

Abschlussbericht an die Wissenschaftsförderung
der Deutschen Brauwirtschaft

Technische Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt

Department für Lebensmittel und Ernährung

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I
85354 Freising-Weihenstephan

**Technologische Beeinflussung des enzymatischen Lipidabbaus
beim Maischen zur Verbesserung der Geschmacks- und
Schaumstabilität des Bieres**

Forschungsprojekt B73

Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Back

INHALTSVERZEICHNIS

1 AUSGANGSSITUATION	3
2 FORSCHUNGSERGEBNISSE	4
2.1 Untersuchung der Aktivitätseigenschaften lipidabbauender Enzyme	4
2.1.1 Aufreinigung und Charakterisierung einer Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktion	4
2.1.2 Untersuchung der Lipoxygenase- und Lipase-Aktivität	5
2.1.3 Bestimmung des Molekulargewichts der aufgereinigten Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktionen	6
2.2 Modifizierung bzw. Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der entstandenen Lipidabbauprodukte	7
3. ERGEBNISSE	8
3.1 Auswirkungen des lipidabbauenden Enzympotenzials im Malz auf die Abbauprodukte im Maischeprozess	8
3.1.1 Einfluss der Rohstoffauswahl auf das lipidabbauende Enzympotenzial	8
3.1.2 Einfluss des Enzympotenzials auf den Hydroperoxid-Gehalt	8
3.1.3 Einfluss des Maischverfahrens auf den Verlauf des Hydroperoxid-Gehaltes während des Maischens	10
3.1.4 Bestimmung der Lipase-Aktivität im Verlauf des Maischprozesses	12
3.1.5 Leitsubstanzen des Lipidabbaus	14
3.2 Praxisversuche zur technologischen Beeinflussbarkeit des Lipidabbaus	14
3.2.1 Erfassung der freien langkettigen Fettsäuren in Würze über den Verlauf der Würzebereitung	14
3.2.2 Fettabbauprodukte während der Würzebereitung	15
4 ZUSAMMENFASSUNG	16
5 VERÖFFENTLICHUNGEN UND PUBLIKATIONEN	16

1 Ausgangssituation

In der Gerste befinden sich Lipide in einer Menge von 2,2-2,5 % in der Trockensubstanz. Die Gerstenlipide setzen sich zusammen aus ca. 70 % Neutrallipiden (89-96 % Triacylglyceride), 20% Phospholipiden und 10 % Glycolipiden. Bei den vorliegenden Triacylglycerinen kann Glycerin mit bis zu drei verschiedenen Fettsäuren verestert sein. In der Gerste handelt es sich dabei hauptsächlich um die Fettsäuren Linolsäure (56 %), Palmitinsäure (22 %) und Ölsäure (11-14 %). Bei der Vermälzung der Gerste sinkt der Rohfettgehalt durch die Atmungsvorgänge und die Ausbildung von Blatt- und Wurzelkeim um 20-27 %. Dabei verschiebt sich die Zusammensetzung der Triglyceride zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolsäure und Linolensäure.^{1,2}

Der enzymatische Lipidabbau erfolgt einerseits durch die Enzyme des Malzes (Lipasen, Lipoxygenasen, etc.), andererseits werden die freien oder als Ester gebundenen Fettsäuren durch Autoxidation und Photooxidation zu Carbonylen abgebaut. In Abbildung 1 sind die möglichen Wege des Lipidabbaus schematisch dargestellt. Abbildung 2 zeigt Enzyme des Lipidabbaus und ihre Abbauprodukte.³

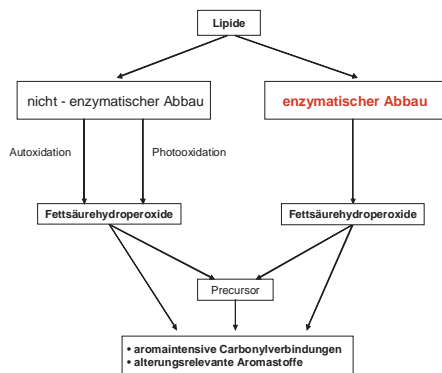


Abbildung 1: Wege des Lipidabbaus

Ehemalige Bezeichnung in der Literatur:

Hydroperoxid Isomerase
Hydroperoxid Dehydratase
Hydroperoxid Isomerase

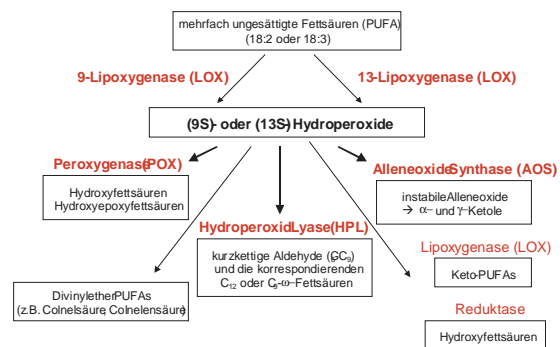


Abbildung 2: Enzyme des Lipidabbaus

Aktuelle Bezeichnung in der Literatur:

Peroxygenase (POX)
Alleneoxide Synthase (AOS)
Hydroperoxid Lyase (HPL)

Die beim Abbau der mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehenden Intermediär- und Abbauprodukte gelten als Vorläufer aromaintensiver Carbonyle sowie alterungsrelevanter Aromastoffe, die maßgeblichen Einfluss auf die Schaum- und Geschmacksstabilität des Bieres ausüben. Entscheidend für die Aromaänderung bei der Bieralterung ist, in welchem Maße beim Maischen und Läutern gesättigte und ungesättigte Fettsäuren und gebildete Zwischenprodukte bis ins abgefüllte Bier gelangen.^{4,5,6,7,8,9}

Vor allem der Gehalt an Mono-, Di- und Trihydroxyfettsäuren in Würze und Bier war Thema zahlreicher Forschungsarbeiten hinsichtlich ihres Einflusses auf die

Geschmacks- und Schaumstabilität des Bieres. Bestehende Publikationen haben gezeigt, dass die Hefe beim Abbau von Fettsäuren und deren Oxidationsprodukten streng differenziert, und zwar insbesondere in Bezug auf die Stereochemie.¹⁰ Damit konnte den Mono- und Dihydroxyfettsäuren eine große Bedeutung im Hefestoffwechsel nachgewiesen werden. Daher wäre es von Vorteil die enzymatischen Lipidabbauprodukte bereits im vorangehenden Prozessschritt, der Würzebereitung, beeinflussen zu können.

Forschungsziele:

- Untersuchung der Aktivitätseigenschaften lipidabbauender Enzyme
- Charakterisierung einer aufgereinigten Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktion

Technologische Einflussmöglichkeiten:

- Rohstoffauswahl (Enzympotenzial):
 - Sortenabhängigkeit
 - Standortabhängigkeit
- Variation der Maischparameter:
 - Maische-pH
 - Temperaturführung
 - Maischverfahren

2 Forschungsergebnisse

2.1 Untersuchung der Aktivitätseigenschaften lipidabbauender Enzyme

2.1.1 Aufreinigung und Charakterisierung einer Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktion

Um die Hydroperoxid-abbauende Enzymfraktion näher charakterisieren zu können, wurde versucht über drei Aufreinigungsschritte eine möglichst reine Enzymfraktion zu erhalten. Dazu wurde im ersten Aufreinigungsschritt der Malzkaltauszug einer fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat in Sättigungskonzentrationen von 40-70 % unterzogen. Der Überstand sowie das in Puffer wiederaufgenommene Pellet wurden mittels einer Hi Prep 26/10 Desalting Column (alternativ: Dialyse) entsalzt. Die erhaltene Fraktion wurde über eine Ion-Exchange Chromatography (Source 30 Q Column) und eine Superdex prep grade 26/60 Column ($M_r = 1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$) präparativ aufgereinigt und nach Retentionszeit getrennt gesammelt. Die Enzymtätigkeit der vorliegenden Fraktionen wurde nach definierter Substratzugabe über die entstandenen Abbauprodukte bei 234 nm spektralphotometrisch bestimmt.

In der entsalzten Proteinfraktion sowie in den mittels Ionenaustauscherchromatographie aufgereinigten Fraktionen konnte, wahrscheinlich auf Grund der Verdünnung, keine Enzymaktivität mehr festgestellt werden. Die Gewinnung der Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktion beschränkt sich daher bei den folgenden Untersuchungen auf den präparativen Aufreinigungsschritt. Eine wiederholte gelchromatographische Auftrennung der Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktion brachte keine Steigerung der Reinheit der Fraktion bzw. der Enzymaktivität mit sich. Um bei den folgenden Versuchen eine vergleichbare Analytik zur Bestimmung der Enzymaktivität zu erhalten, wurde einerseits der Zusammenhang zwischen der Substratkonzentration und der Enzymaktivität, andererseits der Einfluss einer Verdünnung der Enzymfraktion bei gleich bleibender Substratkonzentration untersucht. Ein günstiges Verdünnungsverhältnis zwischen Puffer und Enzymfraktion sowie eine Substratkonzentration von 20-25 μ l gewährleisteten einen linearen Verlauf der Extinktionsabnahme in der ersten Minute der Messung. Die Enzymaktivität errechnet sich aus der Extinktionsabnahme pro Minute, welche im linearen Bereich des Verlaufes der Extinktion abgelesen wird.

Charakterisiert wurde die Hydroperoxid-abbauende Enzymfraktion hinsichtlich ihrer pH-Abhängigkeit und Temperaturstabilität in Puffer. Zusätzlich wurde der Einfluss der Rohstoffauswahl auf das Enzympotenzial bzw. die Enzymaktivität untersucht.

Die durchgeführten Aktivitätsmessungen in Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten zeigten die höchste Aktivität der gewonnenen Enzymfraktion bei einem pH von 7,0. Dabei konnte tendenziell im leicht basischen Bereich eine geringere Abnahme der Aktivität als im leicht sauren Bereich beobachtet werden. Um den Einfluss der Extraktion zu berücksichtigen, wurde ein Kaltauszug jeweils im pH-Bereich des Eluenten als auch bei pH 7,0 erstellt. Als Extraktionsmittel bzw. Eluent dienten Phosphatpuffer im pH-Bereich von 5 - 8. Die Extraktion des Malzauszuges im saueren Bereich zeigte eine zusätzliche Schwächung der Enzymaktivität.

Des Weiteren wurde die Temperaturstabilität der Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktion in Puffer untersucht. Die Einstellung der gewünschten Temperatur erfolgte mit Hilfe zweier Temperierbäder über das Mischungskreuz. Um eine Aufheizphase zu umgehen, wurde dem vorgewärmtem Puffer die Enzymfraktion (20 $^{\circ}$ C) im Mischungsverhältnis 1:6 zugesetzt und die eingestellte Temperatur für 10 Minuten konstant gehalten. Die Probenahme erfolgte nach 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 und 10,0 Minuten. Nach der Entnahme wurde die Probe sofort auf ca. 10 $^{\circ}$ C abgekühlt. Die Enzymaktivität wurde anschließend bei 20 $^{\circ}$ C spektralphotometrisch gemessen. Dabei zeigte sich im Bereich von 40 - 60 $^{\circ}$ C keine Beeinträchtigung der Enzymaktivität. Im Temperaturbereich 70 $^{\circ}$ C konnten nach 6 Minuten bereits Instabilitäten festgestellt werden. Nach 4 Minuten bei 75 $^{\circ}$ C sank die Enzymaktivität unter 50 % der maximalen Enzymaktivität. Als Referenz diente die Aktivitätsmessung einer untemperierten Fraktion bei 20 $^{\circ}$ C. Aufgrund der Ergebnisse ist zu erwarten, dass die Hydroperoxid-abbauenden Enzyme im pH der Maische (5,2-5,8) und während der Würzebereitung noch eine relativ hohe Aktivität aufweisen.

2.1.2 Untersuchung der Lipoxygenase- und Lipase-Aktivität

Ebenso wie die Hydroperoxid-abbauende Enzymfraktion wurden auch die Lipoxygenase-Fraktion und die Lipase-Fraktion über die Größenausschlusschromatographie fraktioniert und die Aktivität spektralphotometrisch gemessen. Die

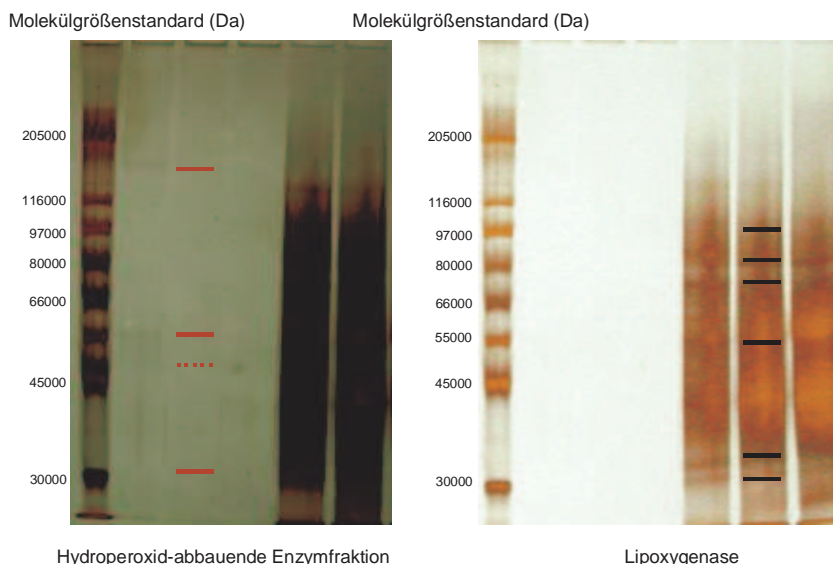
Messung der Lipoxygenasen-Aktivität erfolgte ebenfalls bei 234 nm über die Zunahme der Extinktion pro Minute

Die Lipase-Aktivität wurde mit Paranitrophenylpalmitat bestimmt. Die bei Enzymaktivität entstehende Gelbfärbung kann bei einer Wellenlänge von 410 nm spektrophotometrisch erfasst werden (Quelle: FH Flensburg, Gelchromatographie und Enzymaktivität, Praktikum Biochemie). Zur Untersuchung der Lipase-Aktivität während des Maischens wurde jedoch die im Abschnitt 2.2 beschriebene Methode nach Kwon und Rhee herangezogen. Die Lipase-Aktivität des Malzes ist vornehmlich standortabhängig.

2.1.3 Bestimmung des Molekulargewichts der aufgereinigten Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktionen

Um die fraktionierten Enzyme des Lipidabbaus hinsichtlich ihres Molekulargewichts einstufen zu können, wurde eine gelchromatographische Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe eines Molekülgrößenstandards durchgeführt (Molecular Weight Marker Kit 12.400-700.000 Da, Sigma). Der Proteinstandard bzw. die gewonnenen Enzymfraktionen (Probenvolumen 1 ml) wurden mit einem Säulenfluss von 1 ml/min nach dem Größenausschlussverfahren gelchromatographisch getrennt und über einen Fluoreszenzdetektor ($E_m = 225 \text{ nm}$, $E_x = 280, 340, 410 \text{ nm}$) detektiert. Die logarithmische Auftragung des Molekulargewichts in $\lg kDa$ über die ermittelte Retentionszeit ermöglicht die Erstellung einer Kalibrationsgeraden. Die für Lipoxygenase und Lipase (wheat germ, Sigma) ermittelten Molekülgrößen stimmten mit den aus der Literatur bekannten Molekulargewichten überein. Für die untersuchte Hydroperoxid-abbauende Enzymfraktion errechnete sich ein Molekulargewicht von größer 600 kDa. Diese Molekülgröße kann jedoch im Rahmen des Trennbereiches der Säule nicht genau bestimmt werden bzw. lässt auf einen Proteinkomplex rückschließen.

Bei einer elektrophoretischen Auftrennung über SDS-Page (Homogeneous 7.5) konnten in der Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktion drei Banden identifiziert und über einen Molekülgrößenstandard dem entsprechenden Molekulargewicht zugeordnet werden. Es zeigt sich hier unabhängig von Standort und Sorte (3 Sorten, 2 Standorte) eine



identische Bandenverteilung.

Die Hydroperoxid-abbauende Enzymfraktion zeigt Banden im Bereich von 30 kDa, 50 kDa (schwach) und 55 kDa. Diese Banden finden sich jedoch auch in der aufgetragenen Lipoxygenase-Fraktion wieder. Eine gesonderte Bande befindet sich im Bereich zwischen 130-150 kDa. Die Lipoxygenase zeigt eine für Lipoxygenase aus Gerste charakteristische Bande im Bereich von 95 kDa.

2.2 Modifizierung bzw. Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der entstandenen Lipidabbauprodukte

- 1) Colorimetrische Bestimmung der Lipase-Aktivität in Maische nach Kwon und Rhee über die entstandenen freien Fettsäuren^{11,12}

Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass freie Fettsäuren mit Kupfer(II)-Salzen blaue, in Isooctan oder Toluol lösliche Kupferseifen bilden, die bei 234 nm spektralphotometrisch erfasst werden können. Die Kalibration der Methode erfolgt über fünf Kalibrationsniveaus mit Konzentrationen von 2-50 µM/5ml.

Zur Bestimmung der Lipase-Aktivität in Maische wird aus den gefriergetrockneten, nicht löslichen Maischebestandteilen ein Acetonpulver erstellt und die freien Fettsäuren, welche durch Lipase-Aktivität freigesetzt werden, nach der oben beschriebenen Methode analysiert.

- 2) Methode zur Bestimmung der langkettigen Fettsäuren in Würze und Bier mittels GC/MS

Da die langkettigen Fettsäuren als „Ausgangsstoffe“ des enzymatischen Lipidabbaus angesehen werden können, wurde auch der Gehalt an langkettigen Fettsäuren in Malz, Maische und Bier bestimmt. In der zuerst verwendeten Analytik wurde der Gehalt an freien langkettigen Fettsäuren direkt bestimmt, im weiteren Verlauf der Arbeit wurde diese Methode durch eine Methode zur Bestimmung der freien langkettigen Fettsäuren als Fettsäuremethylester ersetzt.

Die höheren freien Fettsäuren wurden nach einer Festphasenextraktion (Chromabond C18ec) im Eluat (MeCl₂) aufkonzentriert und über GC-MS erfasst. Zur Bestimmung der freien Fettsäuremethylester folgte nach der Festphasenextraktion mit Diethylether (Eluent) eine Methylierung mittels Diazald® (Aldrich Mini Diazald Apparatur, Sigma-Aldrich Co., USA).

- 3) Bestimmung der Summe der C18:2- und C18:3-Hydroperoxide mittels HPLC

Nach einer Festphasenextraktion (Strata C18-E, Phenomenex/Deutschland) wurde das Eluat (MeCl₂) mit Stickstoff verblasen, die Hydroperoxide im HPLC-Eluenten (Acetonitril:Wasser) wieder aufgenommen, mit einer Nucleosil Säule (250mm x 4.6 mm i. D.) aufgetrennt und mittels HPLC mit DAD/UV-Detektor identifiziert. Die Kalibrierung der Methode erfolgte über fünf Kalibrationsniveaus.

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkungen des lipidabbauenden Enzympotenzials im Malz auf die Abbauprodukte im Maischeprozess

Bei den beschriebenen Malzen wurde der Verlauf der Hydroperoxid-Konzentration während des Maischens verfolgt. Dazu wurden im Labormaßstab gesäuerte und ungesäuerte Kongreß-, Hochkurz- sowie isotherme Maischen untersucht. Die Maischen wurden in definiertem zeitlichem Abstand mit CO₂ begast, um den Einfluss der Autoxidation zu minimieren.

3.1.1 Einfluss der Rohstoffauswahl auf das lipidabbauende Enzympotenzial

Anhand von drei Gerstensorten aus zwei Standorten wurde der Einfluss des lipidabbauenden Enzympotenzials im Malz untersucht. Die Gersten wurden nach einem Standardmälzungsverfahren vermälzt und das Enzympotenzial bestimmt (vgl. Tabelle 1). Das Enzympotenzial drückt das Verhältnis zwischen Lipoxygenase-Aktivität und der Hydroperoxid-abbauenden Enzymaktivität einer gelchromatographisch aufgereinigten Enzymfraktion aus.

Wie aus der Literatur bekannt ist, haben Sorte und Standort Einfluss auf die Enzymaktivität des Malzes. Die Untersuchungen zeigen, dass bei hoher LOX-Aktivität eindeutig ein erhöhter Gehalt an Fettsäure-Hydroperoxiden (C18:2-LOOH/C18:3-LOOH) festgestellt werden kann.

Malzsorte/Standort	Lipoxygenase-Aktivität	Aktivität der „Hydroperoxid-abbauenden Enzymfraktion“
Sorte 1/Standort A	↑	↑
Sorte 1/Standort B	→	↑
Sorte 2/Standort A	→	→↓
Sorte 2/Standort B	↓	→
Sorte 3/Standort A	↑	↓
Sorte 3/Standort B	↑	→

Tabelle 1: Niveau der Enzymaktivitäten der untersuchten Malze

3.1.2 Einfluss des Enzympotenzials auf den Hydroperoxid-Gehalt

Der Konzentrationsverlauf der Summe der Linolsäure-Hydroperoxide bei zwei Malzsorten mit vergleichbarer LOX-Aktivität, jedoch unterschiedlicher Hydroperoxid-abbauender Aktivität im Hochkurzmaisverfahren zeigt, dass die Sorte 2 mit deutlich

niedrigerer Aktivität an Hydroperoxid-abbauender Fraktion eine höhere Hydroperoxid-Konzentration aufweist als die Sorte 1 mit hoher Hydroperoxid-abbauender Aktivität. Dies könnte darauf hindeuten, dass die thermotolerante Hydroperoxid-abbauende Fraktion deutlich Einfluss auf die Hydroperoxid-Konzentration in der Maische nimmt (vgl. Abbildung 3).

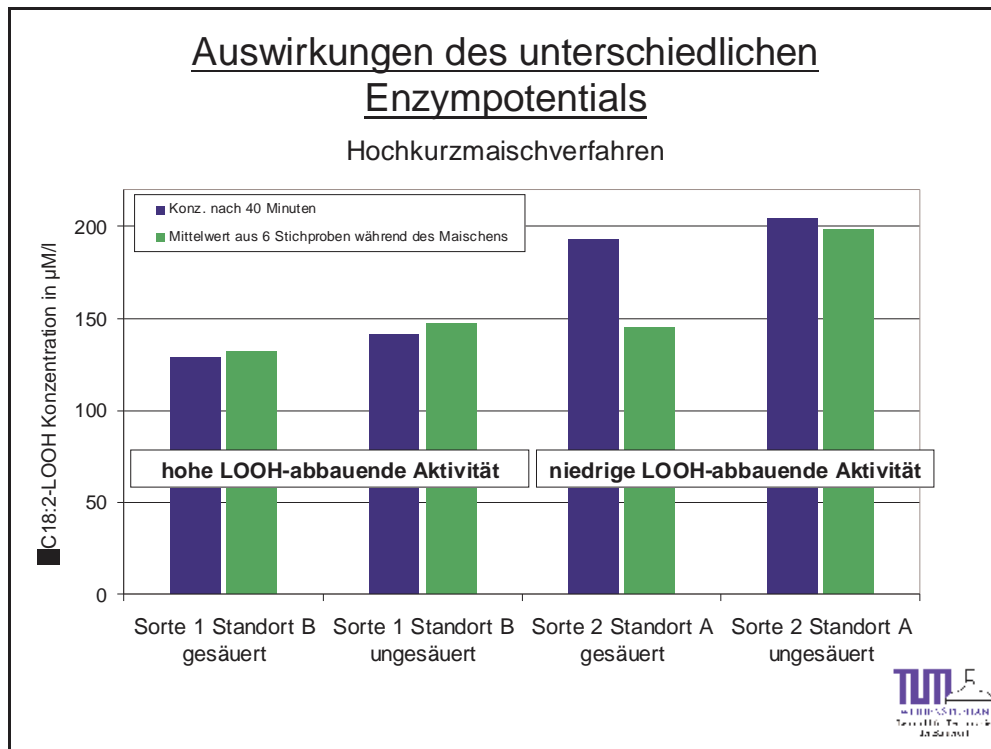


Abbildung 3: Auswirkungen des unterschiedlichen Enzympotentials

Im Vergleich von Hochkurz- und Kongressmaisverfahren wurde der Einfluss der Sorte vor allem im Kongressmaisverfahren deutlich. Im Kongressmaisverfahren ist ein rapider Anstieg der Hydroperoxid-Konzentration mit zunehmender Temperatur erkennbar, wobei im Hochkurzmaisverfahren von Anfang an eine gesteigerte Konzentration nachweisbar ist. Mit steigender Maischdauer sind im Kongressmaisverfahren größere Unterschiede in der Hydroperoxid-Konzentration zwischen den Sorten erkennbar, hingegen im Hochkurzmaisverfahren ist über die Maischdauer ein relativ gleichmäßiger Verlauf auf höherem Niveau zu beobachten (vgl. Abbildung 5 und 6).

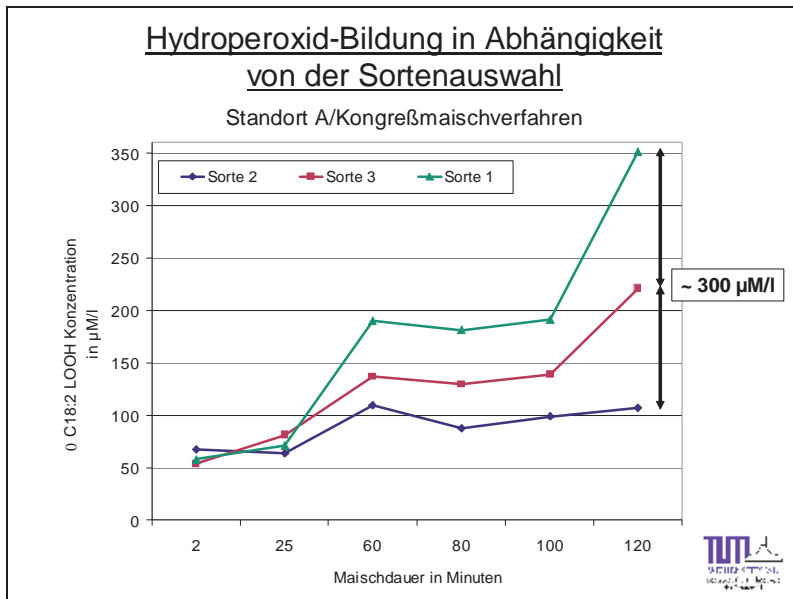


Abbildung 5: Hydroperoxid-Bildung in Abhängigkeit von der Sortenauswahl /Kongressmaisverfahren

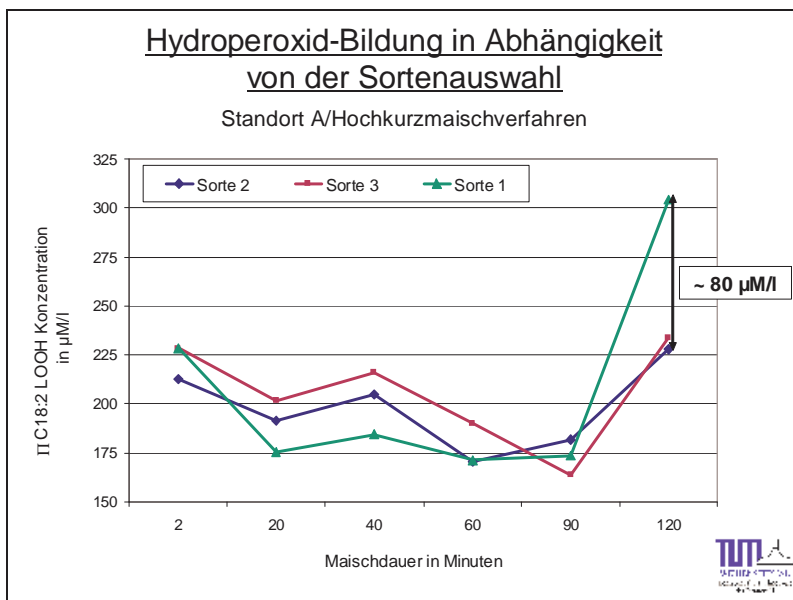


Abbildung 6: Hydroperoxid-Bildung in Abhängigkeit von der Sortenauswahl/Hochkurzmaisverfahren

3.1.3 Einfluss des Maischverfahrens auf den Verlauf des Hydroperoxid-Gehaltes während des Maischens

Des Weiteren wurde bei der Sorte 3/Standort A (hohe LOX-Aktivität, niedrige Hydroperoxid-abbauende Aktivität) der Hydroperoxid-Gehalt über den Verlauf isothermer (40 °C bis 80°C) Maischen verfolgt. Dabei zeigt sich ein deutlich erhöhter Gehalt an Fettsäure-Hydroperoxiden bei 55 - 60 °C und ein sehr niedriges Niveau an

Fettsäurehydroperoxiden bei 70 °C. Bei Temperaturen höher 75 °C ist wiederum ein Anstieg zu beobachten (vgl. Abbildung 7). Dies ist möglicherweise auf unspezifische Lipasen, die eine Freisetzung von Fettsäurehydroperoxiden aus glyceridischen Bindungen katalysieren oder thermische Einflüsse zurückzuführen.^{13,14}

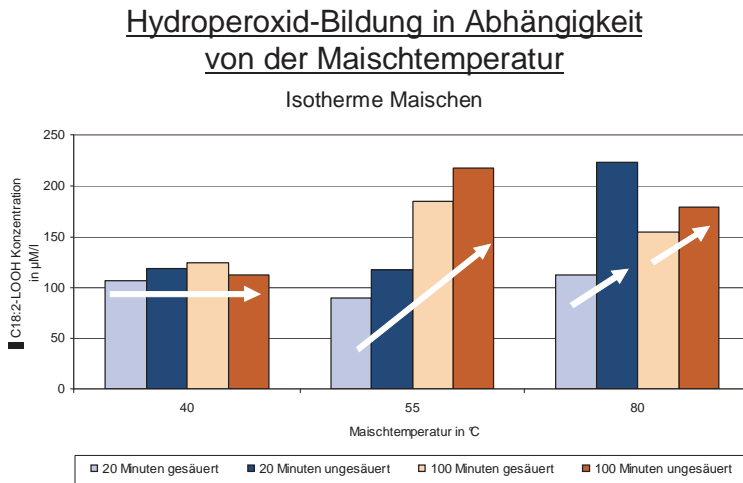


Abbildung 7: Hydroperoxid-Konzentration in Abhängigkeit von der Maischtemperatur

Temperatur und pH-Wert der Maische beeinflussen die Summe an Hydroperoxiden in der Würze. Gesäuerte Würzen (Zugabe von technischer Milchsäure) weisen eine geringere Hydroperoxid-Konzentration auf als ungesäuerte Maischen. Hohe Einmaischttemperaturen und ein niedriger pH-Wert erzielen am Ende des Maischens die geringste Hydroperoxid-Konzentration in der Würze (vgl. Abbildung 8 und 9). Es bestätigt sich, dass die Sorte mit der höchsten LOX-Aktivität die höchste Hydroperoxid-Konzentration aufweist. Die Summe der C18:3-Hydroperoxide verhält sich bei allen Versuchsreihen ähnlich, jedoch ist die Konzentration um Faktor drei bis fünf geringer.

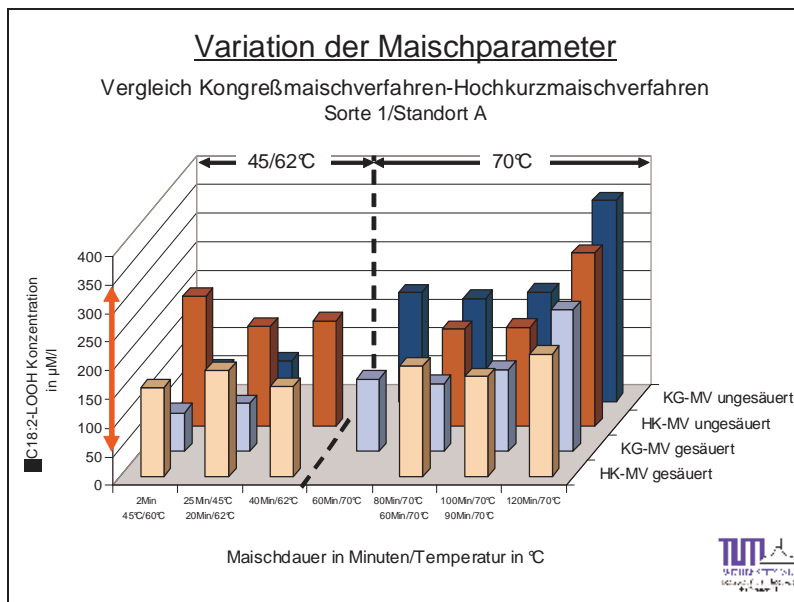


Abbildung 8: Variation der Maischparameter I

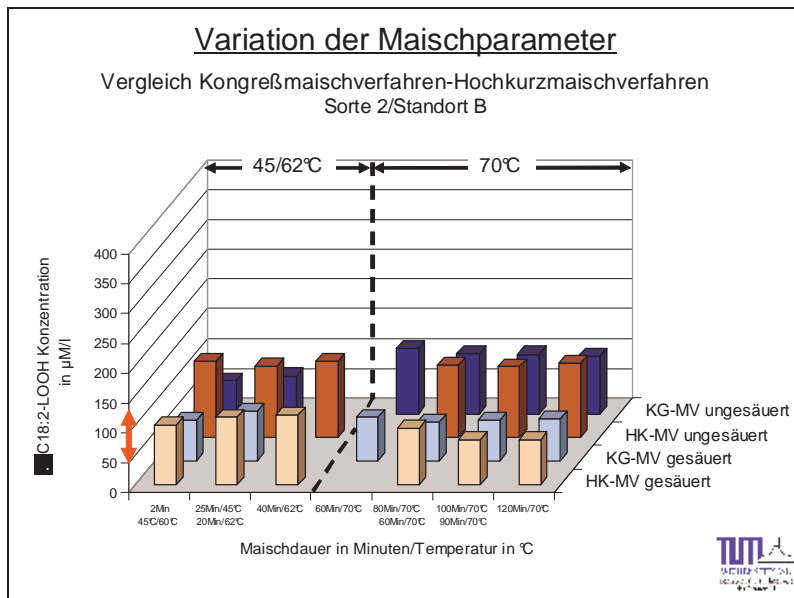


Abbildung 9: Variation der Maischparameter II

3.1.4 Bestimmung der Lipase-Aktivität im Verlauf des Maischprozesses

Die isotherm gemischte Versuchsreihe zeigte sowohl bei der gesäuerten als auch bei der ungesäuerten Maische ein deutliches Aktivitätsmaximum bei 55 °C. Nach 60 Minuten konnte eine deutliche Einschränkung der Lipase-Aktivität bzw. ein niedrigerer Gehalt an langkettigen ungesättigten Fettsäuren festgestellt werden. Auch Schwarz et al. zeigten, dass sowohl Gersten- als auch Reis-Lipasenaktivität bis zu Temperaturen von 67-70 °C während des Maischprozesses festzustellen ist (Abbildung 10 und 11).

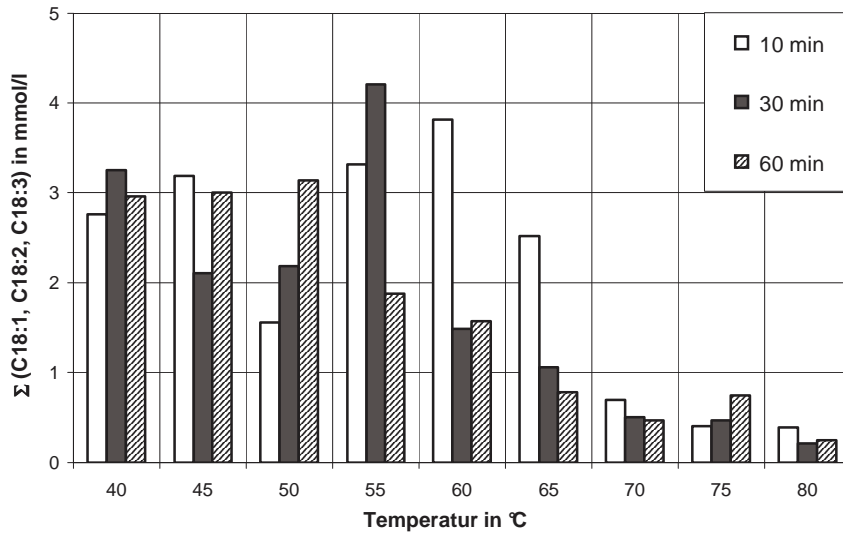


Abbildung 10: Bestimmung der Lipase-Aktivität über die entstandenen freien Fettsäuren in ungesäuerter Maische

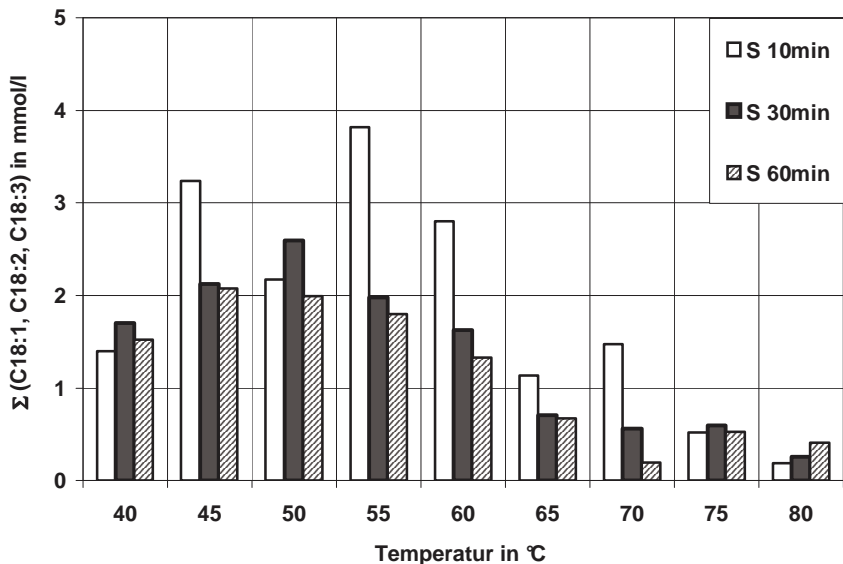


Abbildung 11: Bestimmung der Lipase-Aktivität über die entstandenen freien Fettsäuren in gesäuerter Maische

Der höchste Gehalt an freien Fettsäuren ist nach 10 Minuten zu beobachten. Durch den Einsatz der Säuerung wird die Lipase-Aktivität gehemmt, da in der gesäuerten Maische das Konzentrationsniveau bis zu 1/3 niedriger liegt und der Fettsäuregehalt mit zunehmender Maischzeit rasch abnimmt. Hingegen ist in der ungesäuerten Maische bei 55 °C nach 30 Minuten noch eine hohe Enzymaktivität nachweisbar.

3.1.5 Leitsubstanzen des Lipidabbaus

Direkte Aromakomponenten aus dem enzymatischen Fettabbau der Linolsäure sind Hexanal, Caprylsäure, 9-Oxononansäure und 2,4-Decadienale.⁷ Um geeignete Indikator- bzw. Leitsubstanzen für die Würzeuntersuchung festzulegen, wurde der Zusammenhang zwischen der LOX-Aktivität im Malzkaltauszug verschiedener Gerstensorten und den Würzearomastoffen in den erhaltenen Ausschlagwürzen untersucht. Dabei konnte ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen γ -Nonalacton und Hexanal (keine gute Korrelation) sowie ein umgekehrt proportionaler Verlauf zwischen 2-Phenylethanal und der Summe der Streckeraldehyde beobachtet werden. Γ -Nonalacton könnte eine mögliche Leitsubstanz für den Fettabbau darstellen, die sich bis ins frische bzw. forcierte Bier verfolgen lässt.

3.2 Praxisversuche zur technologischen Beeinflussbarkeit des Lipidabbaus

Sortenreine Gerstenchargen wurden für das „Berliner Programm“ der Arbeitsgemeinschaft zur Förderung des Qualitätsgerstenanbaus im Bundesgebiet e. V. am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I vermälzt. Die Brauversuche wurden im 10 Liter Kleinsudmaßstab mit 3 Sorten aus 2 Standorten im Schüttungsverhältnis 1:5 (1,5 kg Schrot zu 6 kg Brauwasser) durchgeführt. Die Schrotung erfolgte mit einer MIAG Labormühle (Walzenabstand: 0,8 mm).

Temperaturprogramm des Infusionsmaisverfahrens:

62 °C/45 Min.; 72 °C/30 Min.; 78 °C/10 Min.

Die Säuerung erfolgte zum Einmaischn mit 18 %iger technischer Milchsäure. Der Maische-pH wurde zu Beginn des Einmaischns auf pH 5,7 bzw. 5,4 eingestellt. Die Kochzeit betrug 70 Minuten. 10 Minuten vor Kochende erfolgte eine Hopfengabe mit 12 g Hallertauer Perle, 5.9 % α . Die Ausschlagwürze wurde gravimetrisch auf 12 GG% eingestellt.

3.2.1 Erfassung der freien langkettigen Fettsäuren in Würze über den Verlauf der Würzebereitung

Tabelle 2 zeigt eine Abnahme in der Gesamtkonzentration an freien langkettigen Fettsäuren mit Erniedrigung des Maische-pH. Weiterhin zeigt sich eine signifikante Abnahme der Konzentration in Vorderwürze und Pfanne-voll-Würze, jedoch der Gehalt an freien langkettigen Fettsäuren in der Ausschlagwürze sinkt auf ein ähnliches Niveau ab. Deutlich ist der Sorteneinfluss auf den Gehalt an langkettigen freien Fettsäuren zu erkennen. Die Sorte V1 zeigt einen deutlich höheren Gehalt an freien langkettigen Fettsäuren als die Sorte V2. Einerseits könnte dies durch eine unterschiedliche Enzymausstattung, andererseits durch unterschiedliche Fettgehalte der Gerste bedingt sein. Der Gehalt an freien Fettsäuren in der Würze ist sowohl von den Malzeigenschaften als auch von den Maisch- und Läuterbedingungen abhängig. Hinsichtlich des Lipidgehalts der Gerste überwiegt der Einfluss der Sorte gegenüber dem Standort. Die Abnahme an freien langkettigen Fettsäuren mit Erniedrigung des Maische-pH bestätigt eine Abnahme der Lipase-Aktivität im sauren Milieu.

Gesamtkonzentration an langkettigen Fettsäuren in mg/l				Gesamtkonzentration an langkettigen Fettsäuren in mg/l bez. auf 12 GG%			
Vorderwürze	ohne Maischesäuerung	pH 5,7	pH 5,4	Vorderwürze	ohne Maischesäuerung	pH 5,7	pH 5,4
V1 P1	24,84	21,19	20,08	V1 P1	19,51	16,38	15,95
V1 P2	22,62	20,98	19,94	V1 P2	17,42	16,10	15,63
V2 P1	23,78	22,50	18,17	V2 P1	18,38	17,43	14,19
V2 P2	23,96	21,81	18,36	V2 P2	18,27	16,35	14,25
Pfanne-voll-Würze	ohne Maischesäuerung	pH 5,7	pH 5,4	Pfanne-voll-Würze	ohne Maischesäuerung	pH 5,7	pH 5,4
V1 P1	18,79	16,72	14,97	V1 P1	23,13	19,81	18,47
V1 P2	18,30	17,06	15,43	V1 P2	21,59	19,77	18,25
V2 P1	16,67	16,44	13,10	V2 P1	20,23	19,53	15,96
V2 P2	16,58	18,04	14,20	V2 P2	20,14	21,20	16,89
Anstellwürze	ohne Maischesäuerung	pH 5,7	pH 5,4	Anstellwürze	ohne Maischesäuerung	pH 5,7	pH 5,4
V1 P1	4,70	3,64	4,09	V1 P1	4,70	4,06	4,19
V1 P2	4,34	3,50	3,94	V1 P2	4,40	3,66	4,04
V2 P1	4,27	2,81	2,76	V2 P1	4,35	2,88	2,86
V2 P2	2,86	2,77	2,34	V2 P2	2,86	2,84	2,44

Tabelle 2: Gesamtgehalt an freien langkettigen Fettsäuren in mg/l

3.2.2 Fettabbauprodukte während der Würzebereitung

Untersuchungen der Würzearomastoffe zeigten, dass mit sinkendem Maische-pH ein Anstieg der Konzentration an Würzearomastoffen aus dem Fettabbau in der Pfanne-voll Würze festzustellen ist. Da ein tiefer pH-Wert die Lösungsvorgänge fördert, ist davon auszugehen, dass auch das „In-Lösung-Gehen“ von Lipidverbindungen aus der Matrix sowie deren Abbauprodukten begünstigt wird.

Falls diese erhöhten Abbauproduktkonzentrationen durch eine intensive Ausdampfung bei der Kochung entfernt werden könnten, könnte theoretisch ein positiver Effekt hinsichtlich der Geschmacksstabilität erzielt werden.

In der Ausschlagwürze sind keine signifikanten Unterschiede in der Würzearomastoffkonzentration festzustellen. Tendenziell zeigen jedoch moderat gesäuerte Maischen ein leicht erniedrigtes Niveau an Aromastoffen in der Ausschlagwürze (Maische-pH 5,7). Diese Tendenz bestätigt sich auch in der sensorischen Bewertung der Biere.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der durchgeführten Forschungsarbeit wurden die lipidabbauenden Enzyme (Lipase, Lipoxygenase und eine Hydroperoxid-abbauende Enzymfraktion) im Maischprozess untersucht und Möglichkeiten zur technologischen Beeinflussung der Enzyme und ihrer Abbauprodukte im Maischprozess überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass sich Standort- und Sorteneinfluss maßgeblich auf das Enzympotential des Malzes und auf die Entstehung von Lipidabbauprodukten auswirken. Ebenso bestätigt sich, dass eine erhöhte Lipoxygenase-Aktivität im Malz mit einer gesteigerten Entstehung von Abbauprodukten während der Würzebereitung sowie einer Verschlechterung der Geschmacksstabilität des Bieres einhergeht. Eine hohe LOX-Aktivität des Malzes äußert sich in den durchgeführten Versuchsreihen sowohl in der Geschmackstabilität als auch in der Schaumstabilität (Vergleich frisch-forciert) der Biere negativ. Jedoch bedingte eine erhöhte LOX-Aktivität des Malzes nicht zwangsläufig schlechtere Schaumwerte im Bier. Die Ergebnisse der Praxisversuche werden ausführlich im Abschlussbericht des Folgeantrages dargestellt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den durchgeführten Versuchsreihen durch hohe Einmischtemperaturen in Kombination mit moderater Säuerung geschmacks- und schaumstabilere Biere erzielt werden konnten.

5 Veröffentlichungen und Publikationen

Neben alljährlichen Vorträgen im Rahmen des Technologischen Seminars, das vom Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I organisiert wird, wurden folgende Teilergebnisse des Forschungsprojektes in den unten aufgeführten Beiträgen veröffentlicht:

Schütz, M.; Geiger, S.; Back, W.: Enzymatischer Lipidabbau beim Maischen, Der Weihenstephaner, Heft 2, 2004.

in press: Schütz, M., Back, W., :The influence of mash acidification on long chain fatty acids in wort determined by a new developed method. Monatschrift für Brauwissenschaft 57, 11/12, 2004.

-
- ¹ Narziß, L.: Abriß der Bierbrauerei. 6., neuberarb. Aufl., Stuttgart 1995.
- ² Garbe, L.-A.: Untersuchungen zum Metabolismus von Mono- und Dihydroxyfettsäuren in Hefen, Dissertation, TU Berlin, 2002.
- ³ Feussner, I.; Wasternack, C.: The Lipoxygenase Pathway. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55, 2002.
- ⁴ Lustig, S.: Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Lagerung von Flaschenbier und deren technologische Beeinflussung beim Brauprozess. Dissertation, TU-München, 1994.
- ⁵ Boivin, P.: A review of pro- and anti-oxidant of malt, European Brewery Convention Symposium Flavour and Flavour Stability 31, 2001.
- ⁶ Kuroda, H.; Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Takashio, M.; Shinotuka, K.: Trihydroxyoctadecenoic acids having negative effects on beer foam are produced by enzymatic factors present in malt, *EBC Proc.* 2001.
- ⁷ Tressl, R.; Bahri, D.; Silwar, R.: Bildung von Aldehyden durch Lipidoxidation und deren Bedeutung als „Off-Flavor-Komponenten“ in Bier, *EBC Proc.* 1979.
- ⁸ Garbe, L.-A.; Hübke, H.; Tressl, R.: Oxygenated fatty acids and flavour stability – new insights, *EBC Proc.* 2003.
- ⁹ Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Kano, Y.; Koshina, S.: Lipid oxidation during wort production, *EBC Proc.* 1993.
- ¹⁰ Tressl, R.; Garbe, L.-A.; Lange, H.; Hübke, H.; Schulz, H.: Metabolismus oxygenierter Fettsäuren in Brauereihefen, Brau- und maschinentechnische Arbeitstagung der VLB 2001.
- ¹¹ Kwon, D., Rhee, J.: A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for Lipase assay, *JAOCS* 63, 1986.
- ¹² Schwarz, P., Stanley, P., Solberg, S.: Activity of Lipase during mashing, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60, 2002.
- ¹³ Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Kano, Y.; Koshina, S.: Determination of Fatty Acids Hydroperoxides Produced During the Production of Wort. *J. Inst. Brew.* 3/4, 1993.
- ¹⁴ Zürcher, A.: Der Einfluss des Blattkeims von Gerstenmalz auf die Geschmacksstabilität und weitere Qualitätsmerkmale von Bier, Dissertation, TU-München, 2003.