	2,2
Vanillinsäure	10,1
Kaffeesäure	13,7
Epicatechin	9,4
p-Cumarsäure	3,6
Ferulasäure	2,6
Co-Multifidolglucosid	11,9
Syringasäure	3,8
Isoxanthohumol	2,1
Astragalin	4,4
Rutin	3,9

3.3.2 Gesamtpolyphenole

Die Bestimmung der Gesamtpolyphenole erfolgte nach MEBAK II 2.17.1 [MEBAK 2002].

3.3.2 Flavanoide

Die Flavanoide wurden nach der EBC-Methode „9.12 Flavanoids in Beer by Spectrophotometry“ bestimmt [ANALYTIKA-EBC 2008].

3.3.3 Anthocyanogene

Die Anthocyanogene wurden durch das Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität nach der Methode K-B 9.13 1976 analysiert.

3.4 Proteinanalytik

3.4.1 Gesamtlöslicher Stickstoff

Der Gesamtlösliche Stickstoff wurde durch das Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität nach MEBAK II 2.8.1.1 analysiert [MEBAK 2002].

3.4.2 Fraktionierung der Proteine nach Pawlowski-Schild

Die trübungsrelevanten sensitiven Proteine wurden in Form des Tannin-fällbaren Stickstoffs durch das Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität bestimmt. Die Methodik P-Sch III/B/14/b nach Pawlowski-Schild ermöglicht ferner die Bestimmung der nieder- und mittelmolekularen Proteine [PAWLOWSKI-SCHILD 1961].

3.4.3 Freier Aminostickstoff (FAN)

Die Bestimmung des FAN erfolgte nach MEBAK II 2.9.4.1.1 [MEBAK 2002].

3.4.4 Analyse des proteingebundenen Prolins

Die im Folgenden dargestellte Vorgehensweise zur spektralphotometrischen Bestimmung des proteingebundenen Prolins orientiert sich an der Methode nach Wren und Wiggall, wurde aber für die Verwendung in Bier modifiziert [WREN und WIGALL 1964]. Der Variationskoeffizient dieser Methodik für die Prolinbestimmung in einer definierten Menge an Rinderse- rumalbumin (Anzahl der Messungen $n = 20$) beträgt 3,7%.

A) Fällung der Bierproteine mittels Trichloressigsäure (TCA):

Nach Entgasen der Probe: Fällung der Bierproteine mit 20%iger TCA (20 g/100 ml) bei 0 °C (Eisbad) für 1 h. Benötigte Menge: 200 ml je Probe.

Abzentrifugieren des ausgefällten Substanzgemisches bei 13.000 U/min (0 °C, 1 h). Verwerfen des Überstandes und zweimaliges Waschen des Pellets mit 10 ml 100%igem Aceton. Anschließend 15 Minuten bei 0 °C und 13.000 U/min zentrifugieren.

Trocknung des Pellets bei Raumtemperatur im offenen Zentrifugenbecher.

B) Vorbereitung der Reagenzien:

Glycin-Lösung: 4 µmol/ml Glycin in einer Mischung aus Essigsäure und 6 M-Phosphorsäure (Vol% 3:2). Die Lösung ist bei Raumtemperatur mehrere Monate stabil.

Ninhydrin-Lösung: 40 mg/ml Ninhydrin in Essigsäure in ausreichender Menge herstellen. Zur Lösung auf 70 °C erwärmen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur nur für wenige Stunden stabil.

C) Spektralphotometrische Prolinbestimmung im Proteinpellet mittels Ninhydrinlösung:

Schritt 1 - Lösung: Lösung des Pellets mit 20 ml Ameisensäure und quantitative Überführung in das Hydrolyse-Reaktionsgefäß. Zugabe von 0,4 ml Wasserstoffperoxid, dann mischen. Nach 1 h Reaktionszeit Trocknung mittels Rotationsverdampfer (Achtung: Ameisensäure-Rückstände können während Schritt 2 zu Explosionen führen).

Schritt 2 - Hydrolyse: Zugabe von 20 ml 6 N-Salzsäure, Verschließen des Hydrolysegefäßes und Aufbewahrung im Trockenschrank für 20 h bei 110 °C. Nach Ablauf der Zeit Trocknung im Rotationsverdampfer; danach Resuspension mit 50 ml bidestilliertem Wasser.

Schritt 3 - Entfernung basischer Aminosäuren: 2 ml der verdünnten Suspension zusammen mit 775 mg Zeolith (mineralischer Ionentauscher) in ein geeignetes Zentrifugengefäß überführen und 15 Minuten schütteln (in unregelmäßigen Abständen). Danach kurz zentrifugieren und 1 ml des Überstandes in ein verschließbares Reagenzglas (zentrifugierfähig) mit 20 ml Inhalt überführen.

Schritt 4 - Ninhydrin-Reaktion: 2,5 ml Glycin-Lösung und 2,5 ml Ninhydrin-Lösung (Herstellung siehe oben) in das Reagenzglas geben, dieses verschließen und schütteln. Danach 40 Minuten Reaktionszeit bei 95°C (Wasserbad) einhalten. Nach dem Kühlen mit Leitungswasser Zugabe von 20 ml Xylol und Zentrifugieren des Gemisches. Die Messung erfolgt aus der Xylolschicht bei 515 nm im Photometer gegen die Nullprobe (Schritt 3 + 4 mit bidestilliertem Wasser). Die Xylolschicht sollte sich während des Zentrifugierens nicht erwärmen!

Schritt 5: Ergebnis aus der Standardkurve ermitteln. Zur Erstellung der Standardkurve ab Schritt 4 mit 1 ml bidestilliertem Wasser und L-Prolin in verschiedenen Konzentrationen (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 mg/l) arbeiten. Statt 20 ml Xylol werden hier nur 5 ml verwendet.

3.5 Sauerstoffmessung

Die Messung des Sauerstoffs erfolgte mittels des Messgeräts Digox 6 nach MEBAK II 2.32.1.2.2 [MEBAK 2002].

3.6 Reduktionsvermögen

3.6.1 Bestimmung des Redoxpotentials mittels EAA

Die Messung des Redoxpotentials mit dem elektrochemischen Analysenautomat (EAA) erfolgte nach der von Burkert beschriebenen Methode. Dabei können prinzipiell zwei verschiedene Tests durchgeführt werden: Die Cyclovoltametrische Messung zur Bestimmung des mittleren Nullstrompotentials und der elektrochemische Indikatortimetest zur Ermittlung des Stromverhältnisses [BURKERT 2005].

Das mittlere Nullstrompotential (MNP) gibt einen Überblick über das Gesamtpotential der im Medium messbaren Reduktone. Ein höheres Potential weist in diesem Zusammenhang auf eine geringere antioxidative Kapazität hin.

Das mittels elektrochemischen Indikatortimetests ermittelte Stromverhältnis (SV) erlaubt die Messung der schnell (hier innerhalb von 4 Minuten) reduzierenden Substanzen. Ein höheres Stromverhältnis, gemessen in Ascorbinsäure-Äquivalenten, lässt auf ein besseres Reduktionsvermögen schließen.

3.6.2 Bestimmung der DPPH-reduzierenden Aktivität

Die Bestimmung der DPPH-reduzierenden Aktivität erfolgte nach der Methode von Kaneda et al. [KANEDA et al. 1995].

3.6.3 Spektralphotometrischer Indikatortimetest (ITT)

Der spektralphotometrische ITT wurde nach MEBAK II 2.16.1 durchgeführt [MEBAK 2002].

3.7 Bestimmung der kolloidalen Stabilität

Die kolloidale Stabilität der filtrierten und teilweise auch stabilisierten untergärigen Bier wurde mittels Forciertest bei 40/0 °C in Anlehnung an die Methodik nach MEBAK II 2.15.2.1 bestimmt [MEBAK 2002]. Der Test wurde dabei nicht zwangsläufig nach einer Trübungszunahme von nur 2 EBC abgebrochen, sondern mitunter über einen längeren Zeitraum durchgeführt.

Die Ausbildung natürlicher Dauertrübungen über einen definierten Zeitraum wurde mittels Rückstellproben (bei 20 °C, im Dunkeln) verfolgt.

3.8 Weitere Analysen in Bier

Die nachfolgend aufgeführten Analysen wurden durch das Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität durchgeführt.

3.8.1 SCABA-Analytik

Die durch den Servo Chemical Automated Beer Analyser durchgeführten Messungen beinhalten die Bestimmung von spezifischem Gewicht, Alkohol, Stammwürze, Vergärungsgrad, Restextrakt und pH-Wert.

3.8.2 Bestimmung der Schaumhaltbarkeit

Die Messung der Schaumhaltbarkeit erfolgte mittels LG-Foamtester nach MEBAK II 2.19.3 [MEBAK 2002].

3.8.3 Messung der Bierbittere

Die Bestimmung des Bitterwertes erfolgte nach MEBAK II 2.18.1 [MEBAK 2002].

3.8.4 Messung der Bierfarbe

Die Bierfarbe wurde nach MEBAK II 2.13.2 ermittelt [MEBAK 2002].

3.8.5 Analyse der Gärungsnebenprodukte

Die Analyse der Gärungsnebenprodukte erfolgte gemäß MEBAK III 1.1.1/1.2.1 [MEBAK 1996]

3.9 Durchführung von Verkostungen

Einige Biere wurden mittels Dreiecksprüfung nach MEBAK 2.34.7 und nach dem DLG-Prüfschema verkostet [MEBAK 2002]. Zweck der Untersuchung war die sensorische Unterscheidung unterschiedlich behandelter Bierproben sowie die Differenzierung zwischen frischen und gealterten Bieren.

3.10 Statistik

3.10.1 Durchführung und Auswertung der Versuche

Sämtliche Analysen wurden mindestens als Doppel-, in der Regel jedoch als Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Dies bezieht sich sowohl auf die Einzelproben als auch auf die vergleichenden Versuchsreihen in ihrer Gesamtheit. In den zu vergleichenden Ansätzen einer Versuchsreihe wurde dasselbe Basismaterial (z. B. Würze oder Bier) verwendet. Die Reihen selbst basierten im Sinne einer verbesserten Allgemeingültigkeit der Ergebnisse meist auf unterschiedlichem Material. Sofern nicht anders angegeben, werden in dieser Arbeit die arithmetischen Mittelwerte aus allen Versuchsreihen diskutiert. In den Fällen, in denen die Mittelwerte aus verschiedenen Reihen unterschiedlicher Zusammensetzung gebildet werden, wird auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet.

3.10.2 Auswertung der Verkostungsergebnisse

Die Auswertung der Dreieckstests erfolgte nach der Methode MEBAK 2.34.7 [MEBAK 2002]. Für die statistische Überprüfung der DLG-Ergebnisse kam der t-Test für eine zweiseitige

Fragestellung und unter Berücksichtigung unterschiedlicher Signifikanzniveaus (P 95%, P 98% und P 99%) zur Anwendung.

3.10.3 Die Anwendung statistischer Programme zur Korrelationssuche

Neben der Korrelationssuche anhand der Erstellung von Regressionskurven bzw. Regressionsgleichungen wurde in dieser Arbeit auf die Methodik des „data minings“ zurückgegriffen. Die Techniken des Data-Minings dienen der Suche nach Gesetzmäßigkeiten und Korrelationen in großen Datenmengen und werden bereits erfolgreich auf dem Gebiet der Filtration bzw. Filtrierbarkeit angewandt [EBERHARD et al. 2006]. Im Rahmen der Untersuchungen zur Vorhersagbarkeit der kolloidalen Stabilität (siehe Kapitel 4.3) werden sogenannte Entscheidungsbäume („decision trees“) erstellt, mittels derer mögliche Zusammenhänge zwischen den trübungsbildenden Faktoren im frisch abgefüllten Bier und der resultierenden Stabilität aufgedeckt werden sollen. Bei der Anwendung von „decision trees“ handelt es sich um eine klassifizierende Methode, welche Bestandteil des Programms „R“ ist, einer für die Statistik und stochastische Simulation entwickelten Programmiersprache.

3.11 Geräte

Anstichapparatur, Dr. Thiedig & Co., Berlin

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

Eismaschine, Ziegra, Isernhagen

Elektrochemischer Analysenautomat (EAA) und Software zur Auswertung, ME Instrument GmbH, Trappenkamp

Eppendorf Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf Rotor A-4-62, Eppendorf AG, Hamburg

Flaschenschüttelmaschine, Dr. Thiedig & Co., Berlin

Handfüller, Esau & Hueber, Schrobenhausen

HPLC Autosampler Serie 200, Perkin Elmer, Düsseldorf

HPLC Dioden Array Detektor Serie 200, Perkin Elmer, Düsseldorf

HPLC Quarternäre Pumpe Serie 200, Perkin Elmer, Düsseldorf

HPLC Totalchrom Auswertesoftware, Perkin Elmer, Düsseldorf

HPLC Turbochrom Auswertesoftware, Perkin Elmer, Düsseldorf

Kältebad 0 °C für Forciertest, eigene Konstruktion

Kronkorker, Esau & Hueber, Schrobenhausen

Pilotfilteranlage, Seitz-Schenk, Bad Kreuznach Pilotsudanlage und zylindrokonische Gär-tanks, BAM, Freising

Rotationsverdampfer VV 2000, Heidolph, Kehlheim

Sauerstoffmessgerät Digox 6, Dr. Thiedig & Co., Berlin

Sorvall Hochleistungszentrifuge RC 5C PLUS, Kendro, München

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

Spektralphotometer Ultrospec 3100 pro, Biochrom Ltd., Cambridge

Trübungsmessgerät Haze Control DT 9011, Optek, Essen

Wärmeschrank FD 115, Tuttlingen

Wärmeschrank UE 500, Memmert, Schwabach

3.12 Verbrauchsmaterialien

Aceton, HPLC-Gradient, Roth, Karlsruhe

Acetonitril, E. Merck, Darmstadt

Ameisensäure, Roth, Karlsruhe

Ammoniaklösung 25%, E. Merck, Darmstadt

3,5-Ammoniumeisen(III)-citrat, E. Merck, Darmstadt

Ascorbinsäure, E. Merck, Darmstadt

Astragalin (Kämpferol-3-Glucosid), Roth, Karlsruhe

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

Carboxymethylcellulose, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

(+)-Catechin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Co-Multifidolglucosid, zur Verfügung gestellt von der Firma Hopsteiner, Mainburg

2,6-Dichlorphenolindophenol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4-Dimethylaminocinnamaldehyde, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

EDTA-Na₂, E. Merck, Darmstadt

(+)-Epicatechin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Essigsäure, HPLC-Gradient, Roth, Karlsruhe

Ethanol absolut Chromasolv, HPLC-Gradient, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ferulasäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Filterschichten BECO Edura, KD 7, KD 10, KDS 15, Steril S 100, zur Verfügung gestellt von der Firma Begerow E. GmbH und Co. KG, Langenlonsheim

Glycin, Roth, Karlsruhe

HPLC-Kartuschen Chromabond PA 1000 mg, Macherey-Nagel, Düren

HPLC-Säule CC 250/4 LiChrosphere 100 RP 18 ec, 5 µm, Macherey-Nagel, Düren

HPLC-Vorsäule CC 8/4 LiChrospher 100 RP 18 ec, 5 µm, Macherey-Nagel, Düren

Isoxanthohumol, zur Verfügung gestellt von der Firma Hopsteiner, Mainburg

Jodacetamide, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Kaffeensäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Kieselgel (Xerogel) Becosorb 1000, zur Verfügung gestellt von der Firma Begerow E. GmbH und Co. KG, Langenlonsheim

Kieselgur fein und grob, zur Verfügung gestellt von der Staatsbrauerei Weihenstephan

Kronkorken, zur Verfügung gestellt von der Staatsbrauerei Weihenstephan

L-Prolin, Roth, Karlsruhe

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

Ninhydrin, Roth, Karlsruhe

NN-Dimethylformamid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

NRW-Flaschen 0,5 l, Braunglas

Oxalsäure, Roth, Karlsruhe

p-Cumarsäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Phosphorsäure 6 M, Roth, Karlsruhe

Procyanidin B3, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Prodelphinidin B3, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PVPP Divergan F, zur Verfügung gestellt von der Firma BASF SE, Ludwigshafen

Rutin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Salzsäure 6 N, Roth, Karlsruhe

Syringasäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Trichloressigsäure, Roth, Karlsruhe

Vanillinsäure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Wasserstoffperoxid, Roth, Karlsruhe

Xylol, Roth, Karlsruhe

Zeolith, Silberstab Onlinehandel

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

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Allgemeine Untersuchungen zum Thema kolloidale Bierstabilität

4.1.1 Die Auswirkungen von Intensivstabilisierung

Der Einsatz von Stabilisierungsmitteln ermöglicht die Erhaltung der Glanzfeinheit untergäriger und filtrierter Biere über den Zeitraum des von der Brauerei gewählten Mindesthaltbarkeitsdatums. Aufgrund der bis heute mangelhaften Vorhersagemöglichkeit der kolloidalen Stabilität vor der Filtration wird in der Regel eine „Blindstabilisierung“ praktiziert, die aus Gründen der Sicherheit oft in überhöhten Dosagen zum Ausdruck kommt. Dies resultiert nicht nur in einer wesentlichen Erhöhung der Kosten für Stabilisierungsmittel, sondern auch in einer merklichen Veränderung der Bierzusammensetzung.

Um diese Veränderungen und deren Einfluss auf die Bierqualität quantitativ zu erfassen, wurden 5 unterschiedliche Chargen Pilsner Bier auf jeweils zwei verschiedene Arten stabilisiert (PVPP und PVPP + Kieselgel) und mit einer unstabilierten Referenzprobe verglichen. Die Stabilisierung erfolgte dabei mit den maximal erlaubten Einsatzkonzentrationen für PVPP (50 g/hl) und Kieselgel (100 g/hl) im Durchlaufkontaktverfahren zusammen mit der Kieselgur. Das Hauptaugenmerk galt der analytischen Erfassung der Polyphenol- und Proteinreduktion im Vergleich zur Referenzprobe sowie der kolloidalen Stabilität der abgefüllten Biere im Forciertest bei 40/0 °C und im Langzeitversuch (Rückstellprobe bei 20 °C im Dunkeln). Von weiterem Interesse waren die Einflüsse auf das Reduktionsvermögen, auf die Schaumhaltbarkeit sowie auf Geschmack und Geschmacksstabilität. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte aus allen Versuchsreihen.

Tabelle 8: Durchschnittliche Polyphenol- und Proteinkonzentration der unstabilierten Referenzprobe

	Gesamtpolyphenole	Flavonoide	Flavan-3-ole	Phenol. Säuren	Gesamt N	Niedermolekularer N	Sensitive Proteine
Konzentration [mg/l]	180	31,9	9,5	2,7	749	477	153

Die Stammwürze der Basisbiere betrug 11,5-11,8 GG%, der Vergärungsgrad 80-84%, der pH-Wert lag zwischen 4,43 und 4,57. Der Sauerstoffgehalt der abgefüllten Flaschen war

< 0,5 mg/l, die Schwankungen innerhalb der 5 Versuchsreihen waren minimal. Tabelle 8 zeigt ergänzend den durchschnittlichen Absolutgehalt der unstabilisierten Referenzprobe an Polyphenolen und Proteinen.

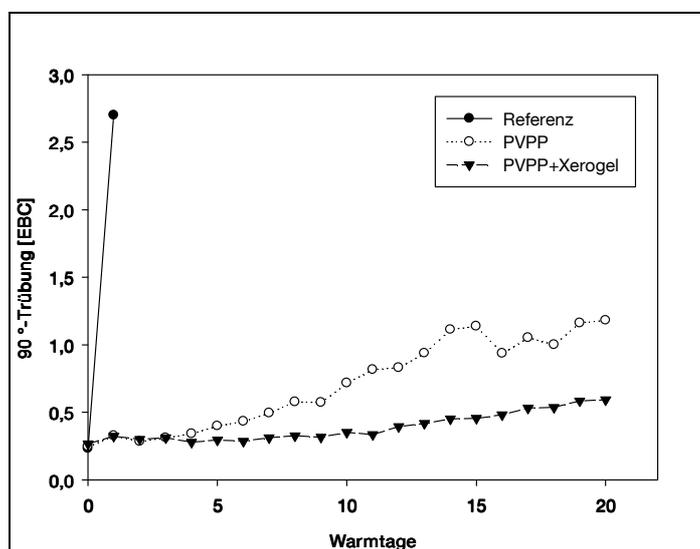


Abbildung 14: Verlauf der 90 °-Trübung in den unterschiedlich stabilisierten Bieren während des Forciertests bei 40/0 °C

Abbildung 14 protokolliert den Verlauf der 90 °-Trübung während des Forciertests über einen Zeitraum von 20 Warmtagen. Während die unstabilisierte Referenzprobe im Durchschnitt bereits nach zwei Warmtagen einen Trübungsanstieg von über 2 EBC verzeichnet, liegt die Trübung des PVPP stabilisierten Bieres selbst nach 20 WT noch unter 1,5 EBC. Die zusätzliche eiweißseitige Stabilisierung mit Kieselgel (hier Xerogel) induziert eine weitere Senkung der Trübung auf etwa 0,5 EBC nach 20 WT, wobei die stabilisierende Wirkung offenbar zum überwiegenden Teil auf den Einfluss von PVPP zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der Trübungsmessung in den Rückstellproben nach 9 Monaten (siehe Tabelle 9) korrelieren im Wesentlichen mit dem Resultat des Forciertests. So zeigt die Kälte-trübung der Referenzprobe bei beiden Messwinkeln mit ca. 17,5 EBC wesentlich höhere Werte als in den stabilisierten Ansätzen (< 2,6 EBC). Das zusätzlich mit Xerogel stabilisierte Bier zeichnet sich durch eine etwas bessere Kältestabilität als das ausschließlich mit PVPP behandelte Bier aus. Die Resistenz der Biere gegenüber der Ausbildung einer Dauertrübung scheint dagegen schon durch die bloße Verminderung der Gerbstoffkomponente erreicht werden zu können, ein zusätzlicher Einsatz von Xerogel hatte diesbezüglich keinen weiteren

positiven Effekt. Die Messung der 90 °-Lichtstreuung bei 20 °C zur Bestimmung der Dauertrübung ergibt verhältnismäßig geringe Unterschiede zwischen der Referenz (2,2 EBC) und den stabilisierten Bieren (0,4 bzw. 0,5 EBC). Hier weist die 11 °-Vorwärtsmessung eine größere Empfindlichkeit zur Detektion der Unterschiede zwischen Vergleichsprobe (8,3 EBC) und Stabilisierungsansatz (0,4 bzw. 0,5 EBC) auf. Dieses Verhalten ist damit erklärbar, dass sich die Dauertrübung im Vergleich zur Kälte-trübung aus größeren Partikeln zusammensetzt, welche bevorzugt durch die Messung des Vorwärtsstrelichts erfasst werden können [WAINWRIGHT 1974, MORRIS 1987].

Tabelle 9: Dauertrübung und Kälte-trübung der unterschiedlich stabilisierten Rückstellproben nach 9 Monaten

Messwinkel	Dauertrübung 20 °C		Trübung nach Kühlung auf 4 °C		Kälte-trübung	
	90 °	11 °	90 °	11 °	90 °	11 °
Referenz	2,2	8,3	19,7	25,7	17,5	17,4
PVPP	0,4	0,4	1,8	3,0	1,4	2,6
PVPP+Xerogel	0,5	0,5	1,8	2,1	1,3	1,6

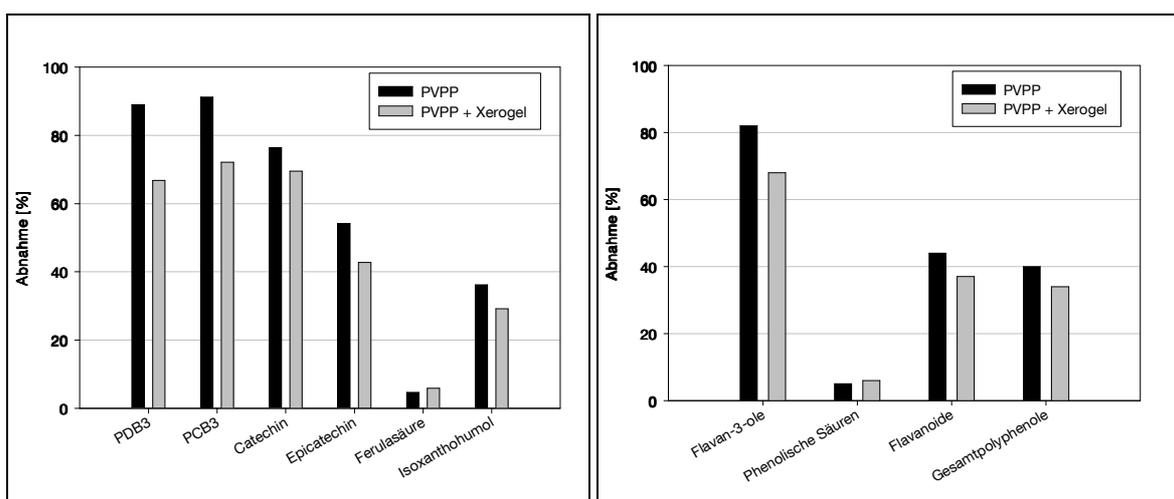


Abbildung 15: Prozentuale Abnahme phenolischer Substanzen durch den Einsatz von Stabilisierungsmitteln, verglichen mit der Referenzprobe

Abbildung 15 verdeutlicht die Abnahme phenolischer Substanzen durch die Dosage hoher PVPP-Konzentrationen. So resultiert ein Zusatz von 50 g PVPP/hl Bier in einer Reduktion der dimeren Flavan-3-ole Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 um durchschnittlich etwa 90% und der Monomere Catechin und Epicatechin um 76 bzw. 54%. In der Summe ergibt sich daraus eine Abnahme der trübungsrelevanten Flavan-3-ole um 82% im Vergleich zur Referenzprobe. Die Ferulasäure sowie die Gesamtheit der detektierbaren phenolischen Säuren werden nur zu sehr geringen Teilen (etwa 5%) entfernt, was die selektive Wirkung von PVPP (siehe Kapitel 2.5.3.2) unterstreicht. Die nur in niedrigen Konzentrationen (< 0,5 mg/l) vorliegenden phenolischen Säuren Kaffeesäure, Vanillinsäure, p-Cumarsäure und Syringasäure werden in dieser Darstellung nicht explizit berücksichtigt.

Trotz der nachweislich guten Selektivität von PVPP werden jedoch offenbar auch andere Substanzen mit zum Teil ernährungsphysiologischer Bedeutung wie z.B. das isomerisierte Prenylflavonoid Isoxanthohumol entfernt (Reduktion ca. 36%, vgl. Abbildung 15).

Als Ergänzung zu den mittels HPLC-Analytik detektierten Polyphenolen ist auch die PVPP-induzierte Verminderung der spektralphotometrisch gemessenen Flavanoide (44%) und Gesamtpolyphenole (40%) graphisch dargestellt (siehe Abbildung 15). Letztere Methoden sind deutlich weniger empfindlich in Bezug auf die Erfassung gerbstoffseitiger Bierstabilisierungsmaßnahmen.

Der gleichzeitige Einsatz von Kieselgel wirkt sich negativ auf die stabilisierende Wirkung von PVPP aus, was sich in einer um 14% niedrigeren Flavan-3-ol-Reduktion sowie einer 6-7%igen Verringerung der Flavanoid- und Gesamtpolyphenolkonzentration äußert. Damit ist auch die etwas höhere Dauertrübung des doppelt stabilisierten Ansatzes im Vergleich zum PVPP-Bier zu erklären. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die „Proteinatrasse“ PVPP und das Kieselgel zu gewissen Teilen miteinander reagieren und sich dadurch gegenseitig inhibieren. Aus diesem Grund sei, wie bereits mehrere Autoren berichteten, ein getrennter Einsatz dieser Stabilisierungsmittel grundsätzlich vorzuziehen. Durch eine Xerogel-Dosage in den Lagertank können, so Kusche, nicht nur trübungsrelevante Proteine, sondern zu geringen Teilen auch an Protein gebundene Polyphenole entfernt werden [NARZISS und REICHENEDER 1977, RAIBLE 1979, DADIC und LAVALLEE 1983, KUSCHE 2005].

Der Einsatz von 50 g PVPP/hl Bier bewirkt neben der fast vollständigen Entfernung der phenolischen Trübungsvorläufer auch eine geringe Reduktion (3%) sensitiver Proteine (siehe Abbildung 16), nicht jedoch des Gesamtstickstoffs oder des niedermolekularen Stickstoffs (nicht dargestellt). Die Reduktion sensitiver Proteine durch PVPP sei auf eine teilweise Ent-

fernung von Eiweiß-Gerbstoff-Komplexen zurückzuführen [WACKERBAUER und ANGER 1984b, OECHSLE und FUSSNEGGER 1995].

Aus einem Zusatz von 100 g Xerogel/hl Bier resultiert nur eine sehr geringe Abnahme des Gesamtstickstoffs (6%), die niedermolekularen Stickstoffsubstanzen (hier nicht dargestellt) werden nicht beeinflusst. Der eiweißseitige Stabilisierungseffekt von Kieselgel kann am besten anhand der Messung sensitiver Proteine (Reduktion 19%) nachvollzogen werden, wobei generell eine Beeinträchtigung durch die gleichzeitige PVPP-Dosage analog zur verminderten Adsorptionsfähigkeit von PVPP als wahrscheinlich gelten darf.

Aufgrund der guten Spezifität von Kieselgel gegenüber den trübungsrelevanten Proteinen (siehe Kapitel 2.5.3.2) wird die Schaumhaltbarkeit der Biere nur in sehr geringem Maße (3%) vermindert. Die PVPP-Dosage hatte hingegen keinerlei Einfluss auf den Schaum.

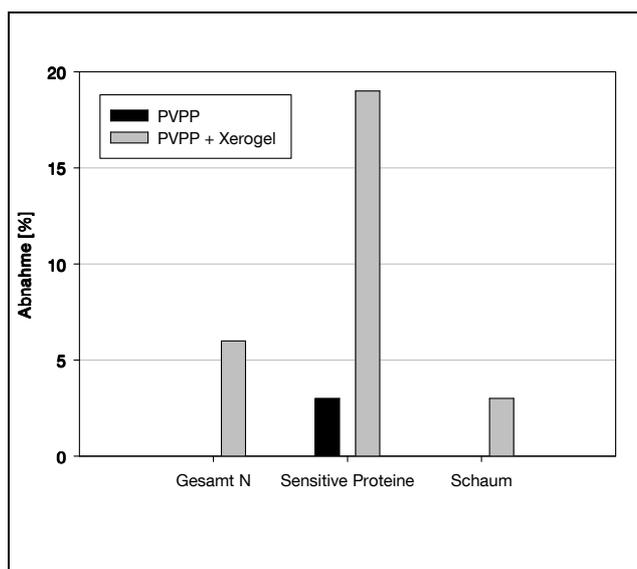


Abbildung 16: Prozentuale Abnahme der Proteine und der Schaumhaltbarkeit durch den Einsatz von Stabilisierungsmitteln, verglichen mit der Referenzprobe

Im Fokus des weiteren Interesses stand die stabilisierungsbedingte Beeinflussung des Reduktionsvermögens (siehe Abbildung 17). Das mittlere Nullstrompotential erhöht sich, gleichbedeutend mit einer Verschlechterung des Gesamt-Reduktionsvermögens, in zunehmendem Maße von der Referenzprobe über das PVPP-stabilisierte Bier bis ins doppelt stabilisierte Bier.

Der elektrochemische Indikator Time Test zur Detektion schnell reduzierender Substanzen protokolliert eine signifikante Verschlechterung des Reduktionsvermögens durch PVPP-Stabilisierung, wobei dieser Effekt durch den Kieselgeleinsatz in geringem Maße abgeschwächt wird. Der Anstieg an Ascorbinsäureäquivalenten im doppelt stabilisierten Bier korreliert mit der oben beschriebenen Verringerung der Polyphenoladsorption durch den gleichzeitigen Einsatz von Xerogel und PVPP.

Da sich das Gesamt-Reduktionsvermögen (MNP) jedoch auch durch die zusätzliche Xerogel-Dosage weiter verschlechtert hat, scheinen mit der Entfernung trübungsrelevanter Eiweiße auch langsam reduzierende stickstoffhaltige Substanzen entfernt zu werden, welche den Anstieg der schnell reduzierenden Substanzen egalisieren.

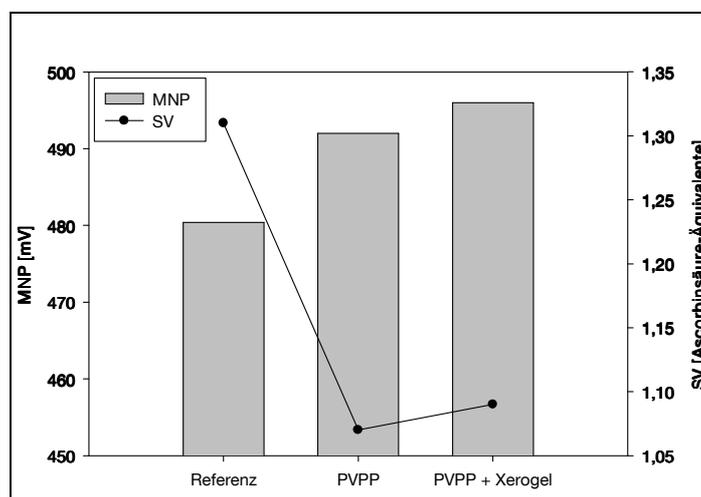


Abbildung 17: Mittleres Nullstrompotential und elektrochemischer ITT in den unterschiedlich stabilisierten Bieren

Die Verkostung der frisch abgefüllten Biere erfolgte mittels Dreieckstest (Anzahl der Verkoster $n = 15$) und ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den stabilisierten Bieren und der Referenzprobe.

Die Verkostung der über 9 Monate natürlich gealterten Biere erfolgte nach DLG-Schema und diente der Beurteilung der Geschmacksstabilität. Dazu wurde jeweils ein mittels PVPP bzw. ein doppelt stabilisiertes Bier mit der Referenzprobe verglichen. Die Auswertung erfolgte mittels t-test für eine zweiseitige Fragestellung. Die Ergebnisse zeigten keine klare Tendenz in Bezug auf die Bevorzugung der unstabilisierten oder stabilisierten Proben. So wurden in

Reihe 1 Geruch und Geschmack der Referenzprobe signifikant besser als in der doppelt stabilisierten Probe beurteilt ($P = 98\%$), wohingegen in Reihe 2 das PVPP-stabilisierte ($P = 99\%$) und in Reihe 3 das doppelt stabilisierte Bier ($P = 98\%$) besser als die Referenz beurteilt wurden. Reihe 4 und 5 ergaben keine signifikanten Flavour-Unterschiede. Trotz einer Verschlechterung des Reduktionsvermögens, vor allem durch die Verwendung von PVPP, konnte keine negative Beeinflussung der Geschmacksstabilität festgestellt werden, was die Ergebnisse anderer Autoren bestätigt [MCMURROUGH et al. 1996, MCMURROUGH et al. 1998, O'ROURKE 1996, SCHLENKER et al. 1999, MIKYSKA et al. 2002].

Es hat sich gezeigt, dass eine Dosage von 50 g PVPP/hl Bier zu einer fast vollständigen und sehr spezifischen Entfernung der Flavan-3-ole, insbesondere der dimeren Proanthocyanidine führt, was in einer signifikant besseren Stabilität gegenüber der Ausbildung von Kälte- und Dauertrübungen resultiert. Die HPLC-Analytik erwies sich in Bezug auf die Kontrolle des Stabilisierungseffekts als wesentlich empfindlicher als die Anwendung spektralphotometrischer Methoden zur Bestimmung der Gesamtpolyphenole und Flavanoide. Neben den Polyphenolen werden durch PVPP zu einem geringen Anteil auch sensitive Proteine adsorbiert, ohne jedoch die Schaumhaltbarkeit zu beeinflussen. Als Nachteil kann die gleichzeitige Entfernung von ernährungsphysiologisch relevanten Substanzen sowie die Verminderung des Reduktionsvermögens durch die Entfernung schnell reduzierender Substanzen angesehen werden, was sich allerdings nicht negativ auf Geschmack und Geschmacksstabilität auswirkt.

Ein zusätzlicher Einsatz von 100 g Xerogel/hl vermag die Kältestabilität des Bieres weiter zu verbessern, nicht jedoch die Widerstandsfähigkeit gegenüber der Ausbildung einer Dauertrübung. Zum Nachweis der eiweißseitigen Stabilisierung eignet sich die Bestimmung sensibler Proteine besser als die Messung des Gesamtstickstoffs. Aufgrund der guten Spezifität der Kieselgele wird die Schaumhaltbarkeit nur in sehr geringem Maße negativ beeinflusst.

Die gleichzeitige Anwendung von Xerogel und PVPP resultiert in einer Verschlechterung des Adsorptionsvermögens beider Substanzen, was hier in einer reduzierten Polyphenoladsorption im Vergleich zu alleiniger PVPP-Stabilisierung zum Ausdruck kommt. Die stabilisierende Wirkung beider Antagonisten kann besser ausgenutzt werden, wenn die Dosage getrennt erfolgt, beispielsweise durch Zugabe von Xerogel in den Lagertank und von PVPP zur laufenden Kieselgurdosage oder im PVPP-Filter [NARZISS und REICHENEDER 1977, RAIBLE 1979, DADIC und LAVALLEE 1983, KUSCHE 2005].

4.1.2 Der Einfluss von Alkohol und pH in unterschiedlich stabilisiertem Bier

In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass neben der Konzentration an Trübungsbildnern auch der Alkoholgehalt und der pH-Wert des Bieres die kolloidale Stabilität bis zu einem gewissen Grad beeinflussen [CURTIS 1966, GRAMSHAW 1970b, SIEBERT 1999a, SPEERS et al. 2003, SIEBERT 2006]. Siebert wies anhand gepufferter Modelllösungen, bestehend aus trübungsrelevanten Proteinen und Polyphenolen im Verhältnis 5:1, ein Maximum an Trübung im Bereich zwischen pH 4,0 und 4,5 nach. Der exakte Wert hänge dabei von der Alkoholkonzentration ab, wie Siebert mittels eines dreidimensionalen Modells (siehe Abbildung 11, Kapitel 2.4.2) erläutert. Demnach sei die Trübungsbildung bei einer Konzentration von 6,0 Vol% am geringsten, oberhalb und unterhalb dieses Wertes steige sie jedoch kontinuierlich an [SIEBERT et al. 1996a, SIEBERT 1999a, SIEBERT 1999b, SIEBERT und LYNN 2003, SIEBERT 2004, SIEBERT 2006].

Eine Versuchsreihe sollte Aufschluss darüber geben, ob auch im komplexen Medium Bier messbare Korrelationen zwischen den Einflussfaktoren pH-Wert bzw. Alkohol und der kolloidalen Stabilität gefunden werden können. Dazu wurden untergärige und unfiltrierte Biere (Anzahl der Proben $n = 10$) während der Filtration auf jeweils drei verschiedene Arten behandelt – ein Teil blieb unstabilisiert, während die anderen beiden Proben mit 50 g PVPP bzw. mit 100 g Xerogel/hl stabilisiert wurden. Die intensive Stabilisierung diene der weitgehenden Eliminierung entweder der Gerbstoffe oder der sensitiven Proteine, da so unter Umständen pH-Wert- bzw. Alkohol-bedingte Unterschiede besser zur Geltung kommen sollten. Zur Beurteilung der Stabilität wurden alle Proben einem Forciertest bei 40/0 °C unterzogen, der nach 4 Warmtagen unabhängig von der gebildeten Trübungsmenge abgebrochen wurde.

Abbildung 18 zeigt zunächst die Trübungszunahme (90 °-Messung) aller Biere nach 4 Warmtagen. Im Mittel beträgt die Trübung der unstabilisierten Probe zu diesem Zeitpunkt etwa 23 EBC, während der PVPP- sowie der Xerogel-Ansatz bei ca. 3 EBC liegen. Eine Dosage von 50 g/hl PVPP hatte demnach durchschnittlich denselben Effekt wie die Anwendung von 100 g/hl Xerogel.

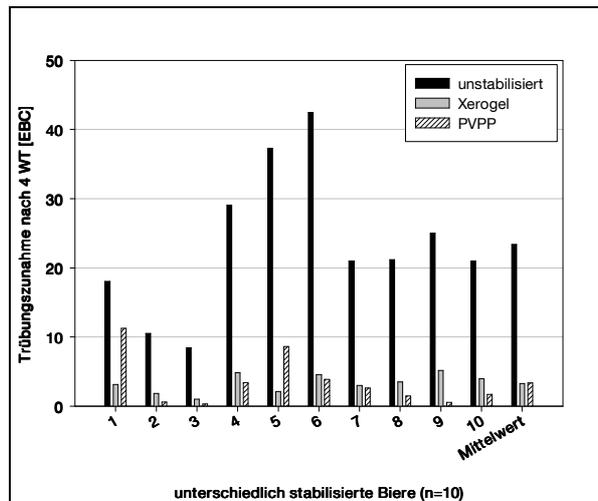


Abbildung 18: Trübungszunahme der unterschiedlich stabilisierten Biere nach 4 Warmtagen

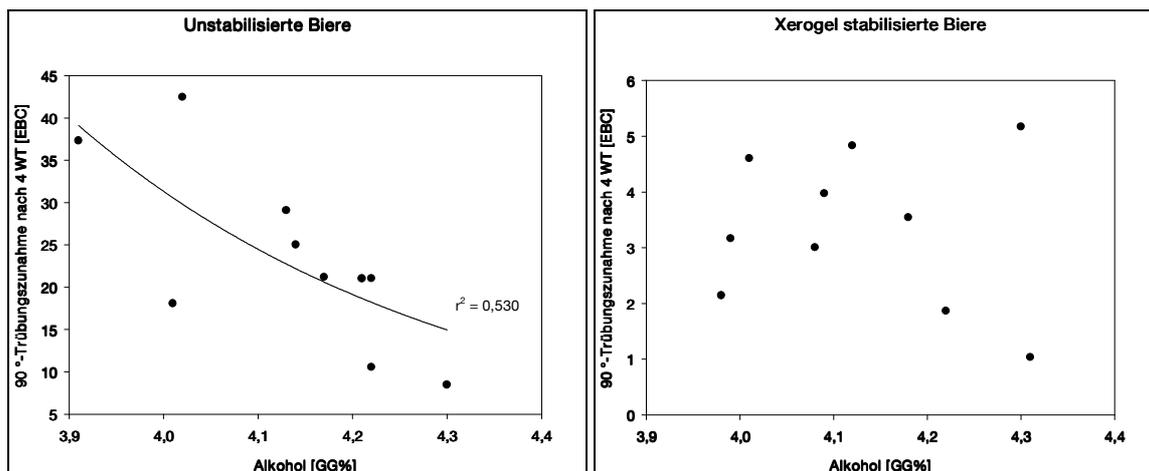


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen Alkoholgehalt und Trübungsbildung in unstabilisiertem und Xerogel stabilisiertem Bier

Aus Abbildung 19 (linke Seite) wird ersichtlich, dass im unstabilisierten Bier nur eine geringe Korrelation zwischen dem Alkoholgehalt der Biere und der resultierenden Trübung besteht. Offenbar wirken sich hier andere Faktoren, insbesondere die Konzentrationen der Haupttrübungsbildner deutlich stärker aus. Tendenziell scheint sich jedoch, in Übereinstimmung mit Sieberts Ergebnissen, die Trübungsstabilität mit zunehmender Alkoholkonzentration zu verbessern, zumindest im untersuchten Bereich zwischen 3,9 und 4,3 GG%.

Im eiweißseitig stabilisierten Ansatz (vgl. Abbildung 19, rechte Seite) ergibt sich ein vergleichsweise noch weniger deutliches Bild. Das Fehlen jeglichen Zusammenhangs zwischen Trübung und Alkohol kann möglicherweise damit erklärt werden, dass sich höhere Alkoholgehalte vor allem auf die Kältestabilität der Biere auswirken, bedingt durch die dehydratisierende Wirkung auf die Bierproteine [GRAMSHAW 1970b]. Die Eliminierung eines Großteils der trübungs sensitiven Proteine durch die Verwendung von Kieselgel wird daher mit hoher Wahrscheinlichkeit gleichzeitig auch den Alkoholeinfluss verringern.

In Übereinstimmung mit der These, dass der Zusammenhang zwischen Alkoholgehalt und Trübungsstabilität in erster Linie auf die Wechselwirkung mit trübungsrelevanten Proteinen zurückzuführen ist, steigt der alkoholbedingte Einfluss mit der Reduktion der Polyphenole, die damit nicht mehr als Bindungspartner für die Proteine fungieren. Die Verminderung der trübungsrelevanten Flavan-3-ole durch die PVPP-Stabilisierung beträgt in dieser Versuchreihe mit Ausnahme von Bier 1 (28%) durchschnittlich etwa 55-80%. Abbildung 20 (linke Seite) zeigt eine klare Korrelation innerhalb der PVPP stabilisierten Biere ($r^2 = 0,90$) in Form einer exponentiellen Abnahme der Trübungsbildung bei ansteigenden Alkoholgehalten. Der rechte Teil der Abbildung stellt zur weiteren Verdeutlichung die Trübungszunahme und den Alkoholgehalt der einzelnen Biere auf zwei Y-Achsen dar – aus dieser Darstellung ergibt sich eine exponentielle Abnahme der Trübungsneigung ($r^2 = 0,93$) bei linear ansteigenden Alkoholgehalten ($r^2 = 0,98$).

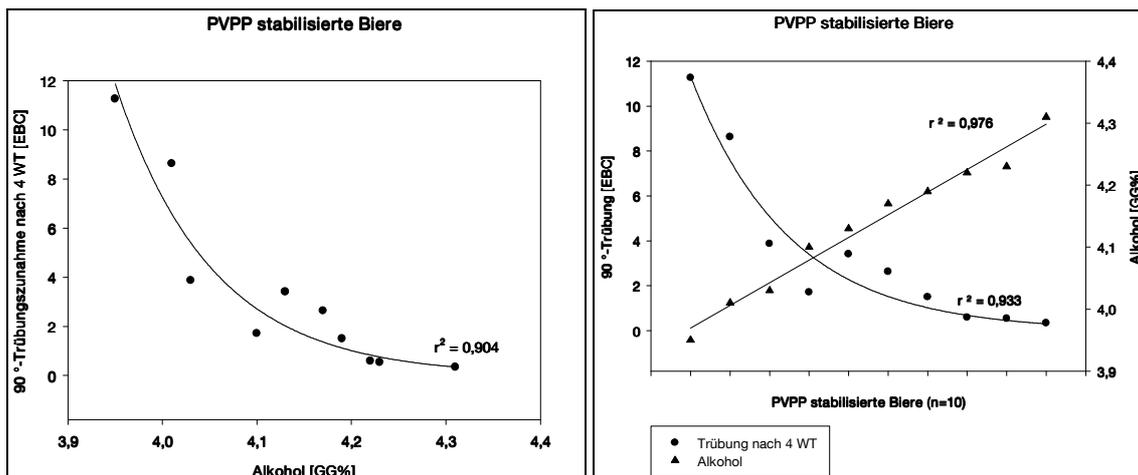


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen Alkoholgehalt und Trübungsbildung in PVPP stabilisiertem

Bier

Die Betrachtung der pH-Werte offenbart in sämtlichen unterschiedlich stabilisierten Ansätzen nur einen geringen Zusammenhang mit der Trübungsbildung (siehe Abbildung 21). Die Bedeutung des pH-Wertes tritt offenbar gegenüber der Relevanz der Haupttrübungsbildner, sowie in den PVPP stabilisierten Bieren auch gegenüber dem Alkoholgehalt, in den Hintergrund. Im unstabilierten Bier ist die Korrelation zur Trübung in etwa vergleichbar mit dem Einfluss des Alkohols, während im Xerogel-Bier eine Verbesserung des Regressionskoeffizienten zu verzeichnen ist.

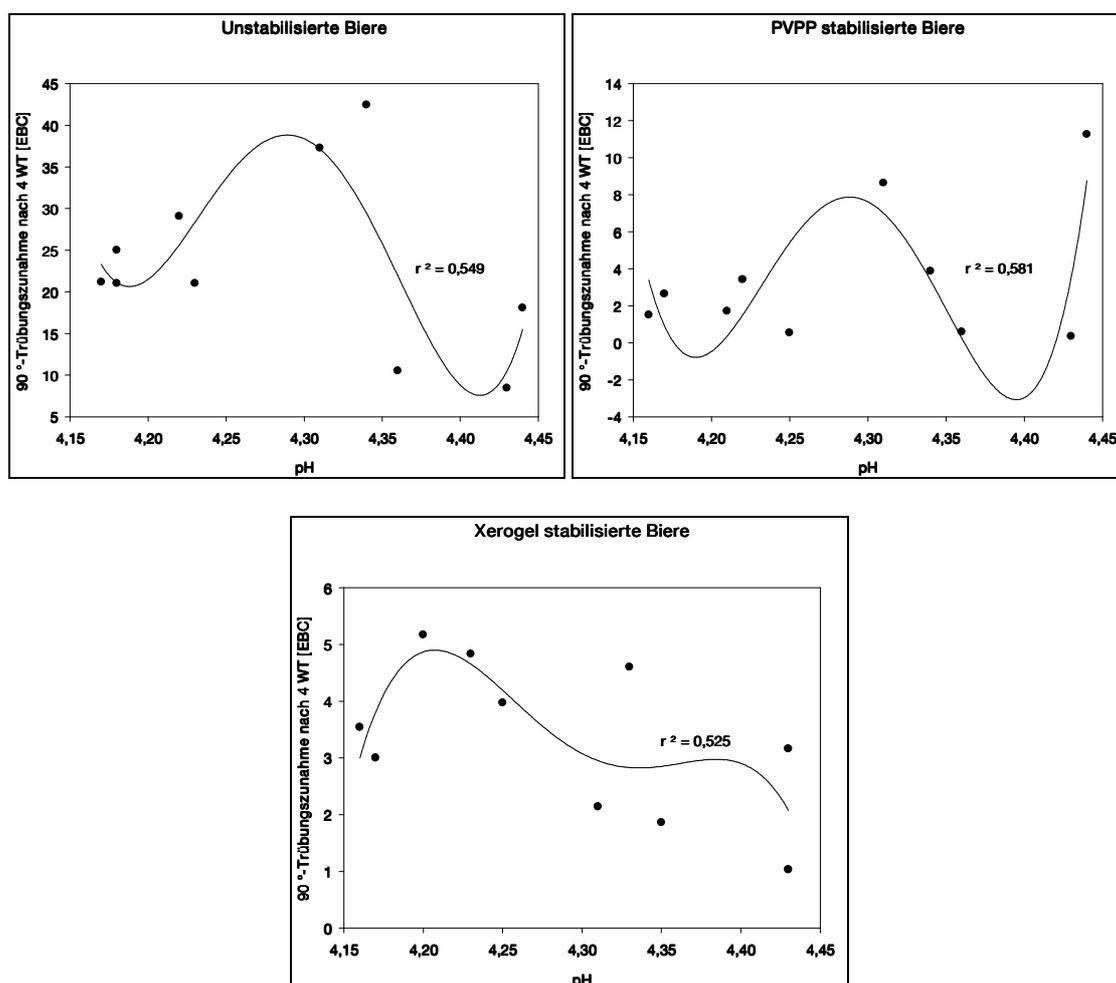


Abbildung 21: Zusammenhang zwischen pH-Wert und Trübungsbildung in unterschiedlich stabilisiertem Bier

Sämtliche Werte liegen, bezogen auf Sieberts Modell, im Bereich maximaler Trübungsbildung zwischen pH 4,15 und 4,45 [SIEBERT et al. 1996a, SIEBERT 1999a, SIEBERT 1999b, SIEBERT und LYNN 2003, SIEBERT 2004, SIEBERT 2006]. Eine differenzierte Betrachtung

dieses Bereichs im Medium Bier liefert nur durch die Anwendung von Regressionsgleichungen fünfter Ordnung Ergebnisse, die auf das Vorhandensein gewisser Trends hindeuten. So kann in den unstabilisierten und PVPP-Bieren ein parabelförmiger Verlauf der Trübungsbildung festgestellt werden, mit einem Maximum im Bereich zwischen pH 4,28 und 4,33. Im eiweißseitig stabilisierten Bier verschiebt sich dieses Maximum in Richtung niedrigerer pH-Werte von etwa 4,20, wobei die Parabelform der Regressionslinie hier deutlich weniger ausgeprägt ist. Nach Gramshaw fördern niedrige pH-Werte die säurekatalysierte Polymerisation der Polyphenole, resultierend in einem Anstieg der Trübungsneigung [Gramshaw 1970b]. Die Verschiebung des Trübungsmaximums könnte daher in der Eliminierung eines großen Anteils trübungsrelevanter Proteine begründet liegen, die in ihrer Funktion als Antagonisten der Polyphenole den Einfluss niedriger pH-Werte bis zu einem gewissen Grad unterdrücken.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Parameter Alkohol und pH-Wert in unterschiedlich stabilisierten Bieren erbrachten einzig im PVPP-Bier eine klare Korrelation zwischen der Alkoholkonzentration und der resultierenden Trübungsbildung im Forciertest. Steigende Alkoholkonzentrationen im Bereich von 3,9-4,3 GG% gehen hier, analog zu den Resultaten von Siebert, mit einer verringerten Trübungsbildung einher [SIEBERT et al. 1996a, SIEBERT 1999a, SIEBERT 1999b, SIEBERT und LYNN 2003, SIEBERT 2004, SIEBERT 2006]. Offenbar verstärkt sich der Einfluss des Alkohols auf trübungsrelevante Proteine durch die Eliminierung phenolischer Trübungsbildner.

Es konnten dagegen keine oder nur geringe Korrelationen zwischen dem Alkoholgehalt und der Trübungsbildung im unstabilisierten sowie im Xerogel stabilisierten Bier und bezüglich des pH-Wertes der Biere (alle Ansätze) gefunden werden.

4.1.3 Das Zusammenspiel von Sauerstoff, Redoxpotential und kolloidaler Stabilität

Wie in Kapitel 2.4.2 erläutert, nimmt der Sauerstoffgehalt der abgefüllten Flasche wesentlichen Einfluss auf die Reaktionskinetik der Trübungsbildung. Je höher der Sauerstoffgehalt, desto schneller verläuft die „Aktivierung“ bzw. Polymerisierung der zunächst noch nicht trübenden Polyphenole zu den eigentlichen Gerbstoffen, was in einer beschleunigten Komplex- und damit Trübungsbildung zusammen mit trübungsrelevanten Proteinen resultiert [CURTIS 1963, GRAMSHAW 1967, DREW 1981, BELLMER 1977, KRETSCHMER 1982, ANGER 1983, MCMURROUGH und HENNIGAN 1984, ANGER 1995, STEWART 2004]. Kusche wies nach Zugabe aktiven Sauerstoffs in Form von H_2O_2 ins abgefüllte Bier parallel zur Trübungsbildung eine signifikante Abnahme der dimeren Proanthocyanidine nach. Die im Vergleich zur unbehandelten Probe unverhältnismäßig starke Trübungsentwicklung deutete jedoch auf die Beteiligung noch weiterer Oxidations-empfindlicher Substanzen hin [KUSCHE 2005].

Mit dem Hintergrund der beschriebenen Problematik zählt die stichprobenartige Messung des Gesamtsauerstoffs in der abgefüllten Flasche zu den obligatorischen Routineuntersuchungen in der Brauerei. Dabei ist darauf zu achten, dass die Messung innerhalb kürzester Zeit nach der Abfüllung erfolgt ($< 2h$), da sich der Sauerstoff ansonsten in zunehmendem Maße chemisch mit den Bierinhaltsstoffen umsetzt und auf direktem Wege nicht mehr nachgewiesen werden kann. Durch Messung des Reduktionsvermögens sind oxidative Schädigungen hingegen auch über einen längeren Zeitraum nachweisbar und stellen damit eine gute Ergänzung bzw. Alternative zur Sauerstoffmessung dar, insbesondere während des Brauprozesses im Heißbereich oder später im Lagertank.

Eine Versuchsreihe, in der untergärige Verkaufsbiere auf drei verschiedene Arten präpariert wurden (ungeöffnet, 1 Minute geöffnet, 5 Minuten geöffnet) sollte Aufschluss über den Zusammenhang zwischen aufgenommener Menge an Luftsauerstoff, dem daraus resultierenden Reduktionsvermögen des Bieres und der kolloidalen Stabilität im Forciertest geben.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus den Untersuchungen aller Biere. Nach der unterschiedlichen Behandlung ergab sich in der ungeöffneten Flasche ein durchschnittlicher Sauerstoffgehalt von 0,2 mg/l, das einminütige Öffnen resultierte in 3,4 mg/l und nach fünfminütigem Öffnen stellte sich ein Wert von 7,1 mg/l ein. Längere Reaktionszeiten brachten keinen nennenswerten zusätzlichen Effekt, da offenbar bereits nach 5 Minuten nahezu atmosphärische Bedingungen im Kopfraum der Flasche vorlagen. Die Methoden zur Messung des Redoxpotentials kamen erst nach fünfzehnminütigem Schütteln und anschließender Reaktionszeit von 24 h zur Umsetzung des Sauerstoffs zur Anwendung.

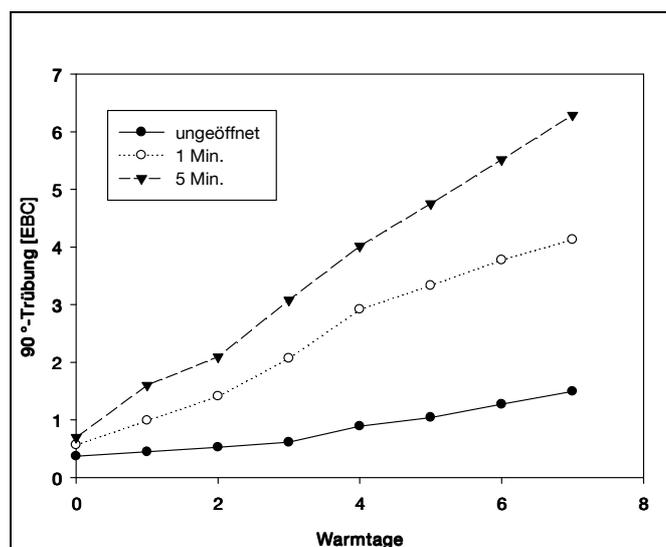


Abbildung 22: 90 °-Trübungsbildung in den unterschiedlich belüfteten Flaschen

Abbildung 22 verdeutlicht den Sauerstoffeinfluss anhand des unterschiedlichen Verlaufs der Trübungsbildung während des Forciertests bei 40/0 °C in den drei Ansätzen. Im ungeöffneten Bier beträgt die 90 °-Trübung auch nach 7 Warmtagen noch weniger als 2 EBC, während das für eine Minute geöffnete Bier bereits nach 3 Tagen die kritische Grenze von 2 EBC überschreitet. Das fünfminütige Öffnen induziert eine weitere Beschleunigung der Trübungsbildung, so dass dieses Bier eine Haltbarkeit von nur mehr 2 Warmtagen aufweist. Interessanter Weise sind bereits Unterschiede in der Ausgangstrübung erkennbar, die darauf hinweisen, dass sich der Sauerstoff sehr schnell mit den Bierinhaltsstoffen umsetzt. Nach 0 WT belüftet sich die Trübung in der Referenzprobe auf 0,4 EBC, die geöffneten Biere weisen hier bereits Trübungswerte von 0,6 bzw. 0,7 EBC auf. Es ist zudem zu berücksichtigen, dass es sich bei den untersuchten Bieren um Verkaufsbiere handelt, die zuvor in der jeweiligen Brauerei auf unterschiedliche Art und Weise künstlich stabilisiert wurden – die Tatsache, dass sich die kolloidale Stabilität dennoch signifikant verschlechtert, unterstreicht den gravierenden Einfluss von Luftsauerstoff in der abgefüllten Flasche.

Abbildung 23 zeigt das Reduktionsvermögen der Biere nach der Kontaminierung mit Luftsauerstoff. So bewirken ansteigende Sauerstoffwerte bereits nach 24 h Einwirkzeit einen Verlust an reduzierenden Substanzen, der mit allen hier angewandten Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden konnte. Sowohl der elektrochemische Indikator Time Test (Stromverhältnis) zur Detektion schnell reduzierender Substanzen als auch der spektralphoto-

tometrische Indikator Time Test (mittels DPI) und die Bestimmung der DPPH-reduzierenden Aktivität belegen die oxidative Schädigung der geöffneten Biere. Das mittlere Nullstrompotential (cyclovoltametrische Messung) verzeichnet einen deutlichen Anstieg vom ungeöffneten bis hin zum 5 Minuten geöffneten Bier, was ebenfalls eine Verschlechterung des Redoxpotentials (schnell und langsam reduzierende Substanzen) bedeutet.

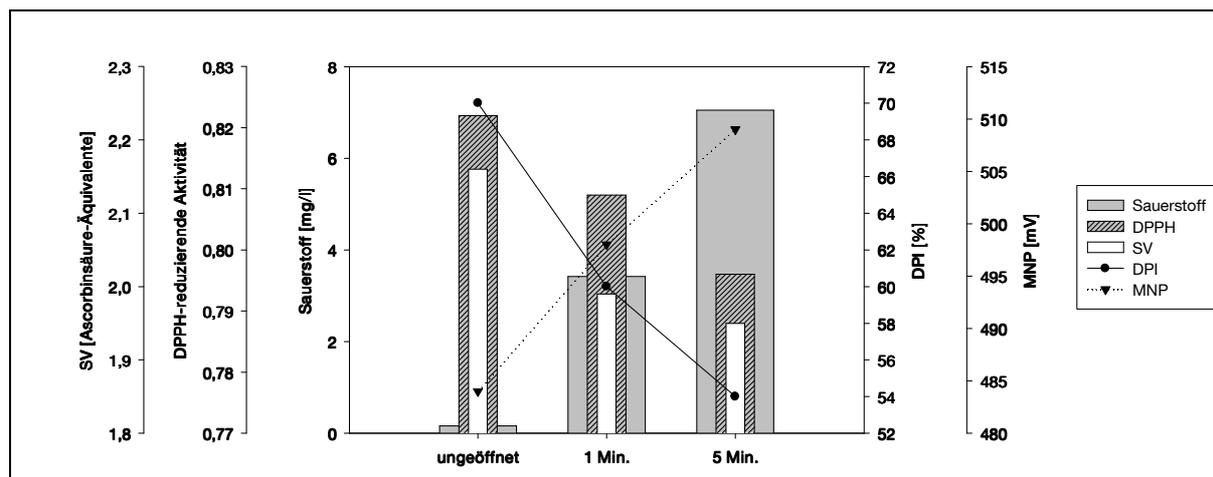


Abbildung 23: Sauerstoffgehalt in den unterschiedlich präparierten Flaschen und Reduktionsvermögen nach 24 h

Es hat sich bestätigt, dass die Kontamination des abgefüllten Bieres mit Luftsauerstoff eine gravierende Verschlechterung der kolloidalen Haltbarkeit zur Folge hat. Die oxidative Schädigung kann nach dem Abreagieren des Sauerstoffs durch die Messung des Reduktionsvermögens erfasst werden.

Der negative Einfluss des Sauerstoffs wirkt sich umso stärker aus, je weiter die Reifung und Lagerung der Biere fortgeschritten sind, da in diesem Stadium der Bierbereitung die Hefe bereits weitestgehend inaktiv ist und infolgedessen den eingebrachten Sauerstoff nicht mehr verwerten kann. Nach der Entfernung der Hefe und der Trubbestandteile durch die Filtration bis hin zum Zeitpunkt der Abfüllung ist die Gefahr einer oxidativen Schädigung der Bierinhaltsstoffe und damit einer reduzierten Trübungsstabilität besonders groß. Unklar ist jedoch, inwieweit sich auch Variationen im Bereich der Würzebelüftung auf die kolloidale Stabilität der resultierenden Biere auswirken und ob oxidative Schädigungen der Würze bis ins unfiltrierte bzw. filtrierte Bier verschleppt werden. Kann die Gärung möglicherweise Unterschiede bezüglich des Würze-Reduktionsvermögens egalalisieren?

Burkert erörtere bereits den negativen Einfluss von Zweit- und Intensivbelüftung auf das Reduktionsvermögen der Biere. So konnte auch nach der Hauptgärung sowie im abgelagerten Bier im Vergleich zur konventionell belüfteten Referenzprobe eine eindeutige Verschlechterung des mittleren Nullstrompotentials (MNP), des Stromverhältnisses (SV) sowie der DPPH-reduzierenden Aktivität nachgewiesen werden. Die oxidative Schädigung konnte jedoch nicht durch Veränderungen bezüglich der Polyphenolzusammensetzung nachvollzogen werden. Die Konzentrationen der unterschiedlich belüfteten Ansätze an Gesamtpolyphenolen, Flavanoiden und Anthocyanogenen zeigten keine signifikanten Unterschiede oder Trends [BURKERT 2005]. Auch Kusche konnte nur geringe Unterschiede bezüglich der Polyphenolzusammensetzung der Biere nach unterschiedlicher Belüftung feststellen. Einzig eine Würze, die durch die Zugabe eines Äquivalents von 2,0 mg/l Sauerstoff in Form von Wasserstoffperoxid belüftet wurde, führte zu einer signifikanten Verringerung der Flavan-3-ole im abgelagerten Bier, was auf eine oxidative Schädigung schließen ließ [KUSCHE 2005].

Eine weiteres Projekt, welches die Analysenmethoden von Burkert und Kusche kombinierte, sollte Aufschluss darüber geben, wie sich konventionelle Belüftung (ca. 8 mg/l O₂) im Vergleich zu einer unbelüfteten Referenzprobe bezüglich des Reduktionsvermögens, der Polyphenolzusammensetzung und der kolloidalen Stabilität auswirkt. Dazu wurden vier unterschiedliche Basiswürzen auf jeweils zwei unterschiedliche Arten belüftet (ohne Belüftung und konventionelle Belüftung) und unter denselben Bedingungen und mit derselben Anstell-Hefezellzahl vergoren, kalt gelagert, filtriert und abgefüllt. Die Messung der phenolischen Substanzen sowie des Redoxpotentials erfolgte in der Würze (vor der Belüftung), im abgelagerten Bier (Unfiltrat) und im Filtrat. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aller vier Versuchsreihen. Ein Forciertest sollte zudem Informationen hinsichtlich der resultierenden kolloidalen Stabilität der Biere liefern.

Abbildung 24 verdeutlicht die Abnahme sowohl der Gesamtpolyphenole als auch der Anthocyanogene und Flavan-3-ole von der Basiswürze (vor der unterschiedlichen Belüftung) bis ins abgelagerte Bier (Unfiltrat). Die Polyphenolreduktion ist bedingt durch die Adsorption phenolischer Substanzen an die Hefezellwände während der Gärung und durch die Ausfällung von Eiweiß-Gerbstoff-Komplexen während der Kaltlagerung [GRAMSHAW 1970a, GROMUS 1981, ANGER 1983, MOLL et al. 1974, MOLL et al. 1984, WACKERBAUER und ANGER 1984a, SCHUR 1987].

Die Unterschiede bezüglich der Unfiltrat-Polyphenolzusammensetzung zwischen der unbelüfteten und belüfteten Probe sind hingegen nur sehr gering und erweisen sich im Mittel als

nicht signifikant. Auf die Darstellung der Konzentrationen im Filtrat wurde hier verzichtet, da die resultierenden Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen auf Unregelmäßigkeiten während der Filtration im Pilotmaßstab zurückzuführen waren und nicht etwa auf die unterschiedliche Würzebelüftung.

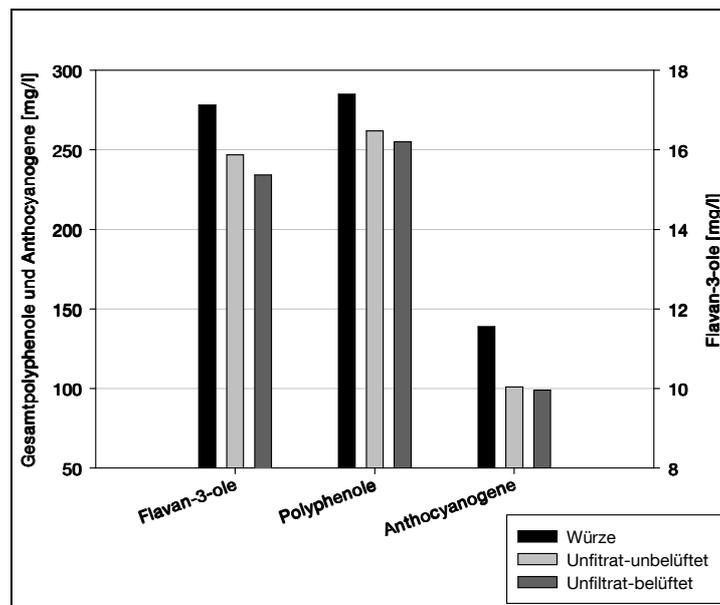


Abbildung 24: Phenolische Substanzen in der Ausgangswürze und im Unfiltrat der unterschiedlich belüfteten Ansätze

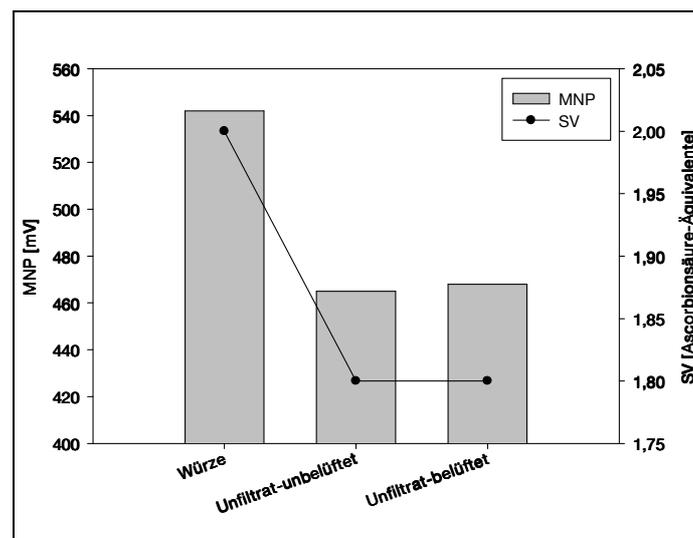


Abbildung 25: Redoxpotential in der Ausgangswürze und im Unfiltrat der unterschiedlich belüfteten Ansätze

Analog zu den nahezu identischen Konzentrationen der Polyphenole im Unfiltrat sind keine Unterschiede bezüglich des Reduktionsvermögens zwischen dem unbelüfteten und dem belüfteten Ansatz festzustellen (siehe Abbildung 25). Sowohl das mittlere Nullstrompotential (Gesamtpotential) als auch das Stromverhältnis (schnell reduzierende Substanzen) verändern sich während der Gärung und Lagerung in beiden Ansätzen im selben Umfang. Das mittlere Nullstrompotential verringert sich von der Würze ins Bier, gleichbedeutend mit einer Verbesserung des Reduktionsvermögens, bedingt durch die Neubildung reduzierender Substanzen durch die Hefe. Überraschenderweise ist gleichzeitig eine leichte Verschlechterung des Stromverhältnisses zu konstatieren, was auf eine Verringerung der schnell reduzierenden Substanzen hindeutet. Offenbar induziert die Gärung also in erster Linie die Neubildung langsam reduzierender Substanzen.

Der Forciertest im abgefüllten Bier brachte aufgrund der unvermeidlichen Schwankungen während der Filtration im Pilotmaßstab keine Ergebnisse, die eindeutig auf die unterschiedliche Würzebehandlung zurückzuführen waren, weshalb hier auf eine gesonderte Darstellung verzichtet wurde. Anhand der protokollierten Polyphenolkonzentrationen im Unfiltrat sind jedoch grundsätzlich keine Unterschiede bezüglich der kolloidalen Stabilität zu erwarten.

Es hat sich gezeigt, dass durch konventionelle Würzebelüftung kein negativer Effekt auf die Polyphenolzusammensetzung und das Reduktionsvermögen des fertigen Bieres zu erwarten ist. Der Vergleich mit der unbelüfteten Referenzprobe lieferte keinerlei Hinweis auf eine oxidative Schädigung des Bieres. Soweit vorhanden, scheinen sich Unterschiede im Hinblick auf den Oxidationszustand der Würze im Laufe der Gärung und Lagerung zu egalisieren. Es sei darauf hingewiesen, dass eine adäquate Würzebelüftung auf etwa 8 mg/l Sauerstoff in der Regel einen beschleunigten Extraktabbau bzw. Gärverlauf induziert, weshalb diese Vorgehensweise prinzipiell dem Verzicht auf Belüftung vorzuziehen ist.

4.1.4 Das Trübungsbildungspotential ausgewählter phenolischer Substanzen

In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass die Flavan-3-ole in ihrer Funktion als Trübungsvorläufer die Polyphenole mit der größten Trübungsrelevanz darstellen [GRAMSHAW 1969a, BELLMER 1977, DELCOUR et al. 1984, SIEBERT et al. 1996b, KUSCHE 2005]. Über die Rolle der im Bier detektierbaren phenolischen Säuren ist hingegen bisher nur sehr wenig bekannt. Einzig der konzentrationsstärksten phenolischen Säure, der Ferulasäure, wird eine Beteiligung an der Trübungsbildung zugeschrieben [HARRIS 1965, PAPP et al. 2001, SZWAJGIER et al. 2005]. So stellte Papp bei einer Zugabe von bis zu 1 mg/l Ferulasäure zu einem PVPP-stabilisiertem Bier mit einer Grundkonzentration von 0,95 mg/l Ferulasäure eine Verschlechterung der kolloidalen Stabilität fest, bei einer Zugabe von 2-5 mg/l jedoch eine Verbesserung. Dies könnte nach Papp damit erklärbar sein, dass die Ferulasäure ihre antioxidative Wirkung erst bei höheren Konzentrationen entfaltet [PAPP 2000, PAPP et al. 2001].

Eine Versuchsreihe, in der unfiltrierte Biere zur Minimierung des Einflusses der Flavan-3-ole zunächst mit 50 g/hl PVPP stabilisiert und anschließend bei der Abfüllung mit ansteigenden Konzentrationen ausgewählter phenolischer Substanzen (Ferulasäure, Vanillinsäure, p-Cumarsäure, Isoxanthohumol) versetzt wurden, sollte weitere Informationen über deren Trübungsbildungspotential liefern.

Dabei wurde jeweils das stabilisierte Basisbier (Referenz) mit zwei weiteren Ansätzen verglichen, die ansteigende Konzentrationen der entsprechenden Substanz enthielten. Zur Beurteilung der kolloidalen Stabilität diente der Forciertest bei 40/0 °C, wobei hier das Bier aufgrund der sehr hohen Grundstabilität 5 Tage am Stück bei 40 °C und anschließend 1 Tag bei 0 °C aufbewahrt wurde, woraufhin dann die Trübungsmessung erfolgte. Wichtiger Bestandteil der Analysen war die Bestimmung des Reduktionsvermögens der verschiedenen Ansätze auf elektrochemischem Weg. Um den Einfluss anderer Substanzen auf die Trübungsbildung ausschließen zu können, wurden das HPLC-Polyphenolspektrum, die Konzentrationen an Gesamtpolyphenolen und Flavanoiden sowie das Proteinspektrum (Gesamtstickstoff, Tannin fällbarer N, niedermolekularer N) protokolliert. Standardmäßig wurden ferner Restextrakt, Vergärungsgrad, Alkoholgehalt, pH-Wert und Gesamtsauerstoff in der abgefüllten Flasche bestimmt. Die Sauerstoffaufnahme betrug allgemein < 0,50 mg/l.

Die jeweiligen Substanzen wurden zunächst in Ethanol (5%) gelöst und vor der Abfüllung in die Flaschen dosiert. Das vorgelegte Volumen betrug 2 ml, wobei die Konzentrationen grundsätzlich auf die Zugabe von 3 bzw. 6 mg/l berechnet waren (Ausnahme Isoxanthohumol mit 1,5 bzw. 3 mg/l). Die mittels HPLC-Analytik gemessenen Absolutmengen im Bier

(siehe Tabelle 10) waren dabei in Abhängigkeit von der Löslichkeit der jeweiligen Substanz in Ethanol und Bier gewissen Schwankungen unterworfen. Insbesondere Vanillinsäure und Isoxanthohumol zeichneten sich durch ein mangelhaftes Lösungsverhalten aus.

Tabelle 10: Absolutkonzentrationen [mg/l] der untersuchten Substanzen in der Referenzprobe und in den Ansätzen nach Zusatz

Substanz	Referenz	Zusatz +	Zusatz ++
Ferulasäure	1,29	3,00	4,81
Vanillinsäure	0,34	1,26	2,02
p-Cumarsäure	0,48	2,03	3,27
Isoxanthohumol	0,20	0,63	1,67

Da die Basisbiere der vier Versuchsreihen mit 50 g/hl PVPP stabilisiert wurden, betrug die Reduktion der Flavan-3-ole nahezu 100%. Lediglich Catechin konnte noch in Mengen von 0,40-0,77 mg/l detektiert werden, wobei die Konzentrationen innerhalb der jeweiligen Reihe identisch waren. Auch die Scaba-Analytik und die Analyse der Flavanoide, Gesamtpolyphenole sowie des Proteinspektrums erbrachten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der untersuchten Reihen, womit die Vergleichbarkeit der jeweils drei Ansätze (Referenz, Zusatz +, Zusatz ++) als gewährleistet gelten darf. Auf eine explizite Darstellung dieser Parameter, die hier lediglich als Kontrolle dienten, wird im Folgenden verzichtet. Von Interesse sind vor allem der Verlauf der Trübungsbildung im Forciertest sowie der mögliche Zusammenhang mit dem Reduktionsvermögen.

Im Gegensatz zu Papps Ergebnissen konnte hier kein Einfluss ansteigender Konzentrationen von Ferulasäure auf die Trübungsbildung nachgewiesen werden [PAPP 2000, PAPP et al. 2001]. Die 90 °-Trübung verläuft sowohl in der Referenzprobe als auch in den beiden Zusatz-Bieren nahezu gleich (siehe Abbildung 26). Auch das Reduktionsvermögen der drei unterschiedlich präparierten Biere offenbart keine signifikanten Unterschiede.

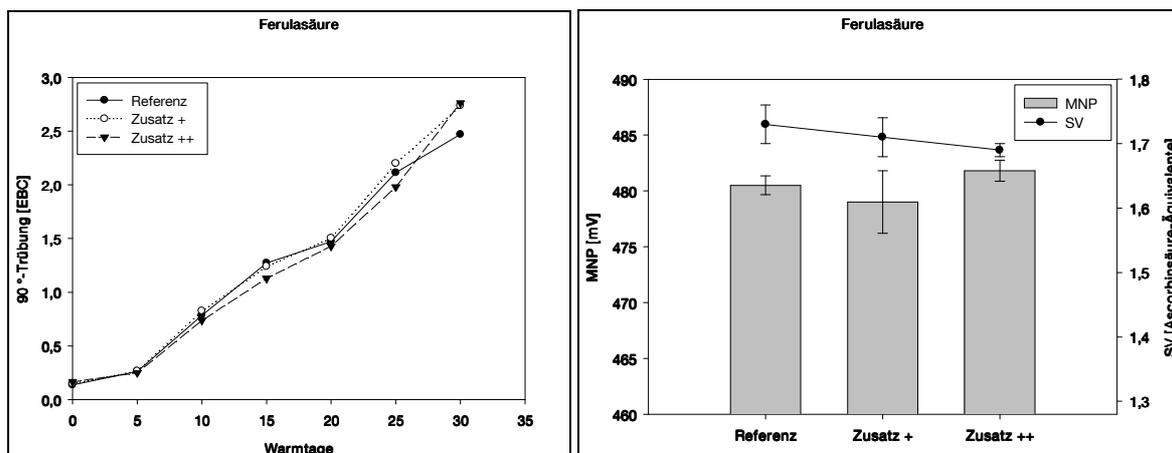


Abbildung 26: Ansatz Ferulasäure - 90 °-Trübungsbildung und Reduktionsvermögen

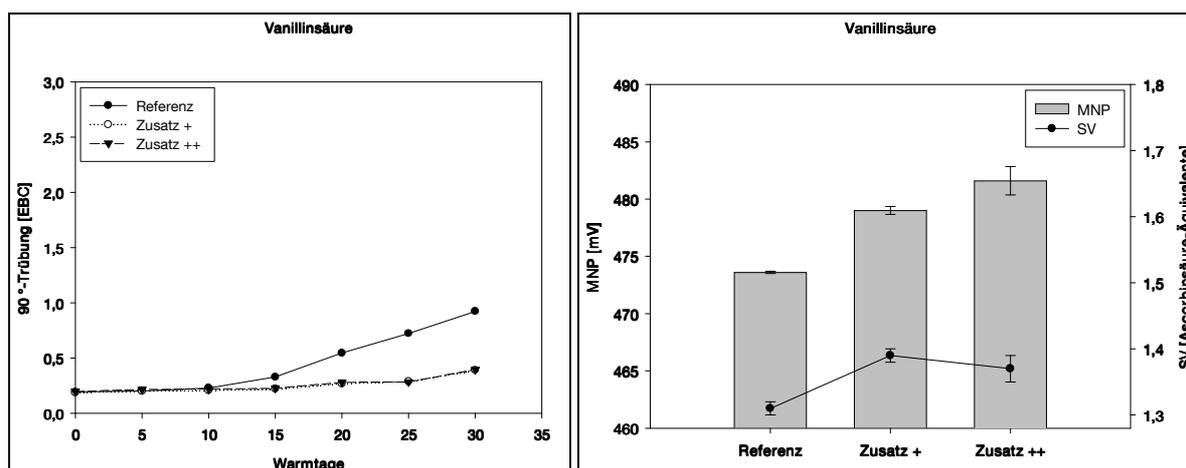


Abbildung 27: Ansatz Vanillinsäure - 90 °-Trübungsbildung und Reduktionsvermögen

Im Vergleich zur Ferulasäure übt der Zusatz von Vanillinsäure eine weitaus größere Wirkung aus. Bereits die Zugabe von etwa 1 mg (Zusatz +) induziert eine sichtbare Verlangsamung der Trübungsbildung (siehe Abbildung 27). Eine weitere Konzentrationserhöhung zeigt hingegen keinen zusätzlichen positiven Effekt. Da bezüglich der Haupttrübungsbildner und anderen Einflussfaktoren auf die Trübung keinerlei Unterschiede zwischen den drei Proben bestanden, dürfte das Reduktionsvermögen die entscheidende Rolle in Bezug auf die kolloidale Stabilität spielen. So zeigt der elektrochemische Indikator Time Test (SV) eine signifikante Verbesserung des Reduktionsvermögens (schnell reduzierende Substanzen) in den Zusatz-Bieren an. Die Tatsache, dass sich das mittlere Nullstrompotential (MNP) in diesen

Bieren gleichzeitig verschlechtert, ist nur schwer erklärbar, insbesondere da dies offenbar keinen Einfluss auf den Forciertest ausübt.

Abbildung 28 verdeutlicht die positive Wirkung ansteigender Konzentrationen an p-Cumarsäure auf die chemisch-physikalische Stabilität. So ist in der Referenzprobe die stärkste Trübungsneigung zu verzeichnen, während das Zusatz ++-Bier den flachsten Kurvenverlauf aufweist. Das Stromverhältnis zeigt eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante Erhöhung des Reduktionsvermögens mit einer Steigerung der p-Cumarsäure-Menge, was möglicherweise die bessere Stabilität der Zusatzbiere bedingt. Beim mittleren Nullstrompotential sind hingegen weder signifikante Unterschiede noch Tendenzen erkennbar.

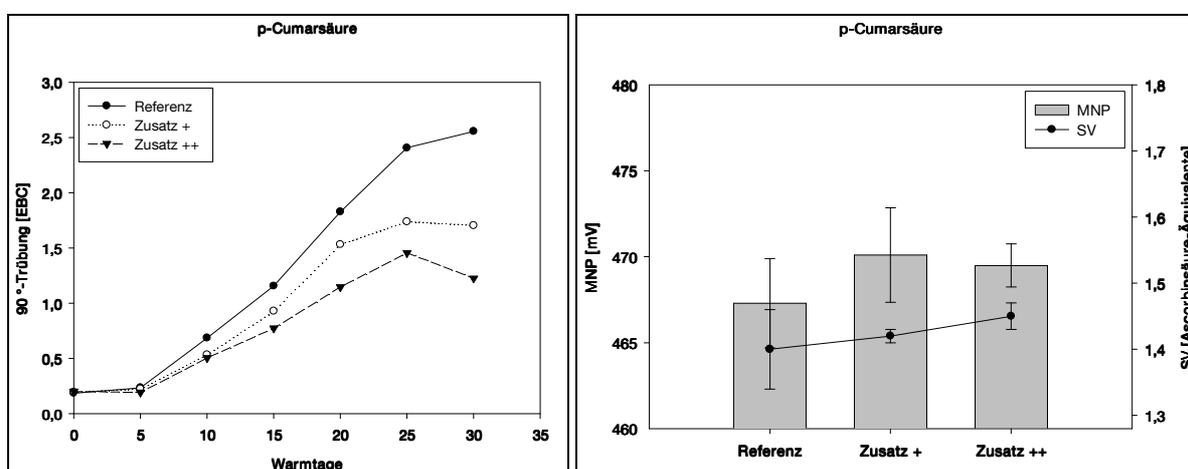


Abbildung 28: Ansatz p-Cumarsäure - 90 °-Trübungsbildung und Reduktionsvermögen

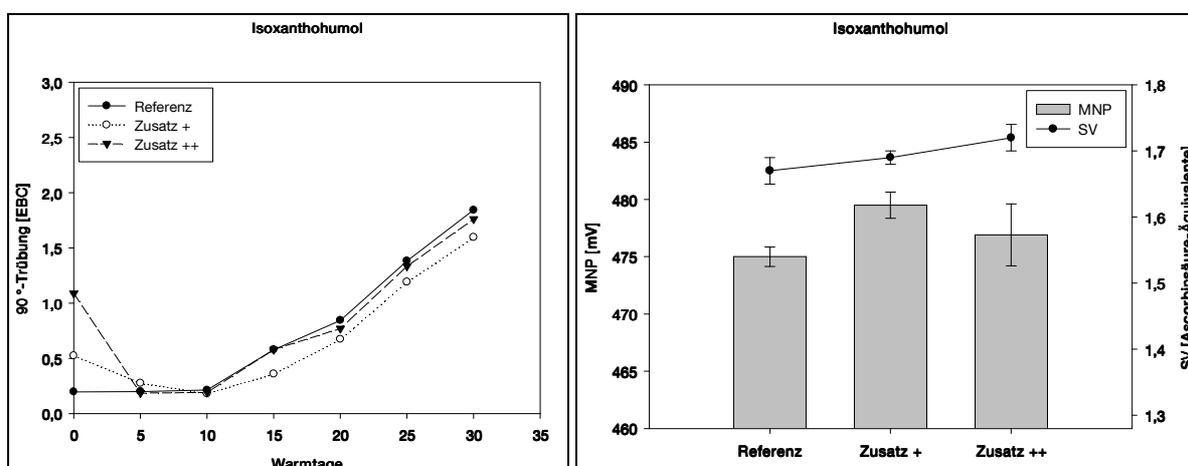


Abbildung 29: Ansatz Isoxanthohumol - 90 °-Trübungsbildung und Reduktionsvermögen

Der Zusatz von Isoxanthohumol resultiert in einem ungewöhnlichen Forciertestverlauf (siehe Abbildung 29) – so steigt bereits die Ausgangstrübung mit zunehmender Dosage unverhältnismäßig stark an, um sich dann zwischen dem fünften und dem zehnten Warmtag auf ein gemeinsames Niveau mit der Referenzprobe einzupendeln. Der Trübungsanstieg ab dem zehnten Warmtag verläuft daraufhin in allen drei Proben nahezu gleich. Die Unterschiede zu Beginn des Forciertests können nur auf die schlechte Löslichkeit des zugesetzten Isoxanthohumols zurückzuführen sein, wodurch offenbar eine messbare Trübung im Bier induziert wurde. Im Laufe der Forcierung ging dann der Teil, der zunächst noch unlöslich war, in zunehmendem Maße in Lösung. Das Stromverhältnis deutet auch hier eine tendenzielle Verbesserung des Reduktionsvermögens nach Isoxanthohumol-Zusatz an, was jedoch keine signifikante Auswirkung auf den Forciertest hat. Bezüglich des mittleren Nullstrompotentials sind wiederum keine merklichen Unterschiede feststellbar.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ferulasäure in ansteigenden Konzentrationen bis auf eine Absolutkonzentration von 4,8 mg/l keinen sichtbaren Einfluss auf die kolloidale Stabilität der PVPP-stabilisierten Biere ausübt. Diese Erkenntnis stimmt nicht mit den Ergebnissen von Papp überein, der Gegenteiliges berichtete [PAPP 2000, PAPP et al. 2001].

Auch ein Zusatz von Isoxanthohumol (bis 1,7 mg/l) hatte keinen signifikanten Effekt auf den Verlauf der Trübungsbildung – zumindest nicht ab dem Zeitpunkt, an dem dieses vollständig gelöst vorlag.

Die phenolischen Säuren Vanillinsäure (hier bis maximal 2 mg/l) und p-Cumarsäure (bis 3,3 mg/l) übten in höheren Konzentrationen eine positive Wirkung auf die kolloidale Stabilität aus. Dieser Effekt kann möglicherweise mit der Verbesserung des Reduktionsvermögens (SV) erklärt werden.

Im Vergleich zum elektrochemischen Indikator Time Test (SV) konnten durch die cyclovoltametrische Messung kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen der vier Versuchsreihen protokolliert werden. Offensichtlich reagiert dieser Test nicht empfindlich genug auf die Dosage der hier untersuchten Einzelsubstanzen.

Es sei hinzuzufügen, dass die hier beschriebenen Resultate nicht ohne weiteres auf ein un-stabilisiertes Bier übertragen werden können. Das Vorhandensein eines breiteren Spektrums an Polyphenolen, welches hier durch die PVPP-Stabilisierung verhindert wurde, kann sowohl zu synergistischen als auch zu maskierenden Effekten zusammen mit den dosierten Substanzen führen. Zum Erzielen brauchbarer Ergebnisse hat sich die vorausgehende PVPP-Stabilisierung jedoch als unverzichtbar erwiesen.

4.2 Möglichkeiten der Einflussnahme auf die kolloidale Bierstabilität

4.2.1 Der Einfluss des Brauwassers

Neben der gezielten Selektion geeigneter Malze vermag auch die Qualität und Zusammensetzung des Brauwassers die chemisch-physikalische Stabilität der resultierenden Biere zu beeinflussen. Als entscheidende Größe zur Beurteilung des Wassers gilt dabei dessen Restalkalität. Diese sollte nicht über 5 °dH liegen, um den pH-Wert der Maische nicht übermäßig zu erhöhen und damit den Stoffabbau zu verschlechtern [SCHUR 1980a, PFENNINGER 1987, ANGER 1995].

In einer Versuchsreihe wurde Pilsner Bier aus ein und derselben Malzcharge, jedoch mit drei unterschiedlichen Brauwasserqualitäten hergestellt. Als Ziel galt es, weiterführende Informationen über das Verhalten der trübungsrelevanten Polyphenole und Proteine im jeweiligen Brauprozess sowie die kolloidale Stabilität des fertigen Bieres zu erhalten. Ferner sollten auch die Auswirkungen auf Geschmack, Schaum, Farbe, Bitterstoffausbeute, Läuterzeit und Reduktionsvermögen protokolliert werden.

Die Schüttung lag für jeden Sud bei 12 kg Pilsner Malz. Haupt- und Nachguss betragen 45 bzw. 30 l. Als Brauwasser wurde destilliertes Wasser, Leitungswasser (Freisinger Stadtwasser) und mit NaHCO₃ versetztes Leitungswasser verwendet. Letzteres sollte eine um etwa 10 °dH höhere Restalkalität als das unbehandelte Leitungswasser aufweisen, was durch den Zusatz von 330 mg/l NaHCO₃ realisiert wurde. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Härte und Restalkalität der Wässer.

Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten Brauwässer in °dH

Brauwasser	Calciumhärte	Magnesiumhärte	Carbonathärte	Restalkalität
Dest. Wasser	< 0,1	< 0,1	0,2	0,2
Leitungswasser	12,2	6,0	16,5	12,2
NaHCO ₃ -Wasser	12,1	5,9	27,2	22,8

Die Einmaischtemperatur betrug 40 °C, die Eiweißrast erfolgte bei 50 °C (10 Min.), die Maltoserast bei 62 °C (30 Min.) und die Verzuckerungsrast bei 72 °C (20 Min.). Abmisch- und Läutertemperatur betragen 78 °C. Die Messung der Läuterzeit begann nach Beendigung der 10-minütigen Läuterruhe und endete mit der Gewinnung einer definierten Menge (60 l) an

Pfannevollwürze. Die komplette Hopfengabe (8 g α -Säure) erfolgte mit Aromahopfen-Pellets 10 Minuten nach Kochbeginn. Nach 60-minütiger Kochung wurde eine 20-minütige Whirlpoolrast eingehalten. Die gekühlte und belüftete Würze wurde mit 5 g/l Presshefe angestellt und bei 15 °C vergoren. Im Anschluss an die Hauptgärung folgten Reifung (1 Woche bei 4 °C) und Lagerung (2 Wochen bei 0 °C). Zur Beurteilung der kolloidalen Stabilität und anderer Qualitätsparameter wurden die Biere filtriert und in NRW-Flaschen abgefüllt.

Tabelle 12 verdeutlicht die aciditätssenkende Wirkung der beiden Brauwässer, die eine hohe Restalkalität aufweisen. Liegt der pH-Wert der Pfannevollwürze aus destilliertem Wasser (5,7) in einem für die Stoffumsetzung beim Maischen optimalen Bereich, so führt bereits die Verwendung des Stadtwassers zu einer deutlichen pH-Verschiebung (6,1). Der pH-Wert der NaHCO₃-Pfannevollwürze (6,6) liegt weit über den Optima der cytolytischen, proteolytischen und amylolytischen Enzyme und sollte daher zwangsläufig mit einem inhibierten Stoffabbau und infolgedessen mit einer verminderten Sudhausausbeute, einer verzögerten Gärung und einem geringeren Endvergärungsgrad einhergehen [NARZISS 1992]. Diese negativen Folgeerscheinungen kommen hier jedoch nicht vollständig zum Ausdruck, was wohl einerseits auf die gute Malzlösung und andererseits auf die hohen Gärtemperaturen zurückzuführen ist.

Tabelle 12: pH-Wert, Extraktgehalt und Vergärungsgrad in Pfannevollwürze (PfvW), Anstellwürze (AW) und Bier

Brauwasser	pH-Wert (PfvW)	pH-Wert (AW)	pH-Wert (Bier)	Extrakt [GG%] (PfvW)	Extrakt [GG%] (Bier)	Vergärung [%]
Dest. Wasser	5,69	5,55	4,62	11,1	2,7	78
Leitungswasser (L-Wasser*)	6,14	5,98	4,66	11,1	2,4	79
NaHCO ₃ -Wasser (Präpariertes L-Wasser*)	6,60	5,75	5,42	11,0	2,5	78

* in den Diagrammen verwendete Kurzschreibweise

In den Ansätzen aus destilliertem Wasser und aus Leitungswasser sinkt der pH-Wert im Verlauf der Würzekochung um 0,1-0,2 Einheiten ab. Hierbei handelt es sich um einen typischen

Verlauf, welcher durch die zugesetzten Hopfenbittersäuren, durch die Bildung von sauren Maillardprodukten, durch die aciditätsfördernde Wirkung von Calcium- und Magnesiumionen sowie durch die Ausscheidung von alkalischen Phosphaten bedingt ist. Im Ansatz aus NaHCO_3 -Wasser kommt es aufgrund der sehr hohen Restalkalität und dem damit verbundenen hohen pH-Wert während des Maischens zu einer Inhibierung der Phosphatasen sowie zu einer verstärkten Fällung der Phosphate [NARZISS 1992]. Die daraus resultierende verringerte Pufferungskapazität der Pfannevollwürze bewirkt ein unverhältnismäßig starkes Absinken des pH-Werts über die Gesamtdauer der Kochung (hier: 0,8-0,9 Einheiten) auf ein Niveau, das sogar unterhalb der Anstellwürze aus Leitungswasser liegt. Wohl in Folge der durch die mangelnde Stickstoffversorgung der Hefe verursachten verzögerten Gärung fällt der pH-Sturz im NaHCO_3 -Ansatz nur sehr gering aus und bleibt auf einem aus Sicht der Bierqualität und -stabilität inakzeptabel hohem Niveau von 5,4. Die anderen beiden Ansätze gleichen sich hingegen offenbar während des Herstellungsprozesses weitgehend einander an und zeigen nahezu identische Werte in Bier (4,6-4,7).

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Konzentrationen der im Folgenden diskutierten Substanz(gruppen) auf einheitliche Extraktgehalte umgerechnet. Diese wurden in der Pfannevollwürze auf 11 GG% und in der Anstellwürze sowie im Bier auf 12 GG% festgelegt.

Die Abbildungen 30 und 31 geben einen Überblick über die Veränderungen des mittels HPLC-Analytik erfassbaren Polyphenolspektrums von der Pfannevollwürze (PfvW) über die Anstellwürze (AW) bis ins filtrierte und abgefüllte Bier. Die wichtigste Erkenntnis ist hier die Tatsache, dass ein Anstieg der Restalkalität offenbar zu einer verminderten Lösung der Flavan-3-ole (als Summe) und phenolischen Säuren während des Maischens und Abläuterns führt. So können sowohl in der Pfannevollwürze als auch in der Anstellwürze die niedrigsten Konzentrationen beider Substanzgruppen im Ansatz mit präpariertem Leitungswasser und die höchsten im Ansatz mit destilliertem Wasser nachgewiesen werden. Dieser Trend setzt sich im Wesentlichen bis ins fertige Bier fort. Schur berichtete in diesem Zusammenhang von einer verminderten Anthocyanogenlösung mit höherer Restalkalität [SCHUR 1987].

Die geringere Konzentration an Flavan-3-olen (als Summe) in der PfvW mit steigender Restalkalität ist alleine auf die verschlechterte Lösung der dimeren Proanthocyanidine Prodelphinidin B3 und Procyanidin B3 aus dem Malz zurückzuführen, wohingegen die Catechin-Lösung bzw. die thermische Dissoziation dimerer Polyphenole zu Catechin durch höhere pH-Werte scheinbar eher gefördert wird. Gleiches gilt offenbar auch für das Epicatechin,

welches erst durch die Hopfung eingebracht wird und in der Anstellwürze aus präpariertem Leitungswasser ebenfalls in höheren Konzentrationen vorliegt.

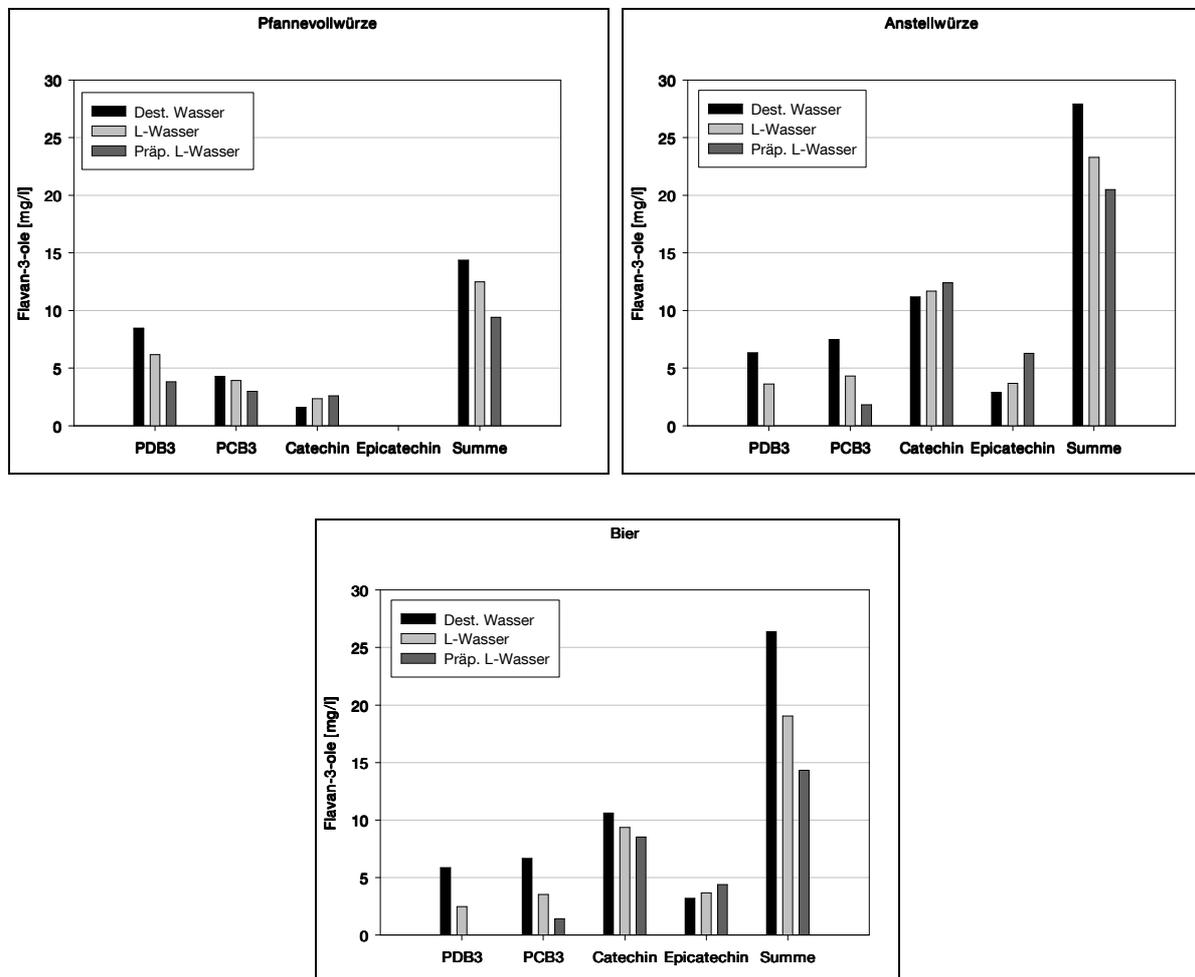


Abbildung 30: Flavan-3-ol-Konzentration in Würze und Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten

Würzekochung und Trubabscheidung resultieren allgemein in einer Reduktion des Polyphenolgehaltes. Dieser Effekt wird jedoch durch die Hopfung, insbesondere mit Naturhopfen oder Pellets sowie durch das Eindampfen der Würze egalisiert, so dass sich der Gerbstoffgehalt der Anstellwürze im Vergleich zur Pfannevollwürze weiter erhöht [ANGER 1983, WACKERBAUER und ANGER 1984a, SCHUR 1987]. Dieses Verhalten kann auch hier in Bezug auf die beobachteten Flavan-3-ole und phenolischen Säuren beobachtet werden. Wie in der Literatur beschrieben, kommt es im Verlauf der Kochung zur thermischen Dissoziation dimerer Proanthocyanidine, was gleichzeitig zu einem Anstieg von Catechin führt [MOLL et

al. 1984, BELLMER et al. 1995b]. Der Anstieg der Flavan-3-ole in ihrer Gesamtheit während der Kochung (siehe Abbildung 30) ist damit alleine auf den aus der Hopfung sowie aus Dissoziationsvorgängen resultierenden überproportionalen Anstieg von Catechin und Epicatechin zurückzuführen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass in der Anstellwürze aus präpariertem Leitungswasser kein PDB3 und nur sehr wenig PCB3 nachgewiesen werden konnte, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass höhere pH-Werte die Dissoziationsvorgänge unterstützen.

Während der Gärung, Lagerung und Filtration kommt es, bedingt durch Adsorption an die Hefezellwände bzw. an das Filterhilfsmittel, in allen Ansätzen zu einer moderaten Abnahme der Flavan-3-ole. Die Catechinreduktion verläuft dabei im Bier aus destilliertem Wasser offenbar weniger intensiv als in den beiden Vergleichsbieren (siehe Abbildung 30-Bier).

Wie bereits erwähnt, vermindert ein höherer Maische-pH auch die Lösung der aus dem Malz stammenden phenolischen Säuren. Dies wird in Abbildung 31 (PfvW) anhand von p-Cumar-säure, Ferulasäure und Syringasäure deutlich, die mit steigender Restalkalität des Brauwassers in geringeren Konzentrationen vorliegen. Durch das Eindampfen der Würze während der Kochung erhöht sich der Gehalt dieser Substanzen in allen Ansätzen nur in geringem Maße. Die Isomerisierung des bei der Hopfung eingebrachten Prenylflavonoids Xanthohumol wird hingegen durch den höheren Würze-pH gefördert, so dass in der Anstellwürze aus präpariertem Leitungswasser die höchsten Konzentrationen an Isoxanthohumol zu verzeichnen sind. Während der Gärung und Lagerung verringert sich der Isoxanthohumolgehalt in allen Ansätzen um etwa 50%, was wohl vor allem auf die verminderte Löslichkeit aufgrund des pH-Sturzes sowie auf den Einfluss der Kaltlagerung zurückzuführen sein dürfte.

Die Vanillinsäure wird offenbar während der Gärung neu gebildet (siehe Abbildung 31-Bier). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Wackerbauer und Krämer überein, die in diesem Zusammenhang von der Reduktion des Vanillins durch untergärige Kulturhefen zu Vanillinalkohol und Vanillinsäure berichteten [WACKERBAUER und KRÄMER 1983]. Die ungewöhnliche Konzentrationssteigerung der übrigen phenolischen Säuren kann möglicherweise auf die Freisetzung dieser zunächst an die Hefezellwand adsorbierten Substanzen zurückzuführen sein, gefördert durch die hier angewandten hohen Gärtemperaturen. Die Unterschiede zwischen den drei Ansätzen bezüglich der einzelnen phenolischen Säuren und Isoxanthohumol in Bier sind jedoch allgemein sehr gering und werden daher als nicht signifikant eingestuft.

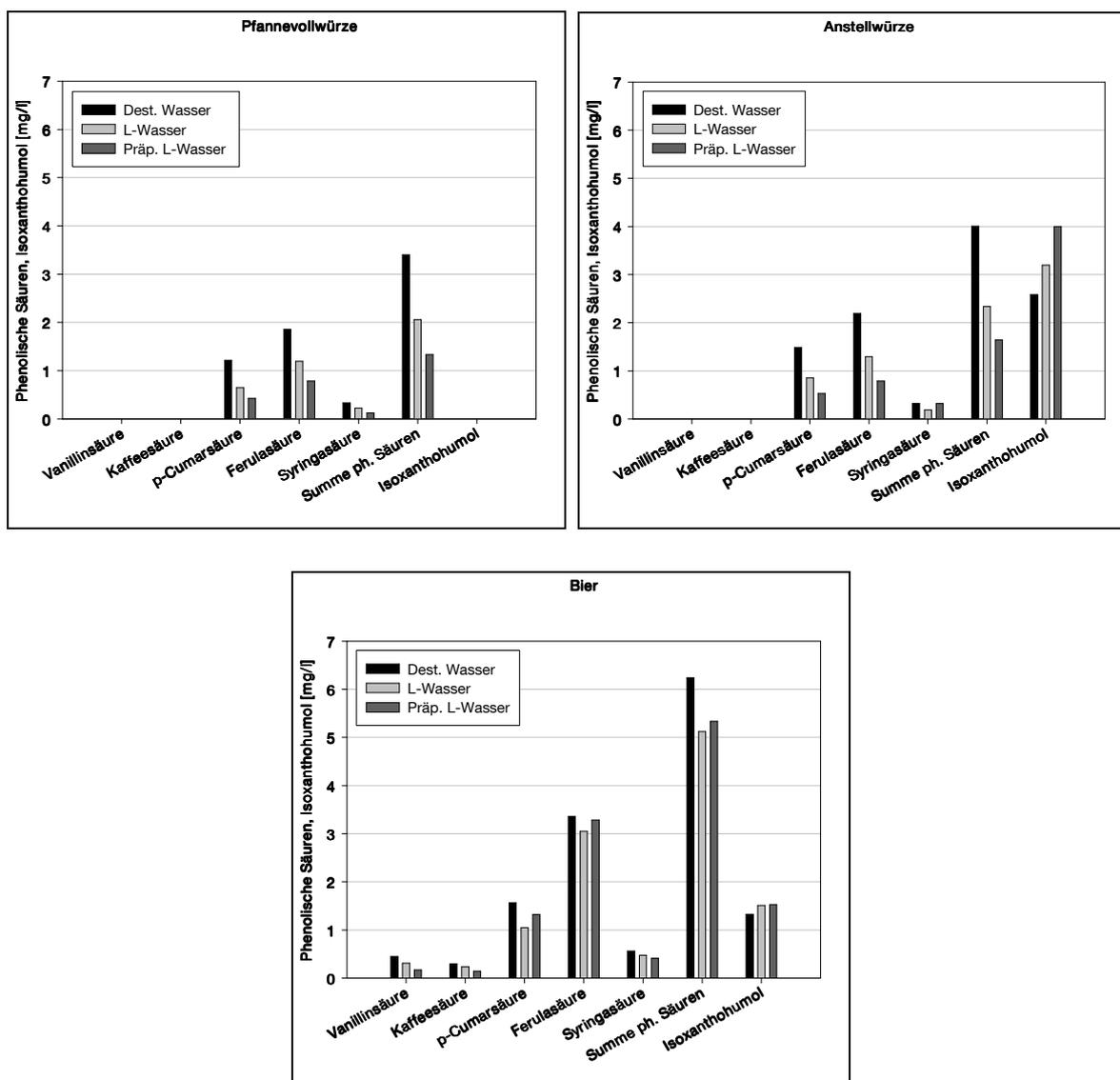


Abbildung 31: Konzentration an phenolischen Säuren und Isoxanthohumol in Würze und Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten

Der in Abbildung 32 dargestellte gesamtlösliche Stickstoff belegt die verminderte proteolytische Aktivität während des Maischens bei höherer Restalkalität des Brauwassers. Sowohl in der PfvW als auch in der AW verzeichnet der Ansatz mit präpariertem Leitungswasser die geringste Eiweißlösung. Das im Vergleich zum Gesamtstickstoff konträre Verhalten sensibler Proteine in der PfvW mit höheren Konzentrationen in den Ansätzen mit höherer Restalkalität weist auf die Inhibierung der Endopeptidasen (pH-Optima < 5,5) hin, wodurch sich der Anteil

der trübungssensitiven Proteine im mittel- bis hochmolekularen Bereich erhöht. Gleichzeitig muss sich daher der Gehalt an niedermolekularem Eiweiß verringern.

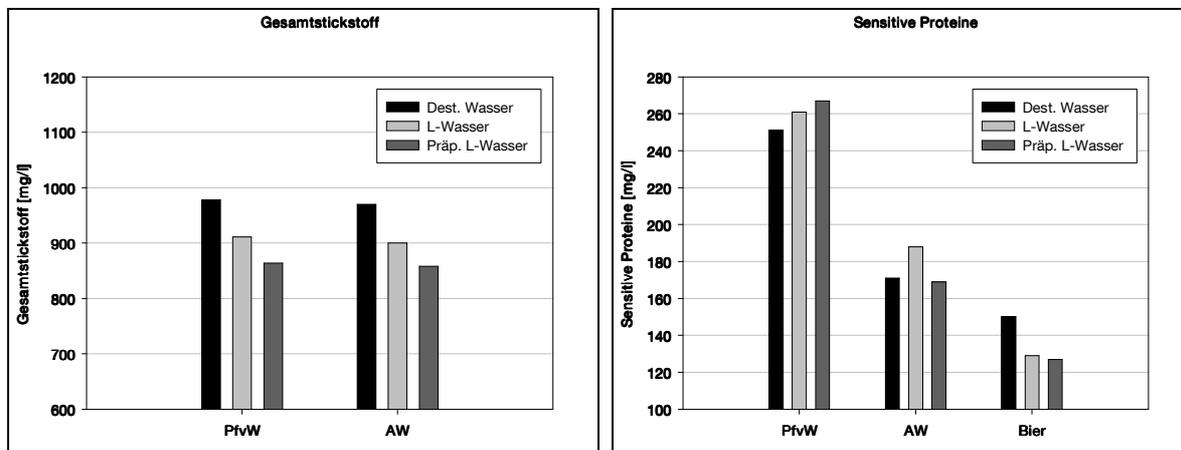


Abbildung 32: Gesamtstickstoff und sensitive Proteine in Würze und Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten

Im Verlauf der Kochung und während der Trubabscheidung im Whirlpool kommt es zur Ausfällung sensitiver Proteine zusammen mit den Gerbstoffen. Aufgrund der durch die höhere Restalkalität des Brauwassers bedingten Hemmung der Phosphatasen sowie durch die verstärkte Fällung der Phosphate und die damit verbundene verringerte Pufferung sinkt der pH-Wert über die Gesamtdauer der Kochung im Ansatz mit präpariertem Leitungswasser unverhältnismäßig stark ab (vgl. Tabelle 12). Dies fördert nach Narziss die Eiweißausscheidung, was auch in Abbildung 32 (rechte Seite) zu sehen ist [NARZISS 1992]. Die im Verhältnis intensivste Eiweißabscheidung kann dementsprechend im Ansatz mit der höchsten Restalkalität beobachtet werden.

Die Gärung und Lagerung bedingt im Fall der Ansätze mit höherer Restalkalität eine intensivierte Fällung sensitiver Proteine (vgl. Abbildung 32), was möglicherweise mit der längeren Gärdauer (hier nicht protokolliert) und damit längeren Sedimentationszeit begründet werden kann. Die höchste Konzentration an trübungsrelevanten Proteinen kann im fertigen Bier, das aus destilliertem Wasser hergestellt wurde, detektiert werden.

Abbildung 33 verdeutlicht die bereits von Narziss beschriebene bessere Ausnutzung der Hopfenbitterstoffe mit steigender Restalkalität. Aufgrund der besseren Isomerisierungsrate bei höheren pH-Werten im Verlauf der Würzekochung ist im Leitungswasser-Bier ein um 8%

und im präparierten Leitungswasser-Bier gar ein um 41% gesteigerter Gehalt an Bitterstoffen zu verzeichnen, verglichen mit dem Ansatz aus destilliertem Wasser. Die Bitterstoffe liegen bei der Verwendung von Brauwasser mit hoher Restalkalität allerdings in einer molekularen und intensiver bitteren Form vor und verursachen eine derbe und kratzige Bierbittere [NARZISS 1992]. Wohl aus diesem Grund unterschieden sich die mittels Dreiecksverkostung (Anzahl der Verkoster $n = 15$) überprüften Biere deutlich. Sowohl beim Vergleich zwischen Bier aus destilliertem Wasser mit Leitungswasser-Bier als auch zwischen dest-Bier mit präp. Leitungswasser-Bier wurde das dest-Bier bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ signifikant bevorzugt.

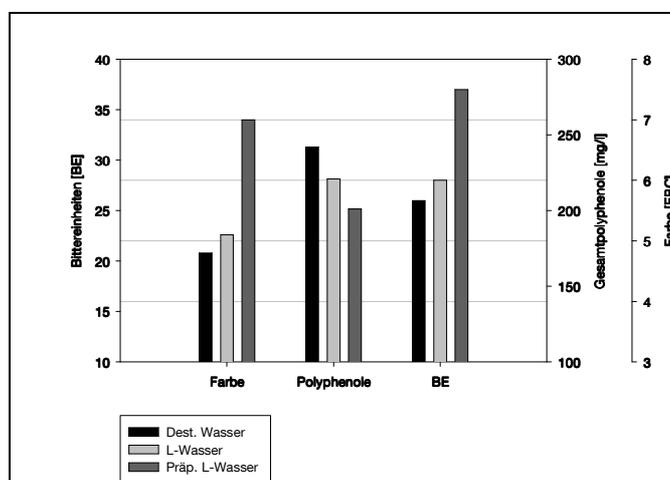


Abbildung 33: Bittereinheiten, Gesamtpolyphenole und Farbe im fertigen Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten

Das in Abbildung 33 sichtbare gegenläufige Verhalten der Gesamtpolyphenole und der Bierfarbe weist darauf hin, dass die deutlich dunkleren Farben im Bier aus Brauwasser höherer Restalkalität nicht mit der von Narziss beschriebenen verstärkten Polyphenolauflösung aus den Spelzen erklärbar sind [NARZISS 1992]. Aufgrund der Tatsache, dass eine höhere Restalkalität eine verminderte Polyphenol-Lösung induziert, scheint die unterschiedliche Bierfarbe vielmehr mit der Intensität der Gärung bzw. des pH-Sturzes und den während der Gärung ablaufenden Stoffumsetzungen zusammenzuhängen. Im Bier mit dem geringsten pH-Sturz (präp. L-Wasser) kann demnach die geringste Farbaufhellung beobachtet werden.

Das in Abbildung 34 dargestellte mittlere Nullstrompotential (Gesamt-Reduktionsvermögen) der drei unterschiedlichen Biere verläuft parallel zu den schnell reduzierenden Substanzen

(SV). Das schlechteste Reduktionsvermögen ist demnach im Bier aus präpariertem Leitungswasser zu beobachten, wohingegen sich die anderen beiden Ansätze nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die Ursachen für das schlechtere Redoxpotential im NaHCO_3 -Ansatz sind vermutlich der geringere Polyphenolgehalt sowie die geringere Gärintensität und die damit verbundene unterdrückte Neubildung reduzierend wirkender Substanzen, wie z.B. organischer Säuren.

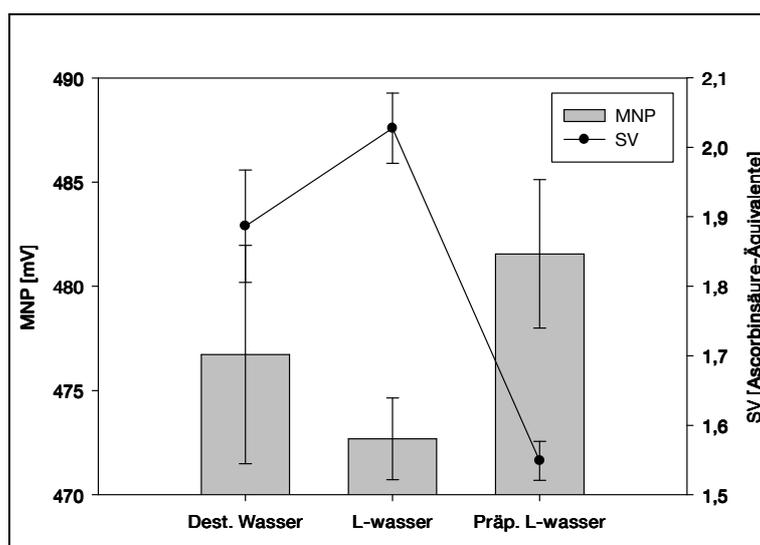


Abbildung 34: Redoxpotential im fertigen Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten

Das vergleichsweise um 15-17% langsamere Abläutern des Ansatzes mit präpariertem Leitungswasser (vgl. Abbildung 35) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die verminderte cytotolytische Aktivität der β -Glucanasen beim Maischen und die damit verbundene höhere Viskosität der Würze zurückzuführen. Die schlechtere Schaumhaltbarkeit in dieser Probe könnte neben dem geringeren Gehalt an höhermolekularen Proteinen auch aus der verminderten Entharzung bei der Gärung resultieren [NARZISS 1992].

Die Unterschiede bezüglich der kolloidalen Stabilität der resultierenden Biere erweisen sich als relativ gering (siehe Abbildung 35). So zeigt die 90° -Trübungsmessung nach 4 Warmtagen sowohl im Leitungswasser-Bier als auch im NaHCO_3 -Bier einen Wert von 10 EBC. Das Bier, welches aus destilliertem Wasser hergestellt wurde, weist eine nur geringfügig bessere Trübung von 7,5 EBC auf. Die Trübungsverläufe bis zu diesem Zeitpunkt (hier nicht dargestellt) verliefen nahezu identisch.

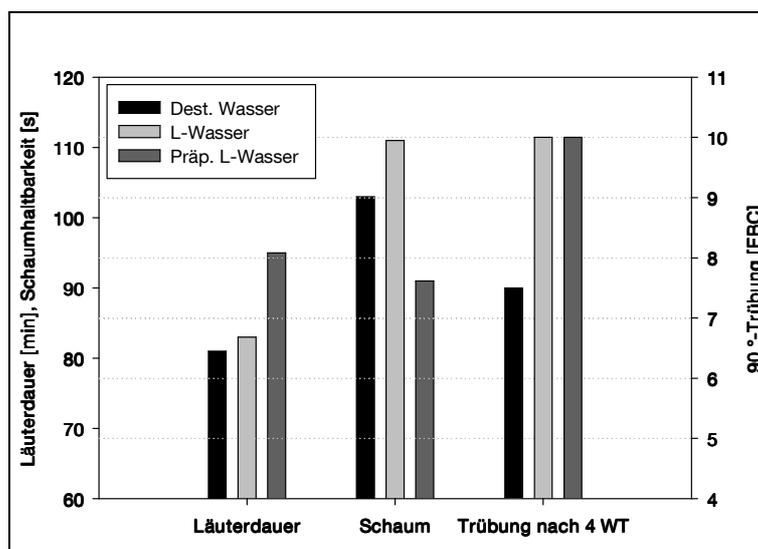


Abbildung 35: Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten - Läuterdauer, Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) und 90 °-Trübung nach 4 WT

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Narziss hat sich in dieser Versuchsreihe gezeigt, dass der Einfluss der Brauwasserzusammensetzung auf die kolloidale Stabilität der resultierenden Biere relativ gering ist [NARZISS et al. 1981, NARZISS 1994]. Eine höhere Restalkalität induziert zwar geringere Gehalte an Polyphenolen und Proteinen im Bier, der daraus resultierende positive Effekt in Hinblick auf die Trübungsstabilität wird jedoch offenbar durch die Auswirkungen der schlechteren Stoffumsetzung beim Maischen egalisiert.

Wesentlich negativer jedoch sind die Folgen in Bezug auf andere Qualitätsparameter des Bieres. So war insbesondere im Bier mit der höchsten Restalkalität (22,8 °dH) eine merklich dunklere Bierfarbe zu verzeichnen als bei der Verwendung von destilliertem Wasser (RA = 0,2 °dH), was nicht auf die Auslaugung von Polyphenolen, sondern eher auf die geringere Farbaufhellung bei der zögerlich verlaufenden Gärung zurückgeführt werden kann.

Aufgrund des langsameren Gärverlaufs kommt es nach Narziss zudem zu einer verminderten Entharzung der Biere, was neben der fortgeschrittenen Sedimentation höhermolekularer Proteine ein weiterer Grund für die verminderte Schaumhaltbarkeit sein kann [NARZISS 1992].

Das verschlechterte Reduktionsvermögen im NaHCO_3 -Ansatz ist vermutlich auf den geringeren Gehalt an Polyphenolen sowie auf die geringere Gärintensität und den damit verbundenen Verlust an reduzierenden Substanzen zurückzuführen.

Der Grund für das signifikant schlechtere Läuterverhalten des Ansatzes mit der höchsten Restalkalität ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Inhibierung der β -Glucanasen beim Maischen und die daraus resultierende Viskositätserhöhung [NARZISS 1992].

Die Auswirkungen auf den Geschmack haben sich als besonders negativ erwiesen. So bewirkt eine hohe Restalkalität des Brauwassers zwar eine bessere Ausnutzung der Bitterstoffe während der Kochung, führt jedoch zu einer sehr intensiven, herben und kratzigen Bierbittere. Im Rahmen einer Dreiecksverkostung wurden die beiden Bierproben aus Wasser mit höherer Restalkalität signifikant schlechter als das Bier aus destilliertem Wasser beurteilt.

4.2.2 Die Wahl des Hopfenprodukts

4.2.2.1 Der Einsatz von Gerbstoffextrakten

Aus der im großtechnischen Maßstab durchgeführten Ethanolextraktion von Hopfen resultieren zwei Endprodukte: Der *Reinharzextrakt* enthält die unpolaren Bestandteile, insbesondere die Bitterstoffe und ätherischen Öle, während mit Ausnahme der Prenylflavonoide nahezu alle Hopfenpolyphenole in den polaren *Gerbstoffextrakt* übergehen [BIENDL und PINZL 2007]. Letzterer stellt gewissermaßen ein „Abfallprodukt“ der Ethanolextraktion dar und findet als solches im Brauprozess keine weitere Verwendung.

Über den Einsatz aus Galläpfeln gewonnener Gerbstoffe (Gallotannine) zur eiweißseitigen Bierstabilisierung wurde bereits berichtet (siehe Kapitel 2.5.3.1). Nun stellte sich zwangsläufig die Frage, ob auch die Verwendung der Hopfen-Gerbstoffextrakte eine Verbesserung der kolloidalen Stabilität zur Folge haben könnte. Eine Anwendung vor bzw. während der Würzekochung entspräche sogar dem Reinheitsgebot, was einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Stabilisierung mit Gallotanninen darstellt.

Zur Evaluierung der Auswirkungen von Gerbstoffextrakt-Dosagen zum Brauwasser wurden aus einer Malzcharge 9 Pilsner Biere gebraut, welche insgesamt drei verschiedene Ansätze ergaben (jeweils 3fach-Bestimmung): Ein Ansatz diente als Referenz (ohne Gerbstoffextrakt), in den anderen beiden Ansätzen kamen zwei Extrakte mit unterschiedlichen Polyphenolgehalten zur Anwendung. Diese enthielten einmal 6% Polyphenole (Bezeichnung „P6“) und einmal 10% Polyphenole (Bezeichnung „P10“) und stammten aus zwei unterschiedlichen Aromahopfen-Sorten desselben Erntejahrs.

Neben der Durchführung eines Forciertests bei 40/0 °C im abgefüllten Bier zur Bestimmung der Trübungsstabilität und der Protokollierung des HPLC-Polyphenolspektrums in Würze und Bier stand vor allem die Quantifizierung des Reduktionsvermögens im Vordergrund. Besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem gesteigerten Gehalt an Polyphenolen, der antioxidativen Kapazität und dem Läuterverhalten? Goiris et al. berichteten diesbezüglich bereits von einer Verkürzung der Läuterdauer, induziert durch die Verwendung von Polyphenolextrakten aus der CO₂-Extraktion [GOIRIS et al. 2005]. Von weiterem Interesse waren ferner die Auswirkungen auf den Proteingehalt und die Schaumhaltbarkeit der resultierenden Biere.

Je Ansatz wurden 10 kg Pilsner Malz mit 40 l destilliertem Wasser vermaischt, wobei ein Hochkurzmaisverfahren zur Anwendung kam: Nach dem Einmaischen bei 60 °C folgte die

30-minütige Maltoserast und im Anschluss die ebenfalls 30-minütige Verzuckerungsrast bei 70 °C. Die Abmisch- und Läutertemperatur lag bei 78 °C, die Nachgussmenge betrug 30 l. In den Ansätzen mit Gerbstoffextrakt-Zugabe erfolgte die Dosage sowohl in den Hauptguss als auch in die Nachgüsse. Die Einsatzkonzentration betrug 1,25 g/l (P6) bzw. 0,75 g/l (P10), was derselben Menge an zugesetzten Polyphenolen entsprach. Die Hopfung erfolgte in allen Ansätzen zu Kochbeginn mit 13,1 g Ethanol-Reinharzextrakt (53,4% Alphasäure), wobei eine Bitterstoffkonzentration von etwa 35 BE angestrebt wurde. Nach der einstündigen Kochung folgte eine 30-minütige Whirlpoolrast. Nach der Würzekühlung wurde diese mit 5 g/l Presshefe angestellt und bei 9 °C vergoren. Im Anschluss an die Hauptgärung folgten die einwöchige Reifung bei 4 °C und die zweiwöchige Lagerung bei 0 °C, sowie die Filtration und Abfüllung.

Im Folgenden werden die Durchschnittswerte der 3fach-Bestimmungen miteinander verglichen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Proben wurde die Konzentration der jeweiligen Substanzen auf eine gemeinsame Stammwürze von 11,6 GG% berechnet.

Auch wenn die in Tabelle 13 dargestellten Ergebnisse auf einen im Vergleich zur Referenzprobe geringeren Gehalt der Gerbstoffextrakt-Biere an unvergärbarem Restextrakt hinweisen, kann dies jedoch nicht anhand der Vergärungsgrade bestätigt werden. Hier sind weder signifikante Unterschiede noch Tendenzen erkennbar. Die Bierbittere liegt, einhergehend mit der identischen Hopfengabe, in allen Proben im Bereich von 36-38 BE. Der Einsatz von Gerbstoffextrakten scheint tendenziell in etwas dunkleren Bierfarben zu resultieren, die Unterschiede fallen mit 0,2 bzw. 0,3 EBC jedoch sehr gering aus.

Tabelle 13: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Durchschnittswerte für Vergärungsgrad, Restextrakt, Bittere und Farbe im Bier

Bier	Vergärung [%]	Restextrakt [GG%]	Bittere [BE]	Farbe [EBC]
Referenz	84	2,4	36	4,6
P6	83	1,8	38	4,8
P10	85	1,8	37	4,9

Abbildung 36 zeigt die Unterschiede bezüglich der 90 °-Trübungsbildung im Forciertest. So weisen die Biere, in denen die Gerbstoffextrakte P6 und P10 zugesetzt worden waren, von

Beginn an ein geringeres Trübungspotential als das Referenzbier auf. Die Extraktbiere selbst unterscheiden sich nur minimal und nicht signifikant voneinander.

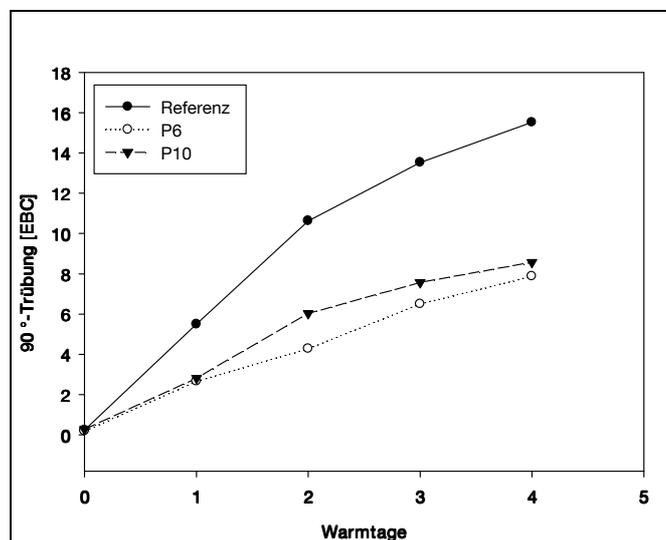


Abbildung 36: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: 90 °-Trübungsbildung im Forciertest 40/0 °C

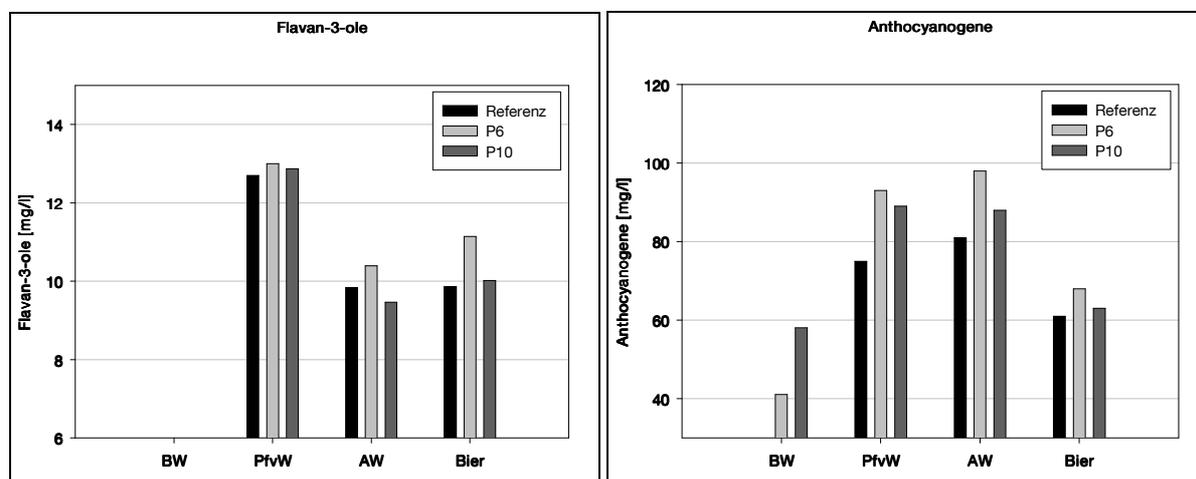


Abbildung 37: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Flavan-3-ole und Anthocyanogene in Brauwasser, Würze und Bier

Aus Abbildung 37 wird ersichtlich, dass die hier verwendeten Gerbstoffextrakte weder monomere noch dimere Flavan-3-ole in detektierbarer Menge ins Brauwasser einbringen. Die in der Pfannevollwürze nachgewiesenen Flavan-3-ole stammen daher ausschließlich aus dem

Malz. Dies kann entweder auf die niedrige Einsatzkonzentration der Extrakte zurückgeführt werden oder darauf, dass die Polyphenole im Gerbstoffextrakt möglicherweise überwiegend in höher polymerisierter Form vorliegen. Da sowohl im P6- als auch insbesondere im P10-Brauwasser relevante Anthocyanogengehalte im Bereich von 40-60 mg/l gemessen werden können, scheint eher Letzteres zuzutreffen. Auch in der Pfannevollwürze sowie der Anstellwürze können in den Gerbstoffextrakt-Ansätzen höhere Konzentrationen als in der Referenzprobe nachgewiesen werden, wobei hier die P6-Probe aus unbekanntem Gründen höhere Werte als der P10-Ansatz aufweist – im Brauwasser verhielt es sich noch umgekehrt. Dieser Trend setzt sich im Wesentlichen bis ins fertige Bier fort, auch wenn die Gärung und Lagerung eine weitgehende Angleichung der Konzentrationen bedingen. Der leichte Konzentrationsanstieg der Anthocyanogene während der Kochung ist hier vor allem auf das Eindampfen der Würze zurückzuführen, nicht jedoch auf die Hopfung mit Ethanol-Reinharzextrakt, der keine Polyphenole enthält. Die Reduktion der Flavan-3-ole während der Würzekochung ist ebenfalls durch die Art der Hopfung bedingt und wird durch Fällungsreaktionen der Proanthocyanidine zusammen mit Proteinen noch verstärkt [ANGER 1983, WACKEBAUER und ANGER 1984a]. Durch die zweiwöchige Kaltlagerung sowie durch die nachfolgende Filtration kommt es zu einer merklichen Verringerung der Anthocyanogene von der Anstellwürze bis ins Bier [SCHUR 1987].

Bezüglich des Gehalts an phenolischen Säuren (hier nicht dargestellt) waren, wie auch im Fall der Flavan-3-ole, keine Unterschiede zwischen den Vergleichsproben erkennbar. Grundsätzlich konnte in keiner Versuchsreihe ein direkter Zusammenhang zwischen dem Polyphenolgehalt der Biere und ihrem Verhalten im Forciertest (vgl. Abbildung 36) festgestellt werden.

Die Dosage von Gerbstoffextrakten induziert im Brauwasser eine Verbesserung sowohl des mittleren Nullstrompotentials (Gesamtpotential) als auch des Stromverhältnisses (schnell reduzierende Substanzen) im Vergleich zur Referenzprobe (vgl. Abbildung 38). Dies dürfte in erster Linie auf die eingebrachte Menge an Anthocyanogenen zurückzuführen sein. Diese Tendenz ist im Fall der schnell reduzierenden Substanzen auch in der PfvW zu sehen, nicht jedoch bezüglich des mittleren Nullstrompotentials. Die Probenahme zu späteren Zeitpunkten (AW, Bier) offenbart parallel zum Verhalten der Polyphenole keine eindeutigen Tendenzen.

Grundsätzlich erhöht sich das Reduktionsvermögen durch das Einbringen der Malzbestandteile vom Brauwasser zur PfvW (vgl. Abbildung 38). Die Kochung bewirkt eine weitere Ver-

besserung des Redoxpotentials, was vor allem durch die Bildung reduzierend wirkender Melanoidine bedingt ist. Auch die Gärung resultiert üblicherweise in einem Anstieg des Reduktionsvermögens, was hier jedoch nur anhand des Gesamtpotentials nachvollzogen werden kann.

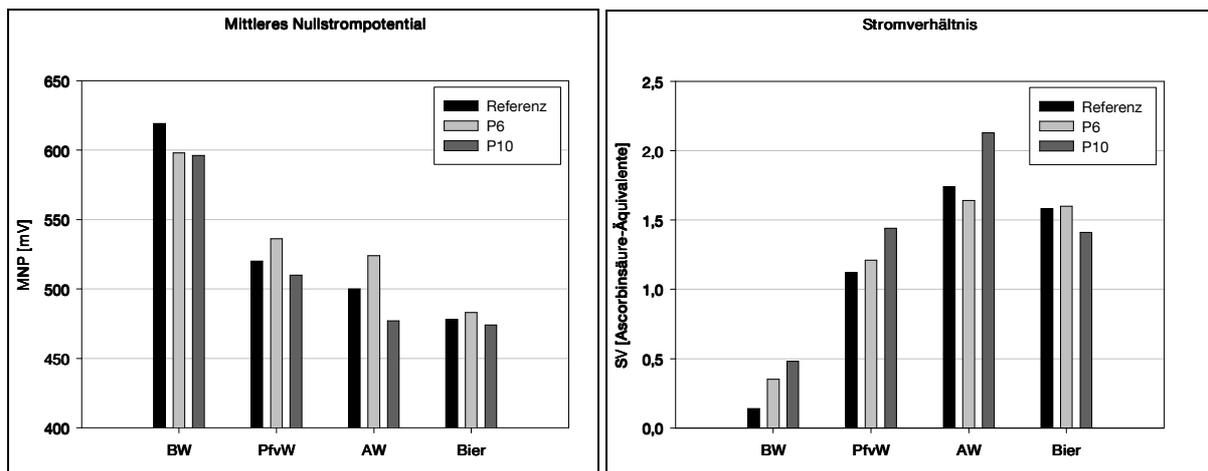


Abbildung 38: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Mittleres Nullstrompotential und Stromverhältnis in Brauwasser, Würze und Bier

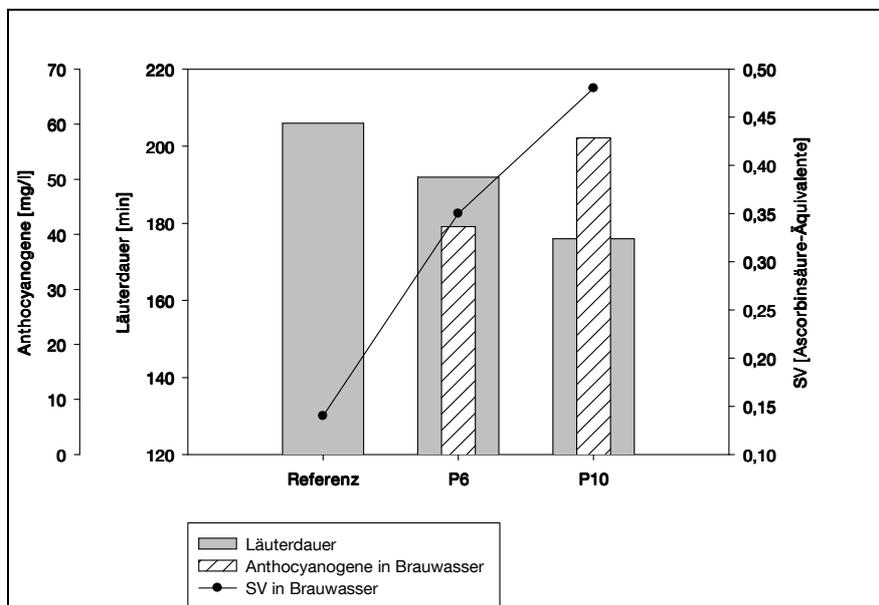


Abbildung 39: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Der Zusammenhang zwischen Läuterdauer und Anthocyanogengehalt bzw. Reduktionsvermögen in Brauwasser

Abbildung 39 verdeutlicht noch einmal explizit den Zusammenhang zwischen dem Anthocyanogehalt des Brauwassers und seinem Reduktionsvermögen, welches hier in Form des Stromverhältnisses dargestellt ist. Nach Zugabe der Gerbstoffextrakte kann parallel zu einer Erhöhung der Anthocyanogenkonzentration auch eine Verbesserung des Redoxpotentials festgestellt werden. Das gesteigerte antioxidative Potential wiederum ermöglicht im Schnitt eine signifikant verkürzte Läuterdauer gegenüber der Referenzprobe. So ist im P6-Ansatz eine um 6% und im P10-Ansatz eine um 15% kürzere Läuterzeit zu verzeichnen. Nach Narziss ist dies auf den gesteigerten Schutz der Malzproteine vor Oxidation und damit vor Polymerisation zurückzuführen, was eine lockerere Zusammensetzung der Treber im Läuterbottich bedingt [NARZISS et al. 1986, NARZISS 1992]. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass das Abläutern während der hier durchgeführten Versuchsreihen allgemein sehr viel Zeit in Anspruch nahm (> 3 h), was wohl in erster Linie mit dem verkürzten Maischverfahren und der damit verbundenen geringeren cytolytischen Lösung begründet werden kann. Weiterführende Versuche wiesen jedoch darauf hin, dass die Unterschiede bezüglich der Läuterdauer unter Verwendung eines gut gelösten Malzes und bei Einhaltung einer Cytolyserast während des Maischens (bzw. alle Maßnahmen zur Optimierung des Läuterprozesses) im Allgemeinen geringer ausfallen. Der positive Effekt des besseren Reduktionsvermögens auf das Läuterverhalten durch den Einsatz von Gerbstoffextrakten äußert sich also vor allem unter suboptimalen Bedingungen, wie beispielsweise bei der Verwendung schlecht gelöster Malze oder unzureichender Maischarbeit.

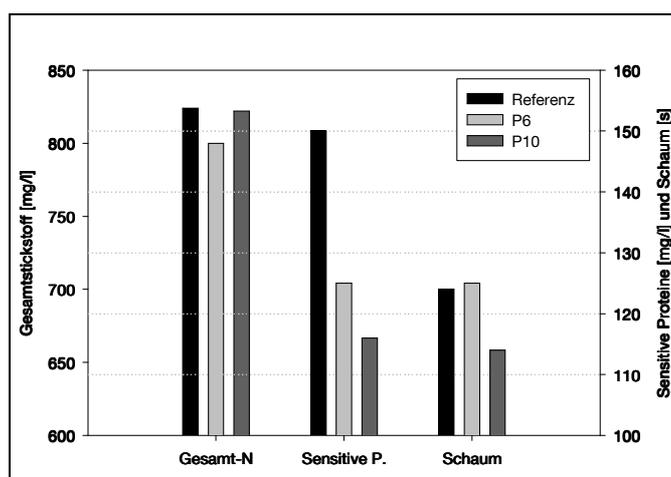


Abbildung 40: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Gesamtstickstoff, sensitive Proteine und Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) in Bier

Da die im Schnitt bessere kolloidale Stabilität der Gerbstoffextrakt-Biere weder mit den Polyphenolkonzentrationen noch mit dem Reduktionsvermögen erklärbar ist (nur geringe Unterschiede im Vergleich zur Referenz), müssen andere Faktoren ausschlaggebend sein. Bezüglich des Gesamtstickstoffs sind keine Tendenzen zu erkennen, die sensitiven Proteine zeigen jedoch eine deutliche Verringerung in den Extrakt-Bieren (vgl. Abbildung 40), was vermutlich auf die eiweißfällende Wirkung der eingebrachten Gerbstoffe zurückzuführen ist. Die trübungshemmende Wirkung der Hopfen-Gerbstoffextrakte beruht damit offenbar in erster Linie auf deren eiweißstabilisierender Wirkung, was in Anbetracht der Wirkungsweise von Gallotanninpräparaten nicht überrascht.

Trotz einer tendenziell schlechteren Schaumhaltbarkeit des P10-Bieres ist keine generelle Beeinträchtigung des Schaums durch den Einsatz der Gerbstoffextrakte zu verzeichnen.

4.2.2.2 Vergleich verschiedener Hopfenprodukte

In einer weiteren Versuchsreihe wurden 4 unterschiedliche Hopfenprodukte (Ethanolextrakt, CO₂-Extrakt, Pellets, Ethanolextrakt + Gerbstoffextrakt) miteinander verglichen, um genauere Informationen über die eingebrachten Polyphenole und den Einfluss auf die kolloidale Stabilität zu erhalten. Zur Erfassung eines breiteren Spektrums an ernährungsphysiologisch relevanten Hopfeninhaltsstoffen wurde die HPLC-Polyphenolanalytik um die Erfassung von Rutin (Kämpferolglucosid), Astragalin (Quercetinrutinosid) und Co-Multifidolglucosid erweitert, deren Wirkungsweise bereits in Kapitel 2.2.4 (vgl. Tabelle 3) erläutert wurde. Bei Letzterem handelt es sich um ein erst in jüngster Vergangenheit in Hopfen entdecktes Acylphloroglucinol-Derivat, dem aufgrund seiner inhibierenden Wirkung auf das Enzym Cyclooxygenase-1 (COX-1) eine antientzündliche Wirkung zugeschrieben wird [BOHR et al. 2005].

Das Malz (Pilsner Typ) stammte für alle 4 Ansätze aus ein und derselben Charge. Die Schüttung erfolgte mit 11 kg, der Hauptguss umfasste 40 l und die Nachgüsse 33 l. Die Einmaischtemperatur lag hier bei 40 °C. Nach dem Einmaischen wurde die Temperatur auf 52 °C erhöht und für 10 Minuten gehalten. Im Anschluss folgten Rasten bei 62 °C (30 Min.) und 72 °C (30 Min.). Die Abmaisch- und Läutertemperatur betrug 78 °C. Die Hopfengabe erfolgte in allen Ansätzen zu Kochbeginn, der Gerbstoffextrakt mit einem Polyphenolgehalt von 8% („P8“) wurde ins Brauwasser dosiert. Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Hopfen- und Gerbstoffextrakt-Zugaben der verschiedenen Ansätze. Sämtliche Hopfenprodukte entstammten derselben Aromahopfen-Sorte aus derselben Ernte. Nach der einstündigen Kochung und der 30-minütigen Whirlpoolrast wurde die Würze auf eine Anstell- und Gär-

temperatur von 12 °C gekühlt und vergoren. Reifung, Lagerung und Abfüllung erfolgten wie unter 4.2.2.1 beschrieben.

Tabelle 14: Einsatzkonzentrationen der verschiedenen Hopfenprodukte

Ansätze	Ethanolextrakt (Ethanol)*	CO ₂ -Extrakt (CO ₂)*	Pellets (Pellets)*	Ethanolextrakt + Gerbstoffextrakt (P8)*
Konzentration	100 mg α-Säure/l PfvW	100 mg α- Säure/l PfvW	75 mg α- Säure/l PfvW	100 mg α-Säure/l PfvW + 0,75 g Polypheno- le/l BW

* in den Diagrammen verwendete Kurzschreibweise

Tabelle 15: Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte - Stammwürze, Vergärungsgrad, pH und Bitterstoffausbeute

Bier	Stammwürze [GG%]	Vergärung [%]	pH	Bitterstoffausbeute [%]
Ethanol	11,4	80	4,56	32
CO ₂	11,6	78	4,68	30
Pellets	11,1	80	4,67	28
P8	11,3	80	4,70	31

Die im Pilotmaßstab gebrauten Biere unterliegen geringen Schwankungen im Bereich der Stammwürze (11,1-11,6 GG%), des Vergärungsgrads (78-80%) sowie des pH-Werts (4,6-4,7), wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die nachfolgend besprochenen Substanzkonzentrationen auf eine gemeinsame Stammwürze von 11,6 GG% berechnet.

Die Berechnung der Bitterstoffausbeute unter Berücksichtigung der dosierten Menge an α-Säure ergibt aufgrund der frühen Hopfengabe nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen (vgl. Tabelle 15). Dennoch resultiert die Hopfung mit Pellets in einer

um 2-4% schlechteren Isomerisierungsrate als dies bei der Verwendung von Reinharzextrakten der Fall ist.

Die mitunter feststellbaren geringen Abweichungen bezüglich der kolloidalen Stabilität und der Schaumhaltbarkeit waren weniger auf die Wahl des Hopfenprodukts als vielmehr auf unvermeidbare Schwankungen bei der Herstellung der Biere im Kleinmaßstab zurückzuführen. Im Allgemeinen konnten in dieser Versuchsreihe jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, weshalb hier auf eine gesonderte Darstellung verzichtet wird.

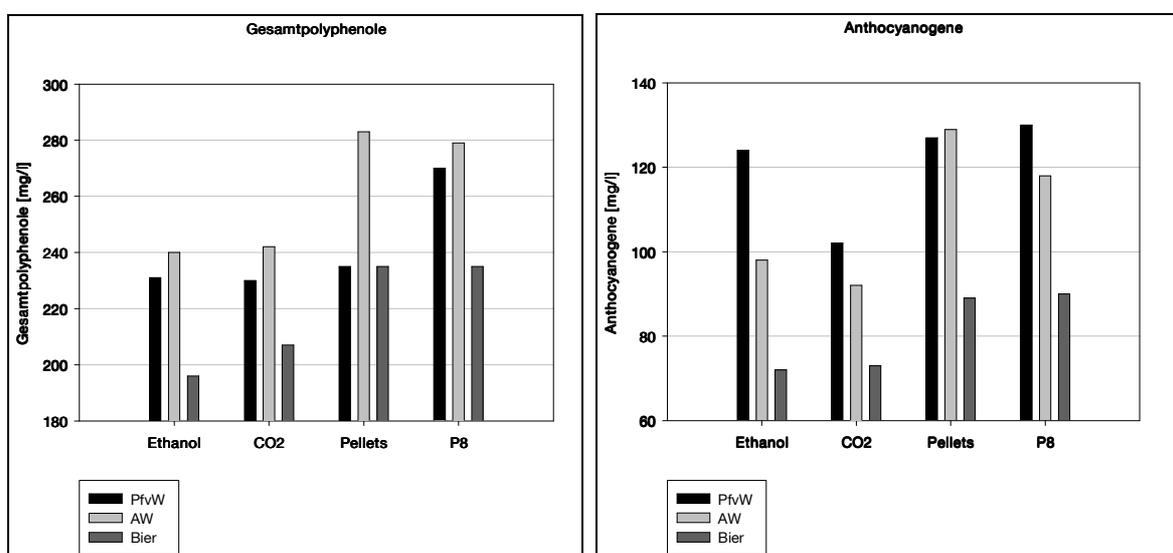


Abbildung 41: Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte - Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene in Würze und Bier

Bedingt durch die aus dem Gerbstoffextrakt ins Brauwasser eingebrachten Polyphenole weist die P8-Pfannevollwürze eine wesentlich höhere Konzentration an Gesamtpolyphenolen auf als die Vergleichsproben (siehe Abbildung 41). Durch die Eindampfung während des Würzekochens erhöht sich der Polyphenolgehalt der Anstellwürze in den Ansätzen Ethanol, CO₂ und P8 um etwa denselben Faktor, während die Konzentrationssteigerung der Pelletwürze aufgrund der durch die Pellets eingebrachten Polyphenole deutlich stärker ausfällt. In der Anstellwürze liegen in den beiden Reinharzextraktansätzen (ca. 240 mg/l) um etwa 40 mg/l niedrigere Konzentrationen vor als in der Pellet- bzw. der P8-Probe. Die Gärung, sowie insbesondere die Lagerung und Filtration bewirken durch die Adsorption von Polyphenolen an die Hefezellwände bzw. durch Fällungsreaktionen zusammen mit trübungsrelevanten Proteinen in allen Ansätzen eine Polyphenolreduktion in vergleichbarer Größenordnung.

Die Anthocyanogen-Konzentrationen aller Proben verlaufen in der Anstellwürze und im Bier praktisch parallel zu ihren jeweiligen Mengen an Gesamtpolyphenolen und weisen auch hier signifikant höhere Konzentrationen im Pellet- und im P8-Bier auf (vgl. Abbildung 41). Generell kommt es während der Kochung in den Ansätzen Ethanol, CO₂ und P8 zu einer merklichen Verminderung des Anthocyanogen-Gehalts, bedingt durch Fällungsreaktionen zusammen mit Proteinen [NARZISS 1992]. Dieser Verlust wird in der Pellet-Würze durch die eingebrachten Hopfenpolyphenole kompensiert.

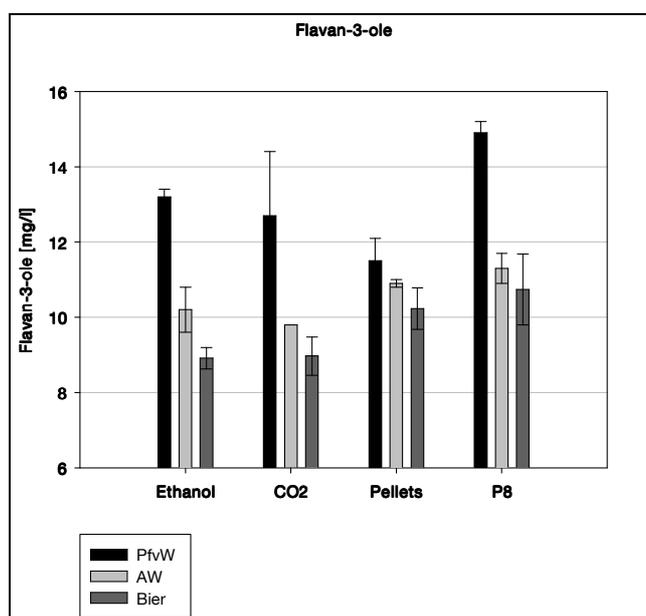


Abbildung 42: Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte - Flavan-3-ole in Würze und Bier

Analog zum Gehalt an Gesamtpolyphenolen kann in der P8-PfvW die höchste Flavan-3-ol-Konzentration nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 42). Durch den Gerbstoffextrakt P8 werden insbesondere Catechin, sowie in geringen Mengen auch Epicatechin und Procyanidin B3 ins Brauwasser eingebracht (hier nicht explizit dargestellt). Diese Tatsache ist insofern bemerkenswert, da der Zusatz der Gerbstoffextrakte P6 und P10 (siehe Kapitel 4.2.2.1) keine detektierbaren Konzentrationen an monomeren und dimeren Flavan-3-olen in die PfvW induzierte. Eine mögliche Erklärung wäre die unterschiedliche Aufbewahrungsart der Gerbstoffextrakte – P6 und P10 wurden in Schraubverschlussgläsern gelagert, während im Falle des neueren P8-Extraktes verschweißte Weißblechdosen verwendet wurden. Ersteres könnte, insbesondere bei längeren Lagerzeiten, zur Oxidation und Polymerisierung niedermolekularer Polyphenole zu höhermolekularen Polyphenolen führen und auf diese Weise

den Verlust der Flavan-3-ole bedingen. Da in der vorliegenden Versuchsreihe im Vergleich zu früheren Untersuchungen kein positiver Effekt der Gerbstoffextrakt-Dosage auf die kolloidale Stabilität festgestellt werden konnte, liegt außerdem der Verdacht nahe, dass eine vorhergehende Oxidation der Gerbstoffextrakte die Ursache für die stabilisierende Wirkung von P6 und P10 gewesen sein könnte. Aufgrund der Oxidations- und Polymerisierungsreaktionen bereits im Aufbewahrungsgefäß würden demnach keine trübungsrelevanten Flavan-3-ole (Precursor) ins Brauwasser eingebracht, sondern überwiegend höher polymerisierte Polyphenole mit starker Gerbkraft, die eine intensivierte Proteinfällung bewirken.

In der Anstellwürze und im Bier liegen in den Ansätzen P8 und Pellets etwas höhere Flavan-3-ol-Konzentrationen als in den beiden Vergleichsproben vor (vgl. Abbildung 42), was auf die ins Brauwasser bzw. die bei der Kochung eingebrachten Hopfenpolyphenole zurückzuführen ist.

Da die phenolischen Säuren in Bier (hier nicht dargestellt) fast ausschließlich aus dem Malz stammen bzw. während der Gärung gebildet werden, konnten erwartungsgemäß keine Unterschiede durch die Verwendung verschiedener Hopfenprodukte festgestellt werden.

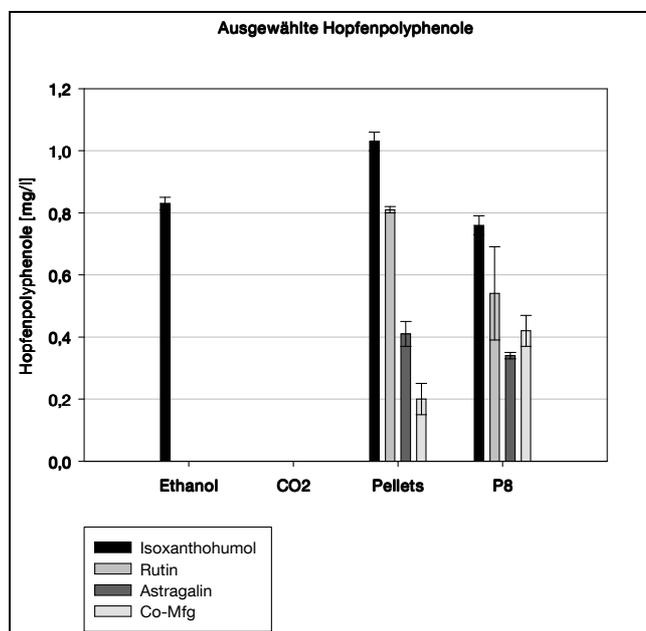


Abbildung 43: Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte - Ausgewählte Hopfenpolyphenole in den unterschiedlich gehopften Bieren

Ein weiteres Ziel dieser Versuchsreihe war die Beobachtung einer Auswahl an ernährungsphysiologisch relevanten Hopfenpolyphenolen. Diesbezüglich wurden die aus der Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte resultierenden Gehalte an Isoxanthohumol, Rutin, Astragalin und Co-Multifidolglucosid (Co-Mfg) im Bier gemessen (vgl. Abbildung 43). Wie bereits unter 4.2.2.1 erwähnt, werden die Hopfenpolyphenole durch Ethanolextraktion mit Ausnahme der Prenylflavonoide vollständig abgetrennt – dies führt dazu, dass im Ethanol-Ansatz von den untersuchten Substanzen nur Isoxanthohumol in Bier wiedergefunden werden kann. Bei der CO₂-Extraktion werden alle Hopfenpolyphenole abgeschieden, so dass im fertigen Bier keine der betrachteten Inhaltsstoffe detektierbar sind [BIENDL und PINZL 2007]. Durch die Verwendung von Pellets bei der Kochung bzw. durch die Zugabe der Gerbstofffraktion kann das gesamte aus dem Naturhopfen stammende Polyphenolspektrum erhalten werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die hier detektierten Substanzen, insbesondere Astragalin und Co-Mfg, allgemein nur in sehr geringen Mengen im Bier vorliegen, was eine relevante ernährungsphysiologische Wirkung eher unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Es hat sich gezeigt, dass die Zugabe der bei der Ethanolextraktion als „Abfallprodukt“ anfallenden Gerbstofffraktion zum Brauwasser eine sowohl aus prozesstechnischer als auch aus qualitativer Sicht vielversprechende Methode darstellt. Sie führt zu höheren Polyphenolgehalten als in der Vergleichsprobe und damit zu einem besseren Reduktionsvermögen bereits während des Maischens und Läuterns, was in einer Verkürzung der Läuterdauer um bis zu 15% resultiert. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Goiris et al. [GOIRIS et al. 2005]. Der beschleunigende Effekt scheint dabei umso größer zu sein, je schlechter die Malzlösung ist und je weniger intensiv die Maischarbeit verläuft.

Gleichzeitig induzieren die eingebrachten Hopfengerbstoffe, ähnlich wie die zur Stabilisierung eingesetzten Gallotannine, offenbar eine intensivierete Fällung sensitiver Proteine und wirken sich auf diese Weise positiv auf die kolloidale Stabilität der resultierenden Biere aus. Die Intensität des Stabilisierungseffekts hängt dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Oxidationsgrad des benutzten Gerbstoffextrakts ab – höher polymerisierte Polyphenole besitzen ein gesteigertes Gerbvermögen.

Es konnte keine eindeutige Verschlechterung der Schaumhaltbarkeit durch den Einsatz der Gerbstoffextrakte festgestellt werden. Auch die Farbzunahme fällt mit 0,2 EBC gegenüber der Referenz nur sehr gering aus.

Eine zeitversetzte Dosage der Gerbstofffraktion (ins Brauwasser) und des Reinharzextrakts (bei der Kochung) ermöglicht zudem auf elegante und Reinheitsgebot-konforme Weise die Erhaltung des Hopfenpolyphenolspektrums (Eintrag ernährungsphysiologisch relevanter Hopfenpolyphenole) bei gleichzeitig besserer Bitterstoffausnutzung, verglichen mit der Verwendung von Pellets.

In Hinblick auf die kolloidale Stabilität der resultierenden Biere konnte, zumindest bei früher Hopfengabe, kein Unterschied zwischen der Verwendung von Reinharzextrakten und Pellets festgestellt werden. Die durch die Pellet-Hopfung bedingte Konzentrationssteigerung trübungsrelevanter Flavan-3-ole wird möglicherweise durch die verstärkte Fällung sensitiver Proteine während der Würzekochung und auch während der Gärung und Lagerung egalisiert.

4.2.3 Der Einfluss hoher Extraktgehalte unter Verwendung von Glucosesirup beim Würzekochen

Das Brauen mit hohen Stammwürzen (High Gravity Brewing) dient in erster Linie zur Erhöhung der Anlagenkapazität bestehender Sudwerke und zur Senkung der Energiekosten. Die Würze wird dabei so stark eingebraut, wie es die Abläutervorrichtung als begrenzender Faktor zulässt. Nach Narziss ist eine Überschüttung von 28-30% realistisch, welche in Stammwürzen von 14,5-14,8 GG% resultiert. Eine weitere Steigerung der Würzekonzentration kann durch die Verwendung spezieller adjuncts wie Flüssigzucker erreicht werden, der etwa 10 Minuten vor Kochende zur Würze gegeben wird. Die Rückverdünnung der Würzen auf die gewünschte niedrigere Stammwürze erfolgt entweder während der Würzekühlung oder bei der Filtration mit sterilem bzw. mit entgastem Wasser. Im Falle einer Verdünnung erst am Filter können sehr hohe Würzekonzentrationen (> 15 GG%) eine Stressreaktion der Hefe hervorrufen, was neben einer verzögerten Gärung in einer gesteigerten Produktion von Gärungsnebenprodukten zum Ausdruck kommt. Derartige Biere weisen selbst nach der Rückverdünnung noch eine wahrnehmbare Ester-Note auf [NARZISS 1992, NARZISS 2004, KUSCHE 2005].

Neben den bereits erwähnten Vorteilen des High Gravity Brewings wird auch von einer Verbesserung der kolloidalen Stabilität berichtet. Kusche wies in diesem Zusammenhang im abgelagerten Bier eine signifikante Reduktion der dimeren Proanthocyanidine Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 nach. [NARZISS 1992, NARZISS 2004, KUSCHE 2005].

Im Rahmen zweier Versuchsansätze (Durchführung jeweils als Doppelbestimmung) sollte der positive Effekt des Brauens mit hohen Stammwürzen auf die chemisch-physikalische Haltbarkeit verifiziert und anhand der Beobachtung der Haupttrübungsbildner analytisch begründet werden. In diesem Zusammenhang wurden nicht nur Biere aus 100% Malz hergestellt, sondern auch adjunct-Biere, denen bei der Würzekochung Glucosesirup zugegeben wurde. Dabei wurde jeweils eine „normal“ eingebraute Referenzprobe (Stammwürze 12 GG%) mit einer High Gravity-Probe aus 100% Malz und einer adjunct-High Gravity-Probe (30% Sirupanteil, bezogen auf den Stammwürzegehalt) verglichen. In Versuchsansatz 1 wurde in den HG-Würzen eine Ausschlagkonzentration von 15 GG% und in Ansatz 2 von 18 GG% angestrebt. Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Systematik und Probenbezeichnung der durchgeführten Versuche. Gegenstand der Untersuchung war neben der Bestimmung der kolloidalen Haltbarkeit im fertigen Bier auch die Protokollierung der trübungsrelevanten Polyphenole und Proteine.

Tabelle 16: Das Brauen mit hohen Stammwürzen - Systematik und Probenbezeichnung der beiden Versuchsansätze

	Ansatz 1	Ansatz 2
Stw. 12 GG%, 100% Malz	Referenz	Referenz
High Gravity, 100% Malz	HG 15%	HG 18%
High Gravity, mit Sirup	HG 15%+	HG 18%+

Für die Versuche wurden entsprechend dimensionierte Probemengen einer im großtechnischen Maßstab hergestellten Vorderwürze (Extraktgehalt 16-18 GG%) entnommen und in der 60 l-Pilotsudanlage auf die jeweils gewünschte Pfannevollwürzekonzentration verdünnt. Die Hopfung erfolgte 10 Minuten nach Kochbeginn unter Berücksichtigung der höheren Dosis in den High Gravity-Würzen, wobei in jedem Versuchsansatz (jeweils zwei Versuchsreihen) sowohl CO₂-Reinharzextrakt als auch Pellets verwendet wurden. Der Glucosesirup wurde 10 Minuten vor Kochende in die HG+ -Würzen dosiert, die Rückverdünnung aller HG-Biere auf 12 GG% Stammwürze erfolgte mit destilliertem Wasser bei Beendigung der Kochung. Der Endvergärungsgrad sämtlicher Anstellwürzen (AW) lag im Bereich von 83-85%. Zur Hauptgärung wurde eine Temperatur von 10 °C gewählt. Reifung, Lagerung, Filtration und Abfüllung erfolgten wie unter 4.2.1 beschrieben.

Die in den folgenden Tabellen und Diagrammen dargestellten Analysenergebnisse repräsentieren die Mittelwerte der Versuchsreihen beider Ansätze.

Tabelle 17: Das Brauen mit hohen Stammwürzen – pH-Wert in Anstellwürze und Bier

Ansatz 1	pH-AW	pH-Bier	Ansatz 2	pH-AW	pH-Bier
Referenz	5,47	4,71	Referenz	5,60	4,72
HG 15%	5,49	4,61	HG 18%	5,55	4,65
HG 15%+	5,50	4,29	HG 18%+	5,55	4,43

Aus Tabelle 17 ist zu entnehmen, dass sich die pH-Werte der rückverdünnten Anstellwürzen weder in Ansatz 1 noch in Ansatz 2 signifikant voneinander unterscheiden. Demgegenüber

induziert die Gärung einen deutlich intensiveren pH-Sturz in den HG-Bieren, insbesondere nach Sirup-Dosage. Der Grund dafür ist vermutlich das verringerte Pufferungsvermögen der Anstellwürze, bedingt durch den Anteil an Glucosesirup und durch die Rückverdünnung.

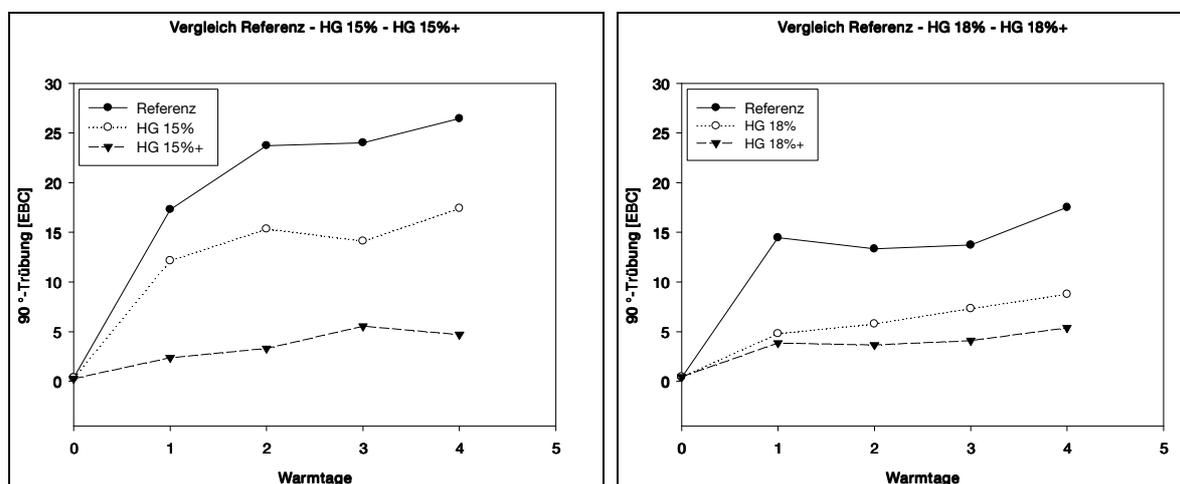


Abbildung 44: 90 °-Trübungsbildung in den unterschiedlich stark eingebrauten Bieren

Die 90 °-Trübungsbildung im Forciertest bei 40/0 °C (vgl. Abbildung 44) verläuft sowohl in den 15%- als auch in den 18%-Ansätzen wesentlich langsamer als in den jeweiligen Referenzproben. Die nach 4 Wärmtagen gebildete absolute Trübungsmenge verringert sich in den High Gravity-Bieren (HG 15% und HG 18%) um etwa 35-50%. Die Sirup-Biere (HG 15%+ und HG 18%+) weisen gar eine um ca. 70-80% niedrigere Trübung als die Referenz auf. Aufgrund der Tatsache, dass in den beiden Untersuchungsansätzen unterschiedliche Basiswürzen mit differierenden Mengen an Trübungsbildnern verwendet wurden, sind in Ansatz 1 allgemein höhere Trübungswerte zu verzeichnen als in Ansatz 2.

In der auf 12% verdünnten Anstellwürze sind noch keine signifikant unterschiedlichen Flavan-3-ol-Konzentrationen zwischen den HG-Proben aus 100% Malz und der Referenz festzustellen (vgl. Abbildung 45). Die HG+-Würzen zeigen hingegen, einhergehend mit der Sirup-Dosage, bereits eine sichtbare Reduktion der phenolischen Trübungsbildner. Während der Gärung und Lagerung kommt es in allen Proben zu einer Abnahme der Flavan-3-ole, die zum einen mit der Adsorption an die Hefe, vor allem aber mit der Ausfällung von Polyphenol-Protein-Komplexen erklärbar ist [GRAMSHAW 1070a, ANGER 1983, MOLL et al. 1984, WACKERBAUER und ANGER 1984a]. Aufgrund des in Tabelle 17 dargestellten ausgeprägten pH-Sturzes und den daraus resultierenden niedrigeren pH-Werten in den High Gravity-

Bieren, wird die Polymerisierung der niedermolekularen Polyphenole gefördert. Dies resultiert in einer vergleichsweise intensiveren Reduzierung der Flavan-3-ole, insbesondere in den Sirup-Bieren.

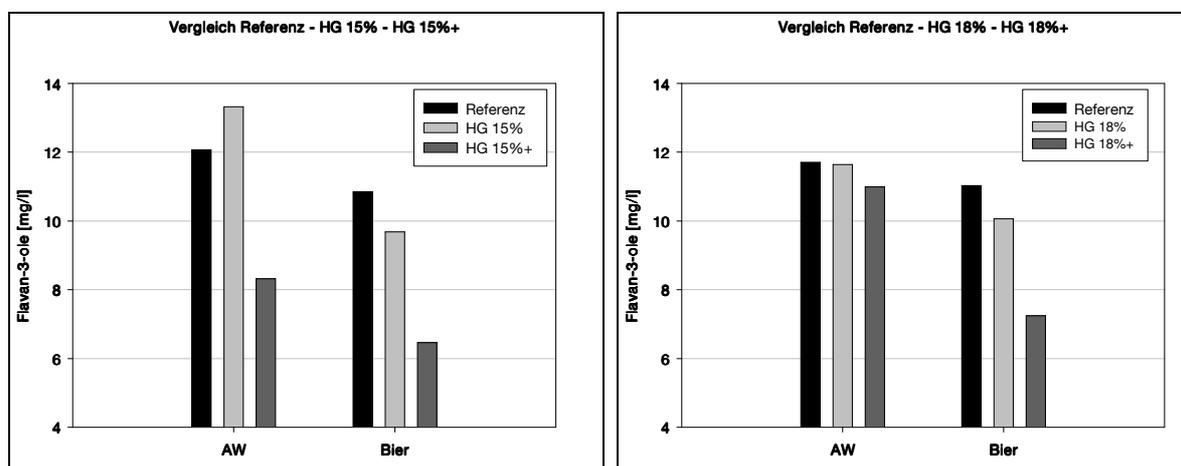


Abbildung 45: Das Brauen mit hohen Stammwürzen - Flavan-3-ole in Anstellwürze (nach Rückverdünnung) und in Bier

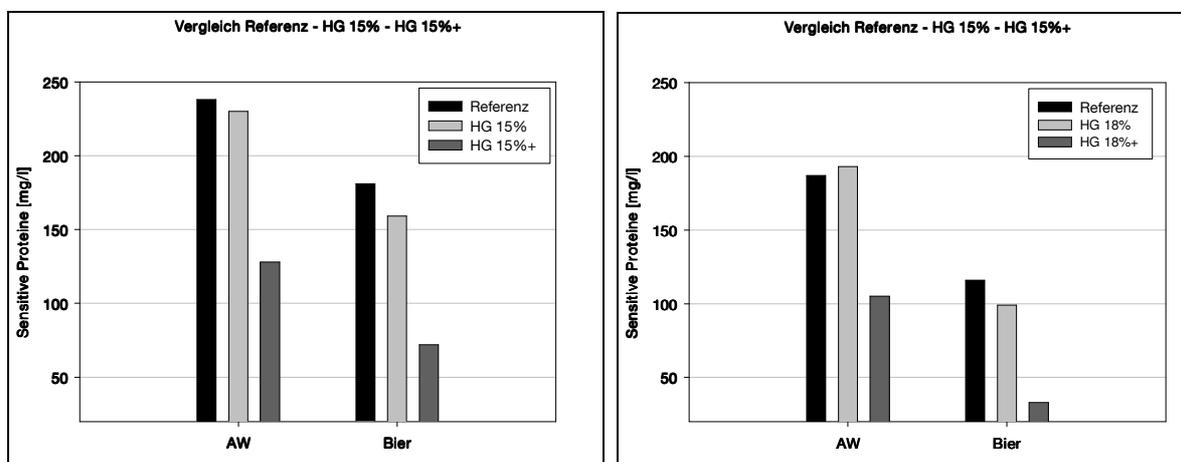


Abbildung 46: Das Brauen mit hohen Stammwürzen - Sensitive Proteine in Anstellwürze (nach Rückverdünnung) und in Bier

Das Verhalten der sensitiven Proteine (vgl. Abbildung 46) ist praktisch identisch mit dem der Flavan-3-ole. Auch hier ist nur in der Sirup-Anstellwürze eine signifikant geringere Menge an Proteinen detektierbar als in der Referenzprobe. Wiederum kommt es in den High Gravity-Bieren zu einer Intensivierung der Fällungsreaktionen während der Gärung und Lagerung,

was auch in Bezug auf die Proteine mit dem tieferen pH-Sturz erklärt werden kann. Dieser bewirkt offenbar eine Annäherung an den isoelektrischen Punkt der sensitiven Trübungsproteine, verringert dadurch deren Löslichkeit und erhöht gleichzeitig die Affinität zu trübungsbildenden Polyphenolen.

Die signifikant bessere kolloidale Stabilität der High Gravity-Biere im Vergleich zur Referenzprobe resultiert aus den geringeren Konzentrationen an Haupttrübungsbildnern im Bier. Die geringste Trübungsbildung ist dabei in den Sirup-Bieren zu verzeichnen. Die durchschnittliche Reduktion der Flavan-3-ole beläuft sich, unabhängig von der Würzekonzentration, auf etwa 10% in den HG-Bieren aus 100% Malz und auf ca. 30% in den Sirup-Bieren. Die Konzentration an sensitiven Proteinen verringert sich ebenfalls in beiden Ansätzen um etwa 14% (nur Malz) und um 60-70% (mit Sirup). Da in der Anstellwürze noch keine wesentlichen Unterschiede festzustellen sind, muss die Konzentrationsabnahme auf Vorgänge bei der Gärung und Lagerung zurückzuführen sein. Offenbar induzieren die niedrigeren pH-Werte im High Gravity-Bier eine intensivierete Fällung von Protein-Polyphenol-Komplexen im Tank. Die unverhältnismäßig starke Abnahme der Proteine und Polyphenole in den HG+-Bieren ist nicht alleine auf die Verdünnung durch den Zusatz von Glucosesirup zurückzuführen, sondern auch auf den weitaus intensiveren pH-Sturz in diesen Proben.

In den vorgestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Brauen mit hohen Stammwürzen eine Methode darstellt, mittels derer die kolloidale Stabilität auf prozesstechnischem Wege deutlich verbessert werden kann. Damit bestätigten sich die Erfahrungen von Narziss und Kusche [NARZISS 1992, NARZISS 2004, KUSCHE 2005]. Als besonders vielversprechend erwies sich der nicht Reinheitsgebot-konforme Einsatz von Glucosesirup bei der Würzekochung. Diesbezüglich muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass etwaige negative Auswirkungen wie z.B. auf Schaum und Geschmack, deren Untersuchung nicht Gegenstand dieser Arbeit war, prinzipiell nicht ausgeschlossen werden können.

4.2.4 Der Einfluss der Gärführung auf die kolloidale Stabilität

Bis heute ist nur sehr wenig über den Einfluss der Gärung auf das Verhalten trübungsrelevanter Substanzen und auf die kolloidale Stabilität der resultierenden Biere bekannt. Grundsätzlich scheinen pH-Sturz und steigender Ethanolgehalt während der Gärung die Ausfällung von Polyphenol-Protein-Komplexen sowie von α - und β -Glucanen zu fördern. Auch die Hefezellwände wirken dabei als unlösliche Proteine und adsorbieren bis zu einem gewissen Grad Polyphenole. [GRAMSHAW 1970a, GROMUS 1981, MOLL et al. 1974, MOLL et al. 1984, WACKERBAUER und ANGER 1984a, ANGER 1995, PAPP 2000, SCHUNKE 1992]. Nach Narziss wirken sich eine warme Gärung und Reifung prinzipiell schlechter auf die chemisch-physikalische Stabilität aus als eine konventionelle (kalte) Gärführung. Eine zweite Hefegabe gegen Ende der Hauptgärung sowie die rechtzeitige Entfernung der Hefe scheinen dagegen eher von Vorteil zu sein [LINKO und ENARI 1969, NARZISS 1994, REHMANJI et al. 2000]. Auch wenn der Effekt einer adäquaten Reifung und Kaltlagerung auf die kolloidale Stabilität (siehe Kapitel 2.5.2) im Allgemeinen sicher höher einzuschätzen ist als die bei der Hauptgärung ablaufenden Prozesse, so werden doch durch Letztere die Grundvoraussetzungen für eine aus Sicht der Bierstabilität optimale Lagerung geschaffen.

Im Rahmen einiger Versuchsreihen sollte der Einfluss bestimmter Variationen hinsichtlich der Gärführung untersucht werden. Dazu kamen unterschiedliche Gärtemperaturen, verschiedene Hefe-Anstellzellzahlen und Hefe aus unterschiedlicher Führungszahl zur Anwendung. Zudem wurden zwei Schnellgärverfahren (mit und ohne Druck) miteinander verglichen. Neben der Protokollierung der Gärdauer sowie des Polyphenol- und Proteinspektrums im fertigen Bier wurden auch das Reduktionsvermögen und die Trübungsbildung im Forciertest bei 40/0 °C gemessen. Zur Beurteilung der Auswirkungen auf andere Qualitätsparameter des Bieres wurden ferner die Gärungsnebenprodukte und die Schaumhaltbarkeit bestimmt.

In jedem der vier im Folgenden beschriebenen Versuchsansätze wurden jeweils drei Versuchsreihen (3fach-Bestimmung) durchgeführt. Dabei kam in jeder Reihe eine andere Basiswürze (im großtechnischen Maßstab gewonnene Anstellwürze) zum Einsatz. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte dieser Reihen. Zur Vergärung der Würze wurde ausschließlich Presshefe vom Stamm W 34/78 verwendet. Die Reifung und Lagerung erfolgten unabhängig von den Variationen bei der Hauptgärung bei 4 °C (1 Woche) bzw. bei 0 °C (2 Wochen). Nach der Lagerung wurden die Biere filtriert, abgefüllt und analytisch untersucht.

4.2.4.1 Die Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen

Zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Gärtemperaturen wurde die Anstellwürze parallel bei 9 °C, 12 °C und 15 °C mit einer Hefekonzentration von 15 Millionen Zellen/ml vergoren. Die Gärung verkürzte sich dabei mit Erhöhung der Temperatur um 2 bzw. 3 Tage (vgl. Tabelle 18). Die mittels SCABA-Analytik ermittelten Parameter im Bier zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit zeigen praktisch keine Unterschiede bezüglich des Alkoholgehalts, des Restextrakts und des Vergärungsgrads. Lediglich der höhere pH-Wert des bei 9 °C vergorenen Bieres weist auf einen etwas moderateren pH-Sturz in diesem Ansatz hin.

Tabelle 18: Gärdauer bei Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen und SCABA-Analyse des fertigen Bieres

Ansatz (Gärtemp.)	Gärdauer [d]	Alkohol [GG%]	Restextrakt [GG%]	Vergärung [%]	pH
9 °C	7	4,1	1,9	84	4,41
12 °C	5	4,1	1,8	85	4,32
15 °C	4	4,1	1,8	85	4,29

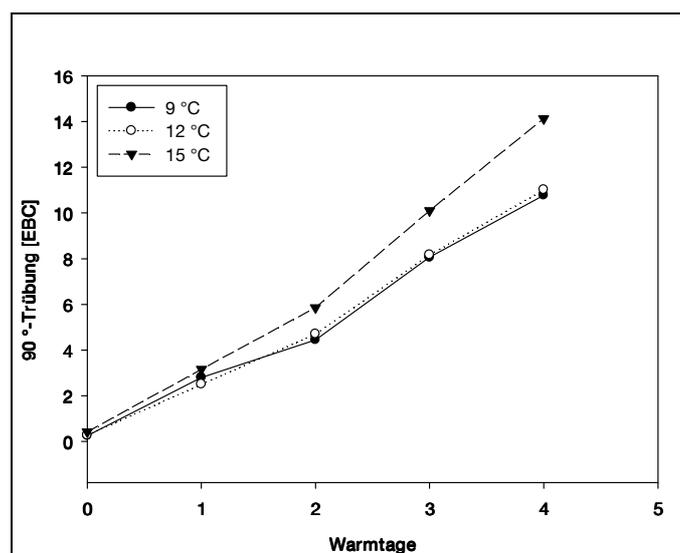


Abbildung 47: 90 °-Trübungsbildung beim Forciertest 40/0 °C nach Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen

Die kolloidale Stabilität im Forciertest (siehe Abbildung 47) zeigt im Durchschnitt nur geringe Unterschiede zwischen den Vergleichsproben. Der 90 °-Trübungsverlauf des bei 9 °C vergorenen Bieres ist nahezu identisch mit dem des 12 °C-Bieres. Einzig das bei 15 °C vergorene Bier weist eine im Vergleich etwas schlechtere Stabilität auf und liegt nach 4 Warmtagen etwa 3 EBC über den anderen Ansätzen.

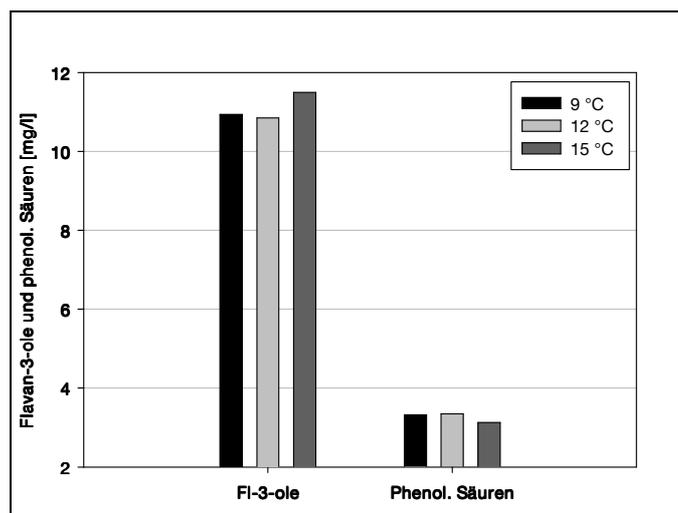


Abbildung 48: Gehalt des Bieres an Flavan-3-olen und phenolischen Säuren nach Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen

Analog zum Verhalten im Forciertest sind im 15 °C-Bier etwas höhere Flavan-3-ol-Konzentrationen zu verzeichnen als in den kälter vergorenen Ansätzen (vgl. Abbildung 48). Dies ist möglicherweise auf die verkürzte Gärdauer bei sehr warmer Gärung zurückzuführen, welche sowohl eine verringerte Sedimentationszeit im Gärtank als auch eine reduzierte Adsorption der Polyphenole an die Hefezellwand bedingt. Der Nachweis der Zunahme trübungsrelevanter Flavan-3-ole bei hohen Gärtemperaturen widerspricht Papps Ergebnissen, der keinen Einfluss auf die Polyphenolkonzentration feststellen konnte [PAPP 2000]. Die phenolischen Säuren scheinen hingegen in ihrer Summe von der Art der Temperaturführung unabhängig zu sein.

Die wärmer vergorenen Biere weisen neben der Tendenz zu steigenden Flavan-3-ol-Gehalten auch leicht erhöhte Proteinkonzentrationen auf (vgl. Abbildung 49). So können im 12 °C- und im 15 °C-Bier um etwa 5% höhere Konzentrationen an Gesamtstickstoff und an sensitiven Proteinen als im 9 °C-Bier detektiert werden. Offenbar wird der von Narziss er-

wähnte positive Effekt des intensiveren pH-Sturzes auf die Ausscheidung von Eiweißkolloiden durch die verkürzte Gärdauer und die einhergehende Verkürzung der Sedimentationszeit bei höheren Temperaturen egalisiert [NARZISS 2004]. Der parallele Verlauf der beiden Stickstofffraktionen verdeutlicht den besonderen Einfluss der Gärtemperatur auf die trübungsrelevanten sensitiven Proteine, wohingegen andere Fraktionen offenbar unbeeinflusst bleiben.

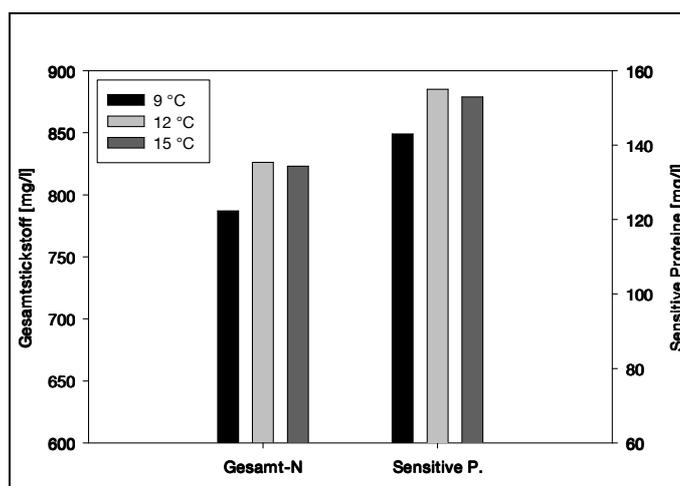


Abbildung 49: Gesamtstickstoff und sensitive Proteine im fertigen Bier nach Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen

Die Schaumhaltbarkeit der Biere wurde in diesem Versuchsansatz nicht untersucht. Diesbezüglich sei jedoch auf Narziss verwiesen, der bereits bei Gärtemperaturen von 10-12 °C von einer möglichen Beeinträchtigung des Schaums berichtet [NARZISS 2004].

Bezüglich des Reduktionsvermögens der resultierenden Biere konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, weshalb hier auf eine gesonderte Darstellung verzichtet wird.

Abbildung 50 zeigt ergänzend den Gehalt des Bieres an aromaaktiven Gärungsnebenprodukten. Die Anwendung höherer Gärtemperaturen bewirkt im Allgemeinen eine gesteigerte Bildung an höheren Alkoholen (insbesondere n-Propanol, Isobutanol, 2-Methylbutanol, 3-Methylbutanol) und Estern (Ethylacetat, Isoamylacetat, Isobutylacetat, 2-Phenylethylacetat), was sich auch in den hier durchgeführten Versuchen bestätigt [NARZISS 2004, BOULTON und QUAIN 2001]. So können im kalt vergorenen Bier (9 °C) die niedrigsten und im 15 °C-Bier die höchsten Konzentrationen beider Substanzgruppen nachgewiesen werden. Unter

Berücksichtigung des Forciertestergebnisses kann auch ein Einfluss der höheren Alkohole auf die kolloidale Stabilität nicht ausgeschlossen werden. Die Auswirkung höherer Ethanolkonzentrationen wurde bereits in Kapitel 2.4.2 erläutert.

Die Konzentrationen an vicinalen Diketonen liegen in allen Ansätzen grundsätzlich weit unter ihrer jeweiligen Geschmacksschwelle von 0,12-0,15 mg/l (Diacetyl) und 0,60-0,90 mg/l (2,3-Pentandion). Eine Temperatur von 15 °C induzierte hier offenbar einen geringfügig intensiveren Abbau während der Gärung, was mit den Beobachtungen von Boulton und Quain übereinstimmt [BOULTON und QUAIN 2001]. Die Bildung von Schwefeldioxid scheint dagegen nicht von der Gärtemperatur beeinflusst worden zu sein.

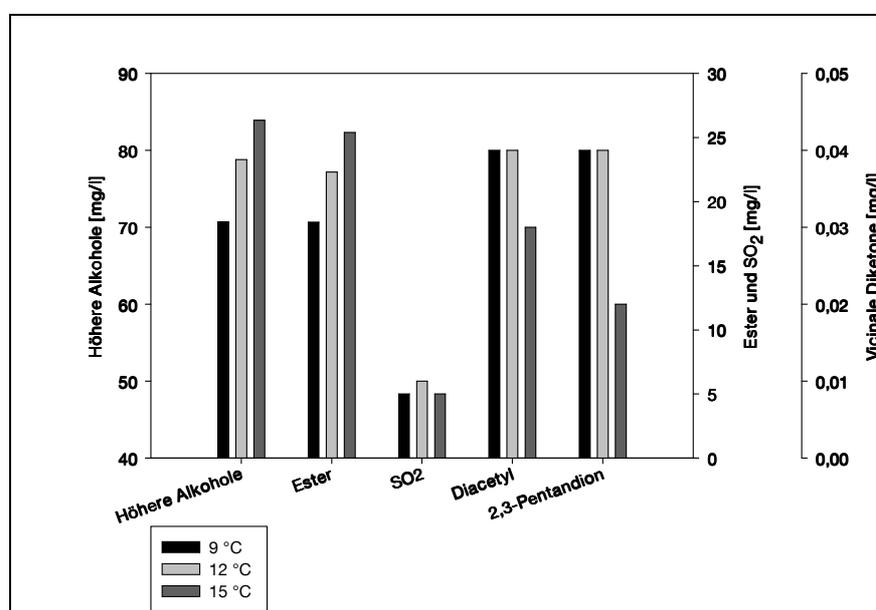


Abbildung 50: Bildung von Gärungsnebenprodukten infolge der Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen

4.2.4.2 Variation der Hefe-Anstellmenge

Wie die Anwendung höherer Gärtemperaturen, so bewirkt auch eine Steigerung der Hefegabe beim Anstellen von 15 auf 30 bzw. 45 Millionen Zellen/ml eine Verkürzung der Gärdauer um zwei bzw. 3 Tage (vgl. Tabelle 19). Als Gärtemperatur wurde hier in allen Ansätzen ein Wert von 9 °C gewählt. Die SCABA-Analyse offenbart keine oder nur minimale Unterschiede in Bezug auf Alkoholgehalt, Restextrakt und Vergärungsgrad. Eine Hefegabe von 45 Millionen Zellen/ml induziert dagegen einen um etwa 0,1 Einheiten höheren Bier-pH, möglicher-

weise bedingt durch die geringere Hefevermehrung in diesem Ansatz und dem daraus resultierenden verminderten pH-Sturz.

Tabelle 19: Gärdauer nach Variation der Hefe-Anstellmenge und SCABA-Analyse des fertigen Bieres

Ansatz (Zellzahl)	Gärdauer [d]	Alkohol [GG%]	Restextrakt [GG%]	Vergärung [%]	pH
15 Mio/ml	8	4,0	1,7	85	4,36
30 Mio/ml	6	4,1	1,7	86	4,38
45 Mio/ml	5	4,3	1,7	86	4,46

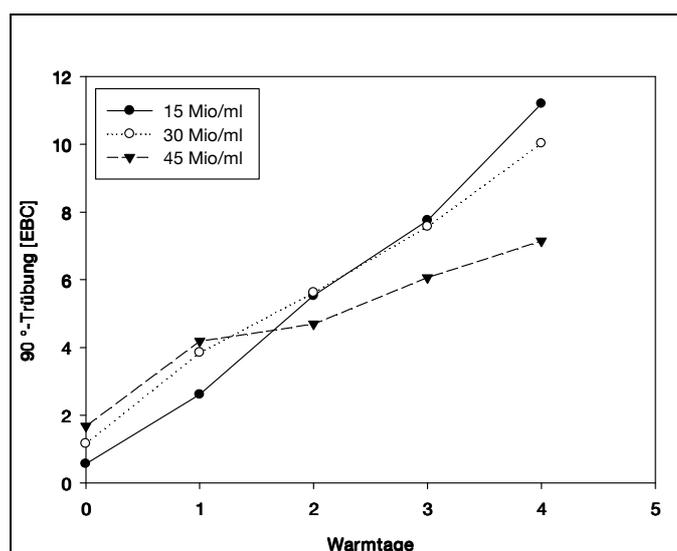


Abbildung 51: 90 °-Trübungsbildung beim Forciertest 40/0 °C nach Variation der Hefe-Anstellmenge

Die 90 °-Trübung im Forciertest nimmt einen bemerkenswerten Verlauf, wie Abbildung 51 verdeutlicht. Bereits in der Anfangstrübung im frisch abgefüllten Bier (WT 0) sind signifikante Unterschiede zu erkennen. So weist das Bier mit der geringsten Anstellzellzahl auch den niedrigsten Trübungswert (0,6 EBC) auf, während die Proben mit höheren Hefegaben um jeweils 0,5 EBC höher liegen. Zwischen erstem und zweitem Wärmtag kehrt sich der Trübungsverlauf jedoch komplett um, so dass letztlich das Bier mit der höchsten Hefegabe die beste Stabilität generiert. Nichtsdestotrotz können gesteigerte Hefegaben offenbar auch ein

vermehrtes Einbringen trübungsaktiver Substanzen induzieren, die selbst durch die Filtration nicht entfernt werden können. Dieser Umstand weist auf die eventuelle Beteiligung von Hefe-Glucanen hin. Der Reservestoff Glycogen (α -Glucan) reichert sich während der Gärung und Reifung in der Hefezelle an, sobald die Hefevermehrung gehemmt wird. Dies geschieht beispielsweise bei einer Unterversorgung mit Nährstoffen und gleichzeitigem Überangebot an Zucker [BOULTON und QUAIN 2001, ANNEMÜLLER et al. 2005]. In Abhängigkeit von Stamm und physiologischem Zustand der Hefe, sowie unter Bedingungen, die zu Hefestress führen (z.B. High Gravity Brewing, hohe Gärtemperaturen) kann es zur spontanen Freisetzung von Glycogen aus der Zelle kommen. Dies führt zur Bildung „unsichtbarer“, jedoch nephelometrisch messbarer Trübungen (90 °-Messung bis 1,2 EBC), welche durch die Filtration nicht entfernt werden können [MALCORPS et al. 2001].

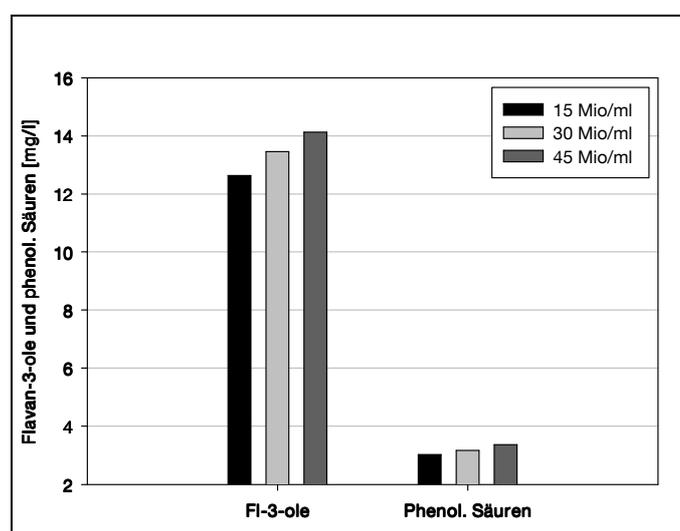


Abbildung 52: Gehalt des Bieres an Flavan-3-olen und phenolischen Säuren nach Variation der Hefe-Anstellmenge

Die Stabilität nach 4 Warmtagen verhält sich umgekehrt proportional zum Verhalten der trübungsrelevanten Flavan-3-ole und sensitiven Proteine (vgl. Abbildungen 52-53). So scheinen höhere Hefegaben zwar das Vorhandensein größerer Mengen an Trübungsbildnern im Bier zu induzieren, ohne jedoch die kolloidale Stabilität negativ zu beeinflussen. Vielmehr zeichnet sich, wie oben bereits beschrieben, insbesondere das Bier mit der höchsten Anstellzellzahl durch die langfristig beste Stabilität aus. Neben einer Steigerung der Konzentrationen an trübungsrelevanten Substanzen ist nach höherer Hefegabe auch ein Anstieg der phenolischen Säuren sowie des Gesamtstickstoffs zu verzeichnen. Als mögliche Ursachen kommen

sowohl das Einbringen von an die Hefezellwand adsorbierten phenolischen Substanzen als auch die verkürzte Gärdauer bzw. Sedimentationszeit in den Bieren mit gesteigerter Hefedosage in Frage.

Trotz der höheren Proteinkonzentrationen kommt es in den Bieren aus höherer Anstellzellzahl zu einer merklichen Verschlechterung der Schaumhaltbarkeit (siehe Abbildung 53). Ein möglicher Grund für dieses Verhalten könnte die verstärkte Exkretion von schaumnegativen Fettsäuren sein, die häufig mit größeren Hefezellmengen einhergeht [NARZISS 2004].

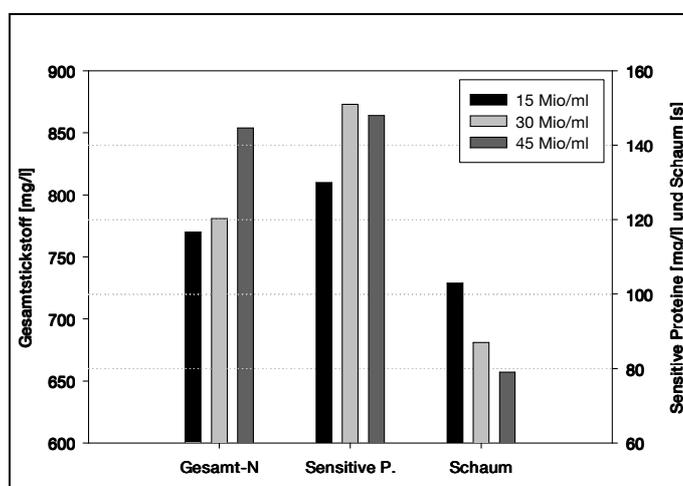


Abbildung 53: Gesamtstickstoff, sensitive Proteine und Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) im fertigen Bier nach Variation der Hefe-Anstellmenge

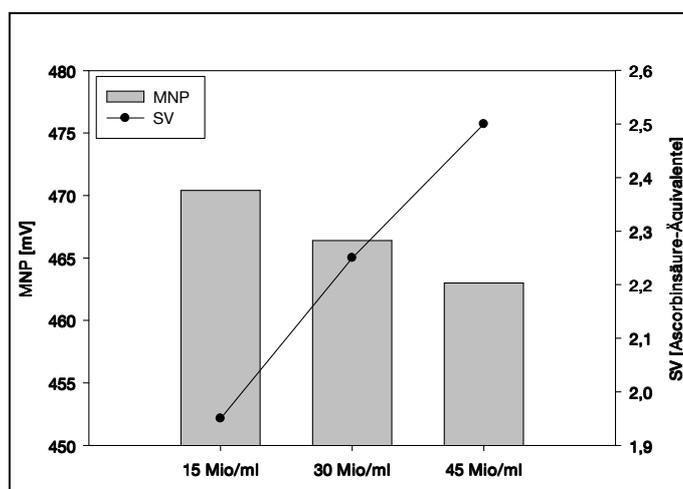


Abbildung 54: Mittleres Nullstrompotential und Stromverhältnis im fertigen Bier nach Variation der Anstellmenge

Der Bestimmung des Reduktionsvermögens (vgl. Abbildung 54) kommt in diesem Versuchsansatz die Schlüsselrolle zur Erklärung des Verhaltens im Forciertest zu. So weist das Bier mit der geringsten Anstellzellzahl (15 Millionen/ml) eine signifikant schlechtere antioxidative Kapazität als die beiden Vergleichsproben auf. Dies gilt sowohl für das mittlere Nullstrompotential (Gesamtpotential) als auch für das Stromverhältnis (schnell reduzierende Substanzen). In den Bieren mit höherer Hefegabe kommt es daher aufgrund der verstärkten Inhibition oxidativer Polymerisationsreaktionen zu einer verzögerten Trübungsbildung, was wohl die Ursache für die Umkehr des Trübungsverlaufs zwischen erstem und zweitem Warntag ist.

Abgesehen von einer minimalen Zunahme der vicinalen Diketone mit gesteigerter Hefegabe waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der gebildeten Gärungsnebenprodukte zu verzeichnen (hier nicht dargestellt).

4.2.4.3 Die Verwendung von Hefe unterschiedlicher Führungszahl

In diesem Versuch sollten die Auswirkungen unterschiedlich oft geführter Hefe untersucht werden. Dazu wurde die Hefe zunächst bei Raumtemperatur bis zum Erreichen der gewünschten Führungszahl in 3 l-Würzekolben hergeführt, danach abzentrifugiert und in einer Konzentration von 15 Millionen Zellen/ml zum Anstellen der 20 l-Gärtanks verwendet. Die Vergärung der Würze erfolgte bei einer Temperatur von 12 °C parallel sowohl mit Hefe aus der dritten als auch aus der elften Führung.

Weder die Gärdauer noch die SCABA-Analytik des fertigen Bieres weisen signifikante Unterschiede zwischen dem Bier aus dritter und aus elfter Führung auf (vgl. Tabelle 20). Eventuell auftretende Unterschiede im Forciertest können damit nur auf andere Faktoren, wie zum Beispiel die Konzentrationen der Trübungsbildner zurückgeführt werden.

Tabelle 20: Gärdauer bei der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe und SCABA-Analyse des fertigen Bieres

Ansatz (Führung)	Gärdauer [d]	Alkohol [GG%]	Restextrakt [GG%]	Vergärung [%]	pH
3. Führung	6	3,8	2,3	80	4,30
11. Führung	6	3,9	2,2	81	4,26

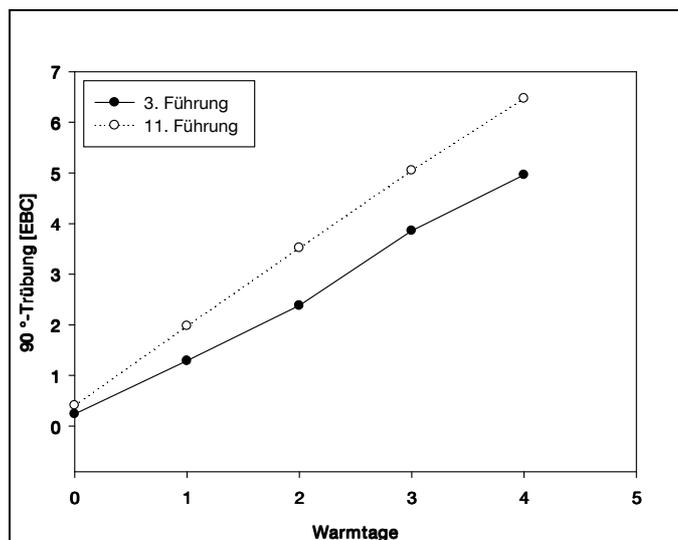


Abbildung 55: 90 °-Trübungsbildung beim Forciertest 40/0 °C nach der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe

Auch wenn das Bier aus dritter Führung eine etwas bessere Stabilität im Forciertest zu verzeichnen hat, sind die Unterschiede bezüglich des Trübungsverlaufs allgemein sehr gering (vgl. Abbildung 55). Nach 4 Warmtagen unterscheiden sich die Biere um lediglich 1,5 EBC. Ähnlich der Vergärung mit höheren Anstellzahlen (siehe Kapitel 4.2.4.2) ist auch hier eine etwas höhere Ausgangstrübung im Bier aus elfter Führung erkennbar. Diese liegt um etwa 0,2 EBC höher als in der Vergleichsprobe. Als möglicher Grund kommt wiederum die Freisetzung des Reservestoffs Glycogen in Frage, bedingt durch die in zunehmendem Maß gestresste Hefe.

Kieninger und Durner wiesen nach mehrmaliger Hefeführung einen deutlichen Anstieg an Gerbstoffen in der Erntehefe nach [KIENINGER und DURNER 1981]. In den hier durchgeführten Versuchen kann jedoch weder eine Steigerung der Flavan-3-ol-Konzentrationen noch der phenolischen Säuren im Bier festgestellt werden (vgl. Abbildung 56). Auch die Messung des Gesamtstickstoffs und der sensitive Proteine ergibt keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsproben. Zudem ist keine Verschlechterung der Schaumhaltbarkeit zu verzeichnen (siehe Abbildung 57).

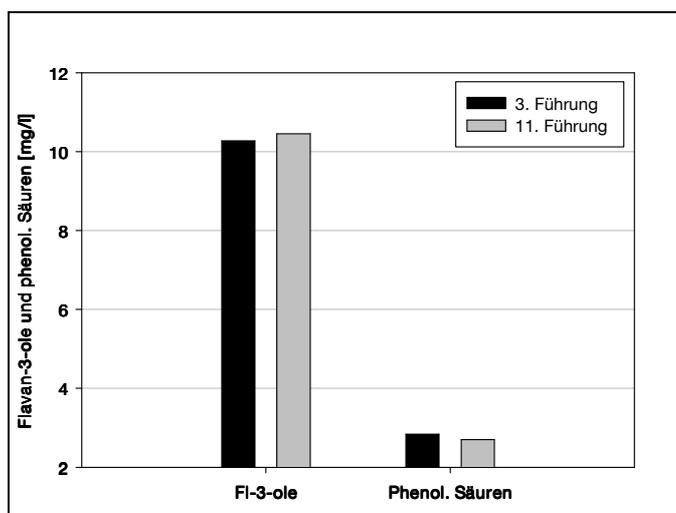


Abbildung 56: Gehalt des Bieres an Flavan-3-olen und phenolischen Säuren nach der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe

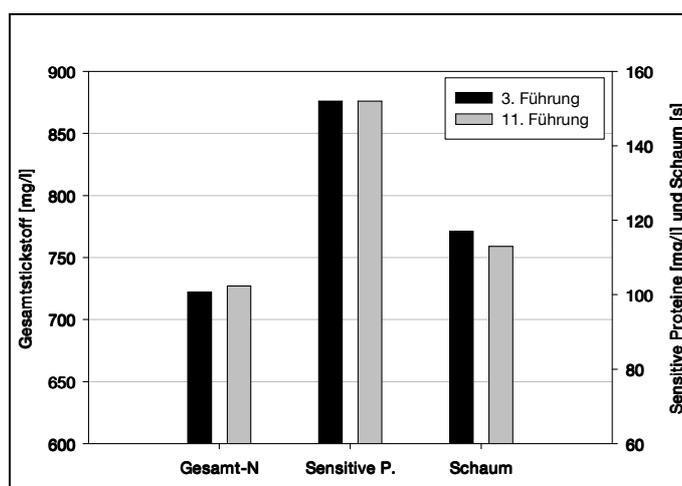


Abbildung 57: Gesamtstickstoff, sensitive Proteine und Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) im fertigen Bier nach der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe

Das unterschiedliche Verhalten im Forciertest scheint damit in direkter Beziehung zum Reduktionsvermögen des Bieres zu stehen (vgl. Abbildung 58). So weist das Bier aus dritter Führung nicht nur ein besseres mittleres Nullstrompotential (schnell und langsam reduzierende Substanzen) sondern auch einen deutlich höheren Gehalt an schnell wirkenden Reduktionen (Stromverhältnis) auf.

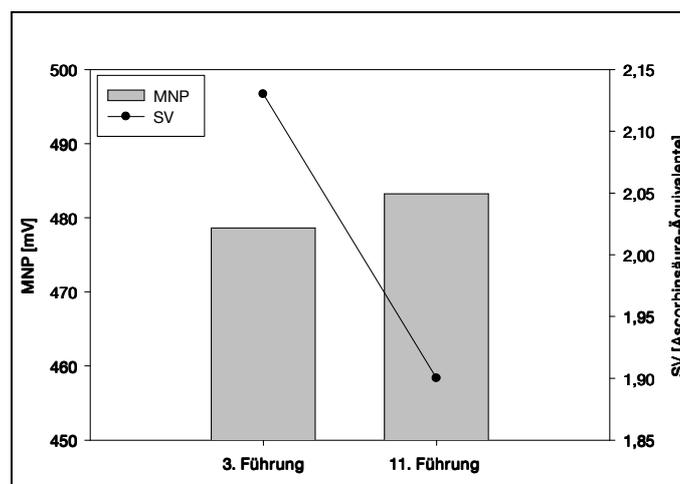


Abbildung 58: Mittleres Nullstrompotential und Stromverhältnis im fertigen Bier nach der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe

Die Bestimmung der Gärungsnebenprodukte (hier nicht dargestellt) erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsproben.

4.2.4.4 Die Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck

Die gezielte Anwendung von Druck zur Regulierung der Hefevermehrung ermöglicht eine schnelle Gärung bei hohen Temperaturen und gleichzeitig eine verringerte Bildung von Gärungsnebenprodukten. Bei diesem Verfahren ist eine kontrollierte Drucksteuerung essentiell – die Druckerhöhung (auf maximal 1,8 bar) im Tank darf nicht zu früh erfolgen, um ein ausreichendes Hefewachstum zu gewährleisten, wohingegen ein zu spätes Erreichen des Drucks in höheren Konzentrationen an Gärungsnebenprodukten resultiert. Durch die starke Beanspruchung lässt die Gärkraft der Hefe schnell nach, weshalb sie nach spätestens drei Führungen ersetzt werden muss [NARZISS 2004].

In diesem Versuch wurde die Würze mit einer Hefekonzentration von 15 Millionen Zellen/ml bei einer Temperatur von 10 °C angestellt. Im Ansatz „Druckgärung“ wurde das Tankventil nach 24 h geschlossen und ein Spundungsdruck von 0,5 bar eingestellt. Sowohl im Druck-Ansatz als auch in der drucklosen Referenzprobe wurde die Gärtemperatur nach 48 Stunden auf 18 °C erhöht. Die Hauptgärung war mit Erreichen des Endvergärungsgrades beendet.

Tabelle 21: Gärdauer bei der Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck und SCABA-Analyse des fertigen Bieres

Ansatz	Gärdauer [d]	Alkohol [GG%]	Restextrakt [GG%]	Vergärung [%]	pH
Referenz (drucklos)	5	3,9	2,2	82	4,42
Druckgärung	6	4,1	2,0	83	4,56

Abgesehen von der durchschnittlich um einen Tag längeren Hauptgärung und dem höheren pH-Wert im Ansatz Druckgärung weisen die unterschiedlich behandelten Biere keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der SCABA-Ergebnisse auf (vgl. Tabelle 21).

Auch die Trübungsbildung im Forciertest liefert nur geringfügig voneinander abweichende Kurven, wobei das aus der Druckgärung hervorgehende Bier überraschender Weise tendenziell etwas stabiler zu sein scheint (vgl. Abbildung 59).

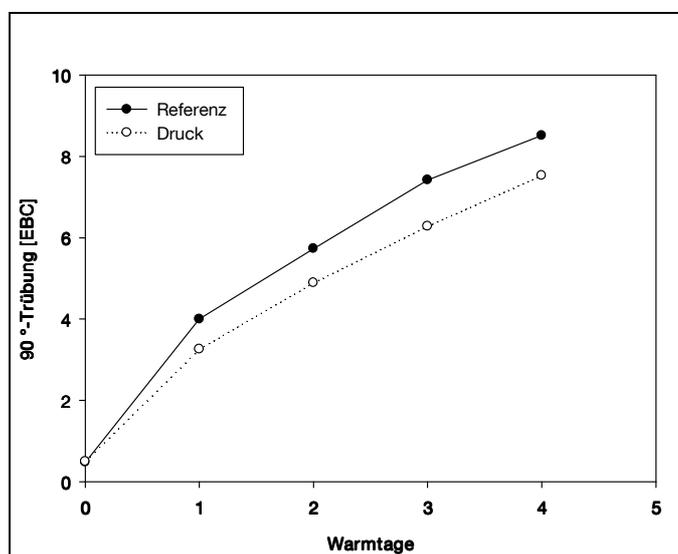


Abbildung 59: 90 °-Trübungsbildung beim Forciertest 40/0 °C nach der Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck

Weder die Flavan-3-ole und phenolischen Säuren noch die sensitiven Proteine (vgl. Abbildung 60-61) unterscheiden sich in den beiden Ansätzen in einer Art und Weise, die das ab-

weichende Verhalten im Forciertest erklären würde. Der höhere Gehalt des Druck-Bieres an Gesamtstickstoff ist offenbar in erster Linie auf erhöhte Konzentrationen an freiem Aminostickstoff (FAN) zurückzuführen. Aufgrund der unterdrückten Hefevermehrung kommt es vermutlich zu einer verminderten Aufnahme an Aminosäuren durch die Hefe. Dies scheint sich jedoch nicht negativ auf den Schaum auszuwirken, wie Abbildung 61 belegt.

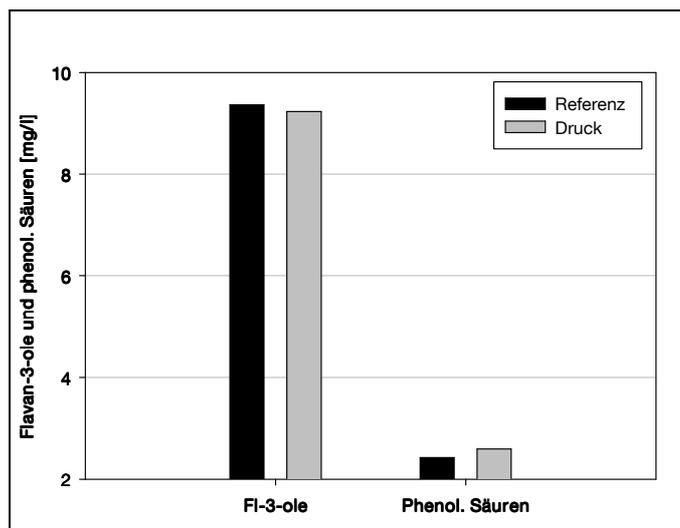


Abbildung 60: Gehalt des Bieres an Flavan-3-olen und phenolischen Säuren nach der Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck

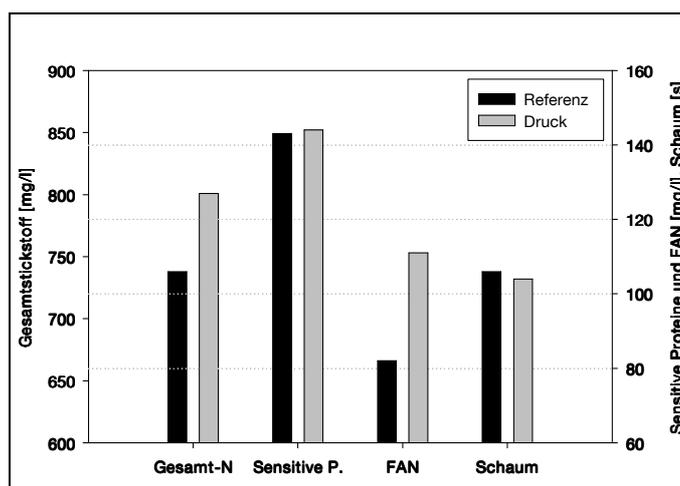


Abbildung 61: Gesamtstickstoff, sensitive Proteine und Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) im fertigen Bier nach der Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck

Da auch bezüglich des Reduktionsvermögens (hier nicht dargestellt) keine Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsproben bestehen, kann die Ursache für die etwas bessere kolloidale Stabilität nicht zweifelsfrei benannt werden. Eine mögliche Erklärung könnte das aus Gründen der Stabilität vorteilhaftere Verhältnis von sensitiven Proteinen zu niedermolekularem Eiweiß im Druck-Bier sein. Hier ist der Anteil der trübungsrelevanten Proteine am Gesamtstickstoff wesentlich niedriger als in der Referenzprobe.

In keiner der durchgeführten Versuchsreihen konnte eine negative Beeinflussung der chemisch-physikalischen Stabilität durch die Anwendung von Druck festgestellt werden.

Es hat sich gezeigt, dass Variationen im Bereich der Gärführung auch die kolloidale Stabilität der resultierenden Biere beeinflussen. Dieser Einfluss ist jedoch generell eher als gering zu werten.

Eine Erhöhung der Gärtemperatur von 9-12 °C auf 15 °C ermöglicht zwar eine verkürzte Gärdauer, vermindert aber gleichzeitig die chemisch-physikalische Stabilität, was auf erhöhte Konzentrationen an trübungsrelevanten Polyphenolen und Proteinen im Bier zurückgeführt werden kann. Dies ist möglicherweise eine Folge der verkürzten Sedimentationszeit der Polyphenol-Protein-Komplexe im Tank sowie der verminderten Adsorption der Polyphenole an die Hefezellwand. Als weitere Nachteile höherer Gärtemperaturen gelten die verstärkte Bildung von Gärungsnebenprodukten sowie die Verminderung der Schaumhaltbarkeit [NARZISS 2004].

Die Anwendung höherer Anstellzellzahlen resultiert in einer Konzentrationssteigerung trübungsrelevanter Polyphenole und Proteine im Bier, was wohl wiederum auf die verkürzte Gärdauer bzw. Sedimentationszeit, aber auch auf das vermehrte Einbringen von an die Hefe adsorbierten Substanzen zurückzuführen ist. Trotz dieser ungünstigen Voraussetzungen erzielt hier das Bier mit der höchsten Hefegabe (45 Millionen Zellen/ml) die beste Stabilität nach 4 Warmtagen. Dieses Verhalten steht wohl in direktem Zusammenhang mit dem signifikant besseren Reduktionsvermögen in dieser Probe. Ein Problem stellt jedoch die deutlich höhere Ausgangstrübung in den Bieren mit gesteigerter Hefe-Anstellmenge dar. Offenbar kam es, zumindest in den hier untersuchten Reihen, zur Freisetzung von Glycogen aus der Hefezelle. Glycogentrübungen können durch die Filtration (und Stabilisierung) nicht mehr aus dem Bier entfernt werden und sind meist Folge eines mangelhaften physiologischen Zustands der Hefe bzw. von Hefestress [MALCORPS et al. 2001]. Höhere Hefegaben scheinen sich ferner negativ auf die Schaumhaltbarkeit auszuwirken, was möglicherweise mit der Exkretion von Fettsäuren erklärbar ist [NARZISS 2004].

Auch die Verwendung von Hefe, die bereits öfter geführt wurde (hier elfte Führung) resultiert in einer leicht erhöhten Ausgangstrübung gegenüber dem Bier aus dritter Führung. Dies dürfte wiederum auf die Freisetzung von Glycogen aus der in zunehmendem Maße beanspruchten Hefe zurückzuführen sein. Der allgemein langsamere Trübungsverlauf im Bier aus dritter Führung hängt wohl in erster Linie mit dem besseren Reduktionsvermögen in diesem Ansatz zusammen. Bezüglich der Konzentrationen an trübungsrelevanten Polyphenolen und Proteinen sowie der Schaumhaltbarkeit sind keine Unterschiede zu verzeichnen.

Überraschender Weise induziert die Druckgärung weder eine Verschlechterung der kolloidalen Stabilität noch der Schaumhaltbarkeit gegenüber einem drucklosen Schnellgärverfahren – zumindest nicht unter den hier gewählten Bedingungen. Dies geht auch mit dem Verhalten der Proteine und Polyphenole einher, die keinerlei Unterschiede in den beiden Vergleichsproben aufweisen. Auch die Ausgangstrübungen im fertigen Bier sind nahezu identisch, so dass davon ausgegangen werden kann, dass hier selbst durch die Druckgärung kein Glycogen freigesetzt wurde. Aus Sicht der Bierqualität stellt die Anwendung von Druck im Rahmen von Schnellgärverfahren daher eine durchaus Erfolg versprechende Methode dar. Dies gilt umso mehr unter der Berücksichtigung der inhibierten Gärungsnebenprodukt-Bildung, was nach Narziss das wesentliche Ziel der Druckgärverfahren darstellt [NARZISS 2004].

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass die Auswirkungen unterschiedlicher Gärführung nicht nur von den gewählten Kontrollparametern (z.B. Temperatur, Anstellmenge etc.) und der Würzezusammensetzung abhängt, sondern auch vom Hefestamm (hier nur Verwendung von Bruchhefe, Stamm W 34/78), der Art der Hefegabe (hier Presshefe) sowie insbesondere vom physiologischen Zustand der Anstellhefe. Insofern sind die in dieser Arbeit besprochenen Resultate und die resultierenden Schlussfolgerungen nicht ohne weiteres auf den gesamten Brauereisektor übertragbar.

4.3 Untersuchungen zur Verbesserung der Vorhersagbarkeit der kolloidalen Stabilität

Die zentrale Problematik des Themengebiets „kolloidale Bierstabilität“ beruht nicht auf der Herstellung ausreichend stabiler Biere, sondern vielmehr auf der mangelnden Vorhersagbarkeit der Trübungsbildung und der daraus resultierenden ineffizienten Vorgehensweise bei der künstlichen Bierstabilisierung. In diesem Zusammenhang spricht man deshalb von „Blindstabilisierung“. Die Gewährleistung der meist überzogenen, aber von den Brauereien selbst auferlegten Mindesthaltbarkeitsanforderungen führt in der Regel zu einer „Überstabilisierung“ der Biere. Diese geht mit einer teilweisen Beeinträchtigung anderer Qualitätsparameter (z.B. Schaumhaltbarkeit) und einem Verlust an ernährungsphysiologisch wertvollen Substanzen (z.B. Polyphenole) einher. Das Hauptargument gegen ineffiziente Bierstabilisierung ist jedoch unzweifelhaft der durch den Mehraufwand an Stabilisierungsmitteln bedingte Anstieg der Betriebskosten.

Die bis heute zuverlässigste und am meisten praktizierte Methode zur Vorhersage der chemisch-physikalischen Stabilität ist die Durchführung von Forciertests (siehe Kapitel 2.6.2). Diese Tests kommen allerdings erst im abgefüllten Bier zur Anwendung und ermöglichen damit keinen Eingriff mehr in den Stabilisierungsprozess. Im Sinne einer flexiblen und effizienten Bierstabilisierung ist es daher unumgänglich, das Trübungsbildungspotential des Bieres bereits im Lagertank zu erfassen.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung von Erfahrungswerten, anhand derer die Brauereien zukünftig in der Lage sein sollen, ihre Biere effizient und „punktgenau“ zu stabilisieren. Dazu wurden 60 verschiedene untergärige, frisch abgefüllte Flaschenbiere aus 28 deutschen Brauereien untersucht. Zur Abdeckung eines möglichst breiten Spektrums wurde Pilsner Bier (Anzahl der Proben $n = 33$), helles Vollbier ($n = 16$), dunkles Vollbier ($n = 2$), helle und dunkle Fest- bzw. Bockbiere ($n = 7$) sowie ein Diätbier und ein alkoholfreies Pils untersucht. Die Pilsner Biere umfassten ferner 5 am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II hergestellte unstabilisierte Versuchsbiere.

Neben den Haupttrübungsbildnern (Proteine und Polyphenole) wurden hier auch die Parameter pH-Wert, Alkoholgehalt, Restextrakt und Gesamtsauerstoff des frisch abgefüllten Bieres berücksichtigt und in ihrer Gesamtheit betrachtet. Die Detektion der Polyphenole und Proteine erfolgte dabei nicht nur mittels hochspezifischer und aufwändiger Analysemethoden (HPLC-Polyphenolspektrum, Bestimmung des proteingebundenen Prolins), sondern auch anhand von „Schnellmethoden“, die ohne größeren Aufwand mit der üblichen Bierla-

borausstattung durchgeführt werden können. Dazu zählen die Bestimmung der Flavanoide nach der entsprechenden EBC-Methode sowie die Messung der sensitiven (mit Tannin fällbaren) Proteine. Zur Beurteilung der kolloidalen Stabilität der Biere wurden diese einem Forciertest bei 40/0 °C unterzogen, bis entweder die 11 °- oder die 90 °- Trübung einen Anstieg von 2 EBC zu verzeichnen hatte. Die Messung der Stabilität erfolgte ferner anhand von dunkel gelagerten Rückstellproben (20 °C). Diese wurden nach Ablauf von 9 Monaten zur Simulation der vom Verbraucher gewählten minimalen Kühlschranktemperatur für zwei Tage auf 4 °C gekühlt und nephelometrisch gemessen. Die aus dieser Behandlung resultierende Kombination aus Dauer- und Kälte-trübung stellt die natürliche Trübung dar, die sich im gewählten Zeitraum unter realen Bedingungen in der abgefüllten Flasche ausbildet.

Zur Verbesserung der Vorhersagbarkeit wurden die im frisch abgefüllten Bier gemessenen Trübungs-Parameter auf Korrelationen zu den mittels Forciertest und Rückstellproben ermittelten Stabilitäten untersucht. Dies erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von Papp und Kusche durch Regressionsgeraden, basierend auf dem mathematischen Produkt aus Proteinen und Polyphenolen, wobei hier noch weitere Einflussfaktoren in die Gleichung miteinfließen [PAPP 2000, KUSCHE 2005]. Zur Korrelationssuche wurde in dieser Arbeit zudem auf die Methodiken des „data minings“ (vgl. Kapitel 3.8.3) zurückgegriffen. Die Anwendung des statistischen Programms „R“ beinhaltet die Erstellung sogenannter „decision trees“, die neben der Korrelationsanalyse auch eine klassifizierende Bewertung der Ergebnisse ermöglichen.

4.3.1 Korrelationssuche auf Basis der Forciertest-Trübung

4.3.1.1 Die Erstellung von Regressionsgeraden zur Vorhersage der Forciertest-Stabilität

Die Einzelparameter sensitive Proteine, proteingebundenes Prolin, Restextrakt, pH-Wert, Alkoholgehalt und Sauerstoff weisen keine direkte Korrelation zur Stabilität im Forciertest auf, weshalb hier auf eine gesonderte Darstellung verzichtet wird.

Die Konzentrationen der Flavan-3-ole und Flavanoide korrelieren hingegen, wenn auch nur in geringem Maß, mit der erreichten Anzahl an Warmtagen (vgl. Abbildung 62). Sowohl die spezifische HPLC-Methode zur Bestimmung der Flavan-3-ole als auch die „Schnellmethode“ zur Detektion der Flavanoide resultieren in ähnlichen Regressionskoeffizienten von 0,39 bzw. 0,33. Dies weist auf eine gute Vergleichbarkeit beider Analysemethoden hin.

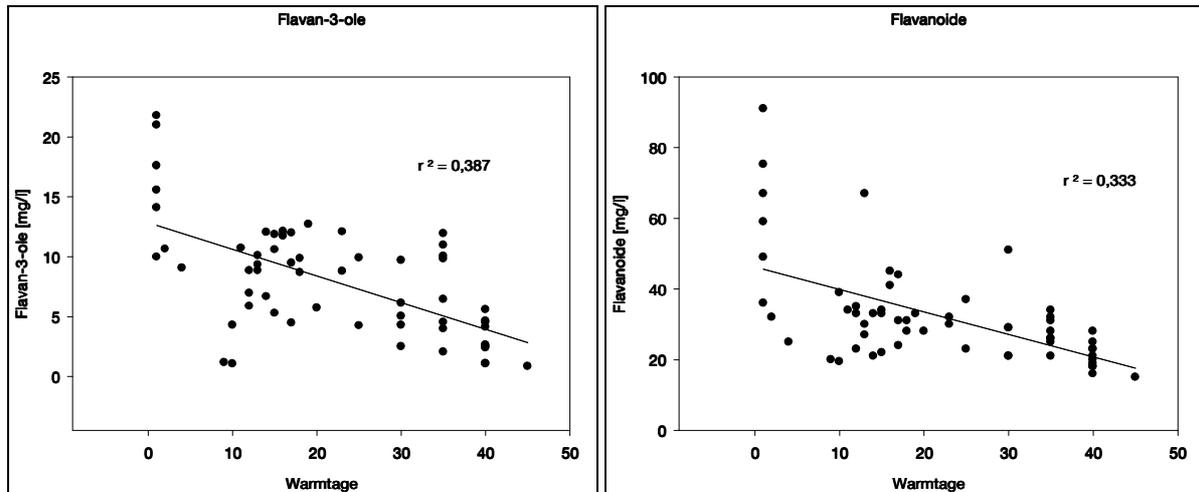


Abbildung 62: Korrelation zwischen Flavan-3-ol- bzw. Flavanoide-Konzentration des frisch abgefüllten Bieres und den im Forciertest erreichten Warmtagen

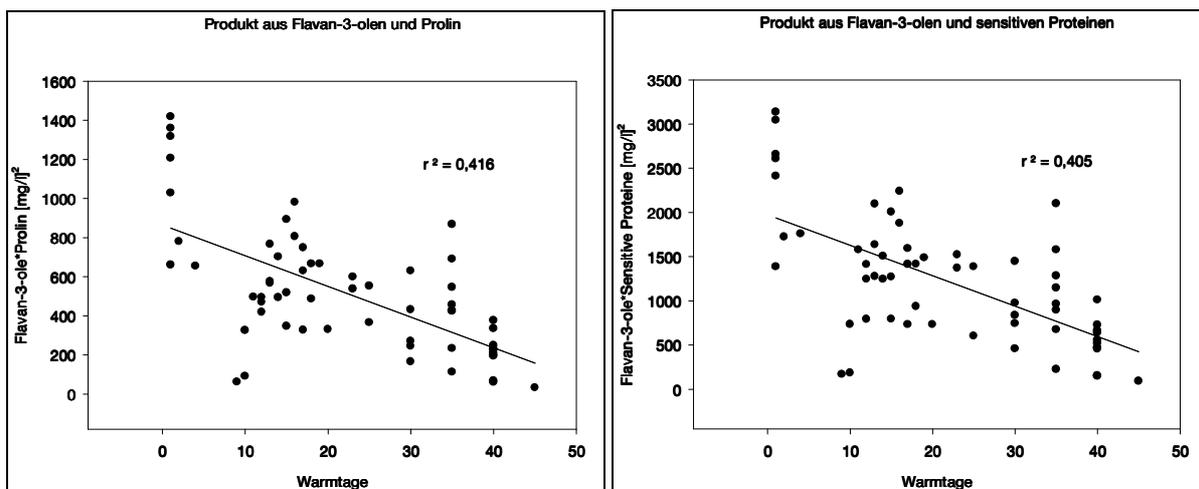


Abbildung 63: Korrelation zwischen dem Produkt aus Flavan-3-olen, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen und den im Forciertest erreichten Warmtagen

Abbildung 63 stellt das Produkt aus der Konzentration an Flavan-3-olen und an proteingebundenem Prolin bzw. an sensitiven Proteinen der Stabilität im Forciertest gegenüber. Das Einbeziehen beider Protein-Bestimmungsmethoden in die statistische Evaluierung verbessert die Vorhersagbarkeit um etwa denselben Faktor ($r^2 = 0,42$ bzw. $0,41$). Dieses Resultat stimmt mit den Erfahrungen von Kusche überein, der ebenfalls eine Korrelationsverbesserung

rung durch die Bildung des Produkts aus Flavan-3-olen und proteingebundenem Prolin feststellte [KUSCHE 2005].

Die Kombination aus Flavanoid- und Proteinkonzentration (vgl. Abbildung 64) resultiert in keiner weiteren Korrelationsverbesserung gegenüber der Einzelmessung der Flavanoide – vielmehr scheint sich die Vorhersagbarkeit der Stabilität sogar zu verschlechtern, einhergehend mit niedrigeren Regressionskoeffizienten.

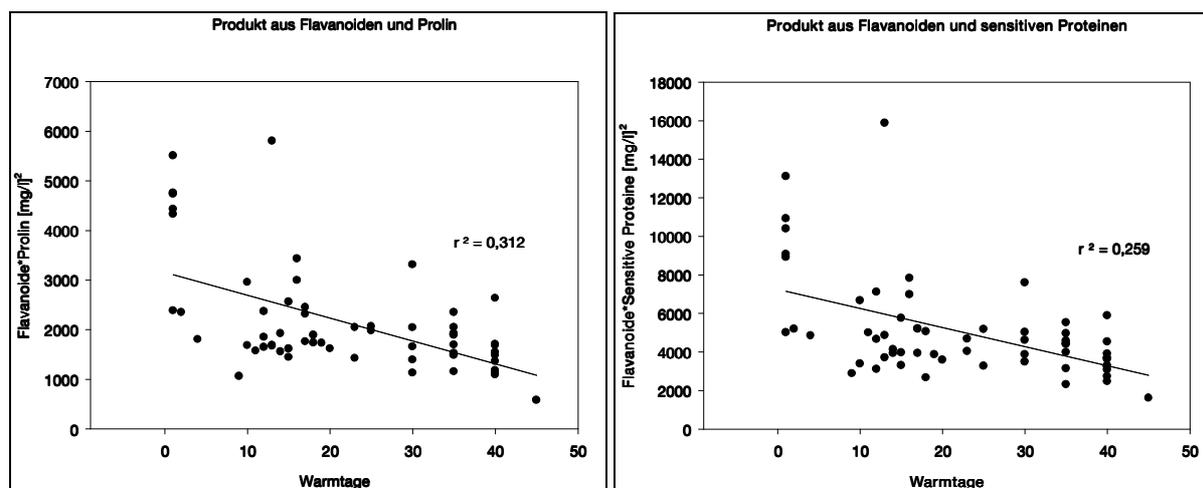


Abbildung 64: Korrelation zwischen dem Produkt aus Flavanoide, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen und den im Forciertest erreichten Warmtagen

Die Vorhersagbarkeit der im Forciertest erreichbaren Stabilität anhand der Erstellung von Regressionsgeraden hat sich als relativ gering erwiesen. Die größte Korrelation zum Forciertest-Ergebnis ergab sich zwischen dem Produkt aus Flavan-3-olen und proteingebundenem Prolin, wobei erstere offenbar als die primären Trübungsbildner fungieren. Mit den „Schnellmethoden“ (Analyse der Flavanoide und sensitiven Proteine) scheinen dabei vergleichbare Ergebnisse wie mit den spezifischeren Methoden (HPLC-Analytik, Prolin-Bestimmung) erzielt werden zu können.

4.3.1.2 Klassifizierung der Forciertest-Ergebnisse mittels „decision tree“

Zur klassifizierenden Bewertung mittels der Erstellung eines Entscheidungsbaums („decision tree“) mussten die untersuchten Biere zunächst in unterschiedliche Kategorien unterteilt und bewertet werden (vgl. Tabelle 22). Ferner wurden vor der Eingabe aller Daten in das Pro-

gramm „R“ sämtliche Biere mit einem Gesamtsauerstoffgehalt von über 0,5 mg/l (Anzahl n = 11) aus der Wertung genommen, da höhere Werte eine falsche Klassifizierung induzieren können. So könnte z.B. ein normalerweise als „überstabilisiert“ geltendes Bier durch einen hohen Gehalt an Sauerstoff in die Kategorie „optimal“ eingeteilt werden, was der ursprünglichen Intention der Bewertung zuwiderlaufen würde.

Tabelle 22: Bewertungsschema der Forciertest-Ergebnisse für die Erstellung des „decision tree“

Erreichte Warmtage	Bewertung
> 29	überstabilisiert
20-29	optimal
15-19	gut
10-14	ausreichend
< 10	schlecht

Der Entscheidungsbaum führt nach Evaluierung aller Messdaten die Konzentration an Flavan-3-olen als oberstes Entscheidungskriterium an (siehe Abbildung 65). Dies geht mit der Bewertung anhand von Regressionsgleichungen (vgl. Kapitel 4.3.1.1) einher. Sowohl unterhalb (linker Ast) als auch oberhalb (rechter Ast) einer Flavan-3-ol-Konzentration von 6,5 mg/l fungieren die sensitiven Proteine als sekundäre Trübungsbildner. Von allen untersuchten Parametern wurden darüber hinaus nur das proteingebundene Prolin sowie der Alkoholgehalt als relevant eingestuft.

Bei Flavan-3-ol-Werten von weniger als 6,5 mg/l (linke Seite des Entscheidungsbaums) und einem Gehalt an sensitiven Proteinen unter 172 mg/l gelten die Biere als „überstabilisiert“, wenn der Gehalt an proteingebundenem Prolin 62 mg/l nicht übersteigt (Gruppe 1). Höhere Prolinkonzentrationen resultieren überwiegend in Bieren der Kategorie „gut“ bzw. „ausreichend“ (Gruppe 2). Beträgt die Menge an sensitiven Proteinen über 172 mg/l, werden die Biere zu 100% als „überstabilisiert“ bewertet (Gruppe 3). Dies kann möglicherweise mit Sieberts Theorie erklärt werden, wonach ein deutlicher Überschuss eines Haupttrübungsbildners (Polyphenole oder Proteine) durch die zunehmende Blockierung der Bindungsstellen am Antagonisten in geringerer Trübungsbildung resultiert als dies bei einem anderen Verhältnis der Fall ist [SIEBERT et al. 1996b, SIEBERT 1999a, SIEBERT und LYNN 2000, SIEBERT 2004, SIEBERT 2006].

Auf der rechten Seite des Entscheidungsbaums induziert ein Gehalt an sensitiven Proteinen von weniger als 123 mg/l trotz der höheren Polyphenolkonzentration (Flavan-3-ole > 6,5 mg/l) eine „gute“ Stabilität (Gruppe 4). Oberhalb dieses Wertes neigen die Biere jedoch in Abhängigkeit ihres Alkoholgehaltes in der Regel zu deutlich verminderter kolloidaler Stabilität (Gruppe 5 und 6).

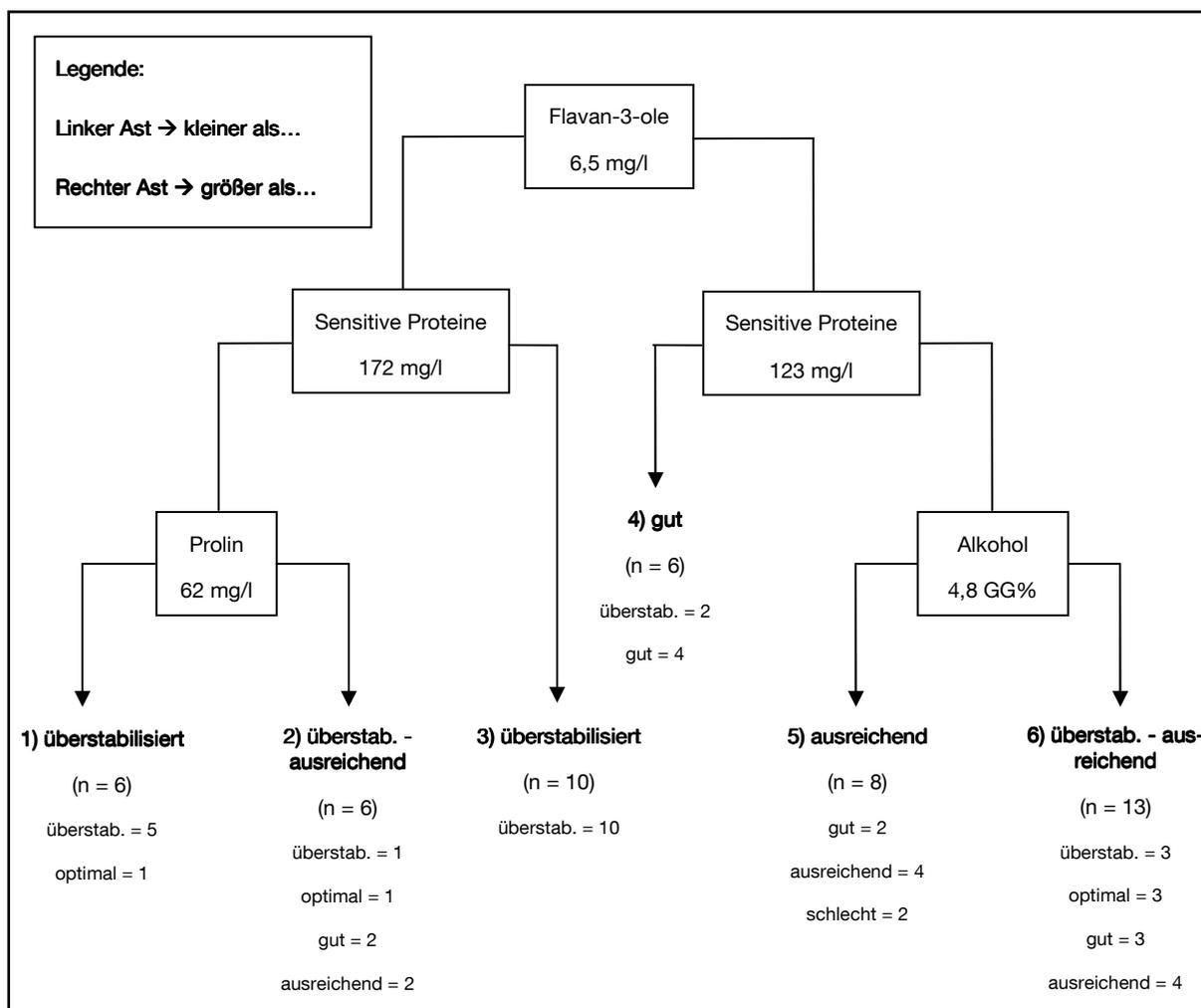


Abbildung 65: Klassifizierende und bewertende Auswertung aller Messdaten in Bezug auf das Forciertest-Ergebnis mittels „decision tree“

Es bleibt festzuhalten, dass die Erstellung eines „decision tree“ in den Gruppen 2, 5 und 6 zu keiner eindeutigen Einteilung der Forciertest-Ergebnisse führt – die Bewertung schwankt hier zum Teil beträchtlich. Die Gruppen 1, 3 und 4 erlauben jedoch eine gute bis sehr gute Klassifizierung, so dass die hier ermittelten Grenzwerte für die primären und sekundären

Trübungsbildner durchaus als Grundlage für zukünftige Optimierungen im Bereich effizienter Bierstabilisierung dienen können.

4.3.2 Korrelationssuche anhand der realen Trübung in den Rückstellproben

4.3.2.1 Die Erstellung von Regressionsgeraden zur Vorhersage der realen Trübung

Die untersuchten Biere wurden nicht nur über die Forciertest-Stabilität, sondern auch anhand der nach 9 Monaten bei 20 °C entstandenen realen Trübung (Messtemperatur = 4 °C) beurteilt.

Abbildung 66 zeigt eine geringe, aber im Vergleich zur Forciertrübung bessere Korrelation der natürlich entstandenen Trübung zu den Flavan-3-olen ($r^2 = 0,55$) und Flavanoiden ($r^2 = 0,58$). Die Flavanoidbestimmung scheint auch hier Ergebnisse zu liefern, die mit der spezifischen Analyse der Flavan-3-ole vergleichbar sind.

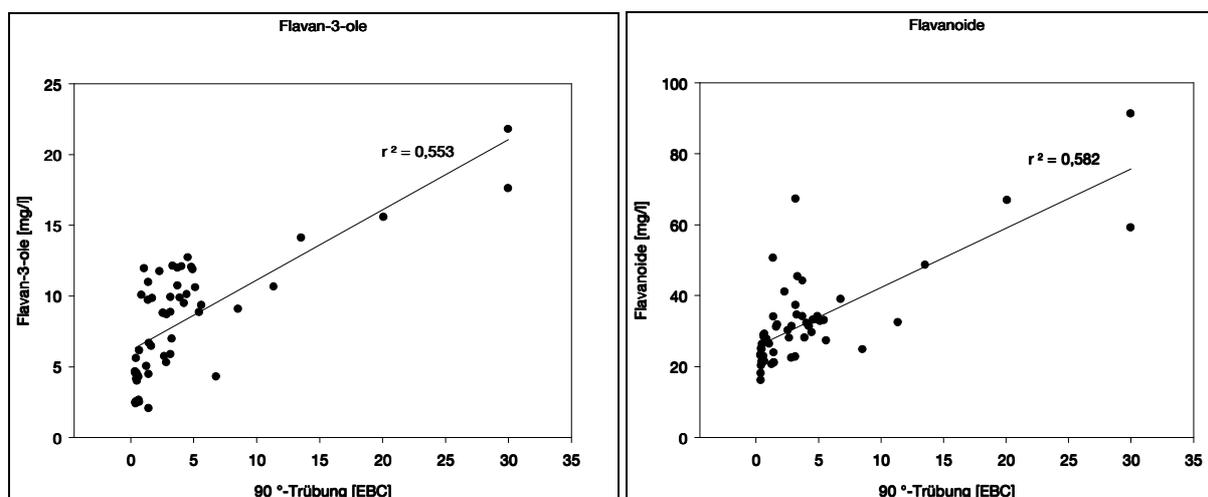


Abbildung 66: Korrelation zwischen Flavan-3-ol- bzw. Flavanoid-Konzentration des frisch abgefüllten Bieres und der Trübung nach 9 Monaten (Messtemperatur = 4 °C)

Neben dem Zusammenhang zwischen den detektierten Polyphenolfractionen und der Trübung nach 9 Monaten ist ferner eine sichtbare Korrelation ($r^2 = 0,58$) zum Gesamtsauerstoffgehalt des abgefüllten Bieres zu verzeichnen (vgl. Abbildung 67). Offenbar kommt der stabilitätsmindernde Einfluss des Sauerstoffs in den Langzeit-Proben wesentlich deutlicher zum Tragen als während des kürzeren Forciertests, bei dem kein derartiger Zusammenhang ge-

funden werden konnte. Die Wirkung des Sauerstoffs auf die reale Trübung ist daher in etwa mit der Konzentration an trübungsrelevanten Polyphenolen gleichzusetzen. Auch der pH-Wert scheint sich in den Rückstellproben stärker auszuwirken als während des Forciertests, obgleich der Regressionskoeffizient ($r^2 = 0,23$) grundsätzlich sehr niedrig ist.

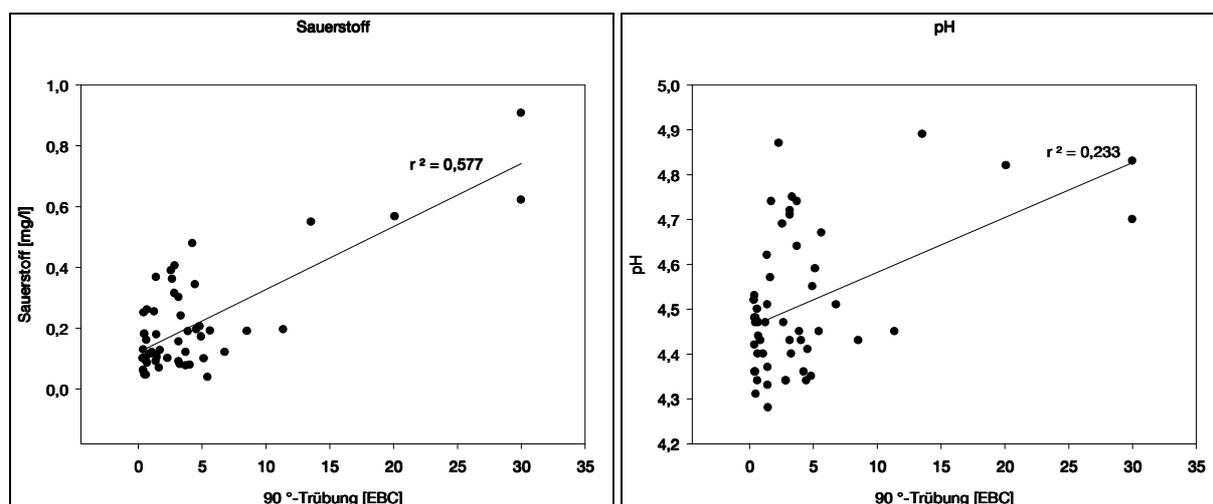


Abbildung 67: Korrelation zwischen Sauerstoffgehalt bzw. pH-Wert des frisch abgefüllten Bieres und der Trübung nach 9 Monaten (Messtemperatur = 4 °C)

Die Untersuchung der sensitiven Proteine, des proteingebundenen Prolins, des Restextrakts sowie des Alkoholgehalts (hier nicht dargestellt) offenbarte keine Zusammenhänge mit der natürlich entstandenen Trübung.

Nach Feststellung der Regressionskoeffizienten aller Einzelkomponenten wurde wiederum das Produkt aus den trübungsrelevanten Polyphenolen und Proteinen gebildet, wobei hier auch Sauerstoffgehalt und pH-Wert Berücksichtigung fanden. So zeigt das Produkt aus Flavan-3-olen, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen, pH-Wert und Sauerstoffgehalt sehr gute Korrelationen ($r^2 > 0,8$) zur Trübung der Rückstellproben (vgl. Abbildung 68). Auch die Kombination auf Basis der Flavanoidbestimmung resultiert in guten Regressionskoeffizienten von über 0,76 (siehe Abbildung 69). Die Vorhersagbarkeit der natürlich entstandenen Trübung ist damit in etwa doppelt so hoch wie im Falle der Forciertest-Trübung.

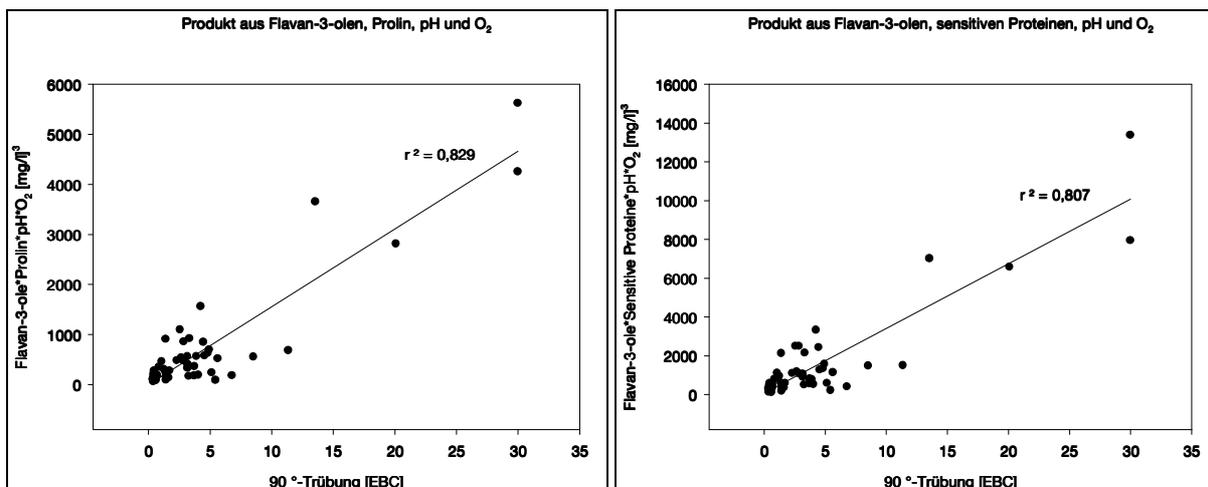


Abbildung 68: Korrelation zwischen dem Produkt aus Flavan-3-olen, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen, pH-Wert sowie O₂-Gehalt des frisch abgefüllten Bieres und der Trübung nach 9 Monaten (Messtemperatur = 4 °C)

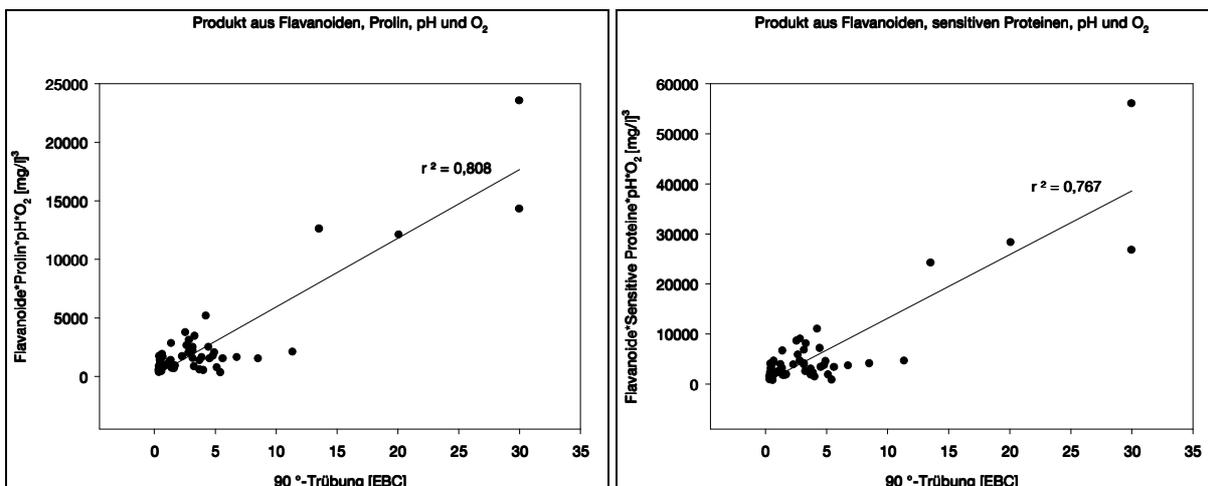


Abbildung 69: Korrelation zwischen dem Produkt aus Flavanoiden, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen, pH-Wert sowie O₂-Gehalt des frisch abgefüllten Bieres und der Trübung nach 9 Monaten (Messtemperatur = 4 °C)

Es hat sich gezeigt, dass die Korrelation der Einzelkomponenten Flavan-3-ole, Flavanoide, Gesamtsauerstoff und pH-Wert zur realen Trübung (nach 9 Monaten) wesentlich besser ist als im Falle der forciert gealterten Biere. Dies äußert sich in einer deutlichen Steigerung der

Vorhersagbarkeit der kolloidalen Stabilität, insbesondere nach der Bildung des mathematischen Produkts aus den jeweiligen Einzelsubstanzen.

Die Methoden zur Detektion der Flavan-3-ole und des proteingebundenen Prolins besitzen diesbezüglich erwartungsgemäß eine etwas größere Aussagekraft als die weniger spezifischen, dafür aber deutlich einfacher und schneller durchzuführenden Analysen der Flavanoide und sensitiven Proteine.

4.3.2.2 Klassifizierung der realen Trübung mittels „decision tree“

Die Bewertung der Biere zur Erstellung des „decision tree“ erfolgte auf Grundlage der 11 °- und 90 °-Trübungswerte des auf 4 °C gekühlten Bieres nach 9monatiger Aufbewahrungszeit (vgl. Tabelle 23). Auch hier wurden nur die Biere mit einem Gesamtsauerstoff-Gehalt von unter 0,5 mg/l berücksichtigt.

Tabelle 23: Bewertungsschema der realen Trübung nach 9monatiger Lagerung bei 20 °C (Messtemperatur = 4 °C) für die Erstellung des „decision tree“

11 °- bzw. 90 °-Trübung [EBC]	Bewertung
< 0,8	überstabilisiert
0,8-2,0	optimal
2,1-2,6	gut
2,7-3,5	ausreichend
> 3,5	schlecht

Das Programm „R“ wählte aus allen untersuchten Parametern wiederum die Flavan-3-ole als oberstes Entscheidungskriterium, was deren Bedeutung für die kolloidale Stabilität nochmals unterstreicht (vgl. Abbildung 70). Der Grenzwert von 6,3 mg/l Flavan-3-olen ist dabei nahezu identisch mit der Evaluierung der Forciertestdaten (6,5 mg/l). Bei Konzentrationen unterhalb dieses Wertes (linke Seite) wird jedoch nicht der Gehalt an sensitiven Proteinen, sondern der Sauerstoffgehalt des abgefüllten Bieres (Gesamtsauerstoff) als zweite relevante Größe eingestuft. Liegt dieser unter 0,1 mg/l (Gruppe 1), gelten die Biere zu 100% als „überstabilisiert“. Die hohe Stabilität der Biere aus Gruppe 1 kann damit sowohl auf den geringen Gehalt an phenolischen Trübungsvorläufern als auch auf die sehr niedrigen Sauer-

stoffkonzentrationen zurückgeführt werden. Dies geht mit den Resultaten aus der Erstellung von Regressionsgeraden (siehe Kapitel 4.3.2.1) einher. Bei höheren Sauerstoffwerten (> 0,1 mg/l) fungieren erneut die Flavan-3-ole als Entscheidungskriterium. Liegen diese unter 4,2 mg/l, so fallen die Biere wiederum überwiegend in die Kategorie „überstabilisiert“ (Gruppe 2). Bei Flavan-3-ol-Konzentrationen zwischen 4,2 und 6,3 mg/l ist keine eindeutige Bewertung möglich (Gruppe 3).

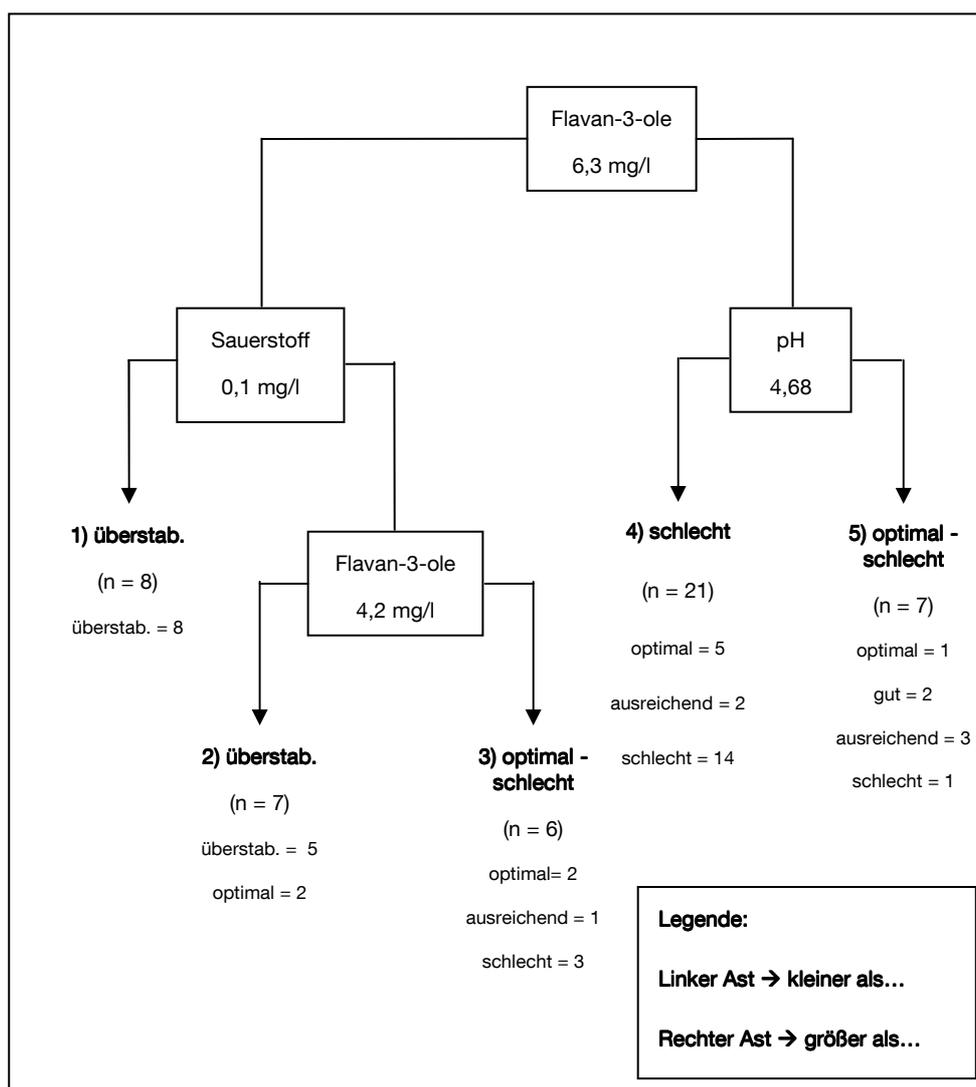


Abbildung 70: Klassifizierende und bewertende Auswertung aller Messdaten in Bezug auf die Trübung der Rückstellprobe nach 9 Monaten mittels „decision tree“

Im Allgemeinen resultieren Flavan-3-ol-Konzentrationen über 6,3 mg/l (rechte Seite des Entscheidungsbaums) in einer Verschlechterung der Trübungsstabilität. In diesem Fall kommt

offenbar auch dem pH-Wert eine gewisse Bedeutung zu. So bedingen pH-Werte unter 4,68 in der Regel eine verringerte Stabilität (Gruppe 4), was mit der säurekatalysierten Polymerisation der niedermolekularen Polyphenole (siehe Kapitel 2.4.2) erklärt werden kann. Höhere pH-Werte erlauben keine eindeutige Zuordnung in eine bestimmte Kategorie (Gruppe 5).

Analog zur besseren Vorhersagbarkeit der realen Trübung anhand des mathematischen Produkts sind auch bei der Erstellung des „decision tree“ deutliche Unterschiede zur Forciertreibung zu verzeichnen. Abgesehen von den primären Trübungsbildnern (Flavan-3-ole) wertet das Programm „R“ in beiden Fällen unterschiedliche Parameter als relevante Größen. Zudem ist die Anzahl der „schlecht“ bewerteten Biere in den natürlich gealterten Bieren ($n = 18$) wesentlich höher als nach forcierter Alterung ($n = 2$). Dies weist auf eine Überbewertung der Biere durch Anwendung des Forciertests hin. Dabei werden offenbar bessere kolloidale Stabilitäten suggeriert, als sich unter normalen Bedingungen im Laufe der Zeit tatsächlich ausbilden. Dieses Verhalten ist vermutlich auf den Einfluss von Sauerstoff und pH bzw. auf die oxidations- und säurekatalysierten Polymerisationsreaktionen zurückzuführen, welche durch die kürzere Versuchszeit des Forciertests nur unvollständig ablaufen. Die Konzentration an trübungsrelevanten Proteinen hingegen scheint in Bezug auf die Ausbildung realer Trübungen von geringerer Bedeutung zu sein als bei forcierter Alterung.

Es hat sich gezeigt, dass die phenolischen Trübungsvorläufer sowie der Sauerstoffgehalt die Schlüsselfaktoren bei der Entstehung natürlicher Trübungen im Bier darstellen. Der Einfluss beider Parameter ist dabei grundsätzlich höher einzuschätzen als die Konzentrationen an trübungsbildenden Proteinen.

5 Zusammenfassung

Neben der Durchführung allgemeiner Untersuchungen bezüglich der kolloidalen Stabilität untergäriger Biere wurden mit dieser Arbeit im Wesentlichen zwei Hauptziele verfolgt. Sowohl die Verbesserung der chemisch-physikalischen Stabilität durch gezielte Rohstoffauswahl bzw. auf technologische Weise im Herstellungsprozess als auch die verbesserte Vorhersagbarkeit der Trübungsbildung dienen dabei einem gemeinsamen Zweck. Die Brauereien sollen dazu befähigt werden, ihre Biere in schonender, flexibler und effizienter Weise zu stabilisieren. Die Reduzierung künstlicher Stabilisierungsmaßnahmen auf das zur Gewährleistung der gewünschten kolloidalen Haltbarkeit notwendige Maß kommt dabei nicht nur der Bierqualität zugute, sondern birgt in erster Linie ein enormes Potential zur Kostensenkung.

Aus analytischer Sicht kam der Bestimmung der trübungsrelevanten Flavan-3-ole Catechin, Epicatechin, Prodelphinidin B3 und Procyanidin B3 eine Schlüsselrolle zu. Darüber hinaus wurde das mittels HPLC messbare Polyphenolspektrum um die Erfassung der im Bier nachweisbaren phenolischen Säuren sowie um weitere ausgewählte Substanzen erweitert.

Die Detektion der proteinischen Antagonisten zu den trübungsbildenden Polyphenolen erfolgte durch die Analyse der Tannin-fällbaren „sensitiven“ Proteine. Ferner wurde eine Analytik zur spektralphotometrischen Bestimmung des proteingebundenen Prolins entwickelt, um auf diese Weise die schwer klassifizierbaren trübungsaktiven Proteine in spezifischer Weise erfassen zu können.

In dieser Arbeit wurde nicht nur der Einfluss des Sauerstoffs berücksichtigt, sondern erstmals auch das über elektrochemische Methoden messbare Reduktionsvermögen der Biere miteinbezogen. Auf diese Weise sollten neue Erkenntnisse über das Zusammenspiel zwischen Oxidation und Reduktion im Bier und dessen Folgen auf die kolloidale Stabilität gewonnen werden.

Mit dem Hintergrund der bis heute mangelhaften Vorhersagbarkeit der Trübungsneigung und der dadurch bedingten „Blindstabilisierung“ der Biere war es von Interesse, die Folgen exzessiver künstlicher Stabilisierung auf die Zusammensetzung und Qualität der resultierenden Biere zu erfassen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die trübungsrelevanten Flavan-3-ole durch den Einsatz von 50 g/hl PVPP in sehr spezifischer Weise nahezu vollständig aus dem Bier entfernt werden. Dies führte zu einer gegenüber der unstabilierten Referenz deutlich gesteigerten kolloidalen Stabilität. Die Polyphenoladsorption ging zwar mit einer

signifikanten Verschlechterung des Reduktionsvermögens einher, hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf Geschmack, Geschmacksstabilität und Schaumhaltbarkeit. Als Nachteil übermäßiger PVPP-Stabilisierung erwies sich die teilweise Entfernung ernährungsphysiologisch relevanter Polyphenole, wie beispielsweise Isoxanthohumol.

Ein zusätzlicher Einsatz von 100 g/hl Xerogel induzierte nur eine geringfügig bessere Trübungsstabilität, führte aber zu einer Verschlechterung der Adsorptionswirkung von PVPP. Dieser Effekt konnte bereits von mehreren Autoren beobachtet werden und ist auf die gegenseitige Inhibierung der beiden Stabilisierungsmittel zurückzuführen. Deren Dosage sollte daher im Sinne einer größeren Effektivität getrennt voneinander erfolgen [NARZISS und REICHENEDER 1977, RAIBLE 1979, DADIC und LAVALLEE 1983, KUSCHE 2005]. Das eingesetzte Xerogel wies eine gute Spezifität zur Reduktion sensibler Proteine auf, ohne dabei die Schaumhaltbarkeit wesentlich zu verschlechtern.

Alkoholgehalt und pH-Wert des abgefüllten Bieres gelten als Faktoren, welche die Trübungsbildung zu beeinflussen vermögen. Siebert wies diesen Einfluss anhand gepufferter Modelllösungen, bestehend aus unterschiedlichen Mengen an trübungsaktiven Polyphenolen und Proteinen nach [CURTIS 1966, GRAMSHAW 1970b, SIEBERT 1999a, SIEBERT und LYNN 2003, SPEERS et al. 2003, SIEBERT 2006]. In dieser Arbeit wurden statt der Modellsuspensionen unterschiedlich stabilisierte Biere auf Korrelationen zwischen Alkoholkonzentration bzw. pH-Wert und der kolloidalen Stabilität untersucht. Einzig im mit PVPP stabilisierten Bier konnte der Effekt unterschiedlicher Alkoholgehalte eindeutig nachgewiesen werden – so wirkten sich ansteigende Konzentrationen im Bereich von 3,9-4,3 GG% positiv auf die Stabilität aus. Im unstabilierten sowie im mit Xerogel stabilisierten Bier konnten hingegen keine oder nur geringe Korrelationen festgestellt werden. Wohl aufgrund der hohen Komplexität der Biermatrix offenbarte auch die Untersuchung des pH-Wertes keinen direkten Zusammenhang mit der chemisch-physikalischen Stabilität der untersuchten Proben.

Von weiterem Interesse war die Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen an Luftsauerstoff in der abgefüllten Flasche auf das Reduktionsvermögen und die kolloidale Stabilität der Biere. Mit steigenden Sauerstoffkonzentrationen war unabhängig von der angewandten Analysenmethode eine eindeutige Verschlechterung beider Qualitätsparameter zu verzeichnen. Die oxidative Schädigung konnte selbst nach der chemischen Umsetzung des Sauerstoffs mit den Bierinhaltsstoffen durch die Messung des antioxidativen Potentials nachgewiesen werden.

Die Versuche mit Variationen im Bereich der Würzebelüftung wiesen darauf hin, dass sich gegebenenfalls vorhandene Unterschiede bezüglich des Oxidationszustandes der Würze während der Gärung und Lagerung egalisieren. So konnte nach konventioneller Belüftung auf ca. 8 mg/l Sauerstoff im Vergleich zu einer unbelüfteten Referenzprobe keine signifikante Verminderung des Reduktionsvermögens sowie der kolloidalen Stabilität im fertigen Bier festgestellt werden. Im Sinn einer zügig verlaufenden Angärung ist eine adäquate Würzebelüftung daher dem völligen Verzicht auf Belüftung vorzuziehen.

Die in Bier detektierbaren phenolischen Säuren sowie Isoxanthohumol scheinen nicht oder nur in sehr geringem Maße an der Trübungsbildung beteiligt zu sein. Im Gegensatz zu Papps Versuchen hatte die Dosage ansteigender Mengen von Ferulasäure zu PVPP-stabilisiertem Bier keinen sichtbaren Effekt auf die kolloidale Stabilität [PAPP 2000, PAPP et al. 2001]. Auch erhöhte Konzentrationen an Isoxanthohumol äußerten sich nicht in beschleunigter Trübungsbildung. Der Zusatz von Vanillinsäure und p-Cumarsäure induzierte in höheren Konzentrationen eine leicht verbesserte Trübungsstabilität, was möglicherweise auf das etwas bessere Reduktionsvermögen dieser Biere zurückgeführt werden kann.

Der Einfluss der Brauwasserzusammensetzung auf die kolloidale Stabilität der Biere erwies sich als relativ gering. So resultierten durch die Verwendung von Wässern mit höherer Restalkalität zwar geringere Konzentrationen an Polyphenolen und Proteinen im Bier – ein möglicher positiver Effekt wurde jedoch offenbar durch die Auswirkungen der schlechteren Stoffumsetzungen beim Maischen egalisiert. Weit gravierender waren die Folgen in Bezug auf andere Qualitätsparameter der Biere. Neben dunkleren Bierfarben, einer schlechteren Schaumhaltbarkeit und einem verminderten Reduktionsvermögen bewirkte eine hohe Restalkalität des Brauwassers eine signifikante Verschlechterung des Geschmacks und eine breite und kratzige Bierbittere. Zudem kam es, in Übereinstimmung mit den Erfahrungen von Narziss, zu einer eindeutigen Verlangsamung des Läuterprozesses [NARZISS 1992].

Ein Zusatz der bei der Ethanolextraktion von Hopfen als „Abfallprodukt“ anfallenden Gerbstofffraktion zum Brauwasser erwies sich insbesondere aus prozesstechnischer Sicht als äußerst vielversprechend. So bewirkten die eingebrachten Polyphenole eine Verbesserung des Reduktionsvermögens und infolgedessen eine Verkürzung der Läuterdauer um bis zu 15%, was die Ergebnisse von Goiris et al. bestätigte [GOIRIS et al. 2005]. Gleichzeitig war keine Verschlechterung der kolloidalen Stabilität zu verzeichnen - in Abhängigkeit vom Polymerisierungsgrad übten die eingebrachten Gerbstoffe, bedingt durch ihre eiweißfällende Wirkung, eine eher positive Wirkung aus. Im Vergleich zum alleinigen Einsatz von Ethanol-

Reinharzextrakt ermöglichte der Zusatz der Gerbstoffextrakte zudem die Erhaltung des kompletten aus dem Hopfen eingebrachten Polyphenolspektrums, was vor allem aus ernährungsphysiologischer Sicht von Bedeutung ist.

Die Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte (Ethanolextrakt, CO₂-Extrakt, Pellets) hatte bei früher Hopfengabe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der kolloidalen Stabilität der resultierenden Biere zur Folge. Der negative Effekt einer höheren Konzentration an eingebrachten Polyphenolen durch den Zusatz von Pellets wurde vermutlich durch die bei der Kochung intensivierte Eiweißfällung kompensiert.

Als sehr wirksame Methode zur Verbesserung der kolloidalen Stabilität im Brauprozess erwies sich das Brauen mit hohen Stammwürzen, insbesondere bei der Verwendung von adjuncts bei der Kochung. Die verminderte Trübungsneigung der mit 100% Malz eingebrauten High Gravity-Biere, von der bereits Kusche und Narziss berichteten, resultierte dabei offenbar nicht aus einer intensivierten Stoffumsetzung während des Würzekochens [NARZISS 1992, NARZISS 2004, KUSCHE 2005]. Dieses Verhalten schien vielmehr auf eine verstärkte Fällung sensibler Proteine und trübungsaktiver Polyphenole während der Gärung und Lagerung zurückzuführen sein, bedingt durch die niedrigeren pH-Werte in den High Gravity-Bieren. Der Zusatz von Glucosesirup zur Würzekochung induzierte eine weitere Senkung der Konzentration an Haupttrübungsbildnern und infolgedessen eine nochmals gesteigerte kolloidale Stabilität gegenüber den all malt-High Gravity-Bieren. Dies konnte sowohl auf die Verdünnung der Würze durch den Sirupanteil als auch auf den tieferen pH-Sturz in diesen Proben zurückgeführt werden.

Neben der Änderung prozesstechnischer Parameter im Sudhaus wurden auch Variationen im Bereich der Gärführung auf ihren Effekt in Hinblick auf die kolloidale Stabilität der resultierenden Biere untersucht. So wirkten sich niedrige Gärtemperaturen von 9-12 °C positiv aus, während höhere Temperaturen ansteigende Konzentrationen an Trübungsbildnern im Bier verursachten, welche die Stabilität herabsetzten.

Auch das Anstellen mit gesteigerter Hefegabe resultierte in erhöhten Polyphenol- und Proteinkonzentrationen im Bier, deren destabilisierende Wirkung aber offenbar durch das gleichzeitig verbesserte Reduktionsvermögen ausgeglichen wurde. Ein mangelhafter physiologischer Zustand der Hefe kann hier jedoch zur Ausbildung von Glycogentrübungen führen, die durch die Filtration nicht mehr entfernt werden können. Auch eine Beeinträchtigung der Schaumhaltbarkeit durch die Exkretion von Fettsäuren kann nicht ausgeschlossen werden [MALCORPS et al. 2001, NARZISS 2004].

Wiederholtes Führen der Hefe hatte keinen signifikanten Effekt auf den Gehalt an Haupttrübungsbildnern. Dennoch wies das aus dreimaliger Führung resultierende Bier ein höheres Reduktionsvermögen und eine etwas bessere chemisch-physikalische Stabilität als das Bier aus elfter Führung auf. Ein zu häufiges Wiederverwenden der Hefe birgt jedoch ebenfalls das Risiko der Ausbildung von Glycogentrübungen.

Die Anwendung von Druck im Rahmen von Schnellgärverfahren führt zu einer Inhibierung der Gärungsnebenprodukt-Bildung bei gleichzeitig stark verkürzter Gärdauer [NARZISS 2004]. Ein Vergleich zwischen Druckgärung und druckloser Gärführung offenbarte darüber hinaus weder Differenzen in Bezug auf Polyphenol- und Proteinkonzentrationen noch auf Reduktionsvermögen und kolloidale Stabilität.

Unter der Voraussetzung eines adäquaten Hefemanagements sind die Auswirkungen der Gärführung auf die Trübungsstabilität der resultierenden Biere im Allgemeinen als eher gering zu beurteilen. Diesbezüglich sind die Bedingungen im Lagerkeller, insbesondere Temperatur und Dauer der Lagerung, von weit größerer Bedeutung.

Es hat sich gezeigt, dass es durchaus möglich ist, während des Herstellungsprozesses von Bier positiv auf die kolloidale Stabilität einzuwirken. Der prozesstechnische Einfluss ist jedoch im Vergleich zur gezielten Selektion geeigneter Rohstoffe, wie z.B. Polyphenol- oder Protein-armer Malze sowie zum Einsatz künstlicher Stabilisierungsmittel als vergleichsweise gering zu werten. Bei allen Maßnahmen zur Verbesserung der chemisch-physikalischen Stabilität muss gleichzeitig auch der Effekt auf die anderen Qualitätsparameter von Bier, wie beispielsweise auf Geschmack, Schaum oder Farbe berücksichtigt werden.

Weitere Forschung in diesem Bereich sollte sich schwerpunktmäßig auf die Erarbeitung von Beurteilungskriterien zur Auswahl geeigneter Malzqualitäten konzentrieren, um so bereits von vornherein die Rohstoff-bedingte Stabilität zu verbessern. Zudem wäre es sinnvoll, die Auswirkungen unterschiedlicher Lagerbedingungen und -methoden auf die resultierende Trübungsstabilität zu untersuchen, um auf diese Weise den Filtrations- und Stabilisierungsvorgang in optimaler Weise vorbereiten und unterstützen zu können.

Bezüglich der Vorhersagbarkeit der Trübungsneigung erwies sich die Konzentration an Flavan-3-olen in sämtlichen statistischen Auswertungen als zentrales Entscheidungskriterium.

Die beste Korrelation zur Forciertest-Trübung war nach Bildung des mathematischen Produkts aus Flavan-3-olen und dem Gehalt an proteingebundenem Prolin zu verzeichnen. Die Anwendung von Schnellbestimmungsmethoden resultierte in etwas schlechteren Regres-

sionskoeffizienten. Die Vorhersagbarkeit der kolloidalen Stabilität auf Basis des Forciertest-Ergebnisses stellte sich jedoch grundsätzlich als mangelhaft heraus ($r^2 = 0,4$), was vermutlich auf den nur ungenügend berücksichtigten Einfluss von Sauerstoff und pH-Wert zurückzuführen ist. Offenbar laufen die oxidations- und säurekatalysierten Polymerisationsreaktionen durch die verkürzte Analysendauer während der forcierten Alterung nur unvollständig ab, was gleichzeitig auch mit einer Überbewertung der Bierstabilität einhergeht.

In Übereinstimmung mit dieser Theorie ergaben sich aus der Untersuchung der realen Trübung nach 9 Monaten wesentlich höhere Regressionskoeffizienten. Das Produkt aus Flavan-3-olen, Prolin, pH-Wert und Sauerstoffgehalt zeigte eine sehr gute Korrelation ($r^2 > 0,8$) zur kolloidalen Stabilität. Im Hinblick auf die Gewinnung zuverlässiger Erfahrungswerte zur flexiblen und effizienten Bierstabilisierung ist die Beurteilung der realen Trübung daher der Untersuchung der Forciertest-Trübung vorzuziehen.

Die Anwendung von Regressionsgleichungen auf Basis mathematischer Produkte nach Analyse der Trübungs-Parameter erlaubt zwar eine Vorhersage der zu erwartenden Stabilität, liefert jedoch keine spezifischen Aussagen zu den Grenzwerten der entsprechenden Trübungsbildner. Aus diesem Grund stellt die Anwendung statistischer Programme zur Klassifizierung und Korrelationssuche eine wertvolle Ergänzung auf dem Wege zu effizienter Bierstabilisierung dar. Mittels des Programms „R“ können sogenannte „decision trees“ erstellt werden, die Informationen zur Relevanz einzelner Parameter und die Angabe von Schwellenwerten beinhalten.

So evaluierte das Programm „R“ die Flavan-3-ole sowohl bezüglich der Forcier-Trübung als auch der realen Trübung als primäres Entscheidungskriterium. Die sensitiven Proteine (Forciertrübung) sowie der Sauerstoffgehalt (reale Trübung) stellten sich als sekundäre Einflussfaktoren heraus. Von allen untersuchten Parametern wurden darüber hinaus nur der Prolin-Gehalt, die Alkoholkonzentration und der pH-Wert berücksichtigt.

Es ist prinzipiell möglich, die kolloidale Stabilität unter Anwendung der beschriebenen Methoden bereits im Unfiltrat vorherzusagen, so dass im Filterkeller entsprechende Maßnahmen zur gezielten Reduktion einzelner Trübungsbildner getroffen werden können. Zur Verbesserung der statistischen Sicherheit sind jedoch weitere Analysen notwendig, wobei hier der Schwerpunkt auf die Untersuchung der realen Trübungen in Form von Rückstellproben gelegt werden sollte.

6 Abstract

This research focused on two main areas. First, improving colloidal stability through the strategic selection of raw materials, and second, optimizing the technological features of brewing process in order to achieve a goal widely aspired to within the brewing industry – a reduction in the use of artificial methods to acquire optimal colloidal stability, that not only improves beer quality, and potentially to significantly reduce production costs.

From a methodological perspective, identifying the haze relevant Flavan-3-ols Catechin, Epicatechin, Prodelphinidin B3 and Procyanidin B3 is a key factor in assessing colloidal stability. In addition, phenolic acids and other selected polyphenols were added as new substances to the HPLC-measurable spectrum.

The detection of protein-antagonists to haze creating polyphenols emerged out of the analysis of “sensitive” proteins precipitated from the use of tannic acid. Further, a new method has been developed to detect protein bound proline concentrations, and to generate more accurate information on hard to classify haze active proteins.

This research not only considered the influence of oxygen measurements, but also for the first time included the reductive power of beers as measured by electrochemical testing methods. This was expected to provide new insights into the interaction between oxidation and reduction in beer and its influence on colloidal stability.

Earlier inadequate predictions of haze performance have given rise to the process of the “blind” stabilization of beers. Therefore it was important to identify and collate the effects of excessive artificial stabilization on the consistency and quality of the beers. It was established that the specific use of 50 g/hl PVPP almost completely removed haze relevant Flavan-3-ols from the beer. This resulted in significantly improved colloidal stability compared with the control sample. No negative impacts on foam, flavor and flavor stability were observed, even when polyphenol absorption was accompanied by a significant deterioration in antioxidant capacity. However, intensive PVPP-stabilization may partially eliminate some health relevant polyphenols such as Isoxanthohumol.

The additional use of 100 g/hl silica gel (Xerogel) resulted in a slightly improved haze stability compared with the beer stabilized exclusively using PVPP. However, it significantly degraded the PVPP-absorptive effect. The inhibitive impact of PVPP associated with silica gel stabilization is noted in earlier research and is traceable to the antagonistic inhibitive effects of both stabilizing agents. In order to maximize their effect stability agents should be added

separately in successive dosages [NARZISS and REICHENEDER 1977, RAIBLE 1979, DADIC and LAVALLEE 1983, KUSCHE 2005]. The used Xerogel exhibited good specificity against sensitive proteins without exerting any noticeable impact on foam.

Alcohol and pH levels of bottled beer are claimed as factors that influence haze formation. Siebert has demonstrated this correlation in model suspensions made up of different amounts of haze relevant polyphenols and proteins [CURTIS 1966, GRAMSHAW 1970b, SIEBERT 1999a, SIEBERT and LYNN 2003, SPEERS et al. 2003, SIEBERT 2006]. This research however did not focus on model suspensions. Rather it investigated differently stabilized beers and the correlation between alcohol concentration i.e. pH levels and colloidal stability. Increased concentrations of alcohol, within the range 3.9–4.3% w/w improved the beer's haze resistance after using PVPP. Conversely, there were no such effects detected in the unstabilized and silica gel stabilized beer. Because of the high complexity of beer matrices, there were therefore no observable links between pH levels and haze formation in any of the beers tested.

Of further interest was the effect of varying concentrations of oxygen in bottled beer on reductive power and colloidal stability. Independent of the analysis methods used, an increased oxygen concentration meant a significant degradation of the two parameters that were used to measure the quality of the tested samples. By monitoring antioxidant capacity, oxidation damage was still detectable after the chemical reaction between oxygen and beer ingredients had ceased.

Any potential impacts on beer quality arising from different wort aeration were neutralized during fermentation, maturation and storage. The comparison of normal aeration (8 ppm O₂) with non-aerated wort revealed no significant difference in the resulting beers with respect to their reductive power and colloidal stability. Thus an adequate aeration of wort is preferable in order to guarantee rapid main fermentation than having no aeration at all.

Phenolic acids and Isoxanthohumol do not appear to be intrinsically involved in the process of haze formation. In contrast to the results reported by Papp the addition of increasing concentrations of Ferulic acid to the beer stabilized with PVPP had no obvious effect on colloidal stability in this case [PAPP 2000, PAPP et al. 2001]. Isoxanthohumol did not accelerate haze formation either. However, the addition of vanillic acid and p-coumaric acid created a slightly improved colloidal stability at higher dosage rates, which may result from the enhanced reductive power of the beer.

The influence of the chemical composition of the brewing liquor in relation to colloidal stability was quite low. Although higher alkalinity levels in the liquids used resulted in lower concentrations of polyphenols and proteins in the beer, no positive effect on haze resistance was observed. This is probably linked to the minor degradation of substrate during mashing which neutralizes any positive effect. On the other hand higher residual alkalinity caused significant deterioration of color, foam stability, antioxidant capacity, flavor and bitterness. Further in accordance with earlier reports, there was a significant slowdown in lautering performance compared with the usage of low alkalinity liquid [NARZISS 1992].

The addition of polyphenolic extracts, which accrue as a by-product during ethanol extraction of hops, has proved to be a promising method to technologically optimize the brewing process. The polyphenols brought in by these tanning products caused better reducing power. Consequently there was an up to 15% improvement in lautering performance. This is consistent with former results [GOIRIS et al. 2005]. At the same time no degradation of colloidal stability was detectable, on the contrary the added polyphenols exerted a positive effect, due to their tanning properties. Further the addition of polyphenolic extracts assisted the preservation of the total polyphenolic spectrum of hops, compared to the exclusive application of pure resin extracts. This preservation is of nutritional value.

Usage of varying hop products (Ethanol pure resin extract, CO₂ pure resin extract, Pellets) at an early stage of wort boiling had no significant influence on the colloidal stability of the resulting beer. The negative effect of higher polyphenol concentrations has obviously been neutralized by the intensified precipitation of proteins.

High gravity brewing emerged as an effective technique to improve colloidal stability during the brewing process, particularly when adjuncts at wort boiling were incorporated. The better stability of all malt-HG-beers compared to "normal" all malt-beers, previously noted by Kusche and Narziss, was not attributable to intensified chemical reactions during wort boiling [NARZISS 1992, NARZISS 2004, KUSCHE 2005]. The better resistance of these beers to haze formation is more likely attributable to enforced precipitation of "sensitive" proteins and haze relevant polyphenols during fermentation, maturation and storage. This performance might be due to the lower pH in the HG-samples. The addition of glucose syrup to the boiling wort resulted in a further decrease of haze relevant substances and produced better stability compared to the all malt-HG-beers. This effect was due to the attenuation of the wort by the added syrup and to the pronounced decrease in pH levels.

Besides variations in processing techniques in the brewing house, the effect of varying fermentation control on the colloidal stability of the resulting beers was tested, too. Cold fermentation within the range of 9-12 °C proved to be beneficial compared to the fermentation at higher temperatures, which resulted in higher concentrations of haze relevant substances and decrease in stability.

Pitching with higher yeast concentrations caused an increase in polyphenols and proteins, but any destabilizing effect seemed to be compensated by the better reductive power of beer that was fermented with a higher yeast dosage. An incomplete physiological state of the yeast used may however generate the formation of Glycogen-haze, which cannot be removed by filtration. Further the release of fatty acids may also have a negative impact on foam stability [MALCORPS et al. 2001, NARZISS 2004].

Even if various numbers of yeast-cycles produced no significant influence on the concentrations of haze relevant substances, the stability of the beer from the 3rd cycle was slightly better compared to the beer from the 11th cycle. This fact may be due to higher reductive power in the beer that was fermented with fresh yeast, as the frequent re-pitching of the yeast may assist formation of Glycogen-haze.

An accelerated and pressure-controlled fermentation process enables fermentation time to be reduced, as well as inhibiting the formation of by-products [NARZISS 2004]. A comparative study between pressure-fermented beer and non-pressurized control samples showed no significant distinctions in relation to polyphenol and protein concentration, reductive power and colloidal stability.

With appropriate yeast management the effect of varying fermentation control on beers' colloidal stability appears to be low. The conditions during maturation and storage seem to be much more relevant, especially temperature and processing time.

It emerged that it is possible to improve colloidal stability during the actual production process of beer. But the influence any such technological factors have are slight, compared with careful selection of raw materials, such as choosing malt that contains only minor amounts of polyphenols and proteins, or the use of artificial stabilizing agents. It is important to note that each step taken in order to improve stability against haze formation can also affect other quality parameter such as flavor, foam and color.

Further research in this field should concentrate on the development of appraisal criteria for the selection of raw materials that will improve colloidal stability. It would also be useful to investigate the effects varying storage conditions and methods have on colloidal stability.

As far as predictability of haze formation is concerned, concentration levels of Flavan-3-ols proved to be the key factor in each statistical evaluation.

The optimal correlation to the Forcier test–haze was found by the mathematical equation of Flavan-3-ols and protein-linked proline. The application of quick-test analyses showed slightly decreased regression coefficients. However the predictability of colloidal stability on the basis of the Forcier test-results was generally quite low ($r^2 = 0.4$), possibly due to the insufficient consideration of the influence of oxygen and pH. Obviously oxidation and acid-catalyzed polymerization of polyphenols are incomplete due to the forced aging process, which in turn gives an overestimated measure of beer stability.

In accordance with this theory, the regression coefficients were significantly greater after analysis of the “natural” real haze, which was formed during the 9 month storage of the beer. The product of Flavan-3-ols, protein-linked proline, pH and oxygen showed very strong correlation ($r^2 > 0.8$) to colloidal stability. For this reason, and the challenges involved in collecting reliable empirical values to enable flexible and efficient beer stabilization, the assessment of the real haze seems preferable to the evaluation of the Forcier test–haze.

The use of regression equations on the basis of mathematical products after measurement of haze relevant parameters enables prediction of the expected beer colloidal stability, but it does not provide specific statements concerning threshold values of haze relevant substances. Therefore the application of statistical programs for classification and correlation searches forms an additional meaningful technique towards an efficient stabilization process. By using the program “R” so called “decision trees” can be generated which contain information on the relevance of single parameters and the indication of thresholds.

Thus the program “R” selected the Flavan-3-ols as the first and decisive criterion with respect to the Forcier test–haze as well as the real natural haze. Sensitive proteins (Forcier test-haze) and total oxygen in the bottled beer (real haze) were exposed as secondary decision criteria. Moreover of all the tested parameters only the concentration of protein-linked proline, the alcohol-concentration and the pH have been considered as important.

Generally speaking it is already possible to predict colloidal stability also in the unfiltered beer by using the methods described in this work. This means that appropriate arrange-

ments can be made in the filter cellar about the selective reduction of single haze relevant substances. However further tests are necessary to improve statistical confidence levels. These tests should focus primarily on the promising analysis of the real hazes emerging during storage of the retain samples.

7 Literaturverzeichnis

ANALYTICA-EBC, 2008: Lose Blattsammlung, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.

ANGER, H. M., 1983: Über die Stabilisierung von Bier unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole. TU Berlin, Fachbereich für Lebensmitteltechnologie und Biotechnologie, Dissertation.

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

ANNEMÜLLER, G., MANGER, H. J., LIETZ, P., 2005: Die Hefe in der Brauerei, 1. Auflage, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin.

APPERSON, K., LEIPER, K. A., MCKEOWN, I. P., BIRCH, D. J. S., 2002: Beer fluorescence and the isolation, characterisation and silica adsorption of haze-active proteins. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 108 (2), 193-199.

ASANO, K., SHINAGAWA, K., HASHIMOTO, N., 1982: Characterisation of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. – Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 40 (4), 147-154.

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

BASF 2008: Crosspure® - Powerpoint-Präsentation der Firma BASF.

BATCHVAROV, V. und CHAPON, L., 1985: Vorausbestimmung der kolloidalen Bierhaltbarkeit. – Monatsschrift für Brauwissenschaft, Heft 8, 331-341.

BECKER, H. und ALT, A., 2001: Ist Bier gesund? – Magazin Forschung, Vol. 2, 57-63.

BELLEAU, G. und DADIC, M., 1981: Beer hazes. II. Further analyses of basic components by high performance liquid chromatography. – Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 39 (4), 142-146.

BELLMER, H. –G., 1976: Über den Einfluss der Malzqualität auf Polymerisationsindex, kolloidale Haltbarkeit und Geschmacksstabilität der Biere. – Brauwelt, Jg. 116, Nr. 24, 789-797.

BELLMER, H. –G., 1977: Polyphenole und Alterung des Bieres. – Brauwelt, Jg. 117, Nr. 20, 660-669.

BELLMER, H. –G., 1981: Hopfenpolyphenole im Brauprozess. – Brauwelt, Jg. 121, Nr. 8, 240-245.

BELLMER, H. –G., GALENSA, R., GROMUS, J., 1995a: Bedeutung der Polyphenole für die Bierherstellung (Teil 1). – Brauwelt, Nr. 28/29, 1372-1379.

BELLMER, H. –G., GALENSA, R., GROMUS, J., 1995b: Bedeutung der Polyphenole für die Bierherstellung (Teil 2). – Brauwelt, Nr. 30, 1477-1496.

BERG, K. A., 1991: A method for the rapid evaluation of colloidal stability in beer. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 28 (4), 163-167.

BIENDL, M., 2007: Development of new plant extracts rich in hop polyphenols. – In: Proceedings of the 31st EBC Congress, Venice, European Brewery Convention (Hrsg.).

BIENDL, M. und PINZL, C., 2007: Arzneipflanze Hopfen. Schriftenreihe des Deutschen Hopfenmuseums, Nr. 6, Wolnzach.

BOHR, G., GERHÄUSER, C., KNAUFT, J., ZAPP, J., BECKER, H., 2005: Anti-inflammatory Acylphloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). – Journal of natural products, Vol. 68, 1545-1548.

BOULTON, C. und QUAIN, D., 2001: Brewing yeast and fermentation, 1. Auflage, MPG Books Ltd., Cornwall.

BRIEM, F. und GEIGER, E., 1999: Development of colloidal stability during beer filtration. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 36 (2), 211-213.

BURKERT, J., 2005: Beurteilung der Bierqualität anhand unterschiedlicher Reduktonklassen. TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation.

CHAPON, L., 1965: The mineral composition of chill haze preparations. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 71, 299-304.

CHAPON, L., 1994: The mechanisms of beer stabilization. – Brewers` Guardian, Vol. 123 (12), 46-50.

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

CURTIS, N. S., 1963: Non-biological stability. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 69, 216-227.

CURTIS, N. S., 1966: The activities and achievements of the haze group of the European Brewery Convention. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 3 (4), 253-257.

DADIC, M. und VAN GHELUWE, G. E. A., 1971: Potential antioxidants in brewing. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 8 (4), 182-190.

DADIC, M., 1973: Comparative adsorption of beer constituents by Nylon-66 and Polyclar AT. - MBAA Technical Quarterly, Vol. 10 (1), 60-64.

DADIC, M. und VAN GHELUWE, G. E. A., 1973: The role of polyphenols and non-volatiles in beer quality. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 10 (2), 69-73.

DADIC, M., 1976: Current concepts on polyphenols and beer stability. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 13 (3), 182-189.

DADIC, M. und BELLEAU, G., 1980: Beer hazes. I. Isolation and preliminary analysis of phenolic and carbohydrate components. – Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 38 (4), 154-158.

DADIC, M. und LAVALLEE, J. G., 1983: The use of Polclar AT (PVPP) in brewing. – Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 41 (4), 141-147.

DE CLERCK, J., 1964: Lehrbuch der Brauerei, Band 1, 2. Auflage, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin.

DE CLERCK, J., 1970: The stabilization of beer through Tannin addition. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 7 (1), 1-4.

DE GAULEJAC, N. V., VIVAS, N., NONIER, M. -F., ABSALON, C., BOURGEOIS, G., 2001: Study and quantification of monomeric flavan-3-ol and dimeric procyanidin quinonic forms by HPLC/ESI-MS. Application to red wine oxidation. – Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 81, 1172-1179.

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

DELCOUR, J. A., SCHOETERS, M. M., MEYSMAN, E. W., DONDEYNE, P., 1984: The intrinsic influence of catechins and procyanidins on beer haze formation. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 90, 381-384.

DELCOUR, J. A., SCHOETERS, M. M., MEYSMAN, E. W., DONDEYNE, P., SCHREVEN, E. L., WIJNHOF, J., 1985: Flavour and haze stability differences due to hop tannins in all-malt Pilsner beers brewed with proanthocyanidin-free malt. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 91, 88-92.

DJURTOFT, R., 1965: Composition of the protein and polypeptide fraction of EBC beer haze preparations. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 71, 305-315.

DREW, I., 1981: Some thoughts on beer stabilization. - Brewers` Guardian, September, 31-39.

DROST, M. A., 1999: Methoden zur Untersuchung der Auswirkungen mechanischer Belastung auf kolloidale Struktur, Rheologie und Filtrationsverhalten von Bier. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Dissertation.

EBERHARD, M., BENNING, R., PETERMEIER, H., KÖCK, S., JUNG, T., DELGADO, A., 2006: Vorgehensweise zur Realisierung eines Data Mining Projekts am Beispiel der Filtrationsoptimierung. - Der Weihenstephaner, Jg. 74, Nr. 4, 145-147.

ENGELHARDT, U., 1999: Flavonoide - in Tee, anderen Getränken und Lebensmitteln. - Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee, Deutsches Tee Institut, Hamburg.

ERDAL, K., 1986: Proanthocyanidin-free barley - malting and brewing. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 92, 220-224.

ESNAULT, E., 1995: Beer stabilisation with papain. Brewers` Guardian, January, 47-49.

EVANS, E., ROBINSON, L. H., SHEEHAN, M. C., TOLLHURST, R. L., HILL, A., SKERRITT, J. S., BARR, A. R., 2003: Application of immunological methods to differentiate between foam-positive and haze-active proteins originating from malt. - Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 62 (2), 55-62.

FISCHER, W. und SCHNICK, T., 2004: Bierstabilisierung mit Kieselgel. - Brauwelt, Nr. 19, 557-565.

FLESCHHUT, J., 2004: Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen. Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Dissertation.

FOSTER II, R. T., PATINO, H., SLAUGHTER, J. C., 2000: The contribution of post-fermentation bittering to beer composition and stability. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 37 (1), 89-95.

FRIEDRICH, W., 2000: Proanthocyanidine in den Braurohstoffen Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Gerstenmalz: HPLC-Bestimmung mit UV- und Elektrodenarray-Detektion. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Dissertation.

FRIEDRICH, W., EBERHARDT, A., GALENSA, R., 2000: Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. – European Food Research Technology, Vol. 211, 56-64.

FRIES, G. und GANZLIN, G., 1969: Die Beurteilung von Biertrübungen. – Brauwelt, Nr. 24/25, 454-456.

FUKAL und KAS, 1984: The role of active and inactivated Papain in beer chillproofing. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 90, 247-249.

FUKUDA, K., SAITO, W., ARAI, S., AIDA, Y., 1999: Production of a novel proanthocyanidin-free barley line with high quality. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 105, 179-183.

GARDNER, R. J. und MCGUINNESS, J. D., 1977: Complex phenols in brewing – a critical survey. - MBAA Technical Quarterly, Vol. 14 (4), 250-261.

GERHÄUSER, C., 2001: Flavonoide und andere pflanzliche Wirkstoffe – Was hat praktische Relevanz? Sollen wir unser Essverhalten ändern? – Ernährung und Medizin, Vol. 26, 137-143.

GOIRIS, K., SYRYN, E., JASKULA, B., VAN OPSTAELE, F., DE ROUCK, G., AERTS, G., DE COOMAN, L., 2005: Hop polyphenols: Potential for beer flavour and flavour stability. – In: Proceedings of the 30th EBC Congress, Prague, European Brewery Convention (Hrsg.).

GOMEZ, L. J. und LEWIS, M. J., 1969: Observations on beer haze. – In: Proceedings of the ASBC-Congress, ASBC (Hrsg.), 142-148.

GRAMSHAW, J. W., 1967: Phenolic constituents of beer and brewing materials. II. The role of polyphenols in the formation of non-biological haze. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 73, 455-472.

GRAMSHAW, J. W., 1969a: Phenolic constituents of beer and brewing materials. IV. Further observations on anthocyanogens and catechins as haze precursors in beer. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 75, 61-83.

GRAMSHAW, J. W., 1969b: Beer polyphenols and the chemical basis of haze formation, part I: Phenolic constituents of beer and its raw materials. - Technical Quarterly, Vol. 6 (4), 239-259.

GRAMSHAW, J. W., 1970a: Beer polyphenols and the chemical basis of haze formation, part II: Changes in polyphenols during the brewing and storage of beer – the composition of hazes. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 7 (2), 122-131.

GRAMSHAW, J. W., 1970b: Beer polyphenols and the chemical basis of haze formation, part III: The polymerization of polyphenols and their reactions in beer. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 7 (3), 167-179.

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

GUZMAN, J. E., MCKEOWN, I. P., GLEAVES, M., STEWART, G. G., DOYLE, A., 1999: Selective protein adsorption with silica gel. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 36 (2), 227-230.

HARTMANN, K., 2006: Bedeutung rohstoffbedingter Inhaltsstoffe und produktionstechnologischer Einflüsse auf die Trübungsproblematik im Bier. TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation.

HARTMEIER, W., 1979: Bierstabilisierung mit Papain. – Brauerei-Rundschau, Jg. 90, Nr. 1/2, 31-33.

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

HASLAM, E., 1998: Practical polyphenolics – from structure to molecular recognition and physical action. Cambridge University Press, Cambridge.

HENNIES, K., 1956: Brauerhandbuch für den Lehrling, Brauer und Vorderburschen, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.

HEYSE, K.-U. (Hrsg.), 1983: Handbuch der Brauereipraxis, Nürnberg.

HEYSE, K.-U., 1986: Proanthocyanidinfreie Gerste "Galant" – Erfahrungen im Anbau, in der Mälzerei und in der Brauerei. – Brauwelt, Jg. 126, Nr.16, 618-622.

HOFMANN, T., 2004: Die Welt der vernachlässigten Dimensionen – Kolloide. Chemie unserer Zeit, Vol. 38, 24-35.

HOUGH, J. S., 1976: Silica hydrogels for chill-proofing beer. - MBAA Technical Quarterly, Vol. 13 (1), 34-39.

HOUGH, J. S. und LOVELL, A. L., 1979: Recent developments in silica hydrogels for the treatment and processing of beers. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 16 (2), 90-100.

IRMSCHER, B., 1991: Zukunftsorientierte Bierstabilisierung. – Brauwelt, Jg. 131, Nr. 38, 1625-1628.

JAKOB, G., 1932: Die Forschungsbrauerei. – In: Brautechnologische Sammlung Forschungsbrauerei München.

JANY, A. und KATZKE, M., 2002: CSS-A new beer stabilization process. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 39 (2), 96-98.

JERUMANIS, J., 1972: Über die Veränderung der Polyphenole im Verlauf des Mälzens und Maischens. – Brauwissenschaft, Vol. 25 (10), 313-322.

KAIN, J., 2005: Entwicklung und Verfahrenstechnik eines Kerzenfiltersystems (Twin-Flow-System) als Anschwemmfilter. TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation.

KAMM, G., 1969: Art und Wirkungsweise von Bierklärmitteln. – Brauwelt, Jg. 109, Nr. 24/26, 445-453.

KANEDA, H., KOBAYASHI, N., FURUSHO, S., SAHARA, H., KOSHINO, S., 1995: Reducing activity and flavour stability of beer . – MBAA Technical Quarterly, Vol. 32, 90-94.

KATZKE, M., BODENHEIM, R., OECHSLE, D., 1998a: Die Bierstabilisierung mit Ionentauschern. Teil 1 – Grundlagen. – Brauwelt, Nr. 22/23, 991-994.

KATZKE, M., BODENHEIM, R., OECHSLE, D., 1998b: Die Bierstabilisierung mit Ionentauschern. Teil 2 – Verfahrenstechnik und Ergebnisse aus Praxisversuchen – Brauwelt, Nr. 36, 1628-1632.

KESSLER, H., 1971: Technologische Wirkungen der Malzgerbstoffe auf die Bierbereitung. – Brauwelt, Jg. 111, Nr. 33, 661-663.

KESSLER, H., 1983: PVPP-haltige Filterschichten. Eine interessante Alternative für die chemisch-physikalische Bierstabilisierung. – Brauwelt, Jg. 124, Nr. 11, 392-397.

KIENINGER, H. und DURNER, G., 1981: Bitter- und Gerbstoffgehalte von Erntehefen. Untersuchungen bei mehrmaliger Führung. – Brauwelt, Jg. 121, Nr. 13, 434-438.

KREISZ, S., 2003: Der Einfluss von Polysacchariden aus Malz, Hefe und Bakterien auf die Filtrierbarkeit von Würze und Bier. TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation.

KRETSCHMER, H., 1982: Die Tannoide im Brauprozeß. – Brauwelt, Nr. 16, 676-683.

KUSCHE, M., 2005: Kolloidale Trübungen in untergärigen Bieren – Entstehung, Vorhersage und Stabilisierungsmaßnahmen. TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation.

KUSCHE, M. und GEIGER, E., 2007: Kinetics of haze formation in beer – turbidity and flavan-3-ols. – *Brewing Science*, January/February, 38-47.

LARRAURI, J. A., SANCHEZ-MORENO, C., RUPEREZ, P., SAURA-CALIXTO, F., 1999: Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 47, 1603-1606.

LEBERLE, H., 1937: Abriss der Bierbrauerei, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

LEBERLE, H., 1949: Abriss der Bierbrauerei, 2. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

LETTERS, R., 1969: European Brewery Convention – Haze and Foam Group. Origin of carbohydrate in beer sediments. - *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 75, 54-60.

LEIPER, K. A., DUSZANSKYJ, R., STEWART, G. G., 2002: Premixing of Isinglass and silica gel to obtain improved beer stability. - *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 108 (1), 28-31.

LEIPER, K. A., STEWART, G. G., MCKEOWN, I. P., 2003a: Beer polypeptides and silica gel. Part I. Polypeptides involved in haze formation. - *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 109 (1), 57-72.

LEIPER, K. A., STEWART, G. G., MCKEOWN, I. P., 2003b: Beer polypeptides and silica gel. Part II. Polypeptides involved in foam formation. - *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 109 (1), 73-79.

LEIPER, K. A., STEWART, G. G., MCKEOWN, I. P., NOCK, T., THOMPSON, M. J., 2005: Optimising beer stabilisation by the selective removal of tannoids and sensitive proteins. - *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 111 (2), 118-127.

LEIPNER, W., 1977: Bierstabilisierung mit polyamidhaltigen Filterschichten. - *Brauwelt*, Jg. 117, Nr. 28, 926-932.

LIM, Y.-H., PECAR, M., SUDARMANA, D., PEEL, R., FREEMAN, M., HAWTHORNE, D., 1992: Effect of storage conditions on the filterability of beer. - *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 29 (2), 37-41.

LINKO, M. und ENARI, T. -M., 1969: Über die Trübungsneigung des Bieres und ihre Bestimmung. - *Brauwissenschaft*, Nr. 22, 186-191.

LOPEZ, M., EDENS, L., HUNIK, J., 2005: Prevention of protein-polyphenol haze in beer using a proline-specific protease. - In: *Proceedings of the 30th EBC-Congress, Prague, European Brewery Convention (Hrsg.)*.

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

LUDWIG, W., GRONEICK, E., KRÜGER, E., 1986: Ein Schnellforciertest zur Vorhersage der kolloidalen Stabilität. - *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Heft 2, 76-79.

MACEY, A., 1979: Bierstabilisierung mit Formaldehyd. - *Brauerei-Rundschau*, Jg. 90, Nr. 1/2, 13-15.

MADIGAN, D. und MCMURROUGH, I., 1994: Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection. - *Analyst*, Vol. 119, 863-868.

MADIGAN, D., Byrne, H., MATTHEWS, S., KELLY, R., MCENROE, C., HARMEY, D., 2000: Studies on the effect of common process variables on the colloidal stability of beer. - Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol 58 (4), 160-164.

MALCORPS, P., HASELAARS, P., DUPIRE, S., VAN DEN EYNDE, E., 2001: Glycogen released by the yeast as a cause of unfilterable haze in the beer. - MBAA Technical Quarterly, Vol. 38 (2), 95-98.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., REMESY, C., JIMENEZ, L., 2004: Polyphenols: Food sources and bioavailability. - Journal of the American Society for Clinical Nutrition, Vol. 79, 727-747.

MANACH, C., WILLIAMSON, G., MORAND, C., SCALBERT, A., REMESY, C., 2005: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. - Journal of the American Society for Clinical Nutrition, Vol. 81, 230-242.

MARSHALL, T. und WILLIAMS, K. M., 1987: High resolution two-dimensional electrophoresis of the proteins and macromolecular constituents of beer and wine. - Electrophoresis, Vol. 8, 493-495.

MARTINEZ-GONZALEZ, M. A. und SANCHEZ-VILLEGAS, A., 2004: The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: Monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern? - European Journal of Epidemiology, Vol. 19, 9-13.

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

MCGUINNESS, J. D., EASTMOND, R., LAWS, D. R. J., GARDNER, R. J., 1975: The use of ¹⁴C-labelled polyphenols to study haze formation in beer. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 81, 287-292.

MCMURROUGH, I., LOUGHREY, M. J., HENNIGAN, G. P., 1983: Content of (+)-Catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain. - Journal of the Science of Food and Agricultural, Vol. 34, 62-72.

MCMURROUGH, I. und HENNIGAN, G. P., 1984: Tanning properties of flavanols in barley and hops measured by reaction with cinchonine sulphate in relation to haze formation in beer. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 90, 24-32.

MCMURROUGH, I. und BAERT, T., 1994: Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 100, 409-416.

MCMURROUGH, I., MADIGAN, D., KELLY, R. J., 1996: The role of flavanoid polyphenols in beer stability. - Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 54 (3), 141-148.

MCMURROUGH, I., MADIGAN, D., KELLY, R. J., 1997: Evaluation of rapid colloidal stabilization with Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP). - Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 55 (2), 38-43.

MCMURROUGH, I., 1998: The colloidal stabilization of beer by treatment with Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP). - Cerevisia, Vol. 23 (3), 27-34.

MCMURROUGH, I., MADIGAN, D., KELLY, R., O'ROURKE, T., 1999: Haze formation. Shelf-life prediction for Lager beer. - Food Technology, Vol. 53 (1), 58-62.

MEIER, J., 1986: Die Stabilisierung des Bieres mit PVPP. - Brauerei-Rundschau, Jg. 97, Nr. 5, 93-112.

MERKEN, H. M. und BEECHER, G. R., 2000: Measurement of food flavanoids by high-performance liquid chromatography: A review. - Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 48 (3), 577-599.

MIKYSKA, A., HRABAK, M., HASKOVA, D., SROGL, J., 2002: The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 108, 78-85.

MILLER, A. D., 1996: Antioxidant flavanoids: Structure, function and clinical usage. - Alternative Medicine Review, Vol. 1 (2), 103-111.

MITCHELL, A. E., HONG, Y.-J., MAY, J. C., WRIGHT, C. A., BAMFORTH, C. W., 2005: A comparison of Polvinylpolypyrrolidone (PVPP), silica Xerogel and a Polyvinylpyrrolidone (PVP)-silica co-product for their ability to remove polyphenols from beer. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 111 (1), 20-25.

MITTELEUROPÄISCHE BRAUTECHNISCHE ANALYSENKOMMISSION (MEBAK), 2002: Brautechnische Analysenmethoden Band II, Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weihenstephan.

MITTELEUROPÄISCHE BRAUTECHNISCHE ANALYSENKOMMISSION (MEBAK), 1996: Brautechnische Analysemethoden Band III, Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weihenstephan.

MOELLER, W. M., 1964: The use of gelatin as a precipitant in American cellaring operations. II. Some further considerations. – *Brewers Digest*, Vol. 39 (1), 66-70.

MOLL, M., DUTEURTRE, B., SCION, G., CHAPON, L., CHAPON, S., 1974: The fate of tannoids during fermentation. – *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 11 (4), 250-254.

MOLL, M., THAT, V., SCHMITT, A., PARISOT, M., 1976: Methods for predicting the colloidal stability of beer. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 34 (4), 187-191.

MOLL, M., FONKNECHTEN, G., CARNIELO, M., FLAYEUX, R., 1984: Changes in polyphenols from raw materials to finished beer. – *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 21 (2), 79-87.

MONTANARI, L., PERRETTI, G., NATELLA, F., GUIDI, A., FANTOZZI, P., 1999: Organic and phenolic acids in beer. – *Lebensmittelwissenschaft und -technologie*, Vol. 32, 535-539.

MORRIS, T. M., 1987: The relationship between haze and the size of particles in beer. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 93 (1), 13-17.

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

MUSSCHE, R. A., 1994: Beer stabilisation with Gallotannin. – *Brewers` Guardian*, November, 44-49.

MUSSCHE, R. A., 1997: Treatment of the protein fraction with tannins, enzymes or silicagels. – *Cerevisia*, Vol. 22 (2), 44-57.

MUSSCHE, R. A. und DE PAUW, C., 1999: Total stabilisation of beer in a single operation. – *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 105 (6), 386-391.

NARZISS, L. und RÖTTGER, W., 1973: Zusammenhänge zwischen Eiweißfraktionen und chemisch-physikalischer Stabilität der Biere. – *Brauwissenschaft*, Jg. 26, Heft 11, 325-335.

NARZISS, L. und RÖTTGER, W., 1974: Über die Veränderung der Eiweißfraktionen während des Mälzungs- und Brauprozesses. – *Brauwelt*, Jg. 114, Nr. 27/28, 570-579.

NARZISS, L. und BELLMER, H. G., 1975a: Studie über die Polyphenole und deren Polymerisationsindex in den Rohstoffen des Bieres und ihre Veränderung während der Bierbereitung. – Brauwissenschaft, Jg. 28, Heft 9, 271-274.

NARZISS, L. und BELLMER, H. G., 1975b: Zur Beeinflussung des Polyphenolgehalts und das Reduktionsvermögen von Würze und Bier. – Brauwelt, Jg. 115, Nr. 52, 1729-1734.

NARZISS, L. und REICHENEDER, E., 1977: Derzeitiger Kenntnisstand der Bierstabilisierung. – Brauwelt, Jg. 117, Nr. 28, 918-924.

NARZISS, L., REICHENEDER, E., DAAMS, R., 1979: Über den Einfluss der Abläuterbedingungen auf den Polyphenolgehalt der Würzen und Biere. – Brauwelt, Jg. 119, Nr. 28, 1009-1014.

NARZISS, L., REICHENEDER, E., SCHRENKER, J., 1981: Tannoide bei der Würzebereitung. – Brauwissenschaft, Jg. 34, Heft 9, 229-238.

NARZISS, L., REICHENEDER, E., FÄRBER, W., FREUDENSTEIN, L., 1986: Sauerstoffaufnahme beim Maischen: 2. Mitteilung: Gezielte Belüftungsversuche im Kleinst- und halbtchnischen Maßstab. Abläuterung, Würze- und Biereigenschaften. – Brauwelt, Nr. 1/2, 11-14, 23-25.

NARZISS, L., 1992: Die Technologie der Würzebereitung, 7. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

NARZISS, L., 1994: Chemisch-physikalische Stabilität des Bieres. – Brauwelt, Nr. 44, 2337-2338.

NARZISS, L., 1999: Die Technologie der Malzbereitung, 7. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

NARZISS, L., 2005: Abriss der Bierbrauerei, 7. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

NIEMSCH, K., 2000: Die Renaissance der Bierstabilisierung mit Kieselgel. – Brauwelt, Nr. 15, 580-585.

NIEMSCH, K. 2001: Bierstabilisierung. Der Schritt in das neue Jahrtausend mit der Erfahrung von gestern. – Brauwelt, Nr. 11, 399-405.

NGUYEN, M.-T., VAN ROON, J., EDENS, L., 2008: Kosten sparen durch Verzicht auf Kaltstabilisierung. – Brauwelt, Nr. 18/19, 512-515.

OECHSLE, D. und FUSSNEGGER, B., 1990: Ein neues quervernetztes Polyvinylpyrrolidon (PVPP) mit verbesserten Eigenschaften zur Bierstabilisierung im Recycling. – Brauwelt, Nr. 41, 1780-1789.

OECHSLE, D. und FUSSNEGGER, B., 1995: Vernetztes, unlösliches Polyvinylpyrrolidon. – Brauwelt, Nr. 28/29, 1380-1384.

O'REILLY, J. P., 1994: The use and function of PVPP in beer stabilisation. – Brewers` Guardian, September, 32-36.

O'ROURKE, T., 1994: The requirements of beer stabilisation. – Brewers` Guardian, August, 30-33.

O'ROURKE, T., 1996: The role of PVPP in improving the haze and flavour stability of beer. – Brewers Digest, October, 18- 21.

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

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

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

PAPP, A., WINNEWISSER, W., GEIGER, E., BRIEM, F., 2001: Influence of (+)-Catechin and Ferulic acid on formation of beer haze and their removal through different Polyvinylpyrrolidone-types. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 107 (1), 55-60.

PAWLOWSKI-SCHILD, F., 1961: Die Brautechnischen Untersuchungsmethoden, 8. Auflage, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.

PFENNINGER, H. und HUG, H., 1983: Verkürzung der Lagerzeit durch Einsatz von Kieselsäurehydrosol. – Brauerei-Rundschau, Jg. 94 (9), 236-239.

PFENNINGER, H., 1987: Die kolloidale Stabilität – ein wichtiges Qualitätskriterium von Bier. – Brauerei-Rundschau, Jg. 98 (7), 129-152.

PHILIPP, R., 2006: Trübungsmessung bei der Filtration / Vergleich 90 ° Streulicht und 11 ° Vorwärtsstreulicht. Informationsschrift der Firma Optek-Danulat GmbH, Essen.

PIENDL, A. und BIENDL, M., 2000: Über die physiologische Bedeutung der Polyphenole und Hopfenbitterstoffe des Bieres. – Brauwelt, Nr. 13/14, 526-544.

PIENDL, A., 2000: Physiologische Bedeutung der Eigenschaften des Bieres. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.

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

PREAUX, G., HOLEMANS, P., VAN DER VURST, M., LONTIE, R., 1969: European Brewery Convention – Haze and Foam Group: Amino acid composition of the beer haze components retained by inorganic adsorbents. – Journal of the Institute of Brewing, Vol. 75, 42-49.

PÜSPÖK, J., 1985: Gerbstoffe aus Hopfen und Hopfenprodukten. – Brauwelt, Nr. 45, 2273-2275.

RAIBLE, K., 1979: Bierstabilisierung mit Kieselgel. – Brauerei-Rundschau, Jg. 90, Nr. 1/2, 26-30.

RAIBLE, K., MOHR, U.-H., BANTLEON, H., HEINRICH, T., 1983: Kieselsäuresol – ein Bierstabilisierungsmittel zur Verbesserung der Filtrationseigenschaften von Bier. – Monatsschrift für Brauwissenschaft, Heft 2, 76-82.

REHMANJI, M., MOLA, A., NARAYANAN, K. S., IANNIELLO, R. M., 1998: Polyclar (PVPP) for improving shelf life in laboratory treated lagers. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 35 (2), 95-100.

REHMANJI, M., MOLA, A., NARAYANAN, K. S., GOPAL, C., 2000: Superior colloidal stabilization of beer by combined treatment with silica (Xerogel) and PVPP, Polyclar plus 730. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 37 (1), 113-118.

REHMANJI, M., GOPAL, C., MOLA, A., 2002: A Novel stabilization of beer with Polyclar® Brewbrite™. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 39 (1), 24-28.

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

ROBINSON, L. H., HOME, S., KAUKOVIRTA-NORJA, A., VILPOLA, A., ALDRED, P., FORD, C. M., HEALY, P., GIBSON, C. E., EVANS, D. E., 2007: Improving beer haze stability by in-

vestigation the interaction between malt protein quality and brewing conditions. – In: Proceedings of the 31st EBC Congress, Venice, European Brewery Convention (Hrsg.).

ROESSLER, J. G., 1971: Technological application of recent results of polyphenol research. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 8 (2), 98-104.

RÖTTGER, W., 1974: Stabilisierungsmittel für Durchlaufkontaktverfahren. – Brauwelt, Jg. 114, Nr. 72, 1527-1536.

SCHAFFT, H., 1979: Bierstabilisierung mit PVPP im Recycling. – Brauerei-Rundschau, Jg. 90, Nr. 1/2, 16-23.

SCHILDBACH, R., 1977: Studies of the nitrogen content and nitrogen composition of barley, malt and beer. – Brewers Digest, Vol. 52 (2), 42-47.

SCHLENKER, R., THOMA, S., OECHSLE, D., 1999: Die Bierstabilisierung mit PVPP im Recycling – Stand der Technik. – Brauwelt, Nr. 18, 794-800.

SCHMIDT, H., 1996: Katechismus der Brauerei-Praxis, 16. Auflage, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.

SCHNEIDER, G., 1995: Online-Kontrolle der Wirkung von Bierstabilisierungs-Verfahren. – Brauwelt, Nr. 42, 2089-2091.

SCHNEIDER, J. und RASKE, W., 2000: Neue Schnellbestimmung der Trübung. – Brauwelt, Nr. 42/43, 1694-1695.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. M., PELL, A. N., 2001: Analysis of condensed tannins: A review. – Animal Feed Science and Technology, Vol. 91, 21-40.

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

SCHUR, F., 1979: Bierstabilisierung. – Brauerei-Rundschau, Jg. 90 (1/2), 5-12.

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

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

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

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

SFAT, M. R., 1974: Evaluation of Polyvinylpolypyrrolidon with American beers. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 11 (3), 216-220.

SIEBERT, K. J., LYNN P. Y., CARRASCO, A., 1996a: Formation of protein-polyphenol haze in beverages. – Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 44 (8), 1997-2005.

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

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y., 1997: Mechanisms of beer colloidal stabilization. - Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 55 (2), 73-78.

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y., 1998: Comparison of polyphenol interactions with PVPP and haze-active protein. - Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 56 (1), 24-31.

SIEBERT, K. J., 1999a: Protein-Polyphenol haze in beverages. – Food Technology, Vol. 53 (1), 54-57.

SIEBERT, K. J., 1999b: Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. - Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 47 (2), 353-362.

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y., 2000: Effect of protein-polyphenol ratio on the size of haze particles. - Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 58 (3), 117-123.

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y., 2003: Effects of alcohol and pH on protein-polyphenol haze intensity and particle size. – Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 61 (2), 88-98.

SIEBERT, K. J., 2004: pH and beer colloidal stability. – Cerevisia, Vol. 30 (3), 189-194.

SIEBERT, K. J. und LYNN, P. Y., 2005: Comparison of methods for measuring protein in beer. - Journal of the American Society of Brewing Chemists, Vol. 63 (4), 163-170.

SIEBERT, K. J., LYNN, P. Y., CLARK, D. F., HATFIELD, G. R., 2005: Comparison of methods for assessing colloidal stability of beer. – MBAA Technical Quarterly, Vol. 42 (1), 7-12.

SIEBERT, K. J., 2006: Haze formation in beverages. – LWT (published by Elsevier Ltd.), Vol. 39, 987-994.

SPEERS, R. A., JIN, Y. -L., PAULSON, A. T., STEWART, R. J., 2003: Effects of β -Glucan, shearing and environmental factors on the turbidity of wort and beer. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 109 (3), 236-244.

STEWART, G. G., 2004: The chemistry of beer instability. - Journal of Chemical Education, Vol. 81 (7), 963-968.

STÜCKLER, K., 1997: Der Most – Gärmost und Süßmost, 4. Auflage, Leopold Stocker Verlag, Graz.

SZWAJGIER, D., PIELECKI, J., TARGONSKI, Z., 2005: The release of ferulic acid and feruloylated oligosaccharides during wort and beer production. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 111 (4), 372-379.

TAYLOR, B., CLEM, A., DAVID, P., 2006: Verwendung des Combined Stabilisation System und dessen Einfluss auf die Bierbeschaffenheit. – Brauwelt, Nr. 24, 698-705.

TCHONE, M., 2003: Über Polyphenole in Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) und andere gesundheitsrelevante Inhaltsstoffe. TU Berlin, Fakultät III - Prozesswissenschaften, Dissertation.

THOMPSON, C. C. und FORWARD, E., 1969: European Brewery Convention: Haze and Foam Group. Towards the chemical prediction of shelf life. - Journal of the Institute of Brewing, Vol. 75, 37-42.

TITZE, J., ILBERG, V., JACOB, F., 2008a: Einsatzmöglichkeiten der Ladungstitrationsmethode zur Beurteilung der chemisch-physikalischen Bierstabilität, Teil 1. – Brauwelt, Nr. 18/19, 506-509.

TITZE, J., ILBERG, V., JACOB, F., 2008b: Einsatzmöglichkeiten der Ladungstitrationsmethode zur Beurteilung der chemisch-physikalischen Bierstabilität, Teil 2. – Brauwelt, Nr. 23, 624-627.

VAN DROMME, M., 1979: Bierstabilisierung mit Tannin. – Brauerei-Rundschau, Jg. 90, Nr. 1/2, 23-25.

VAN ROON, J., CRAIG, H., NGUYEN, M.-T., EDENS, L., 2007: Studies on particle sizes in beer treated with a proline-specific protease which prevents haze in beers. – In: Proceedings of the 31st EBC-Congress, Venice, European Brewery Convention (Hrsg.).

VINSON, J. A., MANDARANO, M., HIRST, M., TREVITHICK, J. R., BOSE, P., 2003: Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, 5528-5533.

WACKERBAUER, K. und KRÄMER, P., 1983: Die Bildung von Phenolen während der Gärung. – *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Heft 6, 242-247.

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

WACKERBAUER, K. und ANGER, H.-M., 1984b: Das Verhalten oxidierter Gerbstoffe bei der Bierstabilisierung und der Analyse. – *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Heft 5, 201-207.

WAIBLINGER, R. und NIßEN, C., 2000: Die Tiefenfilterschicht. – *Brauwelt*, Nr. 41, 1642-1647.

WAINWRIGHT, T., 1974: Non-biological hazes and precipitates in beer. – *Brewers Digest*, May, 38-48.

WALKER, C. J., 2001: Ist Bier gut für ihr Herz? – *Brauwelt*, Nr. 34/35, 1278-1283.

WIESER, P., 1941: *Das Protex-Verfahren zur Behandlung von Bier*, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.

WREN, J. J. und WIGGALL, P. H., 1964: An improved colorimetric method for the determination of proline in the presence of other Ninhydrin-positive compounds. – *Journal of Biochemistry*, Vol. 94, 216-220.

YANG, J. -I. und SIEBERT, K. J., 2001: Development of a method for assessing haze-active protein in beer by dye binding. – *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 59 (4), 172-182.

YAO, L. H., JIANG, Y. M., SHI, J., TOMAS-BARBERAN, F. A., DATTA, N., SINGANUSONG, R., CHEN, S. S., 2004: Flavanoids in food and their health benefits. – *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol. 59, 113-122.

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Partikeldurchmesser kolloidaler Trübungen in Bier im Vergleich zu anderen Trübungspartikeln und Porengrößen verschiedener Filterschichten [WAINWRIGHT 1974].....	5
Abbildung 2: Erfassung von Partikeln durch Vorwärts- und Seitwärtsstreuung [Philipp 2006].....	6
Abbildung 3: Komplexbildung zwischen Polyphenolen und Proteinen bei Kälte- und Dauertrübung [GUZMAN et al. 1999].....	9
Abbildung 4: Struktur der dimeren Flavan-3-ole Procyanidin B3 und Prodelphinidin B3 sowie eines trimeren Proanthocyanidins [FRIEDRICH et al. 2000].....	12
Abbildung 5: Modellhafte Darstellung eines kondensierten Tannins [SCHOFIELD et al. 2001].....	13
Abbildung 6: Monomere Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin [HASLAM 1998].....	14
Abbildung 7: Möglichkeiten der Trübungsbildung im abgefüllten Bier [GARDNER und MCGUINNESS 1977].....	14
Abbildung 8: Ferulasäure [TCHONE 2003].....	15
Abbildung 9: Bindungsarten zwischen Proteinen und Polyphenolen [ASANO et al. 1982].....	26
Abbildung 10: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz von Hordein (P = Prolin, Q = Glutamin) [SIEBERT 2006].....	27
Abbildung 11: Die Auswirkungen von Alkohol und pH auf die Trübungsbildung [SIEBERT 2006].....	30
Abbildung 12: Vergleich eines Polyprolin-Segments mit PVPP [SIEBERT und LYNN 1998].....	44
Abbildung 13: Chromatogramm eines unstabilierten Bieres.....	60
Abbildung 14: Verlauf der 90 °-Trübung in den unterschiedlich stabilisierten Bieren während des Forciertests bei 40/0 °C.....	72
Abbildung 15: Prozentuale Abnahme phenolischer Substanzen durch den Einsatz von Stabilisierungsmitteln, verglichen mit der Referenzprobe.....	73
Abbildung 16: Prozentuale Abnahme der Proteine und der Schaumhaltbarkeit durch den Einsatz von Stabilisierungsmitteln, verglichen mit der Referenzprobe.....	75
Abbildung 17: Mittleres Nullstrompotential und elektrochemischer ITT in den unterschiedlich stabilisierten Bieren.....	76
Abbildung 18: Trübungszunahme der unterschiedlich stabilisierten Biere nach 4 Warmtagen.....	79

Abbildung 19: Zusammenhang zwischen Alkoholgehalt und Trübungsbildung in unstabilisiertem und Xerogel stabilisiertem Bier.....	79
Abbildung 20: Zusammenhang zwischen Alkoholgehalt und Trübungsbildung in PVPP stabilisiertem Bier.....	80
Abbildung 21: Zusammenhang zwischen pH-Wert und Trübungsbildung in unterschiedlich stabilisiertem Bier.....	81
Abbildung 22: 90 °-Trübungsbildung in den unterschiedlich belüfteten Flaschen.....	84
Abbildung 23: Sauerstoffgehalt in den unterschiedlich präparierten Flaschen und Reduktionsvermögen nach 24 h.....	85
Abbildung 24: Phenolische Substanzen in der Ausgangswürze und im Unfiltrat der unterschiedlich belüfteten Ansätze.....	87
Abbildung 25: Redoxpotential in der Ausgangswürze und im Unfiltrat der unterschiedlich belüfteten Ansätze.....	87
Abbildung 26: Ansatz Ferulasäure - 90 °-Trübungsbildung und Reduktionsvermögen.....	91
Abbildung 27: Ansatz Vanillinsäure - 90 °-Trübungsbildung und Reduktionsvermögen.....	91
Abbildung 28: Ansatz p-Cumarsäure - 90 °-Trübungsbildung und Reduktionsvermögen.....	92
Abbildung 29: Ansatz Isoxanthohumol - 90 °-Trübungsbildung und Reduktionsvermögen.....	92
Abbildung 30: Flavan-3-ol-Konzentration in Würze und Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten.....	97
Abbildung 31: Konzentration an phenolischen Säuren und Isoxanthohumol in Würze und Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten.....	99
Abbildung 32: Gesamtstickstoff und sensitive Proteine in Würze und Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten.....	100
Abbildung 33: Bittereinheiten, Gesamtpolyphenole und Farbe im fertigen Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten.....	101
Abbildung 34: Redoxpotential im fertigen Bier nach der Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten.....	102
Abbildung 35: Verwendung unterschiedlicher Brauwasser-Qualitäten - Läuterdauer, Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) und 90 °-Trübung nach 4 WT.....	103
Abbildung 36: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: 90 °-Trübungsbildung im Forciertest 40/0 °C.....	107

Anhang	184
<hr/>	
Abbildung 37: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Flavan-3-ole und Anthocyanogene in Brauwasser, Würze und Bier.....	107
Abbildung 38: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Mittleres Nullstrompotential und Stromverhältnis in Brauwasser, Würze und Bier.....	109
Abbildung 39: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Der Zusammenhang zwischen Läuterdauer und Anthocyanogengehalt bzw. Reduktionsvermögen in Brauwasser.....	109
Abbildung 40: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Gesamtstickstoff, sensitive Proteine und Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) in Bier.....	110
Abbildung 41: Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte - Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene in Würze und Bier.....	113
Abbildung 42: Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte - Flavan-3-ole in Würze und Bier.....	114
Abbildung 43: Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte - Ausgewählte Hopfenpolyphenole in den unterschiedlich gehopften Bieren.....	115
Abbildung 44: 90 °-Trübungsbildung in den unterschiedlich stark eingebrauten Bieren.....	120
Abbildung 45: Das Brauen mit hohen Stammwürzen - Flavan-3-ole in Anstellwürze (nach Rückverdünnung) und in Bier.....	121
Abbildung 46: Das Brauen mit hohen Stammwürzen - Sensitive Proteine in Anstellwürze (nach Rückverdünnung) und in Bier.....	121
Abbildung 47: 90 °-Trübungsbildung beim Forciertest 40/0 °C nach Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen.....	124
Abbildung 48: Gehalt des Bieres an Flavan-3-olen und phenolischen Säuren nach Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen.....	125
Abbildung 49: Gesamtstickstoff und sensitive Proteine im fertigen Bier nach Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen.....	126
Abbildung 50: Bildung von Gärungsnebenprodukten infolge der Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen.....	127
Abbildung 51: 90 °-Trübungsbildung beim Forciertest 40/0 °C nach Variation der Hefe-Anstellmenge.....	128
Abbildung 52: Gehalt des Bieres an Flavan-3-olen und phenolischen Säuren nach Variation der Hefe-Anstellmenge.....	129

Anhang	185
<hr/>	
Abbildung 53: Gesamtstickstoff, sensitive Proteine und Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) im fertigen Bier nach Variation der Hefe-Anstellmenge.....	130
Abbildung 54: Mittleres Nullstrompotential und Stromverhältnis im fertigen Bier nach Variation der Anstellmenge.....	130
Abbildung 55: 90 °-Trübungsbildung beim Forciertest 40/0 °C nach der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe.....	132
Abbildung 56: Gehalt des Bieres an Flavan-3-olen und phenolischen Säuren nach der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe.....	133
Abbildung 57: Gesamtstickstoff, sensitive Proteine und Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) im fertigen Bier nach der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe.....	133
Abbildung 58: Mittleres Nullstrompotential und Stromverhältnis im fertigen Bier nach der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe.....	134
Abbildung 59: 90 °-Trübungsbildung beim Forciertest 40/0 °C nach der Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck.....	135
Abbildung 60: Gehalt des Bieres an Flavan-3-olen und phenolischen Säuren nach der Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck.....	136
Abbildung 61: Gesamtstickstoff, sensitive Proteine und Schaumhaltbarkeit (LG-Foamtester) im fertigen Bier nach der Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck.....	136
Abbildung 62: Korrelation zwischen Flavan-3-ol- bzw. Flavanoid-Konzentration des frisch abgefüllten Bieres und den im Forciertest erreichten Warmtagen.....	141
Abbildung 63: Korrelation zwischen dem Produkt aus Flavan-3-olen, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen und den im Forciertest erreichten Warmtagen.....	141
Abbildung 64: Korrelation zwischen dem Produkt aus Flavanoiden, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen und den im Forciertest erreichten Warmtagen.....	142
Abbildung 65: Klassifizierende und bewertende Auswertung aller Messdaten in Bezug auf das Forciertest-Ergebnis mittels „decision tree“.....	144
Abbildung 66: Korrelation zwischen Flavan-3-ol- bzw. Flavanoid-Konzentration des frisch abgefüllten Bieres und der Trübung nach 9 Monaten (Messtemperatur = 4 °C).....	145
Abbildung 67: Korrelation zwischen Sauerstoffgehalt bzw. pH-Wert des frisch abgefüllten Bieres und der Trübung nach 9 Monaten (Messtemperatur = 4 °C).....	146

Abbildung 68: Korrelation zwischen dem Produkt aus Flavan-3-olen, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen, pH-Wert sowie O ₂ -Gehalt des frisch abgefüllten Bieres und der Trübung nach 9 Monaten (Messtemperatur = 4 °C).....	147
Abbildung 69: Korrelation zwischen dem Produkt aus Flavonoiden, proteingebundenem Prolin bzw. sensitiven Proteinen, pH-Wert sowie O ₂ -Gehalt des frisch abgefüllten Bieres und der Trübung nach 9 Monaten (Messtemperatur = 4 °C).....	147
Abbildung 70: Klassifizierende und bewertende Auswertung aller Messdaten in Bezug auf die Trübung der Rückstellprobe nach 9 Monaten mittels „decision tree“	149

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentuale Zusammensetzung kolloidaler Trübungen gemäß den Angaben unterschiedlicher Autoren.....	7
Tabelle 2: Einteilung flavanoider Bier- und Würzepolyphenole [FRIEDRICH 2000, KUSCHE 2005].....	11
Tabelle 3: Konzentration und Wirkungsweise ausgewählter Polyphenole [PIENDL 2000, BIENDL und PINZL 2007].....	20
Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der Osborne-Fractionen in Gerste und Malz [NARZISS 1999].....	22
Tabelle 5: Prozentuale Verteilung der Lundin-Fractionen in Pfannevollwürze und Ausschlagwürze aus 100% Malz [NARZISS und RÖTTGER 1974, NARZISS 1992].....	22
Tabelle 6: Prozentuale Verteilung der im Bier detektierbaren Molekulargewichts-Fractionen [MUSSCHE 1997].....	23
Tabelle 7: Reproduzierbarkeit der mittels HPLC-Analytik detektierbaren Substanzen.....	61
Tabelle 8: Durchschnittliche Polyphenol- und Proteinkonzentration der unstabilisierten Referenzprobe	71
Tabelle 9: Dauertrübung und Kältetrübung der unterschiedlich stabilisierten Rückstellproben nach 9 Monaten.....	73
Tabelle 10: Absolutkonzentrationen [mg/l] der untersuchten Substanzen in der Referenzprobe und in den Ansätzen nach Zusatz.....	90
Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten Brauwässer in °dH.....	94
Tabelle 12: pH-Wert, Extraktgehalt und Vergärungsgrad in Pfannevollwürze (PfvW), Anstellwürze (AW) und Bier.....	95
Tabelle 13: Vergleich Referenzprobe-Anwendung von Gerbstoffextrakten: Durchschnittswerte für Vergärungsgrad, Restextrakt, Bittere und Farbe im Bier.....	106
Tabelle 14: Einsatzkonzentrationen der verschiedenen Hopfenprodukte.....	112
Tabelle 15: Verwendung unterschiedlicher Hopfenprodukte - Stammwürze, Vergärungsgrad, pH und Bitterstoffausbeute.....	112
Tabelle 16: Das Brauen mit hohen Stammwürzen - Systematik und Probenbezeichnung der beiden Versuchsansätze.....	119
Tabelle 17: Das Brauen mit hohen Stammwürzen – pH-Wert in Anstellwürze und Bier.....	119

Tabelle 18: Gärdauer bei Anwendung unterschiedlicher Gärtemperaturen und SCABA-Analyse des fertigen Bieres.....	124
Tabelle 19: Gärdauer nach Variation der Hefe-Anstellmenge und SCABA-Analyse des fertigen Bieres	128
Tabelle 20: Gärdauer bei der Verwendung unterschiedlich oft geführter Hefe und SCABA-Analyse des fertigen Bieres.....	131
Tabelle 21: Gärdauer bei der Anwendung von Schnellgärverfahren mit und ohne Druck und SCABA-Analyse des fertigen Bieres.....	135
Tabelle 22: Bewertungsschema der Forciertest-Ergebnisse für die Erstellung des „decision tree“ ...	143
Tabelle 23: Bewertungsschema der realen Trübung nach 9monatiger Lagerung bei 20 °C (Messtemperatur = 4 °C) für die Erstellung des „decision tree“	148