

## Einfluss veränderter Malzqualitäten und Hopfenregimes auf die Trübungsneigung von Bier

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle(n):</b>	<p>Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, Freising Prof. Dr. Thomas Becker/Dr. Martina Gastl</p> <p>Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik, Freising Prof. Dr. Thomas Hofmann/Leb.-Chem. Andreas Dunkel</p>
<b>Industriegruppe(n):</b>	<p>Deutscher Mälzerbund e.V., Frankfurt Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V. (DHWV), Pfaffenhofen</p> <p>Projektkoordinator: Sascha Wunderlich Flensburger Brauerei Emil Petersen GmbH &amp; Co. KG, Flensburg</p>
<b>Laufzeit:</b>	2015 - 2017
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 489.160,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Für die Brauwirtschaft stellt die chemisch-physikalische Stabilität von Bieren und insbesondere das Vermeiden unerwünschter Trübungen eine ständige Herausforderung dar. Da der Verbraucher mit solchen Trübungen eine nicht akzeptable Qualitätsminderung verbindet, hat eine nicht ausreichende chemisch-physikalische Stabilität von Bieren in der Regel sowohl finanzielle Schäden als auch einen Imageverlust zur Folge.

Als Hauptverursacher der Trübungen werden Proteine und Polyphenole aus den Rohstoffen Gerste und Hopfen diskutiert, aber auch Metallionen, wie z. B. Eisen, oder auch iso- $\alpha$ -Säuren sollen die Trübungsneigung von Bieren unterstützen. Rein Polysaccharid-basierte Trübungen sind meist Folge eindeutiger technologischer Verfahrensfehler und als solche identifizierbar. Erwartungsgemäß haben die Verarbeitung der Rohstoffe sowie die angewandten Technologien einen maßgeblichen Einfluss auf die Trübungsstabilität der Biere.

Die stoffliche Zusammensetzung sowie die Lösungseigenschaften von Braugersten haben sich durch den enormen Züchtungsfortschritt der letzten Jahre deutlich verändert. Zudem unterliegt der durchschnittliche Eiweißgehalt der Braugersten großen Jahrgangsschwankungen (10,1-11,2 % in den letzten 5 Jahren). Dies führt in Jahren mit knapper Versorgungslage dazu, dass Qualitätzugeständnisse, insbesondere in Hinblick auf heterogene der erhöhte Eiweißgehalte (8,5-12,5 %), gemacht werden müssen. Im Vergleich zu vergangenen Jahrzehnten ist heute aufgrund der wettbewerblichen Rohstoff- und Marktsituation auch eine Verarbeitung von Gersten mit erhöhten Proteingehalten jahrgangsbedingt unumgänglich. Die aus diesen Gersten produzierten Malze zeigen veränderte Qualitäten und die resultierenden Biere weisen häufig ein deutlich erhöhtes Trübungspotential auf, was insbesondere kleinere Produzenten vor enorme Herausforderungen stellt.

Neben den veränderten Braugersteneigenschaften wird die Trübungsstabilität von Biere

ren auch durch die in den letzten Jahren wiederentdeckten alternativen Hopfungstechnologien beeinflusst. Dabei kommen zunehmend veränderte Hopfenregimes zum Einsatz, die auf hohen und späten Hopfengaben basieren. Während die Hopfung früher meist zu Beginn der Kochung erfolgte, geht der Trend inzwischen hin zu einer späteren und deutlich höheren Hopfengabe, vor allem zur Herstellung von hopfenaromatischen Bieren. Wie sich ein erhöhter Eintrag bestimmter Polyphenole auf die Trübung auswirkt, ist nicht bekannt. Durch die veränderten Hopfengaben (Hopfensorte, Dosagemenge, Dosagezeitpunkt) sind ebenso erhöhte Transferraten von Hopfenproteinen ins fertige Bier zu erwarten. So werden bei einer Hopfengabe von 5 g/l Hopfen bei einem Proteingehalt von etwa 20 % umgerechnet 1 g/l Peptide und Proteine dosiert. Bereits bei einer Transferrate von lediglich 1/1.000 ist bereits eine gesteigerte Trübungsneigung im Bier zu erwarten. Obwohl keine belastbaren Daten bezüglich der Übergangsraten einzelner Proteine existieren, lassen praktische Erfahrungen ein Vielfaches dessen erwarten.

Die notwendigen Konzentrationsverhältnisse bzw. die an der Trübung beteiligten Schlüssel-moleküle aus der Gruppe der Proteine und Polyphenole bzw. weiterer trübungsbegünstigender Faktoren (Übergangsmetallionen, Bitterstoffe etc.) sind bislang unbekannt. Gezielte Strategien zur Vermeidung von Trübungen können daher bisher nicht wissenschaftlich entwickelt werden.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, die zur Trübung von Bier führenden Verbindungskomplexe unter Anwendung eines holistischen, ergebnisoffenen Forschungsansatzes analytisch zu charakterisieren und einen kausalen Zusammenhang der molekularen Ursachen der Komplexbildung und der Trübungserkennung herzustellen. Basierend auf diesem molekularen Verständnis sollten technologische Empfehlungen zur Auswahl bzw. zum Einsatz von Rohstoffen in Hinblick auf eine Erhöhung der chemisch-physikalischen Stabilität von Bieren abgeleitet werden.

#### Forschungsergebnis:

An Forschungsstelle (FS) 1 wurden Biere unter Variation des Gerstenrohproteingehaltes, des Malzlösungsgrades, des Brauwassermine-ralstoffgehaltes, der Hopfensorte und des

Hopfenproduktes hergestellt. Als weiterer Einflussfaktor wurde eine späte Hopfengabe in Form einer Whirlpool-Hopfung eingesetzt. Durch vorangehende Mälzungsversuche sollten Malze mit unterschiedlichen Modifikationen hergestellt werden. Ziel der anschließenden Brauversuche war es, durch den Rohstoffeinsatz unterschiedliche Trübungsbilder im Bier zu erzeugen.

Mit Hilfe der Variation des Weichgrades konnten Malze mit unterschiedlichen Lösungseigenschaften hergestellt werden. Sowohl die proteolytischen als auch die cytolytischen Eigenschaften wurden durch die Malzlösung beeinflusst.

Der Eintrag stickstoffhaltiger Substanzen durch die späte Hopfung konnte in den meisten Fällen nachgewiesen werden. So erhöhten sich durch die Whirlpool-Hopfung der Gesamtstickstoffgehalt, der freie Aminostickstoffgehalt sowie der Anteil an niedermolekularen Stickstoffverbindungen. Gleichzeitig bewirkte dies eine Verminderung der hochmolekularen Stickstoffsubstanzen. Die Whirlpool-Hopfung führte zudem zu einer Erhöhung des Gesamtpolyphenolgehaltes. Verkostungen nach DLG-Prüfschema der frischen und forcierten Biere ergaben, dass eine Whirlpool-Hopfung gegenüber einer konventionellen Hopfung mit Extrakt oder Pellets tendenziell zu besseren Bewertungen führte. Die Trübungsneigung der Biere wurde durch die Malzeigenschaften stärker beeinflusst als durch das Hopfenregime. Die Trübungsstabilität wurde bei geringerem Rohproteingehalt und höherem Malzlösungsgrad deutlich erhöht. Die beste Kombination dieser Malzeigenschaften ergab sich bei gleichzeitiger Verwendung eines Hopfenextraktes. So konnte die Trübung gegenüber niedrigerer Malzlösungen sowie einer Verwendung von Pellets oder einer Whirlpool-Hopfung reduziert werden. Diese Beobachtung bestätigte sich in den durchgeführten Forcier-tests und stimmte mit dem zeitsparenden Formaldehydtest überein. Gute, reproduzierbare Ergebnisse liefert zudem die Ammoniumsulfatfällungsgrenze. Durch Anwendung mehrerer Tests kann die Trübungsbildung aufgrund unterschiedlicher stofflicher Spezifitäten besser vorhergesagt werden.

Die Biere wurden zudem Messungen der Partikelgröße und -form unterzogen. Dabei wurden die frischen und forcierten Biere miteinander verglichen. Die Forcierung der Biere führte



unabhängig vom Rohstoff und der Hopfung zu einer Vergrößerung der Partikel. Des Weiteren bestand durch die Forcierung ein Einfluss auf die Partikelform. Die Partikel bildeten während der Bieralterung eine rauere Oberfläche aus. Zudem fand die Partikelvergrößerung unsymmetrisch statt und resultierte in länglichen Partikeln mit einem weniger kreisrunden Partikelumriss.

Ein weiterer getesteter Einflussfaktor für die Trübungsneigung war der Mineralstoffgehalt des Brauwassers mit Fokus auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge, wobei die Ergebnisse mit einer protein- und polyphenolseitigen Stabilisierung verglichen wurden. Die Verwendung von Brauwasser mit erhöhtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt führte im Gegensatz zu normalem Brauwasser oder destilliertem Wasser zu deutlich geringeren Trübungen. Diese sanken nach zweimonatiger Lagerung sogar noch unterhalb des Ausgangswertes direkt nach der Abfüllung. Die Resultate der Biere aus  $\text{Ca}^{2+}$ -angereichertem Wasser erreichten die Qualität einer Kieselgel-Stabilisierung. Einzig die Verwendung von Polyvinylpyrrolidon (PVPP) führte zu noch besseren Werten.

Es ist festzuhalten, dass bei einer konventionellen Hopfung der größte Trübungseinfluss von der Malzqualität abhängt. Nur hochgelöste Malze führen zu einer befriedigenden kolloidalen Stabilität. Wird Malz mit einem geringen Lösungsgrad verwendet, verschlechtert sich die chemisch-physikalische Stabilität erheblich. Ebenso kritisch ist die alternative Hopfung im Whirlpool zu sehen. Hierdurch wird die Trübungsstabilität deutlich reduziert. Eine Erhöhung des Brauwassermineralstoffgehaltes mit Blick auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verminderte die Trübung und verbesserte die kolloidale Stabilität erheblich. Geringere Konzentrationen führten zu Bieren mit einer reduzierten Stabilität.

Der Gesamtproteingehalt ebenso wie der Kristallwassergehalt wurden nach erfolgreicher Trübungsisolierung in Biertrübung mittels Elementaranalyse bzw. Titration nach FISCHER bestimmt. Während der Proteingehalt im Mittel bei rund 43 % liegt, beläuft sich der sehr niedrige Wassergehalt nach Gefriertrocknung auf 1-3 %. Proteomanalysen zeigten zum einen, dass Protein Z4 und Lipidtransferprotein 1 (LTP 1) die beiden abundantesten Proteine in der Biertrübung darstellen und zum anderen, dass vermutlich spezifische Protein-

Wechselwirkungen einzelner Proteinisoformen zur Trübungsausbildung führen. Während in Biertrübung das LTP 1 nach tryptischem Verdau eindeutig nachweisbar ist, konnte LTP 2 nicht detektiert werden. Ebenso verhält es sich für die Isoformen von Protein Z4 und Z7, wobei nur Protein Z4 in Biertrübung nachweisbar ist. Auf niedermolekularer Ebene wurde Calcium als trübungsrelevante Komponente identifiziert. Während es sich in Biertrübung bis zu Gehalten von 3 g/kg anreichert und damit das mengenmäßig deutlich abundanteste Ion darstellt, konnte in Forcierungsexperimenten gezeigt werden, dass Proben, denen das Calcium durch Komplexbildung mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entzogen wurde, weniger stark zur Trübungsneigung neigen. Des Weiteren lässt sich auf Grundlage der durchgeführten Experimente vermuten, dass insbesondere die unpolaren Isomere einiger Verbindungen an der Trübungsneigung beteiligt sind. Im Falle der beiden Isomere Isoxanthohumol und Xanthohumol, deren Verhältnis in Bier bei rund 80:1 auf Seiten des polareren Isoxanthohumols liegt, verschiebt sich ebendieses Verhältnis in der Biertrübung auf bis zu 3:1. Dies könnte auf hydrophobe Interaktionen lipidbindender Proteine (z. B. LTP 1) mit unpolaren Analyten der niedermolekularen Bierfraktion zurückzuführen sein. Im Allgemeinen kann für die Strukturklasse der Polyphenole festgestellt werden, dass deren Rolle ggf. geringer als bisher angenommen ist. Basierend auf massenspektrometrischen Untersuchungen konnte für unterschiedliche Trübungen festgestellt werden, dass die erwartete Vielfalt von Polyphenolen in Biertrübung nicht nachweisbar ist. Während sich Hopfenbitterstoffe stark in der Trübung anreichern, ist ihr Einfluss auf die Trübungsneigung vermutlich eher gering.

Im Zuge einer aktivitätsorientierten Fraktionierung wurde das komplexe System Bier auf eine trübungsaktive MPLC-Fraktion reduziert. Die hochmolekulare, proteinreiche Bierfraktion (HMW > 1 kDa) diente hierbei als Matrix, welcher potentiell trübungsaktive Analyten, Substanzmischungen oder Fraktionen zugesetzt und die Proben daraufhin einer forcierten Alterung unterzogen wurden. Die trübungsaktive MPLC-Fraktion wies unter anderem hohe Gehalte an Guanosin auf, welches bereits in früheren Studien in Biertrübung nachgewiesen werden konnte, dessen genauer Einfluss bislang aber noch unklar ist.

Abschließend ist damit zusammenzufassen, dass im Rahmen des Vorhabens tiefreichende Einblicke in die Chemie der Trübungsbildung gewonnen wurden und die Trübungspartikel weitgehend auf molekularer Ebene charakterisiert werden konnten. Die Biertrübung und die hierfür verantwortlichen Faktoren sind deutlich komplexer als bislang angenommen und zwar sowohl hinsichtlich der Vielfalt der Analyten, die in Biertrübung nachgewiesen werden können, als auch hinsichtlich der molekularen Interaktionen und der maßgeblich beteiligten Substanzen, die zur Präzipitation führen.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Pro Jahr werden in Deutschland ca. 1,8 Mio. t Malz aus Gerste hergestellt. Der Gesamtumsatz der Malzbranche liegt bei ca. 800 Mio. €. Ein Großteil der Mälzereien gehört zu den kleinen und mittelständischen Unternehmen und verzeichnet Produktionsmengen zwischen 1.000 t bis 250.000 t. Auch die deutsche Brauwirtschaft ist trotz zunehmender Zusammenlegung zu großen Konzernen nach wie vor mittelständisch geprägt. Derzeit gibt es in Deutschland ca. 1.300 Braustätten mit ca. 35.000 Beschäftigten, die einen Umsatz von ca. 9 Mrd. € erwirtschaften.

Eine Verbesserung der chemisch-physikalischen Stabilität von Bier auch bei längeren Distributionswegen und langer Lagerzeiten sowie in Jahrgängen mit ungünstigen Rohstoffqualitäten oder bei Anwendung alternativer Hopfungstechnologien stellt insbesondere für kleinere Unternehmen eine wirtschaftliche Herausforderung dar. Trübungen werden vom Lebensmittelhandel und von den Verbrauchern als Zeichen eines Produktverderbs angesehen und umgehend reklamiert. In der Folge führen sie zu direkten Kosten, die aus Rückgabe- oder Rückholaktionen resultieren. Der sekundäre Effekt eines Imageverlustes ist demgegenüber noch schwerwiegender einzustufen.

Insbesondere bei der Verarbeitung von Erntejahrgängen mit erhöhten Eiweißgehalten ist das vermehrt auftretende Problem der Trübungsstabilität ein bekanntes Phänomen in der

Brauindustrie. Nach Schätzungen der Industrie sind bis zu 15 % der Reklamationen auf eine unzureichende chemisch-physikalische Stabilität zurückzuführen.

Weltweit besteht ein zunehmendes Interesse an hochwertigen Spezialbieren; der Export von deutschem Bier steigt deshalb. Aufgrund der längeren Distributionswege stellt eine ausreichende chemisch-physikalische Stabilität allerdings eine wichtige Voraussetzung dar, um die international hohe Reputation von deutschem Bier langfristig zu sichern. Die vornehmlich als filtrierte Biere angebotenen Biersorten Pils und Export besitzen gemeinsam fast 70 % Marktanteil. Eine Reduktion bzw. Vermeidung von Trübungsproblemen wird deshalb zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit deutscher Unternehmen im internationalen Wettbewerb beitragen.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2017.

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW  
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie  
Weihenstephaner Steig 20, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3261  
Fax: +49 8161 71-3883  
E-Mail: tb@wzw.tum.de

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW  
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie  
und Molekulare Sensorik  
Lise-Meitner-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

