Evaluierung technologischer Maßnahmen zur Reduzierung des Hydrophobin-verursachten Gushings

Koordinierung: Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn

Forschungsstelle I: Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Prof. Dr. Rudi F. Vogel/PD Dr. Ludwig Niessen

Forschungsstelle II: Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, Freising
Prof. Dr. Thomas Becker/Dr. Martina Gastl

Industriegruppen: Deutscher Mälzerbund e.V., Frankfurt a. M.
Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V., Berlin

Projektkoordinator: Martin Göhler/Thomas Schumacher
BESTMALZ AG, Heidelberg

Laufzeit: 2010 – 2013

Zuwendungssumme: € 478.650,--
(Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Forschungsziel:

Der Begriff Gushing bezeichnet das spontane Überschäumen von Flaschenbieren nach sachgemäßer Öffnung. Dieses Phänomen ist nicht auf eine einzige Ursache zurückzuführen, sondern stellt einen multikausalen Prozess dar. Dem sekundären, technologisch bedingten Gushing wird das primäre oder rohstoffbedingte Gushing gegenübergestellt. Bei diesem wird die Ursache des Überschäumens in einem durch Schimmelpilzbefall qualitativ veränderten Malz gesehen. Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass oberflächenaktive Proteine aus Pilzen sowie enzymatische Veränderungen von Bierschaumproteinen Auslöser für das Gushing darstellen könnten. Damit ist das primäre Gushing nicht nur ein Problem der Brauereien, sondern es verlagert sich auch auf Mälzereien und Getreideerzeuger, da sich Menge, Typ und Verhältnisse dieser Proteine während der Mälzung oder durch Feldinfektionen verändern können. Die gesamte Produktionskette wird durch die notwendigen kostenintensiven Gushing-Testverfahren, mit denen betroffene Partien im Vorfeld erkannt werden sollen, finanziell stark belastet.

Immer wieder wurde in der Vergangenheit beobachtet, dass Malz aus einer Partie in einer Brauerei zu Gushing führt, während es in einer anderen Brauerei zu einem einwandfreien Produkt verarbeitet werden kann. Vergleichende Brauversuche mit definierten, Gushing-positiv getesteten Malzpartien in unterschiedlichen Brauanalagen unter festgelegten Bedingungen konnten bisher keine technologischen Einflussfaktoren aufzeigen, weil diese Arbeiten durch die Heterogenität der Anlagen und Prozesse sowie aufgrund mangelnder Verfügbarkeit entsprechend großer Malzpartien keine (statistische) Absicherung der Ergebnisse erlauben.

Ein Brauverfahren, in dem gezielt und reproduzierbar Gushing-Bier unabhängig vom Vorhandensein eines Gushing-Malzes produziert werden kann, steht derzeit nicht zur Verfügung. Dies ist jedoch die zwingende Voraussetzung für eine zielgerichtete, hypothesengeleitete Untersuchung des Einflusses technologischer Parameter auf die Ausprägung des Gushing-Effektes in Bier. Ziel des Forschungsvorhabens war daher die Erarbeitung eines Verfahrenskonzeptes sowie die Identifizierung technologischer Parameter und konkreter, daraus abgeleiteter Handlungsanweisungen für Brauereien, anhand derer

primäres, malzverursachtes Gushing minimiert werden kann. Dabei sollte durch Zugabe von transgen erzeugten Hydrophobin-Proteinen in den Brauprozess Gushing-Bier erzeugt werden. Durch Variation technologischer Brauparameter sollte eine Identifizierung jener Verfahrensschritte erfolgen, die einen Einfluss auf die Gushing-Ausprägung aufweisen. Ferner sollte das Gushing-auslösende Hydrophobin FcHyd5p mit Hilfe eines zu etablierenden immunchemischen Assays über den Brauprozess verfolgt werden, um kritische Einflussgrößen des Brauens auf das Protein aufzudecken. Mit Hilfe transgen hergestellter Bierschaum-Proteine und Gushing-Proteine sollten die Wechselwirkungen unterschiedlicher oberflächenaktiver Bierproteine und deren gegenseitige Beeinflussung in Bezug auf Gushing untersucht werden. Aus den erhaltenen Ergebnissen war schließlich eine schlüssige Hypothese über den Mechanismus der Gushing-Auslösung abzuleiten.

Forschungsergebnis:

Gene von Hydrophobin-Proteinen aus *Trichoderma reesei* und *Fusarium culmorum* wurden in die Hefe *Pichia pastoris* kloniert und heterolog exprimiert. Experimente zeigten, dass die transgenen Klasse-2-Hydrophobine FcHyd5p und Hfb2 bereits in geringen Mengen Gushing in karbonisierten Getränken auslösten, während das Klasse-1-Hydrophobin FcHyd3p dagegen keine Gushing-induzierende Wirkung hatte. Das Hydrophobin-induzierte Gushing wurde durch die Hopfenkomponenten Linalool, Hopfenöl und modifizierte iso-α-Säuren reduziert. Dies konnte auch durch Brauversuche im Pilotmaßstab bestätigt werden. Auch eine Hitzebehandlung von Klasse-2-Hydrophobinen in synthetischer Würze vor der Zugabe zu Bier führte zu einem Rückgang der Gushing-auslösenden Wirkung der Proteine. Dabei waren die Überschäumvolumina mit steigendem pH-Wert der Würze stärker reduziert. Ein Einfluss des Alkoholgehaltes auf Hydrophobin-verursachtes Gushing konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Bierschaumproteine nsLtp1 und Protein Z4 aus Gerste wurden ebenfalls heterolog in P. *pastoris* exprimiert. Durch diese Proteine wurde kein Gushing in karbonisierten Getränken ausgelöst. Es zeigte sich jedoch, dass beide einen reduzierenden Effekt auf das Überschäumvolumen bei Hydrophobin-induziertem Gushing aufwiesen.

Zur Verfolgung des Hydrophobins FcHyd5p sowie des Bierschaumproteins nsLtp1 über den Brauprozess wurde jeweils ein immunchemischer Nachweis (ELISA) entwickelt, der eine relative Quantifizierung der Proteine ermöglichte. Das Hydrophobin-Protein zeigte, vermutlich aufgrund von teilweiser Denaturierung, eine mengenmäßige Abnahme während des Maischens und des Würzekochens. Ein zusätzlicher Verlust erfolgte über die Treber. Für nsLtp1 nahm die Menge generell über den Brauprozess zu. Insbesondere während des Läuterprozesses wurde, vermutlich aufgrund des Auswaschens des Proteins aus festen Malzpartikeln, die Menge erhöht. Dennoch erfolgte ein geringer Verlust auch über die Treber. Eine Abnahme der nsLtp1-Menge erfolgte während des Würzekochens. Die Zugabe von Hydrophobin zu unterschiedlichen Stufen des Brauprozesses führte in keinem der untersuchten Fälle zu einem Gushing-Bier. Das Ziel der Etablierung eines Bauprozesses, der zu reproduzierbarem Gushing führte, konnte damit im Rahmen des Projektes nicht erreicht werden. Entsprechend konnten keine technologischen Prozessparameter bestimmt werden, die zu einer Reduzierung des malzverursachten Gushing führen.

Untersuchungen zu den Konzentrationen an nsLtp1 und FcHyd5p in Gushing-auslösenden Malzen sowie in gushenden und nicht-gushenden Bieren aus der Praxis zeigten, dass die Menge an nsLtp1 im Getränk einen entscheidenden Einfluss auf das Gushing hat. Experimente zur Interaktion zwischen dem Hydrophobin FcHyd5p und den Bierschaumproteinen nsLtp1 und Z4 zeigten, dass dieser Einfluss nicht auf eine direkte Interaktion der Proteine zurückgeht, sondern dass es sich bei der Interaktion um eine Einlagerung der Bierschaumproteine in Hydrophobin-Filme handelt, die sich an den Phasengrenzen von Gasblasen bilden und diese stabilisieren. Diese Einlagerung hat eine Reduzierung der Stabilität solcher Proteinfilme zur Folge und führt zu einer Vergrößerung von Mikroblasen im Bier, die sich in der Folge wie Mikroblasen in einem nicht-gushenden Bier verhalten.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich das Auftreten und die Intensität von malzverursachtem Gushing durch all jene technologischen Maßnahmen vermindern lassen, die zu einer Erhöhung des Gehaltes von Bieren an nsLtp1 führen. Hier kommen vor allem Parameter in Betracht, die zu einer intensiveren Eiweißlösung während des Maischens führen. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse zur Verwendung von Getreidesorten führen, die besonders reich an diesem Protein sind.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Von den Ergebnissen des Vorhabens werden über 1.000 kleine und mittelständische Unternehmen der Malz- und Brauindustrie profitieren. Die deutsche Malzindustrie produziert jährlich ca. 2 Mio. t Malz und ist bis auf wenige Ausnahmen mittelständisch geprägt. Dabei dominiert mit ca. 90 % die Herstellung von Gerstenmalz die Produktpalette. Daneben gibt es derzeit ca. 1.300 Braustätten mit ca. 35.000 Beschäftigten und einem Bierabsatz von ca. 103 Mio. hl/Jahr mit einem Marktwert von ca. 9 Mrd. €. Auch die deutsche Brauwirtschaft ist trotz eines zunehmenden Konzentrationsprozesses mittelständisch strukturiert. Laut statistischem Bundesamt sind ca. 66 % der Produktionsstätten kleine und ca. 32 % mittlere Betriebe.

Mälzereien und Brauereien sind derzeit durch kostenintensive Gushing-Testverfahren belastet. Das im Rahmen des Projektes entwickelte Nachweisverfahren für das Gushing-induzierende Hydrophobin FcHyd5p und das Bierschaumprotein nsLtp1 aus Gerste und Weizen kann nach weiterer Optimierung und Erprobung zu einem alternativen Testverfahren aufgebaut werden. Ein Test mit diesem Verfahren könnte durch die Betriebe selbst durchgeführt werden. Der für die Testdurchführung notwendige Aufwand an Zeit und Personal ist gegenüber den bisher üblichen Verfahren deutlich geringer. Daher sollte die Anwendung eines Nachweises auf Basis von Antikörpern auch eine deutliche Kostenersparnis für die Betriebe zur Folge haben. Auch die Modifikation des Brauprozesses in Richtung einer intensiveren Maischarbeit sowie etwas weniger intensiver Nachgüsse kann zu einer Verminderung oder Verhinderung von Gushing in einem betroffenen Malz führen. Dabei muss jeder Betrieb selbst entscheiden, ob die resultierende geringere Malzausbeute gegenüber dem Vorteil eines geringeren Gushing-Potenzials wirtschaftlich hinnehmbar ist.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013.

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW,
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Gregor-Mendel-Straße 4
85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-36 63
Fax: + 49 8161 71-33 27
E-Mail: Rudi.Vogel@wzw.tum.de

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie
Weihenstephaner Steig 20, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-0
Fax: + 49 8161 71-3883
E-Mail: thomas.becker@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: + 49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Das o.g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.