

T. Kunz, A. Stephan, F. J. Methner, R. Kappl und J. Hüttermann

Grundlegendes zur Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) und Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen oxidativer Bierstabilität und dem SO₂-Gehalt

Es ist inzwischen klar nachgewiesen worden, dass Schwefeldioxid als die Hauptkomponente des antioxidativen Potentials eines Bieres zu betrachten ist. Diese endogene antioxidative Puffereigenschaft für reaktive Radikale, die hauptsächlich durch aktivierten Sauerstoff erzeugt werden, kann durch die Lag-Time Bestimmung eines Bieres in einem Forciertest quantitativ durch die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie abgefragt werden. Detaillierte Lag-Time Messungen an verschiedenen Bierproben mit unterschiedlichem SO₂-Gehalt bestätigen frühere Befunde, zeigen aber auch, dass eine signifikante nicht-lineare Abhängigkeit besteht, deren Ursache noch nicht aufgeklärt ist. Im Zusammenhang mit der ausgeprägten Abhängigkeit der Lag-Time vom SO₂-Gehalt eines Bieres, wird die Komplexbildung von SO₂ mit Alterungs-carbonylen diskutiert. In einem Abschnitt werden die Grundlagen der ESR-Spektroskopie kompakt vorgestellt, die insbesondere für die Interpretation der Lösungsspektren der bei der Lag-Time Messung gebildeten Spin-Trap-Radikal-Addukte von Bedeutung ist.

BC 25 Bier

(Deskriptoren: Elektronenspinresonanz, Lag-Time, Spektrenanalyse, Spin-Trap, SO₂-Gehalt.

Descriptors: Electron spin resonance, lag time, spectral analysis, spin trap, SO₂-content).

1 Einleitung

Seit einiger Zeit wird die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie vermehrt eingesetzt, um über eine beschleunigte Alterung bei erhöhten Temperaturen (Forciertest) für ein Bier die sogenannte Lag-Time zu bestimmen. Der Wert der Lag-Time wird dabei als ein Kriterium für das endogene antioxidative Potential des Bieres betrachtet, das seinerseits mit der Geschmacksstabilität des Bieres in einem direkten Zusammenhang stehen soll. Bei diesem Verfahren wird die Eigenschaft der ESR-Spektroskopie ausgenutzt, in dem komplexen System Bier mit einer Vielzahl von verschiedensten Inhaltsstoffen selektiv Radikale mit hoher Empfindlichkeit nachzuweisen. Diese Radikale entstehen meist über verschiedene Formen von aktiviertem Sauerstoff, dem damit eine besondere Rolle bei der Entstehung des Alterungsgeschmacks zukommt. Insbesondere ist es das Ziel, die radikalischen Mechanismen, die im Bier ablaufen, genauer zu verstehen, um mit diesem Wissen gezielt die oxidative Bierstabilität zu verbessern. Da Radikale in wässrigen Lösungen meist nur eine sehr kurze Lebensdauer haben, wird bei dem Verfahren der Lag-Time Messung ein Radikalfänger (Spin Trap) eingesetzt, der diffusive

Radikale anlagern kann. Dabei entsteht ein weitaus stabileres Nitroxid-Radikal, das in ausreichendem Maße akkumuliert wird und dann mit der ESR anhand seiner spektralen Charakteristika nachgewiesen werden kann.

In diesem Beitrag sollen zunächst die Grundlagen der ESR-Spektroskopie etwas genauer beschrieben werden. Dabei wird auf die Entstehung der charakteristischen Spektren verschiedener Nitroxid-Radikale eingegangen und die Theorie der maßgebenden magnetischen Wechselwirkungen qualitativ und quantitativ erläutert. Zudem werden die wesentlichen Prinzipien der ESR-Messtechnik und die für die Qualität der Spektren maßgebenden Geräteparameter beschrieben. In einem weiteren Teil werden die Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der gemessenen Lag-Time und dem SO₂-Gehalt von entalkoholisierten und „normalen“ Bierproben dargestellt. In vielen Veröffentlichungen wird auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Gesamtschwefeldioxidgehalt im Bier und der gemessenen Lag-Time im Hinblick auf die Geschmacksstabilität des Bieres hingewiesen [1/13/15]. Die wichtigste endogene Schwefelverbindung, die als natürliches Antioxidans fungieren kann, stellt das während der Gärung als Stoffwechselprodukt der Hefe gebildete Schwefeldioxid oder Sulfit dar. Aber auch die antioxidative Wirkung von Bisulfitverbindungen, die in Form von Natrium- und Kalium-Metabisulfiten dem Bier vor der Abfüllung zugesetzt werden können, ist seit langem bekannt. Bei Bieren nach dem deutschen Reinheitsgebot ist jedoch dieser Zusatz von Schwefeldioxid gänzlich verboten. Für die positive Wirkung von Schwefeldioxid auf die oxidative Bierstabilität werden zwei Hauptmechanismen verantwortlich gemacht [13].

Zum einen kann Schwefeldioxid als natürliches Antioxidans Sauerstoff reduzieren (und binden) und ist somit ein wichtiger Bestandteil des endogenen antioxidativen Potentials eines Bieres. Das dabei entstehende Sulfat-Ion ist für die Alterungsvorgänge im Bier unschädlich. Außerdem kann Schwefeldioxid als Komplex-

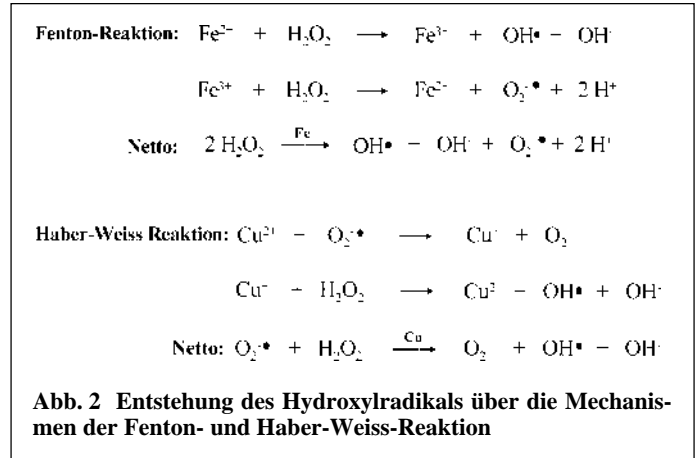
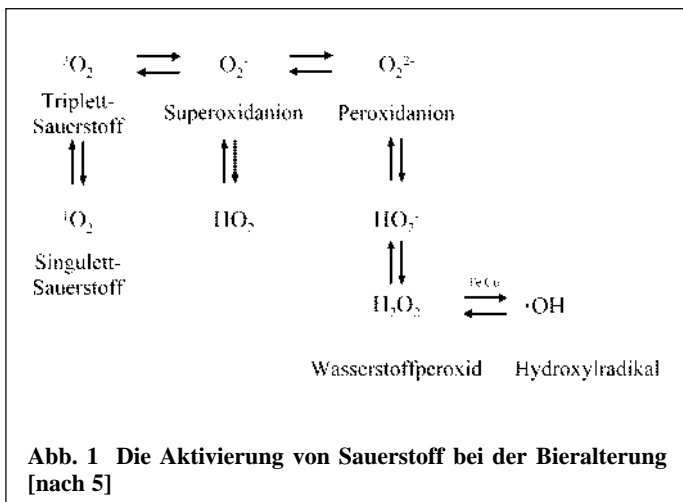
bildner fungieren und die während des Alterungsvorgangs entstehenden Alterungscarbonyle binden, wodurch potentielle Alterungsaromastoffe der sensorischen Wahrnehmung entzogen werden. Die dadurch entstehenden Sulfit-Carbonyl-Komplexe sind im Gegensatz zu den Alterungscarbonylen nicht oder nur schwach aromaaktiv. Da die Reaktion zur Bildung der Sulfit-Carbonyl-Komplexe beim pH des Bieres reversibel ist, besteht jedoch die Möglichkeit einer späteren Freisetzung der Alterungscarbonyle im abgefüllten Bier [13/16]. Dieses würde einem direkt linearen Zusammenhang zwischen der Lag-Time, welche über den SO₂-Gehalt im Bier beeinflusst wird und der sensorischen Geschmacksstabilität eines Bieres entgegenstehen. Auch aus diesem Grunde sind die Zusammenhänge zwischen der SO₂-Konzentration und dem endogenen antioxidativen Potential (Lag-Time) eines Bieres näher zu untersuchen.

2 Methodik der Lag-Time Messung

Die Geschmacksstabilität stellt eines der wichtigsten Qualitätsmerkmale eines Bieres dar. Während der Lagerung führt der natürliche Alterungsvorgang eines Bieres abhängig von Biersorte und Lagerbedingungen (Temperatur, Licht,..) zu geschmacklichen Veränderungen [1]. Der dabei entstehende Oxidationsgeschmack wird hauptsächlich durch aromaaktive Carbonylverbindungen, insbesondere ungesättigte aliphatische Aldehyde verursacht, die unter Beteiligung von Radikalreaktionen gebildet werden [2/3]. Diese werden wiederum durch die Gegenwart von aktiviertem Sauerstoff in der Probe initiiert, so dass dem Sauerstoffgehalt im abgefüllten Bier eine entscheidende Rolle bei der Bieralterung zukommt.

Molekularer Sauerstoff gelangt während des Brau- und Abfüllprozesses, sowie durch Diffusion über den Kronkorken ins Bier. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der im Kopfraum vorhandene noch nicht gelöste Sauerstoff über einen gewissen Zeitraum ins Bier diffundiert. Da molekularer Sauerstoff relativ stabil ist, muss er erst aktiviert werden, bevor er mit anderen Verbindungen Reaktionen eingehen und seine schädigende Wirkung im abgefüllten Bier entfalten kann (s. Abb. 1).

Im Grundzustand liegt molekularer Sauerstoff hauptsächlich im Triplett-Zustand ³O₂ vor. Dabei befinden sich in zwei energiegleichen, antibindenden π*-Molekülorbitalen (MO) je ein Elektron mit parallelem Spin (paramagnetischer Zustand). Der Triplett-Sauerstoff ³O₂ steht mit dem kurzlebigen, energiereicheren Singulett-Sauerstoff ¹O₂ im Gleichgewicht, bei dem die beiden π*-

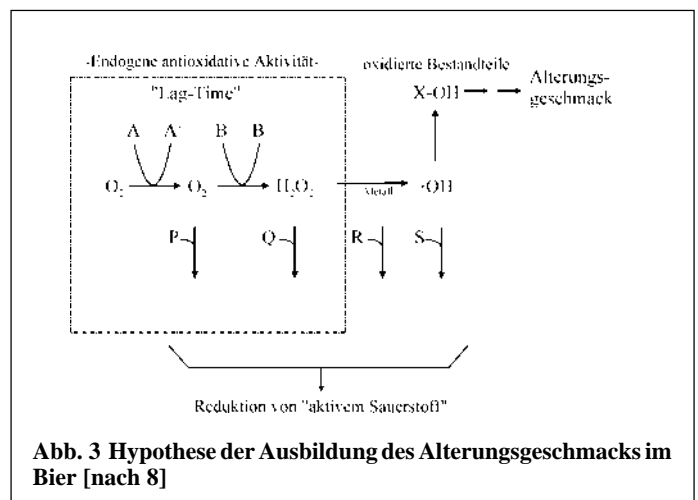


Elektronen einen antiparallelen Spin besitzen (diamagnetischer Zustand) [4].

Der Triplett-Sauerstoff ³O₂ wird durch Aufnahme eines Elektrons zu dem reaktiveren Superoxidradikalanion O₂^{•-} reduziert. Durch die weitere Aufnahme eines Elektrons entsteht das Peroxidation O₂²⁻, dessen Protonierung schließlich zum Wasserstoffperoxid führt. Bei Wasserstoffperoxid handelt es sich um eine sehr schwache Säure K_s = 10⁻¹² [4], die hauptsächlich in undissozierter Form als H₂O₂ vorliegt. Das Wasserstoffperoxid wird unter katalytischer Wirkung der im Bier vorhandenen Metallionen (z.B. Fe²⁺, Cu²⁺) in das äußerst reaktive Hydroxylradikal OH[•] und ein Hydroxylion OH⁻ gespalten, wie es die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen beschreiben (s. Abb. 2).

Das gebildete Hydroxylradikal reagiert unselektiv mit organischen Bierinhaltsstoffen und nimmt deshalb bei der Bieralterung eine Schlüsselposition ein. Kann die Entstehung des Hydroxylradikals verhindert bzw. vermindert werden, so verzögert sich das Auftreten des Alterungsgeschmacks. In diesem Zusammenhang kommt vor allem reduzierenden Verbindungen eine bedeutende Rolle zu, da sie die verschiedenen aktivierten Formen von Sauerstoff abfangen, aus denen die reaktiven Hydroxylradikale entstehen. Da diese reduzierenden Verbindungen wie Reduktone, Polyphenole [6], Maillardreaktionsprodukte [7] oder Bisulfitverbindungen [8/9/10] natürliche Inhaltsstoffe des Bieres sind, spricht man von der endogenen antioxidativen Aktivität des Bieres [1].

Ein mechanistisches Modell zur Ausbildung des Alterungsgeschmacks ist schematisch in der Abb. 3 zusammengefasst.



Verschiedene Bierinhaltsstoffe werden oxidiert und es entstehen aktivierte Sauerstoff-Spezies. Das unter Beteiligung von Metallionen aus Wasserstoffperoxid entstehende Hydroxylradikal reagiert seinerseits mit Alterungsvorstufen und oxidiert diese zu den entsprechenden Alterungsaromastoffen [1]. Durch das Abfangen der aktiven Sauerstoffformen über die endogene antioxidative Aktivität des Bieres wird die Hydroxylradikalbildung solange behindert, bis die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe des Bieres „verbraucht“ sind. Der Zeitraum, ab dem die Hydroxylradikalbildung ungehindert ablaufen kann, ergibt die *Lag-Time*, die somit ein Maß für die endogene antioxidative Aktivität von Bier darstellt und die jeweils vorliegende oxidative Bierstabilität beschreiben kann. Die *Lag-Time* ist, außer von der Konzentration der beschriebenen Inhaltsstoffe, von Faktoren wie Temperatur, Licht usw. abhängig.

Die *Lag-Time* wird meist durch einen Forciertest (bei erhöhter Temperatur, z.B. 60 °C) unter Verwendung der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie bestimmt. Dabei wird die Bildung diffusibler Radikale quantitativ über ihre Stabilisierung an sogenannten Spin-Traps erfasst und ihr zeitlicher Verlauf aufgezeichnet. Dieser kann dann mit der endogenen antioxidativen Aktivität eines Bieres korreliert werden und Hinweise auf die Geschmacksstabilität liefern. Ein wesentlicher Gesichtspunkt unserer Untersuchungen war es, die Abhängigkeit der gemessenen *Lag-Time* von den verschiedenen Parametern des Forciertests detailliert zu ermitteln. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn eine experimentell bestimmte *Lag-Time* mit dem endogenen antioxidativen Potential oder der, weit weniger scharf zu erfassenden Geschmacksstabilität reproduzierbar korreliert werden soll.

3 Grundlegendes zur ESR-Spektroskopie

Bei der ESR (oder auch EPR)-Spektroskopie handelt es sich um die selektive Absorption von Mikrowellen-Strahlung durch paramagnetische Substanzen mit mindestens einem ungepaarten Elektron im Orbitalsystem. Dabei werden Übergänge zwischen den in einem äußeren Magnetfeld aufgespaltenen Energieniveaus des ungepaarten Elektronenspins induziert. Diese Übergänge werden von den Wechselwirkungen der Spinnomente mit ihrer Umgebung beeinflusst, so dass daraus auf strukturelle und elektronische Parameter des paramagnetischen Zentrums geschlossen werden kann.

Die ESR-Spektroskopie findet deshalb Anwendung bei der Untersuchung von freien Radikalen, die in chemischen Reaktionen oder durch die Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit organischen Substanzen erzeugt werden [11]. Die meisten freien Radikale sind jedoch von Natur aus derart kurzlebig, dass sie nicht direkt gemessen werden können. Um diese Radikale dennoch mit Hilfe der ESR-Spektroskopie detektieren zu können, werden chemische Verbindungen eingesetzt, die selbst nicht radikalisch sind, aber mit Radikalen stabile Addukte bilden und gleichzeitig den ungepaarten Zustand des Elektrons erhalten (Spin-Traps).

Im Folgenden sollen die wesentlichen Grundlagen der ESR-Spektroskopie dargestellt werden, die zum Verständnis der durchgeführten Messserien und der erhaltenen Spektren notwendig sind.

Die zunächst zu betrachtende fundamentale Eigenschaft eines Elektrons ist sein Eigendrehimpuls, der sogenannte Spin. Er wird von der Eigenrotation des Elektrons verursacht und induziert ein magnetisches Moment μ_s :

$$\mu_s = -g \cdot \mu_B \cdot S \tag{1}$$

wobei g der dimensionslose Lande-Faktor und μ_B das Bohr'sche

Magneton ist. Das magnetische Moment μ_s und der Eigendrehimpuls S sind vektorielle Größen. Das negative Vorzeichen resultiert aus der Ladung des Elektrons, so dass die beiden Vektoren entgegengesetzt orientiert sind. Die Gleichung (1) gilt für ein „bahnloses“ Elektron, für das die möglichen Beiträge zum magnetischen Moment aus dem Bahndrehimpuls L (entsprechend einem Kreisstrom der Elektronenbahn um den Kern, μ_L) vernachlässigbar klein sind. Der g -Faktor liegt dann sehr nahe an dem Wert von $g_e = 2.00232$ für ein sogenanntes freies Elektron ohne jede additive Beteiligung des Bahnmomentes. Dies trifft auf viele organische Radikale zu, bei denen der g -Faktor nur unwesentlich von g_e abweicht. In speziellen Fällen und vor allem für Übergangsmetall-Ionen muss jedoch das Bahnmoment explizit berücksichtigt werden, das eine erhebliche Abweichung des g -Faktors von g_e bewirken kann [12]. Die resultierenden magnetischen Wechselwirkungen werden unter dem Begriff „Spin-Bahn-Kopplung“ zusammengefasst. Das magnetische Moment des Bahndrehimpuls führt zu einer Verstärkung oder Abschwächung des äußeren Magnetfeldes. Die ESR-Absorptionslinie ist dann relativ zum g -Faktor des freien Elektrons ($g_e = 2.00232$) zu anderen Feldwerten (g -Faktoren) verschoben.

Bringt man nun ein Radikal, mit einem als frei bzw. „bahnlos“ zu betrachtenden Elektron, in ein zeitlich konstantes homogenes Magnetfeld, mit der magnetischen Induktion (magnetischen Flussdichte) B_0 , so wird sich das magnetische Moment des Spin μ_s relativ zum Magnetfeld ausrichten. Es stellt sich „parallel“ oder „antiparallel“ zur Magnetfeldrichtung B_0 unter einem von den Gesetzen der Quantenmechanik vorgegebenen Winkel δ ein [12] (s. Abb. 4).

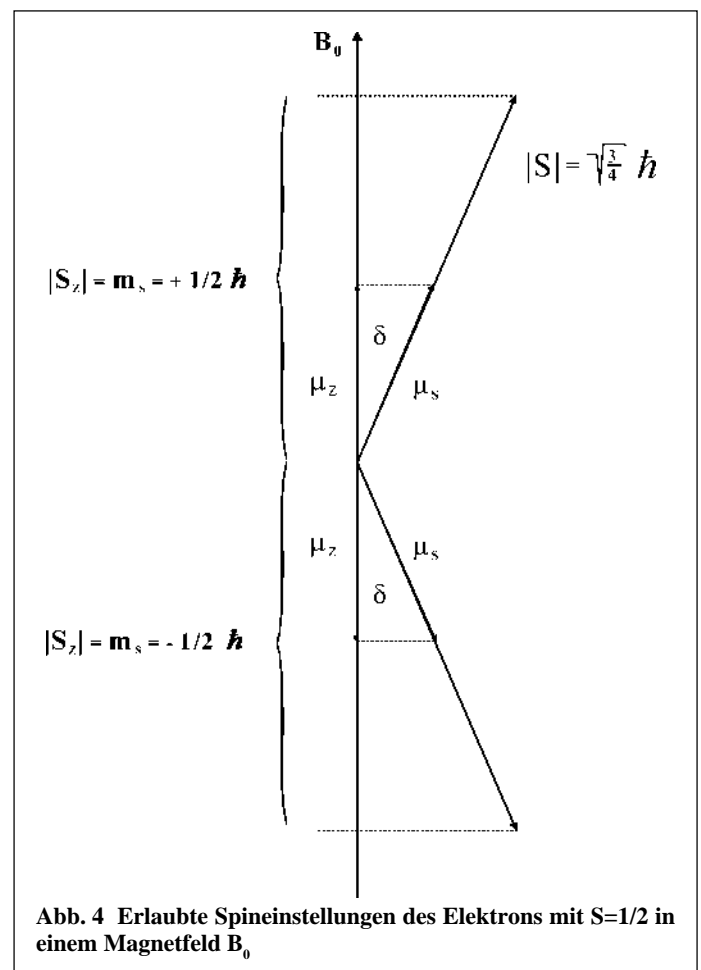


Abb. 4 Erlaubte Spineinstellungen des Elektrons mit $S=1/2$ in einem Magnetfeld B_0

Die Projektion des Spinvektors S auf die Magnetfeldrichtung entspricht dann seiner S_z Komponente. Der Betrag der Projektion ist entlang der z-Achse über die magnetische Quantenzahl m_s gequantelt (d.h. $|S_z| = m_s$), die für ein freies Elektron mit $S = 1/2$ nur die Werte $+1/2$ und $-1/2$ annehmen kann. Allgemein ergeben sich aus der Spinquantenzahl S im angelegten Magnetfeld $2S + 1$ Einstellmöglichkeiten mit $m_s = S, S - 1, S - 2, \dots -S$.

Da S_z mit dem magnetischen Moment μ_z entsprechend Gleichung (1) verknüpft ist, gilt

$$|\mu_z| = m_s \cdot g \cdot \mu_B = \pm 1/2 \cdot g \cdot \mu_B \quad (2)$$

Aus der klassischen Beziehung für die Energie eines Dipols in einem statischen Magnetfeld

$$E_{\text{dipol}} = -\mu \cdot B = -|\mu_z| \cdot |B| \quad (3)$$

folgt, dass die Energie eines freien Elektrons in zwei Niveaus aufspalten wird, deren Energieseparation von der magnetischen Flussdichte B_0 abhängt:

$$E = m_s \cdot g \cdot \mu_B \cdot B_0 = \pm 1/2 \cdot g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (4)$$

Die Aufspaltung entarteter Energiezustände in einem äußeren Magnetfeld wird als Zeeman-Effekt bezeichnet, die aufgespaltenen Niveaus als Zeeman-Niveaus.

Wird einem solchen System Energie durch elektromagnetische Strahlung zugeführt, so kann es durch Absorption von einem niedrigeren in einen höheren Energiezustand übergehen (s. Abb. 5). Dabei muss die Energie der Quanten, gegeben durch $E = h \cdot \nu$ (5), gleich dem Betrag der Differenz der Energien von Ausgangs- und Endzustand sein. Außerdem gilt die Auswahlregel $\Delta m_s = \pm 1$, so dass man als Grundgleichung der ESR-Spektroskopie die Resonanzbedingung erhält:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (6)$$

Typischerweise liegen die bei der ESR-Spektroskopie gebräuchlichen Flussdichten B_0 bei 0.1 – 1 Tesla (1 Tesla = 10^4 Gauß), so dass die Anregung durch Mikrowellen im Zentimeterbereich erfolgt.

3.1 Boltzmann-Verteilung und Relaxationsmechanismen

Die Übergänge zwischen den Energiezuständen können in beide Richtungen erfolgen, also für das Beispiel mit $S = 1/2$ von $m_s = +1/2$

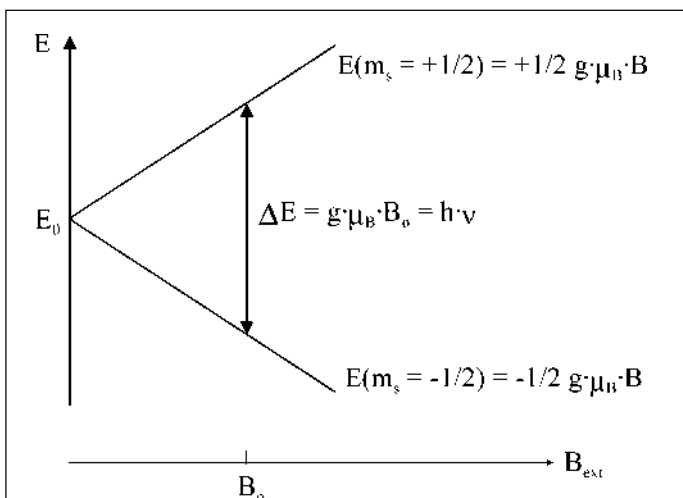


Abb. 5 Energiezustände für $S = 1/2$, d.h. $m_s = \pm 1/2$, in Abhängigkeit vom externen Magnetfeld B_{ext}

zu $m_s = -1/2$ und umgekehrt. Da Absorption und Emission gleich wahrscheinlich sind, ist die absolute Zahl der stattfindenden Absorptions- und Emissionsprozesse abhängig von der durch die Boltzmann-Verteilung vorgegebenen Besetzungszahlen der Zeeman-Niveaus. Die jeweilige Besetzungszahl n_+ und n_- für das obere bzw. untere Energieniveau sind über die Boltzmann-Konstante k direkt abhängig von der Temperatur T und dem Energieunterschied ΔE zwischen den Energieniveaus (siehe Gl. 7).

$$\frac{n_+}{n_-} = e^{-\frac{\Delta E}{k \cdot T}} = e^{-\frac{g \cdot \mu_B \cdot B_0}{k \cdot T}} = e^{-\frac{h \cdot \nu}{k \cdot T}} \quad (7)$$

Aufgrund der Boltzmann-Verteilung ist das obere, höherenergetische Energieniveau um so schwächer besetzt, je tiefer die Temperatur der ESR-Probe ist. So ist z.B. für die später ausschließlich benutzte ESR-Frequenz von 9.5 GHz (X-Band) bei Raumtemperatur (RT) $n_+/n_- = 0.99993$ und bei 77 K $n_+/n_- = 0.995$. Da im thermischen Gleichgewicht $n_- > n_+$ ist, erhält man als Netto-Effekt eine Absorption der eingestrahlten Mikrowellenenergie, die proportional zu dieser Besetzungsdifferenz ist. Die Absorption und damit die Intensität des ESR-Signals wird somit um so größer, je niedriger die Temperatur und je höher die Magnetfeldstärke ist (größeres ΔE , siehe Gl. 7).

Würde die so absorbierte Energie jedoch nicht wieder abgegeben, käme es relativ schnell zu einer Gleichbesetzung der Energieniveaus und somit zum Verlust der Netto-Absorption (Sättigung), d.h. das ESR-Signal würde verschwinden. Dem wirken jedoch zwei Relaxationsprozesse entgegen. Die sogenannte Spin-Gitter-Relaxation gibt die Anregungsenergie über den thermischen Kontakt des Spin-Systems zu seiner Umgebung wieder ab. Die durch den Absorptionsprozess gestörte Boltzmann-Verteilung wird wieder eingestellt, da das Spin-System den Ausgangszustand des thermischen Gleichgewichts anstrebt. Die Zeit, die das System dazu benötigt, um die Ausgangsverteilung zu ca. 66.6% ($1/e$) wiederherzustellen, wird als Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 bezeichnet. Aufgrund der besseren Kopplung des Spin-Systems an die Umgebung ist T_1 in Festkörpern meist kürzer als in Flüssigkeiten.

Der zweite Mechanismus wird durch die sogenannte Spin-Spin-Relaxation beschrieben. Hierbei wird die Energie über magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen übertragen, so dass benachbarte paramagnetische Moleküle ihre Spinzustände austauschen können. Dieses führt zwar nicht zu einer Veränderung des Verhältnisses der Besetzungszahlen (n_+/n_-), hat aber einen Einfluss auf die Lebensdauer des Spinzustandes. Nach der Heisenbergschen Unschärferelation ist das Produkt aus Energieunschärfe (ΔE) und Lebensdauer (τ) eine Konstante. Eine kurze Lebensdauer führt somit zu einer großen Energieunschärfe, woraus wiederum eine Zunahme der Breite der Resonanzlinien resultiert.

In Lösungen, wie z.B. im Bier, ist die Linienbreite in etwa proportional der reziproken Spin-Spin-Relaxationszeit ($1/T_2$), da die Kopplung an das Gitter vergleichsweise gering ist und die Linienbreite fast ausschließlich durch T_2 (Spin-Spin-Relaxationszeit) bestimmt wird.

3.2 Hyperfeinstruktur-Aufspaltung

Eine wesentliche Information über das untersuchte Spinsystem kann aus der sogenannten Hyperfeinaufspaltung der ESR-Spektren gewonnen werden, die aus der Wechselwirkung des Elektro-

nenspins mit dem magnetischen Moment eines Atomkerns in der Umgebung des Elektronenspins resultiert. In der Praxis werden oft Wechselwirkungen mit Protonen ^1H (Kernspin $I=1/2$) oder Stickstoffkernen ^{14}N (Kernspin $I=1$) beobachtet. Die Hyperfein-Wechselwirkung ist auf eine Verstärkung oder Abschwächung des äußeren Magnetfeldes zurück zu führen, wobei sich das effektiv wirkende Magnetfeld B_{eff} aus der Addition des lokalen Magnetfeld B_{lok} , das durch den Kernspin erzeugt wird, mit dem externen Magnetfeld B_0 ergibt (s. Gl. 8).

$$B_{\text{eff}} = B_0 + B_{\text{lok}} \quad (8)$$

Analog zum Elektron kann ein Kern mit einem Kernspin $(2I + 1)$ Einstellungen zum externen Magnetfeld annehmen, die als Kernspin-Quantenzahlen m_I bezeichnet werden. Daraus ergeben sich auch $(2I + 1)$ Werte für das lokale Magnetfeld B_{lok} . Im einfachsten Fall bei einem Kernspin $I = 1/2$ führt dies zu zwei verschiedenen effektiven Magnetfeldern B_{eff} und somit zu einer Aufspaltung der Zeeman-Niveaus (s. Abb. 6). Die daraus resultierende Hyperfeinstruktur ergibt sich also aus $2S(2I + 1)$ Energieübergängen und führt zu einer entsprechenden Anzahl an ESR-Linien, deren Abstände durch die Hyperfein-Kopplungskonstante a wiedergegeben wird, die für die jeweilige Substanz eine charakteristische Größe ist.

3.3 Spektrale Anisotropie

In der bisherigen vereinfachten Betrachtung sind sowohl der g -Faktor als auch die Hyperfeinkopplung als skalare Größen behandelt worden. Im allgemeinen besitzen diese Parameter jedoch Vorzugsrichtungen, die aus der Struktur des Moleküls und den

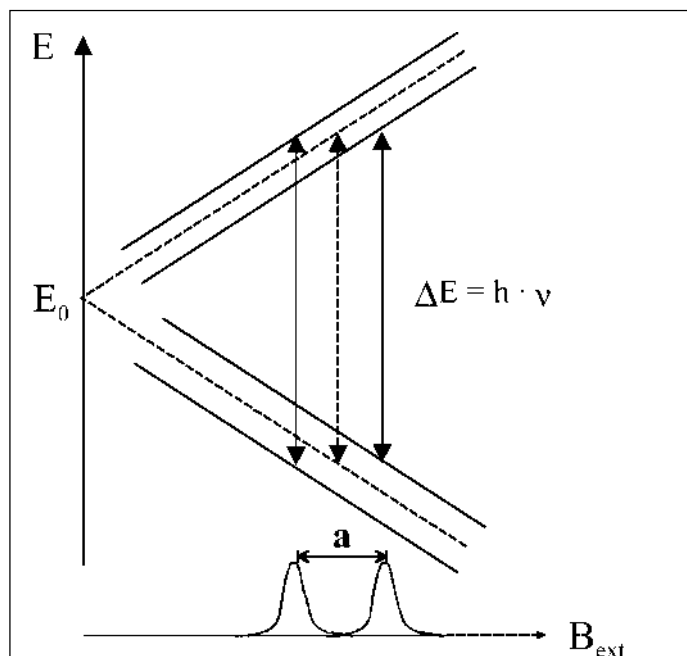


Abb. 6 Hyperfein-Aufspaltung durch Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons ($S = 1/2$) mit den magnetischen Momenten eines Kernspins ($I = 1/2$). Die Energieniveaus von Abbildung 5 ohne Hyperfeinkopplung sind gestrichelt gezeichnet. Die durch die Wechselwirkung mit dem Kernspin erzeugten Hyperfeinniveaus sind zu höheren bzw. niedrigeren Energien verschoben (durchgezogene Linien). Die mit Pfeilen gekennzeichneten Übergänge ergeben zwei Resonanzlinien, die durch die Hyperfein-Konstante a getrennt sind.

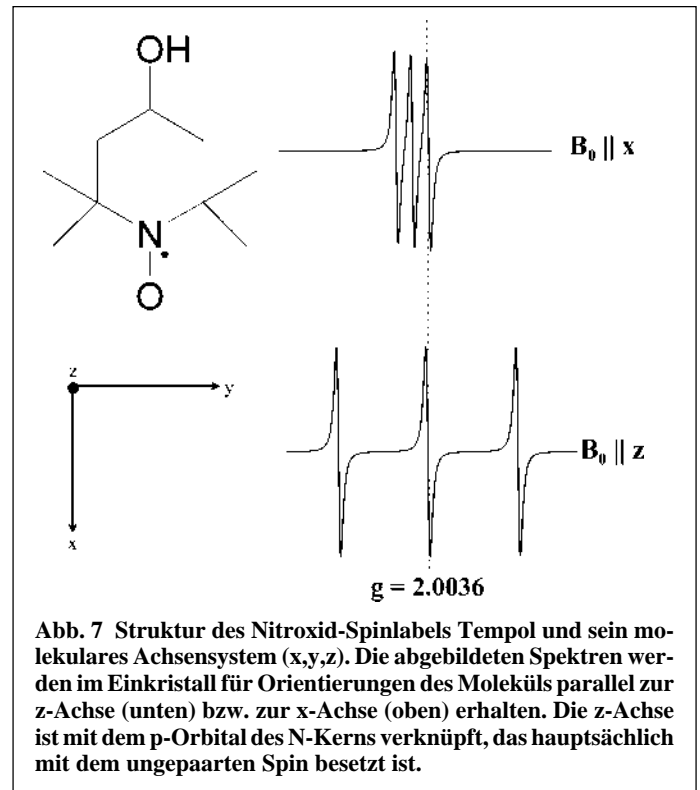


Abb. 7 Struktur des Nitroxid-Spinlabels Tempol und sein molekulares Achsensystem (x,y,z) . Die abgebildeten Spektren werden im Einkristall für Orientierungen des Moleküls parallel zur z -Achse (unten) bzw. zur x -Achse (oben) erhalten. Die z -Achse ist mit dem p -Orbital des N -Kerns verknüpft, das hauptsächlich mit dem ungepaarten Spin besetzt ist.

Molekülorbitalen resultieren. Folglich können aus ihnen auch strukturelle Informationen abgeleitet werden. Die spektrale Anisotropie soll hier am Beispiel eines stabilen Nitroxid-Radikals (Spin-Label Tempol Abb. 7) erklärt werden.

Das ungepaarte Elektron dieser Substanz ist im Wesentlichen am Stickstoff der Nitroxid-Gruppe lokalisiert. Da der ^{14}N -Kern einen Kernspin von $I=1$ aufweist, werden drei Hyperfeinlinien ($m_I=1,0,-1$) erwartet (Triplet-Muster Abb. 7). Zusätzliche, wesentlich kleinere Kopplungen der benachbarten Methylprotonen können unter speziellen Bedingungen ebenfalls detektiert werden.

Wenn nun die Moleküle orientiert und ortsfest in einer festen Matrix, z.B. im Gitter eines Einkristalls, eingebaut sind, kann die Hyperfeinkopplung für verschiedene Anordnungen des Kristalls bezüglich des äußeren Magnetfelds in einem ESR-Experiment abgefragt werden. Man findet, dass die größte Hyperfeinaufspaltung des Triplets von ca. 3.1 mT dann zu beobachten ist, wenn das äußere Feld senkrecht zum Ringsystem, also parallel zum p -Orbital des Stickstoff orientiert ist. Diese Richtung wird im Molekülsystem häufig als z -Achse bezeichnet. Die kleinsten Werte von ca. 0.5 mT werden für Orientierungen in der Ebene des Ringsystems (x,y -Richtungen im Molekül) gemessen. Entsprechend werden für alle anderen Einstellungen Werte zwischen diesen Extrema gefunden. Die Hyperfeinkopplungen an den Achsen des Molekülsystems werden als die Hauptkomponenten des Hyperfein-Tensors bezeichnet, der die vollständige Richtungsinformation enthält. Wenn zwei der Hauptkomponenten gleich sind, spricht man von einem axialen System, falls alle drei unterschiedlich sind von einem rhombischen System. Eine analoge Richtungsabhängigkeit lässt sich auch für den g -Faktor feststellen, die sich darin äußert, dass sich der Schwerpunkt der drei Hyperfeinlinien für verschiedene Einstellungen des Kristalls zum externen Magnetfeld (und damit der g -Faktor) verschiebt. Auch hier spricht man vom g -Tensor mit axialer oder rhombischer Symmetrie.

In der Praxis werden meist jedoch keine Einkristalle verwendet, sondern ein mikrokristallines Pulver, in dem alle Orientierungen der Moleküle statistisch verteilt vorliegen. Dies gilt auch für eingefrorene Lösungen einer paramagnetischen Substanz. Wenn an einer gefrorenen Lösung von Tempol bei einem ESR-Experiment das externe Magnetfeld hochgefahren wird, so werden zunächst nur solche Moleküle in Resonanz kommen, deren p-Orbital parallel zum Magnetfeld liegt. Dabei wird der Übergang zwischen den Niveaus mit $m_l = -1$ angeregt, der um die maximale Hyperfeinkomponente zu niedrigem Feld verschoben ist. Bei etwas grösserem Magnetfeld werden dann Moleküle zur Absorption beitragen, die etwas dazu verkippt sind. Der Resonanzbereich ist dann beendet, wenn der Übergang für $m_l = 1$ mit maximaler Verschiebung zu höherem Feld erreicht ist. Das daraus resultierende Gesamtspektrum ergibt sich folglich aus einer Überlagerung sämtlicher, durch die jeweilige Orientierung vorgegebenen Spektren, wie sie auch bei einem Einkristall gemessen würden. Das sogenannte Pulverspektrum einer gefrorenen wässrigen Lösung von Tempol ist in Abb. 8 a, b dargestellt. Aus ihm kann sofort der maximale Hauptwert als $2 \cdot a_{zz}$ abgelesen werden. Die anderen kleinen Komponenten des Hyperfeintensors sind im zentralen Teil des Spektrums überlagert und nur durch Simulation des Gesamtspektrums genau zu bestimmen. Unter dem Absorptionsspektrum ist die 1. Ableitung gezeigt, die das Spektrum so wie es in der ESR aufgezeichnet wird repräsentiert (siehe Abschnitt 4).

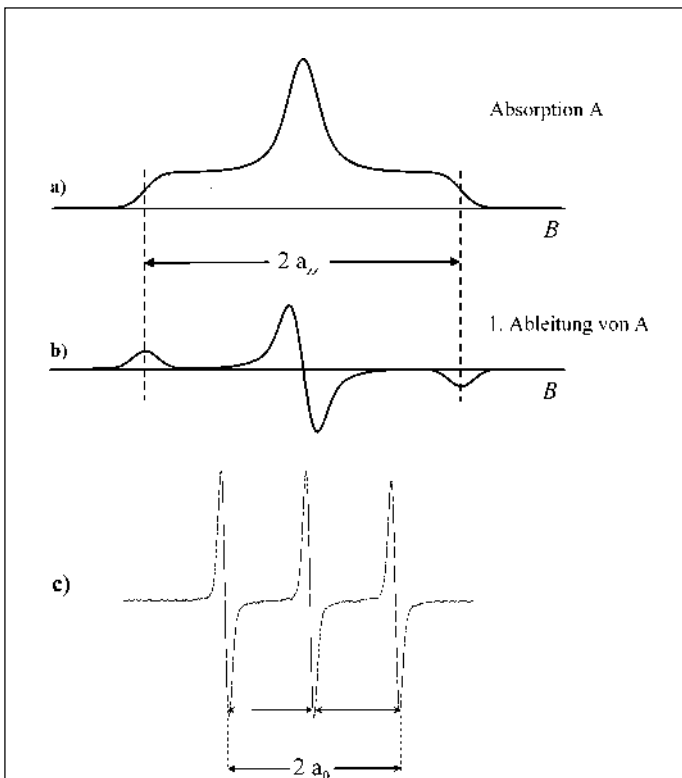


Abb. 8 a, b Pulverspektrum einer gefrorenen wässrigen Lösung von Tempol ($S = 1/2$ und $I = 1$) in Absorption (a) und in 1. Ableitung (b). Die Gausskurven im Absorptionsspektrum (a) repräsentieren verschiedene Orientierungen der in der gefrorenen Lösung statistisch verteilten Moleküle.
8 c Das isotrope ESR-Spektrum einer wässrigen Lösung von Tempol ($S = 1/2$ und $I = 1$) mit der isotropen Hyperfein-Konstanten a_0 .

Einen weiteren Fall, der insbesondere für die Spektren bei der Lag-Time-Messung von Bier von ausgesprochener Bedeutung ist, stellen die Spektren in niedrig viskosen Lösungen dar. In solchen Lösung können sich kleine Moleküle wie Tempol oder Spin-Traps, angestoßen durch die Brown'sche Molekularbewegung, schnell und willkürlich um ihre Achsen drehen. Ist ihre Rotationskorrelationszeit kleiner als die Zeit für den Absorptionsprozess, so mitteln sich die Anisotropien von Hyperfein- und g-Tensors heraus. Es entsteht ein Spektrum, das unabhängig von der Orientierung zum Magnetfeld B_0 nur durch die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante a_0 und den isotropen g_0 -Faktor beschrieben werden kann. Die isotropen Werte sind durch das arithmetisch Mittel der Tensorkomponenten gegeben: $a_0 = (1/3) \cdot (a_{zz} + a_{yy} + a_{xx})$ bzw. $g_0 = (1/3) \cdot (g_{zz} + g_{yy} + g_{xx})$. Das isotrope Spektrum einer wässrigen Lösung von Tempol (mit $S = 1/2$ und $I = 1$) ist durch drei relativ scharfe Linien charakterisiert, wie es in Abb. 8 c im direkten Vergleich zu dem Pulverspektrum dargestellt ist.

3.4 Superhyperfein-Aufspaltung

Allgemein ergibt eine paramagnetische Substanz mit dem Elektronenspin $S=1/2$ und dem Kernspin I ein ESR-Spektrum mit $(2I + 1)$ Linien, da die Auswahlregeln $\Delta m_s = 1$ und $\Delta m_l = 0$ gelten. Das lokale Magnetfeld B_{lok} (s. Gl. 8) wird aber oft nicht nur vom Kernspin des Atoms mit dem ungepaarten Elektron (z.B. ^{14}N , $I=1$), sondern auch von benachbarten Kernen mit $I > 0$ erzeugt. Hierzu zählen insbesondere α - und β -ständige Protonen, so dass es häufig vorkommt, dass mehrere Kerne mit einem ungepaarten Elektronenspin wechselwirken. Daraus resultieren zusätzliche Aufspaltungen durch weitere Kernspinniveaus und entsprechend erhöht sich die Anzahl der beobachteten ESR-Übergänge (Absorptionslinien). Im Falle stark unterschiedlicher Hyperfeinkopplungen sind die Resonanzlinien der kleineren Kopplungen jenen der größeren überlagert. Man bezeichnet diese weitere Unterteilung als Superhyperfeinstruktur. Diese soll kurz anhand des Lösungsspektrums des bei der Lag-Time-Messung verwendeten Spin Traps PBN (N-tert-Butyl- α -phenylnitron) erläutert werden.

Nach Anlagerung und Stabilisierung des sehr reaktiven Hydroxylradikals bildet sich am PBN ein Nitroxidradikal, bei dem das freie Elektron ($S = 1/2$) in einem $p\pi$ -Orbital am Stickstoff ($I = 1$) lokalisiert ist (s. Abb. 9). Betrachtet man ausschließlich die N-O

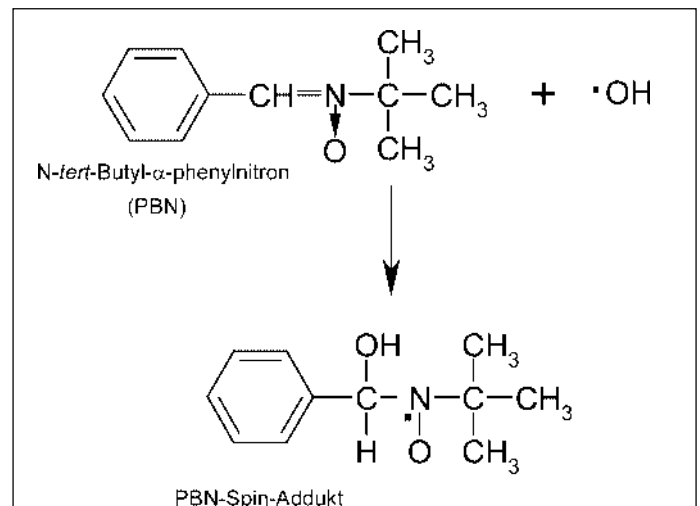


Abb. 9 Bildung von PBN-Spin-Addukten während des oxidativen Forciertests [1]

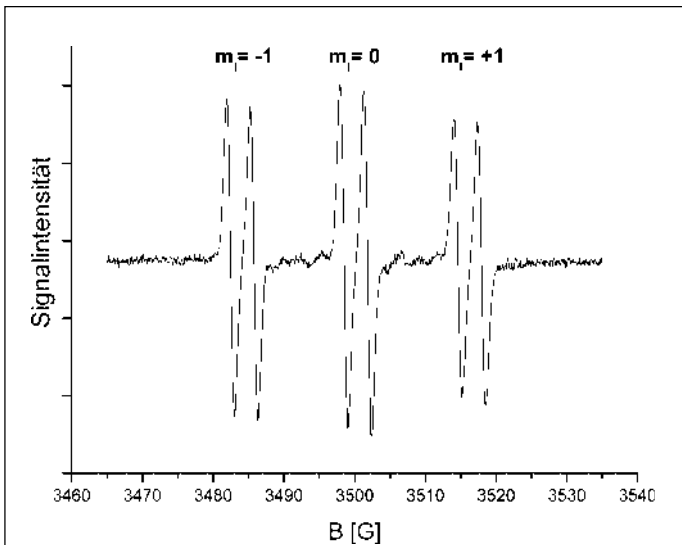


Abb. 10 a Spektrum des Spin Addukts von PBN: Hyperfeinaufspaltung durch die Wechselwirkung mit dem ^{14}N -Kern ($I = 1$, mit $m_l = 1, 0, -1$) und der weiteren Superhyperfeinaufspaltung durch den benachbarten β - ^1H -Kern ($I = 1/2$), siehe Strukturformel.

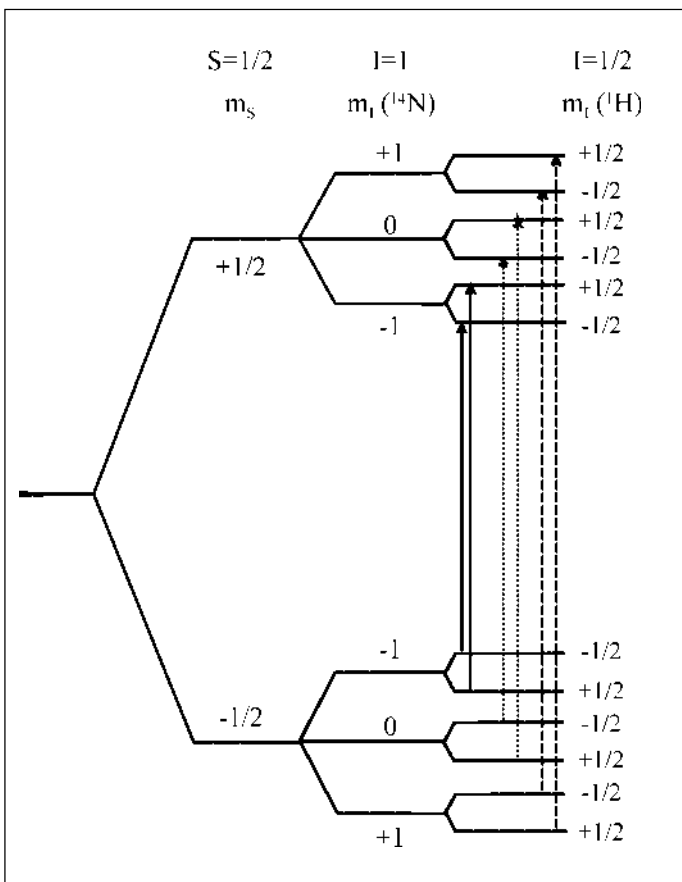


Abb. 10 b Energieniveauschema für das Spektrum von PBN. Die elektronischen Niveaus werden durch die Wechselwirkung mit dem ^{14}N -Kern aufgespalten. Die kleinere Kopplung mit einem Proton spaltet jedes dieser Niveaus weiter auf. Die 12 Niveaus sind durch die sechs Resonanzübergänge verknüpft, die den Linien des Spektrums in Abb. 10 a entsprechen.

Gruppe, so würde man drei durch den ^{14}N -Kern hervorgerufene relativ schmale Linien erwarten (s. Abb. 8 c). Aus der Strukturformel des PBN-Spin-Adduktes ist jedoch zu erkennen, dass sich am benachbarten C-Atom ein sogenanntes β -Proton (H mit $I = 1/2$) befindet, das ebenfalls mit dem am Stickstoff lokalisierten Elektronenspin wechselwirken kann. Da seine Aufspaltung deutlich kleiner als die des ^{14}N -Kerns ist, wird jede Triplet-Linie in ein Dublett aufgespalten (s. Abb. 10 a). Das Linienmuster mit sechs Resonanzen kann durch das Energieniveauschema (s. Abb. 10 b) mit einer ^{14}N - und einer ^1H -Kopplung erklärt werden.

Weitere Superhyperfeinaufspaltung sind prinzipiell auch durch die Protonen der OH- bzw. der Methylgruppen möglich, die wegen ihrer sehr kleinen Kopplungskonstanten aber nicht mehr im ESR-Spektrum auflösbar sind und nur zur Linienbreite beitragen. Solche kleinen Kopplungen können zum Beispiel durch Isotopensubstitution (^2D) oder durch Anwendung hochauflösender ESR-Techniken nachgewiesen werden.

3.5 Zusätzliche Einflüsse auf die gemessenen ESR-Lösungsspektren

Abhängig von der Polarität des Lösungsmittels erhält man paramagnetische Nitroxidradikale mit leicht unterschiedlichen Grenzstrukturen. In polarer Umgebung (z.B. Wasser) ist die Spindichte des ungepaarten Elektrons am Stickstoff größer, d.h. auch die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante a_0 ist größer. Im Vergleich zu einer apolaren Umgebung ergibt sich dadurch eine größere Aufspaltung des Spektrums. Typischerweise nimmt a_0 von ca. 1.55 mT in apolarer bis auf 1.8 mT in polarer Umgebung zu. Auch die durch den g-Faktor bestimmte Lage des Gesamtspektrums hängt von der Polarität des Lösungsmittels ab. Je apolarer die Lösung, um so größer wird der g-Faktor oder, anders ausgedrückt, um so mehr wird das gesamte Spektrum zu etwas kleineren Resonanzfeldstärken verschoben. Diese Zusammenhänge lassen sich im geringen Maße auch bei der Lag-Time-Messung von Bierproben unterschiedlichen Alkoholgehalts beobachten, der die Polarität der Lösung beeinflusst.

Ein weiterer Einfluss auf die ESR-Lösungsspektren ergibt sich aus der Konzentration der Radikale. Bei zunehmender Konzentration wird die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung zwischen den ungepaarten Elektronen verschiedener Moleküle immer größer. Die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den magnetischen Momenten der Elektronen haben eine Verbreiterung der Hyperfeinlinien zur Folge. Dabei hängt das Ausmaß der Linienverbreiterung stark vom mittleren Abstand der Radikale ab und ist proportional $1/r^3$. Bei einer sehr hohen Dichte der Radikale kann ein kritischer Abstand von <1.5 nm erreicht werden, so dass die Spin-Orbitale überlappen und eine Spin-Austausch-Wechselwirkung auftritt [11]. In der Konsequenz führt die Spin-Austausch-Wechselwirkung der Radikale zu einer starken Verbreiterung der Hyperfeinstrukturlinien des Stickstoffs bis hin zu ihrem vollständigen Verlust.

4 Messtechnik der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Der prinzipielle Aufbau eines ESR-Spektrometers mit den wesentlichen Komponenten ist in Abbildung 11 als vereinfachtes Blockschaltbild dargestellt, anhand dessen die Funktionsweise kurz erläutert werden soll.

Das Klystron (oder ein Gunnoszillator) erzeugt eine kohärente Mikrowellenstrahlung, die bei dem verwendeten X-Band Spektrometer mit einer Frequenz von ca. 9.5 GHz (Wellenlänge ca. 3 cm) in einen Hohlleiter eingekoppelt wird. Die Mikrowellenfre-

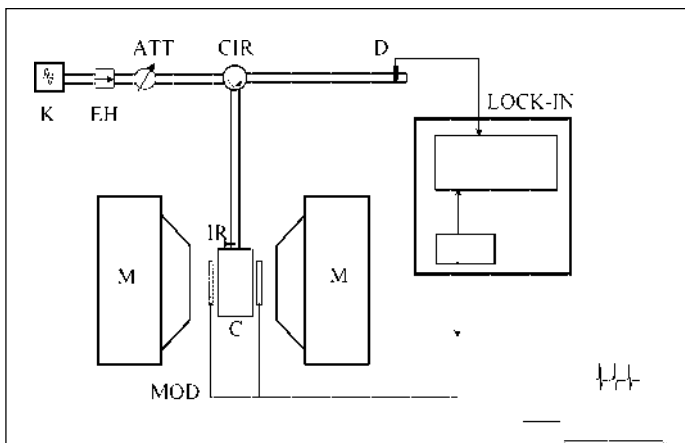


Abb. 11 (Blockschaltbild): Prinzipieller Aufbau eines ESR-Spektrometers mit den wesentlichen Komponenten: K = Klystron, EH = Einweg-Hohlleiter, ATT = Dämpfungsglied, CIR = Circulator, C = Hohlraumresonator (Cavity), D = Detektordiode, IR = Iris, M = Elektromagneten (externes Magnetfeld zwischen den Polschuhen), LOCK-IN = Lock-In-Verstärker, MOD = Modulationsspulen

quenz wird an die Eigenresonanz des Hohlraumresonators angepasst. Über einen Einweg-Hohlleiter und ein Dämpfungsglied gelangt die Mikrowelle über den Circulator zum Hohlraumresonator (oder Cavity). Der Circulator sorgt dafür, dass der Hohlleiter mit der Detektordiode vollständig vom Klystronarm entkoppelt wird. Die an der Cavity einlaufende Mikrowelle muss mit der sogenannten Iris optimal angekoppelt werden, so dass keine Mikrowellenleistung mehr reflektiert wird. Die in der Cavity aufgenommene Mikrowellenstrahlung baut dort eine stehende Welle auf, wobei sich die Probe möglichst im Bereich der größten Flussdichte der magnetischen Feldkomponente (B_1 -Feld) der Mikrowelle befinden sollte, da die beobachteten Resonanzen magnetischen Dipol-Übergängen entsprechen. Im idealen Fall wird die gesamte Mikrowellenleistung in der Cavity dissipiert, so dass keine Leistung an der Detektordiode des Messarms anliegt (Nullabgleichsmethode). Wenn das externe Magnetfeld zwischen den Polschuhen langsam erhöht wird, setzt beim Erreichen der Resonanzbedingung der Probe Absorption ein. Dies hat zur Folge, dass die Abstimmung an der Cavity nun gestört wird und Mikrowellenleistung zur Diode reflektiert wird (deshalb werden die verwendeten Resonatoren auch als Reflexionscavities bezeichnet). Das reflektierte Signal an der Diode ist proportional zur Absorption in der Cavity und kann registriert werden. Da die Nettoabsorption und damit das Diodensignal jedoch i. a. sehr klein ist (siehe Abschnitt 3.1) wird mit Hilfe eines Lock-In-Verstärkers das Rauschen aller Systemkomponenten im Vergleich zum Nutzsignal stark unterdrückt. Dazu wird das sinusoidale Referenzsignal des Lock-In über einen Verstärker zur Modulation des externen Magnetfeldes benutzt. Die Modulationsspulen befinden sich in Helmholtz-Anordnung an beiden Seiten der Cavity, so dass das externe Magnetfeld mit z. B. 100 kHz und einer variablen Amplitude (0.01 bis 3 mT) moduliert wird. Im Resonanzfall wird folglich die Absorption und damit das Signal an der Diode moduliert. Das Diodensignal wird dann phasen- und frequenzempfindlich durch Vergleich mit dem Referenzsignal verstärkt und in ein Gleichspannungssignal umgesetzt. Letzteres wird digitalisiert und vom steuernden Computer dargestellt. Durch die Modulation wird effektiv die Steigung der Absorptionkurve abgetastet, so dass die 1. Ableitung des Absorptionssignals der Probe aufgezeichnet wird. Bei wenig intensiven Signalen werden die

Spektren häufig durch mehrfaches Durchfahren des Magnetfeldbereichs akkumuliert, so dass das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert wird (proportional zur Wurzel der Akkumulationen).

Neben der optimalen Abstimmung der Cavity hat vor allem auch die Wahl der Modulationsamplitude und die Phaseneinstellung des Lock-In erheblichen Einfluss auf die Qualität des Spektrums. Wird die Modulationsamplitude größer als die halbe natürliche Linienbreite der Absorption gewählt, so verbreitert sich das Signal und spektrale Auflösung geht verloren. Wenn die Modulationsamplitude zu klein gewählt wird (oder die Phase nicht passend eingestellt ist), geht andererseits Signalintensität verloren, die nur durch einen erheblichen Mehraufwand an Messzeit wettgemacht werden kann. Um optimale Spektren zu erhalten müssen auch die Vorschubgeschwindigkeit des externen Magnetfeldes und die Zeitkonstante des Lock-In-Verstärkers aufeinander abgestimmt werden. Vor allem bei relativ zu hoch gewählten Zeitkonstanten werden die niederfrequenten Signalanteile unterdrückt und das Spektrum verzerrt. Insbesondere wenn quantitative Messungen geplant sind, muss auch die Leistung der Mikrowelle so angepasst werden, dass Sättigungsphänomene der Probe ausgeschlossen sind.

5 Durchführung der Lag-Time-Messung

Im Folgenden wird das Verfahren der Lag-Time-Messung mit Hilfe der ESR-Spektroskopie, wie es von *Uchida* et al. [8] entwickelt wurde, kurz beschrieben. Zur Ermittlung der Lag-Time wird Bier einem oxidativen Forciertest bei 60 °C unterworfen. Der Luftsauerstoff, der sich über der Bierprobe befindet, diffundiert ins Bier und wird in seine aktiven Formen überführt. Die entstehenden reaktiven und kurzlebigen Radikale werden mit Hilfe des Spin-Traps PBN (N-tert-Butyl- α -phenylnitron) eingefangen und stabilisiert, um sie auf diese Weise der ESR-Messung zugänglich zu machen. Diese wurden an einem X-Band-Spektrometer der Firma Bruker (ESP-300) ausgeführt.

Für die Messungen wurden nach Optimierung folgende Standardparameter-Einstellungen für das ESR-Spektrometer verwendet:

Messtemperatur: ca. 20 °C; Center Field : 3500 G; Dämpfung: 10 dB (entspricht einer Leistung von 20 mW); Sweep Width: 7.0 mT; Conversion Time: 40.96 ms; Receiver Gain: $1 \cdot 10^5$; Mod.-Amplitude: 0.1 mT; Time constant: 40.96 ms; Messpunkte: 1024; Phasenangleichung: 0 – 5; Scans: 3; Mod. Frequenz: 100 kHz; Cavity-Type: Bruker 4108 TMH Nr.: 8603.

Verwendete Reagenzien:

N-tert-Butyl- α -phenylnitron (PBN) 98 %, $C_{11}H_{15}NO$, $M = 177,2$ g/mol;

(SIGMA CHEMICAL CO., P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA, Tel. 314-771-5750; SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany, Tel. 49-7329-970; Nr. B-7263, 5g, Lot 31K1498, mind. 98% [3376-24-7], EC No 222-168-6. For RAD use only. Not for drug, household or other uses. **W5/R**)

Ethanol pro analysis 99,8%, C_2H_5OH , $M = 46,07$ g/mol, Dichte: $1 l = 0,79$ kg;

(Merck KgaA, 64271 Darmstadt, Germany, Tel. 49(0)6151 72-2440; EG-Nr.: CE 200-578-6, Charge/Lot K29301283125, Nr. 1.00983.1011, UN 1170, Reinheit mind. 99,8%, VbF B3.2 (IMDG-Code), mind. verw. bis 31.05.06, R: 11, S: 7-16)

Natriumsulfit wasserfrei zur Analyse; Na_2SO_3 ; $M = 126,04 \text{ g/mol}$; Dichte: $2,63 \text{ g/cm}^3$ (20°C)

MERCK-Art-Nr: 106657; CAS-Nummer: 7757-83-7; Giftklasse CH: 3 – starke Gifte; HS-Warennummer: 28321000; EG-Nr.: 231-821-4; Lagerklasse (VCI): LGK 10-13; Lagerung: ohne Einschränkung; WGK: 1-schwach wassergefährdend; Entsorgung: 28.

5.1 Schrittweise Durchführung

- Aus einer Bierprobe (Bierflasche), die sich in einer anaeroben Box unter N_2 -Atmosphäre befindet, werden jeweils 1,2 ml Bier in zwölf 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und diese verschlossen. Diese Proben werden anschließend zur CO_2 -Teilentgasung 10 min bei 1000 g zentrifugiert, so dass kein ungewollter Sauerstoffkontakt vor der eigentlichen Messung vorliegt. (Zentrifugeneinstellung: 10 min bei 3100 U/min, entspricht etwa 1000 g; HERAEUS, Microzentrifuge MC-13)
- Während der Zentrifugation der Bierproben werden 0,1275 g *N-tert-Butyl- α -phenylnitron* (PBN) 98% abgewogen und durch Zugabe von 0,360 ml Ethanol 99,8% in einem 20 ml Messkolben gelöst (2,35 M PBN in EtOH).
- Aus den zentrifugierten Proben werden 12 ml des teilentgasten Bieres in den 20 ml Messkolben überführt, mit der PBN-Ethanol-Lösung durchmischt und der Messkolben in einem auf 60°C temperierten Wasserbad befestigt. Dieser Zeitpunkt stellt die Null-Zeit des Forciertests dar.

Nach Mischung mit einer Bierprobenmenge von 12 ml entspricht die PBN-Endkonzentration ungefähr 58 mM bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Ethanolkonzentration um ca. 3 Vol. %. Mit Rührfisch und einem Magnetrührer wird eine ständige Durchmischung über den gesamten Messzeitraum gewährleistet. Um während der Messung für einen ausreichenden Atmosphärenaustausch (Sauerstoffkontakt) zu sorgen und gleichzeitig den Verlust durch Verdunstung gering zu halten, wird ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml bzw. 1,5 ml) mit einer kleinen Bohrung versehen und der Messkolben damit verschlossen. Eine zu starke Verdunstung führt ansonsten, insbesondere zum Ende der Messung hin, zu einer Aufkonzentration der Lösung, die eine höhere Konzentration der Spin-Addukte vortäuscht.

- 3 – 4 Minuten nach dem Start des oxidativen Forciertests wird die erste Probe zur Aufnahme eines ESR-Spektrums entnommen. Dazu wird mit Hilfe einer Pasteurpipette ein entsprechendes Volumen (ca. 0,3 ml) aus dem 20 ml Messkolben aufgenommen und in eine ESR-Flachzelle überführt. Die ESR-Flachzelle wird in dem Hohlraumresonator (Cavity) des ESR-Spektrometers optimal justiert, bevor die Aufnahme des Spektrums unter den beschriebenen Bedingungen und Geräteeinstellungen erfolgt. Dieser Vorgang wird über eine Zeitspanne von 180 min in Abständen von 8 – 10 min wiederholt. Während der ersten 100 min sollten möglichst kurze Abstände (ca. 8 min) gewählt werden, um eine ausreichende Anzahl von Messpunkten für die Lag-Time-Ermittlung zu erhalten und somit den Fehler der Messung zu verringern.

Vielfach wird auch die Möglichkeit angewendet, das erste ESR-Spektrum nach der Zugabe der Bierprobe zur PBN-Ethanollösung und vor Beginn des oxidativen Forciertests im Wasserbad aufzunehmen, um ein Spektrum des Ausgangszustandes zu bekommen. Messungen haben jedoch gezeigt, dass zu diesem Zeitpunkt die

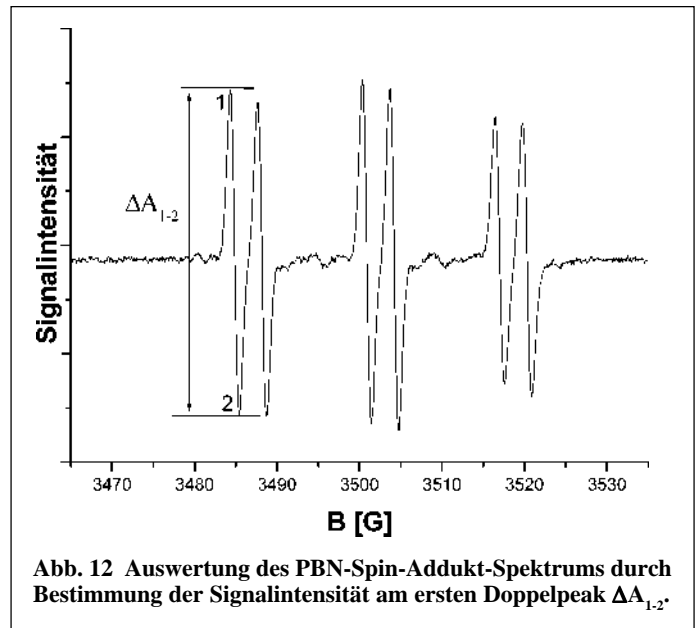


Abb. 12 Auswertung des PBN-Spin-Addukt-Spektrums durch Bestimmung der Signalintensität am ersten Doppelpeak $\Delta A_{1,2}$.

Konzentration der PBN-Spin-Addukte noch unter dem Nachweinsniveau liegt und im Wesentlichen nur Rauschen zu detektieren ist. Unter den Bedingungen des oxidativen Forciertests wird nach 3 – 4 Minuten ein ausreichend gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht.

5.2 Auswertung der ESR-Spektren

In einer Reihe von Veröffentlichungen ist die Bestimmung der Lag-Time mit Hilfe der ESR-Spektren ausführlich beschrieben worden (z.B.: [1], [13], [14]). Deshalb soll die hier angewandte Vorgehensweise nur kurz begründet und auf mögliche Fehlerquellen hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit hingewiesen werden.

Das charakteristische Linienmuster der ESR-Spektren von PBN-Spin-Addukten wurde anhand des Molekülaufbaus von PBN und den daraus resultierenden Hyperfein- und Superhyperfeinaufspaltungen bereits zuvor beschrieben (s. Abb. 10 a, b). Die Linienintensität ist dabei direkt proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen Spins. Entsprechend wird die Zunahme der Konzentration an PBN-Spin-Addukten im Verlauf der Lag-Time-Messung über die Signalintensität der Spektren, die in bestimmten Zeitabständen gemessen werden, erhalten.

Dazu wird bei jedem Einzelspektrum die Intensität der 1. Linie der Niederfeld-Hyperfeinresonanz des Spin-Addukt-Spektrums (Abb. 12; $\Delta A_{1,2}$) ausgewertet und gegen die jeweiligen Forciertestzeiten aufgetragen. Man erhält eine Kurve, die die Änderung der Konzentration der PBN-Spin-Addukte im Zeitverlauf des oxidativen Forciertests wiedergibt, wie sie in den Abb. 13 a, b anhand eines typischen Beispiels dargestellt ist.

Um aus dieser Kurve die zugehörige Lag-Time zu ermitteln, werden durch die linearen Abschnitte A und C jeweils eine Ausgleichsgerade gelegt und aus dem Schnittpunkt der beiden Geraden die Lag-Time in Minuten abgelesen bzw. berechnet (s. Abb. 13 b). Eine Reihe von Versuchen hat gezeigt, dass es nicht sinnvoll ist, Messpunkte in die Auswertung der Regressionsgeraden mit einzubeziehen, die sich im Bereich des ersten Knickpunktes befinden (z.B. Punkt B in Abb. 13 a). Für sie ist zum einen die Zuordnung zu einer der beiden Ausgleichsgeraden

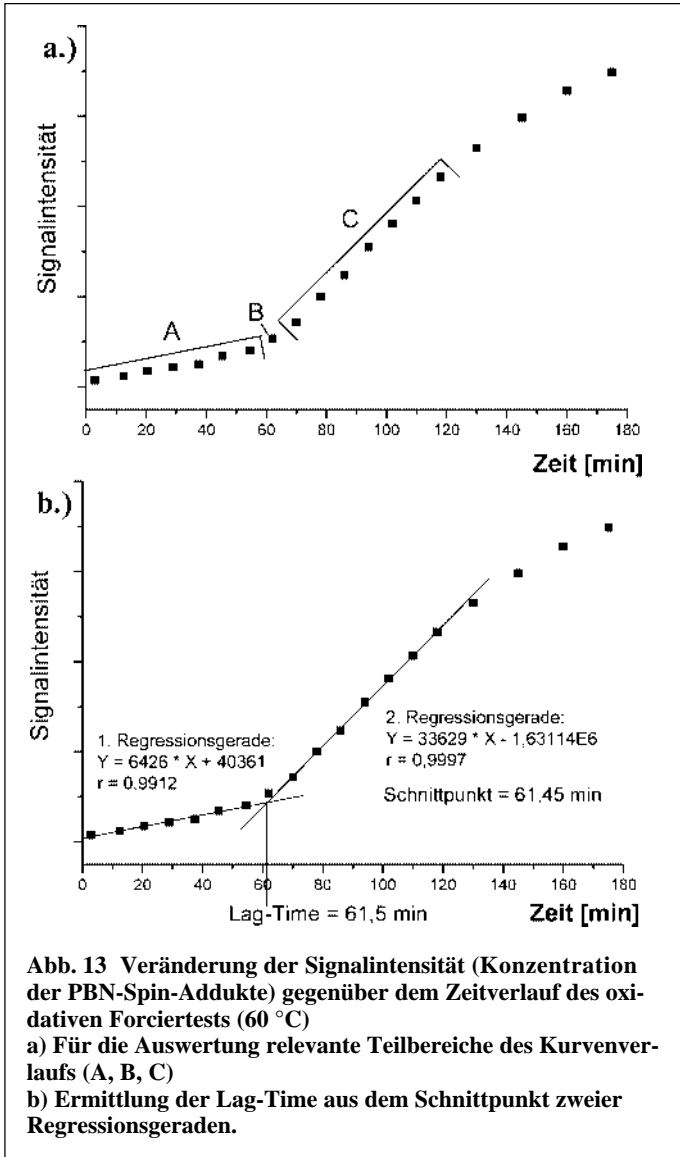


Abb. 13 Veränderung der Signalintensität (Konzentration der PBN-Spin-Addukte) gegenüber dem Zeitverlauf des oxidativen Forciertests (60 °C)

a) Für die Auswertung relevante Teilbereiche des Kurvenverlaufs (A, B, C)

b) Ermittlung der Lag-Time aus dem Schnittpunkt zweier Regressionsgeraden.

problematisch und zum anderen wird die jeweilige Ausgleichsgerade aufgrund der starken Abweichung dieser Messpunkte gegenüber den anderen Messpunkten zu stark beeinflusst. Die Änderung der Geradensteigung führt je nach Zuordnung zu einer Verschiebung der berechneten Lag-Time nach oben (Zuordnung zum Bereich A) oder nach unten (Zuordnung zum Bereich C). Hier liegt eine mögliche Fehlerquelle für den Vergleich der Lag-Time-Werte aus verschiedenen Messungen. Aus diesem Grunde wurden solche Messpunkte bei der Auswertung der Ausgleichsgeraden nicht berücksichtigt.

In den Abb. 13 a, b ist auch deutlich zu erkennen, dass oberhalb von Bereich C eine Krümmung des Verlaufs einsetzt, der offensichtlich der Sättigung zustrebt. Die Sättigung stellt die maximale Konzentration der PBN-Spin-Addukte dar, die mit der vorgegebenen PBN-Zugabe erreicht werden kann. Bei der Auswertung ist daher zu berücksichtigen, dass ab dem Übergang in die Sättigung jeder weitere Messpunkt, der noch dem Bereich C zugeordnet wird, einen Fehler in Richtung einer kleineren Lag-Time verursacht. Aus diesem Grunde wurde bei der Auswertung darauf geachtet, dass nur Messpunkte des linearen Abschnitts C für die Berechnung der entsprechenden Regressionsgerade berücksichtigt wurden.

In regelmäßigen Abständen wurden Messungen zur Reproduzierbarkeit durchgeführt. Dazu wurden Bierproben der gleichen Abfüllung kurz hintereinander gemessen und nach dem oben beschriebenen Verfahren ausgewertet. Die aus den Regressionsgeraden bestimmten Lag-Time-Werte wichen mit <1 min nur unwesentlich voneinander ab. Bei einer konsequent gleichen Durchführung der Lag-Time-Messung ist somit eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Messergebnisse gewährleistet.

6 Abhängigkeit der Lag-Time vom Schwefeldioxidgehalt im Bier

Vielfach wird auf einen direkten linearen Zusammenhang zwischen SO_2 -Gehalt und Lag-Time hingewiesen (z.B.: [1]). Um diesen linearen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurden Lag-Time-Messungen mit Bierproben durchgeführt, deren SO_2 -Gehalt über die Zugabe von Natriumsulfit definiert erhöht wurde. Für die Untersuchung erschien insbesondere der Bereich bis 10 mg/l SO_2 -Gehalt im Bier am interessantesten, da dies der Grenzwert ist, ab dem SO_2 als Konservierungsstoff deklariert werden muss. Im Zusammenhang mit der SO_2 -Zugabe wurde gleichzeitig der Lag-Time-Unterschied zwischen entalkoholisierendem Bier und Bier mit „normalem“ Alkoholgehalt näher untersucht. Entalkoholisierte Biere weisen normalerweise eine mit Abstand niedrigere Lag-Time auf als Biere mit „normalem“ Alkoholgehalt. Eine vergleichende Messung unter SO_2 -Zugabe erlaubt daher eine Aussage darüber, inwieweit der Unterschied in der gemessenen Lag-Time auf den niedrigeren SO_2 -Gehalt entalkoholisierter Biere zurückzuführen ist und welchen Einfluss andere Faktoren, wie z.B. der Ethanolgehalt, auf die gemessene Lag-Time haben. Der niedrigere SO_2 -Gehalt entalkoholisierter Biere ist darauf zurückzuführen, dass ein Teil des SO_2 -Gehalts bei den gängigen Methoden der Entalkoholisierung (Destillation, Umkehrosmose) mit ausgetrieben wird. (Bei anderen Herstellungsmethoden alkoholärmer Biere, z.B. durch Drosselung der Gärung oder mit speziellen Hefen, die nicht alle in der Würze enthaltenen Zucker in Alkohol umwandeln, wird grundsätzlich weniger SO_2 durch die Hefen produziert).

Der SO_2 -Gehalt eines entalkoholisierten Bieres (A) und eines normalen Pils (Bier B) des gleichen Abfülltages wurde durch Zugabe einer definierten Menge Natriumsulfit um jeweils 3 mg/l bzw. 6 mg/l erhöht. Die Proben wurden unter gleichen Bedingungen gelagert (Lagertemperatur 5 – 7 °C, dunkel) und alle Messungen in einem Zeitraum von zwei Tagen durchgeführt, um die Lag-Time-Werte miteinander vergleichen zu können.

Die Kurvenverläufe der Lag-Time-Messungen des entalkoholisierten Bieres sind in Abbildung 14 a dargestellt. Das Bier ohne Sulfit-Zugabe (Kurve A₁) zeigt einen frühen Anstieg und eine entsprechend kurze Lag-Time von ca. 21 min. Bei dem Bier mit 10,5 mg/l SO_2 -Gehalt (Kurve A₃) ist die Lag-Time um das Dreifache auf über 70 min angestiegen. Für das Bier mit normalem Alkoholgehalt (Pils) wurden die Kurvenverläufe der Abbildung 14 b bestimmt. Das Bier ohne SO_2 -Zusatz mit einem SO_2 -Gesamtgehalt von 7,5 mg/l (Kurve B₁) besitzt eine Lag-Time, die der des entalkoholisierten Bieres beim gleichen SO_2 -Gehalt (Kurve A₂) nahe kommt. Für den höchsten SO_2 -Zusatz ist die resultierende Kurve B₃ noch einmal zu höherer Lag-Time verschoben.

Werden die Lag-Time-Werte der entalkoholisierten Bierproben (A) und der „normalen“ Bierproben (B) gegen den Gesamtgehalt an SO_2 aufgetragen, so wird der Graph der Abbildung 15 erhalten. Er zeigt eine nicht-lineare Abhängigkeit der Lag-Time vom SO_2 -

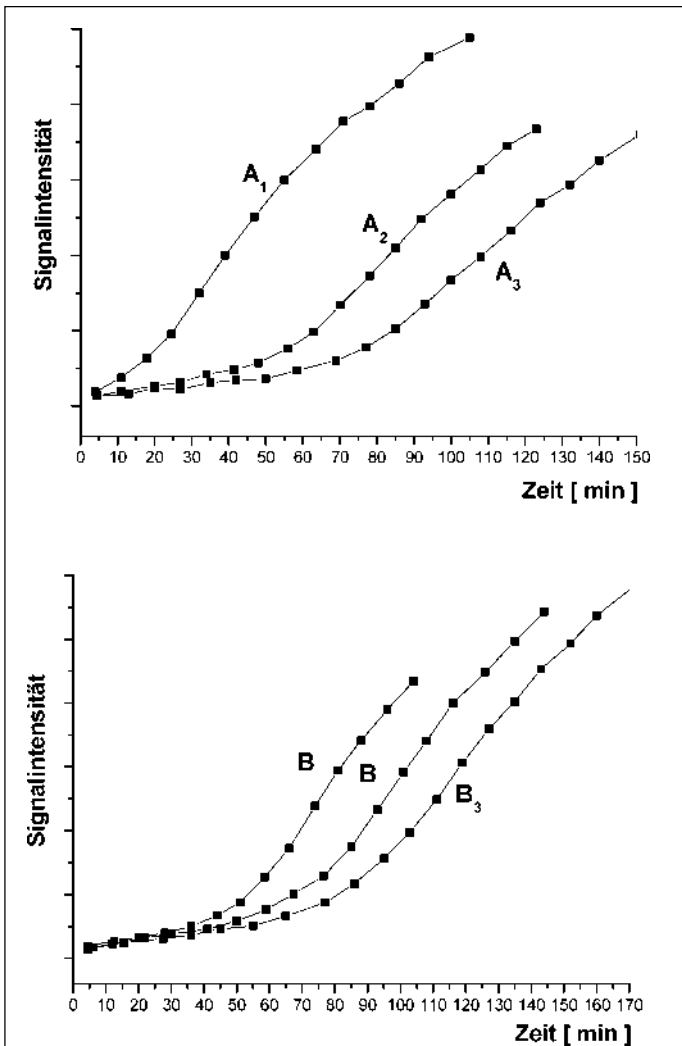


Abb. 14 a Veränderung der Lag-Time alkoholarmer Biere durch SO₂-Zugabe;
A₁: Ausgangswert ohne SO₂-Zugabe, Ges.-SO₂-Gehalt = 4,5 mg/l; Lag-Time = 21,7 min; **A₂**: Ges.-SO₂-Gehalt = 7,5 mg/l; Lag-Time = 56,5 min; **A₃**: Ges.-SO₂-Gehalt = 10,5 mg/l; Lag-Time = 73,5 min;

Abb. 14 b Veränderung der Lag-Time „normaler“ Biere (Pils) durch SO₂-Zugabe
B₁: Ausgangswert ohne SO₂-Zugabe, Ges.-SO₂-Gehalt = 7,5 mg/l; Lag-Time = 50,3 min.; **B₂**: Ges.-SO₂-Gehalt = 10,5 mg/l; Lag-Time = 70,9 min.; **B₃**: Ges.-SO₂-Gehalt = 13,5 mg/l; Lag-Time = 81 min.

Gehalt. Der deutliche Lag-Time-Unterschied der beiden verschiedenen Bierproben ohne zusätzliche Sulfit-Zugabe, hier gegeben durch A₁ und B₁, ist fast ausschließlich auf den Unterschied im SO₂-Gehalt zurückzuführen. Bei gleicher SO₂-Konzentration liegt der Wert von A₂ nahe bei dem der Probe B₁. Es fällt auf, dass die Lag-Time-Werte für die Bierproben mit „normalem“ Alkoholgehalt im Bezug auf den Gesamt-SO₂-Gehalt im Bier sogar etwas unter den gemessenen Lag-Time-Werten für entalkoholisierte Biere liegen. Dies weist darauf hin, dass der geringere Ethanolgehalt im entalkoholisierten Bier nicht für die geringere Lag-Time entalkoholisierter Biere verantwortlich sein kann.

Die nichtlineare SO₂-Abhängigkeit der Lag-Time wurde durch zusätzliche Messungen verifiziert, wobei der SO₂-Gehalt eines entalkoholisierten Bieres um 1 – 10 mg/l erhöht wurde.

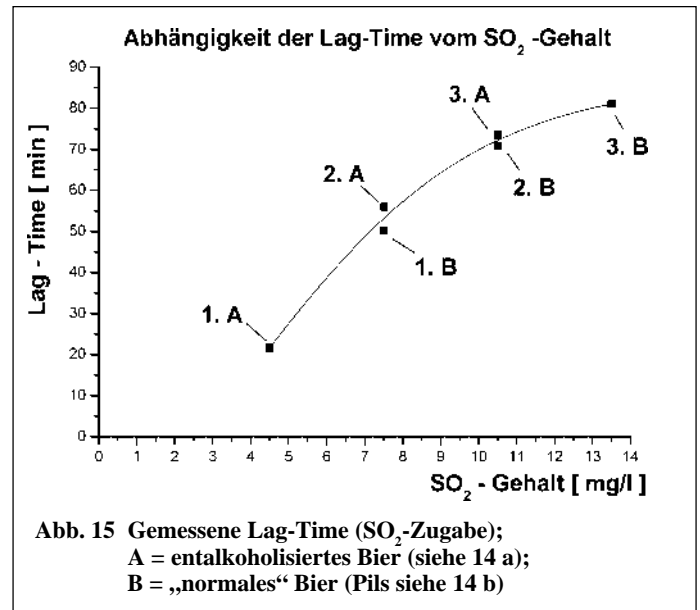


Abb. 15 Gemessene Lag-Time (SO₂-Zugabe);
A = entalkoholisertes Bier (siehe 14 a);
B = „normales“ Bier (Pils siehe 14 b)

Die Lag-Time-Werte sind in Abbildung 16 a gegenüber dem Gesamt-SO₂-Gehalt im Bier wiedergegeben und bestätigen den nicht-linearen Zusammenhang. Der Kurvenverlauf deutet auf eine Sättigungskurve hin. D.h. die größten Steigerungsraten in der Lag-Time aufgrund der Erhöhung des SO₂-Gehalts erhält man im Bereich bis zu 10 mg/l. Danach führt eine weitere Erhöhung des SO₂-Gehalts zwar immer noch zu einer Erhöhung der Lag-Time, aber die Steigerungsraten werden kleiner.

Um den weiteren Verlauf der Kurve abschätzen zu können, wurde ein Versuch mit einer SO₂-Zugabe von 50 mg/l durchgeführt. Der daraus resultierende Lag-Time-Wert kann jedoch nur bedingt mit den anderen Werten verglichen werden, da die SO₂-Zugabe erst nach einer zusätzlichen Lagerzeit von 2 Wochen (5 – 7 °C) erfolgte. Daher kann der in Abbildung 16 b dargestellte Kurvenverlauf nur als Anhaltspunkt für eine zu erwartende Abhängigkeit zwischen SO₂-Gehalt und Lag-Time bei einem SO₂-Gehalt im Bier von > 10 mg/l dienen. Der interpolierte Kurvenverlauf zeigt deutlich, dass eine Erhöhung des SO₂-Gehalts über die gesetzliche Grenze von 10 mg/l hinaus nicht mehr so große Vorteile bringt, wie im Bereich niedrigerer SO₂-Konzentrationen. Da die Steigerungsraten der zu erreichenden Lag-Time im Bereich bis 10 mg/l sehr hoch sind, ist es zu empfehlen, über den Brauprozess, die Rohstoffe und die verwendete Hefe zu versuchen, den SO₂-Gehalt im abgefüllten Bier auf ein Wert von 8 – 10 mg/l einzustellen. In dem Bereich < 10 mg/l führt jede Erhöhung der SO₂-Konzentration zu einer bedeutenden Steigerung der gemessenen Lag-Time-Werte und über die Zunahme des endogenen antioxidativen Potentials auch zu einer Steigerung der oxidativen Bierstabilität.

6.1 Lag-Time-Messung bei sehr geringem SO₂-Gehalt

Die starke Abhängigkeit der gemessenen Lag-Time vom SO₂-Gehalt im Bier wirft die Frage auf, ob ein Bier, in dem kein SO₂ vorhanden ist, überhaupt noch eine messbare Lag-Time aufweist. Dieser Fragestellung wurde durch die Untersuchung eines speziell gebrauten Bieres mit einer SO₂-Konzentration von ≈ 1 ppm (= 1 mg/l) von Anderson et al. nachgegangen [15]. Die Autoren vergleichen dabei die Lag-Time Messungen dieses Bieres und eines mit einer SO₂-Konzentration von 4 ppm miteinander (Abb. 17). Aus dem oberen Kurvenverlauf für die geringe SO₂-Konzentration von ≈ 1 ppm, geht ein sehr geringer Lag-Time-Wert

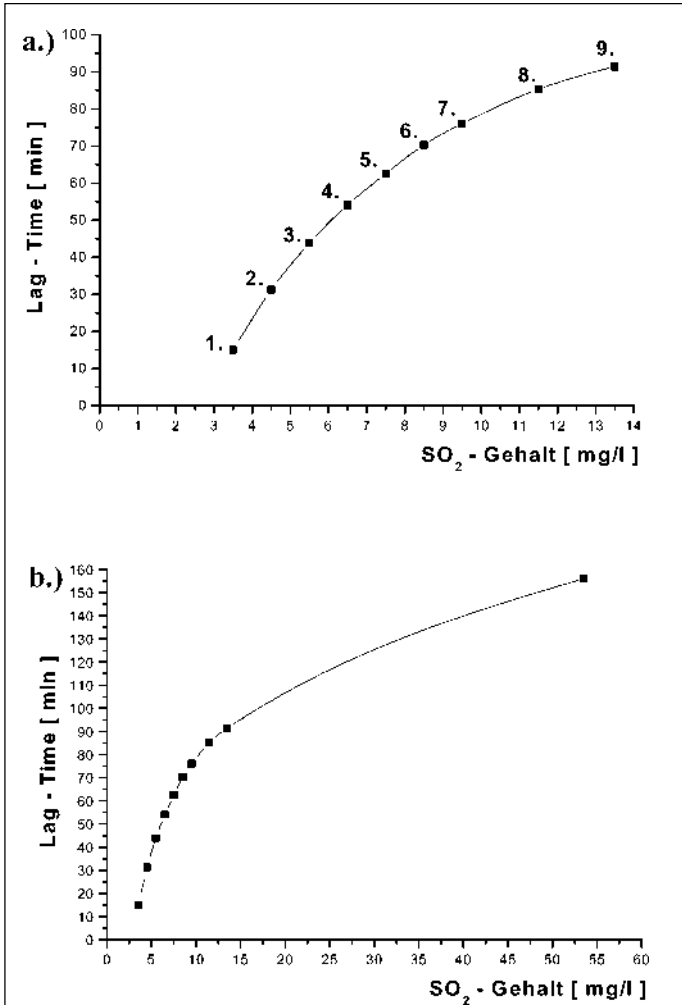


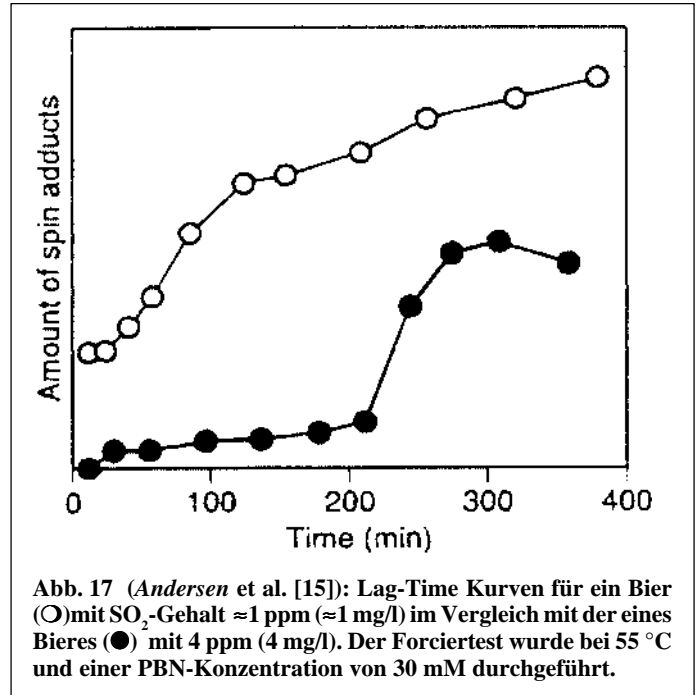
Abb. 16 a Abhängigkeit der Lag-Time vom SO₂-Gehalt im entalkoholisierten Bier

1. Lag-Time = 15 min.; SO₂-Gehalt = 3,5 mg/l
2. Lag-Time = 31,2 min.; SO₂-Gehalt = 4,5 mg/l
3. Lag-Time = 43,8 min.; SO₂-Gehalt = 5,5 mg/l
4. Lag-Time = 54,1 min.; SO₂-Gehalt = 6,5 mg/l
5. Lag-Time = 62,5 min.; SO₂-Gehalt = 7,5 mg/l
6. Lag-Time = 70,3 min.; SO₂-Gehalt = 8,5 mg/l
7. Lag-Time = 76 min.; SO₂-Gehalt = 9,5 mg/l
8. Lag-Time = 85,3 min.; SO₂-Gehalt = 11,5 mg/l
9. Lag-Time = 91,4 min.; SO₂-Gehalt = 13,5 mg/l

Abb. 16 b Werte aus 16 a: + 10. Lag-Time = 156 min. ; SO₂-Gehalt = 53.5 mg/l;

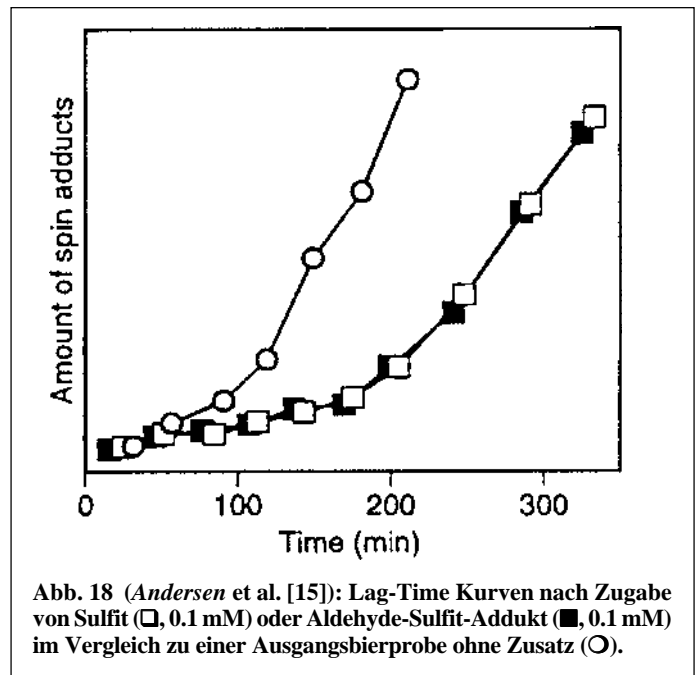
von ca. 15 – 20 min hervor. Der Vergleichswert (unterer Kurvenverlauf 4 ppm) ist in etwa um das 10-fache höher. Damit wird die starke SO₂-Abhängigkeit der Lag-Time bestätigt und SO₂ als Hauptbestandteil des endogenen antioxidativen Potentials eines Bieres nachgewiesen [15].

Da der oxidative Forciertest von den Autoren unter anderen Bedingungen durchgeführt wurde (55 °C, geringere PBN-Konzentration), ist ein direkter Vergleich der Lag-Time Werte nicht möglich. Dennoch lässt sich aufgrund der geringen Lag-Time bei einer SO₂-Konzentration von ≈1mg/l vorhersagen, dass eine Messung unter den in unserem Labor angewendeten Messbedingungen (60 °C, höhere PBN-Konzentration) keine auswertbare Lag-Time mehr liefern würde.



6.2 Freisetzung der Alterungcarbonyle aus Sulfid-Carbonyl-Komplex

Im Zusammenhang mit der starken Abhängigkeit der Lag-Time vom SO₂-Gehalt eines Bieres, ist auch die Komplexbildung von SO₂ mit Alterungcarbonylen in Betracht zu ziehen. Bei ihr handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, die von der vorliegenden SO₂-Konzentration im Bier beeinflusst wird. D.h. solange am Anfang ausreichend SO₂ vorhanden ist, werden die Alterungcarbonyle gemäß des vorliegenden Gleichgewichts abgefangen. Während des Alterungsprozesses wird SO₂ als natürliches Antioxidans verbraucht, die SO₂-Konzentration geringer und SO₂ aus dem Gleichgewicht entzogen. Die dadurch freigesetzten Alterungcarbonyle und die anfänglich gebundenen Alterungcarbonyle sollten einem linearen Zusammenhang zwischen der gemessenen Lag-Time und der sensorisch bestimmten Geschmacksstabilität entgegenstehen.



Der Einfluss von Sulfit-Carbonyl-Komplexen auf die Lag-Time wurde untersucht, indem einem Bier einmal ein Sulfit-Carbonyl-Komplex in Form eines Acetaldehyde-Sulfit-Addukts und zum anderen SO_2 in Form von Bisulfit zugesetzt wurde, so dass jeweils eine Gesamtkonzentration von 0.1 mM (= 6.4 mg/l SO_2) in der Bierprobe vorlag [15]. Anschließend wurde die Lag-Time der zwei präparierten Bierproben und der Ausgangsbierprobe gemessen (Abb. 18).

Die Kurven zeigen eindeutig, dass sowohl die Zugabe von Sulfit als auch des Acetaldehyde-Sulfit-Addukts zu der gleichen Lag-Time-Vergrößerung gegenüber der Ausgangsbierprobe führen. Man kann daher davon ausgehen, dass während der Bieralterung sämtliche zuvor als Komplex gebundene Alterungscarbonyle wieder freigesetzt werden. Das vorherige Abfangen und die spätere Freisetzung der Alterungscarbonyle wirken somit einem direkt linearen Zusammenhang zwischen der gemessenen Lag-Time und der sensorisch bestimmten Geschmacksstabilität entgegen.

7 Schlussfolgerung

Die Anwendung der ESR-Spektroskopie in diesen Untersuchungen ermöglichte es, mit hoher Präzision den Einfluss der SO_2 -Konzentration auf die Lag-Time zu verfolgen. Aus den vergleichenden Messungen von entalkoholisierendem und normalen Bierproben konnte in Übereinstimmung mit der Literatur gezeigt werden, dass das SO_2 die Hauptkomponente des endogenen antioxidativen Potentials darstellt. Für die entalkoholisierten Biere ist demnach auch die deutlich verringerte Lag-Time nicht auf den reduzierten Alkoholgehalt, sondern auf die geringere SO_2 -Konzentration zurückzuführen. Die Messungen ergaben als weiteren wichtigen Befund einen deutlichen nicht-linearen Zusammenhang der SO_2 -Konzentration mit der Lag-Time. Eine besonders starke Zunahme der Lag-Time liegt in einem Konzentrationsbereich bis 10 mg/ml vor, danach beginnt der Zuwachs in der Lag-Time geringer zu werden. Die vorläufigen Messergebnisse für sehr hohe SO_2 -Konzentrationen deuten auf einen Sättigungsbereich für die Lag-Time hin. Hier können sich neue Ansatzmöglichkeiten zur Untersuchung der radikalischen Mechanismen ergeben.

Im Verlauf der Experimente haben sich zudem eine Reihe von Gesichtspunkten ergeben, die für die Interpretation der Lag-Time Messung von Bedeutung sind und in Zukunft genauer untersucht werden müssen. Dies betrifft insbesondere die Radikalbildungswege im Forciertest, die zusätzlich Informationen über die Bieralterungsprozesse ergeben können.

Es wurde deshalb versucht, einen kompakten Überblick über die Grundlagen der ESR-Spektroskopie, besonders im Hinblick auf das Zustandekommen der charakteristischen Linienmuster von Spin-Traps bzw. Spin-Labels, zu geben. Die detaillierte Interpretation der Spektren sollte in Zukunft unter Einsatz von z. B. isotopensubstituierten Spin Traps auch die Identifikation der reaktiven Radikalspezies ermöglichen und damit Hinweise auf die Bildungsmechanismen bzw. die Kinetik liefern. In dieser Hinsicht ist das Potential der ESR-Spektroskopie noch bei weitem nicht ausgeschöpft.

8 Summary

Kunz, T., Stephan, A., Methner, F.J., Kappl, R., and Hüttermann, J.: Fundamentals on electro spin resonance spectroscopy (ESR) and research about the correlation between oxidative beer stability and sulphite content — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No 7/8, 140 – 153, 2002

BC 25 Beer

Meanwhile it has been distinctly confirmed, that sulphite is the main component for the antioxidant potential in beer. This endogenous antioxidant buffer capacity for reactive radicals, which is mainly produced by activated oxygen, can quantitatively be determined by the lag time of beer during a forcing test using electro spin resonance spectroscopy (ESR). Detailed lag time measurements of various beer samples with a different sulphite content verify former results, but also show that there is a significant non-linear dependency, whose cause has not been clarified yet. In connection with the distinct dependency of the lag time to the sulphite content of beer the formation of sulphite complexes in conjunction with staling carbonyls will be discussed. The fundamentals of ESR spectroscopy will be presented, which are particularly important for the interpretation of the solution spectra of the spin trap radical adducts being formed during lag time measurements.

Kunz, T., Stephan, A., Methner, F.J., Kappl, R., et Hüttermann, J.: Données fondamentales de la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) pour l'examen des relations entre la stabilité d'oxydation de la bière et la teneur en SO_2 — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No 7/8, 140 – 153, 2002

BC 25 Bière

Il a été clairement prouvé que le dioxyde de soufre doit être considéré comme composante principale du potentiel anti-oxydant de la bière. Cette propriété tampon anti-oxydante endogène pour radicaux réactifs qui est essentiellement formée par l'oxygène activé, peut être déterminée quantitativement par le « Lag-Time » d'une bière par un test forcé à l'aide de la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique. Des mesures détaillées du « Lag-Time » sur différents échantillons de bière avec une teneur variable en SO_2 , confirment des déterminations antérieures, mais montrent également qu'il y a une liaison non-linéaire, dont la cause reste à éclaircir. En relation avec la dépendance marquée entre le « Lag-Time » et la teneur en SO_2 d'une bière, on discute la formation de complexes entre SO_2 et composés carbonyles de vieillissement. Dans cet article on expose de façon concise les bases de la spectroscopie RPE qui est importante pour l'interprétation des radicaux spin-trap des spectres de la mesure du « Lag-Time ».

9 Literatur

1. Forster, C., Schweiger, J., Narziß, L., Back, W., Uchida, M., Ono, M., Yanagi, K.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität von Bier mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie freier Radikale, Monatsschrift für Brauwissenschaft **52**, 5/6, 86 – 93, 1999.
2. Wackerbauer, K., Hardt, R.: Radikalreaktionen und die Geschmacksstabilität des Bieres, Brauwelt **136**, 40/41, 1880 – 1888, 1996.
3. Yanagi, K., Ishibashi, Y., Oka, K., Uchida, M.: Neue Methoden zur Beurteilung von Geschmacksstabilität, Schaumeigenschaften und -stabilität von Bier, Brauwelt **137**, 21/22, 841 – 859, 1997.
4. Riedel, E.: Anorganische Chemie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 1994.
5. Uchida, M., Ono, M.: Improvement for oxidative flavor stability of beer – role of OH-radical in beer oxidation, J. Am. Soc. Brew. Chem. **54**, 4, 198 – 204, 1996.
6. Walters, M. T.: Natural antioxidants and flavour stability, Ferment **10**, 2, 111 – 119 1997.
7. Yoshimura, Y., Iijima, T., Watanabe, T., Nakazawa, H.: Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system, J. Agr. Food Chem. **45**, 10, 4106 – 4109, 1997.
8. Uchida, M., Suga, S., Ono, M.: Improvement for oxidative flavor stability of beer – rapid prediction method for beer flavor stability by electron spin resonance spectroscopy, J. Am. Soc. Brew. Chem. **54**, 4, 198 – 204, 1996.

9. Kaneda, H., Osawa, T., Kawakishi, S., Munekata, M., Koshino, S.: Contribution of carbonyl-bisulfite adducts to beer stability, *J. Agr. Food Chem.* **42**, 2428 – 2432, 1994.
10. Kaneda, H., Masachika, T., Osawa, T., Kawakishi, S., Tamaki, T.: Behavior of sulfites during fermentation and storage of beer, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 2, 115 – 120, 1996.
11. Voggenreiter, B.: ESR-Spektroskopische Untersuchungen der Sauerstoffkonzentration in Erythrocyten, Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Fachbereich 3 (Theoretische Medizin), Homburg/Saar, 1991.
12. Galla, J.: Spektroskopische Methoden in der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1988.
13. Forster, C.: Die antioxidative Aktivität von Bier – eine neue Methode zur Verbesserung der Geschmacksstabilität, *Mitteilungen österreichisches Getränkeinstitut*, **11/12**, 132 – 139, 1998.
14. Iul Instruments GmbH, Königswinter: Lag Time – Abschätzung der Geschmacksstabilität im Bier, Gerätebeschreibung Miniscope MS100: Gerät zur Lag Time-Analyse, 1999.
15. Andersen, M.L., Outtrupk H., Skibsted, H.: Potential Antioxidants in Beer Assessed by ESR Spin Trapping, *J. Agr. Food Chem.* **48**, 8, 3106 – 3111, 2000.
16. Let, D. R.: Aspects of the analysis, role and fate of sulphur dioxide in beer – A review *MBAA Tech. Quart.* **32**, 4, 213 – 221, 1995.

(Manuskripteingang: 14. 6. 2002)

Call for Posters

29th Congress of the European Brewery Convention Dublin, Ireland, 17 – 22 May 2003

The Scientific Programme Committee is soliciting posters for presentation at the 29th EBC Congress, which will be held in Dublin (Ireland), 17 – 22 May 2003.

Contributions to the scientific programme should deal with **new topics** and/or **new visions** to existing topics, based on original data. Contributions of all kinds are welcomed, i.e. topics of general as well as scientific and technological nature. Relevant topics include scientific development in the supply chain from raw materials to finished packaged products.

Special Interest Areas

The following special interest areas have been selected:

- Beer & Health
- Technology, with emphasis on environmental-friendly technology
- Flavour & Taste Stability, including sensory issues
- Packaging

Submission of Proposals

Anyone wishing to submit a poster for consideration is invited to send the following information to the EBC Secretariat – by e-mail to secretariat@ebc-nl.com - **before 1 December 2002**:

- title of the poster
- author(s), underline the name of the presenter
- company/institute affiliation
- full address details, including e-mail address
- abstract (max. 1 page A4)

For all submissions the following applies:

Proposals will only be accepted if they contain **new** material; a statement of “what is new” has to be part of the submission. Contributions may not have been published before the 29th EBC Congress.

It is requested to structure abstracts by using the following headings:

description of theme/problem; analytical methods (if any); results; discussion; practical or scientific relevance of the results with regard to practicability, possible applications, future perspectives, limitations, economics.

Selection Procedure

The above information, which should be provided **in English** exclusively, will form the basis for selection by the EBC Selection Committee. It will neither be published, nor translated.

Notwithstanding the quality of the proposed contributions, EBC may regrettably have to forego proposals due to receipt of more applications than can be accommodated.

The result of the selection will be made known through a personal letter in the beginning of January 2003.

Registration Fees

Speakers and poster presenters in the EBC Congresses will enjoy a considerable reduction in the registration fees; only a modest contribution to cover the direct costs will be charged.

Language

English is the only congress language.

Deadline

Submission of posters is requested before **1 December 2002**. Applications received after the deadline cannot be taken into consideration.

Poster re-use

After the EBC Congress, re-use of posters is allowed in national meetings on the condition that proper acknowledgement is made to the EBC Congress where the poster was originally presented.

NB Deadline for submission of lecture proposals is **1 September 2002**