

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>2</b>
<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>Methoden zur Untersuchung antioxidativer Eigenschaften</b>	<b>4</b>
Elektronenspinresonanz (ESR)	5
Lagtime und Antiradikalisches Verhalten (ARV)	7
Antiradikalisches Potential (ARP)	8
Reduktionsvermögen)	9
Chemilumineszenz	9
Feststoffmessung am ESR	10
Malzkaltauszüge	11
<b>Methoden zur Bestimmung phenolischer Einzelsubstanzen</b>	<b>12</b>
Beschleunigte Lösungsmittlextraktion	13
Festphasenanreicherung	13
LCMS-Untersuchungen	14
<b>Ergebnisse</b>	<b>17</b>
Veränderung phenolischer Substanzen bei der Mälzung	17
Einfluss der Gerstensorte und der Aufwuchsbedingungen auf den Polyphenolgehalt und die antioxidativen Eigenschaften der resultierenden Malze	22
Einfluss und Veränderung der Polyphenole beim Maischprozess	39
Einfluss und Veränderung der Polyphenole im fertigen Bier und während der Alterung	46
<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
<b>Literatur und Veröffentlichungen</b>	<b>55</b>

## Zusammenfassung

Im vorliegenden Forschungsprojekt wurden die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole und ihre Veränderung im Brauprozess untersucht. Die Zusammenarbeit zwischen einem lebensmittelwissenschaftlichen Institut und einem brauwissenschaftlichen Lehrstuhl ermöglichte es, die Zusammensetzung und Veränderung relevanter Polyphenole im Brauprozess zu klären und ihren Beitrag zur antioxidativen Aktivität von Bier zu ermitteln. Basierend auf den Erkenntnissen konnten technologische Empfehlungen zur Erhöhung der Geschmacksstabilität von Bier abgeleitet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Polyphenole antioxidativ wirken und sich positiv auf die Geschmacksstabilität des Bieres auswirken. Die Wirkung geschieht dabei vor allem im Sudhausbereich und geht vermutlich in erster Linie von niedermolekularen und noch nicht oxidierten Polyphenolen aus. Bei oxidierten phenolischen Substanzen kann eine prooxidative Wirkung nicht ausgeschlossen werden. Der Oxidationsschutz der Polyphenole ergänzt damit den im fertigen Bier dominierenden Schutz durch Schwefeldioxid hervorragend. Es kann empfohlen werden, die Polyphenole beim Mälzen möglichst zu schonen und erhöhte Gehalte beim Maischen anzustreben. Einer späteren Entfernung von Polyphenolen durch eine Stabilisierung steht unter dem Gesichtspunkt der Geschmacksstabilität nichts entgegen. Einträge oder Verschleppungen von oxidierten und möglicherweise polymerisierten Polyphenolen, zum Beispiel durch Glattwasser, sollten vermieden werden. Es muss berücksichtigt werden, dass die Auswirkungen dieser Empfehlungen auf andere Qualitätsmerkmale des Bieres sowie auf einige Prozessschritte wie zum Beispiel die Trubausfällung bei der Kochung noch nicht ausreichend untersucht wurden.

Bereits die Gerste und das Malz können auf ihre Polyphenolgehalte, die Verhältnisse der phenolischen Fraktionen zueinander und auf ihre antioxidative Aktivität hin untersucht werden. Diese Merkmale sind für die antioxidative Wirkung im weiteren Brauprozess entscheidend. Die Messung der freien Radikale bietet zusätzlich eine Möglichkeit, das Malz bezüglich seiner Aufwuchsbedingungen zu charakterisieren. So könnten diese Parameter verstärkt als neue Spezifikationen eingeführt werden.

„Das Forschungsziel des Vorhabens wurde erreicht!“

## Einleitung

### Geschmacksstabilität von Bieren und antioxidative Eigenschaften

Die Geschmacksstabilität stellt ein wichtiges Qualitätsmerkmal des Bieres dar. Unter der Geschmacksstabilität versteht man den Zeitraum, in dem die im Laufe des Alterungsprozess ablaufenden sensorischen Veränderungen des Bieres noch nicht wahrgenommen werden können. Dabei ist das Aroma des Bieres nie absolut stabil. Es ist vielmehr ständigen Veränderungen unterworfen, weshalb man auch von einer geschmacklichen Instabilität des Bieres spricht (Dalgliesh 1977).

Die Geschmacksstabilität wird von verschiedenen Parametern geprägt (vgl. Back 2005, 2006). Der Charakter des Bieres ist von entscheidender Bedeutung. Manche Aromen, die sich während der Alterung bilden, werden in einer Biersorte als negativ und in einer anderen hingegen als neutral oder sogar positiv empfunden. Positive Aromakomponenten (z.B. eine ausgeprägte Hopfenblume oder Ester) können Aromaeindrücke von Alterungskomponenten überdecken. Man spricht in diesem Zusammenhang von maskierenden Effekten durch aromapositive Substanzen. Im Verlauf der Alterung werden dann Bieraromen durch überwiegend oxidative Vorgänge abgebaut und Alterungsaromen aus den entsprechenden Precursor-substanzen gebildet. Diese oxidativen Reaktionen können durch antioxidative Bierinhaltsstoffe gehemmt oder verzögert werden. Die antioxidativen Eigenschaften des Bieres stellen also eine wichtige Einflussgröße der Geschmacksstabilität dar, wenngleich sie nicht die einzige sind (Back 2005, 2006).

Im fertigen Bier weist das durch die Hefe gebildete Schwefeldioxid mit Abstand die stärkste antioxidative Aktivität auf (Andersen 2000). Phenolische Substanzen, die aus der Gerste oder dem Hopfen stammen, besitzen ebenfalls antioxidative Eigenschaften (Bellmer 1995, Rice - Evans 1996, Walters 1997, Goupy 1999). Verschiedene Untersuchungen haben bereits Hinweise darauf erbracht, daß phenolische Substanzen die Geschmacksstabilität des Bieres erhöhen könnten (Kaneda 1995, Mikyska 2001, 2002, Aerts 2001, 2003). Dabei muss berücksichtigt werden, dass sich die Ergebnisse aufgrund spezieller Versuchsbedingungen (Zugaberversuche, forcierte Alterung) nicht absolut auf den Brauprozess und die natürliche Alterung übertragen lassen. Die antioxidative Wirkung von phenolischen Substanzen ist bei Bier - pH zudem vermutlich eingeschränkt (Nakamura 2001).

Antioxidative Aktivitäten phenolischer Substanzen wurden bisher bei pH-Werten im neutralen Bereich festgestellt, weshalb sie möglicherweise vor allem im Sudhaus wirken. Dementsprechend vermindert auch eine Stabilisierung mittels PVPP zwar die Polyphenolgehalte, aber nicht zwangsläufig die Geschmacksstabilität (Mikyska 2002, McMurrough 1996). Für eine Wirkung im Sudhaus wären vor allem die Malzpolyphenole von besonderem Interesse, da sie unmittelbar mit dem Einmaischen in den Brauprozess eingebracht werden, und so den ersten Oxidationsschutz darstellen. Ihre Gehalte werden neben der Mälzung vor allem durch die Sorte und die Bedingungen während des Gerstenaufwuchses, wie Klima, Boden und Agrotechnik, bedingt (Chapon 1969, Vrtelova 1976, Wen 2002). Goupy (1999) schlug bereits vor, die Geschmacksstabilität durch die Auswahl geeigneter Gerstensorten mit ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften zu erhöhen.

Ein ausführlicher Literaturüberblick über die Veränderung der Polyphenole im Brauprozess findet sich bei Franz (2004).

## **Methoden zur Untersuchung antioxidativer Eigenschaften**

Zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften wurden die folgenden Analysemethoden herangezogen:

### **Malz:**

- Radikalmessung am ESR (trocken)
- Chemilumineszenz

### **Malzkaltauszug und Würze:**

- Reduktionsvermögen
- Antiradikalisches Potential (ARP)

### **Bier:**

- Reduktionsvermögen
- Antiradikalisches Potential
- Lagtime
- Antiradikalisches Verhalten (ARV)

Unterstützend wurde ein Großteil der Proben auch nasschemisch auf phenolische Substanzen analysiert. Hierzu wurden die Methoden zur Bestimmung der Anthocyanogene und Gerbstoffe nach MEBAK (2.21.1 und 2.21.2, 1993) sowie die Bestimmung des Gehaltes an Tannoiden mittels des Analysengerätes (Tannometer) der Firma Pfeuffer, Kitzingen gemäß der Bedienungsanleitung herangezogen.

Auf die Bestimmung des Reduktionsvermögens, des antiradikalischen Potentials, der Lagtime und des antiradikalischen Verhaltens soll hier nur kurz eingegangen werden, da diese Methoden bereits im AiF-Abschlußbericht 12605 N ausführlich erläutert wurden. Sie wurden für dieses Projekt unverändert übernommen. Die Analysemethoden zur Radikalmessung in Feststoffen (Malz, trocken) und zur Untersuchung der Chemilumineszenz wurden im Rahmen dieses Projektes weiterentwickelt.

### Elektronenspinresonanz (ESR)

Zur Bestimmung der endogenen antioxidativen Aktivität wird die Methode nach Uchida et al. (1996) zur Messung der Lagtime angewendet. Hierbei wird entkohlensäueres Bier unter Zutritt von Luft einem Forciertest bei 60°C ausgesetzt. Abbildung 1 stellt die dabei in der Probe ablaufende Aktivierung von Sauerstoff stark vereinfacht dar. (Elstner 1990).

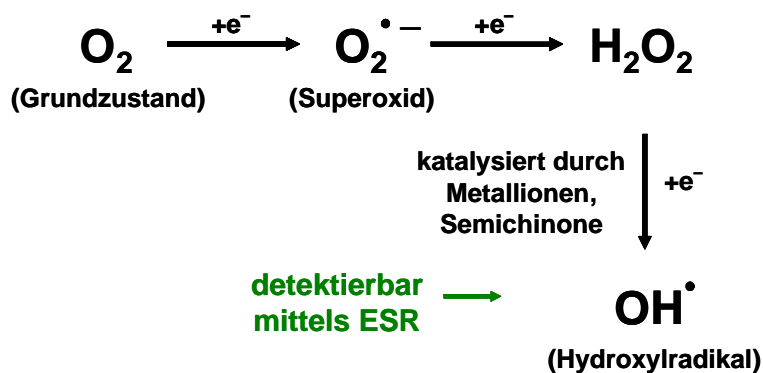


Abbildung 1: Aktivierung von Sauerstoff.

Das entstehende Hydroxylradikal nun reagiert unspezifisch mit verschiedensten Bierinhaltsstoffen und leitet deren Oxidation ein. Aufgrund der verhältnismäßig hohen Ethanolkonzentration im Bier bildet ein Großteil der Hydroxylradikale zuvor mit Ethanol das Hydroxyethylradikal als Zwischenprodukt. Mit einem Elektronenspinresonanzspektrometer (ESR; Fa. Bruker, Rheinstetten) kann nun die Bildung des

Hydroxyl- und des Hydroxyethylradikals und somit die Oxidation von Bierinhaltsstoffen analytisch verfolgt werden. Da Radikale sehr reaktiv und damit kurzlebig sind, müssen sie zur Messung stabilisiert werden, was mit dem Spin-Trap-Reagenz PBN (N-tert-Butyl-a-phenylnitron) geschieht.

Mit dem ESR werden die ungepaarten Elektronen der Radikale detektiert. Jedes Elektron stellt aufgrund seines Eigendrehimpulses eine bewegte Ladung dar und erzeugt somit ein Magnetfeld in Richtung seiner Rotationsachse. Die Felder gepaarter Elektronen heben sich dabei gegenseitig auf, wohingegen die Felder ungepaarter Elektronen detektiert werden können. Bei der Messung wird die Probe einem starken Magnetfeld ausgesetzt, wodurch sich deren Elektronen gleich- oder gegensinnig ausrichten (vgl. Abbildung 2).

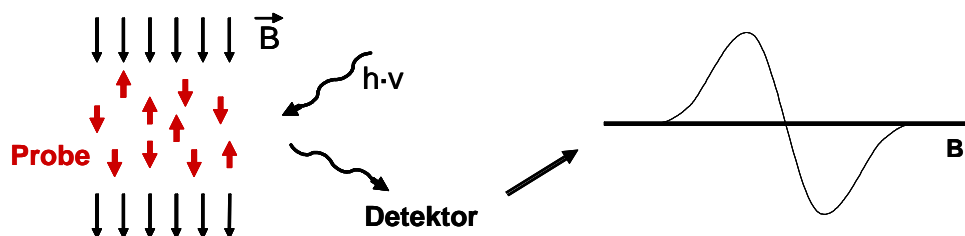
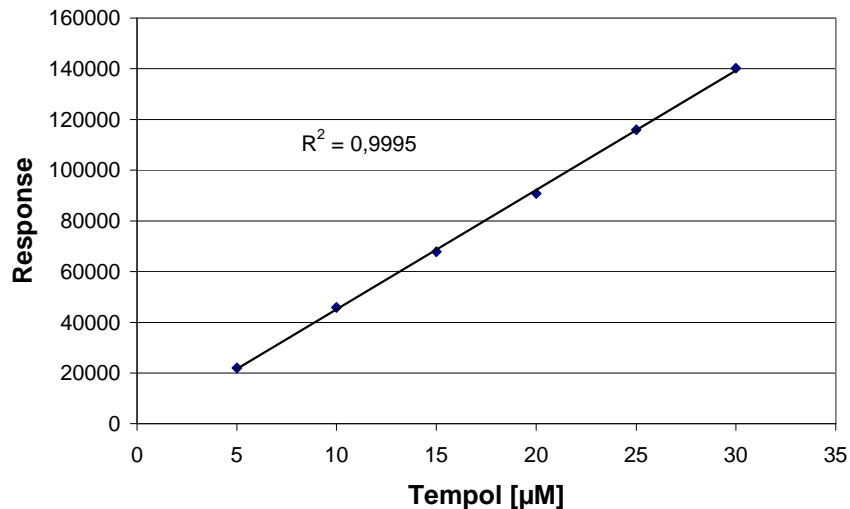


Abbildung 2: Messprinzip eines ESR.

Gleichzeitig wird die Probe mit elektromagnetischer Mikrowellenstrahlung bestrahlt, die nun unter Resonanzbedingungen mit den ausgerichteten Elektronen in Wechselwirkung tritt. Diese Wechselwirkung kann am Mikrowellendetektor gemessen werden. Bei korrekter Geräteeinstellung besteht zwischen der Amplitude des verstärkten Detektorsignals (Response) und der Konzentration an Radikalen ein annähernd linearer Zusammenhang (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Zusammenhang zwischen der Response und der Radikalkonzentration am Beispiel des stabilen Radikals Tempol.**

### Lagtime und Antiradikalisches Verhalten (ARV)

Abbildung 4 stellt die Radikalentstehung im Forciertest bei 60°C anhand einer Bierprobe dar. Die aufgenommene Kurve zeigt zwei charakteristische Merkmale: Den Beginn der Radikalbildung und die Bildungsrate. Die Verringerung der Bildungsrate ab 160 min und das Endniveau haben keine Aussage, da sie auf Sättigungseffekte und einen zunehmenden Zerfall der gebildeten Spin-Addukte zurückzuführen sind. Vorversuche haben gezeigt, dass die Zeit bis zur Bildung der ersten Hydroxylradikale, die so genannte Lagtime, in Bier in hohem Maße durch den Schwefeldioxidgehalt beeinflusst wird. Die Einflussgrößen auf die Radikalbildungsrate sind noch weitgehend unbekannt. Möglicherweise werden hier einerseits die Wirkungen von Reduktionen als auch prooxidative Eigenschaften erfasst. So zeigt zum Beispiel Bier mit erhöhten Konzentrationen an Metallionen, die die Radikalgenerierung katalysieren können, deutlich erhöhte Radikalbildungsraten (Uchida 1999).

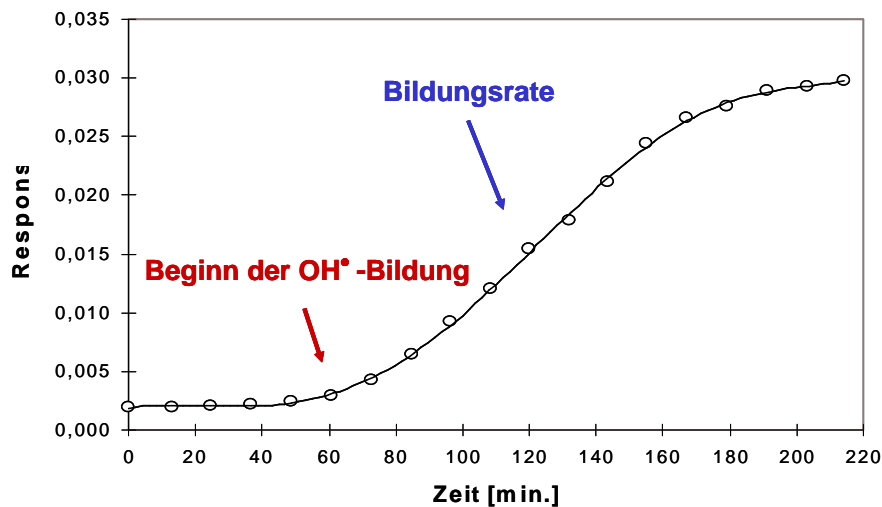


Abbildung 4: Radikalgenerierung während eines oxidativen Forciertests von Bier.

Bei der Messung der Lagtime nach Uchida (1996) wird der Beginn der Radikalbildung durch die Berechnung des Schnittpunkts zweier Regressionsgeraden erfasst. Die berechneten Werte sind gegenüber dem ersten Anstieg der Kurve tendenziell leicht erhöht.

Bei der Bestimmung des ARV wird die Fläche unter der Kurve über 120 min integriert und ihre relative Differenz zu der Fläche eines Referenzbieres mit sehr geringer antioxidativer Aktivität berechnet. Das ARV beschreibt damit als Mischgröße sowohl die Lagtime, als auch die Bildungsrate, wobei erstere dominiert.

### Antiradikalisches Potential (ARP)

Eine weitere ESR-Analyse stellt das Antiradikalische Potential dar. Bei der Bestimmung des ARP wird die Reduktion des stabilen Radikals DPPH durch die Probe (Bier) bei 20°C über 10 min verfolgt. Zur Auswertung wird die relative Abnahme des Radikals berechnet. Hierbei gehen wiederum die Flächen unter dem Graphen in die Berechnung ein, wodurch nicht nur die Differenz zwischen der DPPH-Konzentration zu Beginn und zum Ende der Messung berücksichtigt wird, sondern auch die Reduktionskinetik. Das ARP wird stark durch den Polyphenolgehalt geprägt (Abbildung 5, Franz 2004) und zeigt nach neueren Untersuchungen auch einen guten Zusammenhang zum elektrochemischen Redoxpotential des Bieres (Wurzbacher 2006).



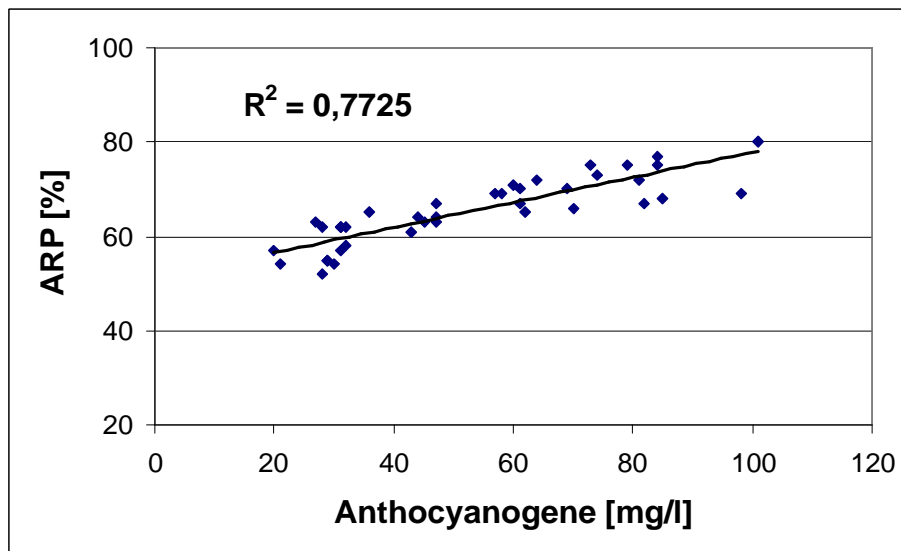


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen dem ARP und dem Gehalt an Anthocyanogenen bei einer Marktanalyse von 40 Bieren (Franz 2004).

### Reduktionsvermögen

Bei der Bestimmung des Reduktionsvermögens wird die Reduktion des farbigen Reagenzes DPI durch die Probe (Bier) photometrisch verfolgt. Die Methode ist in der Analysensammlung der MEBAK (2.20.1, 1993) beschrieben.

### Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenzmessung ermöglicht eine Echtzeitmessung von chemischen Reaktionen. Bei jedem Elektronenübergang von einem Energieniveau auf ein niedrigeres, wird die Energiedifferenz der beiden Energieniveaus in Form von Licht abgestrahlt. Bei der Chemilumineszenzmessung detektiert man diese abgestrahlten Photonen und damit die Elektronenübergänge. Da jede Redoxreaktion durch Elektronenübergänge gekennzeichnet ist, lassen sich Oxidationsreaktionen besonders einfach nachweisen. Bei der Messung wird ein unvollständiges Reaktionsgemisch in die Probenschale vorgelegt. Die Reaktion wird kurz nach Messbeginn durch die Zugabe des fehlenden Reagenzes beziehungsweise eines Lösungsmittels gestartet. Malz lässt sich auf diese Art bezüglich seines Einmischverhaltens charakterisieren. Dieses stellt ein Maß für dessen Reaktivität und Oxidationsneigung dar. Franz (2004) konnte bereits zeigen, dass bei Abwesenheit von Sauerstoff bei der Messung von Malz nahezu kein Signal detektierbar ist, wodurch bestätigt wurde,

dass nur Oxidationsreaktionen erfasst werden. Die Weiterentwicklung der Methode wurde bereits im Zwischenbericht abgehandelt. Zur Messung wird das Malzschrot in die auf Einmischtemperatur temperierte Reaktionskammer vorgelegt. Dann wird das ebenfalls temperierte Wasser zugegeben, wodurch die Reaktionen ausgelöst werden. Die gemessene Signalhöhe (Counts pro Sekunde) ist ein Maß für die augenblickliche Reaktionsgeschwindigkeit. Zur Auswertung wird der aufgezeichnete „Einmischpeak“ integriert. Der erhaltene Wert stellt grob die Summe aller Reaktionen im Integrationszeitraum dar. Abbildung 6 zeigt das Einmischverhalten zweier Malze bei unterschiedlichen Messbedingungen.

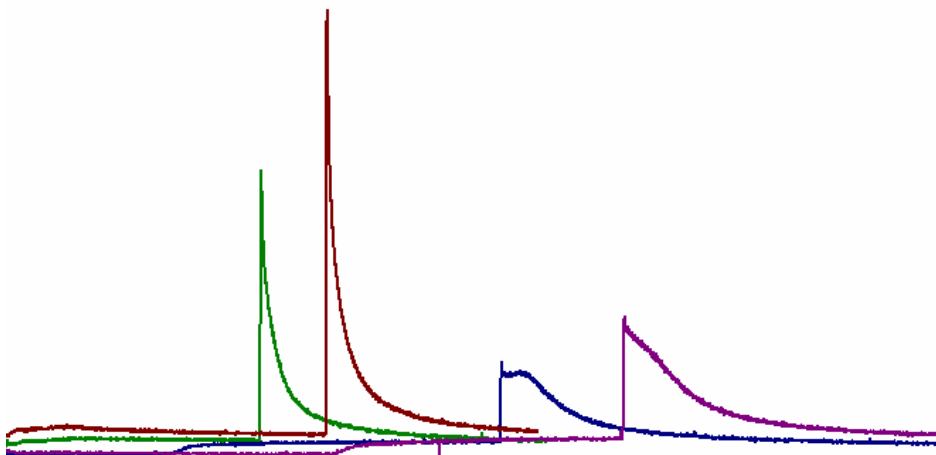
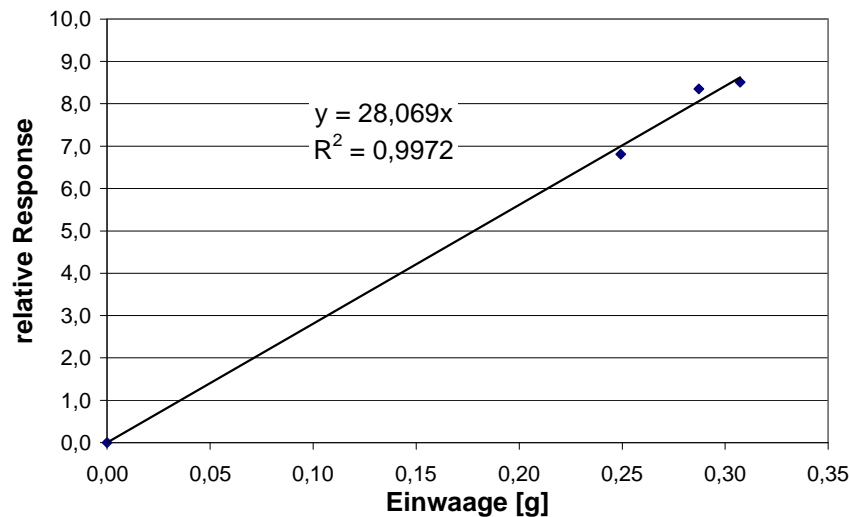


Abbildung 6: Chemilumineszenzsignale zweier Malze bei zwei unterschiedlichen Messbedingungen: blau – Malz A kalt, grün – Malz A warm, lila – Malz B kalt, rot – Malz B warm.

### Feststoffmessung am ESR

Die Methode zur Feststoffmessung am ESR wurde so verändert, dass Radikale in Malz oder Gerste nun quantitativ gemessen werden können (vgl. Zwischenbericht). Da die Radikale in Feststoffen mangels Lösungsmittel relativ stabil sind, ist hierzu kein Spintrap-Reagenz nötig. Auf eine Kalibrierung mit einem stabilen Radikal wurde verzichtet, da das verwendete Gerät mit einem internen Marker ( $Mn^{2+}$ ) ausgestattet ist, auf den die Responsewerte bezogen werden können. Zur Messung wird die Probe vermahlen und das Mehl unmittelbar im Anschluss im ESR gemessen. Die Messung wird mit neuem Probenmaterial jeweils ein bis zweimal wiederholt. Die Messwerte (relative Response = Response [Probe] / Response [Marker].) werden dann in Abhängigkeit von ihrer Einwaage in ein Diagramm eingetragen, woraufhin

durch die Werte eine Ausgleichsgerade durch den Ursprung gelegt wird (Abbildung 7). Die Steigung der Geraden ist ein Maß für die Radikalkonzentration der Probe.



**Abbildung 7: Radikalmessung am Beispiel eines Malzes.**

Sowohl bei der Chemilumineszenzmessung als auch bei der Radikalbestimmung ist ein konstantes Mahlergebnis von entscheidender Bedeutung. Messungen mit unterschiedlichen Mühlen oder Mühleneinstellungen, beziehungsweise unterschiedlichen Mahlparametern wie Probenmenge, Zeit und Temperatur sind nicht vergleichbar. Zudem muss bei den Analysen die Homogenität der eingewogenen Proben gewährleistet sein.

### **Malzkaltauszüge**

Um die nasschemischen Untersuchungen und die antioxidativen Tests auch an den Malzproben durchführen zu können, wurde eine Methode zur Herstellung von Malzkaltauszügen entwickelt (vgl. Zwischenbericht). Zur nasschemischen Untersuchung der Malze auf phenolische Substanzen musste deren Oxidation während der Probenvorbereitung unterbunden werden. Dazu wurde das Malzmehl bei 20°C mit einer Ascorbinsäurelösung, die mittels Eisessig auf pH 2,5 eingestellt worden war, während 30 Minuten extrahiert (Malz : Lösung = 1 : 10). Die Ascorbinsäurelösung wirkt in dieser Konzentration antioxidativ und die pH-Absenkung bewirkt eine Hemmung der Enzyme und setzt gleichzeitig die Reaktivität phenolischer

Verbindungen herab. Zudem wird durch den niedrigen pH-Wert die Auflösung des Malzmehls gefördert. Die Kaltauszüge konnten nun auf Anthocyanogene und Tannoide untersucht werden. Die Methode zur Bestimmung der Gesamtpolyphenole (Gerbstoffe) musste leicht abgewandelt werden. Um die Probe in den für die Farb-reaktion nötigen pH-Bereich von etwa 10 zu bringen wurden anstatt der 0,5 ml 30%iger Ammoniaklösung 2 ml 50%iger Lösung zugegeben.

Bei der Herstellung der Kaltauszüge zur Durchführung der antioxidativen Tests wurde auf ein Antioxidationsmittel und die pH-Absenkung verzichtet, da dadurch die Analytik beeinträchtigt worden wäre. In den so gewonnenen Kaltauszügen konnten nun das ARP und das Reduktionsvermögen bestimmt werden. Die Messung des ARV war nicht möglich, da die Auszüge nicht hitzestabil waren. Mögliche Oxidationsreaktionen während der Probenaufbereitung sowie die verminderte Extraktion des Malzmehls aufgrund des höheren pH-Wertes schränkten die Aussagekraft dieser Analysen und die Vergleichbarkeit mit den Analyseergebnissen der sauren Kaltauszüge vermutlich ein.

## **Methoden zur Bestimmung von phenolischen Einzelsubstanzen**

Zur Bestimmung der Polyphenole als Einzelsubstanzen in Forschungsstelle 2 wurden die folgenden Analysemethoden verwendet:

### **Malz:**

- Extraktion der Polyphenole mit beschleunigter Lösungsmittlextraktion (ASE)
- Anreicherung der Polyphenole durch Festphasenextraktion (SPE)

### **Würze und Bier:**

- Anreicherung der Polyphenole durch Festphasenextraktion

### **Extrakte der Festphasenanreicherung:**

- Bestimmung von Einzelsubstanzen (LCMS)

Die Methode zur Bestimmung der phenolischen Einzelsubstanzen im Rahmen dieses Projektes entspricht weitestgehend der des Vorgänger-Projektes und wurde bereits

im Abschlussbericht zum AiF-Projekt 12605 N beschrieben. Hier soll besonders auf die weitere Methodenoptimierung hingewiesen werden. Die Analysenparameter werden hier nur schematisch vereinfacht dargestellt, soweit es zum Verständnis der Untersuchungen erforderlich ist. Die genauen Analysenparameter einschließlich Geräteeinstellungen werden in der in Vorbereitung befindlichen Dissertation (Kinitz) wiedergegeben.

### **Beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE)**

Die Extraktion der Polyphenole aus dem festen Probenmaterial Gerste und Malz erfolgt durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE 200, Fa. Dionex). Das Probenmaterial wird zunächst bei Raumtemperatur in einer Kugelmühle fein gemahlen, anschließend unter erhöhtem Druck (200 bar) und erhöhter Temperatur (60°C) zunächst mit n-Pentan, anschließend mit einem Aceton/Wasser-Gemisch (55/45 v/v) extrahiert. Durch kurze Analysenzeiten und teilweises Arbeiten unter Stickstoff wird die Gefahr der Artefaktbildung bei der Extraktion vermindert.

Die zunächst für Hopfenuntersuchungen verwendete apolare Vorextraktion (Pentan) der Proben wird nun auch auf die Gersten- und Malzanalysen angewandt. Hierdurch wurde die weitere Verarbeitung der Extrakte durch Festphasenanreicherung erleichtert.

### **Festphasenanreicherung (SPE)**

Da bei der beschleunigten Lösungsmittlextraktion nicht nur Polyphenole, sondern auch andere Inhaltsstoffe (z. B. Kohlenhydrate) extrahiert werden, erfolgt die weitere Aufarbeitung der ASE-Extrakte zur Abtrennung dieser störenden Substanzen und Konzentrierung der Analyten mittels Festphasenextraktion. Die flüssigen Würze- und Bierproben werden ebenfalls gereinigt und konzentriert.

Nach vollständiger Adsorption der Analyten (Proanthocyanidine, Phenolcarbonsäuren, Flavonolglykoside) auf dem Polyamid-Adsorbentmaterial unter Diskriminierung der unerwünschten Stoffe soll die vollständige Desorption mit einer möglichst geringen Menge an organischem Lösungsmittel (hier: Dimethylsulfoxid) erfolgen. Polyamid ist hier dem von anderen Arbeitsgruppen verwendeten C18-Material als Phasenmaterial vorzuziehen, da es eine größere Affinität zu phenolischen Stoffen und eine geringere zu den Störsubstanzen besitzt.

Die im Rahmen des AiF-Projektes 12605N erarbeitete Methode zur Anreicherung von Polyphenolen an käuflichen Polyamid-Festphasenkartuschen mithilfe eines Pipettierroboters (ASPEC, Fa. Abimed) wurde weiter miniaturisiert. Es werden nun Kartuschen mit einer geringeren Menge (500mg) an Adsorbermaterial eingesetzt, wodurch die Analysenzeit für diesen Schritt der Probenvorbereitung deutlich verkürzt werden konnte und sich die zur Desorption der Analyten benötigte Lösungsmittelmenge weiter verringert (1ml). Weiterhin kommt nun ein verändertes Elutionsmittel (Dimethylsulfoxid) zum Einsatz.

### **LCMS-Untersuchungen**

Die Bestimmung der Polyphenole erfolgt mit der im AiF-Projekt 12605N entwickelten HPLC-MS<sup>n</sup>-Methode. Die interessierenden Inhaltsstoffe werden durch Gradientenelution (Wasser/Acetonitril) innerhalb von 100 Minuten auf einer Säule mit Umkehrphasenmaterial (AQUA, Fa. Phenomenex; 2.0x150mm, 3 $\mu$ ) getrennt und anschließend mit einem UV-Diodenarraydetektor (UVD 340S, Fa. Dionex) detektiert und quantifiziert. Da nur sehr wenige phenolische Bierinhaltsstoffe als käufliche Standards erhältlich sind und daher die Peakzuordnung mittels Retentionszeit und UV-Spektrum nicht immer möglich ist, wird die Identifizierung durch ein nachgeschaltetes Massenspektrometer mit Ionenfalle (LCQ Classic; Fa. ThermoFinnigan) abgesichert. Zur Verbesserung der Ionisierung wird dem HPLC-Fluss vor dem Massenspektrometer eine geringe Menge Methanol zudosiert.

Abbildung 8 zeigt den schematischen Aufbau des Ionenfallen-Massenspektrometers. Durch schonende Ionisierung im Elektrospray-Interface (ESI) entstehen zunächst Quasi-Molekularionen, die anschließend in der Ionenfalle (Ringelektrode + Abschirmelektroden) gesammelt und dann durch Kollision mit Helium fragmentiert werden. Durch mehrstufige Fragmentierungsexperimente kann bei unbekanntem Substanzen anhand typischer Fragmentmuster eine Aussage über Stoffklasse und ggf. Struktur gemacht werden. So kann die Sequenz der Monomerenbausteine in Proanthocyanidinen bestimmt werden (Friedrich 2000) oder die Art der gebundenen Zucker in Glykosiden (Roeder 1997).

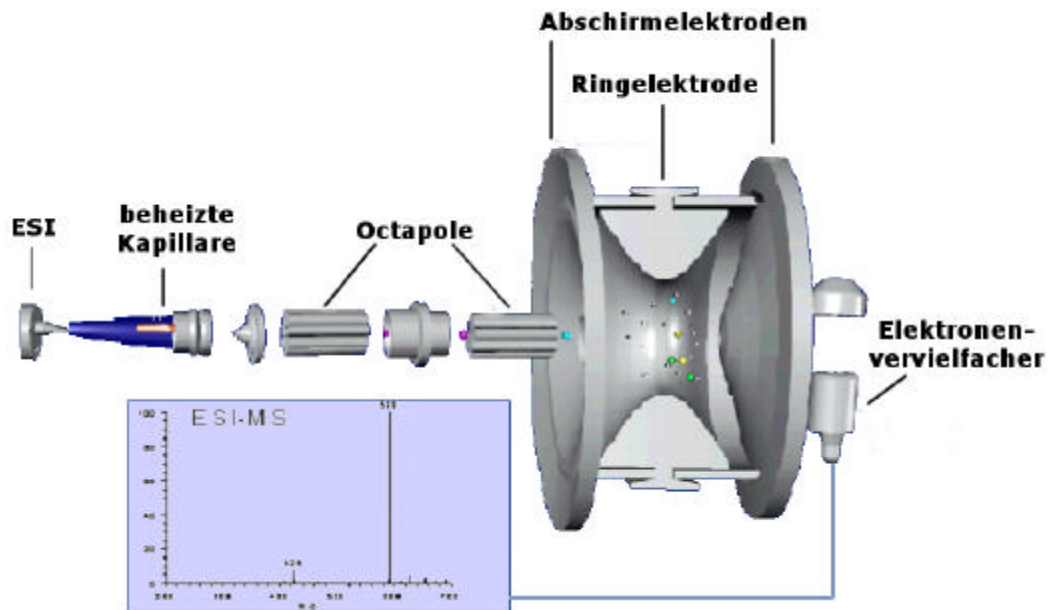


Abb. 8: schematische Darstellung des Ionenfallen-Massenspektrometers

Mithilfe des Massenspektrometers können auch Peaküberlagerungen nachgewiesen werden, die bei alleiniger UV-Detektion zu falschen quantitativen Daten führen könnten. Abbildung 9 verdeutlicht, dass in der Gruppe der Proanthocyanidine Minorbestandteile mit den Haupt-Komponenten überlagern.

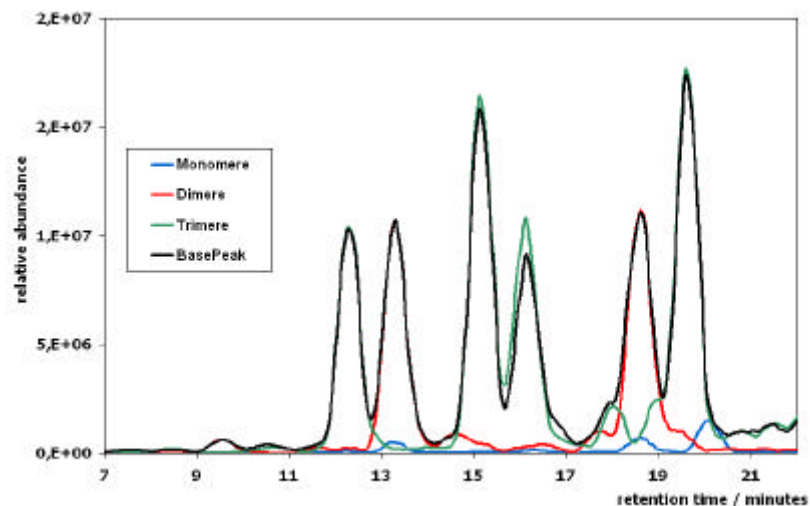
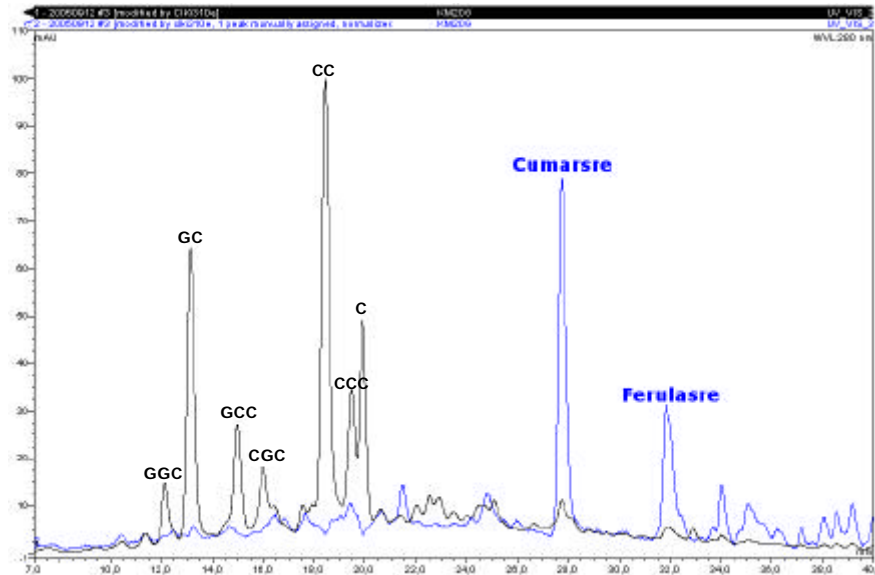


Abbildung 9: Basepeak-Darstellung und Massenspuren der Proanthocyanidin-Monomere, -Dimere und -Trimere

Als phenolische Hauptbestandteile in Gerste und Malz wurden Proanthocyanidin-Dimere und -Trimere sowie Hydroxyzimtsäuren identifiziert. Abbildung 10 zeigt exemplarisch das UV-Chromatogramm eines Gerstenextraktes.



**Abbildung 10: UV-Chromatogramm Gerstenextrakt, 280nm (schwarz) und 310nm (blau)**

**GGC: Gallocatechin-Galocatechin-Catechin (Prodelphinidin C2); GC: Gallocatechin-Catechin (Prodelphinidin B3); GCC: Gallocatechin-Catechin-Catechin; CGC: Catechin-Galocatechin-Catechin; CC: Catechin-Catechin (Procyanidin B3); CCC: Catechin-Catechin-Catechin (Procyanidin C2); C: Catechin; Cumarsäure: p-Cumarsäure; Ferulasäure: t-Ferulasäure;**

Auf die Grenzen der Massenspektrometrie und die Vorteile der Kombination aus UV- und massenspektrometrischer Detektion wurde bereits im Abschlussbericht zu Projekt 12605N hingewiesen.



## Ergebnisse

### Untersuchung der Veränderung phenolischer Substanzen bei der Mälzung

In einem Vorversuch wurde die Veränderung phenolischer Substanzen während der Mälzung untersucht. Eine ausgeweitete Untersuchung unter systematischer Variation aller Mälzungsparameter ist für die Zukunft geplant. Da der Schwerpunkt dieses Projektes jedoch beim Brauprozess und fertigen Bier lag, wurden entsprechende Versuche zugunsten anderer Untersuchungen zurückgestellt. Vier zugelassene Braugersten aus je zwei Sorten und Anbaugebieten (Ernte 2004), die sich bezüglich ihrer Polyphenolausstattung deutlich unterschieden, wurden für den Versuch ausgewählt. Die Gersten wurden nach MEBAK (2.5.3.1., 1997) standardvermälzt. In einer weiteren Mälzung sollte durch die Variation des Weichgrades versucht werden, ähnliche Gehalte an löslichem Stickstoff einzustellen. Entgegen der Erwartung unterschieden sich die Malze bezüglich ihrer cytolytischen und proteolytischen Lösung allerdings deutlich. Die Gehalte an löslichem Stickstoff fielen insgesamt höher als erwartet aus, wofür keine Erklärung gefunden werden konnte. Die Analyseergebnisse der Malze sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Analyseergebnisse der Gersten und Malze:**

**Friab – Mürbigkeit [%]; Rohprot – Rohprotein [% wfr.]; lösl.N – löslicher Stickstoff [mg/100g Trs.]; ELG – Eiweißlösungsgrad [%]; Polys – Gerbstoffe [mg/l Kaltauszug]; Tann – Tannine [mg/l PVP im Kaltauszug]; Anthos – Anthocyanogene [mg/l Kaltauszug]; ARP [%, Kaltauszug]; ESR – Radikalgehalt [relative Response/g]; WG – Weichgrad[%].**

Gerste											
Sorte	Gebiet	Friab	Rohprot	lösl.N	ELG	Polys	Tann	Anthos	ARP	ESR	WG
2	B	-	11,2		-	171	48	45	31	22,3	-
3	B	-	11,1		-	157	34	34	27	18,8	-
2	F	-	9,2		-	180	57	49	25	22,5	-
3	F	-	9,9		-	171	43	39	24	23,5	-
Std.malz											
Sorte	Gebiet	Friab	Rohprot	lösl.N	ELG	Polys	Tann	Anthos	ARP	ESR	WG
2	B	94,0	10,3	725	44,0	156	58	47	37	25,6	45
3	B	87,3	10,5	828	49,3	185	38	44	35	26,1	45
2	F	93,2	8,6	634	46,1	215	73	70	44	30,5	45
3	F	84,4	9,4	739	49,1	146	49	44	38	25,7	45
Malz (zielvermälzt)											
Sorte	Gebiet	Friab	Rohprot	lösl.N	ELG	Polys	Tann	Anthos	ARP	ESR	WG
2	B	82,6	10,1	786	48,6	160	65	55	36	19,7	42
3	B	71,8	10,3	830	50,4	144	52	42	34	19,8	42
2	F	92,3	8,5	746	54,9	177	82	67	40	23,3	45
3	F	78,5	9,6	784	51,0	161	56	46	37	21,9	43

Zusätzlich zur Bestimmung der phenolischen Inhaltsstoffe als Summenparameter wurden auch verschiedene Proanthocyanidine und Hydroxyzimtsäuren als Einzelsubstanzen bestimmt. Hydroxybenzoesäuren wie Gallus- und Vanillinsäure konnten aufgrund von Peaküberlagerungen mit Proanthocyanidinen nicht quantitativ bestimmt werden. Hier konnte auch durch die Kombination von UV- und massenspektrometrischer Detektion keine Verbesserung erzielt werden, da die Hydroxybenzoesäuren nur sehr schlecht ionisiert werden und daher nur äußerst schwache Signale im Massenspektrometer hervorrufen. Die quantitativen Ergebnisse der Gersten- und Malzuntersuchungen finden sich in Tabelle 2.

**Tabelle 2: Analyseergebnisse, Bestimmung von Einzelsubstanzen.**

Gehaltsangaben jeweils in mg/kg; Erläuterung der Abkürzungen: siehe Abbildung 10; S Proanthos: Summe der 7 quantifizierten Proanthocyanidine.

Gerste											
Sorte	Gebiet	C	ProD B3	ProC B3	ProD C2	ProC C2	GCC	CGC	S Proanthos	Cumarsre	Ferulasre
2	B	29,0	51,3	76,9	7,2	22,7	12,6	9,7	209,4	n.q.	n.q.
3	B	29,5	48,4	77,7	8,2	22,3	17,8	12,4	216,2	0,8	0,6
2	F	22,5	95,3	99,1	33,6	29,9	42,8	30,1	353,4	0,6	0,4
3	F	34,9	91,5	97,0	31,4	27,4	44,6	29,2	355,9	0,6	0,4
Std. Malz											
Sorte	Gebiet	C	ProD B3	ProC B3	ProD C2	ProC C2	GCC	CGC	S Proanthos	Cumarsre	Ferulasre
2	B	10,3	56,7	57,3	56,3	36,3	63,6	37,2	317,7	0,2	0,5
3	B	6,3	32,5	38,1	28,4	27,0	39,7	22,0	194,0	0,2	0,5
2	F	9,7	52,9	61,7	50,5	42,4	62,3	38,4	317,9	0,2	0,5
3	F	3,2	32,7	39,8	23,7	26,8	30,9	20,4	177,5	0,2	0,5
Malz (zielvermälzt)											
Sorte	Gebiet	C	ProD B3	ProC B3	ProD C2	ProC C2	GCC	CGC	S Proanthos	Cumarsre	Ferulasre
2	B	11,6	91,6	87,0	29,8	25,7	39,4	24,8	309,9	n.q.	n.q.
3	B	12,5	43,8	51,1	12,0	14,8	18,8	13,0	165,9	0,6	1,0
2	F	8,0	87,9	98,6	36,0	36,8	50,8	33,5	351,5	0,5	0,9
3	F	3,6	26,5	30,5	16,6	16,8	20,2	13,7	127,9	0,2	0,4

Wie schon von Friedrich (2000) festgestellt wurde, werden die Gehalte an Proanthocyanidinen im Verlauf der Mälzung geringer. Unerklärbar ist nur die deutliche Zunahme an Proanthocyanidinen bei Sorte 2 in Anbaugebiet B.

Der in der Tabelle angegebene Wert „Summe der Proanthocyanidine“ bezieht sich nur auf die 7 hier quantifizierten Proanthocyanidine und dient dem einfacheren Vergleich der Proben. Er ist nicht gleichzusetzen mit dem nasschemisch bestimmten Summenparameter „Gerbstoffgehalt“.

Abbildung 11 zeigt, dass sich während der Mälzung nicht nur der Gesamtgehalt sondern auch das Polyphenolmuster, also das Verhältnis der Einzelsubstanzen zueinander, verändert.

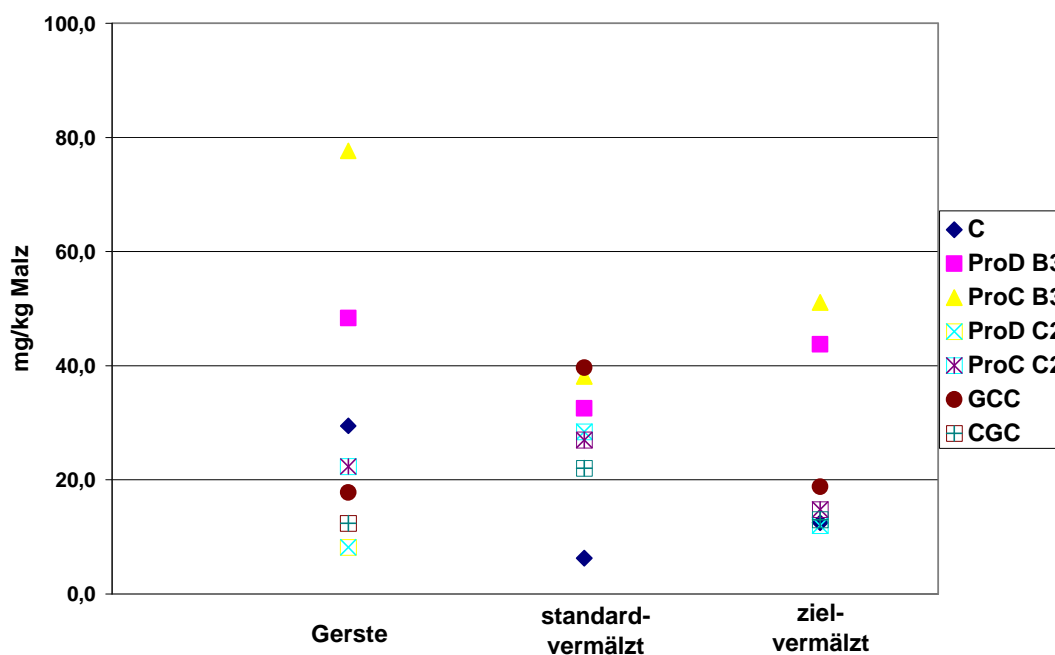


Abbildung 11: Gehalte der Einzelsubstanzen, Sorte 3, Anbaugebiet B

Die Gerbstoffgehalte der Kaltauszüge aus den Gersten und Malzen schwankten im Bereich von rund 140 bis 220 mg/l. Da die Kaltauszüge mit einer Einwaage von 10 g pro 100 ml Lösung hergestellt worden waren, ließen sich daraus Gerbstoffgehalte der Proben im Bereich von mindestens 1,4 bis 2,2 g/kg Gerste bzw. Malz ableiten. Die tatsächlichen Gehalte hingen von der unbekanntem Extraktionsausbeute ab und lagen somit möglicherweise höher.

Anhand der vorhandenen Daten konnten keine Zusammenhänge zwischen den Lösungseigenschaften der Malze oder den Mälzungsparametern und den Gehalten an phenolischen Substanzen festgestellt werden. Die nasschemisch bestimmten Polyphenolgehalte der Malze waren zudem unabhängig von den Polyphenolgehalten der Gersten. Für diese Analysen standen nur geringe Probenmengen zur Verfügung. Aus diesem Grund und bedingt durch die geringe Probenanzahl und größere Streuung der Gerbstoffanalysen ist dieses uneinheitliche Ergebnis allerdings eingeschränkt zu bewerten.

Auch der Proteingehalt hatte keinen Einfluss. Die Messung des Radikalgehaltes der Gersten und Malze zeigte hingegen gute Zusammenhänge zum Polyphenolgehalt und zum Antiradikalischen Potential (ARP) der Kaltauszüge (Abbildung 12 und 13). Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Polyphenolgehalt und dem ARP ergab

sich nur innerhalb der Malze (Abbildung 14). Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass der Probenumfang in Anbetracht der Vielzahl der variierten Parameter (Probenart, Sorte, Gebiet, Mälzung) zu klein war um statistisch abgesicherte Aussagen machen zu können.

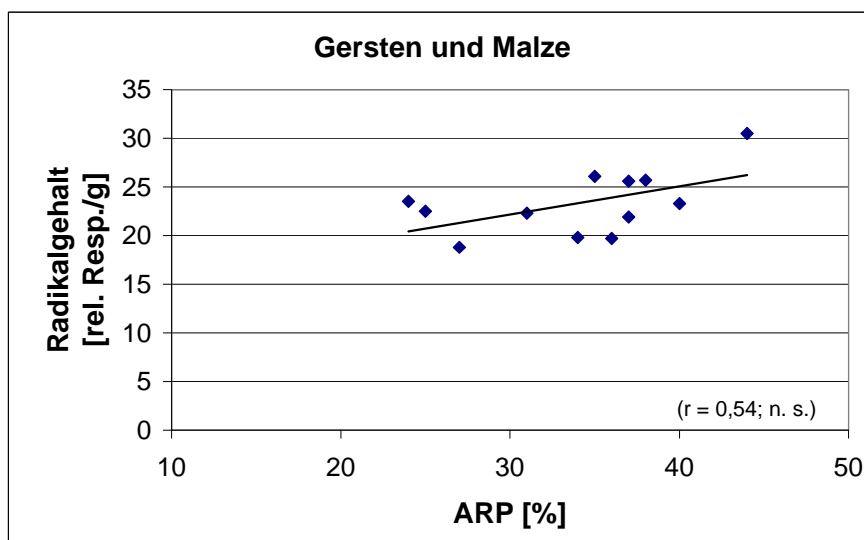


Abbildung 12: ARP und Radikalgehalt der Gersten und Malze.

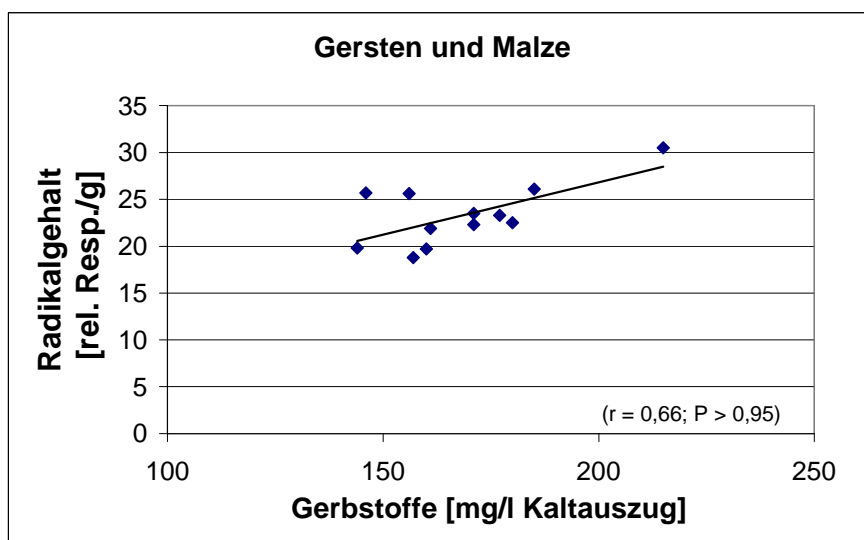


Abbildung 13: Gerbstoff- und Radikalgehalt der Gersten und Malze.

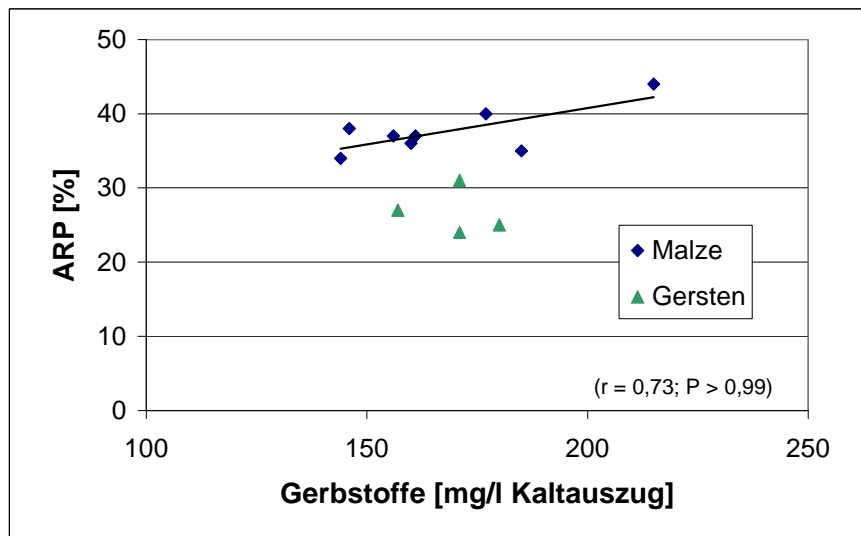


Abbildung 14: Gerbstoffgehalt und ARP der Gersten und Malze.

Der Radikalgehalt der Gersten und Malze wird vermutlich einerseits durch oxidative Belastungen und andererseits durch die Stoffwechselaktivität in vorangegangenen Prozessschritten geprägt. Er ermöglicht somit eine Aussage über die klimatischen und technologischen Verhältnisse vom Wachstum der Gerste bis hin zur Mälzung. Das im Vergleich zu den Malzen niedrigere ARP der Gersten bei vergleichbarem Polyphenolgehalt ließ zwei Schlussfolgerungen zu: das ARP könnte zusätzlich zu den phenolischen Verbindungen noch durch weitere reduzierend wirkende Substanzgruppen, z. B. Melanoidine geprägt worden sein, die in der Gerste in niedrigeren Konzentrationen vorlagen. Andererseits könnten die Ergebnisse auch einfach die besseren Lösungseigenschaften des Malzes widerspiegeln. Da die Kaltauszüge für die antioxidativen Tests im Gegensatz zu den Kaltauszügen zur Bestimmung phenolischer Substanzen bei natürlichem pH-Wert durchgeführt wurden, hatten sich hierbei möglicherweise deutlich weniger Substanzen aus dem Gerstenmehl gelöst. Letzterem widersprach allerdings, dass die Gerbstoffkonzentrationen von Malz und Gerste in vergleichbarer Größenordnung bestimmt wurden.

## Untersuchung des Einflusses der Gerstensorte und der Aufwuchsbedingungen auf den Polyphenolgehalt und die antioxidativen Eigenschaften der resultierenden Malze

Für die Untersuchung wurden Gersten aus 7 Sorten, die in vier Anbaugebieten angepflanzt worden waren, standardvermälzt (Ernte 2003). Die Malze unterschieden sich in Abhängigkeit von Sorte und Aufwuchsbedingungen teilweise deutlich in ihren Lösungseigenschaften und in ihrem Proteingehalt (Abbildung 15 bis 19). Dasselbe galt für die Gerbstoffgehalte, wobei der Einfluss der Aufwuchsbedingungen gegenüber dem der Sorte augenscheinlich dominierte (Abbildung 20 und 21).

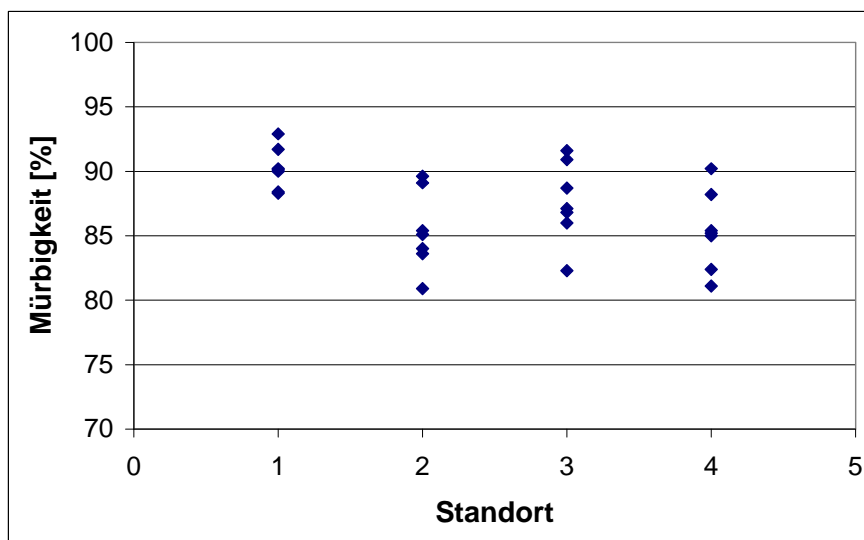


Abbildung 15: Cytolytische Lösung der Malze in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen (Standort).

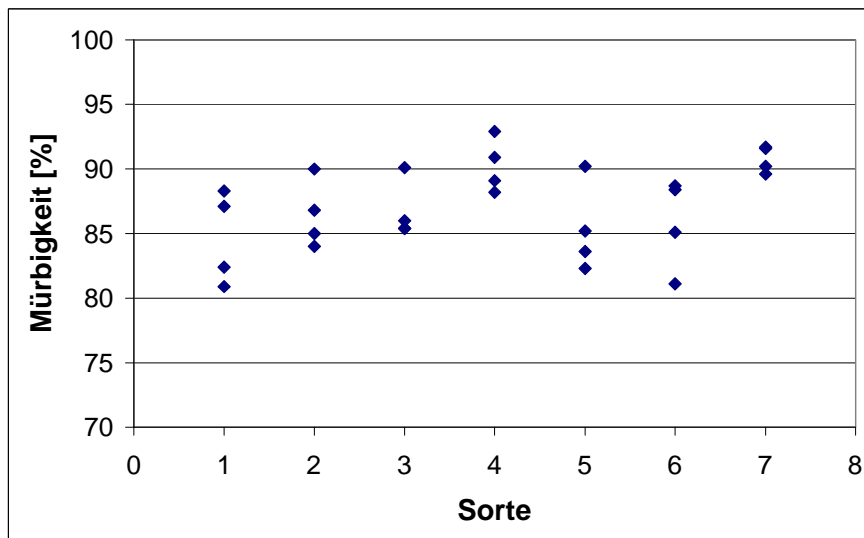


Abbildung 16: Cytolytische Lösung der Malze in Abhängigkeit von der Gerstensorte.

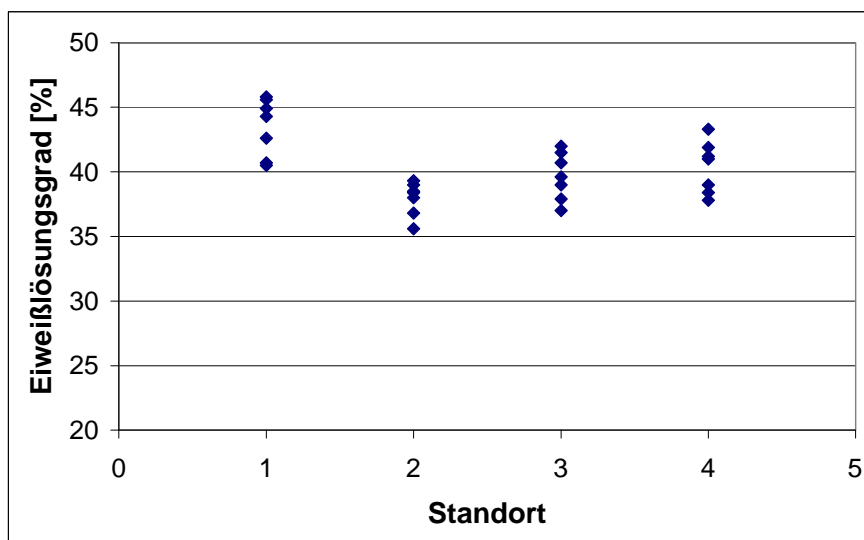


Abbildung 17: Proteolytische Lösung der Malze in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen (Standort).

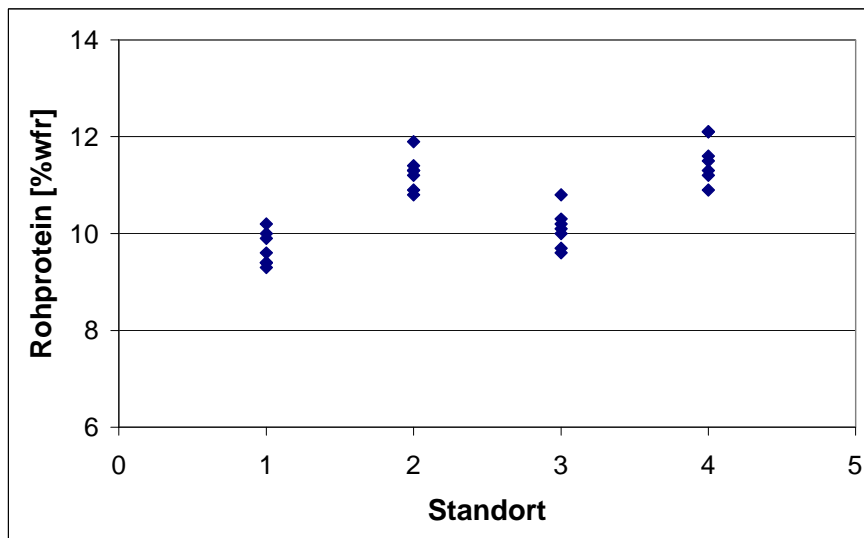


Abbildung 18: Proteingehalt der Malze in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen.

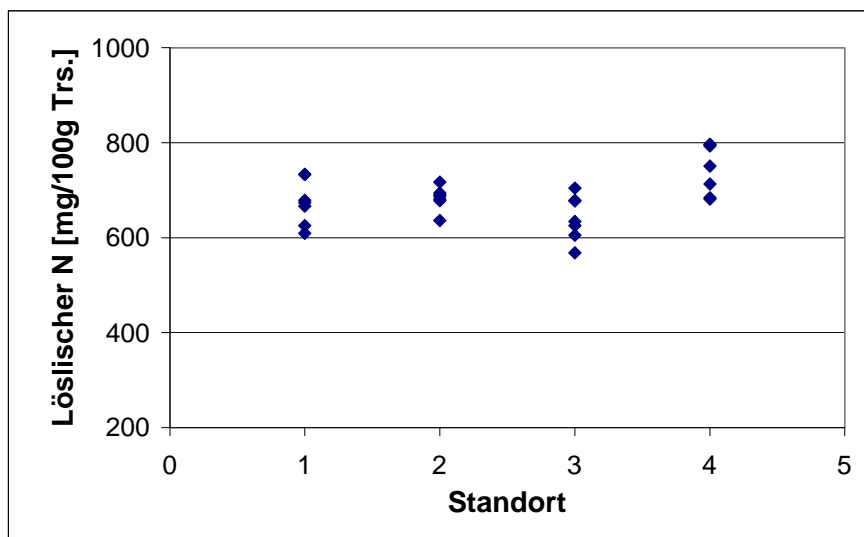


Abbildung 19: Gehalt an löslichem Stickstoff der Malze in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen.



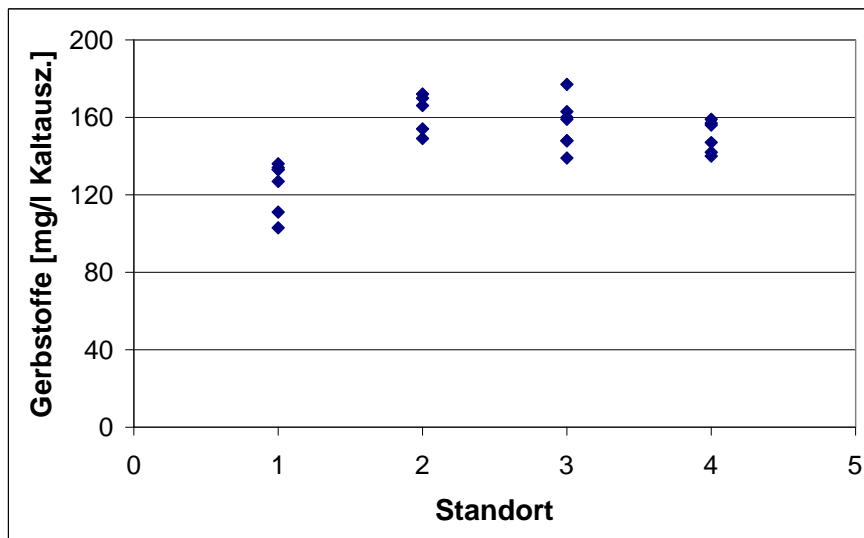


Abbildung 20: Gerbstoffgehalt der Malze in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen.

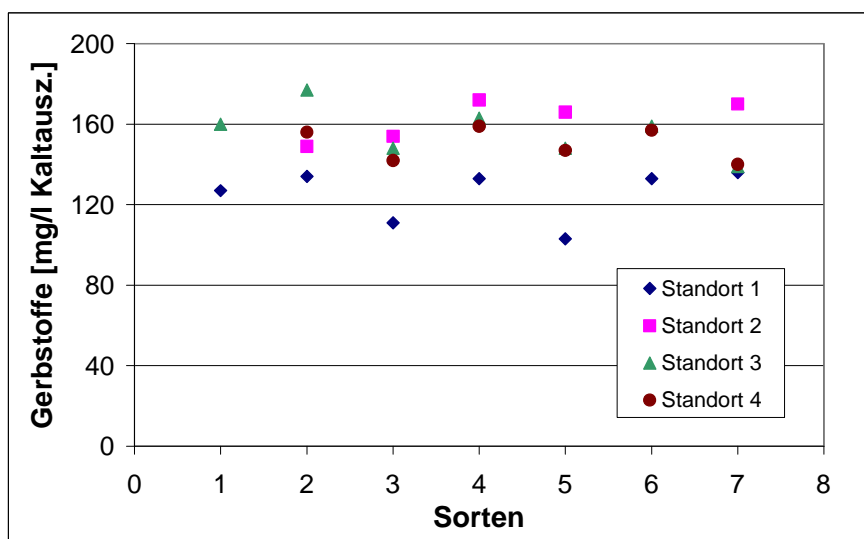


Abbildung 21: Gerbstoffgehalt der Malze in Abhängigkeit von der Gerstensorte.

Entsprechende Tendenzen ergaben sich auch bei den Untersuchungen der Einzelsubstanzen. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, zeigen sich innerhalb einer Malzsorte deutliche Variationen im Proanthocyanidin-Muster in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen. Sortenabhängigen Unterschiede innerhalb eines Standortes wurden ebenfalls festgestellt, hier aber nicht graphisch dargestellt.

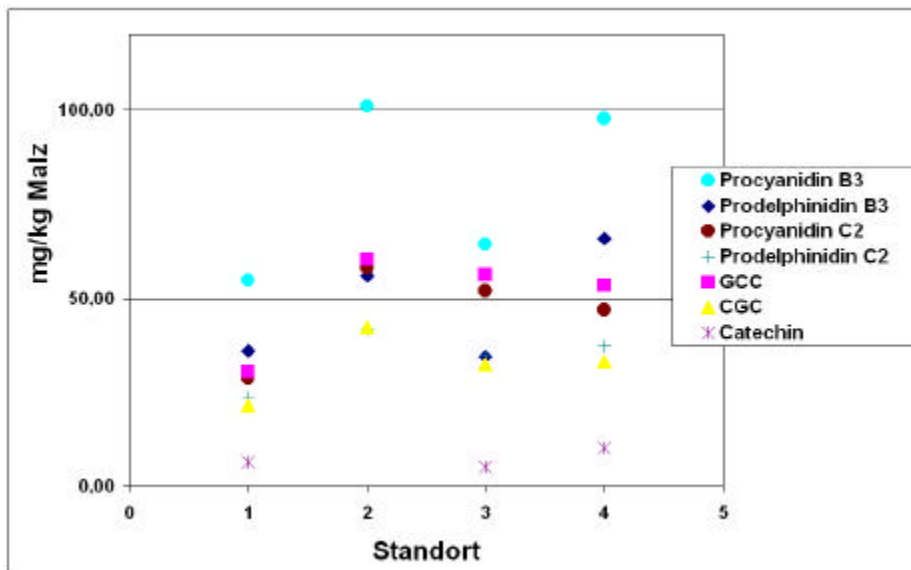


Abbildung 22: Proanthocyanidin-Muster einer Malzsorte in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen

Die in Abbildung 20 gezeigte Abhängigkeit des Gerbstoffgehaltes vom Standort bestätigt sich auch bei der Betrachtung von Einzelsubstanzen, in den Abbildungen 23 und 24 beispielhaft dargestellt für Prodelphinidin B3 (Dimer) und Procyanidin C2 (Trimer).

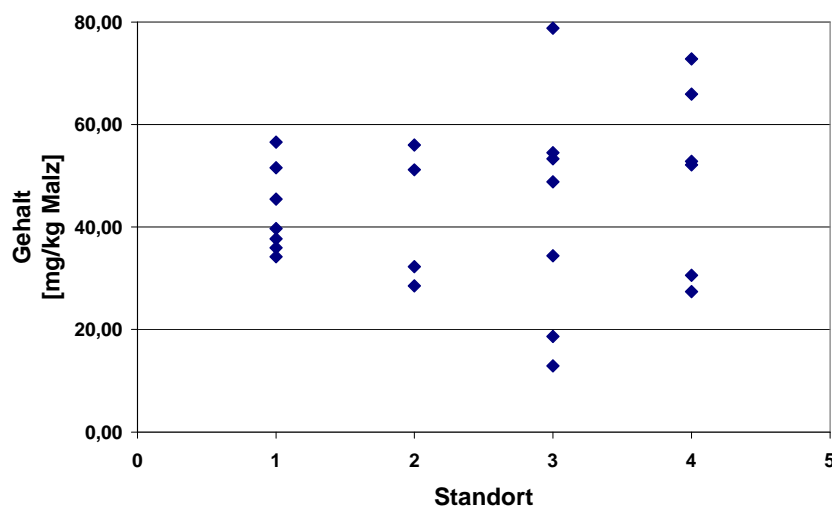
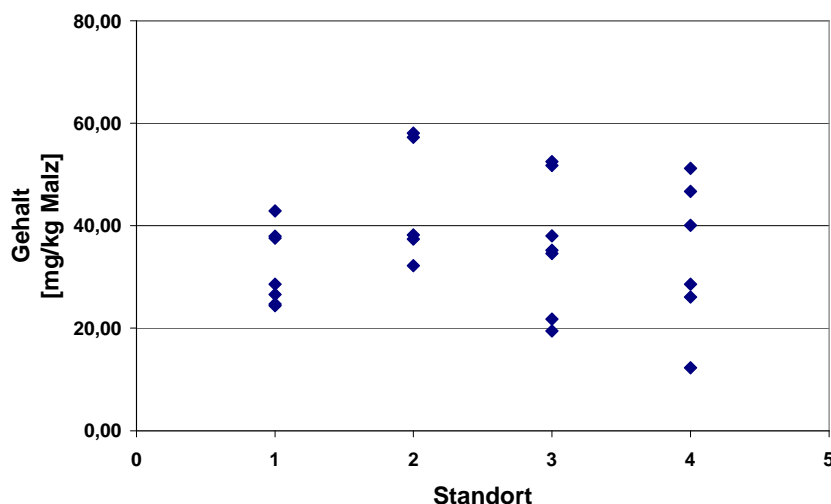


Abbildung 23: Gehalt an Prodelphinidin B3 in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen



**Abbildung 24: Gehalt an Procyanidin C2 in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen**

Beim direkten Vergleich von Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigt sich deutlich, dass die phenolischen Einzelsubstanzen sehr unterschiedlich auf den Einfluss der Aufwuchsbedingungen reagieren.

Die Unterschiede im Eiweißlösungsgrad wurden bei den Malzen in erster Linie durch die unterschiedlichen Proteingehalte verursacht. Der lösliche Stickstoff, der deshalb als Maß für die proteolytischen Lösungsvorgänge herangezogen werden sollte, wies keine so deutlichen Schwankungen auf. Die Gerbstoffgehalte der Malze lagen insgesamt zwischen 100 und 170 mg/l im Malzkaltauszug. Entsprechend der Einwaage bei der Zubereitung der Kaltauszüge ergaben sich daraus tatsächliche Gehalte im Malz von (mindestens; je nach Lösung) 1,0 bis 1,7 g/kg. Die Beeinflussung der Gerbstoffgehalte durch die Aufwuchsbedingungen („Standort“) zeigte ein den Lösungskennzahlen gegenläufiges Verhalten (vgl. Abbildung 14, 17 und 20). Der direkte Zusammenhang ist für den Eiweißlösungsgrad noch einmal in Abbildung 25 dargestellt. Erstaunlicherweise ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Gerbstoffgehalt und löslichen Stickstoff (Abbildung 26) sowie dem Proteingehalt (Abbildung 27). Abbildung 28 zeigt den Zusammenhang zwischen der cytolytischen Lösung und dem Gerbstoffgehalt und in Abbildung 29 ist der Zusammenhang zwischen Extraktgehalt und Gerbstoffgehalt dargestellt.

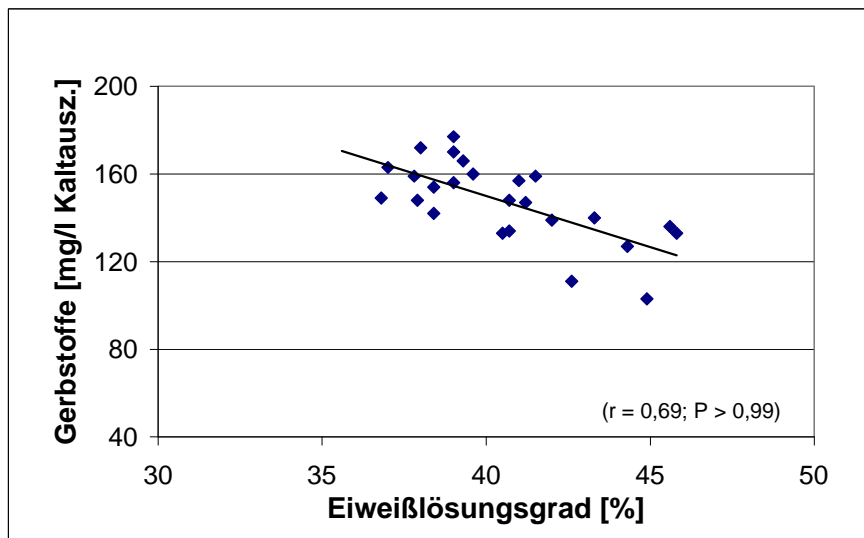


Abbildung 25: Zusammenhang zwischen dem Eiweißlösungsgrad und dem Gerbstoffgehalt.

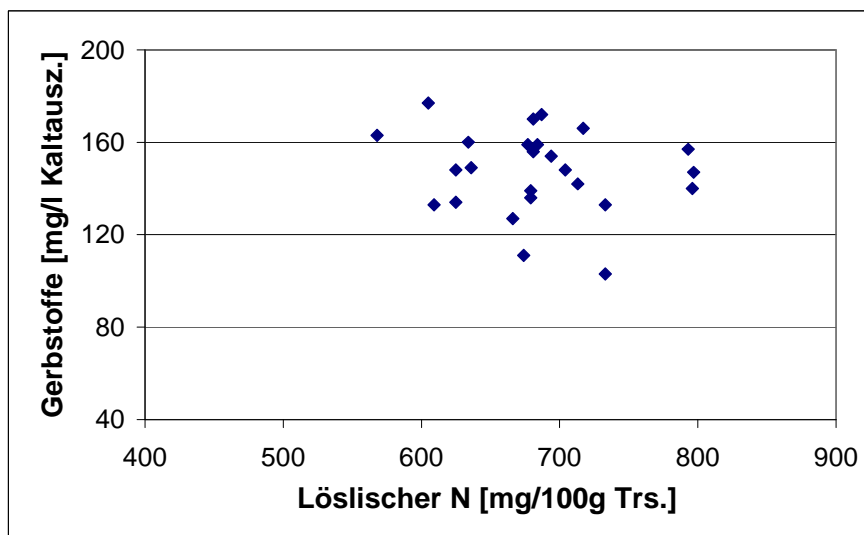


Abbildung 26: Eiweißlösungsgrad und Gerbstoffgehalt der Malze.

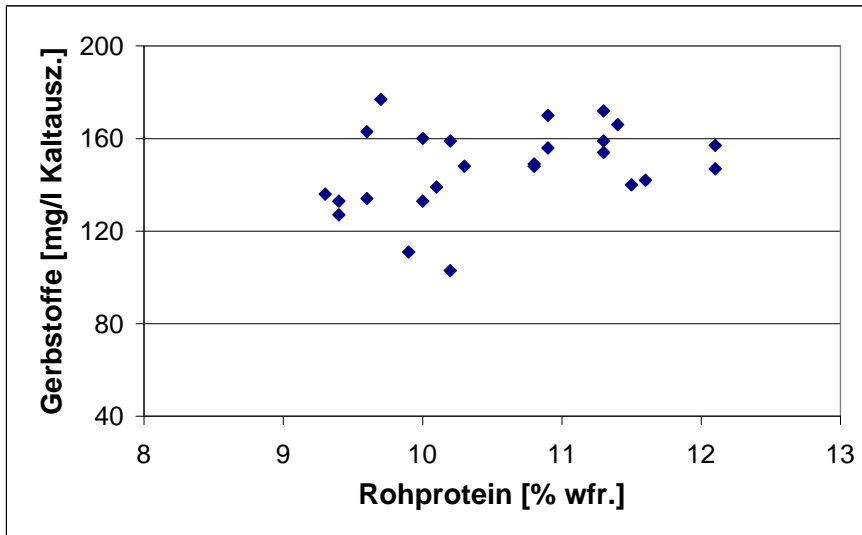


Abbildung 27: Protein- und Gerbstoffgehalt und untersuchten Malze.

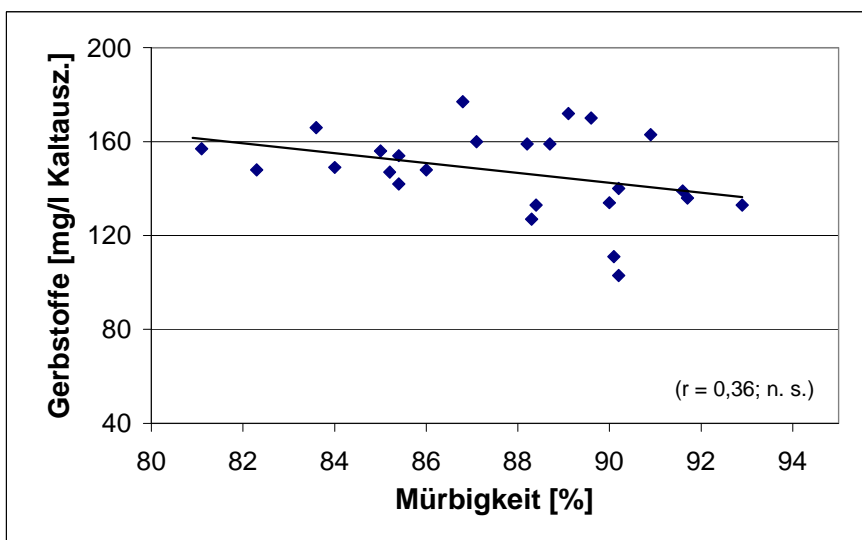
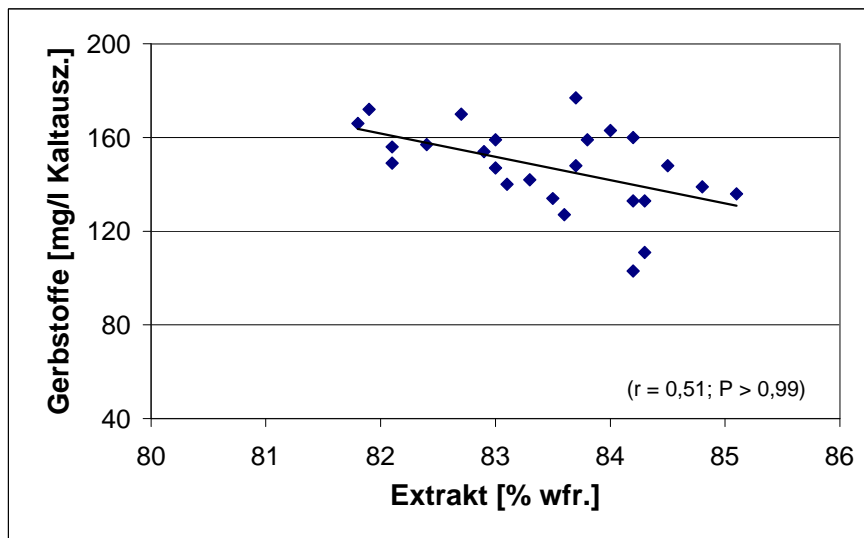


Abbildung 28: Zusammenhang zwischen der cytolytischen Lösung der Malze und dem Gerbstoffgehalt.



**Abbildung 29: Zusammenhang zwischen dem Extraktgehalt der Malze und dem Gerbstoffgehalt.**

Da sich der Eiweißlösungsgrad aus dem Gehalt an löslichem Stickstoff und dem Proteingehalt errechnet, blieb dennoch nur der Schluss, dass sich der Gerbstoffgehalt annähernd proportional zum Proteingehalt verhält und einen negativen Zusammenhang zum löslichen Stickstoff zeigt. Anscheinend führte erst die Berücksichtigung beider Parameter zu einem signifikanten Zusammenhang. Der Gerbstoffgehalt nahm des Weiteren tendenziell, aber nicht signifikant mit zunehmender cytolytischer Lösung der Malze ab. Der Extraktgehalt zeigte einen signifikanten, negativen Zusammenhang zum Gerbstoffgehalt. Dieser Zusammenhang war zu erwarten gewesen, da der Extraktgehalt die Summe aller löslichen Stoffe darstellt, und somit die messbaren Konzentrationen aller anderen Inhaltsstoffe beeinflusst. Eine Verminderung des Extraktgehaltes führt somit zum Beispiel zwangsläufig zu einer Erhöhung des Gerbstoffgehaltes, auch wenn die absolute Menge an Gerbstoffen pro Korn unverändert bleibt. Zwischen dem Extraktgehalt und dem Proteingehalt wurde ein entsprechender Zusammenhang gefunden (nicht dargestellt).

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse musste beachtet werden, dass die Unterschiede der verschiedenen Merkmale der untersuchten Malze in erster Linie auf unterschiedliche Aufwuchsbedingungen sowie zusätzlich auf Sortenunterschiede zurückzuführen waren (Standardmälzung). Vermutlich wirkte sich die Proteinausstattung der Malze nicht direkt auf die Polyphenolausstattung aus. Vielmehr

konnte vermutet werden, dass beide Merkmale von denselben Einflussparametern während des Gerstenaufwuchses beeinflusst wurden.

Die Darstellungsform in Abbildung 30 bekräftigte diese Vermutung. Sowohl der Eiweißlösungsgrad, als auch der Polyphenolgehalt waren von den Aufwuchsbedingungen abhängig.

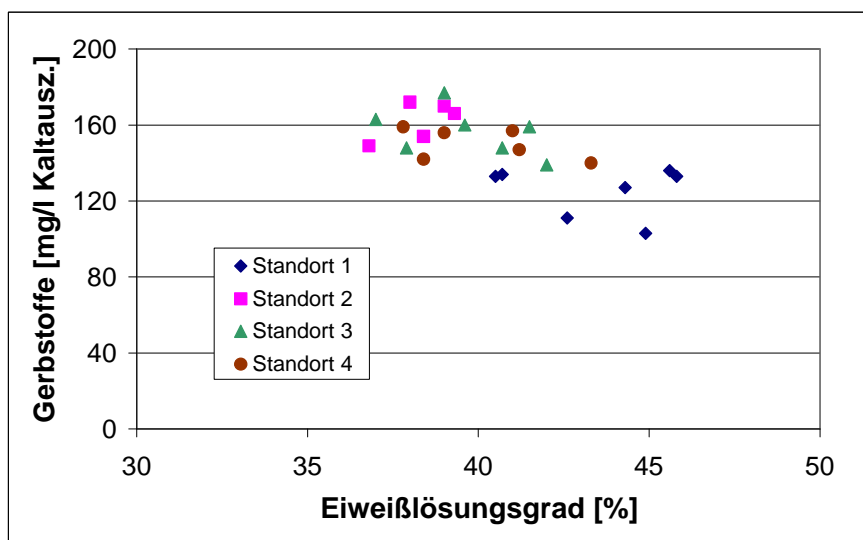


Abbildung 30: Gerbstoffgehalt der Malze in Abhängigkeit vom Eiweißlösungsgrad.

Die Fraktionen der Anthocyanogene und Tannoiden zeigten einen relativ schwachen, aber signifikanten Zusammenhang zur Fraktion der Gerbstoffe (Abbildung 31). Der Zusammenhang zwischen Anthocyanogenen und Tannoiden stellte sich sehr gut dar (Abbildung 32). Innerhalb der Anbauggebiete ergab sich sogar ein noch deutlich schärferer Zusammenhang zwischen den beiden Größen (nicht dargestellt).

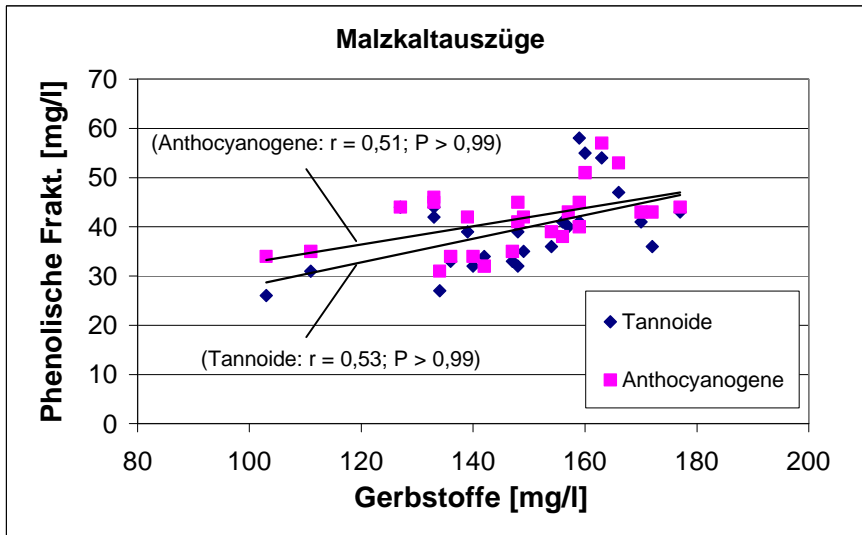


Abbildung 31: Anthocyanogen- und Tannoidgehalt der Malze in Abhängigkeit vom Gerbstoffgehalt (Kaltauszüge).

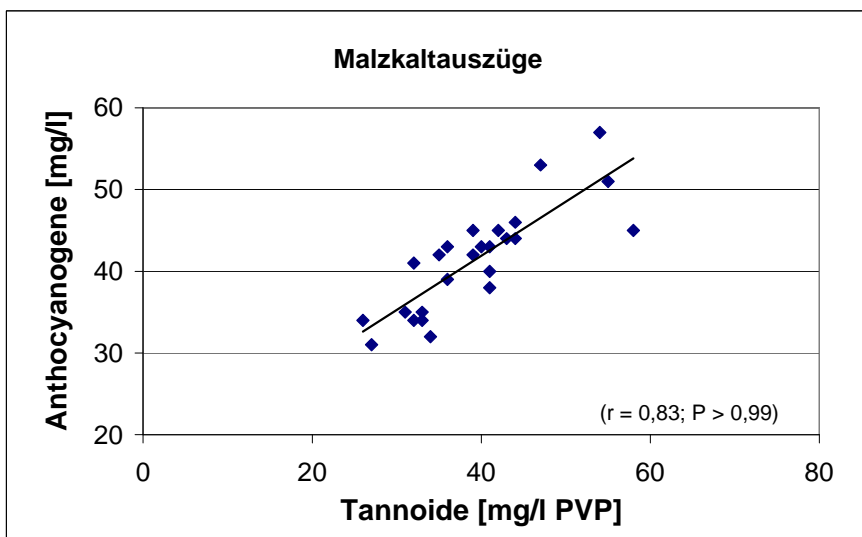


Abbildung 32: Zusammenhang zwischen dem Tannoid- und Anthocyanogengehalt in den Malzkaltauszügen.

Um die antioxidativen Eigenschaften der Malze zu charakterisieren, wurde deren Einmischverhalten mittels Chemilumineszenz untersucht. Die Methoden zur Bestimmung des ARP im Kaltauszug und zur Messung von ARP und ARV in Würzen standen zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht zur Verfügung. Abbildung 33 zeigt die Chemilumineszenzsignale in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen.



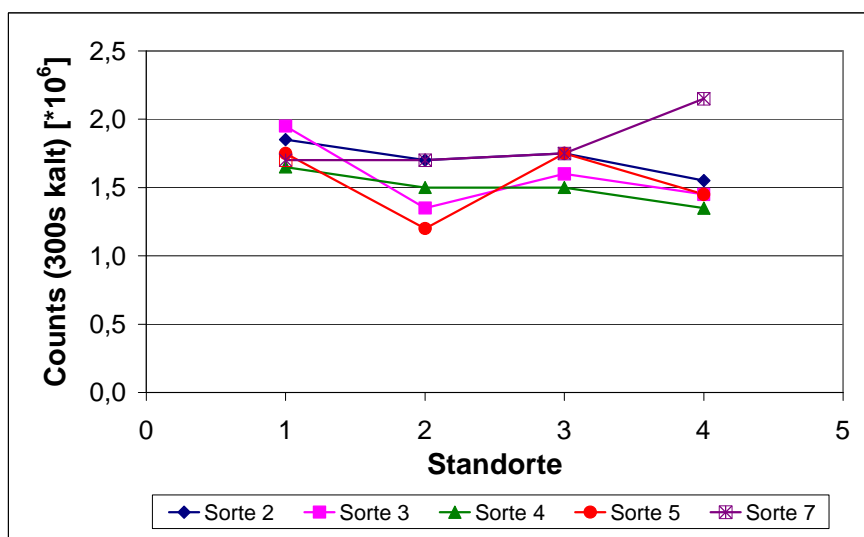


Abbildung 33: Einmischverhalten (Chemilumineszenz) der Malze in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen.

Die Einmischpeaks (Reaktivität, Oxidationsneigung) der untersuchten Sorten lagen grundsätzlich auf vergleichbarem Niveau, allerdings verhielten sich die einzelnen Sorten sehr unterschiedlich. Während die Sorten 2 und 4 kaum auf die verschiedenen Aufwuchsbedingungen reagierten, unterschieden sich die Malze der Sorten 3 und 5 deutlich in Abhängigkeit vom Gerstenstandort. Ihre Einmischpeaks veränderten sich gleichlaufend zur Malzlösung (vgl. Abbildung 15 und 17) und gegenläufig zum Polyphenol- und Proteingehalt (vgl. Abbildung 20 und 18). Für das Verhalten von Sorte 7 konnte keine Erklärung gefunden werden. Ihr ausreißender Wert für Standort 7 wurde durch mehrere Wiederholungsmessungen abgesichert. Sorte 7 war bereits durch die durchweg hohe cytolytische Lösung aufgefallen (vgl. Abbildung 16). Von den Sorten 1 und 6 standen nicht von allen Standorten Proben für die Chemilumineszenzmessung zur Verfügung, so dass sie bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

Das Chemilumineszenzsignal stellt die Reaktivität beim Einmischen dar. Anhand obiger Darstellung konnte jedoch nicht entschieden werden, ob sie durch die unterschiedlichen Lösungseigenschaften der Malze oder deren unterschiedliche Polyphenolgehalte beeinflusst wurde. Zudem konnte auch die Möglichkeit nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass kein ursächlicher Zusammenhang zwischen Malzlösung, Polyphenolgehalt und Reaktivität bestand, sondern die genannten Merkmale unabhängig voneinander durch dieselben Einflussparameter während des Gerstenwachstums geprägt wurden.

In Abbildung 34 und 35 wurde das Einmischverhalten dem Gerbstoffgehalt direkt gegenübergestellt.

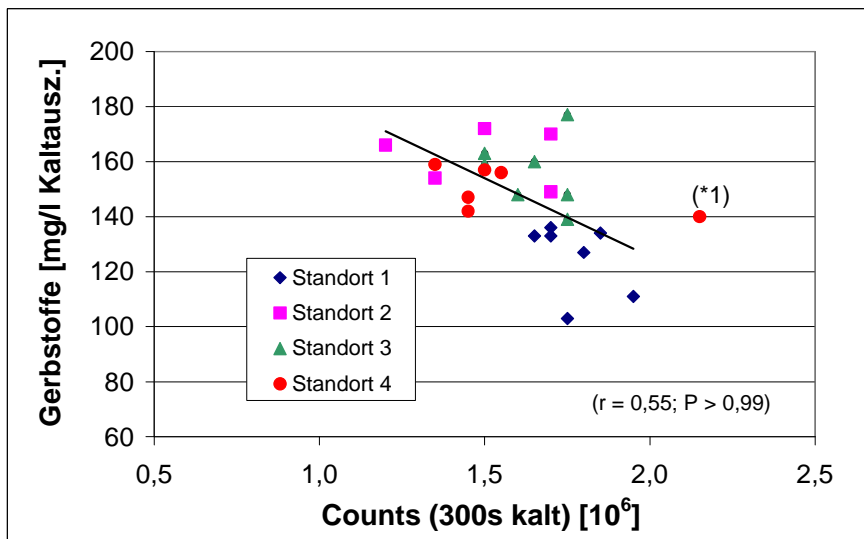


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen dem Gerbstoffgehalt der Malze und ihrem Einmischverhalten an verschiedenen Standorten.

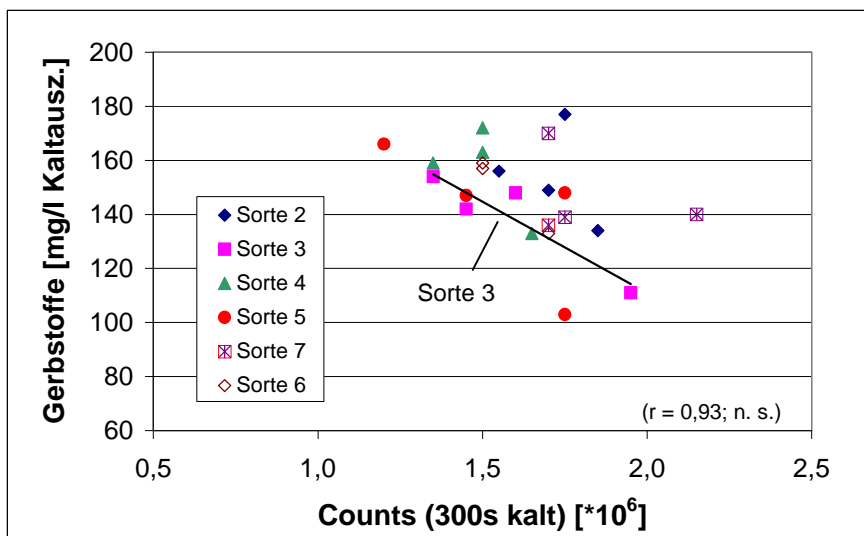


Abbildung 35: Zusammenhang zwischen dem Gerbstoffgehalt der Malze und ihrem Einmischverhalten in den Sorten.

Es zeigte sich die deutliche Tendenz, dass mit zunehmendem Gerbstoffgehalt der Malze deren Reaktivität beim Einmischen sank (vgl. Abbildung 34). Der Einmischpeak von Sorte 7, Standort 4 wurde als Ausreißer betrachtet und bei der Berechnung der Korrelation nicht berücksichtigt (\*1). Die Aufschlüsselung der Messpunkte nach

Standorten zeigte, dass die Unterschiede im Einmischverhalten und Gerbstoffgehalt in erster Linie durch die Aufwuchsbedingungen beeinflusst wurden (Abbildung 35). Folglich ergaben sich innerhalb der Sorten deutlichere Zusammenhänge, wie in Abbildung 35 am Beispiel von Sorte 3 dargestellt wurde, wengleich die geringe Probenzahl hier keine statistische Bewertung mehr zuließ. Bei Sorte 5 zeigte sich eine ebenso gute Tendenz. Die Sorten 2 und 4 wiesen keine so deutliche Reaktion auf die Veränderung der Aufwuchsbedingungen auf, was bereits weiter oben festgestellt worden war (vgl. Abbildung 33). Um den Einfluss der Malzlösung auf die Ergebnisse abzuschätzen, wurde in Abbildung 36 das Einmischverhalten der Mürbigkeit gegenüber gestellt.

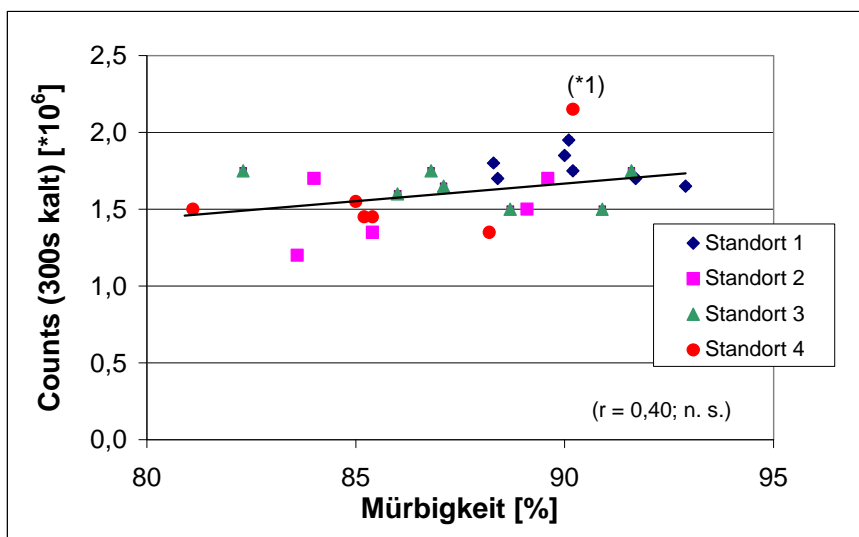
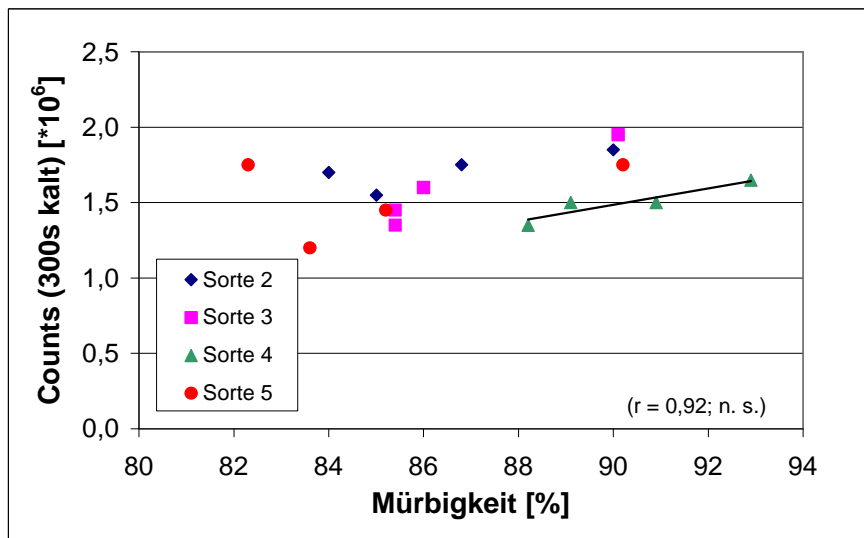


Abbildung 36: Zusammenhang zwischen der cytolytischen Lösung der Malze und ihrem Einmischverhalten.

Die einzelnen Standorte unterschieden sich deutlich in der Mürbigkeit und dem Einmischverhalten. Über alle Proben betrachtet nahm die Reaktivität beim Einmischen leicht mit der cytolytischen Lösung zu. Der Zusammenhang war allerdings nicht signifikant ((\*1) nicht berücksichtigt). Innerhalb der Sorten (und damit in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen) war der Zusammenhang wesentlich stärker ausgeprägt, wie in Abbildung 37 am Beispiel von Sorte 4 dargestellt ist. Alle Sorten wiesen dieselbe Tendenz auf, die allerdings wegen der geringen Probenanzahl innerhalb einer Sorte nicht statistisch abgesichert werden konnte.



**Abbildung 37: Zusammenhang zwischen der cytolytischen Lösung der Malze und ihrem Einmischverhalten in den Sorten.**

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die cytolytische Lösung des Malzes, und damit die Löslichkeit und Angreifbarkeit der Malzbestandteile beim Einmischen nur einen vergleichsweise geringen Einfluss auf das mittels Chemilumineszenz messbare Einmischverhalten hatte. Der deutliche Zusammenhang in Abbildung 37 wurde vermutlich durch unterschiedliche Polyphenolgehalte hervorgerufen. Die Unterschiede in der Reaktivität der untersuchten Malze in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen waren also vermutlich in erster Linie auf die verschiedenen Polyphenolgehalte zurückzuführen.

Im Folgenden wurden aus einigen der Malzmuster im Kleinstmaßstab Würzen hergestellt. Vom Gerbstoffgehalt des Malzes konnte dabei nicht immer auf den Gerbstoffgehalt der Würze geschlossen werden, wofür vermutlich Ausfällungsvorgänge während der Kochung verantwortlich waren. Höhere Gerbstoffgehalte des Malzes führten aber zu Würzen mit erhöhtem Reduktionsvermögen wie in Abbildung 38 anhand der Proben vom Standort 3 dargestellt ist.

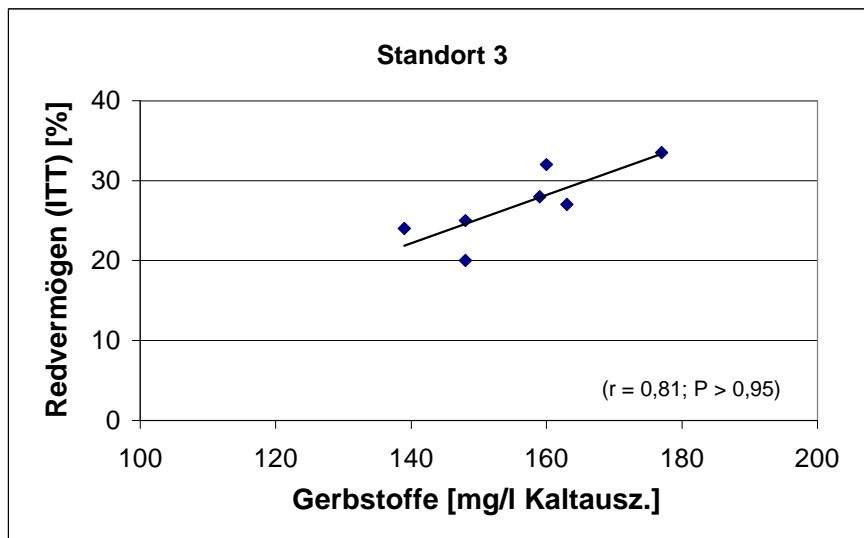


Abbildung 38: Das Reduktionsvermögen der Würze in Abhängigkeit vom Gerbstoffgehalt des Malzes:

Der Tannoidgehalt des Malzes zeigte hingegen eine gute Korrelation zum Tannoidgehalt der Würze, wie in Abbildung 39 dargestellt ist.

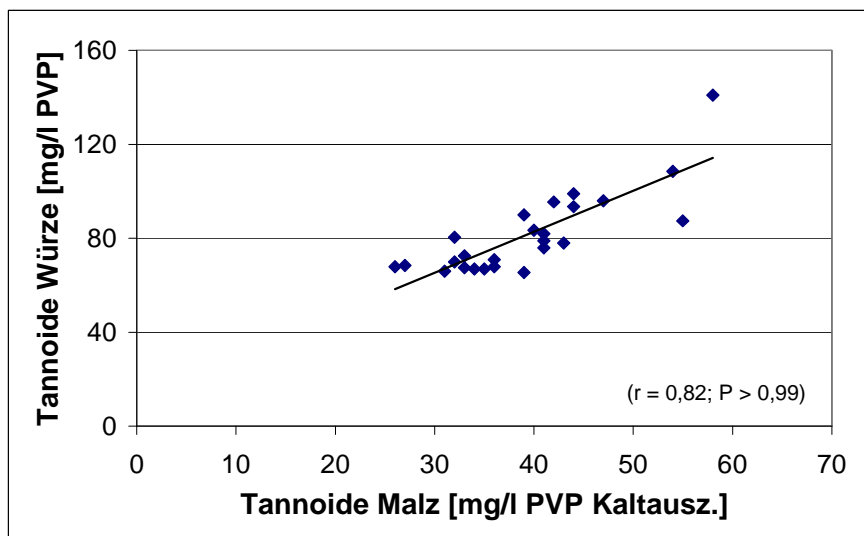


Abbildung 39: Zusammenhang zwischen dem Tannoidgehalt von Malz und Würze.

Diese Korrelation bestätigt sich auch bei der Betrachtung von einzelnen Proanthocyanidinen. Dies wird in Abbildung 40 an einem Dimer und zwei Trimeren dargestellt.

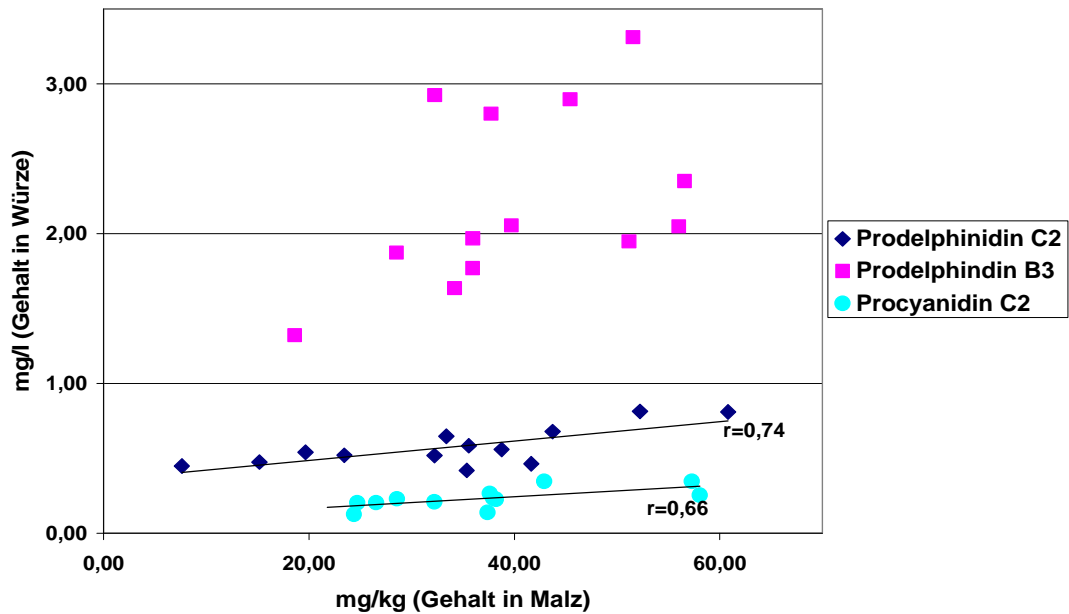


Abbildung 40: Verhältnis von Einzelsubstanzen in Malz und Würze

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Malze mit erhöhten Polyphenolgehalten unabhängig von ihrer Lösung eine deutlich verminderte Reaktivität beim Einmaischen zeigten und zu Würzen mit besserem Reduktionsvermögen führten. Bei Versuchen mit einer Zugabe von Sinapinsäure konnte Franz (2004) bereits zeigen, dass phenolische Substanzen Oxidationsreaktionen beim Einmaischen hemmen können. Folglich kann nach den vorliegenden Daten nun davon ausgegangen werden, dass auch natürlich vorliegende Malzpolyphenole beim Maischen antioxidativ wirken und die Oxidation von Malz- und Maischebestandteilen vermindern. Im Zuge ihrer antioxidativen Wirkung werden die phenolischen Substanzen selbst oxidiert. Über den Einfluss und die Wirkungen dieser Oxidationsprodukte in späteren Prozessschritten liegen noch keine Erkenntnisse vor. Vorstellbar wäre hier eine prooxidative Wirkung, wie sie von anderen Antioxidantien, z.B. einigen Vitaminen, bekannt ist. Eine prooxidative Wirkung von Flavonoiden wird beispielsweise schon von Szymusiak (2000) beschrieben.

Aus den vorliegenden Daten kann aber noch nicht abgeleitet werden, dass polyphenolreichere Malze zwangsläufig zu geschmacksstabileren Bieren führen.

## Untersuchung des Einflusses und der Veränderung der Polyphenole beim Maischprozess

Um die Wirkung und Veränderung von phenolischen Substanzen im Maischprozess zu untersuchen, wurde bei diesem Versuch mit einer Zugabe von Phenolen eingemaischt. Der Versuchs- und ein Vergleichssud wurden daraufhin vergoren und die resultierenden Biere analysiert und verkostet.

Für den Versuch wurde ein Malz mit einem vergleichsweise geringem Gehalt an phenolischen Substanzen ausgewählt (Ernte 2005, Tabelle 3). Die Malzanalyse ergab einen relativ niedrigen Endvergärungsgrad. Da die anderen verfügbaren Malze aus der aktuellen Ernte aber deutlich höhere Gehalte an phenolischen Substanzen aufwiesen und somit für diesen Versuch ungeeignet waren, fiel die Wahl trotz des schlechten Vergärungsgrades auf das verwendete Malz. Von den Malzmustern der weiter oben beschriebenen Versuche reichten die vorhandenen Probenmengen nicht mehr für die Brauversuche aus.

**Tabelle 3: Merkmale des für den Brauversuch verwendeten Malzes.**

Tannoide [mg/l PVP im Kaltausz.]	43
Mürbigkeit [%]	95
Rohprotein [% wfr.]	10,2
Eiweißlösungsgrad [%]	45,8
Endvergärungsgrad [% s]	78,8

Im Versuch wurde jeweils einmal mit (P) und einmal ohne (V) Zugabe von Phenolen eingemaischt. Die Zugabe pro 10 kg Schrot betrug 1 g Epicatechin, 3 g Gallussäure und 5 g Catechin. Die Substanzen wurden in Ethanol gelöst und unmittelbar beim Einmischen zum Hauptguss gegeben. Zum Hauptguss des Vergleichssudes wurde die entsprechende Menge reiner Ethanol gegeben (100 ml). Beide Sude (V und P) wurden daraufhin auf jeweils zwei 20 l – Behälter aufgeteilt und parallel vergoren (4 Gärungen: VA, VB, PA und PB). Um den antioxidativen Einfluss phenolischer Substanzen besser beobachten zu können, wurde zur Gärung ein Hefestamm gewählt, der bekanntermaßen kaum Sulfid produziert. Um die Sulfidbildung zusätzlich zu unterdrücken, wurde zudem eine Belüftungsrate im Sättigungsbereich und eine relativ hohe Hefegabe gewählt. Die gemessene Anstellzellzahl fiel mit 26 Mio./ml

dann allerdings noch deutlich höher als geplant aus. Auch in den Lagertanks nach dem Schlauchen betrug die Zellzahl (Zellen in Schwebelösung) noch über 20 Mio./ml. Nach der Lagerung wurden die Biere filtriert und in 0,5l-Flaschen abgefüllt. Für die Filtration wurde ein Schichten-Tiefenfilter (Seitz, K150, Rückhaltevermögen 3 – 4 µm) verwendet. Die Prozessparameter sind in Tabelle 4 dargestellt:

**Tabelle 4: Parameter des Brauprozesses im Versuch.**

Schüttung [kg]	10
Hauptguss [l]	40
Stammwürze [%]	12
Einmaischtemperatur [°C]	62
Rast 62 °C [min]	30
Aufheizen 72 °C [min]	10
Rast 72 °C [min]	30
Aufheizen 78 °C [min]	7
Rast 78 °C bis Abmaischen [min]	5
1. Nachguss [l]	20
2. Nachguss [l]	14
Sieden [min]	70
Bitterhopfen (15,8 %a, 10 min nach Kochbeginn)	15 BE
Aromahopfen (4,9 %a, 10 min vor Kochende)	5 BE
Whirlpoolrast [min]	20
Anstell-, Gärtemperatur (5 Tage) [°C]	10
Belüftung (p atmosphärisch) [l/hl]	21
Hefegabe dickbreiig [g/l]	10
Reifung nach Schlauchen (5 Tage) [°C]	14
Lagerung (6 Wochen) [°C]	0

Die Würzen wurden bezüglich der Stickstofffraktionen analysiert, wobei sich nur beim Niedermolekularen Stickstoff (MEBAK 2.9.3.2, 1993) leichte Unterschiede ergaben (Tabelle 5). Stammwürze, Endvergärungsgrad, Farbe und Zinkgehalt sind ebenfalls in Tabelle 5 dargestellt.



**Tabelle 5: Analysenmerkmale der Würzen V und P.**

<b>Merkmal</b>	<b>Sud V</b>	<b>Sud P</b>
Extrakt [% mas]	12,68	12,58
Endvergärungsgrad [% s]	77,4	78,3
Farbe [EBC]	9,1	9,6
Niedermolekularer N [mg/100ml]	75,0	69,3
Zink [mg/l]	0,03	0,07

Der Sud mit den zugegebenen Phenolen (P) fiel gegenüber dem Vergleichsud (V) durch eine leicht erhöhte Farbe, leicht erniedrigte Gehalte an niedermolekularem Stickstoff und einen leicht erhöhten Zinkgehalt auf. Der Endvergärungsgrad war entsprechend der Malzqualität niedrig. Der gegenüber dem Versuchssud noch niedrigere Wert im Vergleichsud kann dadurch erklärt werden, dass beim Maischen eine kleine Menge Schrot am Rührwerk einen Klumpen gebildet hatte, der erst beim Abläutern in die Maische gespült wurde. Vermutlich wurden dadurch in höherem Maße unvergärbare Kohlenhydrate in die Würze V eingebracht.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der nasschemischen Analysen und der antioxidativen Tests der Würzen und Biere abgebildet.

**Tabelle 6: Analysenergebnisse von Würze und Bier:**

**Polys – Gerbstoffe [mg/l Kaltauszug]; Tann – Tannoinde [mg/l PVP im Kaltauszug]; Anthos – Anthocyanogene [mg/l Kaltauszug]; ARP [% , Kaltauszug]; Redv. – Reduktionsvermögen (ITT) [% , Kaltauszug].**

<b>Pfanne-Voll-Würze</b>						
<b>Probe</b>	<b>Extr</b>	<b>Polys</b>	<b>Tann</b>	<b>Anthos</b>	<b>ARP</b>	<b>Redv.</b>
V-Pf	11,6	187	150	96	65	-
P-Pf	11,9	327	180	95	79	-
<b>Ausschlagwürze</b>						
<b>Sorte</b>	<b>Extr</b>	<b>Polys</b>	<b>Tann</b>	<b>Anthos</b>	<b>ARP</b>	<b>Redv.</b>
V-AW	12,7	214	105	99	77	67
P-AW	12,6	345	117	86	86	80
<b>Bier</b>						
<b>Sorte</b>	<b>Extr</b>	<b>Polys</b>	<b>Tann</b>	<b>Anthos</b>	<b>ARP</b>	<b>Redv.</b>
V-A	-	-	-	66	63	29
V-B	-	-	-	61	60	30
P-A	-	-	-	67	69	35
P-B	-	-	-	69	70	34

Tabelle 7 zeigt die Gehalte an Einzelsubstanzen in den Würzen und Bieren

**Tabelle 7: Analysenergebnisse, Bestimmung von Einzelsubstanzen.**

**Gehaltsangaben jeweils in mg/l; Erläuterung der Abkürzungen: EC: Epicatechin, übrige: siehe Abbildung 10;**

Pfanne-voll-Würze							
Probe	C	EC	ProD B3	ProC B3	ProD C2	ProC C2	CGC
V-Pf	4,3	2,1	3,0	4,0	0,5	0,2	0,4
P-Pf	41,2	21,9	3,6	4,1	0,4	0,6	0,6
Ausschlagwürze							
Probe	C	EC	ProD B3	ProC B3	ProD C2	ProC C2	CGC
V-AW	3,1		6,4	9,2	1,2	2,1	1,8
P-AW	44,6	13,3	7,4	7,5	1,3	0,4	1,8
Bier							
Probe	C	EC	ProD B3	ProC B3	ProD C2	ProC C2	CGC
V (Mittelwert)	5,4	1,9	2,2	3,9	0,3	0,4	0,1
P (Mittelwert)	39,3	15,0	2,6	4,5	0,3	0,4	0,2

Die Zugabe der phenolischen Substanzen spiegelt sich deutlich in den Analysen der Gerbstoffe und Tannoide der Pfanne-Voll-Würze sowie der Bestimmung der Einzelsubstanzen wieder. Da monomere Substanzen durch die Analysen der Tannoide nicht erfasst werden, konnte davon ausgegangen werden, dass während des Maischprozesses Polymerisierungsreaktionen abgelaufen waren. Der direkte Vergleich zwischen dem Vergleichssud (V) und dem Sud mit Polyphenol-Zusatz (P) zeigt aber nur gering erhöhte Gehalte der betrachteten dimeren und trimeren Proanthocyanidinen. Denkbar wäre also nur die Bildung von Oligo- oder Polymeren, die von den Analysen nicht als Einzelsubstanzen erfasst wurden.

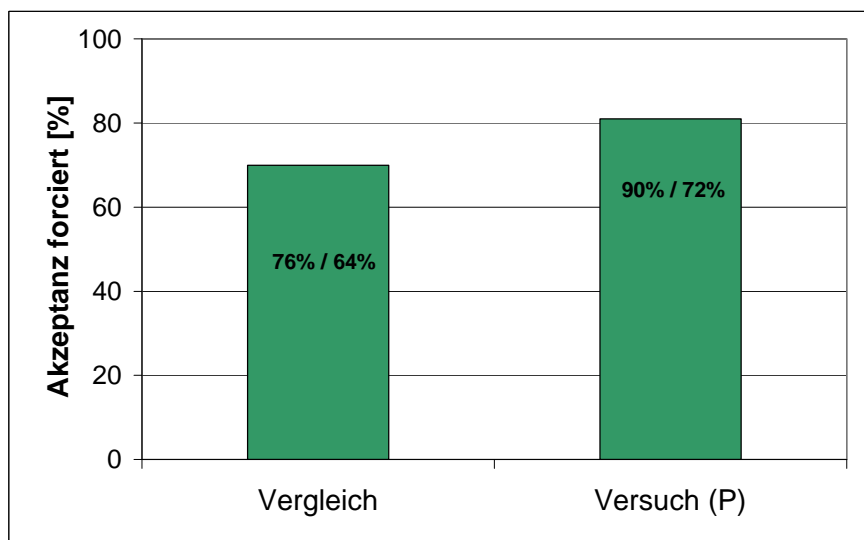
Auffällig ist außerdem der verhältnismäßig geringe Gehalt an Catechin in der polyphenol-versetzten Pfanne-Voll-Würze (P-Pf). Hier wird nur etwa ein Drittel der zugesetzten Menge gefunden. Das bestätigt erneut die Annahme, dass das Catechin an Polymerisierungsreaktionen beteiligt ist.

Auch in der Ausschlagwürze des Versuchssudes waren noch stark erhöhte Polyphenolgehalte messbar. Die Tannoide nahmen bei der Kochung beider Sude stark ab, wofür Ausfällungs- und Polymerisierungsreaktionen in Frage kamen.

Die Zugabe der phenolischen Substanzen führte sowohl in der Würze als auch im Bier zu einem deutlich verbesserten ARP und Reduktionsvermögen. Von der Würze bis ins fertige Bier nahmen das ARP leicht und das Reduktionsvermögen stark ab. Mögliche Ursachen könnten in der Sauerstoffbelastung bei der Belüftung, der

Reduktionskraft der Hefe, oder Ausfällungsreaktionen während der Würzekühlung und Gärung gelegen haben. Über die Veränderung des Reduktionsvermögens während komplexer Prozessschritte ist noch sehr wenig bekannt. Hierzu sind an der Forschungsstelle 1 weiterführende Untersuchungen geplant. Die Analyse der Würzen auf Aromastoffe (Streckeraldehyde, höhere Alkohole) ergab im Versuchssud gegenüber dem Vergleich ein tendenziell, aber nicht signifikant erhöhtes Niveau. Bei der Gärung zeigten beide Gärungen des Versuchssudes gegenüber den Gärungen des Vergleichssudes eine höhere Diacetylbildung, wobei es sich aber um ein zufälliges Ergebnis handeln konnte.

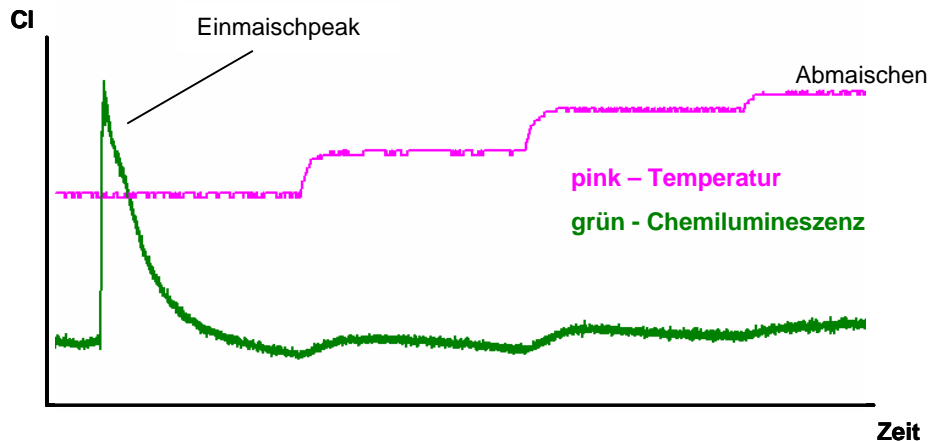
Zur Abschätzung der Geschmacksstabilität wurden die vier Biere forciert und anschließend eine Alterungsverkostung nach Eichhorn (1991) durchgeführt. Die Versuchsbiere wurden dabei im Mittel als deutlich geschmacksstabiler eingestuft (Abbildung 41). Da die Ergebnisse der vergleichbaren Gärungen aber stark voneinander abwichen, ist der Unterschied als nicht signifikant anzusehen.



**Abbildung 41: Alterungsverkostung der Biere (nach Eichhorn).**

In einem Folgeversuch sollte nun nach Möglichkeiten gesucht werden, die eine Erhöhung der Polyphenolkonzentration und damit des Oxidationsschutzes beim Maischen im Rahmen des Reinheitsgebotes und unabhängig von der Rohstoffauswahl ermöglichen.

Bei einer Chemilumineszenzmessung im Verlauf eines kompletten Maischprogramms stellte sich heraus, dass ein bedeutender Teil der Oxidationsreaktionen unmittelbar nach dem Einmischen ablief (Abbildung 42). Um die Oxidationsreaktionen beim Maischen erfolgreich zu hemmen, war es also erforderlich, antioxidativ wirksame Substanzen unmittelbar mit dem Einmischvorgang in Lösung zu bringen.



**Abbildung 42: Chemilumineszenzmessung im Verlauf eines Maischprogramms (52 – 62 – 72 – 78 °C).**

Als einfache Möglichkeiten die Polyphenolkonzentration beim Einmischen zu erhöhen, wurden eine Sauergut- und eine Glattwassergabe getestet. Das Sauergut und Glattwasser wurden hierzu von einer benachbarten Brauerei bezogen. Zum Vergleich der phenolischen Inhaltstoffe wurde ebenfalls eine Vorderwürzprobe analysiert (Tabelle 8, Tabelle 9).

**Tabelle 8: Analysenergebnisse und zugegebene Mengen.**

**Extrakt [%mas]; Gerbst – Gerbstoffe [mg/l]; Tannoide [mg/l PVP].**

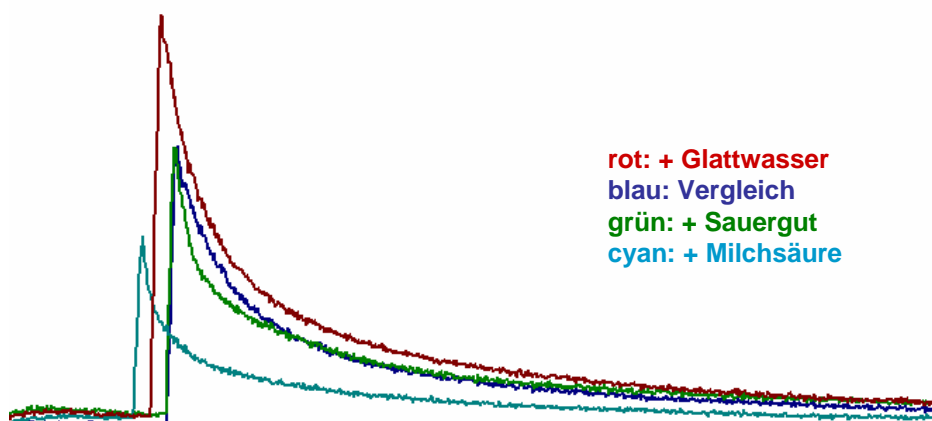
	pH	Extrakt	Gerbst	Tannoide	Zugabe
<b>Vorderwürze</b>	5,71	15,26	-	150 (12%)	-
<b>Sauergut</b>	3,02	7,48	89	26,5	4%
<b>Glattwasser</b>	5,95	2,03	87	Sp.	4%
<b>Milchsäure</b>					435 mg/l

**Tabelle 9: Analysenergebnisse (Einzelsubstanzen).**

Gehaltsangaben jeweils in mg/l; Erläuterung der Abkürzungen: siehe Abbildung 10

	C	ProD B3	ProC B3	ProD C2	ProC C2	GCC	CGC	Cumarsre	Ferulasre
<b>Vorderwürze</b>	3,8	12,8	13,8	3,4	2,9	4,2	3,0	1,0	1,4
<b>Sauergut</b>	3,5	1,1	2,1	0,2	0,1	0,5	0,1	0,3	0,5
<b>Glattwasser</b>	1,8	3,4	5,3	0,8	1,3	1,3	1,0	0,2	0,3

Im Versuch wurde unter Zugabe von Sauergut bzw. Glattwasser eingemaischt und der Einmischpeak mittels Chemilumineszenz aufgenommen. Zum Vergleich wurde ohne Zugabe eingemaischt. Um den Effekt des pH-Wertes zu untersuchen wurde zusätzlich einmal mittels technischer Milchsäure angesäuert. Da das Pufferungsverhalten der Maische schwer abschätzbar war, waren die pH-Absenkungen durch die Milchsäure und das Sauergut nicht absolut miteinander vergleichbar. Während des Versuches war keine pH-Messung möglich. Abbildung 43 zeigt die Einmischpeaks der Versuche.

**Abbildung 43: Einmischpeaks (Chemilumineszenz):**

(Peakhöhen von oben nach unten: + Glattwasser, Vergleich, + Sauergut, + Milchsäure).

Die Zugabe von Glattwasser erhöhte den Einmischpeak gegenüber dem Vergleich deutlich. Eine mögliche Erklärung lag im veränderten Polyphenolspektrum des Glattwassers im Vergleich zur Vorderwürze. Bereits oxidierte Polyphenole des Glattwassers könnten hier prooxidativ gewirkt haben. Ebenso könnte es sich um den Einfluss von anderen phenolischen Substanzen handeln, die indirekt über den Hopfen eingebracht wurden. Solche Hopfeninhaltsstoffe wurden im Sauergut und im

Glattwasser identifiziert (Flavonolglykoside, Chinasäureester, Prenylflavonoide), aber nicht quantifiziert.

Die pH-Absenkung durch Milchsäure brachte gegenüber dem Vergleich eine deutliche Reduzierung des Chemilumineszenzsignals. Dieser Effekt konnte durch die pH-Abhängigkeit der Fenton-Reaktion und damit eines wichtigen Zwischenschrittes der Sauerstoffaktivierung erklärt werden (Bishop, 1968). Die Zugabe von Sauergut ergab eine leichte Absenkung des Einmischpeaks.

Der Versuchsaufbau war nur von eingeschränkter Aussagekraft, da die durch das Sauergut oder Glattwasser eingebrachten gelösten Substanzen die Summe aller gelösten Stoffe unmittelbar beim Einmischen gegenüber dem Vergleichsversuch stark erhöhten. Diese Konzentrationserhöhung könnte sich auf die Analyse ausgewirkt und zu einem erhöhten Einmischpeak geführt haben. Vermutlich überlagerten sich hier Konzentrations-, pH- und antioxidative Effekte. Festgestellt werden konnte, dass allgemein durch die pH-Absenkung Oxidationsreaktionen in der Maische gehemmt wurden und dass die Sauergutgabe beim Einmischen eine antioxidative Wirkung hervorrief. Auf welche Eigenschaft des Sauergutes die antioxidative Wirkung zurückzuführen war, und ob das Glattwasser tatsächlich prooxidativ wirkte, konnte anhand dieser Ergebnisse noch nicht entschieden werden.

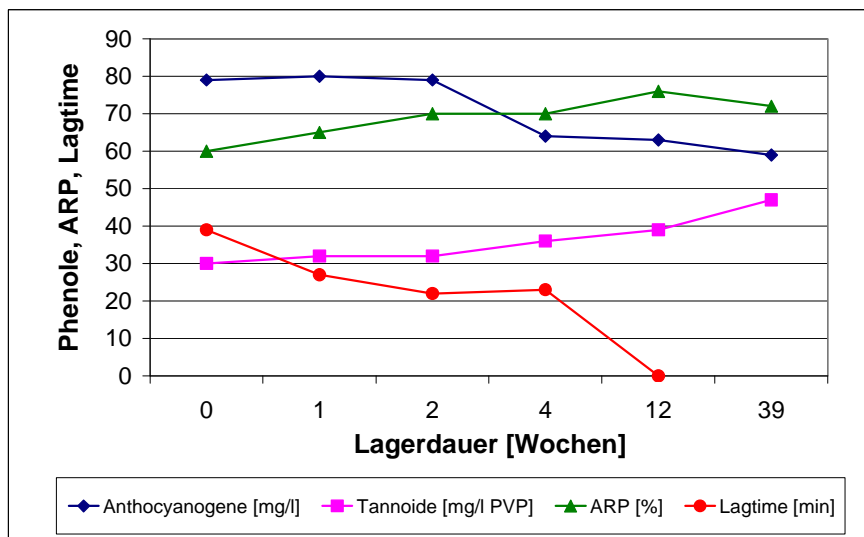
### **Untersuchung des Einflusses und der Veränderung der Polyphenole im fertigen Bier und während der Alterung.**

Um die Wirksamkeit phenolischer Substanzen auch im fertigen Bier abzuschätzen, wurde unstabiliertes Bier mit unterschiedlichen Sauerstoffbelastungen abgefüllt und bei 20°C gelagert. Die unterschiedlichen Sauerstoffeinträge wurden durch eine Veränderung der HDE-Einstellung bei der Abfüllung erreicht. Für den Versuch wurde eine Brauerei gewählt, deren Hefe grundsätzlich nur wenig SO<sub>2</sub> bildet. Aufgrund einiger Störungen in der Abfülllinie schwankten die von der Brauerei bestimmten Gehalte an Luft im Flaschenhals in der Versuchsreihe allerdings leicht, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

Die Biere mit den vier HDE-Einstellungen (ohne HDE, HDE direkt vor dem Füller, HDE mittig, HDE ganz hinten = beste Einstellung, niedrigster O<sub>2</sub> - Eintrag) unter-

schieden sich in ihren Gehalten an Anthocyanogenen, Tannoiden und Gerbstoffen sowie in den antioxidativen Tests während der ersten drei Monate nicht. Nach einer Lagerdauer von 12 Wochen konnten allerdings eindeutige, den HDE-Einstellungen entsprechende Unterschiede in der Sensorik und in der gaschromatischen Bestimmung der Alterungskomponenten festgestellt werden. Erst nach einer Lagerdauer von 39 Wochen zeigten sich Unterschiede zwischen den Bieren in den nasschemischen Analysen. Die Biere mit den schlechteren HDE-Einstellungen wiesen hier leicht erhöhte Gehalte an Tannoiden und Gerbstoffen auf.

Aufschlussreicher war der Vergleich der Proben einer Abfüllung (gleiche HDE-Einstellung) über die Lagerdauer. Abbildung 44 zeigt die Veränderung der Anthocyanogene, der Tannoiden, des ARP und der Lagtime über den Verlauf der natürlichen Alterung am Beispiel des Bieres, das ohne HDE abgefüllt wurde. Die Gerbstoffe (nicht abgebildet) nahmen im Untersuchungszeitraum tendenziell ab (am Rande der Analysengenauigkeit) und das Reduktionsvermögen (nicht abgebildet) blieb über die ersten 12 Wochen konstant bei rund 30 % und stieg im folgenden bis zur 39. Woche auf 46 % an.



**Abbildung 44: Ausgewählte Merkmale der Biere im Verlauf einer natürlichen Alterung.**

Bereits in den ersten zwei Wochen sank die Lagtime von rund 39 auf 22 min, um in den folgenden zwei Wochen konstant zu bleiben. Der schnelle Abfall zu Beginn war mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die vorhandene Sauerstoffbelastung zurückzuführen. Möglicherweise wurde in den ersten zwei Wochen das wenige vorhandene Sulfid aufgebraucht. Da mit diesem Ergebnis nicht gerechnet wurde, war keine

Schwefeldioxidmessung durchgeführt worden. Inzwischen hat sich jedoch bei anderen Untersuchungen gezeigt, dass Biere, die kein  $\text{SO}_2$  enthalten, noch eine Lagtime im Bereich von 20 bis 40 min besitzen. Die Gehalte an Anthocyanogenen und Tannoiden blieben während der ersten zwei Wochen unverändert. Ab der zweiten Woche, als die Lagtime auf 22 min abgesunken war, begann der Anthocyanogengehalt kontinuierlich zugunsten des Tannoidgehaltes zu sinken, was auf Polymerisationsreaktionen schließen ließ. Das ARP begann bereits direkt nach der Abfüllung langsam zu scheinbar besseren Werten zu steigen. Dieses Verhalten deutet erfahrungsgemäß auf Oxidationsreaktionen hin. Möglicherweise wurden hierbei reduktiv wirkende Reaktionsprodukte von Oxidationsreaktionen erfasst. Nach 39 Wochen wiesen alle Biere eine starke Trübung auf. An der Forschungsstelle 1 sind hierzu weitere Untersuchungen, mit dem Ziel, die genauen chemisch-physikalischen Abläufe während der Alterung aufzuklären, geplant.

Abbildung 45 zeigt das Verhalten einiger ausgewählter Einzelverbindungen während der natürlichen Lagerung am Beispiel des Bieres, das ohne HDE abgefüllt wurde.

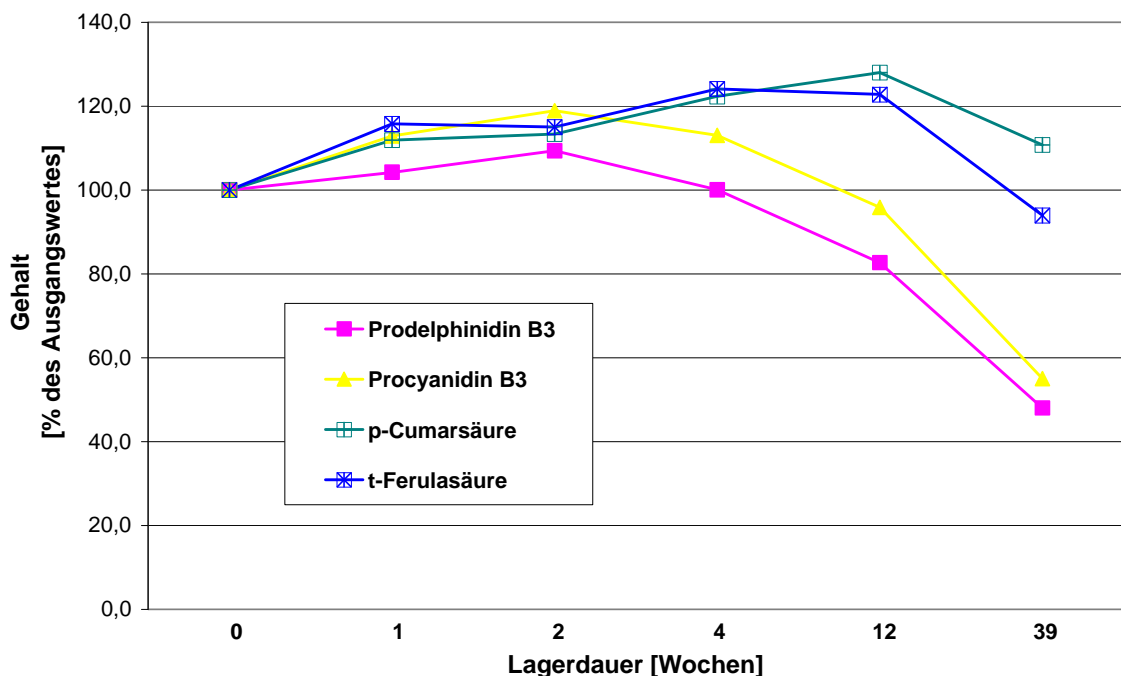


Abbildung 45: ausgewählte Einzelverbindungen während der natürlichen Lagerung (Abfüllung ohne HDE).

Bei den dimeren Proanthocyanidinen Prodelphinidin B3 und Procyanidin B3 zeigt sich zunächst eine leichte Zunahme, im weiteren Verlauf der Lagerung aber eine



sehr deutliche Abnahme auf ca. 50% des ursprünglichen Gehaltes. Es könnte sich hierbei um die Überlagerung zweier gegenläufiger Mechanismen handeln. Zum einen die Bildung der beiden Dimere in Folge von Polymerisierungsreaktionen oder Abbau von höheren Oligomeren, zum anderen ein oxidativer Abbau. Da die möglichen Oxidationsprodukte mit der verwendeten Analyse-methode nicht erfasst werden konnten, kann diese Vermutung aber nicht bestätigt werden.

Die Gehalte der Hydroxyzimtsäuren liegen auch nach der Lagerung über 39 Wochen in etwa bei ihren Ausgangswerten. Die leichte Zunahme im mittleren Bereich der Lagerung könnte auf den Abbau von glykosidischen Verbindungen zurückgeführt werden.

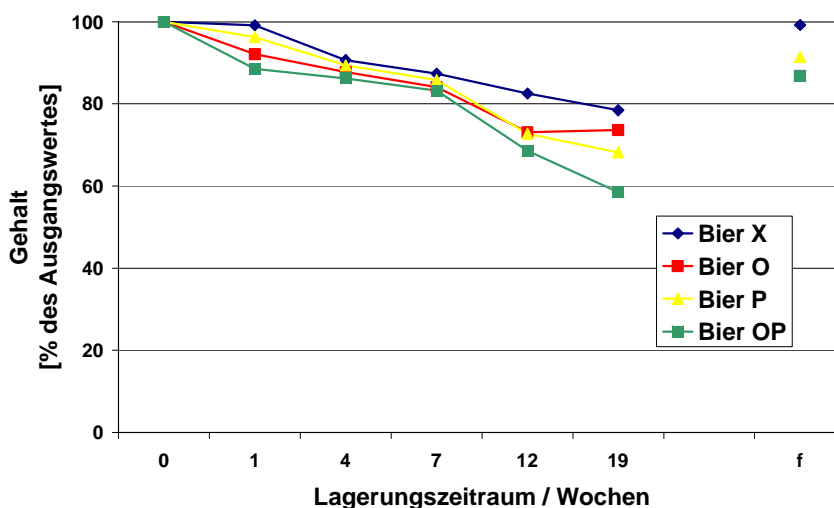
In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Alterung eines Bieres verfolgt, dem niedermolekulare phenolische Substanzen zugesetzt worden waren. Ein Teil des Bieres wurde sauerstoffbelastet abgefüllt. Das wurde erreicht, indem die betreffenden Flaschen ohne Vorevakuierung und ohne Vorspannen mit CO<sub>2</sub> abgefüllt wurden. Insgesamt wurden vier Biere abgefüllt: Mit und ohne Zugabe von Phenolen und jeweils mit und ohne Sauerstoffbelastung. Für den Versuch wurde ein stabilisiertes Bier gewählt, das keine Tannoide mehr enthielt. Bei den HPLC-MS-Untersuchungen waren nur die Proanthocyanidin-Dimere „GC“ (Prodelphinidin B3) und „CC“ (Procyanidin B3) quantitativ erfassbar. Sie waren in sehr geringen Gehalten von 1,2 mg/l (ProD B3) bzw. 1,7 mg/l (ProC B3) enthalten. Im Bier wurde ein vernachlässigbarer SO<sub>2</sub>-Gehalt von 0,6 mg/l gemessen. In Tabelle 10 sind die zugegebenen Mengen phenolischer Substanzen abgebildet.

**Tabelle 10: Gehalte des Versuchsbieres an ausgewählten phenolischen Substanzen und im Versuch zugegebene Mengen.**

Substanz	Natürlicher Gehalt im Bier [mg/l]	Zugabe [mg/l]
Catechin	2,6	7,9
Epicatechin	0,8	3,1
p-Cumarsäure	1,4	3,3
Ferulasäure	2,5	7,1
Sinapinsäure	0,5	3,0

Die Biere wurden während einer natürlichen Alterung (20 °C) über 19 Wochen analytisch untersucht, sowie zusätzlich nach einer forcierten Alterung. Über den gesamten Zeitraum betrachtet, nahm auch hier der Anthocyanogehalt bei allen Bieren kontinuierlich ab. Die Tannine blieben jedoch unter der Nachweisgrenze. Der Gerbstoffgehalt stieg bei allen Bieren während der ersten 4 Wochen an und blieb dann im weiteren Verlauf der Alterung auf konstantem Niveau. Das ARP stieg über den gesamten Alterungsverlauf leicht an. Die Lagtime sank bei allen Bieren innerhalb der ersten 4 Wochen von rund 30 auf etwa 10 min, wobei sich zwischen den vier Bieren keine eindeutigen Unterschiede zeigten.

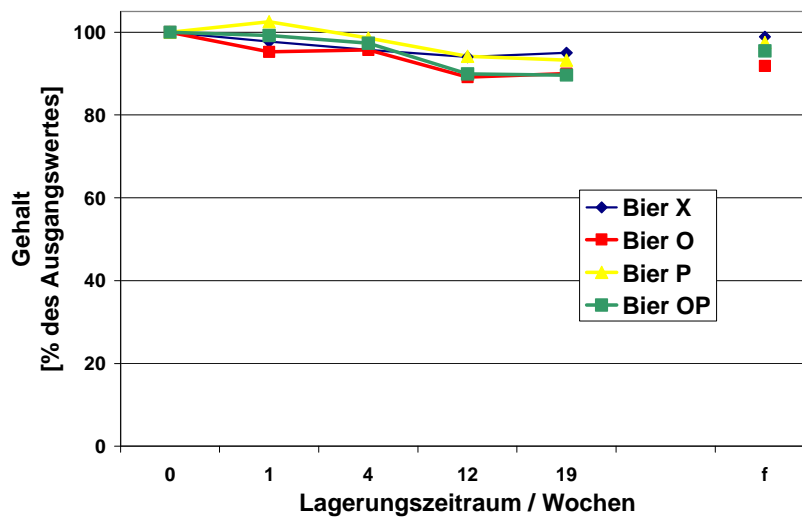
Abbildung 46 zeigt exemplarisch den Abbau von Epicatechin im Verlauf der Lagerung. Deutlich ist zu erkennen, dass der Abbau im sauerstoffbelasteten Bier (rote und grüne Linie, im Vergleich zur blauen und gelben Linie) beschleunigt abläuft. Das ebenfalls zur Gruppe der Flavanole gehörende Catechin verhält sich ähnlich. Eine mit dem Abbau der monomeren Flavanole einhergehende Bildung von oligomeren Proanthocyanidinen konnte nicht festgestellt werden. Über die Entstehung von Oxidationsprodukten der monomeren Flavanole oder der Proanthocyanidine kann keine Aussage getroffen werden, da keine speziellen Untersuchungen hierzu durchgeführt werden konnten.



**Abbildung 46: Abbau von Epicatechin während der Lagerung**

**Bier X:** ohne Sauerstoffbelastung, ohne Polyphenolzugabe; **Bier O:** Sauerstoffbelastung; **Bier P:** Polyphenolzugabe; **Bier OP:** Sauerstoffbelastung und Polyphenolzugabe.

Wie Abbildung 47 am Beispiel von p-Cumarsäure verdeutlicht, sind die Hydroxyzimtsäuren über die Lagerung wesentlich stabiler als die Flavanole. Sie zeigen aber ebenfalls einen beschleunigten Abbau unter Sauerstoffeinfluss. Auch in diesem Fall wurden keine speziellen Untersuchungen zu möglichen Oxidationsprodukten durchgeführt.



**Abbildung 47: Abbau von p-Cumarsäure während der Lagerung  
Probenbezeichnung analog zu Abbildung 46**

In Tabelle 11 sind die Analysenergebnisse der vier Biere zu ausgewählten Zeitpunkten im Verlauf der Alterung dargestellt.

**Tabelle 11: Ausgewählte Merkmale der vier Biere im Verlauf der Alterung.**

**Polys – Zugabe von Phenolen; O<sub>2</sub> – Sauerstoffbelastung; Zeit – Wochen nach Abfüllung, f = forciert; Anthos – Anthocyanogene [mg/l]; Gerbst – Gerbstoffe [mg/l]; ARP [%]; AK – Summe Alterungskomponenten [µg/l]; DLG – Verkostungsnote nach DLG; Alt.note – Alterungsnote nach Eichhorn; Akz. – Alterungsakzeptanz nach Eichhorn.**

Probe			Phenole		ESR	GC	Verkostung			
Polys	O <sub>2</sub>	Zeit	Anthos	Gerbst	ARP	AK	DLG	Alt.note	Akz.	Attribute
		0	48	109	62	60	4,5	-	-	
	X	0	47	116	60	46	4,4	-	-	süß, breite Bittere
X		0	47	130	65	47	4,3	-	-	süß
X	X	0	47	131	65	55	4,3	-	-	süß, breite Bittere
		f	44	118	61	187	3,7	1,8	63	Würze, Beere
	X	f	45	131	62	177	3,6	2,1	48	süß, Mandel
X		f	47	139	70	180	3,7	1,8	73	süß, leichte Beere
X	X	f	47	157	68	178	3,6	2	55	Würze, Beere
		7	43	139	63	153	3,6	1,9	67	Würze, Beere
	X	7	44	133	63	165	3,4	2,4	40	Brot, Sherry
X		7	46	145	70	156	3,5	1,9	60	Würze, Beere
X	X	7	48	144	69	160	3,5	2,3	37	Sherry, Brot
		19	40	130	70	295	3,1	2,7	38	süß, sherry, nachh. Bittere
	X	19	41	129	69	289	3,2	2,6	44	sherry, nachh. Bittere
X		19	45	141	74	272	3,2	2,6	40	sherry
X	X	19	42	146	72	281	3,1	2,8	28	süß, sherry, nachh. Bittere

Die Zugabe phenolischer Substanzen wirkte sich nur im Forciertest positiv auf die Sensorik aus. Überraschenderweise konnten die vier Biere im forcierten Zustand anhand der Alterungsindikatoren jedoch nicht unterschieden werden. Nach 7 Wochen natürlicher Alterung unterschieden sich die vier Biere weder anhand der Sensorik noch anhand der Alterungskomponenten. Nach 19 Wochen zeigten die natürlich gealterten Proben anhand der Alterungsindikatoren schließlich eine deutliche positive Wirkung der Polyphenole, waren zu diesem Zeitpunkt sensorisch allerdings schon sehr stark gealtert (Sherry). Bei den sauerstofffrei abgefüllten Bieren wurde dasjenige mit den zugegebenen Polyphenolen sensorisch etwas besser bewertet. Das Bier mit Polyphenolen und Sauerstoffbelastung wurde mit Abstand am schlechtesten bewertet, wofür aber keine Erklärung gefunden werden konnte. Mögliche Erklärungsansätze liegen in negativen Geschmacksbeiträgen oder einer möglichen prooxidativen Wirkung oxidierter Polyphenole.

## Diskussion der Ergebnisse

Das antiradikalische Potential der untersuchten Gersten wurde vom Polyphenolgehalt geprägt. Die resultierenden Malze zeigten bei vergleichbarem Polyphenolgehalt ein höheres ARP, was auf weitere reduzierende Inhaltsstoffe, vermutlich Melanoidine schließen ließ. Bemerkenswert war der gute Zusammenhang des Gerbstoffgehaltes zum Radikalgehalt der Gersten, der sich zusammenfassend über Gersten und Malze darstellen ließ.

In Pflanzen stammt der überwiegende Teil der Radikale aus der Atmungskette, weshalb der Radikalgehalt als Maß für die Intensität des Zellstoffwechsels aufgefasst werden kann. Er ermöglicht somit einen umfassenden Blick auf das Wachstum der Gerste und die Mälzung und scheint Faktoren zu berücksichtigen, von denen auch die Polyphenolbildung abhängt.

Bei der folgenden Untersuchung der standardvermälzten Malze aus verschiedenen Gerstenstandorten und -sorten konnten bezüglich des Polyphenolgehaltes klare Unterschiede in Abhängigkeit von den Aufwuchsbedingungen und der Sorte festgestellt werden, wobei der Einfluss der Aufwuchsbedingungen überwog. Überraschenderweise ergab sich ein guter, negativer Zusammenhang zwischen dem Gerbstoffgehalt und dem Eiweißlösungsgrad. Der Eiweißlösungsgrad wurde allerdings in erster Linie vom Proteingehalt geprägt. Protein- und Gerbstoffgehalt hingen aufgrund ihrer Bestimmungsmethode und Berechnung wiederum vom Extraktgehalt der Malze ab. Vermutlich beruhte der Zusammenhang zwischen dem Gerbstoffgehalt und dem Eiweißlösungsgrad überwiegend auf diesen Einflüssen. Die Aufwuchsbedingungen der Gersten äußerten sich in erster Linie in unterschiedlichen Extraktgehalten.

Die Gerbstoffgehalte werden folglich, wie auch die Konzentrationen anderer Inhaltsstoffe, vor allem durch die Extraktgehalte beeinflusst. Da die Aufwuchsbedingungen ohnehin schwierig zu kontrollieren sind, bleibt wohl nur die Züchtung, um den Polyphenolgehalt bei einigen ausgewählten Sorten kontrolliert zu erhöhen.

Bei der Untersuchung der Reaktivität beim Einmischen reagierten die einzelnen Sorten auf die verschiedenen Aufwuchsbedingungen sehr unterschiedlich. Zwischen der Reaktivität und dem Polyphenolgehalt ergab sich ein indirekter Zusammenhang, allerdings scheint es noch weitere Einflussgrößen zu geben. Es konnte jedoch fest-

gestellt werden, dass Malze mit erhöhtem Polyphenolgehalt eine niedrigere Reaktivität (und damit Oxidationsanfälligkeit) aufwiesen. Die entsprechenden Würzen zeichneten sich durch ein verbessertes Reduktionsvermögen aus. Denselben Effekt rief eine Zugabe von phenolischen Substanzen beim Einmaischn hervor. Die resultierenden Biere waren sensorisch tendenziell stabiler (Forciertest), wenngleich der Unterschied hier nicht statistisch abgesichert werden konnte.

Als mögliche technologische Maßnahmen um den Polyphenolgehalt beim Maischen in diesem Sinne unabhängig von der Rohstoffauswahl zu beeinflussen, wurde die Wirkung einer Sauergut- und einer Glattwassergabe untersucht. Die antioxidative Wirkung des Sauergutes konnte bestätigt werden. Eine pH-Absenkung durch Milchsäure zeigte ebenfalls einen antioxidativen Effekt. Eine Glattwasserzugabe war nach den vorliegenden Ergebnissen abzulehnen, da sie auch prooxidativ wirken könnte.

Da ein bedeutender Teil der Oxidationsreaktionen unmittelbar beim Einmaischn abläuft, ist es unter dem Gesichtspunkt der antioxidativen Wirkung wichtig, dass das Sauergut unmittelbar beim Einmaischn zugegeben wird.

Im fertigen Bier zeigten die Polyphenole nur eine schwache Wirkung, und im Verlauf der Alterung reagierten sie erst spät, als die sensorischen Veränderungen bereits deutlich wahrgenommen werden konnten. Unter Sauerstoffbelastung könnten oxidierte Polyphenole möglicherweise sogar prooxidativ wirken.

## Literatur

Aerts, G. et al.: Evaluation of the addition of gallotannins in the brewing liquor for the improvement of the flavour stability of beer, *Proc. Congr. EBC*, 2001.

Aerts, G. et al.: Improved brewhouse performance and beer stability by addition of a minimal but effective concentration of gallotannins to the brewing and sparging liquor, *Proc. Congr. EBC*, 2003.

Andersen, M.L., Outtrup, H., Skibsted, L.H.: Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping, *J. Agric. Food Chem.* 48, 2000.

Back, W. (Hrsg.): Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2005.

Back, W.: Technologie und Analytik, *Handbuch zum 39. Technologischen Seminar Weihenstephan*, 1/1- 1/18, 2006.

Bellmer, H.G., Galensa, R., Gromus, J.: Bedeutung der Polyphenole für die Bierherstellung, *Brauwelt* 28/29, 1995.

Bishop, D.F. et.al.: Hydrogen peroxide catalytic oxidation of refractory organics in municipal waste waters, *Ind. Eng. Chem., Process Design and Development*, vol. 7, 1968.

Chapon, L., Kretschmer, K.F.: Untersuchungen über Tannoidgehalt und Reduktionkraft von Gerste und Malz, *Monatsschrift für Brauerei*, 1969.

Dalgliesh, C.E.: Flavour stability, *Proc. Congr. EBC*, 1977.

Eichhorn, P.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität, Dissertation, TU München-Weihenstephan, 1991.

Elstner, E.F.: Der Sauerstoff – Biochemie, Biologie, Medizin, BI-Wissenschafts-Verlag, Mannheim, 1990.

Franz, O.: Systematische Untersuchungen zur endogenen antioxidativen Aktivität von hellem, untergärrigen Bier unter besonderer Berücksichtigung technologischer Maßnahmen beim Brauprozess, Dissertation, TU München-Weihenstephan, 2004.

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

García, A.A. et al.: Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *J Chrom A* 1054, 2004.

Goupy, P. et al.: Antioxidant compounds of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts, *Proc. Congr. EBC*, 1999.

- Kaneda, H. et al.: Reducing activity and flavor stability of beer, *Technical Quarterly – MBAA* 32(2) 1995.
- MEBAK: Brautechnische Analysenmethoden, Band 1, 3. Auflage, Selbstverlag der MEBAK, Weihenstephan, 1997.
- MEBAK: Brautechnische Analysenmethoden, Band 2, 3. Auflage, Selbstverlag der MEBAK, Weihenstephan, 1993.
- Mikyska, A. et al.: The role of polyphenols and oxidation processes in brewhouse on beer quality, *Proc. Congr. EBC*, 2001.
- Mikyska, A. et al.: The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability, *J. Inst. Brew.* 108(1), 2002.
- McMurrough, I. et al.: The role of flavanoid polyphenols in beer stability, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54(3), 1996.
- Nakamura, T., Franz, O., Back, W.: DPPH-scavenging activity of beer and polyphenols measured by ESR, *Proc. Congr. EBC*, 2001.
- Rice–Evans, C., Miller, N., Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavanoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine* 20(7), 1996.
- Roeder, A.; Thermospray-HPLC-MS-Untersuchungen von Polyphenolen in unterschiedlichen Probenmaterialien pflanzlicher Herkunft, Dissertation, Universität Braunschweig, 1997.
- Szymusiak, H. et. al.: Flavanoid anion radicals – structure and ESR properties, 20th International Conference on Polyphenols, Polyphenol Communications 2000, vol. 1, Weihenstephan, 2000.
- Uchida, M., Ono, M.: Determination of hydrogen peroxide in beer and its role in beer oxidation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57(4), 1999.
- Uchida, M., Ono, M.: Improvement for oxidative flavor stability of beer – role of OH-radical in beer oxidation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 1996.
- Vrtelova, H., Dolezalova, A.: Effect of polyphenols on the analytical criteria which characterizes the quality of malt. Part II. Experimental work, *Kvasny Prumysl* 22(4), 1976.
- Walters, M.T.: Natural antioxidants and flavour stability, *Ferment* 10, 1997.
- Wen, Y. et al.: Relationship between climatic factors and contents of petroleum ether extracts and polyphenol compounds in Yunnan tobacco, *Hunan Nongye Daxue Xuebao* 28(2), 2002.



Einen umfangreichen Überblick über weiterführende Literatur gibt der Abschlussbericht des Vorgänger-Projektes (AiF-Projekt 12605N: Systematische Untersuchungen zur endogenen antioxidativen Aktivität von Bier unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole und ihrer Veränderungen im Brauprozess); auch im Internet abrufbar unter [www.wifoe.org](http://www.wifoe.org)

### **Veröffentlichungen FSt. 1:**

M. Wurzbacher; Einsatzmöglichkeiten der Elektronenspinresonanz - Spektroskopie (ESR) zur Beurteilung der antioxidativen Eigenschaften von Malz, Würze und Bier; *Handbuch zum 39. Technologischen Seminar Weihenstephan*, 4/1 – 4/9, 2006.

### **Veröffentlichungen FSt. 2:**

C. Kinitz; Identifizierung und Bestimmung von Polyphenolen in Braurohstoffen und Bier mit HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>; Dissertation Universität Bonn; in Vorbereitung.

C. Kinitz; Narrow-bore LC-MS zur Polyphenol-Analytik – Prozesskontrolle in Brauereien (Vortrag); Anwenderforum „Summit HPLC“ der Fa. Dionex GmbH, Düsseldorf; 16. Februar 2005.

C. Kinitz, M. Papagiannopoulos, R. Galensa; Das ist Ihr Bier! Übersicht über die phenolischen Inhaltsstoffe von Bier und ihre Identifizierung mit HPLC-MS<sup>n</sup> (Poster); 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn; 13. – 15. September 2004; in: *Lebensmittelchemie* 59:42.

C. Kinitz, M. Papagiannopoulos, R. Galensa; Determination of phenolic ingredients in beer by HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> (Poster); XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland; 25. – 28. August 2004; in: *Polyphenols Communications 2004*, P254.

M. Papagiannopoulos, C. Kinitz, R. Galensa; Analysis of Polyphenols: Benefits of Method-Optimization (Vortrag); XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland; 25. – 28. August 2004; in: *Polyphenols Communications 2004*, O 31.