

## Aktivitätsorientierte Charakterisierung antioxidativer Schlüssel- inhaltsstoffe und deren Wirkung auf die sensorische Qualität von Bier

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie Prof. Dr. Thomas Becker/Dr. Martina Gastl
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik Prof. Dr. Thomas Hofmann
<b>Industriegruppen:</b>	Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V., Pfaffenhofen Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö), Berlin
	Projektkoordinatorin: Dr. Christina Schönberger Joh. Barth & Sohn GmbH & Co. KG, Nürnberg
<b>Laufzeit:</b>	2012 - 2015
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 472.650,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Bis heute stellt die Geschmacksstabilität bei Bier neben der Trübungsstabilität den wichtigsten limitierenden Faktor für die Lagerfähigkeit von Bier dar. Im Verlauf der Lagerung treten zahlreiche Veränderungen im sensorischen Profil auf, obwohl insbesondere der Geschmack von Bier einen entscheidenden Qualitätsparameter darstellt. Nachdem man davon ausgeht, dass oxidative und radikalische Prozesse eine entscheidende Rolle spielen, wird Antioxidantien eine große Bedeutung bei der Verbesserung der Lagerfähigkeit zugeschrieben. Bisher fehlen aber überzeugende Studien, die zeigen, welcher der diskutierten Gruppen an Antioxidantien die größte Bedeutung für Bier zukommt. Außerdem gibt es keine Untersuchungen, die den Effekt relevanter Konzentrationen der Substanzen in Bier erfasst.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, die Struktur der bedeutendsten Antioxidantien in hellem Vollbier aufzuklären und zu ermitteln, inwiefern die Verbindungen in der Lage sind, die Geschmacksstabilität von Bier zu verbessern.

### Forschungsergebnis:

Zunächst wurden als Vortest verschiedene kommerzielle Biere und Versuchsbiere mit Hilfe von In-vitro-Antioxidationstests untersucht. Während kein signifikanter Unterschied zwischen gehopften und ungehopften Bieren erkennbar war, zeigten sich bei der Messung verschiedener Prozessstufen des Brauprozesses und auch bei kommerziellen Bieren Unterschiede in der antioxidativen Wirksamkeit. Sie waren damit für Untersuchungen auf quantitative Unterschiede wirksamer Antioxidantien interessant.

Im Folgenden wurde eine aktivitätsorientierte Fraktionierung durchgeführt. Hierbei war es durch Anwendung nasschemischer Methoden und mehrerer chromatographischer Schritte möglich, Bier in einzelne Fraktionen aufzutrennen und es konnten mit Hilfe der verschiedenen In-vitro-Antioxidationstests aktive Fraktionen lokalisiert werden, in denen wirksame Antioxidantien angereichert vorliegen. Um die Erfassbarkeit antioxidativ wirksamer Verbindungen durch die klassischerweise in der Brauereianalytik verwendeten Globalanalysen zu prüfen, wurden die antioxidativen Fraktionen

auf ihren Gesamtpolyphenol-, ihren Anthocyanogen- und ihren Tannoidgehalt untersucht.

Nach ausreichender Fraktionierung und Aufreinigung konnten mittels Massenspektrometrie, ein- und zweidimensionaler Kernresonanzspektroskopie sowie durch Syntheseexperimente die Strukturen von 30 Verbindungen identifiziert werden, die sich als wirksame Antioxidantien herausstellten. Es war dabei interessant zu beobachten, dass es sich dabei fast ausschließlich um phenolische Substanzen handelt. Dieser Stoffgruppe scheint daher eine große Bedeutung für das antioxidative Potential von Bier zuzukommen. Neben Syringaresinol und Quercetin-6''-malonyl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid wurden dabei Tachiosid (3-Methoxy-4-hydroxyphenyl- $\beta$ -D-glucopyranose) und Arbutin (4-Hydroxyphenyl- $\beta$ -D-glucopyranose) erstmals in Bier nachgewiesen.

Um den Einfluss der Rohstoffe auf die antioxidative Aktivität und die Geschmacksstabilität beurteilen zu können, wurden Brauversuche mit 3 verschiedenen Hopfenprodukten und 2 Hopfengabezeitpunkten durchgeführt. Die Biere wurden sensorisch und analytisch auf ihre Geschmacksstabilität hin untersucht. Mittels Spin-Trapping-ESR wurden die Lag-Time sowie die T150-Werte gemessen.

Für 28 in Bier enthaltene Antioxidantien wurde in der Folge eine Quantifizierungsmethode mittels HPLC-MS/MSMRM unter Verwendung interner Standards entwickelt. Die Untersuchung der verschiedenen Versuchsbiere erklärte dabei die Ergebnisse der In-vitro-Antioxidationstests. So zeigten sich bei den mengenmäßig dominierenden Verbindungen, wie Tachiosid (32-37  $\mu$ mol/L) und Tyrosol (30-60  $\mu$ mol/L), keine signifikanten Unterschiede zwischen gehopften und ungehopften Bieren, sondern lediglich bei Minorkomponenten, wie Kämpferolglucosid, die zugleich Marker für bestimmte Hopfenprodukte darstellen. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die kommerziellen Biere, wobei alle untersuchten Biere dieselben Hauptkomponenten enthielten. Die einzige Ausnahme bildeten Ferulasäure und p-Cumarsäure, die in fast allen Weißbieren nur in geringen Mengen enthalten waren. Aus dem Gehalt der einzelnen Antioxidantien als Mittelwert der kommerziellen Biere und deren antioxidativer Wirksamkeit als Reinsubstanz in vitro konnten außerdem Aktivitätswerte berechnet werden, die als Vergleichswerte dienen, um die Bedeutung einer einzelnen Substanz auf das antioxidative Gesamtpotential von Bier zu beurteilen.

Tachiosid, Tyrosol und Arbutin stellten sich dabei in sämtlichen Bieren als die bedeutendsten Antioxidantien heraus. Darüber hinaus stellen auch Catechin, Ferulasäure und Procyanidin B3 wichtige Verbindungen dar, wohingegen viele der untersuchten Substanzen lediglich eine untergeordnete Rolle spielen.

Bei der folgenden Untersuchung der gesammelten Prozessstufen konnten Informationen über die Bildung und den Verbleib der Antioxidantien im Brauprozess gesammelt werden. Tyrosol konnte dabei als Hefemetabolit bestätigt werden. Während die Verbindung vor der Gärung nur in Spuren zu finden war ( $< 0,5 \mu$ mol/L), war nach der Gärung bereits der finale Gehalt fast vollständig erreicht (30-45  $\mu$ mol/L). Tachiosid dagegen war bereits in der Pfannenvollwürze in hohen Gehalten enthalten (12  $\mu$ mol/L), wurde aber während des Gärprozesses zusätzlich freigesetzt, so dass sich der finale Gehalt ergab (30-35  $\mu$ mol/L). Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch für die analoge Verbindung Arbutin (10  $\mu$ mol/L in Bier). Damit werden Vorläuferverbindungen in der Pfannenvollwürze vermutet, die zum großen Teil erst durch die Hefe zu Tachiosid bzw. Arbutin abgebaut werden.

Um die Antioxidantien in einem natürlichen System evaluieren zu können, wurden im Weiteren in einem Modellexperiment mit Bier Markersubstanzen für den oxidativen Abbau bei der Lagerung von Bier identifiziert. Für frisches Bier waren die iso- $\alpha$ -Säuren und  $\alpha$ -Säuren die charakteristischen Verbindungen, während in gealtertem Bier sämtliche Kongenere der Alloisohumulonhydroxide als Marker auftraten. Dabei bestätigte sich auch der bekannte sauerstoffabhängige Abbauweg der iso- $\alpha$ -Säuren zu Alloisohumulonhydroxiden.

Diese Markersubstanzen wurden anschließend in Dotierungs- und modellhaften Lagerungsexperimenten herangezogen, um den Fortschritt der oxidativen Alterung von Bierproben beurteilen zu können. Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass eine Verdopplung des natürlichen Gehaltes der untersuchten Antioxidantien zu einer signifikanten Verlangsamung der Alterungsprozesse führt. Außerdem war ein deutlich geringerer Effekt messbar, wenn bei der Dotierung der Gehalt an Tachiosid und Arbutin nicht erhöht wurde. Damit sind die untersuchten Antioxidantien tatsächlich in der Lage, oxidative Abbauprozesse im Bier zu verlangsamen und die Getränke Stabilität von Bier zu verbessern. Insbesondere Tachiosid und Arbu-



tin stellten sich dabei als Schlüsselverbindungen heraus.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Hopfenbranche ist mittelständisch strukturiert. Weltweit wird ein jährliches Erntevolumen von 90.000 t Rohhopfen erzielt. Derzeit gibt es in Deutschland rd. 1.300 Braustätten mit ca. 35.000 Beschäftigten und einem Bierabsatz in Höhe von 103 Mio. hl/ Jahr mit einem Marktwert von 9 Mrd. €. 66 % der Produktionsstätten sind kleinen und 32 % mittelständischen Unternehmen zuzuordnen, die einen Anteil von ca. 30 % des Gesamtbiausstoßes abdecken.

Der Erfolg mittelständischer Unternehmen hängt in starkem Maße von der Verbraucherakzeptanz ab. Eine gezielte Kontrolle der Getränkestabilitäten und eine Sicherstellung hoher Produktqualitäten sind gerade für kleinere Unternehmen von großer Bedeutung. Qualitätseinbußen und Imageschäden stellen gerade für diese einen immensen, v. a. auch finanziellen Schaden dar.

Insbesondere kleinere Produzenten sind jedoch in ihrer Laborausstattung limitiert, so dass die Produktüberwachung meist mittels etablierter Globalanalytik erfolgt, insbesondere bei der Polyphenolanalytik. Durch eine Präzisierung der Analytik und durch die Identifizierung einzelner Leitsubstanzen kann die Produktqualität durch Auswahl geeigneter Rohmaterialien und durch angepasste technologische Verfahren gesteigert werden.

Im Ergebnis des Vorhabens konnten neben bekannten auch bisher nicht berücksichtigte Komponenten hinsichtlich ihrer Wirksamkeit als Antioxidantien in Bier beurteilt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Auswahl der Gerstensorte zukünftig eine größere Bedeutung zukommen sollte, andererseits müssen aber auch die starken Einflüsse des Brauprozesses berücksichtigt werden. Hinge-

gen zeigte sich, dass die Hopfenauswahl nur eine untergeordnete Rolle in Bezug auf das antioxidative Potential traditionell gehopfter Biere spielt. Die im Rahmend es Vorhabens entwickelte Quantifizierungsmethode ist als Routineanalytik geeignet, um den Gehalt der bedeutendsten Antioxidantien schnell und selektiv ermitteln zu können. Die Globalanalysen zeigten dagegen nur eine begrenzte Aussagekraft.

#### Publikationen Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2015.
2. Wannemacher, J., Gastl, M. und Becker, T.: Polyphenole im Bier – Analytik und antioxidatives Potenzial. Brauind. 9, 40-43 (2017).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW)  
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie  
Weihenstephaner Steig 20, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3262  
Fax: +49 8161 71-3883  
E-Mail: tbecker@wzw.tum.de

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW)  
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik  
Lise-Meiner-Str. 34, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-2901  
Fax: +49 8161 71-2949  
E-Mail: thomas.hofmann@tum.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:

