

V. Batchvarov and V. Kellner

Determination of Sensitive Proteins in Beer by Nephelometry

Submitted on behalf of the Analysis Committee of the European Brewery Convention

BC 36 Beer

(Descriptors: Collaborative trial.

Deskriptoren: Ringanalyse).

Introduction

The EBC Analysis Committee decided to test a modification of Chapon's method (2, 3) for the determination of sensitive proteins in beer by nephelometry.

In autumn 2001 a collaborative trial was carried out using six beer samples with different levels of sensitive proteins. Sixteen laboratories of the members of the EBC Analysis Committee took part in the collaborative trial.

Experimental

The organization of the collaborative trial and the statistical treatment of the data were performed according to the procedure given in the International Standard ISO 5725 (1, 5).

Six stabilized and pasteurized beer samples with different levels of sensitive proteins were circulated to 16 laboratories. Fifteen laboratories analysed all beer samples and carried out two measurements for each (one laboratory analysed 4 beer samples).

Results and discussion

The original data are given in table 1. Mandel's **k** and **h** statistics are used for testing the consistency of results. Two Mandel's **k** statistical outliers and two Mandel's **h** statistical outliers were

Table 1 Results: Sensitive Proteins in Beer (EBC units, after addition of 5 mg/l tannic acid)

Laboratory	Level					
	1	2	3	4	5	6
1	1.26/1.19	1,35/1,35	1.53/1.55	2.52/2.69	4.28/4.40	7.26/7.40
2	1.25/1.39	1,55/1,61	1.62/1.66	2.63/2.79	4.72/4.83	7.72/7.60
3	1.54 ⁺⁺ /1.07	1.72/1.71	1.71/1.95	2.49/2.33	4.13/4.65	6.81 ⁺⁺ /5.99
4	1.44/1.04	1.49/1.56	1.59/1.92	2.34/2.15	-/-	-/-
5	0.88/1.01	1.84/1.90	1.77/1.75	2.16/2.51	4.29/3.97	8.77/8.14
6	1.12/0.89	1.74/1.59	1.68/1.52	2.07/1.97	3.14/3.07	7.66/7.58
7	1.61/1.75	1.82/1.83	1.73/1.92	2.95/2.54	4.14/4.10	8.16/8.12
8	1.27/1.28	1.60/1.62	1.79/1.69	2.86/2.88	3.69/3.80	7.52/7.47
9	1.26/1.23	1.38/1.58	1.36/1.60	2.69/2.42	5.56/5.31	7.72/7.91
10	1.54/1.54	1.22/1.26	1.68/1.80	2.28/2.36	3.59/3.69	7.56/7.05
11	1.55/1.44	1.66/1.78	1.97/1.86	2.80/2.72	4.68/4.79	5.37/5.36
12	1.00/0.90	1.31/1.44	1.46/1.49	2.68/2.97	4.16/4.42	6.56/6.40
13	1.10/1.10	1.08/1.28	1.32/1.28	2.76/2.54	4.89/4.64	6.42/6.79
14	1.65/1.55	1.88/1.67	1.79/1.73	2.69/2.81	4.27/4.80	7.28/7.28
15	1.37/1.27	1.75/1.67	1.74/1.86	2.70/2.86	4.44/4.56	7.49/7.39
16	1.52/1.35	1.73/1.86	1.92/1.80	3.32 ^{**} /3.37	1.65 ^{**} /2.18	5.02/5.01

⁺⁺Mandel's **k** statistic outlier

^{**}Mandel's **h** statistic outlier

Table 2 Summary of the precision data (calculated from data of table 1)

Sample	Beer 1	Beer 2	Beer 3	Beer 4	Beer 5	Beer 6
Number of laboratories	15	16	16	15	14	14
Grand mean (m)	1.292	1.588	1.689	2.572	4.322	7.143
Repeatability standard deviation (Sr)	0.107	0.082	0.106	0.150	0.182	0.180
Reproducibility standard deviation (S _R)	0.242	0.220	0.184	0.272	0.586	0.984
Repeatability (r ₉₅)	0.301	0.230	0.297	0.420	0.509	0.505
Reproducibility (R ₉₅)	0.676	0.615	0.515	0.761	1.641	2.755
Coefficient of variation of repeatability (CVSr)	8.31	5.17	6.28	5.83	4.21	2.52
Coefficient of variation of reproducibility (CVS _R)	18.70	13.83	10.90	10.57	13.56	13.77

excluded from the computation. The precision data are summarized in table 2. From this table it seems clear that both r_{95} and R_{95} tend to increase with higher values of mean. The final r_{95} and R_{95} values are:

$$r_{95} = 0.240 + 0.044 m \quad R_{95} = - 0.030 + 0.384 m$$

These results were obtained using nephelometers (haze meters) with 90° measuring angle, but with certain differences in measuring wavelength and geometry of the optical systems. On the other hand, the measured turbidities were results of formation of very small quantities of protein-tannic acid hazes (ppm or less). That means that coefficient of variation of repeatability (CVSr) and coefficient of variation of reproducibility (CVS_R) are fully in accordance with requirements established by Horwitz (4).

Conclusions

The method for the determination of sensitive proteins in beer by nephelometry yields results with acceptable repeatability (r₉₅) and reproducibility (R₉₅). The EBC Analysis Committee decided to include the method for the determination of sensitive proteins in beer by nephelometry in Analytica-EBC.

References

1. Analytica-EBC, 1998, Method 14.2.
2. Chapon, L., Internationaal Tijdschrift voor Brouwerij en Mouterij, 15, 173, 1962.
3. Chapon, L., Journal of The Institute of Brewing, 99, 49, 1993.
4. Horwitz, Analytical Chemistry, 1982, 54, 67A.
5. International Standard ISO 5725, 1994.

Anmerkungen zum Artikel „Xanthohumol in Bier – Möglichkeiten und Grenzen einer Anreicherung“

von A. Forster, A. Gahr, M. Ketterer, B. Beck und S. Massinger in Heft 9/10, 184 – 194, 2002

In dem oben genannten Artikel werden Untersuchungen zum Verhalten von Xanthohumol während der Bierherstellung vorgestellt. Dabei wird unter dem Punkt „Xanthohumol im Brauprozess – Stand des Wissens“ nur auf eine einzige Arbeit verwiesen (Forster, A. und Köberlein, A., Brauwelt 138, 1677 – 1679, 1998). Dies entspricht jedoch nicht dem aktuellen Stand der Wissenschaft zu diesem Thema. Seit 1998 sind mehrere Publikationen erschienen, deren Ergebnisse weiter unten kurz zusammengefasst sind. Zum Teil zeigen sich hier deutliche Abweichungen zu den von Forster und anderen veröffentlichten Resultaten. Diese Ergänzungen erscheinen notwendig, um dem Leser der Monatschrift für Brauwissenschaft eine umfassende und objektive Information zum Thema „Xanthohumol in Bier“ zu ermöglichen.

Folgende Arbeiten sind im Zeitraum von 1999 – 2001 erschienen:

Stevens, J.F., Taylor, A.W., Deinzer, M.L.: „Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry“, J. Chromatogr. A, 832, 97 – 107, 1999.

Hier wird eine Methode zur Analyse von Xanthohumol, Isoxanthohumol und anderen Prenylflavonoiden durch HPLC-MS beschrieben. Es werden u.a. die Ergebnisse der Analytik eines Biersortiments vorgestellt. Ein „Am. Porter“ und ein „Strong Ale“ von „Northwest / US Microbrews“ zeigen die höchsten Werte für Xanthohumol (0,69 mg/l) und Isoxanthohumol (3,44 mg/l). Ein „Imported Stout“ weist 0,34 mg/l Xanthohumol und 2,1 mg/l Isoxanthohumol auf.

Stevens, J.F., Taylor, A.W., Clawson, J.E., Deinzer, M.L.: „Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer“, J. Agric. Food Chem. 47, 2421 – 2428, 1999.

In dieser Arbeit wird sehr detailliert über das Schicksal von Xanthohumol während der Bierbereitung berichtet. Entsprechende Versuche wurden in einer Pilotbrauerei (300 Liter Ausschlagwürze) durchgeführt. Es wurde ein „lager-type“ Bier mit ca. 12 Bittereinheiten hergestellt. Bei einer Doldenhopfungabe 15 Minuten nach Beginn der Würzekochung und einer weiteren Kochzeit von 75 Minuten wurde nach 15-minütiger Whirlpool-Rast

eine Ausbeute von 69% festgestellt. Nicht isomerisiertes Xanthohumol war nur in geringen Mengen nachweisbar. 13% des mit dem Hopfen dosierten Xanthohumols konnten in den Trebern nachgewiesen werden und 12% im Heißtrub. Weitere Verluste traten dann durch Kühltrubabscheidung (6%) und während der Gärung (11%) auf. Letztendlich fanden sich im fertigen Bier nach der Lagerung 30% des mit dem Hopfen dosierten Xanthohumols wieder. Davon waren 98% zu Isoxanthohumol umgewandelt.

Ausführlich werden auch Untersuchungen zur Löslichkeit von Xanthohumol und Isoxanthohumol beschrieben. Bei 23 °C liegt die maximale Löslichkeit von Xanthohumol in Bier bei 5,3 mg/l, die von Isoxanthohumol bei 27,2 mg/l.

Piendl, A., Biendl, M.: „Über die physiologische Bedeutung der Polyphenole und Hopfenbitterstoffe des Bieres“, *Brauwelt* 140, 526/539 – 544, 2000.

Es wird u.a. eine Analysenmethode zur Bestimmung von Isoxanthohumol in Bier durch HPLC-UV vorgestellt und über die Ergebnisse von Analysen eines umfassenden internationalen Bier-

sortiments stark gehopfter und polyphenolreicher Biere berichtet. Der Maximalgehalt liegt bei 2,7 mg/l Isoxanthohumol. Eine bekannte deutsche Biermarke weist einen Gehalt von 2,1 mg/l Isoxanthohumol auf.

Biendl, M., Mitter, W., Peters, U., Methner, F.-J.: „Einsatz eines xanthohumolreichen Hopfenprodukts bei der Bierherstellung“, *Brauwelt* 140, 2006 – 2011, 2000.

Brauersuche zur Testung eines xanthohumolreichen Hopfenprodukts im 20 hl Maßstab werden beschrieben. Bei Herstellung eines Pilsener (ca. 30 Bittereinheiten) resultiert im fertigen Bier ein maximaler Isoxanthohumol-Gehalt von 6,0 mg/l bei einer Isoxanthohumol/Xanthohumol-Wiederfindung von 20%. Im Vergleich dazu können mit Pellets bzw. Ethanol-Reinharzextrakt lediglich 1,5 mg/l bzw. 1,9 mg/l Isoxanthohumol erzielt werden. Allerdings sind mit diesen konventionellen Hopfenprodukten im fertigen Bier nach der Filtration mit 3% bzw. 47% deutlich höhere Isoxanthohumol/Xanthohumol-Wiederfindungen erreichbar.

Dr. rer. nat. Martin Biendl, Mainburg

Weihenstephan Brewing Biotechnology 2003

Welcome

In the year 2003 we celebrate 200 years of research and education in Weihenstephan. It is needless to say that brewing science and technology has a multi centennial history and is in its prime in this place. We want to take this opportunity and organize a scientific brewing symposium with all our friends and colleagues interested in the topic, residing at universities, research institutes and research departments of companies. In particular we want to address this to researchers and (PhD) students in brewing science and technology to present, exchange and discuss novel results and stimulate international collaborations and short term missions.

The meeting is planned to take place right before the start of the famous "Octoberfest" in Munich which begins 20th of September 2003, i. e. we start on Wednesday **17 th September 2003** with the actual meeting to be held on the **18 and 19 th September 2003**. This way you have "one more good reason" to go for a long trip.

Scope

In respect of the Campus Weihenstephan being the Center of Life Sciences of the Technische Universität München with about 100 Professors working in Biological-, Food-, Nutritional-, and Agricultural Sciences as well as Life Science Engineering the focus is on "**Brewing Biotechnology**"

From our point of view this means that the symposium shall cover all facets of biological systems in brewing from the field to the malt, the yeast to the spoiling bacterium, the enzymes and flavours, to the technology influencing biological systems in brewing. We encourage presentations involving the use of molecular sciences, genomics, proteomics, enzymology as well as bio-sensing and mathematical modelling.

Call for papers

You are invited to submit contributions for oral presentations and posters. These will be reviewed by the scientific board members

who reserve the right to accept presentations and make a final decision on the presentation as poster or lecture, depending on scientific quality, novelty and available time and space.

Submission of a contribution, registration and accomodation is only possible through our website at

<http://www.brewing.foodscience.ws>

Please go to the registration area in the website and follow the guidelines given there for the required format.

We especially encourage PhD students to present their recent work and thus contact colleagues with similar topics for scientific discussion, collaboration and future laboratory visits. To stimulate this process, we intend to give prizes to the best contributions selected by the scientific board.

Deadlines

- Submission of registration and abstracts – **March-31-2003**.
- Notification of presentation acceptance and format (lecture/poster) – **April-30-2003**.
- Payment of registration fee to validate registration – **May-31-2003**.
- Reservation of accomodation – **June-30-2003**.

Contact us

Contact Maher Korakli for scientific matters at **brewing@foodscience.ws**

Contact Angela Seppour for organizational matters at **contact@foodscience.ws**

Prof. Rudi F. Vogel, Technische Universität München, Chair of the scientific and organizational committee