1 TU München-Weihenstephan
2 Universität Bonn

Name der Forschungsstelle(n)

12605/N

AiF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.10.2000 bis 30.09.2002

Bewilligungszeitraum

Schlußbericht für den Zeitraum : 01.10.2000 bis 30.09.2002

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die

AiF
Otto von Guericke

geförderten Forschungsvorhaben

Forschungsthema : Systematische Untersuchungen zur endogenen antioxidativen Aktivität von Bier unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole und ihrer Veränderung beim Brauprozess

Freising, 16.12.02
Ort, Datum

W. Back
Unterschrift der/des Projektleiter(s)

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I
D - 85350 FREISING-WEIHENSTEPHAN

Bonn, 18.12.02
Ort, Datum

Unterschrift der/des Projektleiter(s)

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Lebensmittelchemie
Endenicher Allee 11-13, III. Stock, 53115 Bonn
Telefon 0228 - 73 37 97;- 98; Telefax 0228 - 73 37 57

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **1**

Allgemeines zur Geschmacksstabilität von Bier **2**

Antioxidative Wirkung phenolischer Substanzen **2**

Darstellung der Ergebnisse **4**

Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung phenolischer Substanzen 4

Vorbereitung der Proben für die Analytik 4
Vorbereitung von Malzproben 5
Vorbereitung von Hopfenproben 5
Festphasenextraktion 7
Gekoppelte Probenvorbereitung 12
Stabilität der Analyten 12
Chromatographische Trennung der Polyphenole 13
Verwendung von narrow-bore-Säulen 13
Vergleich von Phasenmaterialien 13
Optimierung der Trennbedingungen 17
Detektion und Identifizierung 17

Gefriertrocknung (Probenaustausch, Lagerung) 22

Methoden zur Untersuchung antioxidativer Eigenschaften 24

Entwicklung des antiradikalischen Potenzials (ARP) 24
Beurteilung des antiradikalischen Potenzials in Bier 28
Ermittlung der Lag-Time 29
Das antiradikalische Verhalten (ARV) 31
Das Reduktionsvermögen 32
Entwicklung des Stabilitätsindex 33
Anwendung der Chemilumineszenz-Messung 35
Direkte Messung der Chemilumineszenz in Bier und Malz 35
Beurteilung der antiradikalischen Aktivität von Polyphenolen und Sulfit mittels der Chemilumineszenz-Messung 35
Einfluss des pH-Wertes auf die antiradikalische Aktivität der Polyphenole 36
Zusammenhang zwischen einzelnen phenolischen Substanzen und den antioxidativen bzw. nasschemischen Analysen 37

Untersuchungen im Bierbereitungsprozess 38

Untersuchung des Malzes auf Polyphenole und ihr antioxidatives Potenzial 38
Untersuchung der Polyphenole in der Maische 40
Einfluss der biologischen Säuerung auf den Polyphenolgehalt und die Geschmacksstabilität der Biere 40
Einfluss der Gärung auf den Stabilitätsindex und die Geschmacksstabilität der Biere 41
Einfluss der Stabilisierung und Filtration auf die phenolischen Substanzen und die Geschmacksstabilität der Biere 42
Veränderung der phenolischen Substanzen im Bier während der Lagerung und ihr Beitrag zur Geschmacksstabilität 47

Literatur **51**

Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse

Die Zusammenarbeit zwischen einem lebensmittelchemischen Institut und einem brauwissenschaftlichen Lehrstuhl sollte es ermöglichen, die Zusammensetzung und Veränderung der im Brauprozess relevanten Polyphenole zu klären, ihren Beitrag zur antioxidativen Aktivität von Bier zu ermitteln und basierend auf diesen Erkenntnissen technologische Verfahren zur Erhöhung der Geschmacksstabilität von Bier abzuleiten.

Im Bereich der Probenvorbereitung wurden detaillierte Untersuchungen durchgeführt. Sie resultieren in einer Analysemethode, die durch die innovative ASE-ASPEC-Kopplung ein großes Spektrum der phenolischen Inhaltsstoffe aus Braurohstoffen, Brauprozessproben und Bier quantifizieren kann und dabei sehr empfindlich und reproduzierbar ist (Standardabweichung in der Größenordnung 1-2%). Dabei wird zur Absicherung der Ergebnisse auf zwei verschiedene Detektionssysteme (UV-DAD und Ionenfallen-MS) zurückgegriffen. Einzelne Substanzen sind z. T. erst durch die Korrelation der Informationen aus beiden Detektoren eindeutig identifizierbar.

Die hier erreichte Automatisierung der Polyphenolanalytik erhöht die Chancen der Etablierung der HPLC-Methodik in den Laboratorien kleiner und mittlerer Unternehmen, da der hohe Zeitaufwand der manuellen Probenvorbereitung entfällt. Zudem erlauben die eingesetzten Geräte eine schnelle Anpassung der Parameter an geänderte Problemstellungen (z.B. andere Zielsubstanzen).

Im Rahmen des Forschungsvorhabens konnte gezeigt werden, dass sich die phenolischen Substanzen aus heutiger Sicht während der Bieralterung nicht signifikant verändern und so im abgefüllten Bier keine schützende Wirkung zeigen. Dies liegt an dem niedrigen pH-Wert im Bier, der die antioxidative Aktivität der Polyphenole stark herabsetzt.

Die Analytik der antioxidativen Aktivität wird auf der anderen Seite stark durch den Gehalt an phenolischen Substanzen beeinflusst. Der Stabilisierung mit PVPP kommt somit eine große Bedeutung zu, da hier das Spektrum an Polyphenolen unnatürlich verändert wird und so die Ergebnisse nicht mit der Alterungsverkostung auf einem hohen Niveau korrelieren. Einen großen Einfluss auf die Geschmacksstabilität hat das Schwefeldioxid, das auch bei dem niedrigen pH-Wert antioxidative Wirkung zeigt.

Der positive Einfluss der phenolischen Substanzen zeigt sich während der Maischarbeit. Biologische Maischesäuerung führte zu erhöhten Gehalten an Polyphenolen in den Würzen und zu entsprechend geschmacksstabileren Bieren. Gerade das Einmaischen zeigt deutliche Oxidationsreaktionen. Diese können in speziellen Tests verfolgt werden. Dadurch zeigen sich verschiedene phenolische Substanzen, wie die Sinapinsäure, als besonders antioxidativ. So spielt das Spektrum der phenolischen Substanzen bereits im Malz eine große Rolle. Auch das Malz selbst kann auf sein antioxidatives Potenzial hin untersucht werden; so könnte eine neue Spezifikation eingeführt werden.

„Das Forschungsziel des Vorhabens wurde zum Teil erreicht!“

Allgemeines zur Geschmacksstabilität von Bieren

Ein für den Brauer wichtiges Qualitätsmerkmal des Bieres stellt die Geschmacksstabilität dar. Es soll gewährleistet werden, dass das Produkt über eine lange Zeitspanne seinen frischen Charakter nicht verliert. Allerdings sprach schon Dalgliesh (1977) von einer geschmacklichen Instabilität des Bieres, da es einem natürlichen Alterungsvorgang unterworfen ist. Die Biere sind jedoch aufgrund spezieller Inhaltsstoffe in der Lage, die meist oxidativen Alterungsvorgänge zu verzögern. Außerdem ist es dem Brauer heutzutage möglich, bis in das abgefüllte Bier weitgehend sauerstofffrei zu arbeiten. Dies zeigt sich auch in deutlich verbesserten Geschmacksstabilitäten. Mit der Entdeckung freier Radikale im Bier (Kaneda et al., 1988) wurde die Alterungstheorie erweitert. Aufgrund von Wärme und Licht reagiert der molekulare Sauerstoff zum sehr reaktiven Hydroxylradikal, das unspezifisch mit Bierinhaltsstoffen reagieren kann. Aufgrund ihrer endogenen antioxidativen Aktivität können Biere die Radikalentstehung verhindern. Als ein wichtiger Inhaltsstoff gilt in diesem Zusammenhang das Schwefeldioxid, das während der Hauptgärung von der Hefe gebildet wird. Die Produktion des SO_2 kann gezielt gesteigert werden. So sind zum Beispiel beim Drauflassverfahren die Belüftungsrate und der Belüftungszeitpunkt sehr wichtig (Forster et al., 1999; Back et al., 1999). Aber auch der Hefestamm hat eine Bedeutung. So zeigen obergärige Hefen fast keine SO_2-Bildung.

Besondere Bedeutung für die Geschmacksstabilität hat das Reduktionsvermögen des Bieres. Die reduzierend wirkenden Substanzen schützen das Bier in gewissem Maße vor Oxidationen. Hierfür werden Reduktone und Melanoidine verantwortlich gemacht. Der Sulfitgehalt verbessert ebenso das Reduktionspotenzial (Narziß, 1995).

In Bier ist eine Vielzahl von Substanzen enthalten, die reduzierende und antioxidative Eigenschaften aufweisen. Zur Erfassung dieser komplexen Vorgänge sind verschiedene Analysenverfahren und Meßgeräte erforderlich.

Antioxidative Wirkung phenolischer Substanzen

Polyphenole stellen ein wichtiges Kriterium in Bezug auf die Geschmacksstabilität von Bieren dar. Sie werden über das Malz und den Hopfen in den Brauprozeß eingebracht. Aufgrund ihrer reduzierenden Wirkung können sie während der Bierbereitung die Inhaltsstoffe vor Oxidationen schützen. Besonders niedermolekularen Polyphenolen wird eine positive Wirkung als natürliche Antioxidantien zugeschrieben.

In dieser Forschungsarbeit sollte geklärt werden, welche antioxidativen Eigenschaften einzelne Substanzen aus der Gruppe der Polyphenole aufweisen und wie ihr Gehalt im abgefüllten Bier gefördert werden kann. Es muß entsprechend geklärt werden, wie Polyphenole antioxidativ wirksam sein können.

Folgende Definition für Antioxidantien und ihrer Wirkungsweise kann in der Literatur gefunden werden:

„Antioxidantien sind Substanzen, die im Vergleich zu einem oxidierbaren Substrat in geringer Konzentration vorliegen und dessen Oxidation deutlich verzögern oder verhindern.“ (Halliwell et. al., 1989)

Es werden mehrere Reaktionsmechanismen unterschieden. Zu den wichtigsten zählen:

- Verhinderung von Kettenreaktionen durch Abfangen (Scavenging, Quenchen) eines Starterradikals.
- Chain-breaking: Unterbinden von Radikalkettenreaktionen durch Abfangen (Scavenging oder Quenchen) eines Intermediärradikals.
- Chelatbildung: Binden von Metallionen, die katalytisch an Oxidationsreaktionen beteiligt sind (z.B. Fe_2^+).

In der Forschung werden in erster Linie biologische Systeme bei physiologischen pH-Werten untersucht, in denen auch Enzyme an den Oxidationsvorgängen beteiligt sein können. In Bier dagegen liegt ein Milieu mit einem pH-Wert um etwa 4,3 vor und es handelt sich um ein nichtenzymatisches System. Entsprechend beschränken sich die antioxidativen Reaktionen auf das Abfangen (Scavengen) von Radikalen und das Quenchen aktiver Sauerstoffformen.

Folgende phenolische Verbindungen, die auch in Bier vorhanden sind, lassen sich unterscheiden:

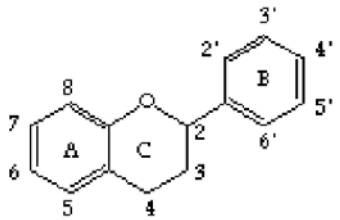
Zum einen finden sich in Bier Phenolcarbonsäuren. Zu ihnen gehören die Hydroxyzimtsäuren wie zum Beispiel die Kaffee-, Ferula-, oder Sinapinsäure. Eine weitere Gruppe stellen die Hydroxybenzoesäuren dar. Als Beispiele seien die p-Hydroxybenzoe- und Vanillinsäure genannt. Beide Arten von Phenolcarbonsäuren liegen häufig als Derivate vor. Dies können Veresterungen mit der D-Chinasäure oder mit D-Glucose sein. Ester der Gallussäure („hydrolysierbare Gerbstoffe“ bzw. Tannine) spielen ebenfalls eine große Rolle.

Eine große Gruppe der Polyphenole stellen die Flavonoide dar. Sie lassen sich in die Flavone, Flavonole, Flavanone und weitere untergliedern. Polymere Strukturen der Flavan-3-ole sind als Proanthocyanidine („kondensierte Gerbstoffe“) bekannt.

Es zeigen sich bei den Polyphenolen strukturelle Kriterien, die eine Aussage zulassen, wie gut sie Radikale abfangen können:

- Die *ortho*-Dihydroxy-Struktur am B-Ring führt zu einer höheren Stabilität der entstehenden Radikalform (Elektronen-Delokalisation).
- Stabilisierung am C-Ring wird durch die 2,3-Doppelbindung und die 4-Oxo-Gruppe ermöglicht.

- Eine maximale antiradikalische Aktivität zeigt sich, wenn neben der 4-oxo-Gruppe eine 3- und 5-OH-Gruppe vorhanden ist. Dies ermöglicht auch die Chelatbildung mit Metallionen (Rice-Evans et. al., 1996).



Grundgerüst der Flavonoide

Um das Scavenging-Verhalten von Polyphenolen gegenüber Radikalen messen zu können, wurden an der Forschungsstelle 1 Messmethoden entwickelt, die im weiteren Verlauf dieses Berichtes dargestellt werden.

Von aktueller Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der Gehalt an Xanthohumol in Bier, das durch den Hopfen in den Brauprozess eingebracht wird. Dieses Prenylflavonoid wird neben anderen Inhaltsstoffen, wie Vitamine und Zink (Piendl, 2000, Ricken, 1999, Walzl, 1999), zurzeit als gesundheitsförderlicher Wirkstoff diskutiert (Gerhäuser, 2002).

Darstellung der Ergebnisse

Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung phenolischer Substanzen

Vorbereitung der Proben für die Analytik

Einen Schwerpunkt im Verlauf des Forschungsprojektes bildeten Untersuchungen zur Probenvorbereitung. Diese spielt als erster Schritt eine wesentliche Rolle im Rahmen der Polyphenolanalytik. Aus den festen Braurohstoffen werden die Verbindungen zunächst extrahiert, die Extrakte anschließend mittels Festphasen-extraktion (SPE) gereinigt und konzentriert, um mitgelöste Störsubstanzen, z.B. Kohlenhydrate, weitgehend zu entfernen und die Konzentration der Zielanalyten zu erhöhen.

Aber auch flüssige Brauprozessproben und Bier müssen konzentriert werden, um die notwendige Empfindlichkeit beim Nachweis der interessierenden Verbindungen zu erreichen. Hohe Wiederfindung und gute Reproduzierbarkeit stehen dabei im Vorder-grund. Schnelle und schonende Bearbeitung sind wesentlich, um eine Veränderung der empfindlichen und reaktiven Polyphenole weitestgehend zu verhindern.

Vorbereitung von Malzproben

Bei der beschleunigten Lösungsmittelextraktion (ASE, accelerated solvent extraction, Dionex) werden Proben unter Druck und erhöhter Temperatur extrahiert. Unter Druck ändern sich die Lösungseigenschaften der Extraktionsmittel, außerdem wird das Probenmaterial besser durchdrungen. Hierdurch reicht eine gröbere Zerkleinerung des Probenmaterials zur vollständigen Extraktion aus. Am Beispiel von Malz konnte gezeigt werden, dass sich mit einer 10minütigen ASE dasselbe Extraktionsergebnis wie mit der bisherigen Extraktion im rotierenden Kolben (2 mal 1 Stunde) erzielen lässt. Durch direkte Kopplung mit der automatisierten Festphasenextraktion (s.u.) und der HPLC lassen sich weitere signifikante Zeit- und Reproduzierbarkeitsvorteile erreichen.

Die schnelle Extraktion fester Probenmaterialien mit der ASE, unter weitgehendem Ausschluss von Sauerstoff, vermindert außerdem die Gefahr der Artefaktbildung während der Probenaufarbeitung.

Vorbereitung von Hopfenproben

Die Anwendung der ASE wurde nach den Erfolgen bei der Malzanalyse auf die Analyse von Hopfen ausgedehnt. Hopfen stellt aufgrund seiner großen Anzahl störender Komponenten, insbesondere der Harze und Öle, analytisch eine besonders schwierige Matrix dar.

Bei der Extraktion der phenolischen Verbindungen mit dem üblicherweise verwendeten Aceton/Wasser-Gemisch werden apolare Probenkomponenten (Hopfenbitterstoffe, Chlorophylle, ...) ebenfalls extrahiert. Das führt zu Problemen bei der weiteren Probenaufarbeitung, da die mitextrahierten Störkomponenten beim Senken des Acetongehaltes, wie es für die folgende SPE notwendig ist, Emulsionen und Niederschläge bilden. Damit einher geht die Gefahr, dass die apolareren der interessierenden Analyten, z.B. Xanthohumol, in diesen Niederschlägen irreversibel eingeschlossen und somit der Bestimmung teilweise entzogen werden.

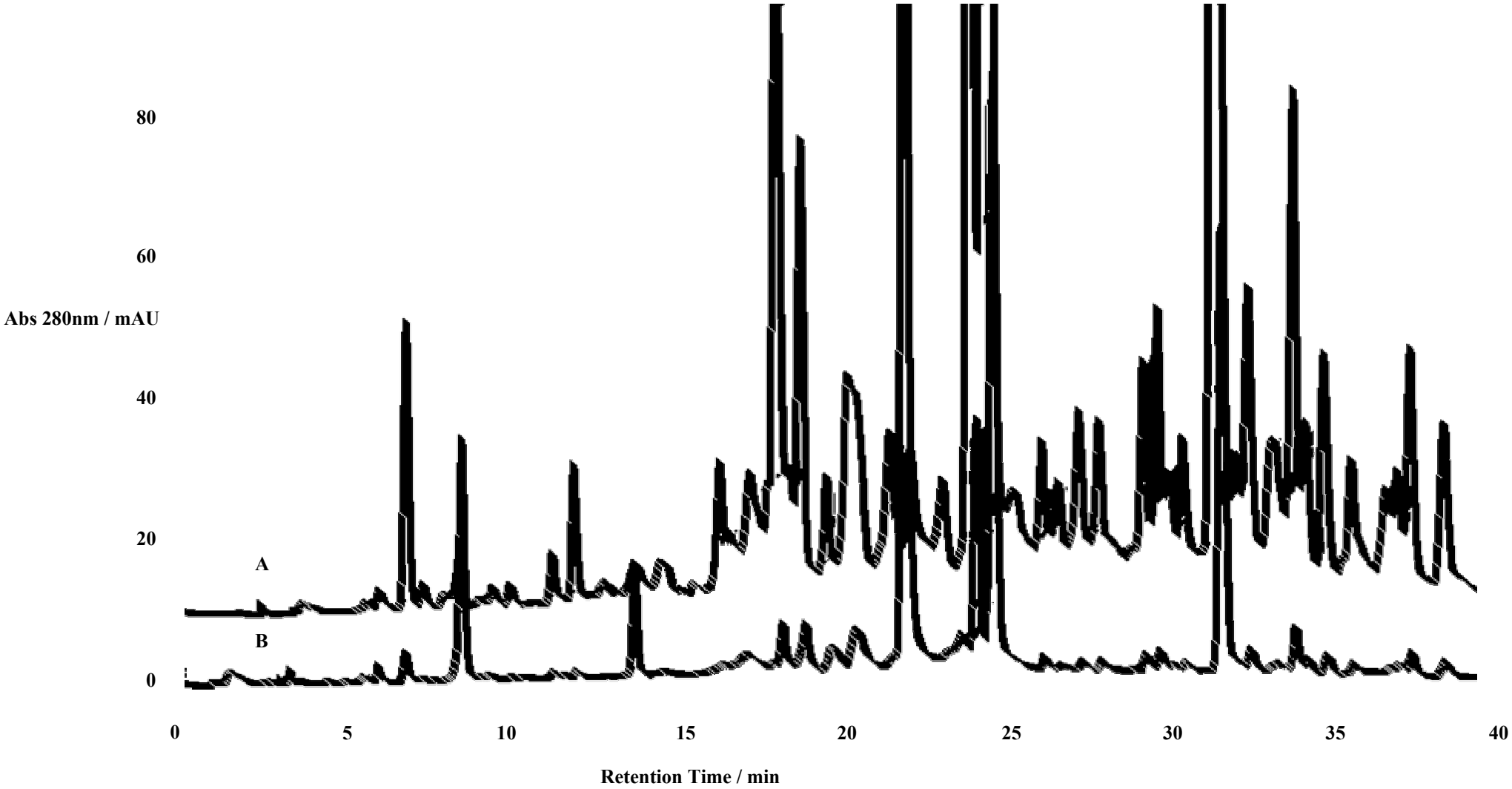


Abbildung 1: Hopfenextrakt mit (unten) und ohne (oben) apolare Vorextraktion unter Verwendung der beschleunigten Lösungsmittel-extraktion

Es zeigte sich, dass sich die mit der ASE mögliche Vorextraktion mit apolaren Lösungsmitteln erfolgreich einsetzen lässt, um den Einfluss von Störsubstanzen weitgehend zu unterdrücken (Abb. 1). Dadurch wird auch die folgende SPE stark erleichtert. Eine Vorextraktion mit Pentan erwies sich hier als optimal, da es durch seinen niedrigen Siedepunkt schnell wieder entfernt werden kann. Hier interessierende Verbindungen werden nicht mit Pentan extrahiert, sodass ein Verlust an Analyten durch die Vorextraktion ausgeschlossen werden kann.

Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion sind die Wahl des Adsorbermaterials und die Zusammensetzung und Volumina der Auftrage-, Wasch- und Elutionsmittel die entscheidenden Einflussfaktoren. Beim Auftrage- und Waschschritt sollen die interessierenden Analyten vollständig adsorbiert werden, bei weitestgehender Entfernung der unerwünschten Probenkomponenten. Bei der Elution hingegen ist eine komplette Desorption der Analyten mit möglichst geringem Lösungsmittelvolumen das Ziel. Dadurch wird sowohl eine Entfernung störender Stoffe als auch eine Konzentrierung der Analyten erreicht.

Das bisher vielfach eingesetzte Polyamid hat als Adsorbens eine hohe Affinität zu phenolischen Stoffen, eine geringe zu üblicherweise auftretenden Störsubstanzen. Es eignet sich daher gut zur Festphasenextraktion der in diesem Forschungsvorhaben interessierenden Stoffgruppen. Oligomere Proanthocyanidine aus mehr als 3 Flavanoleinheiten, denen eine besondere Bedeutung bei der Trubbildung in Bier zugeschrieben wird, werden jedoch unter Verwendung bisher etablierter Methoden irreversibel adsorbiert und sind damit der Analytik nicht vollständig zugänglich.

Es wurde eine große Zahl verschiedener Adsorptionsmaterialien erprobt, um Limitierungen der bisherigen Methode aufzuheben. Neben verschiedenen Polyamidmaterialien wurden spezielle silicabasierte Reversed Phase-Materialien, Styrolharze und Ionentauscher erprobt. Seit einiger Zeit werden speziell auf die Analytik polarer organischer Verbindungen zugeschnittene Materialien angeboten, die ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen wurden.

Ziel war es zunächst, eine für ein breites Spektrum phenolischer Verbindungen geeignete Methodik zu entwickeln. Die beobachteten Selektivitätsunterschiede unterschiedlicher Materialtypen können jedoch auch zur Fraktionierung verschiedener Gruppen phenolischer Verbindungen ausgenutzt werden, um damit eine auch für oligomere Proanthocyanidine besser geeignete Methodik zu etablieren.

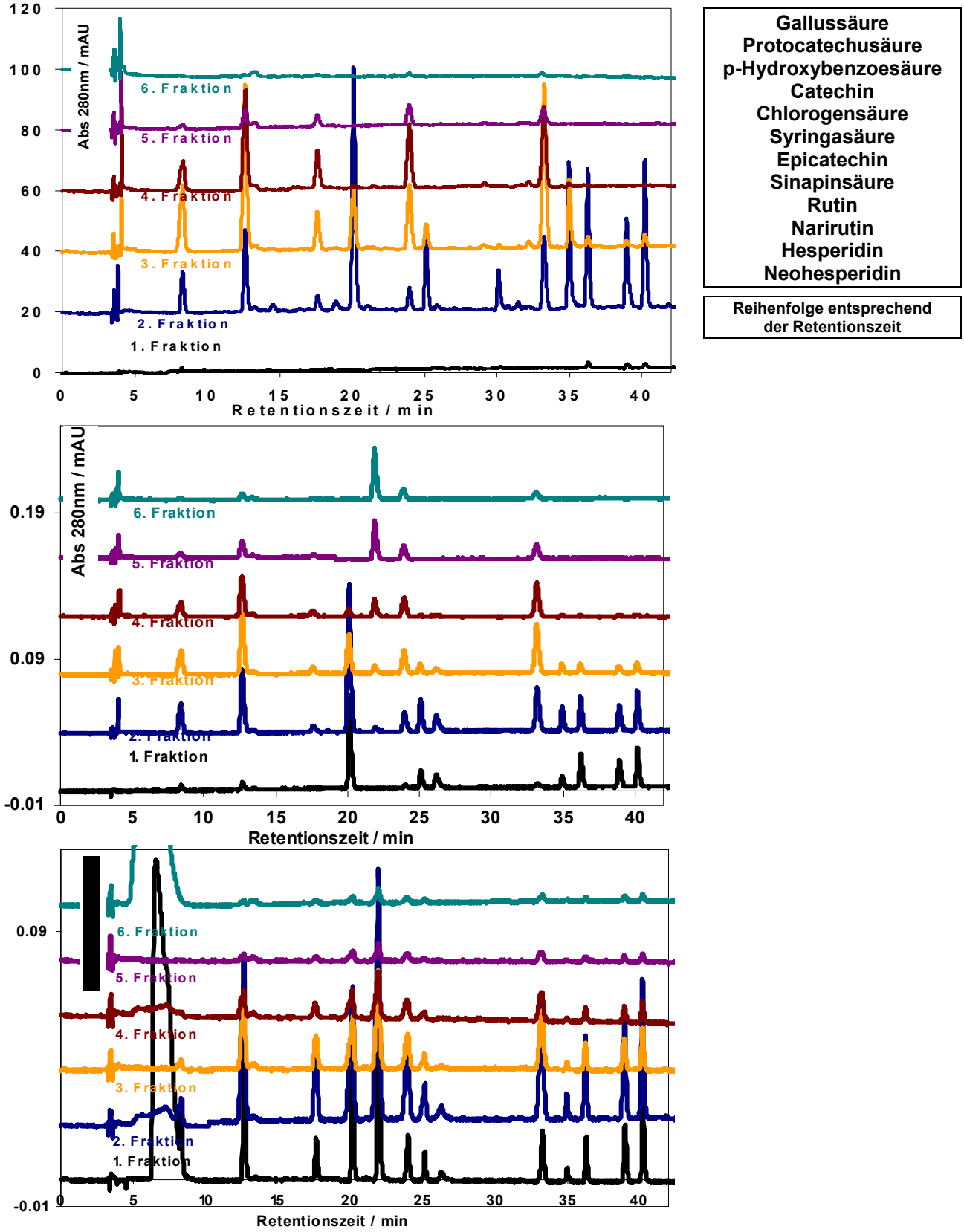


Abbildung 2-4: Fraktionierte Elution des Standardgemisches von unterschiedlichen SPE-Kartuschen (Polyamid (Macherey-Nagel), DPA-6S (Supelco), HRP (Macherey-Nagel), v.o.n.u.)

Die Abbildungen zeigen das Elutionsverhalten ausgewählter Standardsubstanzen aus verschiedenen phenolischen Verbindungsklassen auf den unterschiedlichen Materialien (Abb. 2-4). Das Standardgemisch wurde dabei auf die SPE-Kartuschen aufgetragen und sowohl während des Auftragens der Probe als auch während des Waschschrittes und der Elution fraktioniert aufgefangen. Diese Lösungen wurden danach per HPLC aufgetrennt, sodass aus der Peakfläche bzw. -höhe der einzelnen Substanzen auf das Verhalten der unterschiedlichen Verbindungen auf den Kartuschen geschlossen werden kann. Dargestellt sind die HPLC-Chromatogramme der Elutionsfraktionen ausgewählter Kartuschen. Deutlich zu erkennen sind die Unterschiede in der Selektivität sowie generell in der Retentionskraft der unterschiedlichen Materialien. Diese Unterschiede sind nicht nur zwischen verschiedenen Materialien, sondern auch zwischen entsprechenden Materialien verschiedener Hersteller festzustellen. Aus diesem unterschiedlichen Verhalten können nun Strategien für eine optimierte Festphasenextraktion abgeleitet werden.

Für eine Methodik, die in einer Probe die Gesamtheit der phenolischen Verbindungen (Proanthocyanidine, Phenolcarbonsäuren, Flavonolglykoside) erfasst, hat sich bisher die Verwendung des Polyamid-Materials von Macherey-Nagel als optimal erwiesen. Auf die üblicherweise verwendeten 1g Kartuschen (1g Polyamid in Kunststoffkartuschen mit einem Volumen von 6ml) lassen sich auch 100 mL Bier oder andere flüssige Proben ohne Analytdurchbruch aufbringen. Das Material erlaubt das Auftragen von Probelösungen, in denen sich bis zu 20% organisches Lösungsmittel (Aceton oder DMF) befindet, ohne Analytdurchbruch. Dadurch kann eine Vereinfachung der Probenaufarbeitung erreicht werden, da das zeitaufwändige Entfernen der organischen Lösungsmittel entfallen kann. Außerdem lässt sich durch Waschen der Kartuschen mit Lösungsmittel/H_2O-Gemischen eine verbesserte Abtrennung von Störsubstanzen erreichen.

Die Modifikation und Optimierung der zur Elution verwendeten Lösungsmittel ist von größter Bedeutung für die erfolgreiche Festphasenextraktion. Die Untersuchung verschiedener Aceton/Wasser- und DMF/Wasser-Gemische zeigte, dass die Verwendung einer Mischung von DMF/H_2O 85/15 für eine schnelle Elution in einem kleinstmöglichen Volumen optimal ist. Die Elutionskraft ist wesentlich stärker als die von DMF allein (Abb. 5).

Die Verwendung kommerzieller Polyamid-Kartuschen, eines DMF/H_2O-Gemisches zur Elution und die Anpassung der Parameter der Festphasenextraktion ermöglicht Ergebnisse zu den bisher analytisch schlecht erfassbaren oligomeren Proanthocyanidinen (bis zu Hexameren) (Abb. 6-8). Genaue methodische und analytische Parameter können den als Anlage beigefügten Veröffentlichungen entnommen werden.

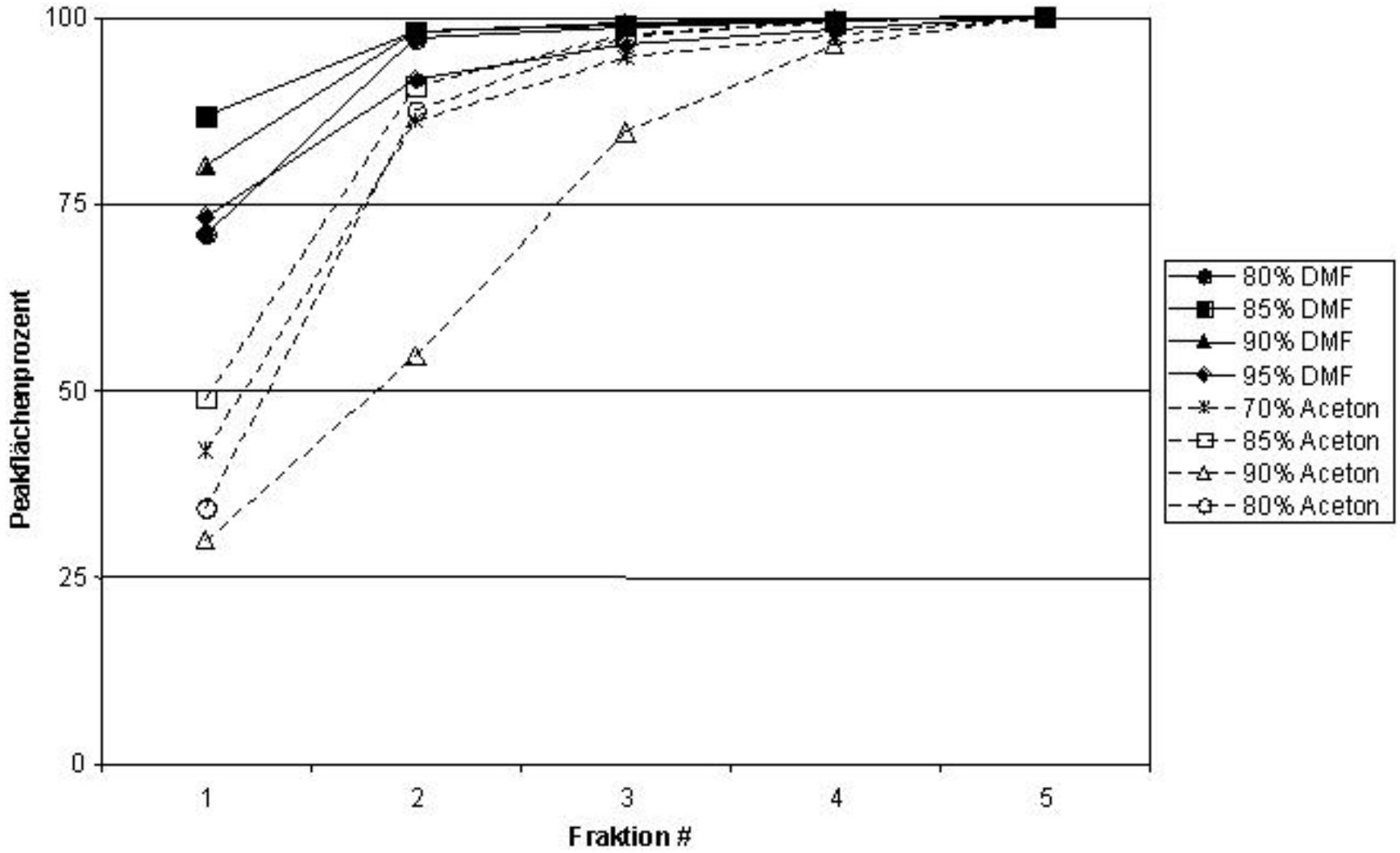


Abb. 5: Fraktionierte Elution von Prodelphindin B3 mit verschiedenen Lösungsmittel- / Wasser-Gemischen

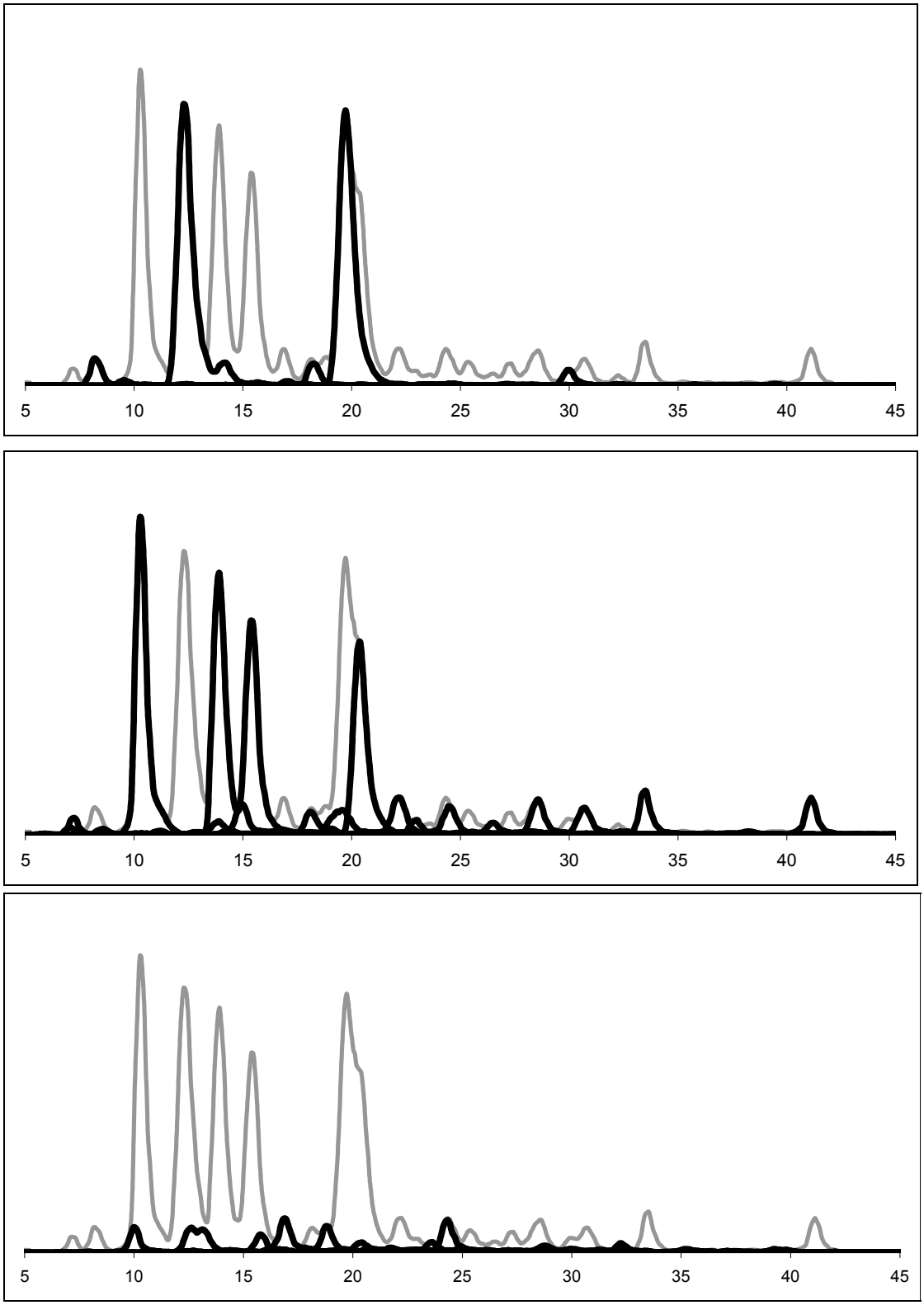


Abbildung 6-8: Di-, tri- und tetramere Proanthocyanidine (v.o.n.u.) einer mit ASE und ASPEC aufgearbeiteten Malzprobe, sowie das Gesamtsignal zum Vergleich (MS-Detektion proanthocyanidinspezifischer Massen und BasePeak).

Insbesondere für die Analyse von flüssigen Brauprozessproben und Bier erweist sich die Technik des ASPEC (automated sample preparation with extraction cartridges; Gilson), die Probe durch die SPE-Kartusche zu drücken statt zu saugen, als großer Vorteil. Unter der Verwendung manueller SPE-Technik treten dabei mitunter Probleme mit dem Ausschäumen und –gasen der Flüssigkeiten, insbesondere bei Brauprozessproben und Bier, auf. Die optimierte Reinigung und Konzentrierung der Proben hat verbesserte Nachweisgrenzen zur Folge, sodass auch dadurch nun weitere Verbindungen analytisch zugänglich werden.

Zur Analytik der Hopfenbittersäuren (Humulone, Lupulone) muss auf ein anderes Adsorptionsmaterial zurückgegriffen werden, da sie auf Polyamid nicht ausreichend adsorbiert werden. In diesem Fall werden RP18-Kartuschen verwendet, die die Bestimmung dieser Verbindungen ermöglichen. Durch das Waschen der SPE-Kartusche mit einer Mischung von Methanol/H_2O 30/70 und anschließende Elution mit Methanol/H_2O 90/10 gelingt gleichzeitig die Abtrennung unerwünschter Störsubstanzen.

Gekoppelte Probenvorbereitung

Ende 2000 konnte in einer Demostellung am Bonner Institut die innovative Kopplung der beschleunigten Lösungsmittelextraktion (ASE) und der automatisierten Fest-phasenextraktion (ASPEC) erprobt werden. Schon erste Ergebnisse machten das Potenzial dieser Methodik deutlich. So konnte am Beispiel der Analyse von Proanthocyanidinen in Malz in einem Zeitraum von etwa 3 Monaten erfolgreich eine Methode entwickelt werden, mit der die früheren Ergebnisse reproduziert werden konnten. Sie bietet aber zusätzlich große Vorteile gegenüber der bisher verwendeten manuellen Methodik.

Ende 2001 konnte durch die finanzielle Unterstützung unter anderem der Wissen-schaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft eine ASE-ASPEC-Kopplung zur automatisierten Probenvorbereitung beschafft werden. Als generelle Vorteile dieser Kopplung, neben der Zeit- und Arbeitsersparnis, stehen die verbesserte Wiederfindung und Reproduzierbarkeit im Vordergrund.

Diese ASE-ASPEC-Einheit lässt sich direkt mit einer HPLC koppeln, so dass der ASPEC hier als Autosampler fungiert. Der Analysengang kann dann nach der Probeneinwaage und dem Füllen der Extraktionszellen bis zur Ausgabe der Chromatogramme vollautomatisch ablaufen. Hierdurch kann die Reproduzierbarkeit der Analysen nochmals verbessert werden.

Stabilität der Analyten

Die Stabilität der untersuchten Verbindungen ist für die gesamte Analytik ein entscheidender Faktor. Es wurde im Rahmen der Untersuchungen festgestellt, dass insbesondere bestimmte Phenolcarbonsäuren und Flavanole (z.B. Catechin, Epicatechin) in ammoniakalischer Lösung, wie sie Bestandteil einiger bestehender Vorschriften zur Probenaufarbeitung ist, einem raschen Abbau unterliegen. Solche Bedingungen müssen demnach vermieden werden, um das polyphenolische

Spektrum unverändert zu erfassen und die Basis für eine aussagekräftige Analytik zu schaffen, um die dem Projekt zugrunde liegenden Fragestellungen beantworten zu können.

Chromatographische Trennung der Polyphenole

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung müssen die interessierenden Substanzen zunächst chromatographisch getrennt werden. Hierzu werden meist HPLC-Säulen, gefüllt mit RP18-Material, verwendet.

Verwendung von Narrow-bore-Säulen

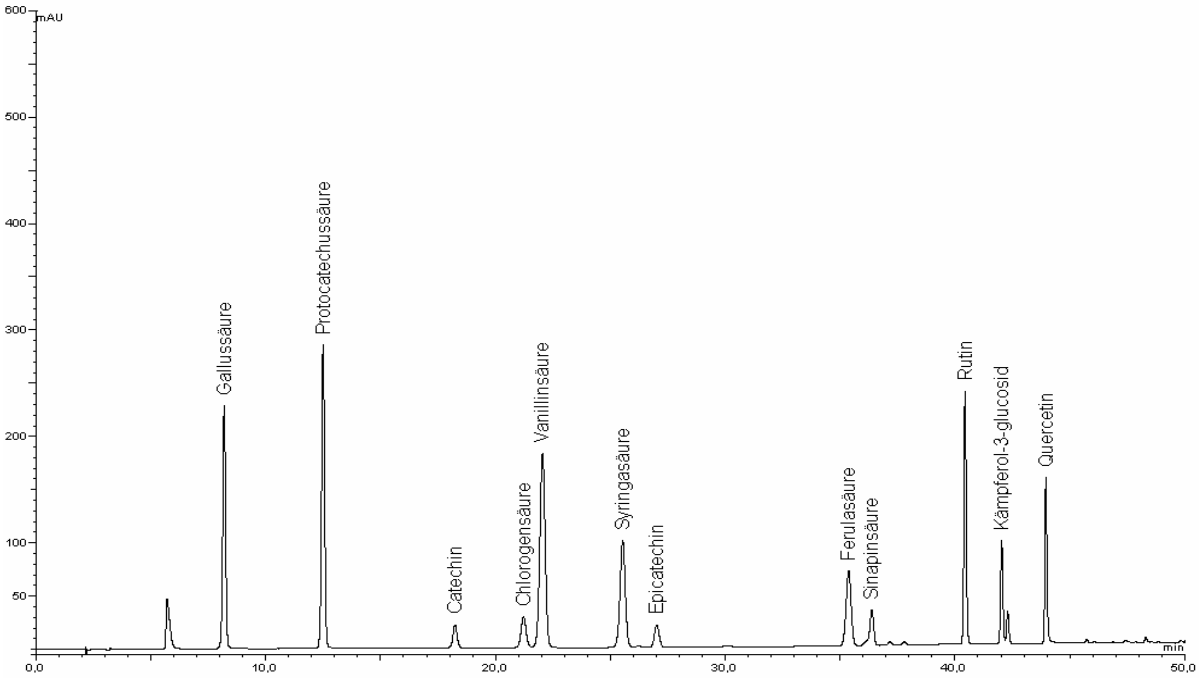
Für die hier dargestellten Untersuchungen erfolgte die Umstellung der bisher in der Forschungsstelle 2 verwendeten HPLC-Methode (RP18-Säule mit 4.6 mm innerem Durchmesser, Fluss 1 ml/min) auf Säulen mit 2 mm i.D.. Gleichzeitig mit dem Säulenvolumen wurde hierbei auch das Volumen der UV-Messzelle verringert. Verwendung findet nun eine Mikro-Kapillar-Messzelle mit einem Volumen von 140 nl anstelle einer Standardmesszelle von 10 µl. Durch diese Umstellung auf sog. narrow-bore-Säulen konnte eine Empfindlichkeitssteigerung am DAD um etwa den Faktor 2.5 erreicht werden (Abbildung 9, 10). Die Kapillar-Messzelle erwies sich allerdings als störanfällig und erfordert eine sehr sorgsame Behandlung.

Durch die Verwendung der narrow-bore-Säulen konnte die Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Detektion ebenfalls erhöht werden, da der bisher benötigte Split des Eluenten vor dem Massenspektrometer durch die geringere Flussrate entfallen kann. Dieser Split wurde im Rahmen der bisherigen Methode benötigt, um den Fluss zu verringern, da die Ionisationsausbeute im Elektrospray-Interface bei kleineren Flussraten erhöht ist. Ohne Split gelangt nun die gesamte Analytmenge in die Ionenquelle des Massenspektrometers.

Ein positiver Nebeneffekt der Umstellung auf narrow-bore-Säulen ist der deutlich geringere Verbrauch an organischen Lösungsmitteln.

Vergleich von Phasenmaterialien

Auf herkömmlichem RP18-Material werden einige Phenolcarbonsäuren, insbesondere Gallus- und Protocatechusäure, nur schwach reteniert. Daher wurden verschiedene neu entwickelte Phasenmaterialien unterschiedlicher Hersteller (Tab. 1) miteinander verglichen, um eine optimale chromatographische Trennung der Polyphenole zu erreichen. Diese Phasenmaterialien werden speziell zur Analyse polarer Verbindungen angeboten und können auch unter rein wässrigen Bedingungen verwendet werden. Die Säulen wurden unter identischen chromatographischen Bedingungen und mit denselben Proben (Standard-Lösungen [Gemisch aus Flavan-3-olen, Phenolcarbonsäuren, Flavonolglykosiden], ASE-Extrakt von Hopfenpellets, SPE-Eluat von Flaschenbier) untersucht.



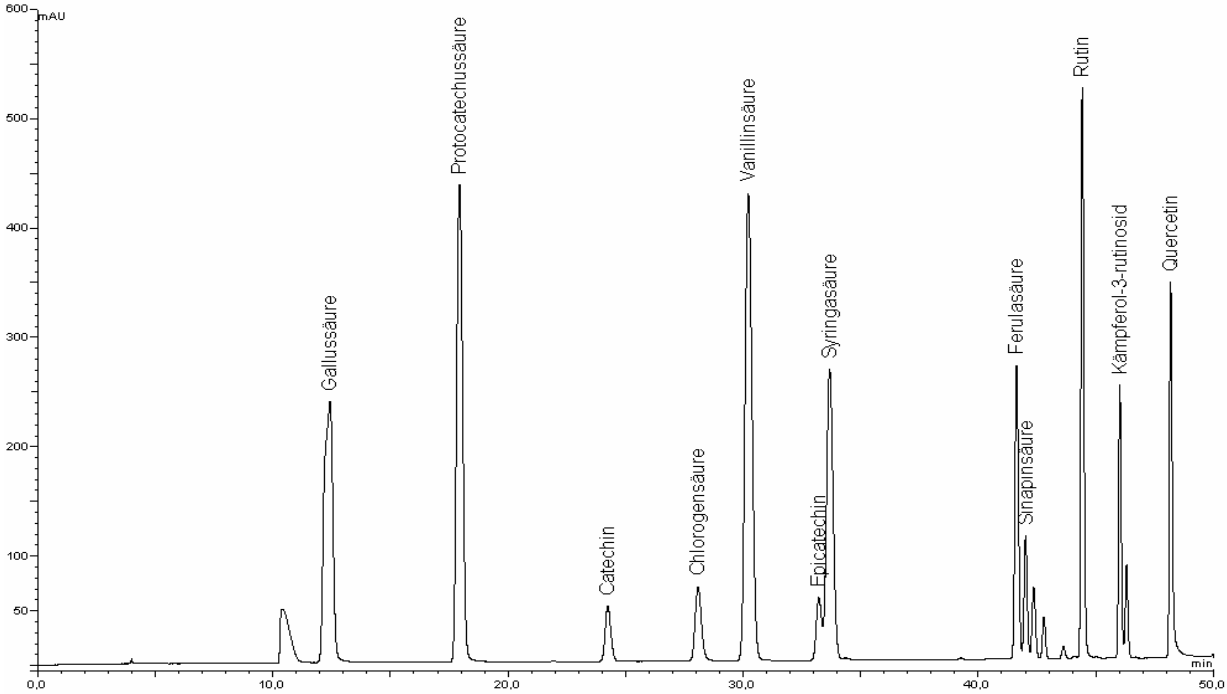


Abbildung 9, 10: UV-Chromatogramm einer Standard-Lösung auf Aqua, 4.6 mm i.D. und 2 mm i.D.; v.o.n.u.

Phasenmaterial	Dimension	Besonderheit
Thermo Hypersil		
HyPURITY Advance	5µ, 250x2.1 mm	RP18 mit hydrophilem Endcapping und eingebetteter polarer Gruppe
Fluophase PFP	5µ, 250x2.0 mm	Pentafluorphenyl-Phase
Aquasil C18	5µ, 250x2.0 mm	RP18 mit hydrophilem Endcapping, optimiert für wässrige Bedingungen
Phenomenex		
Aqua	5µ, 250x2.0 mm	RP18 mit hydrophilem Endcapping, optimiert für wässrige Bedingungen
Synergi Polar RP	4µ, 250x2.0 mm	etherverlinkte Phenyl-Phase, optimiert für polare Analyten
Supelco		
Discovery PEG	3µ, 150x2.0 mm	Polyethylenglykol, optimiert für polare Analyten

Tabelle 1: untersuchte Phasenmaterialien

Drei der untersuchten Phasenmaterialien zeigten unter den von uns gewählten Bedingungen verstärktes Tailing bzw. Fronting und erschienen daher für die LCMS-Analytik der Polyphenole in Bier und Braurohstoffen wenig geeignet.

Aquasil, Aqua und Synergi Polar RP zeigen sehr ähnliche Peakform und ähnliche Selektivität. Die beste Trennung der Polyphenole unter den untersuchten Bedingungen wurde mit Aqua erreicht (Abb. 11, 12). Dieses Phasenmaterial zeigte im Vergleich zu herkömmlichem RP18-Material eine leicht veränderte Selektivität, insbesondere bei den Flavonol-Glykosiden.

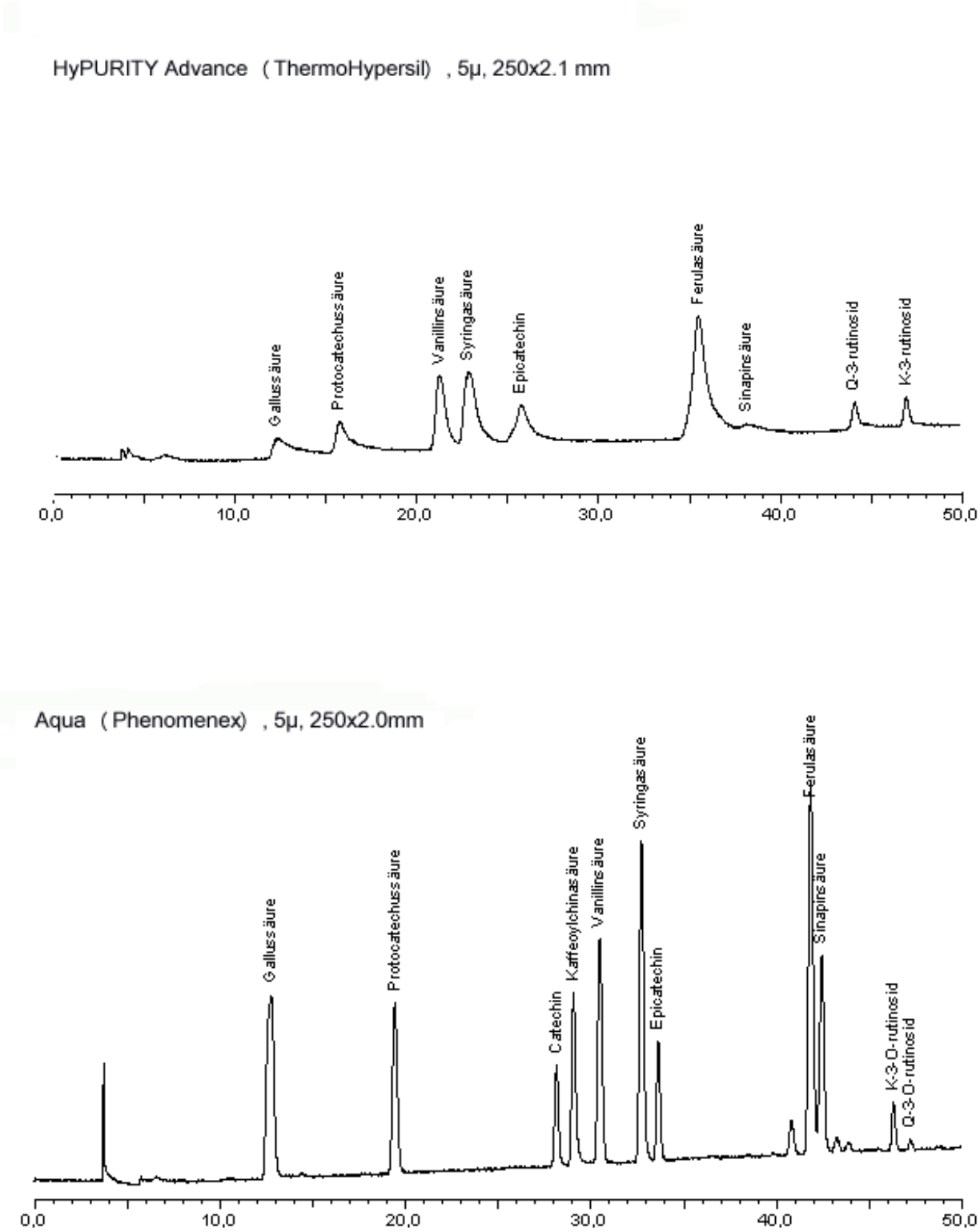


Abbildung 11, 12: Vergleich zweier Phasenmaterialien zur Polyphenolanalytik; v.o.n.u.: HyPURITY Advance (wenig geeignet), Aqua (gut geeignet)

Optimierung der Trennbedingungen

In Bier und Braurohstoffen ist eine Vielzahl phenolischer Verbindungen nachzuweisen, hauptsächlich aus der Gruppe der Proanthocyanidine (monomere und oligomere Flavan-3-ole), der Phenolcarbonsäuren (Hydroxybenzoe- und -zimtsäuren, sowie deren Ester) und der Flavonolglykoside. Ziel der weiteren HPLC-Methodenoptimierung war es, eine möglichst große Anzahl dieser phenolischen Bierinhaltsstoffe in einem möglichst kurzen Zeitraum chromatographisch voneinander zu trennen.

Die Wahl der zu verwendenden Fließmittel wird eingeschränkt durch die Kopplung der HPLC mit dem Massenspektrometer. Hierbei sollte auf nichtflüchtige Puffer verzichtet werden, da es ansonsten durch Auskristallisation zu Verschmutzungen und Verschleppungen innerhalb der Ionenquelle und des Massenspektrometers kommen kann.

Durch die Verwendung einer geringeren Partikelgröße des HPLC-Phasenmaterials (3µ anstatt 5µ) werden zum Erreichen gleicher Trennleistung kürzere Trennsäulen benötigt. Die hierdurch erreichte verkürzte Chromatogrammlaufzeit ermöglicht einen erhöhten Probendurchsatz.

In umfangreichen Untersuchungen wurde der Einfluss der Zusammensetzung des organischen Fließmittels, des Flusses, der Temperatur und des Gradientenverlaufs auf die Trennung der Polyphenole betrachtet. Endpunkt dieser Optimierungen ist eine LC-MS-Methode, die die Trennung der interessierenden Inhaltsstoffe (ca. 50 Verbindungen) innerhalb von 80 Minuten erreicht.

Detektion und Identifizierung

Außer den Phenolcarbonsäuren sind nur sehr wenige der phenolischen Bierinhaltsstoffe als käufliche Standards erhältlich, oftmals auch nur in ungenügender Reinheit. Daher muss zu ihrer Identifizierung auf Analysenmethoden zur Strukturaufklärung zurückgegriffen werden. Hierfür steht ein Massenspektrometer mit Ionenfalle (IonTrap) zur Verfügung (LCQ, ThermoFinnigan), das innerhalb eines Analysenlaufs mehrstufige Fragmentierungsexperimente bis maximal MS^{10} ermöglicht. Zur Ionisierung wird das besonders schonende Elektrospray-Interface verwendet, mit dem zunächst Quasi-Molekularionen entstehen, die anschließend in der Ionenfalle fragmentiert werden können. Man erhält zusätzlich zu den Informationen über das Molekulargewicht für jede Verbindung spezifische Fragmente und innerhalb der einzelnen Verbindungsklassen charakteristische Fragmentierungsreaktionen. Über die bei der Fragmentierung entstandenen Bruchstücke kann auf die Struktur des Moleküls rückgeschlossen werden. So kann die Sequenz der Monomerenbausteine in Proanthocyanidinen bestimmt werden (Friedrich, 2000) oder die Art der gebundenen Zucker in Glykosiden (Roeder, 1997).

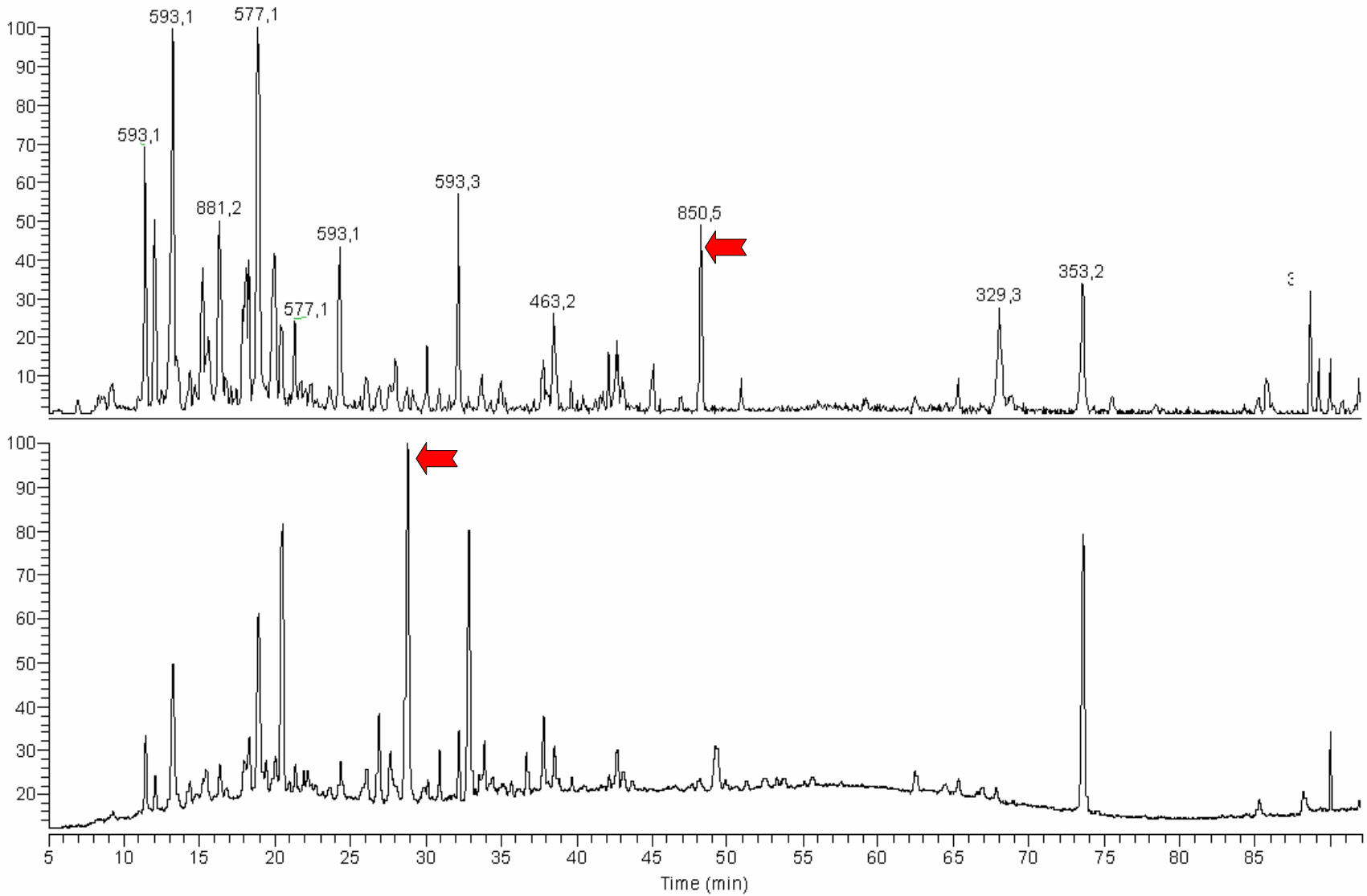


Abbildung 13: Vergleich von MS- und UV-Detektion (MS-Signal: Base Peak-Darstellung mit Angabe des Masse-/Ladungs-Verhältnisses, UV-Signal bei 280 nm; v.o.n.u.)

Qualitative und quantitative Aussagen über das Polyphenol-Spektrum von Bier und Braurohstoffen können nur durch das Zusammenspiel von UV- und massenspektrometrischer Detektion gemacht werden. Einige Substanzen, die ein deutliches UV-Signal erzeugen, sind im Massenspektrometer nicht zu detektieren. Ebenso gibt es Verbindungen, die ein deutliches MS-Signal ergeben, ohne im UV-Bereich zu absorbieren (Abbildung 13, Beispiele markiert).

In Hopfenproben, die mit Hilfe der ASE gewonnen wurden, konnten verschiedene Quercetin- und Kämpferol-Glykoside massenspektrometrisch identifiziert werden. Anhand der UV-Spektren allein lassen sich die Substanzen jedoch nicht unterscheiden, es ist nur eine Differenzierung zwischen Kämpferol- und Quercetin-Derivaten möglich (Abb. 14).

Erst mit Hilfe des Massenspektrometers und der erhaltenen spezifischen Zerfallsreaktionen in der Ionenfalle kann die Struktur der Analyten hergeleitet werden. Die Identität der Aglykone wird abgesichert und es können Aussagen über die Art des gebundenen Zuckers getroffen werden (Abb. 15).

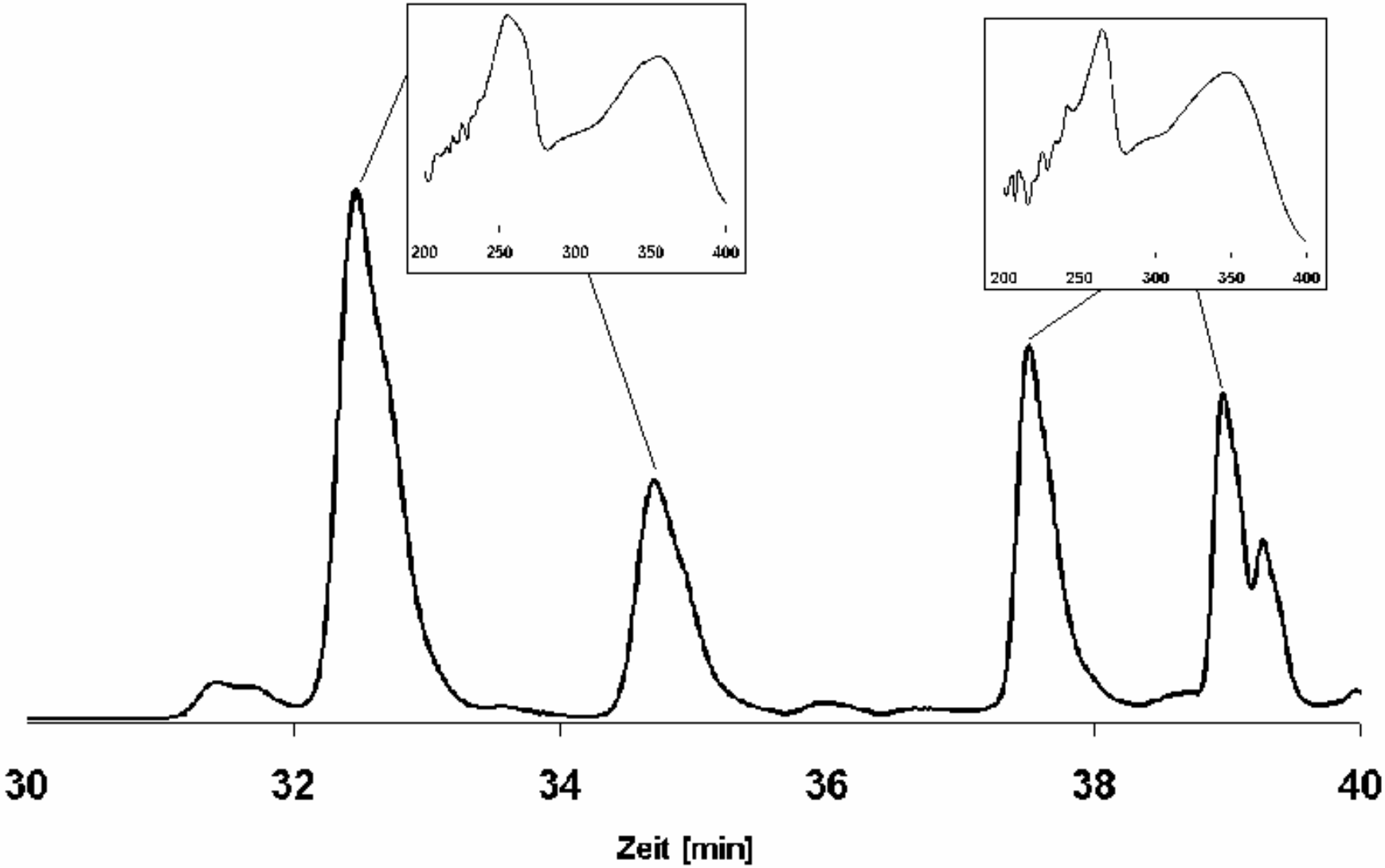


Abbildung 14: UV-Spektren der Quercetin- und Kämpferol-Derivate

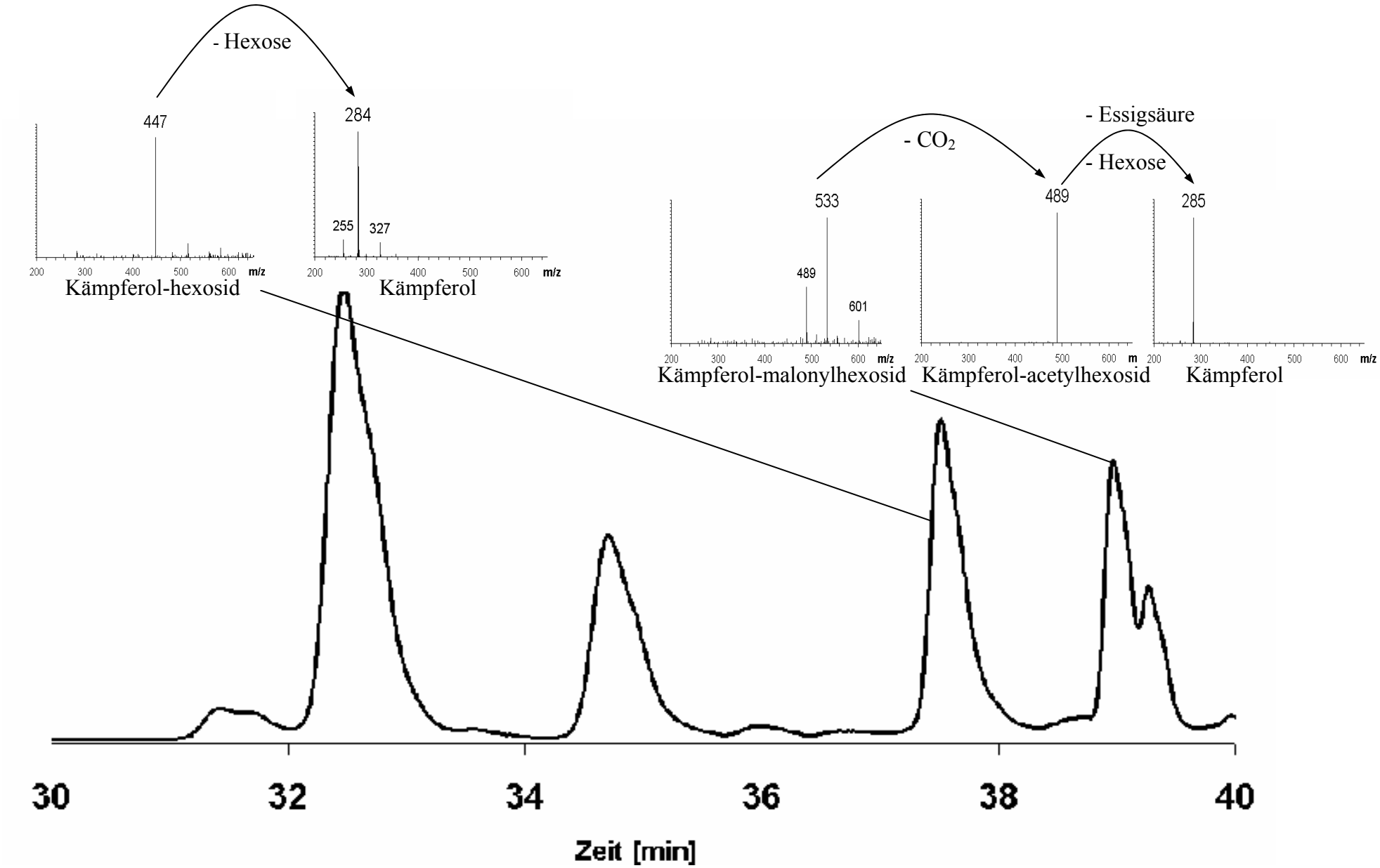


Abbildung 15: MS-Spektrum eines Kämpferol-hexosids und Kämpferol-malonyl-hexosids

Gefriertrocknung (Probenaustausch, Lagerung)

Zum Austausch von Probenmaterial zwischen den beiden weit voneinander entfernten Forschungsstellen und zur Aufbewahrung von Proben wurden Untersuchungen zur Eignung der Gefriertrocknung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein sehr schonendes Verfahren, das sich auch aus Platz- und Gewichtsgründen zum Probenaustausch anbietet.

In diesen Versuchen konnten bei einigen Verbindungen Unterschiede zwischen dem flüssigen und dem gefriergetrockneten Bier festgestellt werden. Signifikante Unterschiede zeigten sich allerdings nur bei Probenmaterial, das nach der Gefriertrocknung längere Zeit bei Raumtemperatur gelagert wurde. Bei einer kurzen Lagerzeit bei Raumtemperatur zeigte sich gute Übereinstimmung zwischen dem ursprünglichen und dem gefriergetrockneten Bier (Abb.16).

Diese Möglichkeit des Probenaustauschs gefriergetrockneter Biere wurde nicht weiter verfolgt, da sie sich aufgrund des zeitlichen Aufwandes als unpraktikabel erwiesen hat. Der Austausch erfolgte stattdessen in geschlossenen Flaschen, die vor und nach dem Versand bei 4°C gelagert und schnellstmöglich der Probenvorbereitung unterzogen und anschließend analysiert wurden.

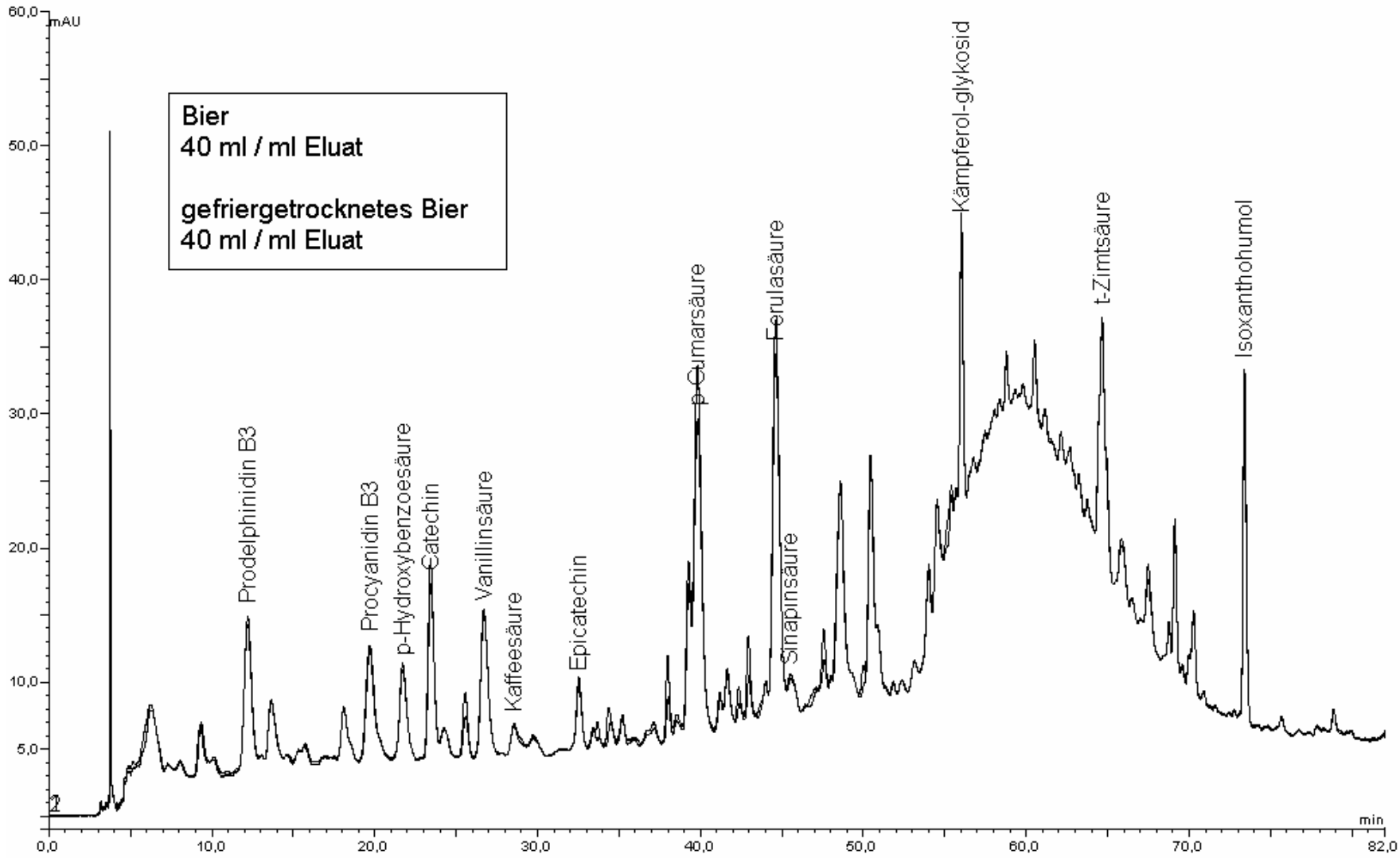


Abbildung 16: Übereinander liegende Chromatogramme einer Bierprobe vor und nach Gefriertrocknung

Methoden zur Untersuchung antioxidativer Eigenschaften

Entwicklung des antiradikalischen Potenzials (ARP)

Um die antioxidative Aktivität der phenolischen Substanzen beurteilen zu können, war es nötig, eine entsprechende Analytik zu verwenden. Die Messung der endogenen antioxidativen Aktivität (Lag-Time) wird deutlich vom Gehalt an freiem Schwefeldioxid in der Probe beeinflusst (siehe auch Kapitel Lag-Time). Es wurde versucht, die Scavenging-Effekte von Polyphenolen auch mit der Spintrap-Methode am Elektronenspinresonanz-Spektrometer (ESR) zu messen. Dies führte selbst bei Konzentrationen von 100 mg/l zu keinen signifikanten Unterschieden. Eine Erklärung ist, dass das Spintrap-Reagenz selbst deutlich schneller mit Radikalen reagiert als die phenolischen Substanzen.

Um trotzdem eine Aussage über die antiradikalische Aktivität treffen zu können, wurde auf die Methode von Brand-Williams (1995) zurückgegriffen, die die Reduktion des freien stabilen Radikals DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) spektralphotometrisch verfolgt. Kaneda (1995) hat diese Methode auf Bier angewandt. Allerdings zeigte sich, dass die spektralphotometrische Methode relativ ungenau und in dunklem Bier nicht anwendbar ist. Kaneda berücksichtigt zudem nur die Abnahme der Extinktion über 10 Minuten, allerdings nicht den Verlauf des Graphen. Aus diesem Grund wurde versucht, diese Methode auf ein ESR zu übertragen.

Als stabiles freies Radikal kann das DPPH direkt mittels ESR gemessen werden, ohne dass sekundäre Effekte einen Einfluss haben. Die DPPH-Lösung wird nach Kaneda (1995) auf eine Konzentration von $1{,}86 \times 10^{-4}$ mol/L eingestellt. Dies hat sich auch am ESR-Gerät als sinnvoll erwiesen. Der pH-Wert der Lösung wird auf 4,3 eingestellt.

Die Parameter für die DPPH-Messung mit dem JES-FR30 von JEOL (Japan) sind: Power: 4 mW, C.Field: 339 mT, SwWid: 5 mT, SwTime: 0.5 min, ModWid: 0.1 mT, Amp: 79, TimeC: 0.03 s.

Die Parameter für die DPPH-Messung mit dem escan von BRUKER (Deutschland) sind: Power: 2.51 mW, C.Field: 349 mT, SwWid: 2 mT, SwTime: 2.62 s, ModWid: 0.226 mT, Amp: 224, TimeC: 10.24 ms.

Das Mischungsverhältnis zwischen der DPPH-Lösung und dem Bier ist 2,8 ml zu 0,2 ml. Dieses Verhältnis hat sich als geeignet erwiesen. Ansonsten verläuft die Reaktion je nachdem zu langsam bzw. deutlich zu schnell.

Die ursprüngliche Messmethode wird mittels IC_{50} ausgewertet, d.h. es wird eine Verdünnungsreihe angelegt und die Konzentration über die reduzierte Menge an DPPH aufgetragen. Gesucht wird die Konzentration, die 50 % des Radikals reduziert.

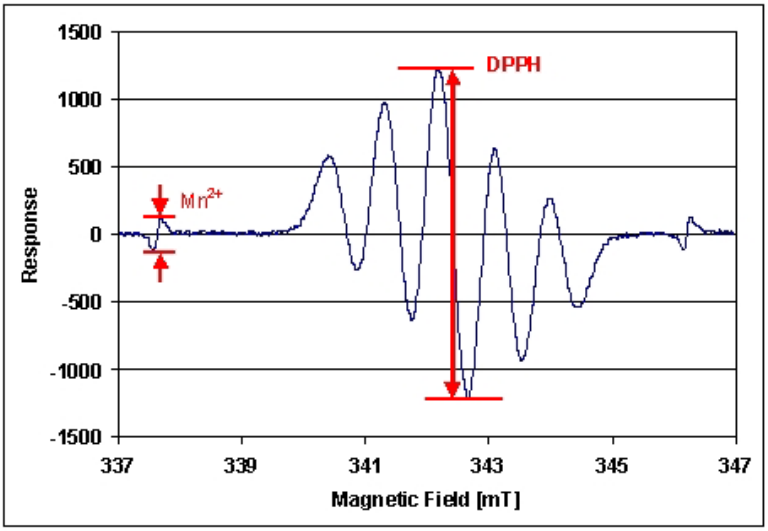


Abbildung 17: Spektrum von DPPH am ESR

Da das Anlegen einer Verdünnungsreihe aufwendig ist, wurde ein neues Verfahren gewählt. Hierzu wird neben der reduzierten Menge an DPPH auch der Verlauf des Graphen berücksichtigt, indem die Fläche unterhalb des Graphen ausgewertet wird. Je kleiner diese Fläche ist, um so besser ist das antiradikalische Potenzial.

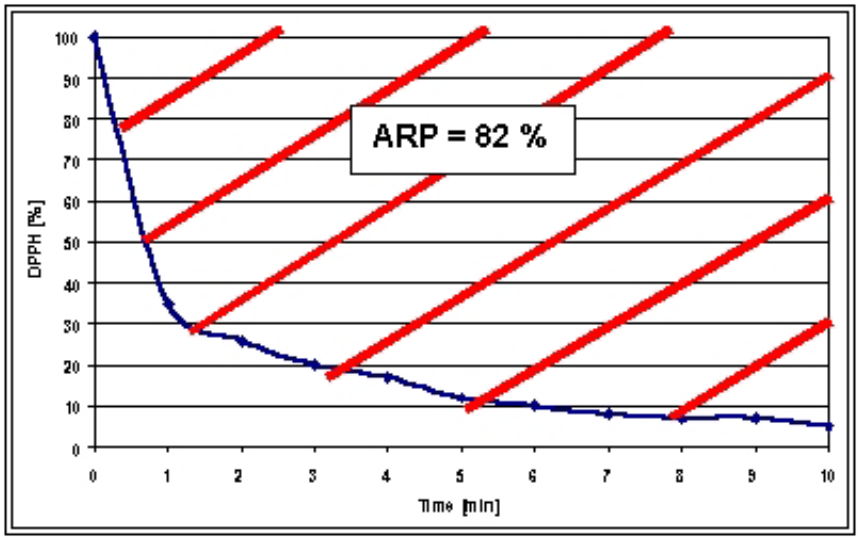


Abbildung 18: Auswertung des antiradikalischen Potenzials

Für eine prozentuale Auswertung wird die Fläche unterhalb des Graphen herangezogen. Die Darstellung des Graphen erfolgt in Prozent. So ist die theoretisch maximale Fläche 1000. Die Differenz beider Flächen, bezogen auf die maximale Fläche, entspricht dem Potenzial.

Zur Berechnung der Probe wird zum Beispiel folgendermaßen vorgegangen:

Fläche unterhalb des Graphen: 180

Differenz zur maximalen Fläche: 1000 – 180 = 820

Antiradikalisches Potenzial (%) = 820 *100 % /1000 = 82 %

Das antiradikalische Potenzial ist in erster Linie vom Gehalt an phenolischen Substanzen abhängig, jedoch nicht von Schwefeldioxid.

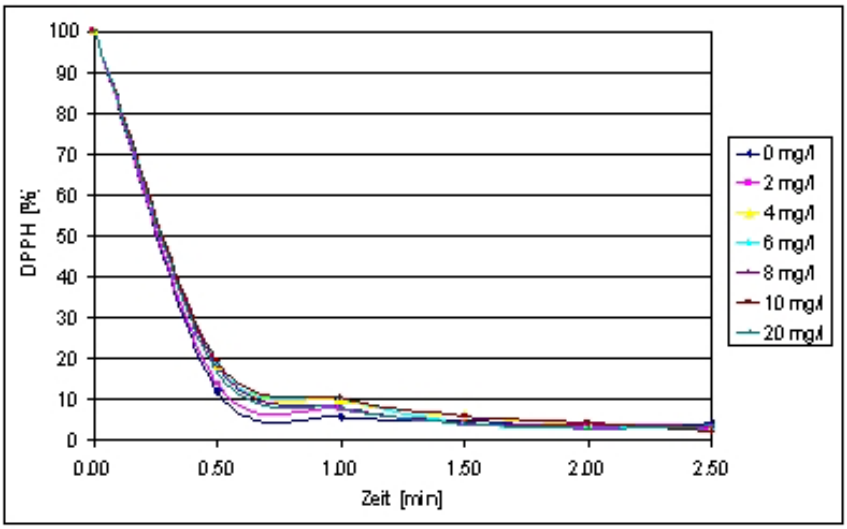


Abbildung 19 : ARP von Bier mit Zudosage von Bisulfit

Die Methode ist nicht nur auf Bier anwendbar, mittels eines anderen Mischungsverhältnisses ist es auch möglich, einzelne phenolische Substanzen in ihrem antiradikalischen Potenzial zu unterscheiden. Hierzu hat es sich als positiv erwiesen, die Lösungen mit den phenolischen Substanzen in der gleichen Konzentration wie die DPPH-Lösung (1,84 x 10^{-4} Mol/L) anzusetzen. Es werden dann gleiche Volumenanteile der Lösungen vermischt. Es zeigen sich deutliche Unterschiede in der Aktivität zwischen den Substanzen, wodurch es möglich ist, diese in ihrem Potenzial zu klassifizieren.

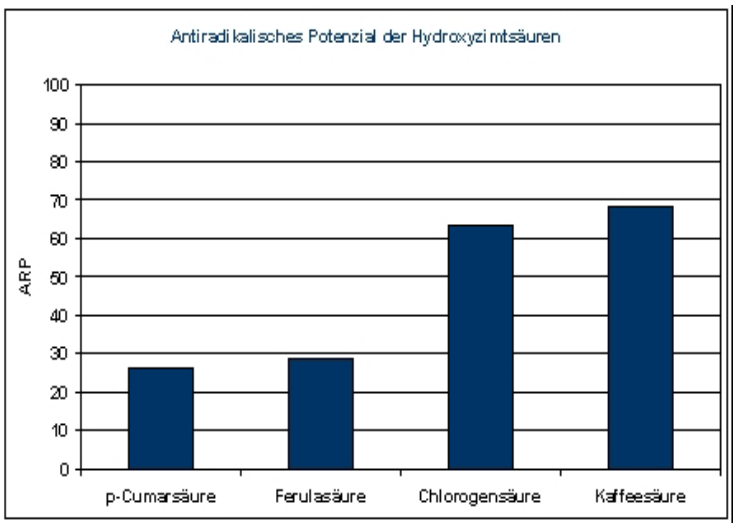


Abbildung 20: Antiradikalisches Potenzial von Hydroxyzimtsäuren

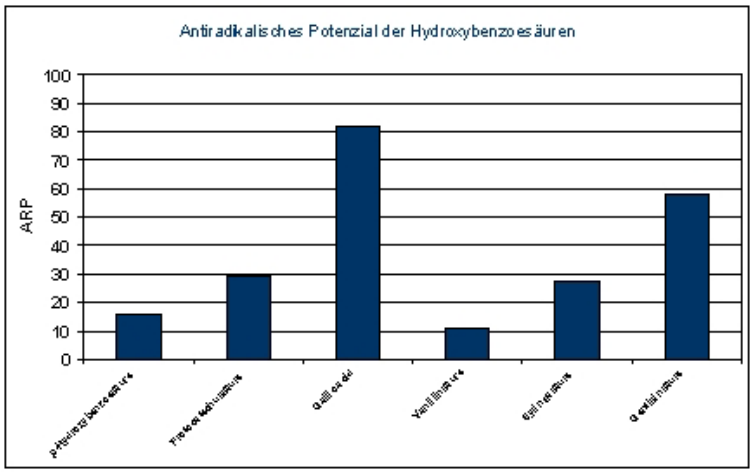


Abbildung 21: Antiradikalisches Potenzial von Hydroxybenzoesäuren

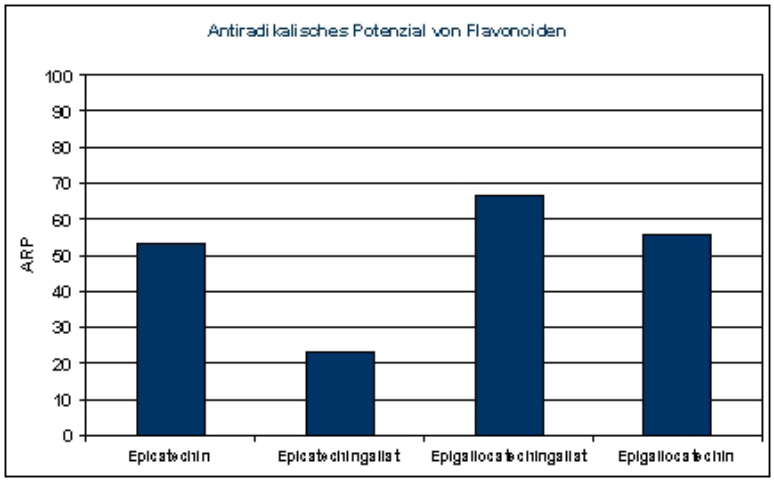


Abbildung 22: Antiradikalisches Potenzial von Flavonoiden

	Name	ARP [%]
1	Sinapinsäure	94
2	Gallussäure	82
3	Kaffeesäure	68
4	Epigallocatechingallat	67
5	Chlorogensäure	63
6	Gentisinsäure	58
7	Epigallocatechin	56
8	Epicatechin	53
9	Xanthohumol	52
10	Isoxanthohumol	47
11	Protocatechussäure	29
12	Ferulasäure	29
13	Syringasäure	28
14	p-Cumarsäure	26
15	Epicatechingallat	23
16	p-Hydroxybenzoesäure	16
17	Vanillinsäure	11
18	Genistein	5

Tabelle 2: Klassifizierung einzelner phenolischer Substanzen aufgrund ihres antiradikalischen Potenzials

Die Reihenfolge ist sehr gut mit den Ergebnissen aus der Literatur vergleichbar. Es ist überraschend, dass nicht die Flavanoide zu den reaktivsten Substanzen zählen, sondern die Phenolcarbonsäuren, die schon im Malz vorhanden sind, was für den Brauprozess besonders wichtig ist. So ist nicht nur die Dosage und Qualität des Hopfens von Bedeutung, sondern auch das Spektrum an phenolischen Substanzen im Malz. Es zeigt sich, dass die Polyphenole gerade beim Maischen einen positiven Einfluss haben können.

Beurteilung des antiradikalischen Potenzials in Bier

Die phenolischen Substanzen werden über die Rohstoffe Gerste, Weizen und Hopfen dem Brauprozess zugeführt. So dient diese Messung zur Beurteilung aller Biersorten. Es muß allerdings darauf geachtet werden, dass Weizenmalz einen geringeren Gehalt an phenolischen Substanzen enthält als Gerstenmalz. Auch wird zum Beispiel Weizenbier geringer gehopft und enthält schließlich in der abgefüllten Flasche weniger Polyphenole als ein vergleichbares untergäriges Pilsener. So sind die Ergebnisse der Weizenbiere etwas schlechter.

Alkoholfreie Biere können ebenfalls, unabhängig davon, ob sie mittels gestoppter Gärung hergestellt wurden oder der Alkohol nachträglich entzogen wurde, bewertet werden.

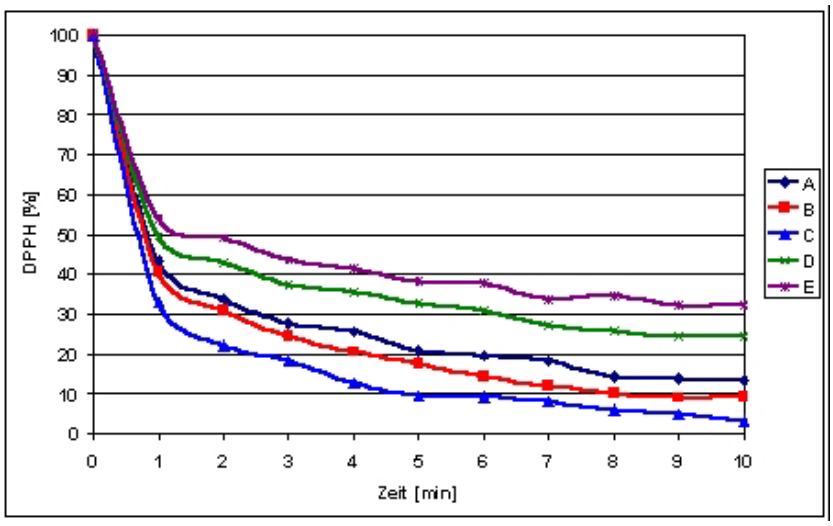


Abbildung 23: Das antiradikalische Potenzial verschiedener. A: 73 %, B: 78 %, C: 84 %, D: 64 %, E: 58 %

Ermittlung der Lag-Time

Zur Ermittlung der Lag-Time wird die Methode nach Uchida et al. (1996) angewendet. Die Lag-Time wird mit Hilfe des Elektronenspinresonanz-Spektrometer (ESR) bestimmt.

Die zu untersuchende Probe wird bei 60 °C einem oxidativen Forciertest unterzogen. Dabei entstehen aus dem Sauerstoff aktive Formen, wie das Superoxidradikalanion. Die Reaktion geht weiter über das Wasserstoffperoxid und die Fenton-Reaktion bis zum Hydroxylradikal. Dieses Radikal reagiert sehr schnell unspezifisch weiter. Dadurch kann es nur schwer direkt gemessen werden. Um dies zu ermöglichen, wird der Probe ein Spin-Trap Reagenz zugegeben. An der Forschungsstelle I wird mit N-tert-butyl-α-phenyl-nitron (PBN) gearbeitet. Dieses reagiert mit den entstehenden Radikalen und bildet ein stabiles Spinaddukt, das mittels ESR gemessen werden kann. Das Hydroxylradikal reagiert zuerst noch mit Ethanol zum 1-Hydroxy-ethyl-radikal, welches letztendlich erfasst wird, was anhand der aufgenommenen Spektren erkennbar ist.

Die Einstellungen für die Spintrap-Messung am JES-FR30, JEOL (Japan) sind: Power: 4 mW, C.Field: 339 mT, SwWid: 5 mT, SwTime: 4 min, ModWid: 0.1 mT, Amp: 200, TimeC: 1 s.

Die Einstellungen für die Spintrap-Messung am escan von BRUKER (Deutschland) sind: Power: 1.99 mW, C.Field: 349 mT, SwWid: 2 mT, SwTime: 2.62 s, ModWid: 0.25 mT, Amp: 224, TimeC: 10.24 ms.

Abbildung 24: Spektrum von PBN am ESR

Bierinhaltsstoffe vermögen die Entstehung dieser Radikale zu unterbinden oder fangen diese direkt ab. So kann der Verlauf der Radikalentstehung zu Beginn flach sein und erst nach einer spezifischen Zeit kommt es zu einem Anstieg in der Radikalbildung. Mittels zweier Regressionsgeraden kann der Knickpunkt berechnet und als die Lag-Time dargestellt werden.

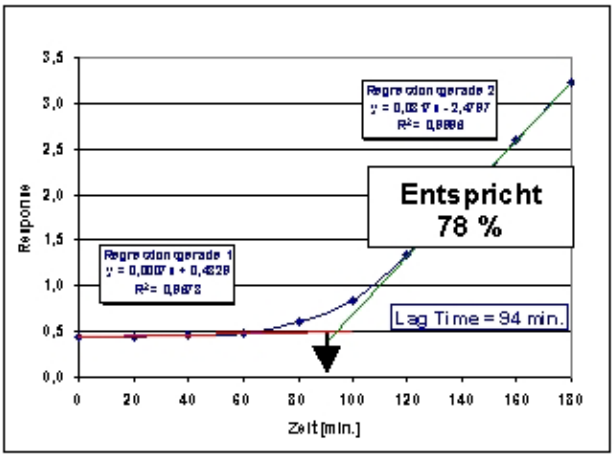


Abbildung 25: Ermittlung der Lag-Time

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass ein klarer Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Schwefeldioxid und der Lag-Time besteht. Das Schwefeldioxid wird natürlich von der Hefe während der Hauptgärung gebildet. Es kann somit im Sudhaus bzw. in der Würze noch keine Lag-Time ermittelt werden. Der maximal zulässige Wert in Bier ist in Deutschland 10 mg/l. Für eine einheitliche prozentuale Auswertung wird folgendermaßen vorgegangen. Als maximale Lag-Time, die 100 % entspricht, wurden 120 Minuten festgelegt. Dies geht aus einer statistischen Auswertung der Messungen der vorangegangenen Jahre hervor.

Dies ergibt zum Beispiel für eine gemessene Lag-Time von 94 Minuten:

Lag-Time (%) = 94 min *100 % / 120 min = 78 %

Das antiradikalische Verhalten (ARV)

Bei der Messung der Lag-Time wurde bisher nur der Bereich berücksichtigt, bis der Graph zu einem bestimmten Zeitpunkt ansteigt. Da es Biere gibt, die keine Lag-Time besitzen, wie zum Beispiel obergärige Biere, wurde eine zweite Auswertung in Betracht gezogen.

Der Anstieg des Graphen nach der Lag-Time, oder sogar schon vom Startzeitpunkt der Messung an, gibt Aufschluss darüber, wieviel Radikale pro Zeit entstehen. Somit kann aus dieser Steigung ein antiradikalisches Verhalten bzw. eine antiradikalische Aktivität abgeleitet werden. Da sich die Auswertung der Steigung des Graphen als schwierig erweist, wird die Fläche unterhalb des Graphen als Messparameter herangezogen. Diese wird durch Integration des Graphen bis 120 Minuten ermittelt. Hiermit wird zugleich die Menge an entstandenen Radikalen, aber auch die Entstehungskinetik berücksichtigt. Je kleiner diese Fläche ist, umso weniger Radikale sind entstanden. Um eine gleichmäßige Auswertung zu gewährleisten, wird die Fläche unterhalb des Graphen auf eine Referenzgröße bezogen. Diese entspricht der maximal möglichen Fläche, die ein schlechtes ARV darstellt. Diese sogenannte Null-Probe wurde empirisch ermittelt. Die Differenz dieser beiden Flächen entspricht der eigentlichen Reaktivität. Für eine prozentuale Auswertung wird diese errechnete Differenz auf die maximal mögliche Fläche bezogen. Die Ermittlung dieser Flächen ist gerätespezifisch und somit nicht einfach auf andere Laboratorien übertragbar, da die Messung der absoluten Mengen an Radikalen von der Empfindlichkeit des Gerätes abhängt. Um die Vergleichbarkeit zu ermöglichen, kann der gemessene Wert am Gerät auf einen stabilen Standard umgerechnet werden. Hierzu dient zum Beispiel das stabile Radikal 4-Hydroxy-Tempol, das käuflich erwerblich ist.

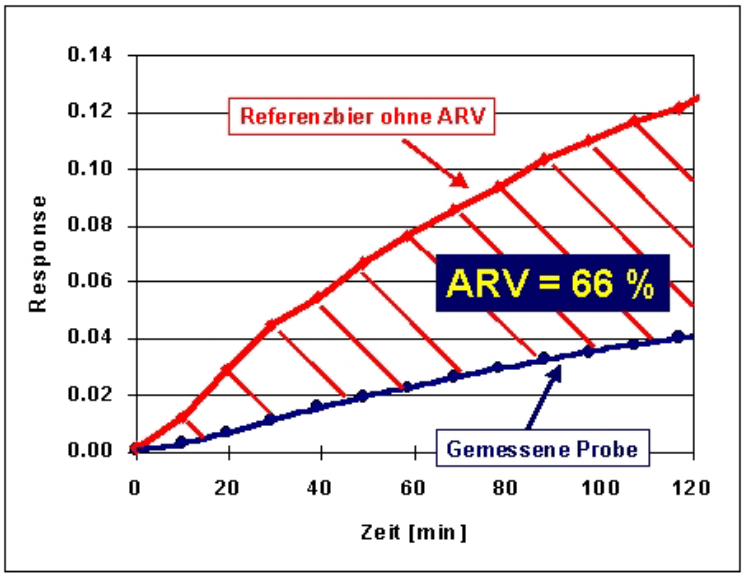


Abbildung 26: Bestimmung des antiradikalischen Verhaltens (ARV)

An der Forschungsstelle 1 ergibt sich als Fläche für die Null-Probe ein Wert von 8. Um eine prozentuale Auswertung zu ermöglichen wird folgendermaßen vorgegangen:

Fläche unterhalb des Graphen bis 120 Minuten: 2,72

Maximale Fläche der 0-Probe: 8

Differenz der Flächen: 8 – 2,72 = 5,28

Antiradikalisches Verhalten (%) = 5,28 *100 % / 8 = 65,6 % (gerundet 66 %)

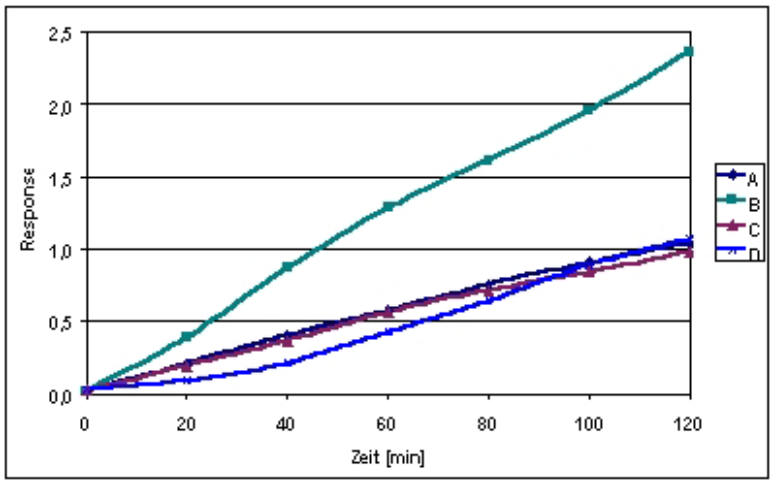


Abbildung 27: Das ARV verschiedener Biere: A: 86 %, B: 71 %, C: 87 %, D: 89 %

Abbildung 27 zeigt zwischen den Bieren deutliche Unterschiede in ihrem ARV. Das ARV ist natürlich auch klein, wenn die Lag-Time sehr groß wird. So hat das SO_2 indirekt einen Einfluss auf die Messung. Jedoch können sich die ARV bei gleicher Lag-Time stark unterscheiden. Besonders Polyphenole und allgemein reduzierend wirkende Substanzen werden mit dem ARV erfasst. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass der pH-Wert und der Extraktgehalt der Probe das Ergebnis ebenfalls beeinflussen können, da die Radikalentstehung von diesen Parametern direkt abhängt. Je höher der Extraktgehalt ist, umso mehr Inhaltsstoffe können unspezifisch Radikale abfangen.

Das Reduktionsvermögen

Eine weitere Methode zur Bestimmung antioxidativer Inhaltsstoffe in Bier ist das Reduktionsvermögen nach MEBAK. Hierbei wird die Reduktion von Dichloroindophenol spektralphotometrisch bei 520 nm über 1 Minute verfolgt. Aus der Extinktionsdifferenz kann das Reduktionsvermögen berechnet werden. An der Forschungsstelle I wird hierzu das Tannometer von Pfeuffer, Kitzingen, verwendet. Die Werte liegen normalerweise im Bereich zwischen 20 und 50 %. Über 60 % erreichen nur dunkle Biere aufgrund ihres erhöhten Gehaltes an Melanoidinen oder Biere, denen ein Antioxidanz, zum Beispiel Ascorbinsäure, zugegeben wurde.

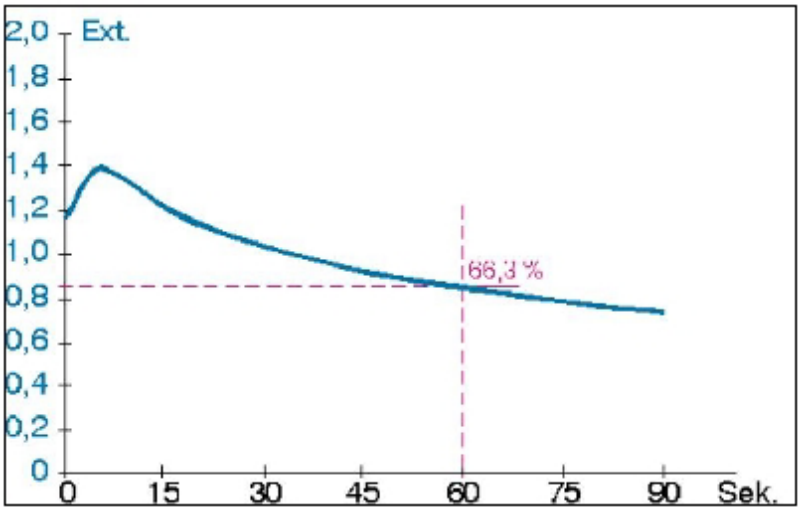


Abbildung 28: Bestimmung des Reduktionsvermögens

Durch diesen Parameter ist es möglich, auf die thermische Belastung des Bieres im Brauprozess zurückzublicken. Auch kann er einen Überblick über die Qualität des eingesetzten Malzes geben, bzw. über den Zusatz dunkler Spezialmalze.

Entwicklung des Stabilitätsindex

Die erwähnten Analysen sind eine gute Möglichkeit, das antioxidative Potential von Getränken, speziell von Bier, zu beurteilen, da sie vier Einflussgrößen berücksichtigen. Die einzelnen Analysen können sowohl getrennt betrachtet werden, aber es ist auch möglich, einen Summenparameter aus ihnen zu berechnen. Hierzu wurde der Stabilitätsindex entwickelt. Er ist eine rechnerische Größe und das arithmetische Mittel der Ergebnisse aller vier Messungen. Es gab Vorschläge, einzelne Messungen, wie zum Beispiel die Lag-Time, stärker zu gewichten. Dies führte jedoch nicht zu signifikanteren Ergebnissen. Im Gegenteil, es kommt zu einer ungleichen Überlagerung der weiteren Ergebnisse. Für diesen Parameter wurden die einzelnen Ergebnisse wie zuvor erwähnt in Prozent berechnet und somit ist diese auch die Einheit des Stabilitätsindex.

Für die Bewertung des Stabilitätsindex als Maß für das antioxidative Potenzial von Bier wird folgende Einteilung vorgeschlagen:

Sehr gut	> 60 %
Normal	50 - 60 %
Schlecht	< 50 %

Diese Einteilung geht auf die Verteilung des Stabilitätsindex in deutschen Bieren zurück, die anhand eines großen Probenvolumens erstellt wurde.

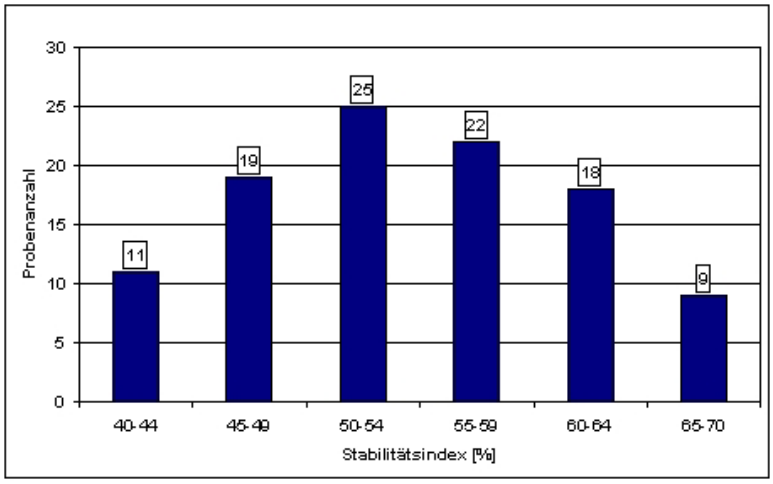


Abbildung 29: Verteilung des SI in Bier (N=108)

Um einen Zusammenhang zwischen dem Stabilitätsindex und der Alterungsverkostung zu prüfen, wurde eine große Zahl von Proben untersucht und eine gute Korrelation festgestellt. Der kombinierte Parameter zeigt den besten Zusammenhang im Gegensatz zu den Einzeluntersuchungen.

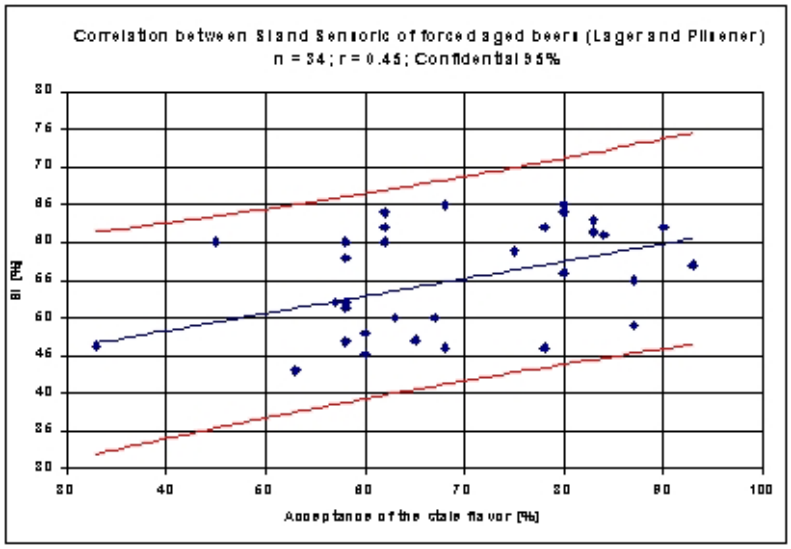


Abbildung 30: Korrelation zwischen Stabilitätsindex und der Alterungsverkostung

Anwendung der Chemilumineszenz-Messung

Neben der Messung des Stabilitätsindex und dessen Einzelanalysen, wurde auch die Chemilumineszenz-Messung und verschiedene Applikationen für das Gerät angewendet.

Direkte Messung der Chemilumineszenz in Bier und Malz

Eine einfache Anwendung der Chemilumineszenz-Messung (CL) ist das direkte Messen der Photonen, die bei einem oxidativen Forciertest entstehen. Dazu wird das Bier auf 60 °C erhitzt und über 2 Stunden die Intensität des „Lichtes“ gemessen. Es zeigten frühere Veröffentlichungen, dass in einem gealterten Bier die Intensitäten deutlich höher sind als in einem frischen Bier. Da die Werte sehr groß sind, bis zu 10^6, ist die Empfindlichkeit der Messung klein. Zur Beurteilung der Geschmacksstabilität werden daher die ESR-Methoden (Lag-Time) angewendet.

Zudem wird die Summe aller Oxidationsreaktionen aufgenommen. Es ist mit dem zur Verfügung stehenden Gerät nicht möglich, spezifische Reaktionen zu messen. Es wäre allerdings möglich, spezielle Wellenlängen mit Hilfe von Filtern zu detektieren, um so einzelne Reaktionen zu verfolgen.

Neben flüssigen Proben ist es auch möglich, Feststoffe zu messen. So konnten Oxidationsreaktionen im gemahlenen Malzpulver bei 60 °C verfolgt werden.

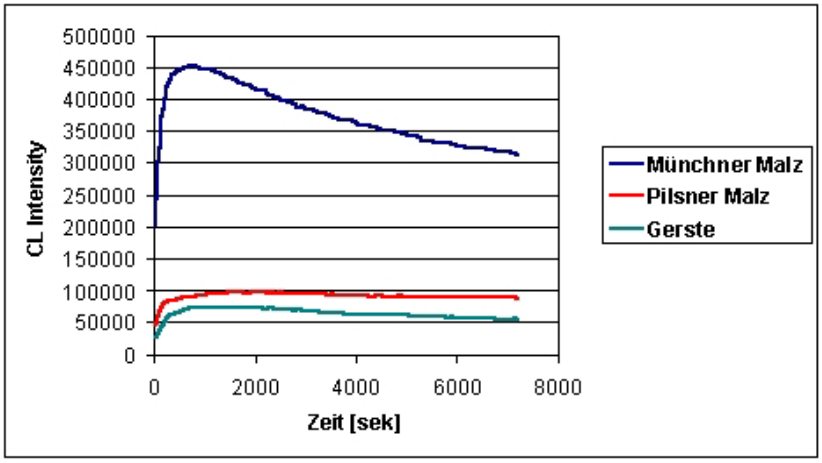


Abbildung 31: Vergleich der Chemilumineszenz verschiedener Malze und Gerste

Beurteilung der antiradikalischen Aktivität von Polyphenolen und Sulfit mittels der Chemilumineszenz-Messung

Wie das antiradikalische Potenzial ist auch die Chemilumineszenz-Messung zur Beurteilung des antoxidativen Effektes einzelner Substanzen anwendbar.

Die zu testende Substanz wird in dem nicht ganz vollständigen Reaktionsgemisch vorgelegt. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid wird die Radikalentstehung gestartet und der Inhibitionseffekt der zu untersuchenden Substanz kann gemessen werden.

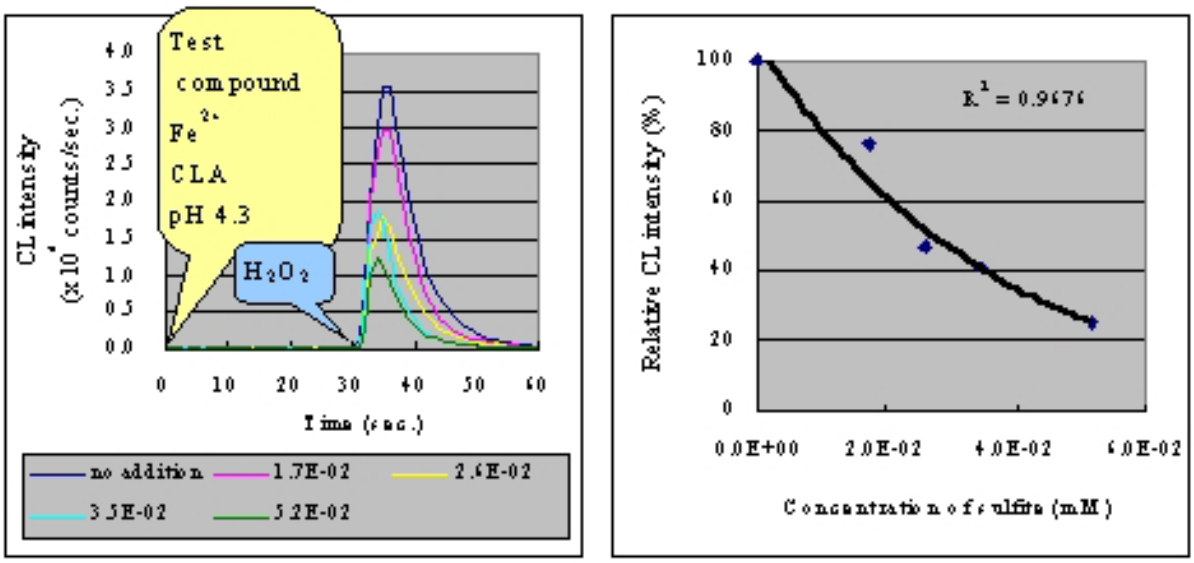


Abbildung 32: Darstellung der Chemilumineszenz-Methode und Inhibitionseffekt von Sulfit

Einfluss des pH-Wertes auf die antiradikalische Aktivität der Polyphenole

Es sollte geklärt werden, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Reaktionskinetik von phenolischen Substanzen hat. So zeigt sich, dass bei einem typischen Bier pH-Wert von ca. 4,3 die antiradikalische Reaktion der Polyphenole gegenüber Superoxid-radikalanionen und Hydroxylradikalen nicht nachweisbar ist. Bei einem pH-Wert von 7 kann eine deutliche Reaktivität gemessen werden.

Der Gehalt an Sulfit dagegen zeigt bei diesen Messungen bei beiden pH-Werten eine Reaktivität.

PH	pH 4.3		pH 7.0	
Test compound Active oxygen	Hydroxyl radical (mM)	Superoxide (mM)	Hydroxyl radical (mM)	Superoxide (mM)
Catechin	N.A.[1)] (6.0)[2)]	N.A. (5.9)	2.9×10^{-1}	2.0×10^{-2}
Ferulic acid	N.A. (2.4)	1.4×10^{0}	N.A. (2.4)	5.0×10^{-2}
p-Hydroxybenzoic acid	N.A. (8.5)	N.A. (8.5)	8.3×10^{-2}	N.A. (8.5)
Gallic acid	N.A. (8.3)	4.9×10^{0}	8.0×10^{-2}	1.1×10^{-2}
Vanillic acid	N.A. (4.8)	N.A. (4.7)	3.8×10^{-1}	6.2×10^{-2}
Sulfite	1.4×10^{0}	2.8×10^{-2}	4.3×10^{-2}	5.9×10^{-4}

Tabelle 3: Antiradikalische Reaktivitäten der einzelnen phenolischen Substanzen und des Sulfit bei verschiedenen pH-Werten. In Klammern sind die maximal verwendeten Konzentrationen angegeben (Nakamura et al. 2001)

Das antiradikalische Potenzial dagegen zeigt, dass die phenolischen Substanzen mit DPPH auch bei pH 4,3 reagieren und so eine Unterscheidung möglich ist. Diese Ergebnisse stehen in keinem Widerspruch. Es ist somit wichtig, anzugeben, welcher Test mit welchem Radikal verwendet wurde. So ist festzuhalten, dass phenolische Substanzen gegenüber dem Hydroxylradikal bei pH 4,3 keine Wirkung zeigen. Dies kann aber auch damit begründet werden, dass die Radikalentstehung sehr gering ist. So ist die Affinität der Polyphenole gegenüber diesem speziellen Radikal bei geringen Konzentrationen nicht ausreichend, um ein messbares Ergebnis zu erlangen, zumal die Radikale auch unspezifisch schnell weiter reagieren. Dies ist bei DPPH nicht der Fall, da dieses selbst stabil ist und so die Affinität der Polyphenole gegenüber diesem speziellen Radikal verfolgt werden kann.

Zusammenhang zwischen einzelnen phenolischen Substanzen und den antioxidativen bzw. nasschemischen Analysen

Die Auswertungen der Ergebnisse der Forschungsstelle 2 über den Gehalt an einzelnen phenolischen Substanzen wurden mit den Ergebnissen der nass-chemischen und antioxidativen Tests der Forschungsstelle 1 verglichen.

So zeigte sich ein sehr guter Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Flavonoiden, bzw. Proanthocyanidinen und den Messungen der Gesamtpolyphenole, Anthocyanogene und Flavonoide. Der beste Zusammenhang zeigte sich mit dem Gehalt an Tannoiden der Probe.

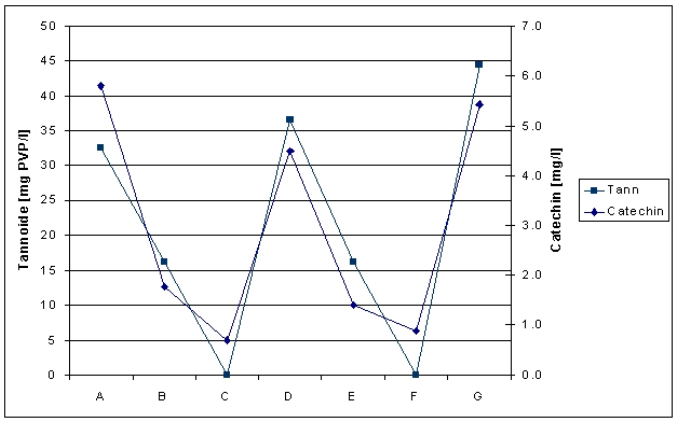


Abbildung 33: Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Catechin und der Bestimmung der Tannoide in Bier

Die von der Forschungsstelle 2 bestimmten Phenolcarbonsäuren hingegen werden mit diesen Methoden scheinbar nicht erfasst, da sich kein Zusammenhang erkennen läßt. Sie korrelieren dagegen sehr gut mit der Bestimmung des antiradikalischen Potenzials. Unter den Phenolcarbonsäuren hebt sich besonders die Sinapinsäure hervor, die auf einem hohen Niveau mit dem ARP korreliert.

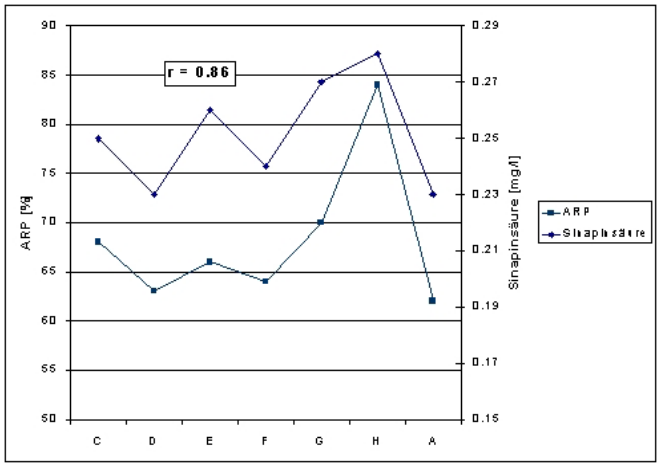


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Sinapinsäure und dem antiradikalischen Potenzial

Die Sinapinsäure kann somit eventuell als Indikatorsubstanz für das Spektrum an phenolischen Substanzen und ihrem antiradikalischen Potenzial verwendet werden. Gerade das Spektrum im Malz wäre von Interesse, da es einen positiven Einfluss auf die Maischarbeit haben kann.

Untersuchungen im Bierbereitungsprozess

Untersuchung des Malzes auf Polyphenole und ihr antioxidatives Potenzial

Um den Rohstoff Malz zu beurteilen, wurden Malzkaltauszüge hergestellt. Zuerst wurde das Malz bei konstanter Temperatur (~20 °C) fein vermahlen. Damit die phenolischen Substanzen nicht oxidiert werden, wurde für die Kaltauszüge eine Hydrazinsulfat-Lösung verwendet.

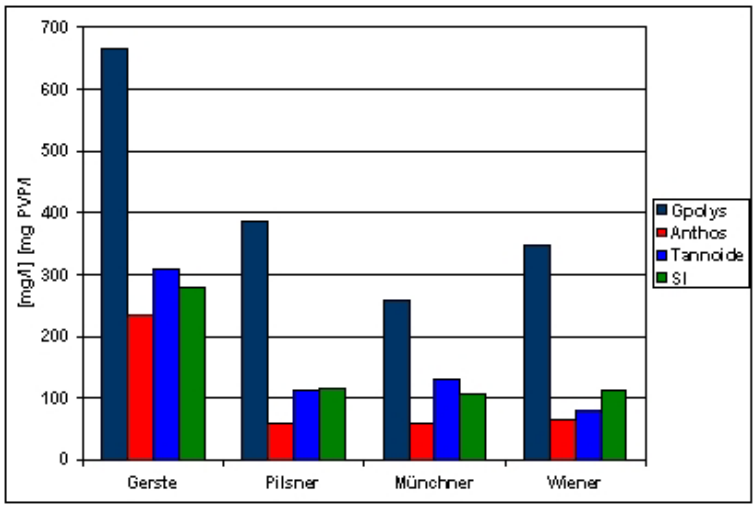


Abbildung 35: Polyphenole und der Stabilitätsindex während der Mälzung (Gpolys = Gesamtpolyphenole, Anthos = Anthocyanogene)

Es zeigt sich, dass bereits in Malzkaltauszügen der Stabilitätsindex reproduzierbar gemessen werden kann. Um die Ergebnisse der verschiedenen Malze zu vergleichen, müssen diese auf einen einheitlichen Extraktgehalt bezogen werden, da bei unterschiedlichem Lösungsgrad die Extrakte in den Auszügen voneinander abweichen. Ebenso ist zu berücksichtigen, dass die Hydrazinsulfatlösung einen niedrigen pH-Wert von ungefähr 3,2 hat. Da die Radikalentstehung und die antiradikalische Reaktion von Polyphenolen vom pH-Wert abhängen, muss dieser berücksichtigt werden. Die Reaktivität der Malze ist zwar untereinander vergleichbar, es ist jedoch noch keine Vorhersage für die entstehende Maische und Würze möglich, da dort die pH-Werte deutlich höher (> 5) liegen.

Es ist festzuhalten, dass der Stabilitätsindex bzw. die einzelnen Analysen zur Bewertung des Malzes herangezogen werden können und das antioxidative Potenzial bestimmt werden kann.

Des Weiteren ist es möglich, bereits im Feststoff Malz freie Radikale mittels ESR zu messen. So können zwischen Malzsorten signifikante Unterschiede gemessen. Es hat sich gezeigt, dass mit zunehmendem Lösungsgrad, die Menge an freien Radikalen im fertigen Malz zunimmt (Takoi et al. 2002). Dieser Parameter könnte als zukünftige Spezifikation für das Malz Anwendung finden und wird an der Forschungsstelle 1 ebenfalls gemessen.

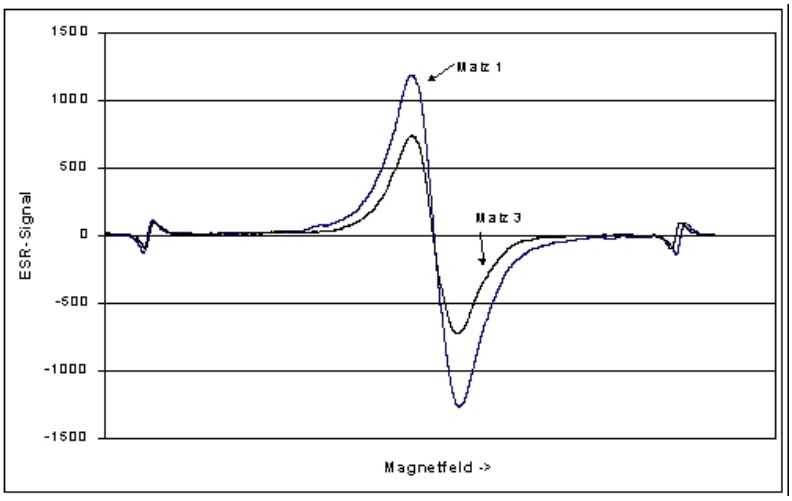


Abbildung 36: Freie Radikale in unterschiedlichen Malzen gemessen mittels ESR

Inwieweit dieses Potenzial in die Maische übertragbar ist und dort schützend wirken kann, muss noch geklärt werden. Es kann somit der Einfluss des Mälzens auf das antioxidative Potenzial des Malzes von Interesse sein. Es hat sich gezeigt, dass, unabhängig vom Mälzungsverfahren, die gleiche Abnahme an phenolischen Substanzen und des Stabilitätsindex beobachtet werden konnte. Es bietet sich im Bereich der Mälzung somit noch ein großes Forschungsgebiet an.

Untersuchung der Polyphenole in der Maische

Es ist bekannt, dass sauerstofffreies Maischen zu besseren Geschmacksstabilitäten der Biere führt. Dies setzt voraus, dass im weiteren Brauprozess keine negativen Einflüsse (Hefequalität, Sauerstoffeintrag beim Abfüllen, thermische Belastungen) zum Tragen kommen. So zeigt sauerstofffreies Arbeiten in der Würze höhere Gehalte an Tannoiden und einen niedrigeren Polymerisationsindex (siehe nächstes Kapitel). Problematisch für die Untersuchung der Maischarbeit ist die Probennahme. Da die Enzyme noch wirksam sind, müssen sie deaktiviert werden. Dabei ist es aber schwierig, die Matrix der Probe (Temperatur, pH-Wert) nicht zu verändern.

Einfluss der biologischen Säuerung auf den Polyphenolgehalt und die Geschmacksstabilität der Biere

Das Säuern der Maische mittels biologisch hergeführter Milchsäure führt zu geschmacklichen Vorteilen und auch die Geschmacksstabilität kann gesteigert werden. Es wurden Versuche durchgeführt, um mit den neu erarbeiteten Methoden diese Erfahrung zu bestätigen und neue Erklärungsmöglichkeiten zu finden.

Es zeigt sich, dass die Geschmacksstabilität mittels biologischer Säuerung gesteigert werden konnte. Es ist besonders wichtig, möglichst sauerstofffrei im Bereich des Maischens zu arbeiten, da sonst der scheinbar positive Effekt der Polyphenole analytisch nicht nachvollziehbar ist. Auffallend ist, dass durch diesen technologischen Schritt der Gehalt an Tannoiden auf einem deutlich hohen Niveau verbleibt (in Abhängigkeit des Ausgangswertes). Auch nimmt der Polymerisationsindex nur gering zu. Dies deutet auf einen Schutz vor Oxidationen hin. Im Vergleich zu einem ungesäuerten Vergleichssud waren die Werte deutlich erhöht und bestätigen den positiven Einfluss.

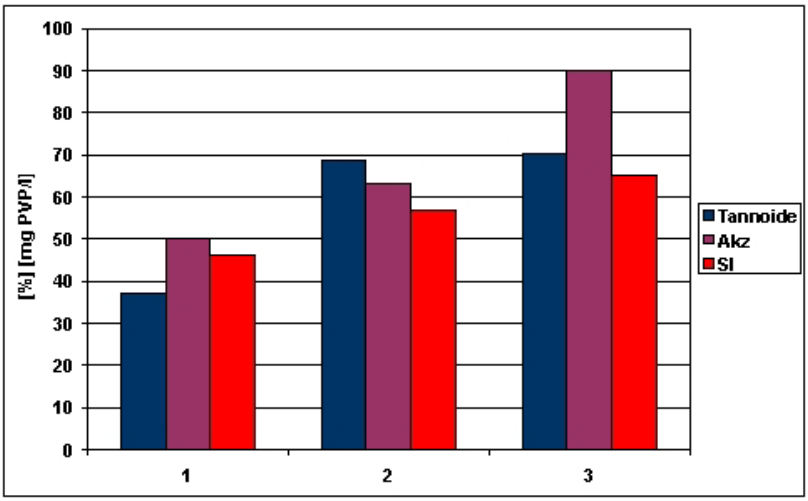


Abbildung 37: Einfluss der biologischen Maischesäuerung auf den Tannoidgehalt und den Stabilitätsindex im fertigen Bier (1: Null-Sud, 2 und 3: Maischesäuerung, Akz = Alterungsakzeptanz)

Die fertigen Biere aus den Maischsäuerungsversuchen zeigen einen sehr guten Zusammenhang zwischen der Alterungsverkostung und dem Stabilitätsindex

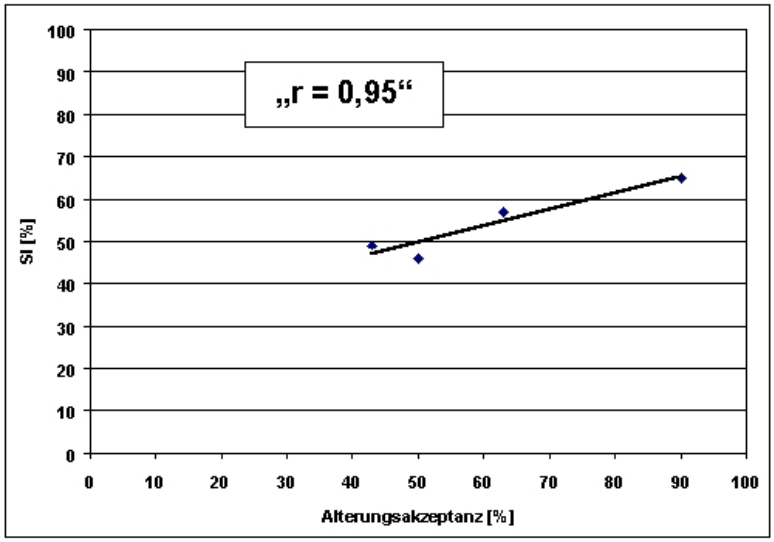


Abbildung 38: Korrelation zwischen dem Stabilitätsindex und der Alterungsverkostung

Die Probenzahl war für eine statistische Auswertung nicht groß genug, doch ist die Tendenz eindeutig.

Einfluss der Gärung auf den Stabilitätsindex und die Geschmacksstabilität der Biere

Grundsätzlich zeigen sich in der Würze keine Veränderungen auf das antioxidative Potenzial durch das Anstellen, bzw. das Belüften. So wird der Sauerstoff, der zu Gärbeginn zugegeben wird, von der Hefe sehr schnell aufgenommen, bevor er zu messbaren Oxidationen der Würzeinhaltsstoffe führt.

Da sich die Lag-Time erst während der Hauptgärung mit der Entstehung von SO_2 ausbildet, wird in diesem Bereich auch der Stabilitätsindex positiv verändert. Da SO_2 einen sehr guten Oxidationsschutz darstellt, ist mit seinem Gehalt auch die Geschmacksstabilität des Bieres zu einem Großteil bestimmt. Bis 10 mg/l im Bier ist es nicht deklarierungspflichtig.

Interessant ist, dass frisch hergeführte Hefe nur bis zu 1,5 mg/l SO_2 bildet, dagegen Erntehefe, die zum Beispiel viermal geführt wird, Werte bis zu ~10 mg/l erreicht.

Phenolische Substanzen, gemessen als Gesamtpolyphenole, Anthocyanogene und Tannoide, nehmen hingegen deutlich während der Hauptgärung ab. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass auch der pH-Wert des Jungbieres weit unter dem der Würze liegt. Dies hat auch auf die Analytik einen Einfluss. Es ist schwierig, die Ergebnisse direkt zu vergleichen.

Da heutzutage oft nur noch Reinzuchthefe verwendet wird, sind die SO_2-Gehalte im Bier relativ niedrig. Dies ermöglicht jetzt erst, die Wirkung der Polyphenole besser zu erkennen, da diese zuvor vom Effekt des SO_2 überdeckt war. Das Niveau des Stabilitätsindex bleibt im Bereich der Lagerung konstant, außer es kommt zu deutlichen Sauerstoffaufnahmen, die die Hefe nicht schnell genug aufnehmen kann. Der Stabilitätsindex kann so bereits als Qualitätsmerkmal für das antioxidative Potenzial des Jungbieres herangezogen werden. Sind hier Unterschiede erkennbar, sind diese im Lagerkeller durch verschneiden unterschiedlicher Chargen kompensierbar.

Einfluss der Stabilisierung und Filtration auf die phenolischen Substanzen und die Geschmacksstabilität der Biere

Die Filtration und speziell die Stabilisierung der Biere mit PVPP haben einen großen Einfluss auf das Spektrum der phenolischen Substanzen. Gerade der Gehalt an Tannoiden wird mit PVPP deutlich reduziert. Das kann soweit gehen, dass kein Gehalt mehr messbar ist. Dies ist aus Sicht der kolloidalen Stabilität notwendig, um die Biere im Rahmen der Mindesthaltbarkeit trübungsstabil zu halten. Der Filtration über Kieselgur/PVPP vor der Abfüllung des Bieres kommt im Hinblick auf den Polyphenolgehalt somit eine besondere Bedeutung zu.

Der Einfluss unterschiedlicher Stabilisierungsmaßnahmen auf das Polyphenolmuster von Bieren wurde von beiden Forschungsstellen parallel untersucht. Hierzu wurden Biere betrachtet, die gar nicht, mit PVPP, mit Kieselgel und mit einem Gemisch aus PVPP und Kieselgel stabilisiert wurden.

Bei den monomeren und kondensierten Flavanolen (Proanthocyanidinen) zeigt sich durch den Einsatz von PVPP eine deutliche Reduzierung der Konzentrationen (Abb. 39). Es ist nicht relevant, ob das PVPP allein oder im Gemisch mit Kieselgel angewendet wird. Kieselgel allein zeigte bei dieser Substanzklasse nur einen geringen Effekt.

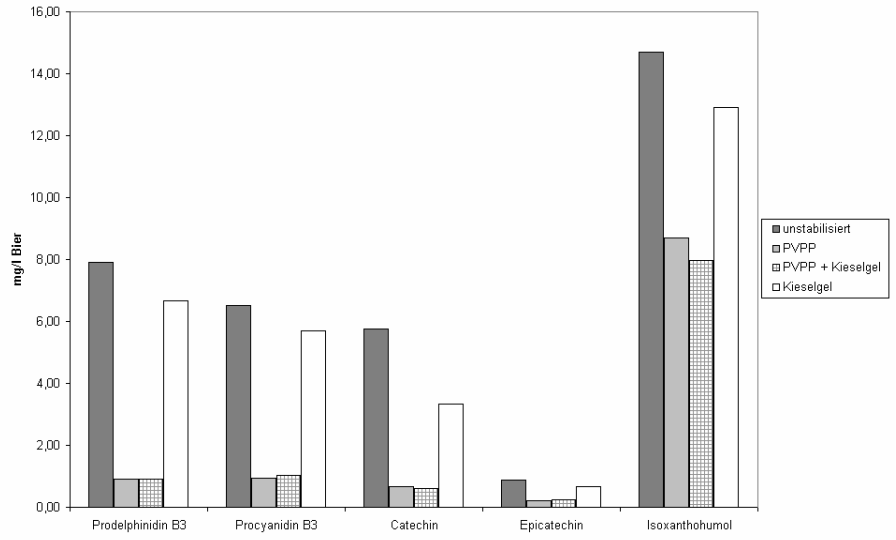


Abbildung 39: Einfluss der Stabilisierungsmittel auf den Proanthocyanidin- und Isoxanthohumolgehalt des Abzugs

Die Gehalte an Phenolcarbonsäuren werden zumeist durch die Stabilisierung nur in geringem Maße beeinflusst (Abbildung 40). Bei Ferulasäure und p-Cumarsäure zeigte sich ein bisher noch nicht erklärter Effekt, nämlich eine starke Zunahme während der Stabilisierung. Erklärungsansätze für diesen Effekt setzen u.a. bei der Trübung des unstabilisierten Bieres an. Als Bestandteile dieser Trübung könnten die Hydroxyzimtsäuren der Bestimmung im unstabilisierten Bier entzogen werden.

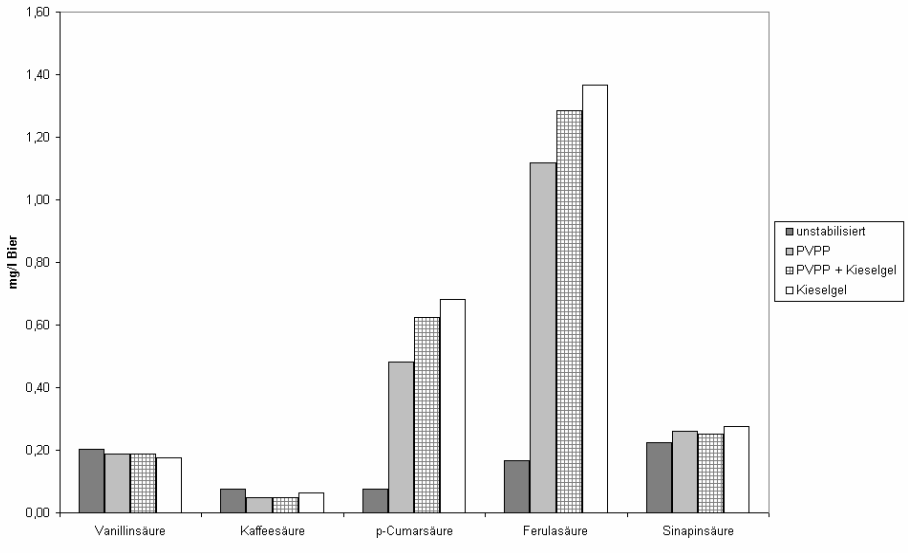


Abbildung 40: Einfluss der Stabilisierungsmittel auf die Gehalte phenolischer Säuren

Die nasschemischen Tests der phenolischen Substanzen werden entsprechend beeinflusst. So nimmt der Gehalt an Tannoiden und Anthocyanogenen in gleichem Maße wie die Einzelsubstanzen ab.

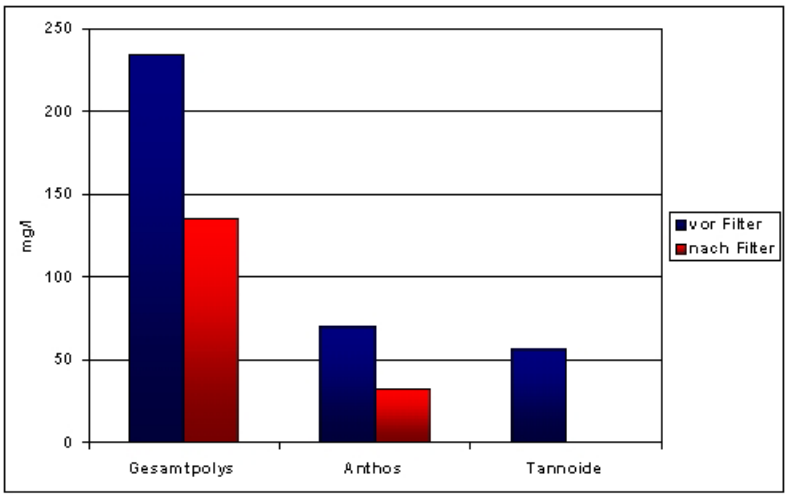


Abbildung 41: Abnahme der Polyphenole während der Stabilisierung und Filtration

Im Weiteren wurden der Filterein- und –auslauf eines Kieselgur-/PVPP-Kerzenfilters sowie die auf dem Filter adsorbierten Verbindungen untersucht (Abbildung 42). Die Konzentrationen von Catechin sowie di- und trimeren Proanthocyanidinen im Bier werden dabei wie erwartet durch die Filtration deutlich gesenkt, entsprechend finden sich diese Verbindungen auf dem Filtermaterial adsorbiert wieder. Aber auch Isoxanthohumol sowie Flavonolglykoside werden vom Filtermaterial zurückgehalten, sodass auch die Konzentrationen von im Bier durchaus erwünschten Verbindungen durch die Filtration gesenkt werden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse könnten die Brauereien bei der Formulierung von Zielvorstellungen für die Eigenschaften optimierter Filtermaterialien unterstützen.

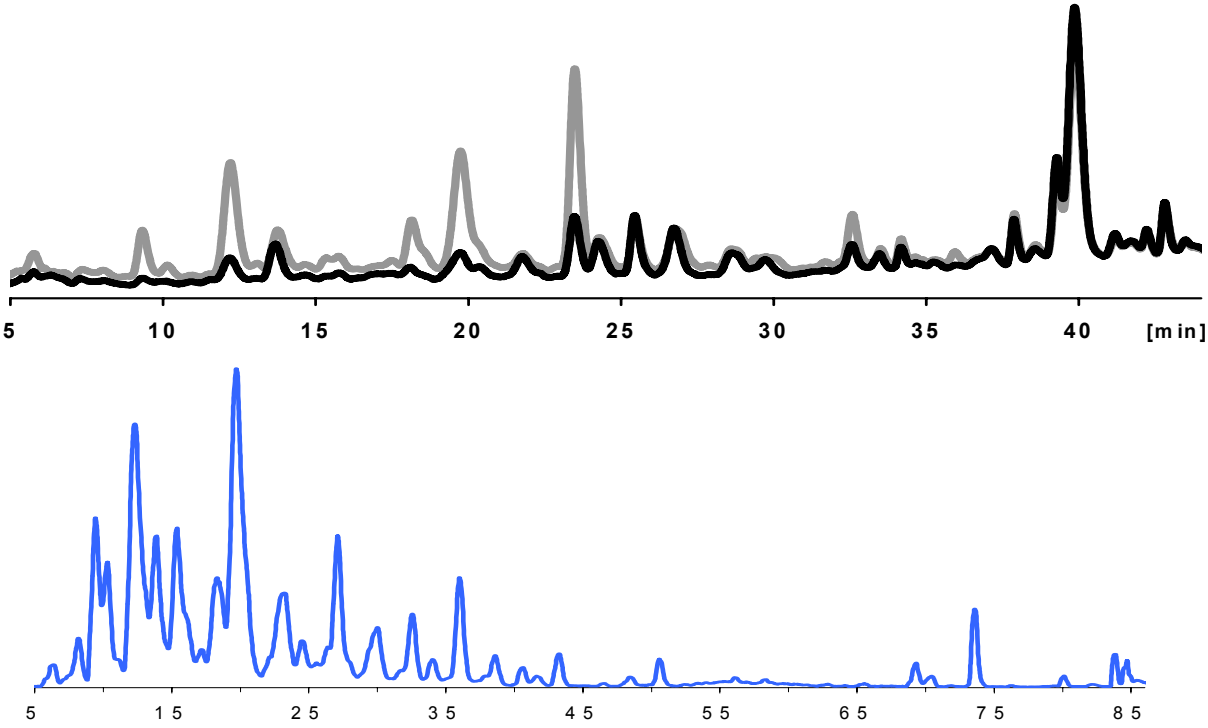


Abbildung 42: HPLC-Chromatogramme des Bieres am Filterein- (hell) und -auslauf (dunkel) nach SPE-Aufarbeitung (oben) und der vom Filtermaterial gewonnenen Polyphenole (unten)

Abbildung 43 zeigt, wie das antiradikalische Verhalten nach der Filtration abnimmt, bzw. die Fläche unterhalb des Graphen zunimmt. Es wird deutlich, wie stark der Einfluss durch die PVPP-Stabilisierung und die Filtration auf die Inhaltsstoffe des Bieres sind. Die Lag-Time bleibt hingegen gleich, außer es kommt zur Sauerstoffaufnahme in diesem Prozessschritt.

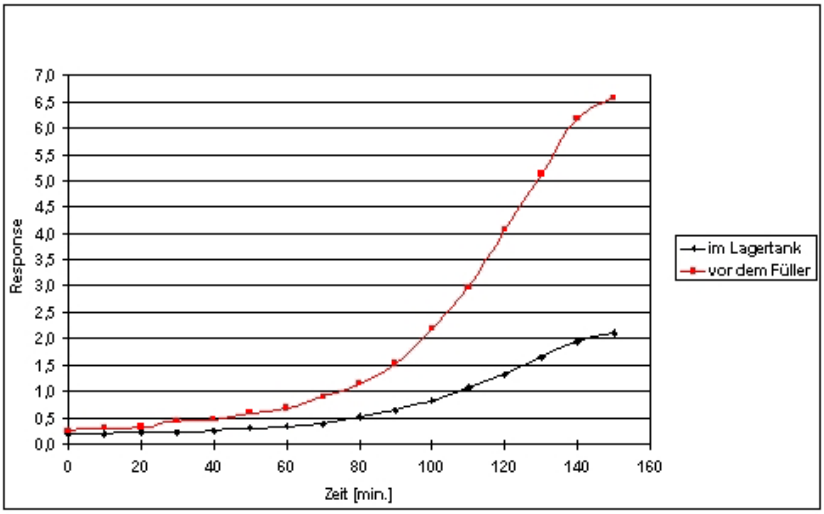


Abbildung 43: Verlauf der Radikalbildung im Lagertank und vor der Abfüllung

Die Veränderung des natürlichen Spektrums an phenolischen Substanzen am Filter hat in erster Linie einen Einfluss auf die Analytik, speziell auf den Stabilitätsindex. Es wurden Alterungsverkostungen mit diesem Parameter verglichen. Wurden die Biere nach ihrem Grad der Stabilisierung geordnet, so war ein sehr guter Zusammenhang zwischen der Analytik und der Verkostung zu erkennen. Das bestätigt die sehr guten Ergebnisse innerhalb einer Brauerei, wo die Stabilisierung relativ konstant durchgeführt wird.

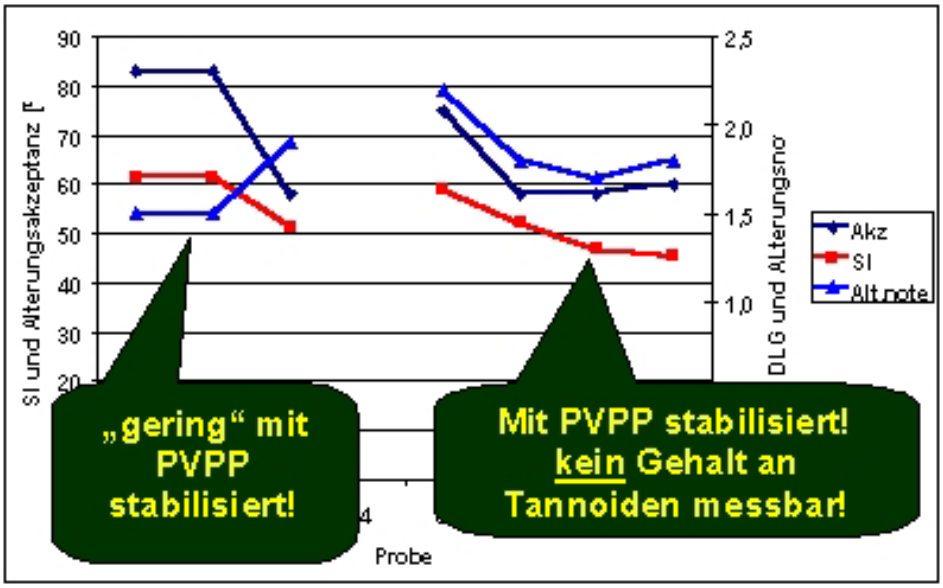


Abbildung 44: Korrelation zwischen dem Stabilitätstindex und der Alterungsverkostung im Biertyp Helles (Akz = Alterungsakzeptanz, Alt.note = Alterungsnote)

Grundsätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Polyphenole scheinbar keinen deutlichen Einfluss auf die Geschmacksstabilität im abgefüllten Bier haben, da bei einem pH-Wert von ca. 4,3 deren Reaktivität gering ist. Ihre große Bedeutung liegt wohl im Bereich des Sudhauses, vor allem beim Maischen, da hier pH-Werte von über 5 vorliegen. Wie vorher erwähnt, zeigt die Schonung der Tannoide im Sudhaus einen positiven Effekt auf die Geschmacksstabilität. Sie wirken womöglich als Indikatoren für eine sauerstofffreie Maischarbeit. Ihr Gehalt muss vor dem Filter bestimmt werden. Ist dieser sehr hoch, so kann darauf zurückgeschlossen werden, dass im Sudhaus positiv gearbeitet wurde und die zu erwartende Geschmacksstabilität hoch ist. Im abgefüllten Bier ist der Tannoidgehalt aufgrund der PVPP-Stabilisierung nicht mehr aussagekräftig.

Es wurde daraufhin versucht, den Stabilitätsindex bereits vor der Stabilisierung zu messen, um den negativen Einfluss des PVPP zu umgehen. Dies setzt allerdings voraus, dass die Stabilisierung und Filtration im Hinblick auf die Geschmacksstabilität auf einem hohen Level ablaufen. Bei Versuchen im Praxismaßstab zeigte sich ein negativer Einfluss während der Filtration in Form von Sauerstoffaufnahme, wodurch neben den Polyphenolen auch die Lag-Time beeinflusst wird. Diese verringert sich ebenso, wenn zum Beispiel die Kieselgur stark eisenhaltig ist. Die Eisenionen unterstützen katalytisch die Radikalentstehung im Bier.

Die PVPP-Stabilisierung hat somit nur einen Einfluss auf die Steigerung der kolloidalen Stabilität. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die antioxidativ wirkenden Polyphenole auch an den Trübungen beteiligt sind. Versuche haben jedoch gezeigt, dass es sich wohl um unterschiedliche Reaktionsmechanismen handelt. So sind Polyphenole, die antioxidativ besonders wirksam sind, nicht unbedingt Trübungsbildner. Für eine bessere kolloidale Stabilität können derartige phenolische Substanzen beruhigt entfernt werden. Da gerade niedermolekulare Polyphenole antiradikalisch aktiv sind und diese während der PVPP-Stabilisierung kaum entfernt werden, hat dieser Schritt keinen signifikanten Einfluss auf die Geschmacksstabilität.

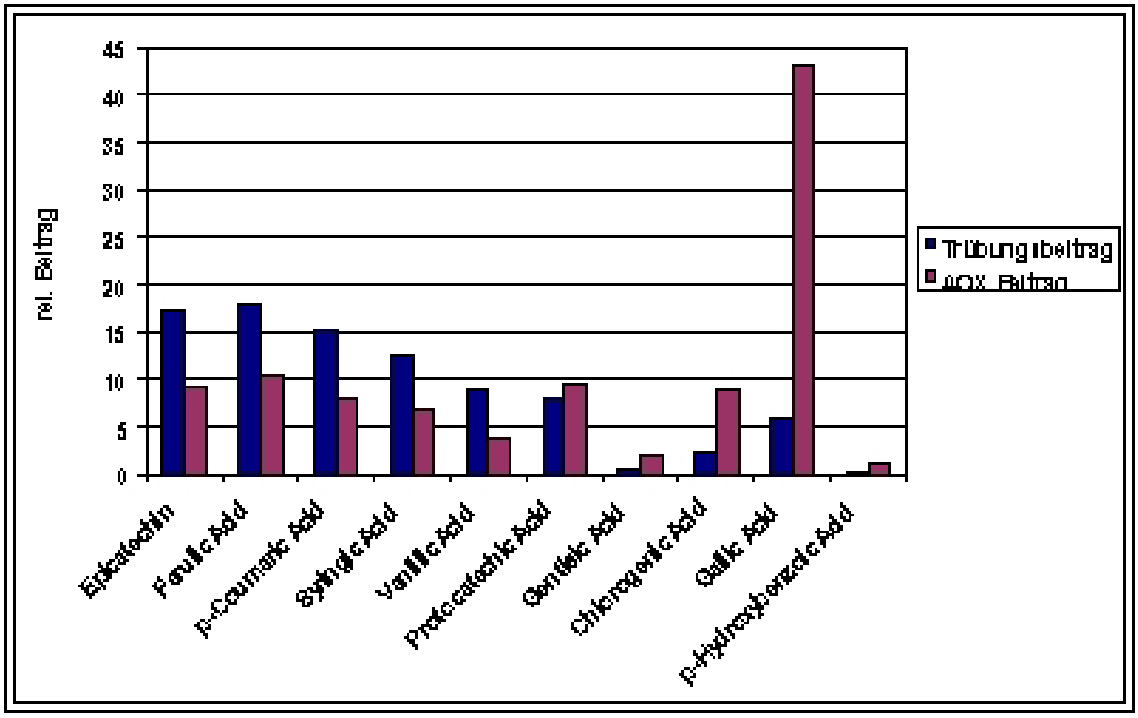


Abbildung 45: Vergleich des Trübungsbeitrages mit dem antioxidativen Beitrag phenolischer Substanzen (jeweils auf deren durchschnittlichen Gehalt in Bier bezogen)

Veränderung der phenolischen Substanzen im Bier während der Lagerung und ihr Beitrag zur Geschmacksstabilität

Zur Untersuchung der Veränderung der phenolischen Substanzen während der Bieralterung wurden die Biere 24 Stunden geschüttelt und 4 Tage bei 40 °C im Warmschrank dunkel gelagert. Neben den klassischen nasschemischen Messmethoden an der Forschungsstelle I wurden die Biere an der Forschungsstelle II auf die einzelnen phenolischen Substanzen hin untersucht.

Beim direkten Vergleich des frischen und forciert gealterten Bieres sind geringe Unterschiede festzustellen (Abb. 46). Bei Betrachtung der prozentualen Abnahme einzelner Verbindungen zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Stoffgruppen. So war bei den untersuchten Proanthocyanidinen eine geringe Abnahme beobachten (Abb. 47). Bei den Phenolcarbonsäuren konnte in der Tendenz ebenfalls eine geringe Abnahme festgestellt werden, jedoch mit stärkeren Schwankungen (Abb. 48). Die Flavonolglykoside scheinen im Verlauf der forcierten Alterung leicht zuzunehmen (Abb. 49). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Spaltung von Flavonolglykosiden mit mehreren gebundenen Zuckern. Diese Precursoren konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden.

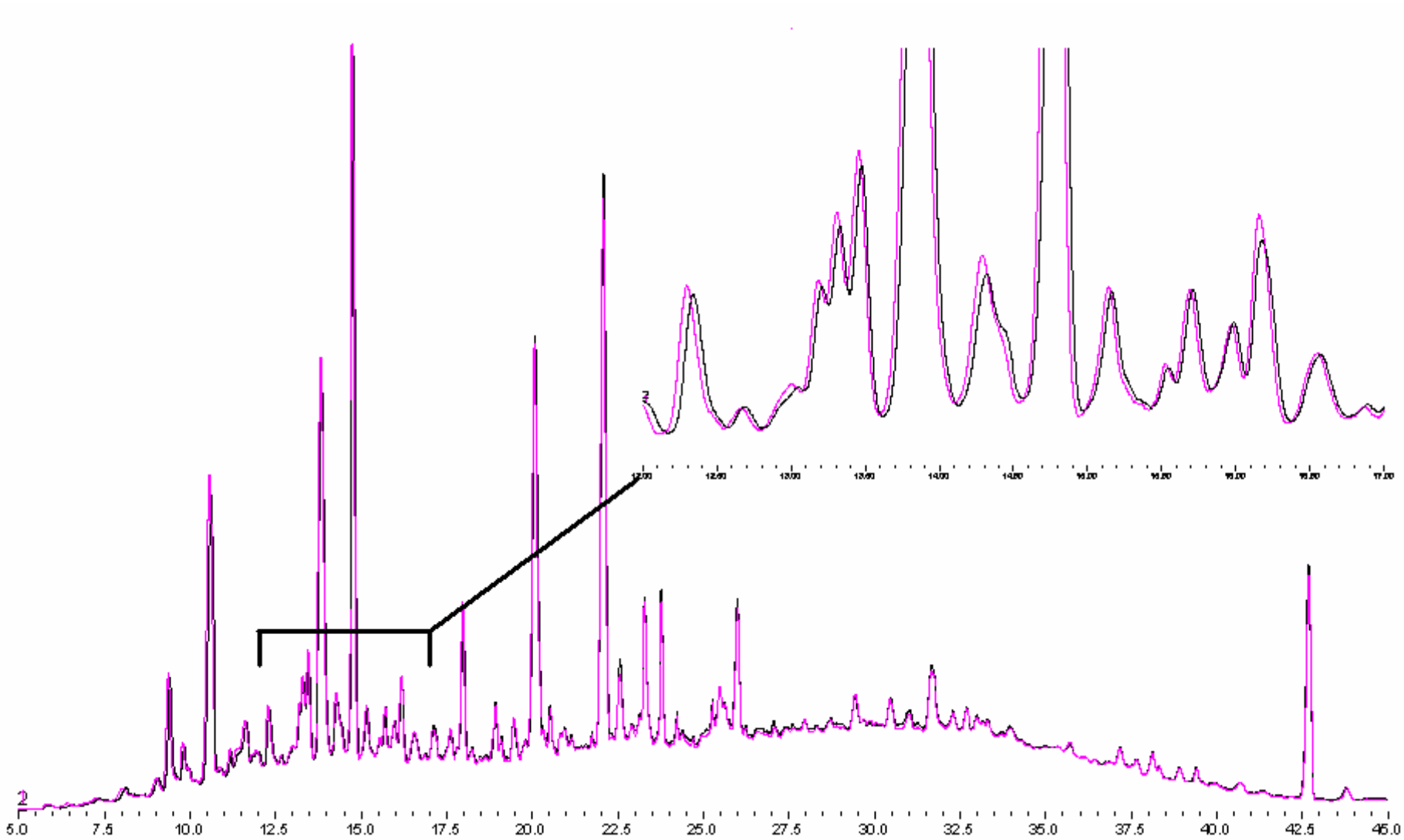
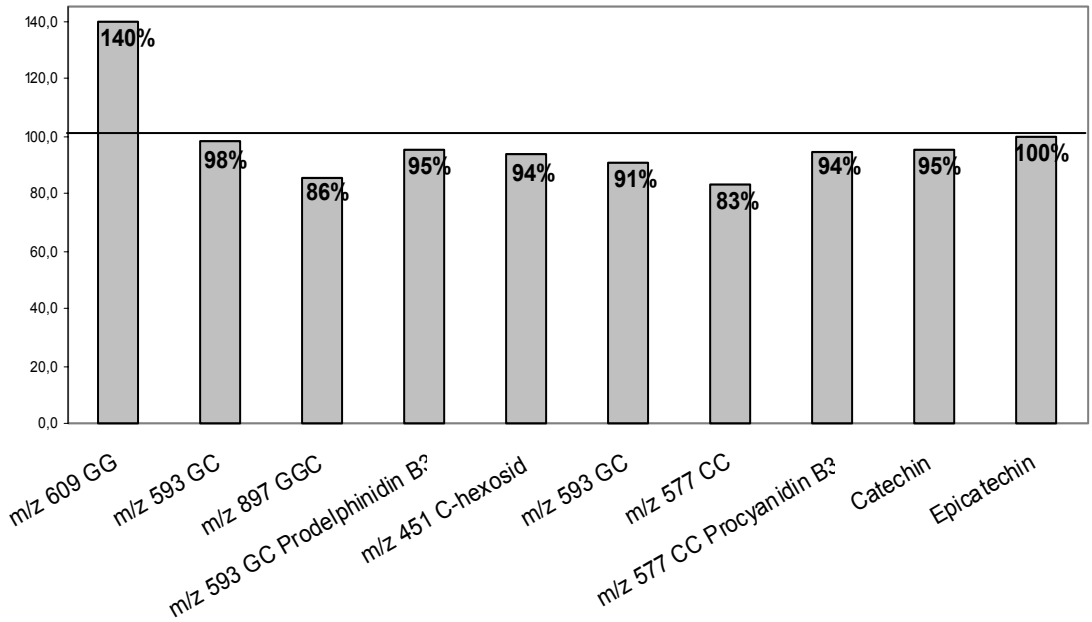
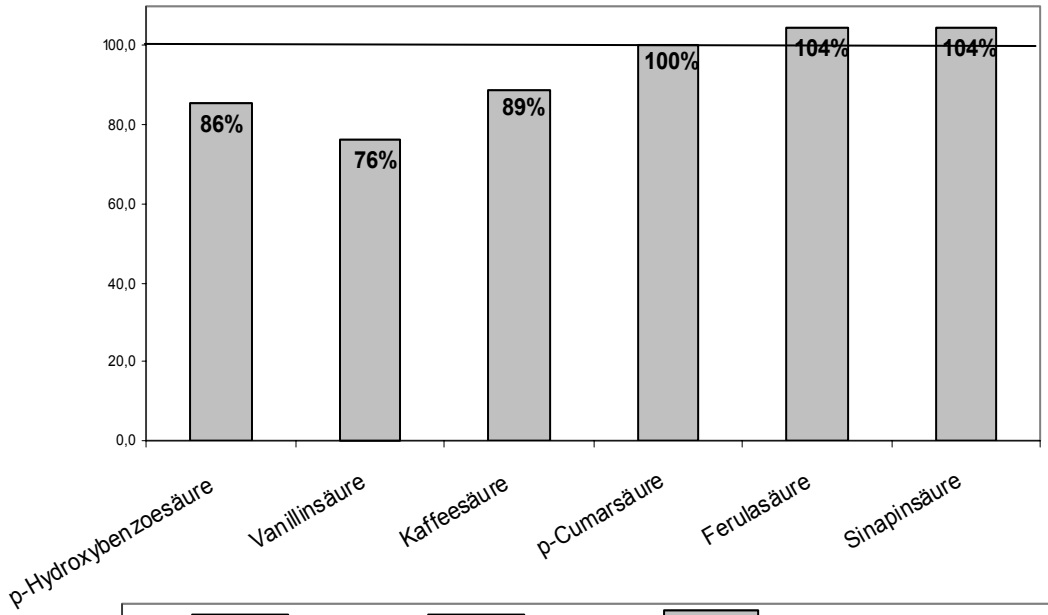


Abbildung 46: Übereinander liegende Chromatogramme von frischem (hell) und forciert gealtertem (dunkel) Bier nach SPE-Aufarbeitung (PA); gezoomter Bereich: u.a. Procyanidin B3, Catechin, weitere Proanthocyanidine





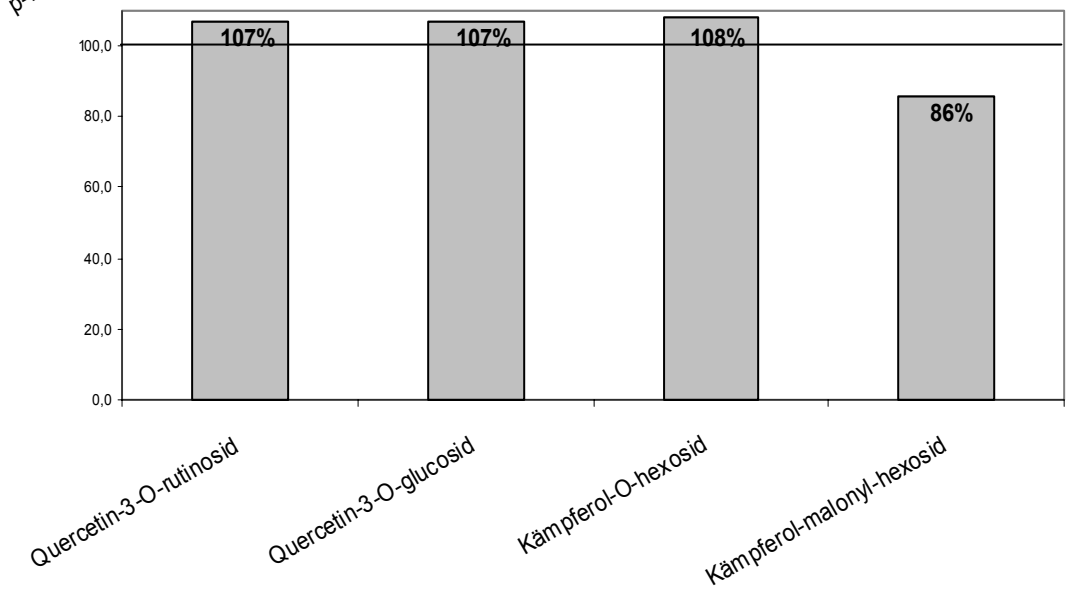


Abbildung 47-49: prozentuale Abnahme der untersuchten Proanthocyanidine, Phenolcarbonsäuren und Flavonolglykoside (v.o.n.u.)

Trotz einer deutlichen Geschmacksveränderung während der forcierten Alterung zeigten sich weder im nasschemischen Bereich (Gesamtpolyphenole, Anthocyanogene und Tannoide) noch bei einzelnen Substanzen während der Alterung signifikante Veränderungen. Ebenso wenig konnten spezifische Unterschiede zwischen den untersuchten Biersorten Pils und Helles infolge der forcierten Alterung festgestellt werden.

Wird davon ausgegangen, dass Alterungscarbonyle in deutlich geringeren Konzentrationen als die untersuchten phenolischen Substanzen enthalten sind, ist im Augenblick keine Aussage darüber möglich, ob die diese schützende Wirkung haben.

Als Grund für das Ergebnis kann die Abhängigkeit der antioxidativen Aktivität vom pH-Wert genannt werden. Bei einem Wert von ca. 4,3 in Bier ist diese nicht nachweisbar gewesen. Der Heißbereich der Brauerei, in dem pH-Werte von über 5 vorliegen, ist der positive Einfluss wahrscheinlicher. Die Untersuchung der Produktionsschritte im Sudhaus, speziell des Maischens, sollten in Zukunft im Vordergrund stehen.

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen lassen sich die sensorischen Unterschiede zwischen frischem und forciert gealtertem Bier nicht auf eine einzelne Substanz oder eine Verbindungsklasse zurückführen. Nach Abschluss dieses Forschungsvorhabens ist im Rahmen des Fortsetzungsantrags die Isolierung phenolischer Einzelsubstanzen geplant, um deren Beitrag zu den Geschmacksveränderungen aufgrund von Alterungsvorgängen bzw. deren Einfluss (z.B. oxidativer Schutz durch verstärktes antioxidatives Verhalten) auf geschmacklich relevante Stoffe zu untersuchen.

Literatur

Back, W. et al.: Hefemanagement und Anstelltechnologie mit ihren Auswirkungen auf Geschmack und Geschmacksstabilität. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 1999.

Brand-Williams, W. et al.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 1995.

Dalgliesh, C. E.: Flavour Stability. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 1977.

Forster, C. et al.: Untersuchungen über den Einfluß der Anstell- und Befüllungstechnik zylindrokonischer Gärtanks auf die antioxidative Aktivität von Bier. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 1999.

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

Gerhäuser, C. et al..: Cancer chemopreventive activitiy of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* 1:959-969, 2002

Halliwell, B.; Cutteridge *J. Free Radicals in Biology and Medicine*, 2ndEdition, Clarendon Press, Oxford, 1989.

Kaneda, H. et al.: Detection of Free Radicals in Beer Oxidation. *J. Food Sci*. 53, 1988.

Kaneda, H. et al.: Reducing Activity and Flavor Stability of Beer. *MBAA Tech. Quart.* 32, 1995.

Narziß, L.: Abriß der Bierbrauerei. 6. Aufl., Stuttgart, 1995.

Piendl, A.: Physiologische Bedeutung der Eigenschaften des Bieres. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2000.

Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity realtionships of flavanoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, No.7, 1996.

Ricken, K.-H.: Gesund mit Bier. Falken Verlag, Niederhausen/Ts. 1999.

Roeder, A.: Thermospray-HPLC-MS-Untersuchungen von Polyphenolen in unterschiedlichen Probenmaterialien pflanzlicher Herkunft. Dissertation TU Braunschweig, 1997. Papierflieger, Clausthal-Zellerfeld

Takoi, K., Kaneda, H., Kikuchi, T., Watari, J. und Takashio M.: Application of Compact High Performance ESR for Malt Quality Estimation. Poster Presentation, ASBC Annual Meeting 2002.

Walzl, M.: Vortrag anläßlich der Arbeitstagung des Bundes Österreichischer Braumeister und Brauereitechniker in Graz, Oktober 1999.

Uchida, M. and Ono, M.: Improvement for Oxidative Flavor Stability of Beer - Role of OH-Radical in Beer Oxidation. *J. Am. Soc. Brew. Chem*. 54, 1996.

Liste der Veröffentlichungen der Forschungsstelle 1

Neben den alljährlichen Vorträgen im Rahmen des Technologischen Seminars in Weihenstephan, das von der Forschungsstelle 1 organisiert wird, wurden folgende Veröffentlichungen geschrieben:

Back, W., Franz, O., and Nakamura, T. (2001). Das antioxidative Potenzial von Bier. Brauwelt. 6-7:209-215. (auch in der Brauwelt International)

Franz, O., and Back, W. (2001). DPPH-scavenging activity of beer and polyphenols measured by ESR. In: Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. Budapest 28: Fachverlag Hans Carl.

Franz, O., Back, W. (2002). Erfahrungen zur Messung von freien Radikalen mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometer in der Brauerei. Monatsschr. Brau. 7/8:156-162.

Franz, O., Back, W. (2003). Stability Index - A New Approach To Measure The Flavor Stability Of Beer. MBAA Tech. Quart. In Press.

Nakamura, T., Franz, O., and Back, W. (2001). pH dependence of antiradical activtiy of polyphenols, phenolic acids and sulfite. In: Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. Budapest 28: Fachverlag Hans Carl.

Liste der Veröffentlichungen der Forschungsstelle 2

Neben Vorträgen auf Fachtagungen (z.B. HPLC 2002, Deutscher Lebensmittelchemikertag, Regionaltagungen der Lebenmittelchemischen Gesellschaft) beinhalten folgende Veröffentlichungen Teilergebnisse dieses Forschungsvorhabens:

Kinitz C, Mellenthin A, Galensa R (2002): Narrow-bore HPLC-DAD-MS zur Polyphenolanalytik in Bier. Lebensmittelchemikertag, Frankfurt (Poster). In: Lebensmittelchemie (im Druck)

Papagiannopoulos M, Mellenthin A (2002): Automated sample preparation by pressurized liquid extraction – solid-phase extraction for the liquid chromatographic – mass spectrometric investigation of polyphenols in the brewing process. *J Chrom A* 976/1-2 pp. 345-348

Papagiannopoulos M, Zimmermann B, Mellenthin A, Krappe M, Maio G, Galensa R (2002): Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. *J Chrom A* 958 pp. 9-16

Papagiannopoulos M, Mellenthin A (2002): Selektive und effiziente Probenvorbereitung für die Polyphenolanalytik mittels HPLC-MS^n. Lebensmittelchemie 56:54

Kinitz C, Mellenthin A (2002): Methodenentwicklung für die Polyphenolanalytik mit LC-MS. Lebensmittelchemie 56:53

Kinitz C, Mellenthin A (2002): Polyphenolanalytik mittels „narrow-bore“-HPLC-DAD-MS. Anwendertreffen ASE und HPLC der Firma Dionex, Trier (Poster)

Zimmermann B, Papagiannopoulos M, Mellenthin A, Galensa R (2002): Extraktion von Polyphenolen aus Getreide mit der ASE. Anwendertreffen ASE und HPLC der Firma Dionex, Trier (Vortrag)

Papagiannopoulos M, Mellenthin A (2002): ASE-ASPEC-HPLC-MS: Automated sample preparation for the mass spectrometric investigation of polyphenols in the brewing process. Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers, Brügge, Belgien (Poster)

Mellenthin A, Papagiannopoulos M, Kinitz C (2001): Polyphenols in Brewing - Significance, Analysis and Characterization. Eurofoodchem XI, Norwich, Großbritannien (Poster)

Mellenthin A, Papagiannopoulos M, Kinitz C (2001): Bedeutung und Analytik von Polyphenolen im Brauprozess. Lebensmittelchemie 55: 143-144