

## Untersuchungen zur Bildung unerwünschter Trübungspartikel in Bier und deren Verzögerung durch technologische Maßnahmen

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität Berlin Institut für Biotechnologie Lehrstuhl für Brauwesen Prof. Dr. Frank-Jürgen Methner/Dipl.-Ing. Thomas Kunz
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität Braunschweig Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Peter Winterhalter/Dr. Peter Fleischmann
<b>Industriegruppe:</b>	Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V., Berlin  Projektkoordinator: Frank Homann, Warsteiner Brauerei Haus Cramer KG , Warstein
<b>Laufzeit:</b>	2010 – 2012
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 282.000,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Brauereien sehen sich infolge der Globalisierung der Märkte mit dem Problem konfrontiert, über einen langen Zeitraum Stabilität und Produktqualität zu garantieren. Kommt es im Laufe der Lagerung von Bieren zu einer unerwünschten Trübung, so wird das Erzeugnis vom Verbraucher schnell als ungenießbar eingestuft. Es handelt sich dabei allerdings meist nicht um eine gesundheitlich bedenkliche Trübung, die auf den mikrobiellen Verderb des Lebensmittels zurückzuführen ist, sondern um einen kolloidalen Niederschlag aus biereigenen Inhaltsstoffen. Diese Trübungsbildung entsteht aus der Komplexbildung trübungsaktiver Polyphenol- und Proteinfractionen unter Beteiligung von Kohlenhydraten und Metallionen. Grundsätzlich wird bei der chemisch-physikalischen Trübungsbildung zwischen einer reversiblen Kältetrübung und einer irreversiblen Dauertrübung unterschieden. Die Kältetrübung entsteht bei Temperaturen zwischen  $-2^{\circ}\text{C}$  und  $+5^{\circ}\text{C}$  und löst sich beim Erwärmen rückstandslos auf. Im Gegensatz dazu klaren Biere, die eine irreversible Trübung enthalten, auch bei Raumtemperatur nicht mehr auf. Im Verlauf der Lagerung eines Bieres nimmt die Kältetrübung zu, wobei nach einiger Zeit das lös-

liche Trübungsprodukt in eine unlösliche Dauertrübung übergeht. Obwohl auf diesem Gebiet bereits intensiv geforscht wurde, konnte bislang kein eindeutiger Mechanismus vorgestellt werden, der die komplexen Reaktionsmechanismen dieser Trübungsbildung umfassend erklärt. Durch Vorversuche der Forschungsstellen, bei denen die Entwicklung des endogenen antioxidativen Potentials (EAP-Wert) im Bier im Verlauf einer forcierten Alterung der Trübungsbildung im Bier gegenübergestellt wurde, konnte in ersten Versuchsreihen nachgewiesen werden, dass die reversible und irreversible Trübungsbildung in stabilisierten Bieren erst nach dem Verbrauch des endogenen antioxidativen Potentials eintritt.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, mithilfe der in Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse die vorliegenden Reaktionsmechanismen bei der Trübungsbildung weitergehend aufzuklären und zu evaluieren, inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse brauereitechnologisch umgesetzt werden können, um die kolloidale Bierstabilität zu verbessern.

### Forschungsergebnis:

Die Aufklärung der Reaktionsmechanismen zur Trübungsbildung in stabilisierten Bieren stellten einen wichtigen Schwerpunkt der beschriebenen Forschungsarbeiten der Forschungsstelle 1 dar. In diesem Arbeitsbereich war es möglich unter Verwendung von Modelllösungen und verschiedenen Biermatrices, die pH-Wert- und temperaturabhängige Beteiligung der Fenton-/Haber-Weiss-Reaktionsprodukte  $Fe^{3+}$  bzw.  $Fe^{2+}$  an der Trübungsbildung in Bieren nachzuweisen und den Mechanismus in einem ersten Ansatz aufzuzeigen. Bei den vorliegenden Reaktionen kommt der pH- und temperaturabhängigen Ausbildung von Metall-Komplexverbindungen mit Polyphenol-Protein-Verbindungen eine besondere Bedeutung zu, so dass der vorliegende Mechanismus insbesondere die temperaturabhängige Ausbildung der reversiblen Kältetrübung in Bieren signifikant beeinflusst bzw. maßgeblich an deren Entstehung beteiligt ist. Darüber hinaus konnte der postulierte Zusammenhang der beschleunigten Ausbildung der reversiblen Kältetrübung nach dem Verbrauch des endogenen antioxidativen Potentials in Bieren verifiziert werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die signifikante Zunahme in der reversiblen Trübungsbildung im Verlauf der forcierten Bieralterung bei unstabilisierten Bieren entweder direkt oder spätestens mit einem Warm-/Kaltzyklus ( $60^{\circ}C/0 - 2^{\circ}C$ ) Verzögerung nach Erreichen des  $EAP_0$ -Wertes eintritt. Mit Hilfe der vorliegenden Versuchs- und Messreihen war es zusätzlich möglich, den Zusammenhang zwischen der Ausbildung der reversiblen Kältetrübung als Vorstufe der später auftretenden permanenten Trübung in Bieren eindeutig zu verifizieren. Es war nachzuweisen, dass in direkter Korrelation zum signifikanten Anstieg in der reversiblen Kältetrübung nach Verbrauch des endogenen antioxidativen Potentials mit 1 - 3 Warm-/Kalttagzyklen Verzögerung ein entsprechend auffälliger Anstieg in der permanenten Trübung der Biere zu beobachten ist.

Die Untersuchung der unterschiedlich hergestellten Standardbiere zur Trübungserzeugung ergaben, dass die Einflüsse der verschieden gewählten Malzsorten und Hopfenvarietäten auf die Trübungsbildung gegenüber den Einflüssen, die durch die oxidative Stabilität der Biere und bestimmte Brauprozessstufen, wie z.B. Filtration bzw. Stabilisierung, hervorgerufen werden, geringer einzustufen sind. Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse ist es schwierig bzw. nicht zu-

lässig, absolut eindeutige Rückschlüsse in Hinblick auf den Einfluss der Rohstoffe auf die Trübungsbildung zu ziehen. Erst zukünftig produzierte Biere mit ähnlicher Zielsetzung unter Verwendung verschiedener Hopfenvarietäten sollten dazu beitragen, eindeutiger Aussagen in Hinblick auf den Rohstoffeinfluss treffen zu können.

Die Untersuchungen zum Einfluss technologischer Maßnahmen im Brauprozess zur Verbesserung der kolloidalen Bierstabilität ergaben, dass die filtrationsbedingte Abnahme im antioxidativen Potential sehr stark von der eingesetzten Filtrationsmethode bzw. den verwendeten Filterhilfsmitteln beeinflusst wird. In Relation zu den EAP-Wert-Verlusten, die durch eine Kieselgur- und Kieselgur-PVPP-Filtration hervorgerufen wird, ist bei membranfiltrierten Bieren oder dem Einsatz neuer Filterhilfsmittel (z.B. Crosspure®) eine wesentlich geringere Abnahme zu beobachten. In diesem Zusammenhang ist auch auf eine vorhandene Korrelation zwischen der ESR-Signalintensität/ $T_x$ -Werten als Maß für die Radikalgenerierung und den Eisengehalten in den Bierfiltraten hinzuweisen. In direkter Korrelation resultieren aus geringeren Eisengehalten höhere EAP-Werte und eine geringere Radikalgenerierung bzw. umgekehrt. In Folge lässt sich für den filtrationsbedingten Eiseneintrag durch die eingesetzte Kieselgur ein negativer Einfluss auf die oxidative Bierstabilität ableiten. Der Einsatz des Stabilisierungsmittels PVPP führt in allen Bieren zu einer geringfügigen Absenkung des zuvor eingetragenen Eisengehaltes und kann durch die Komplexverbindungen von Eisenionen mit Polyphenol-Protein-Verbindungen und den über PVPP entfernten trübungsaktiven Polyphenolen erklärt werden. Im gleichen Zusammenhang kann auch bei Verwendung von Crosspure® (Polystyrene mit 25 - 26 % aktivem PVPP-Anteil) als Filterhilfsmittel aufgrund des fehlenden Eiseneintrages bei verschiedenen Bieren eine geringfügige Abnahme des Eisengehaltes gegenüber dem Unfiltrat beobachtet werden. Der daraus resultierende positive Einfluss auf die oxidative Stabilität der Crosspure® filtrierte Biere konnte anhand verschiedener Messreihen zum Verbrauch des antioxidativen Potentials und die im Vergleich zur Kieselgurfiltration sehr viel niedrigere Radikalgenerierung ( $T_{400}$ -Wert) eindeutig aufgezeigt werden. Die sehr hohe kolloidale Stabilität der Biere unter Verwendung des Filterhilfsmittels Crosspure® bei den ersten Versuchsreihen war jedoch im Wesentlichen auf die nach Herstellerempfehlung verwendete Crosspure®-

Dosage und die daraus resultierende zu hohe PVPP-Dosage bzw. Überstabilisierung zurückzuführen. Aus diesem Grunde wurden die Grundanschwemmung und die laufende Dosage so angepasst, dass ein direkter Vergleich zu einer erlaubten PVPP-Stabilisierung von 50 g/hl möglich war. Auch in diesen Versuchsreihen war aufgrund des signifikant geringeren Eisengehaltes im Verlauf der Lagerung eine geringere reversible Trübungsbildung und eine höhere oxidative Stabilität in den Crosspure® filtrierten Bieren gegenüber Kieselgur mit PVPP Stabilisierung nachzuweisen. Auf Basis der Versuchsreihen stellt auch die Membranfiltration neben der Crosspure®-Filtration gegenüber der Kieselgurfiltration eine weitere Alternative dar, um die oxidative und kolloidale Stabilität von Bieren zu verbessern.

In Hinblick auf den von der Kieselgur verursachten Eiseneintrag wurde der mögliche Einsatz von Divergan®HM als Filterhilfsmittel in der Brauerei evaluiert. Divergan®HM ist ab 2013 auf dem Markt erhältlich und hat eine adsorbierende Wirkung auf Schwermetallionen in wässrigen und wässrig-alkoholischen Lösungen. So kann es die Schwermetalle entfernen, welche sonst zu einer Trübungsbildung, einer geringeren oxidativen Stabilität und metallischen Bittere im Getränk beitragen könnten. In Laborversuchen und ersten Filtrationsversuchen im Pilotmaßstab konnte die grundsätzliche Eignung von Divergan®HM als Filterhilfsmittel festgestellt werden, welches in der Lage ist, prooxidativ wirkende Eisenionen aus der Biermatrix zu entfernen. Die Bindung der bei der Kieselgurfiltration freigesetzten Eisenionen ist jedoch eindeutig mit einem unerwünschten pH-Wert-Anstieg in der Bier- bzw. Getränkmatrix verbunden. Auf Basis der zuvor gewonnenen Erkenntnisse zum Einfluss des pH-Wertes auf die Trübungsbildung und die oxidative Bierstabilität wird verständlich, dass der durch Divergan®HM verursachte pH-Wert-Anstieg in der Biermatrix einen nachteiligen Effekt auf die oxidative Bierstabilität zur Folge hat und zu einer Abnahme des endogenen antioxidativen Potentials führt. D.h. der positive Effekt wird durch die Entfernung der prooxidativ wirkenden Eisenionen aus der Biermatrix durch den pH-Wert-Anstieg kompensiert bzw. aufgehoben. Zusätzliche Versuchsreihen ließen erkennen, dass es möglich ist, die unerwünschten Einflüsse von Divergan®HM durch eine entsprechende Säuerung zu neutralisieren. Hierbei stellte sich heraus, dass eine natürliche Säuerung mit organischen Säuren, wie Milch- bzw. Zitronensäure,

in der Anschwemmung bzw. laufenden Dossage am besten dazu geeignet ist, den pH-Wert-Anstieg zu vermeiden. Auf diesem Wege ist es möglich, die positiven Eigenschaften von Divergan®HM, hervorgerufen durch die Bindung von prooxidativ wirkenden Eisenionen und dem vorhandenen 10 %igen PVPP-Anteil, im Brauprozess sinnvoll zu nutzen, um die oxidative und kolloidale Bierstabilität zu verbessern.

In weiteren Versuchsreihen war es möglich, die verschiedenen Einflüsse aller zuvor beschriebenen Filtrationsmethoden gegenüberzustellen und erste Hinweise für die mögliche Einsparung von Stabilisierungsmitteln durch Verringerung des Metallioneneintrages bzw. -gehaltes aufzuzeigen.

Ebenso konnte durch die Forschungsstelle (FS) 1 der positive Einfluss bestimmter Verpackungsmaterialien (z.B. O<sub>2</sub>-Scavengerkronkorken) auf die Trübungsentwicklung im Verlauf der Bierlagerung aufgezeigt werden. In diesem Zusammenhang war von FS 2 jedoch kein direkter Einfluss auf die stoffliche Zusammensetzung der gebildeten Trübung nachzuweisen.

Der FS 2 lagen zur Analyse verschiedene Biertrübungen im frühen Stadium der reversiblen Trübungsbildung bei Verwendung von verschiedensten Filtrationsmethoden bzw. Filterhilfsmitteln vor (z.B. Crosspure®, Kieselgur, Divergan®HM, Membran und Kieselgur-PVPP).

In den Kieselgur filtrierten Bieren konnten in den Trübungen, neben Eisen und Kupfer, auch Mangan (höchste Konzentration) und Zink in höheren Konzentrationen bestimmt werden. Durch den Einsatz der zuvor beschriebenen Crosspure®-Filtration mit PVPP-„Überstabilisierung“, welche gezielt auf die Entfernung von trübungsaktiven phenolischen Substanzen abzielt und keinen Eiseneintrag verursacht, konnten die Konzentrationen der genannten Metalle im Vergleich zu den Trübungen aus Kieselgur-filtrierten Bieren gesenkt werden. In diesen Trübungen war Kupfer das Metall höchster Konzentration. Trotz „Überstabilisierung“ konnte eine Bildung der reversiblen Trübung nicht vollständig verhindert werden. Es erfolgte lediglich eine zeitliche Verzögerung der detektierbaren, respektive sichtbaren Präzipitation. Im frühen Stadium der reversiblen Trübungsbildung konnte unabhängig von den verwendeten Rohstoffen und den eingesetzten Filtrationshilfsmitteln eine annähernd gleichbleibende Zusammensetzung identifiziert werden, an der neben den Metallionen auch bestimmte Heterozyklen entscheidend beteiligt sind. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Betei-

ligung bestimmter Nukleoside, wie Adenosin, Guanosin und der freien Aminosäure Tryptophan, hervorzuheben. Die HPLC-DAD-Chromatogramme der zuvor beschriebenen Trübungsansätze unterscheiden sich nicht, da die eingesetzten Filtrationshilfsmittel nicht auf die Entfernung (oder Minderung der Konzentration) der identifizierten Heterozyklen Adenosin, Guanosin und Tryptophan ausgelegt sind. Insbesondere Tryptophan zeigte hier einen hohen Konzentrationsanstieg und deutet damit auf eine besondere Rolle in der Trübungsbildung hin. Auch die Kombination verschiedener Absorptionmittel, die Kombination von Größenaus-schlussstechniken und absorptiven Materialien sowie die Erhöhung der Konzentration von PVPP als absorptivem Mittel konnte die in den Trübungen mittels HPLC zusätzlich nachgewiesene p-Cumar- und Ferulasäure nicht entfernen. Die Konzentration der Heterozyklen steigt während der Trübungsbildung mit fallendem pH-Wert. Die Hydroxycimtsäuren zeigten diesen Einfluss jedoch nicht. Eine Beteiligung der in der Literatur für die Trübungsbildung mitverantwortlich gemachten Dimere von Proanthocyanidinen konnte in der sehr frühen Phase der reversiblen Trübungsbildung nicht nachgewiesen werden, kann jedoch zu einem späteren Zeitpunkt der Präzipitation nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt zeigten sich die isolierten Trübungen unter Beteiligung verschiedenster Stoffgruppen als sehr viel komplexer als in der Literatur beschrieben.

Die Bedeutung des Protein Z's wurde durch den Versuch der Crosspure®-Filtration mit „Überstabilisierung“ in der verzögert entstehenden Trübungsbildung bestätigt. Der erhöhte Einsatz absorptiver Techniken führte im Vergleich zu der herkömmlich durchgeführten Kieselgurfiltration ohne Stabilisierung zu einer Reinigung der Trübungen, welche mittels SDS-PAGE aufgezeigt werden konnte. Die Rolle von Protein Z bei der Entstehung der unlöslichen Komplexe konnte durch die gezielte „Überstabilisierung“ bestätigt werden, da dieses als einziges Protein in diesen Trübungen ausgemacht werden konnte.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die zunehmende Globalisierung im Brauereibereich führt dazu, dass sich die deutsche Braubranche mit einem 80 %igen KMU-Anteil einem zunehmenden Wettbewerb ausgesetzt sieht. Bedingt durch den damit verbundenen Konzentrationsprozess müssen auch kleine und mittelständische Unternehmen ihr Bier über län-

gere Transportwege vertreiben, wenn sie eine Chance haben wollen, in den Großformen des Handels gelistet zu bleiben. Dies hat zur Folge, dass die Biere eine sehr gute Geschmacks- und Trübungsstabilität gegenüber der Lagerzeit und ungünstigen Lagerbedingungen aufweisen müssen. Auf der Basis der Forschungsergebnisse eröffnen sich insbesondere für kleinere Brauereien neue Möglichkeiten, die kolloidale und oxidative Bierstabilität zu verbessern und in bestimmten Bereichen die Produktionskosten für trübungsstabilere Biere durch Einsparungen beim Einsatz von Stabilisierungsmitteln zu reduzieren. Bei den Forschungsergebnissen stehen jedoch die Erhöhung der Lagerstabilität und die damit verbundene Verbesserung der Vermarktungsfähigkeit von Bieren im Mittelpunkt. Auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse kann der Brauprozess unter gezielter Anwendung neuer Filtrationstechnologien (z.B. Membranfiltration) bzw. neuer Filterhilfsmittel (z.B. Crosspure®, Divergan®HM) gegenüber der üblicherweise eingesetzten Kieselgurfiltration (ca. 80 %) in Hinblick auf die kolloidale und oxidative Bierstabilität optimiert werden. Kleine und mittelständische Unternehmen haben damit die Chance, technologisch auf dem Stand der Großbetriebe zu bleiben. Darüber hinaus eröffnet sich für kleinere Unternehmen auch die Möglichkeit, ihr Bier über größere Transportwege zu exportieren, wodurch sich neue Marktchancen eröffnen. Damit wächst die Chance, im Wettbewerb zu bestehen und vor allem sinkt das Risiko, durch Kundenreklamationen bedingte Verluste zu erleiden.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2012.
2. Burmeister, A., Oetken, J., Biester, H., Kunz, T., Methner, F.-J. und Fleischmann, P.: Influence of Filtration Materials on the Arsenic Content in Beverages. Lebensmittelchem. 68, 112 – 113 (2014).
3. Burmeister, A., Calean, A., Kunz, T., Methner, F.-J. und Fleischmann, P.: From Malt to Haze – Changes of Metal Concentrations in Beer Production and the isolated Precipitates. Lebensmittelchem. 68, 113 (2014).
4. Burmeister, A., Hübner, S., Kunz, T., Methner, F.-J. und Fleischmann, P.: The free amino acid Tryptophan is Part of chill in Beers. Lebensmittelchem. 68, 113 (2014).

5. Burmeister, A., Noe, F., Kunz, T., Methner, F.-J., Fleischmann, P. und Winterhalter, P.: Einfluss der Filtrationsmethode auf ausgewählte Bierinhaltsstoffe. Abstract In Kurzreferate 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag. 133. ISBN 978-3-936028-68-3 (2011).

**Weiteres Informationsmaterial:**

Technische Universität Berlin  
Institut für Biotechnologie  
Lehrstuhl für Brauwesen  
Seestrasse 13, 13353 Berlin  
Tel.: +49 30 314-27504  
Fax: +49 30 314-27503  
E-Mail: frank-juergen.methner@tu-berlin.de

Technische Universität Braunschweig  
Institut für Lebensmittelchemie  
Schleinitzstraße 20, 38106 Braunschweig  
Tel.: +49 531 391-7202  
Fax: +49 531 391-7230  
E-Mail: p.winterhalter@tu-bs.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 3079699-9  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.