

O. Franz und W. Back

Erfahrungen zur Messung von freien Radikalen mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometer in der Brauerei

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) ist es möglich, freie Radikale in Würze und Bier zu detektieren. Diese Radikale sind an Oxidationsreaktionen und somit an den Alterungsvorgängen in Bieren beteiligt. Die Lag-Time, die mittels ESR gemessen wird, stellt die endogene antioxidative Aktivität des Bieres dar. Sie zeigt einen sehr guten Zusammenhang mit der zu erwartenden Geschmacksstabilität. Trotz der relativ einfachen Anwendung des ESR, gibt es Einflussfaktoren, die zu berücksichtigen sind, um die Analytik reproduzierbar und vor allem zwischen Bierlabors vergleichbar durchzuführen. So spielen der Extraktgehalt, der pH-Wert und der Ethanolgehalt der Probe eine wichtige Rolle. Speziell bei der Auswertung von Würzen ist es wichtig, diese Einflüsse zu kennen. Da die Zahl an Labors zunimmt, die das ESR in der Betriebskontrolle einsetzen, sind im Folgenden die Erfahrungen mit dieser Messmethode, die am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I gemacht wurden, dargestellt. Es ist sinnvoll, sich in Zukunft auf ein Vorgehensschema in der Probenvorbereitung und der Auswertung der Messung zu einigen, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

BC 25 Bier

(Deskriptoren: Geschmacksstabilität, ESR, freie Radikale, Lag-Time, pH-Wert, SO_2).

Descriptors: Flavour stability, ESR, free radicals, lag time, pH value, SO_2).

Einleitung

Mit Hilfe der Spin-Trap Technik war es 1988 *Kaneda et. al.* (10) möglich, freie Radikale mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) in Bier zu detektieren. Versuche zeigten, dass es sich bei dem gemessenen Radikal um das Hydroxylradikal handeln muss, das durch die Fenton Reaktion aus dem Wasserstoffperoxid eisenkatalysiert entsteht (11). *Uchida* geht davon aus, dass elementarer Sauerstoff in aktivierte Formen (Singlet-Sauerstoff, Superoxidradikalanion) überführt wird und weiter über das Wasserstoffperoxid zum Hydroxylradikal reagiert (22). Bierinhaltsstoffe vermögen in ihrer natürlichen Zusammensetzung diese Radikalentstehung eine gewisse Zeit lang zu unterbinden. *Uchida et. al.* (23) konnte diese Lag-Phase („Lag-Time“, „endogene antioxidative Aktivität“) darstellen und einen Zusammenhang mit dem Gehalt an Schwefeldioxid feststellen. So erhöht sich die Lag-Time mit der Zudosage von Sulfit zur Probe. In der Würze zeigt sich noch keine Lag-Time. Sie entsteht erst während der Hauptgärung parallel zur Schwefeldioxidbildung durch die Hefe (7, 23). Eine deutliche Steigerung der Lag-Time ist durch die Einwirkung des Enzyms Katalase möglich. Dies bestätigt nochmal die Beteiligung des Wasserstoffperoxids an der Radikalentstehung. Durch

Zudosage von H_2O_2 wird die Lag-Time unterdrückt und eine Steigerung der Radikalentstehung hervorgerufen. Die katalytische Wirkung von Fe^{2+} Ionen konnte ebenfalls durch Zudosage gezeigt werden (22). Dieses Messprinzip wurde vom Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I in Weihenstephan übernommen. Nach Prüfung eines großen Probevolumens zeigte sich bezüglich ihrer Lag-Time eine Gauss'sche Normalverteilung der Biere (3, 6). Langzeittests zeigten die Abnahme der Lag-Time während der Flaschenlagerung und eine gute Korrelation mit den Ergebnissen der Alterungsverkostung und der ermittelten Alterungskomponenten der Biere (3). Durch brauereispezifische Anpassung der Anstelltechnologie (Belüftungstechnik, Drauflassverfahren), konnte der Gehalt an Schwefeldioxid im Bier und somit die Lag-Time gesteigert werden (2, 7, 24). *Uchida* zeigte, dass trotz einer Verdünnungsreihe, die endogene antioxidative Aktivität gleich bleibt. Er erklärt dies mit einem natürlichen Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Inhaltsstoffen (24). Unterschiedlich starke Anstiege der Graphen nach der Lag-Time konnten mit unterschiedlichen Kieselgurtypen bei der Filtration in Verbindung gebracht werden. Eine Erklärung hierfür ist der Gehalt an prooxidativen Substanzen, wie zum Beispiel Eisenionen, die bei diesem Produktionsschritt dem Bier zugeführt werden können (25).

Es gibt neben der Lag-Time eine große Anzahl an weiteren Tests, die antioxidative Eigenschaften des Bieres messen. Dabei stellt sich die Frage, ob ein einziger Test das antioxidative Potenzial ausreichend beschreiben kann. Aus diesem Grund wurde der „Stabilitätsindex“ definiert, der vier Untersuchungen beinhaltet und so eine komplexere Betrachtung der antioxidativen Verhältnisse im Bier ermöglicht (Tab. 1) (3, 8).

Um antioxidative Eigenschaften in Würzen darzustellen, wurde für derartige Proben die Auswertung der Radikalverläufe abgeändert. Es wird die Fläche unterhalb des Graphen und somit die entstandenen Radikale bis zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst (3). In anderen Veröffentlichungen wird ebenso auf dieses Thema eingegangen und es finden sich unterschiedliche Varianten, wie RKI (5) oder T150 (21). Es gibt eine Vielzahl an weiteren Tests,

Tabelle 1 Die vier Einzelanalysen, aus denen sich der Stabilitätsindex zusammensetzt

Stabilitätsindex (3) Methode	Gerät
1) Lag-Time	ESR
2) Antiradikalisches Verhalten (Auswertung der Fläche)	ESR
3) Antiradikalisches Potenzial (DPPH-Methode) (8)	ESR
4) Reduktionsvermögen (DPI-Methode)	Tannometer

um Antioxidantien und reduzierende Aktivitäten in Bier zu messen. Diese sind in diversen Veröffentlichungen dargestellt (5, 14, 15, 16, 19).

Es soll im Folgenden auf Erfahrungen mit der Radikalmessung mittels ESR eingegangen werden, da immer mehr Labors ein ESR für die Betriebskontrolle in der Brauerei verwenden. Bisher war es schwierig, die Vergleichbarkeit der Analytik zu gewährleisten. Es zeigt sich jedoch, dass diese verbessert werden kann, wenn die Anwendung in den Labors vereinheitlicht wird.

Die Radikalmessung mittels ESR

Die Radikalmessung wird mittels Spin-Trap Technik (N-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN)) am ESR (JEOL Ltd. JES-FR 30, Japan und BRUKER e-scan, Germany) durchgeführt. Als Standard dient beim JES-FR 30 ein Marker (Mn^{2+}), bei dem e-scan 4-Hydroxy-TEMPO (100 μ M, Aldrich). Die Responsewerte werden auf den Standard bezogen und als Relativwerte angegeben. Da zwei unterschiedliche Geräte verwendet werden, unterscheiden sich die aufgenommenen relativen Responsewerte in den Abbildungen.

Oxidativer Forciertest

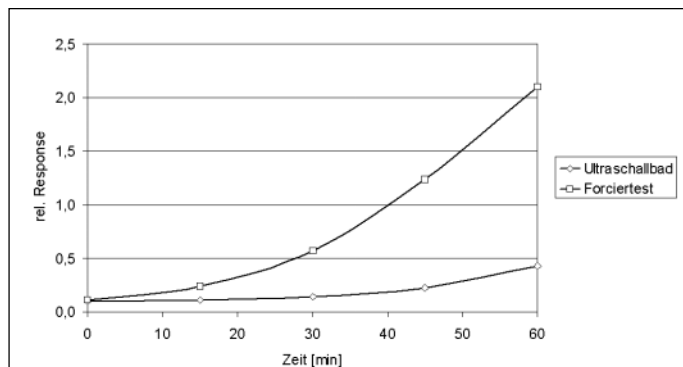
Den Proben (Bier, Würze und Modelllösung) wird das Spin-Trap Reagenz N-tert-butyl- α -phenylnitron (2,55 M) zugegeben. Die Endkonzentration beträgt 0,05 M (100 μ l PBN auf 5 ml Probe). Die Proben werden dann bei 60 °C einem oxidativen Forciertest unterzogen. Ob die Probengläser offen oder geschlossen sind, hat auf die Messergebnisse keinen Einfluss.

Einfluss der Probenvorbereitung auf die Radikalentstehung

Um Bierproben für die Messung vorzubereiten, werden diese im Ultraschallbad entkohlensäuert. Dabei wurde kein Einfluss auf die Radikalentstehung festgestellt (Abb. 1). Der Anstieg des Graphen nach 40 Minuten ist mit dem Erwärmen des Wassers im Ultraschallbad auf etwa 30 °C zu erklären.

Trübe Proben wie Würze und Jungbier werden zentrifugiert. Das zusätzliche Filtrieren dieser Proben über einen Faltenfilter führt zu einer gesteigerten Radikalentstehung während der Messung.

Der Extraktgehalt hat ganz allgemein einen Einfluss auf die antiradikalische Aktivität der Probe. Dies ist bei einem Vergleich von Würzen (Stammwürzegehalt), aber auch von unterschiedlichen Biersorten (Alkoholfrei, Leichtbier, Vollbier, Starkbier) zu berücksichtigen.

**Abb. 1 Radikalentstehung im Ultraschallbad im Vergleich zum oxidativen Forciertest**

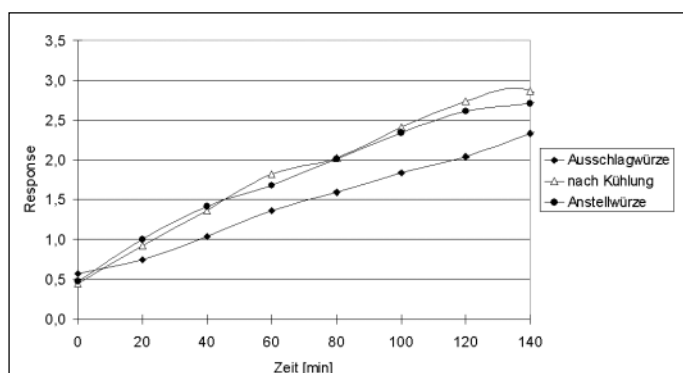
Radikalmessung im Sudhaus

Im Sudhaus konnte keine Veränderung in der Radikalentstehung zwischen Pfannevoll- und Ausschlagwürze erkannt werden. Die Heißtrubabtrennung im Whirlpool dagegen führt zu einer Steigerung der Radikalentstehung (Abb. 2) und damit zu einer Abnahme der antiradikalischen Aktivität. Eine verlängerte Heißhaltezeit im Whirlpool zeigte im Gegensatz zu Takaoka et. al. (20) keinen messbaren Einfluss.

Die Gärung und der Einfluss von Schwefeldioxid auf die Radikalmessung

In der Würze lässt sich keine Lag-Time messen. Sie entsteht erst während der ersten Tage der Hauptgärung. Es zeigt sich, dass sie innerhalb eines Betriebes sehr gut mit dem Gehalt an Gesamtschwefeldioxid, das durch die Hefe produziert wird, korreliert. Verschiedene Hefevitalitäten und Führungen haben einen starken Einfluss auf den Gehalt an produziertem Schwefeldioxid. Durch eine angepasste Anstelltechnologie kann auf den Hefestoffwechsel großer Einfluss genommen werden. Somit ist es möglich, technologisch die Lag-Time Werte im Bier zu steigern (7).

Diese sehr gute Korrelation zwischen dem SO_2 -Gehalt und der Lag-Time zeigte sich allerdings nicht beim Vergleich von Bieren unterschiedlicher Brauereien. Ein Erklärungsansatz ist das unterschiedliche Verhältnis von freiem SO_2 zu Gesamt- SO_2 . Chemische Bindungen, z.B. mit Acetaldehyd, können aufgrund des Schwefelmetabolismus und Management der Hefe brauereispezifisch sein. Bisher wurde das Gesamt- SO_2 mit der Lag-Time verglichen. Versuche, nur das freie SO_2 gaschromatographisch zu

**Abb. 2 Verlauf der Radikalbildung im Sudhaus**

messen, führten tendenziell zu einer besseren Korrelation zwischen Brauereien.

Da obergärige Hefen kaum SO₂ produzieren, ist in den entsprechenden Bieren fast keine Lag-Time messbar (< 10 min). Die Werte für Gesamt-SO₂ liegen bei maximal 1,0 – 1,5 mg/l im frischen Bier.

Nach Andersen führt die Zudosage schwefelhaltiger Aminosäuren wie L-Cystein zu einem steileren Verlauf des Graphen nach der Lag-Time und somit zu einer vermehrten Radikalentstehung (2). Es konnte aber auch in Aqua bidest (mit 5 Vol. % EtOH) gezeigt werden, dass eine Steigerung der Konzentration an L-Cystein eine starke prooxidative Wirkung zur Folge hat (Abb. 3).

Allgemeiner Einfluss des Ethanolgehaltes auf die Radikalmessung

Das durch die Fenton-Reaktion entstehende Hydroxylradikal ist sehr reaktiv und kurzlebig. Noch bevor es mit dem Spin-Trap Reagenz PBN reagiert, geht es mit dem Ethanol eine Verbindung zum 1-Hydroxyethylradikal ein. Dies zeigt sich am aufgenommenen ESR-Spektrum des Spinadduktes. Im Gegensatz zum Hydroxylradikal ist der Einfluss des Kohlenstoffes aus dem Ethylrest klar zu erkennen (Abb. 4) (1, 18).

Durch die Zugabe von Ethanol zu Würze kann die Radikalentstehung pro Zeit deutlich gesteigert werden (Abb. 5). Da das PBN in Ethanol gelöst wird, ist grundsätzlich ein gewisser Ethanolgehalt in der zu messenden Probe enthalten. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Labors zu gewährleisten, sollte dieser zugeführte Ethanolgehalt gleich sein, da sonst Flächenauswertungen stark

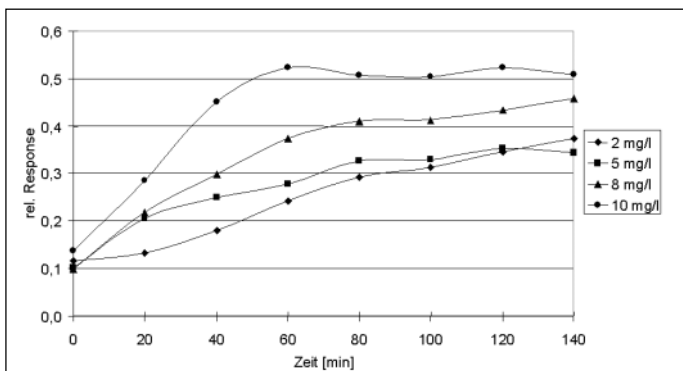


Abb. 3 Zugabe von L-Cystein in Aqua Bidest (5%-Vol EtOH)

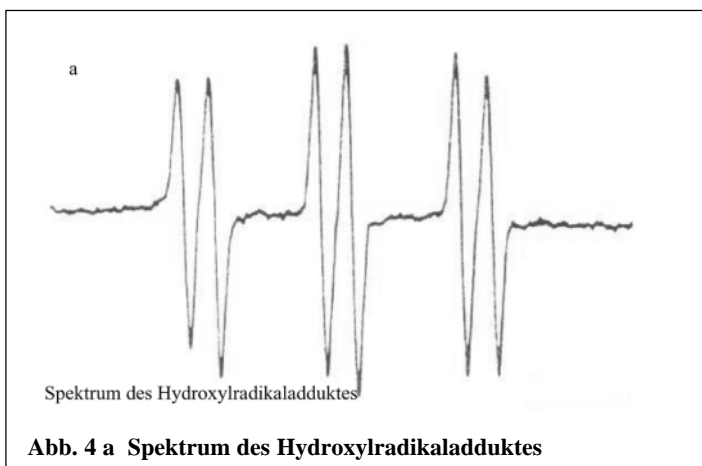


Abb. 4 a Spektrum des Hydroxylradikaladduktes

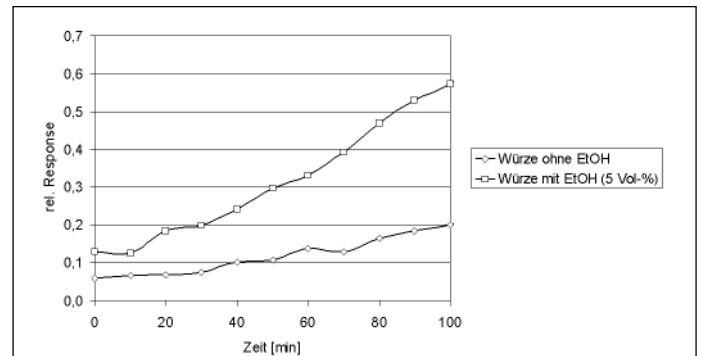


Abb. 5 Radikalentstehung in Würze (mit und ohne EtOH)

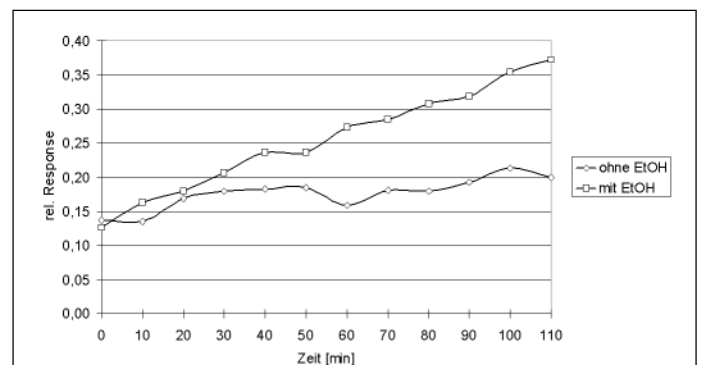


Abb. 6 Radikalentstehung in Würze (PBN in EtOH und H₂O gelöst)

differieren. Die Responsewerte zu bestimmten Zeiten würden auf unterschiedlichem Niveau liegen.

Wird das PBN nur in Wasser gelöst, zeigt sich ein sehr flacher Verlauf in Würze. Es entstehen fast keine Radikale in der gemessenen Zeit. Allein der Ethanolgehalt des Spin-Trap Reagenzes führt zu einem deutlichen Anstieg des Graphen (Abb. 6).

Einfluss des pH-Wertes, des Extraktgehaltes und des Ethanolgehaltes der Probe auf die Radikalmessung

Um den Einfluss einzelner Parameter wie pH-Wert, Extraktgehalt und Ethanolgehalt genauer zu prüfen, wurden Verdünnungsreihen von Bier angelegt.

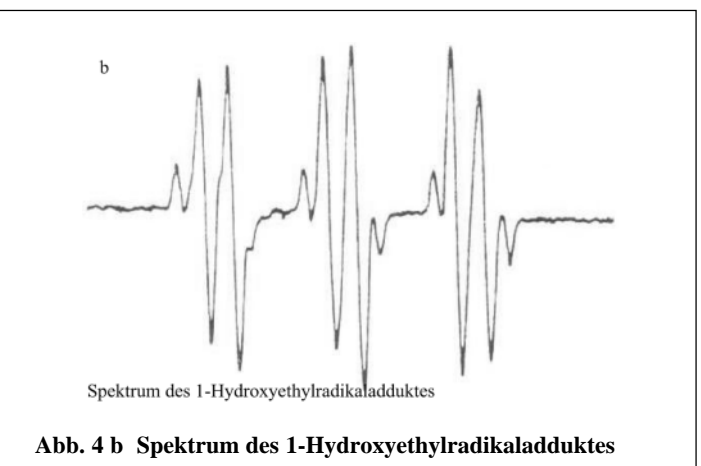


Abb. 4 b Spektrum des 1-Hydroxyethylradikaladduktes

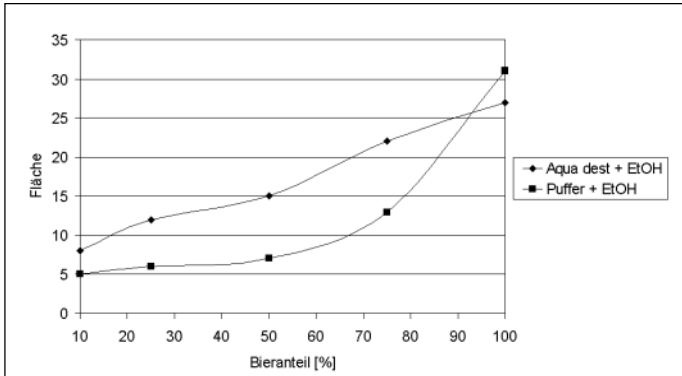


Abb. 7 Abnahme der Fläche unterhalb des Graphen nach der Verdünnung von Bier

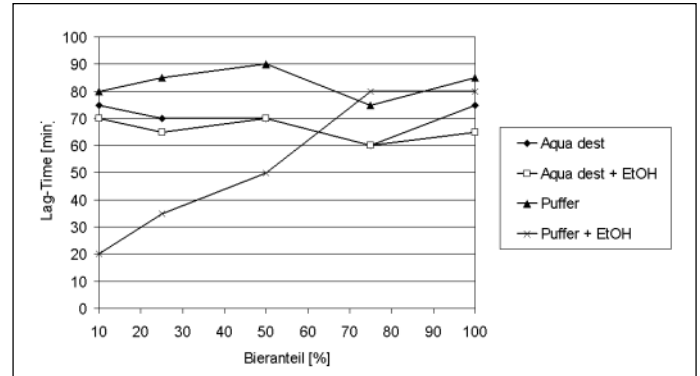


Abb. 8 Lag-Time nach der Verdünnung von Bier

Wird das Bier mit Aqua dest verdünnt, so zeigt sich kein Einfluss auf die Lag-Time, aber die Fläche unterhalb des Graphen nimmt fast linear mit der Verdünnung ab. Dies wurde auch von Uchida et. al. festgestellt. Er geht von einem Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Inhaltsstoffen im Bier aus. Dieses Gleichgewicht liegt auch bei einer großen Verdünnung noch vor und äußert sich in einer konstanten endogenen antioxidativen Aktivität (24). Die Abnahme der Fläche mit der Verdünnungsreihe ist auf die Verringerung von spezifisch reagierenden Substanzen, wie Polyphenole, aber auch unspezifisch reagierenden Bierinhaltsstoffen (Eiweiß, Aminosäuren, Dextrine und andere Extraktbestandteile) zurückzuführen.

Wird die Verdünnung mit einer 5 prozentig ethanolischen wässrigen Lösung durchgeführt, zeigt sich das gleiche Bild. Allerdings sind die Responsewerte etwas erhöht, was mit dem konstanten Ethanolgehalt und der Reaktion zum stabileren 1-Hydroxyethylradikal erklärt werden kann.

Wird mit einem Acetatpuffer (pH 4,3) verdünnt, so bleibt die Lag-Time gleich, die Fläche nimmt jedoch exponentiell ab (Abb. 7). Im Gegensatz zur Verdünnung mit Aqua dest bleibt der pH-Wert zu Beginn der Messung konstant.

Bei einer Verdünnungsreihe mit einem Acetatpuffer (pH 4,3), der auf 5 Vol. % Ethanol eingestellt ist, nimmt neben der Fläche auch die Lag-Time ab (Abb. 8). Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass aufgrund des konstanten Ausgangs-pH-Wertes die Radikalenstehung während des Forciertests bei allen Verdünnungsstufen ähnlich verläuft (siehe hierzu „Einfluss des pH-Wertes der Probe auf die Radikalmessung“). Der gleichbleibende Ethanolgehalt führt

offensichtlich zu so großen Mengen an 1-Hydroxyethylradikalen, dass dadurch die endogene antioxidative Aktivität (Lag-Time) abnimmt.

Messung von Radikalen vor und nach der Filtration

Die Lag-Time bleibt während der Filtration konstant, außer es kommt bei Umpumpvorgängen zu einer starken Sauerstoffaufnahme. Die Fläche unterhalb des Graphen erfährt dagegen am Filter eine starke Vergrößerung (Abb. 9).

Bei spezieller Untersuchung der Filtration mit Kieselgur bleibt die Lag-Time im Vergleich zur 0-Probe gleich. Der Anstieg des Graphen beginnt ein wenig früher, aber der „Knick“ verläuft flacher. Die Fläche unterhalb des Graphen nimmt um fast 25% zu (Abb. 10). Uchida et. al. begründet dies unter anderem mit einer Zufuhr an prooxidativen Substanzen, wie Eisenionen. Entsprechend sind die Kurvenverläufe bei verschiedenen Kieselgurprodukten voneinander abweichend (25). Eigene Untersuchungen zeigten allerdings keinen Unterschied zwischen verschiedenen Kieselgurdosagemengen (50, 80, 100 und 120 g/hl) in Bier. Auch die Filtration mit organischem Material (z.B. Cellulose) zeigte deutliche Unterschiede in der Radikalenstehung zwischen dem Unfiltrat und Filtrat (Abb. 11).

Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen sehr deutlich, dass der Entzug phenolischer Substanzen zu einer Vergrößerung der Fläche führt. In Tabelle 2 sind die zugehörigen Gehalte an Polyphenolen dargestellt. Mit Abnahme der Polyphenolfractionen ergibt sich ein steilerer Verlauf des Graphen, während die Lag-Time der Biere nahezu gleich ist.

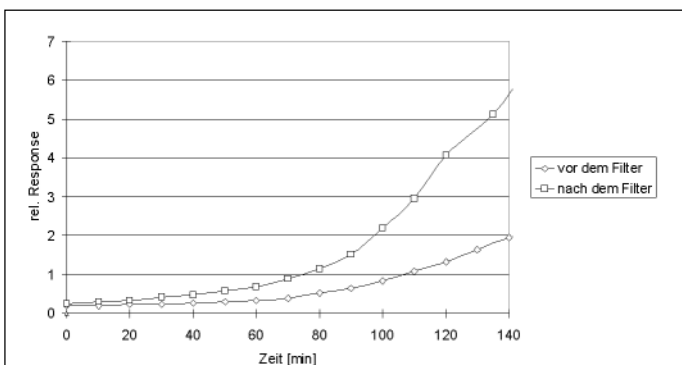


Abb. 9 Verlauf der Radikalbildung vor und nach dem Filter

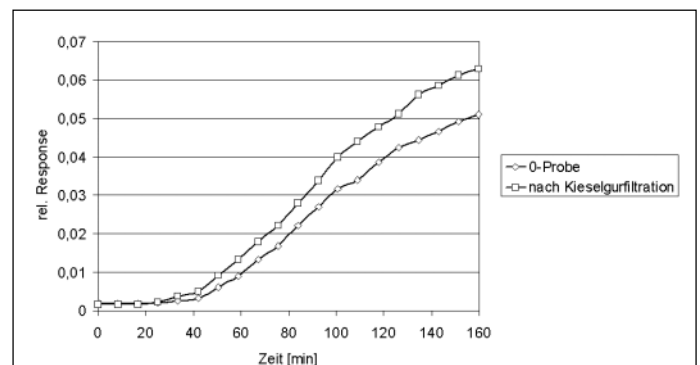


Abb. 10 Radikalentstehung nach Kieselgurfiltration von Bier

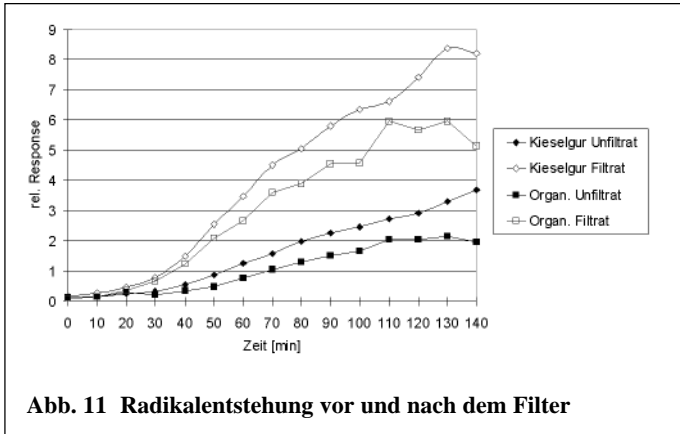


Abb. 11 Radikalentstehung vor und nach dem Filter

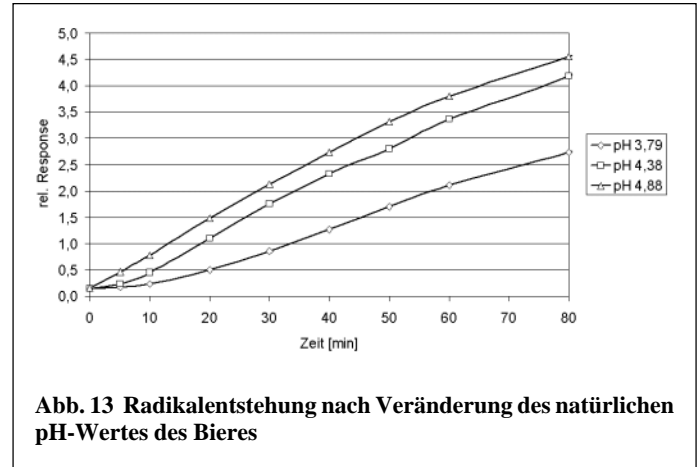


Abb. 13 Radikalentstehung nach Veränderung des natürlichen pH-Wertes des Bieres

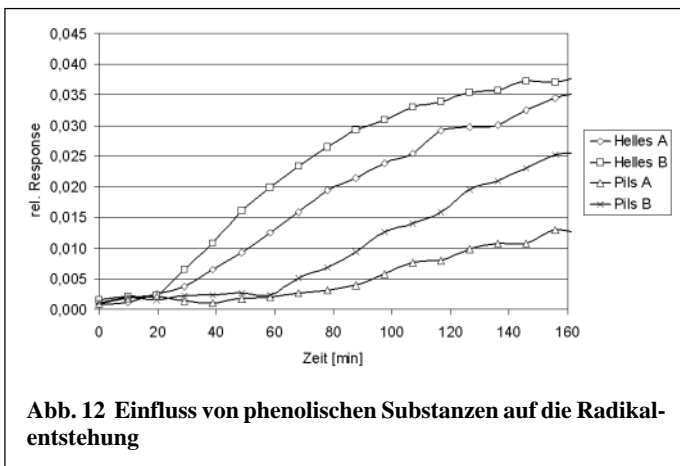


Abb. 12 Einfluss von phenolischen Substanzen auf die Radikalentstehung

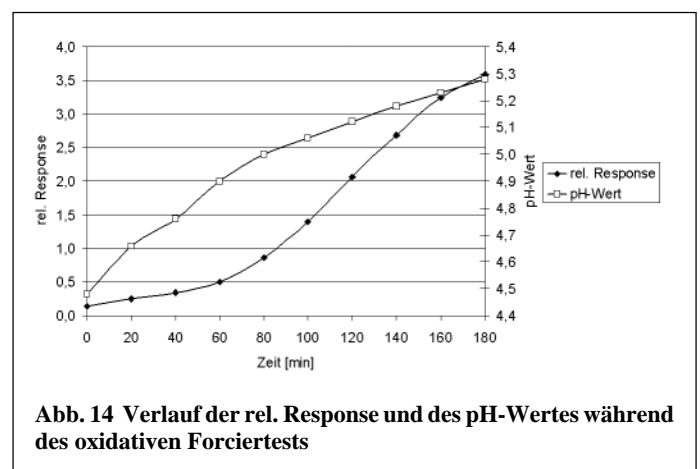


Abb. 14 Verlauf der rel. Response und des pH-Wertes während des oxidativen Forciertests

Tabelle 2 Gehalte an phenolischen Substanzen in den gemessenen Bieren

	Helles A	Helles B	Pils A	Pils B
Lag-Time (min)	24	19	58	59
Gesamtpolyphenole (mg/l)	192	105	122	36
Anthocyanogene (mg/l)	64	32	34	12
Tannoinde (mg/l)	44	0	16,2	0

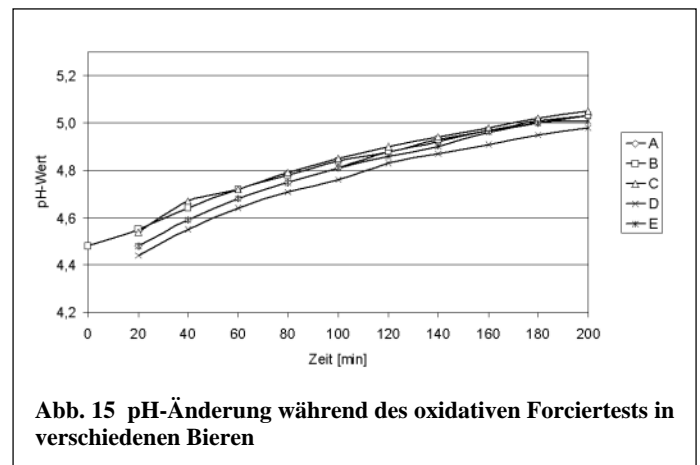


Abb. 15 pH-Änderung während des oxidativen Forciertests in verschiedenen Bieren

Einfluss des pH-Wertes der Probe auf die Radikalmessung

Untersuchungen zeigten, dass durch die nachträgliche Erhöhung des pH-Wertes des Bieres dessen Lag-Time erniedrigt wird, während eine Absenkung des pH-Wertes zu einer Steigerung der Lag-Time führt (Abb. 13). Dies hängt mit einer Veränderung der natürlichen Pufferungsverhältnisse im Bier zusammen. Dagegen müssen Biere mit einem ursprünglich höheren pH-Wert nicht eine schlechtere Lag-Time besitzen als Biere mit einem niedrigeren pH-Wert. Kaneda et.al. (12) schreibt, dass ein niedriger pH-Wert während des gesamten Brauprozesses sich positiv auf die Geschmacksstabilität des Bieres auswirkt.

Wird der pH-Wert während des forcierten Oxidationstests verfolgt, so zeigt sich, dass dieser um fast 1,0 auf über 5,0 in etwa 3 Stunden ansteigt (Abb. 14). Je höher der Ausgangswert ist, umso höher ist auch der Endwert. Die Verläufe sind nahezu parallel (Abb. 15). Es zeigte sich bisher kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Überschreiten eines bestimmten pH-Wertes und den gemessenen Lag-Time Werten.

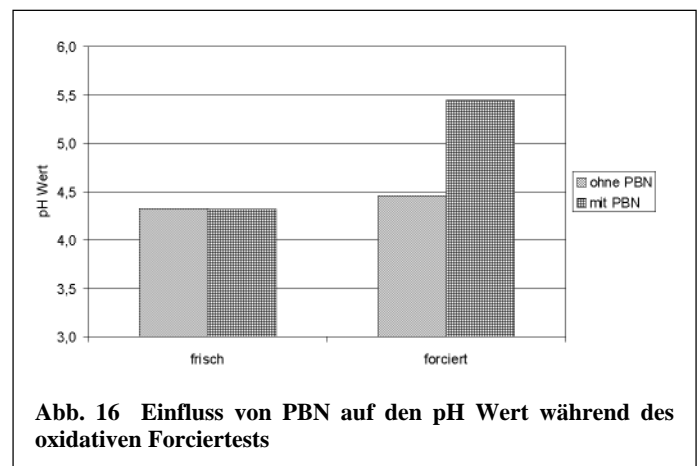


Abb. 16 Einfluss von PBN auf den pH Wert während des oxidativen Forciertests

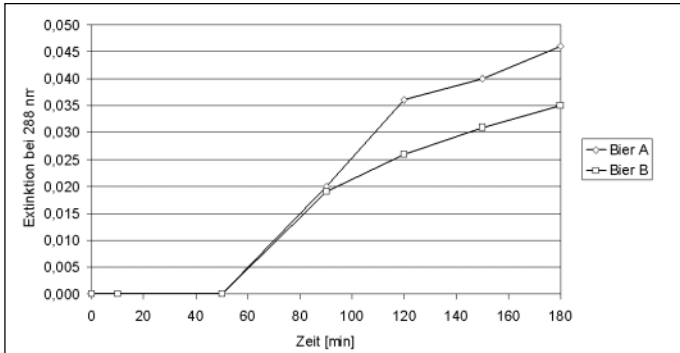


Abb. 17 Extinktion bei 288 nm während des oxidativen Forciertests

Dieser pH-Anstieg hängt mit dem Spin-Trap Reagenz PBN zusammen (Abb. 16). Eine mögliche Erklärung ist die Hydrolyse des PBN-Adduktes zu einem Aldehyd. Dies ist in diesem Fall das Benzaldehyd (9, 13, 17), wofür der marzipanähnliche Geruch der Probe nach dem oxidativen Forciertest spricht. Die Zunahme der Extinktion bei $\lambda=288$ nm während des Tests ist ein weiterer Hinweis (Abb. 17). Laut Okhuma et. al. (17) besitzt zwar auch das PBN bei dieser Wellenlänge ein Extinktionsmaximum. In der frischen Probe konnte dieses jedoch nicht gemessen werden. Erst während des Erhitzens nimmt dieses Maximum zu und kann mit dem entstehenden Aldehyd in Verbindung gebracht werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch die Entstehung des Hydroxylradikals vom pH-Wert abhängt. Bishop et. al. (4) zeigt, dass die Hydroxylradikalgenerierung zwischen pH 3 und 4 am geringsten ist. Er begründet dies damit, dass in diesem Bereich Eisenionen komplex gebunden vorliegen und somit nicht katalytisch an der Radikalentstehung beteiligt sind (4). Zwischen pH 4 und 6 zeigt sich hingegen ein starker Anstieg in der Radikalgenerierung (4). Es könnte gefolgert werden, dass während des Forciertests der pH-Wert und parallel die Radikalentstehung stetig zunimmt, was sich in der Steigung des Graphen am ESR widerspiegelt.

Eine Absenkung des pH-Wertes auf den Ausgangswert nach dem Forciertest führt zu einer Verringerung des Responsewertes, der daraufhin wieder ansteigt (Abb. 18). Dies kann damit erklärt werden, dass das Gleichgewicht zwischen freiem SO_2 und Sulfid auf die Seite des Schwefeldioxides verschoben wird. Der ursprüngliche Wert wird wahrscheinlich aufgrund des inzwischen

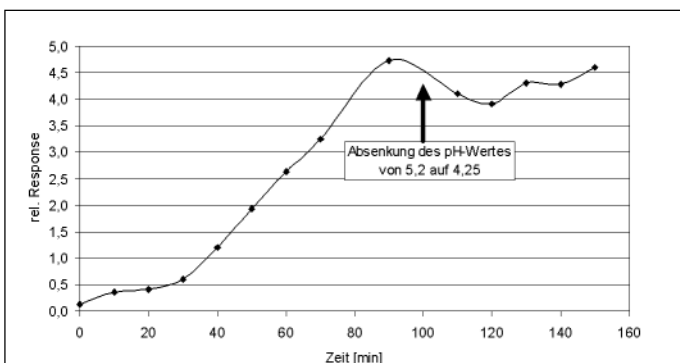


Abb. 18 Absenkung des pH-Wertes nach dem oxidativen Forciertest

verbrauchten SO_2 -Anteils nicht mehr erreicht. Aber es sollte auch in diesem Fall die pH-Wert-Abhängigkeit der Hydroxylradikalentstehung berücksichtigt werden.

Zusammenfassung

Auf die Radikalmessung mittels ESR zeigen sich viele Einflussfaktoren, wie der pH-Wert, der Ethanolgehalt, aber auch der Extraktgehalt der Probe. Es sollte daher eine einheitliche Vorgehensweise bei der Probenvorbereitung (Entkohlensäuern, EtOH-Gehalt im PBN, PBN-Konzentration im Bier, PBN-Dosage, Auswertung mit oder ohne Standard) angestrebt werden.

Nach der Hauptgärung ist der maximale Gehalt an Schwefeldioxid erreicht. Er sinkt nur, falls es im Lagerbereich zu einer starken Sauerstoffaufnahme kommt. Dies könnte auftreten, wenn sich die Hefe bereits abgesetzt hat oder in den Leitungen vom Lager- zum Filterkeller.

Es empfiehlt sich schon vor dem Filter die Lag-Time zu bestimmen. Durch Kieselgur kann die antiradikalische Aktivität gesenkt werden. Die Stabilisierung mit PVPP wirkt sich deutlich auf die Abnahme der Gehalte an phenolischen Substanzen aus. Dies führt zu schlechteren Ergebnissen bei der Analyse. Zudem wird das natürliche Gleichgewicht der Bierinhaltsstoffe gestört.

Die Korrelation der Lag-Time mit dem Gesamt- SO_2 Gehalt zeigt sich hauptsächlich innerhalb einer Brauerei. Da ausschließlich das freie SO_2 antioxidative Wirkung besitzt, ist es wichtig, wie das Verhältnis zwischen SO_2 und Sulfid ist. Durch die Verschiebung des pH-Wertes während des oxidativen Forciertests verlagert sich das Gleichgewicht auf die Seite des Sulfits bis kaum noch freies SO_2 vorhanden ist. Die Lag-Time spiegelt womöglich dieses Gleichgewicht wieder. Der anschließende Verlauf des Graphen steht im Zusammenhang mit einem allgemeinem Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Substanzen, wie zum Beispiel Polyphenole. Eine weitere Möglichkeit ist die Zunahme der Hydroxylradikalentstehung mit der Erhöhung des pH-Wertes während des Forciertests.

Es ist davon auszugehen, dass ein niedriger pH-Wert im Bier, sowie ein hoher Gehalt an freiem SO_2 die Lag-Time und damit die Geschmacksstabilität fördert.

Wir bedanken uns bei der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. und AIF Otto von Guericke e.V. (AIF 12605) und der Firma Bruker BioSpin GmbH für ihre Unterstützung.

Summary

Franz, O., and Back, W.: Experiences in measuring free radicals using electro spin resonance spectrometry in the brewery — Monatschrift für Brauwissenschaft 55, No 7/8, 156 – 162, 2002

BC 25 Beer

It is possible to detect free radicals in both wort and beer by means of electro spin resonance spectroscopy (ESR). These radicals are involved in oxidative reactions and thus in staling processes in beer. The lag time, which is determined by ESR, demonstrates the endogenous antioxidant activity of beer. It shows a distinct correlation to the expected flavour stability. Despite the relatively simple application of ESR, there are several factors to consider in order to obtain reproducible analysis results,

which are comparable between different beer laboratories. Therefore, the extract content, pH and ethanol content of the sample play an important role. Especially when measuring in wort, it is paramount to know these factors. Since the number of laboratories using ESR for operations control increases, subsequently the experiences of the Chair for Brewery Technology I are being shown. In the long run it makes sense to agree on one procedure for preparing samples and evaluation of the measurement to be able to compare the results.

Franz, O., et Back, W.: Détermination de radicaux libres en brasserie par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No 7/8, 156 – 162, 2002

BC 25 Bière

Il est possible de détecter à l'aide de la spectroscopie résonance paramagnétique électronique (RPE) les radicaux libres dans le moût et la bière. Ces radicaux prennent naissance dans les réactions d'oxydation et par conséquent dans les phénomènes de vieillissement des bières. Le « Lag-time » déterminé par la RPE, représente l'activité anti-oxydante endogène de la bière. Il montre une bonne relation avec la stabilité de flaveur attendue. Malgré une utilisation relativement simple de la RPE, il y a des facteurs d'influence dont il faut tenir compte dans le but d'obtenir des résultats reproductibles entre laboratoires brassicoles. Les facteurs qui jouent un rôle important sont : la teneur en extrait, la valeur du pH et la teneur en éthanol. Pour l'exploitation des résultats du moût, il est important de connaître ces influences. Etant donné que le nombre de laboratoires qui utilisent la RPE dans le contrôle de fabrication augmentent on présente l'expérience par la Chaire de technologie brassicole I, faite par cette technique de détermination. Il est souhaitable dans le futur d'effectuer un schéma d'expérimentation pour la préparation d'échantillons et pour l'exploitation des mesures dans le but de pouvoir comparer les résultats.

Literatur

1. Andersen, M., Outtrop, H., und Skibsted, L.: „Potential Antioxidants in Beer Assessed by ESR Spin Trapping“, J. Agric. Food Chem. **48**, 3106 – 3111, 2000.
2. Andersen, M., und Skibsted, L.: „Electron Spin Resonance Spin Trapping Identification of Radicals Formed during Aerobic Forced Aging of Beer“, J. Agric. Food Chem. **46**, 1272 – 1275, 1998.
3. Back, W., Franz, O., und Nakamura, T.: „Das antioxidative Potenzial von Bier“, Brauwelt **141**, 209 – 215, 2001.
4. Bishop, D., Stern, G. Fleischman, M. und Marshall, L.: „Hydrogen Peroxide Catalytic Oxidation of Refractory Organics in Municipal Waste Waters“, Vol. 7, 110 – 117, 1968.
5. Bößendörfer, G., Birkenstock, B., und Thalacker, R.: „Ein Beitrag zur Geschmacksstabilität des Bieres“, Brauwelt **141**, 1042 – 1047, 2001.
6. Forster, C., Schwieger, J., Narziß, L., Back, W., Uchida, M., Ono, M., und Yanagi, K.: „Untersuchungen zur Geschmacksstabilität von Bier mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie freier Radikale“, Monatsschrift für Brauwissenschaft **52**, 86 – 93, 1999.
7. Forster, C., und Back, W.: „Untersuchungen über den Einfluß der Anstell- und Befüllungstechnik zylindrokonischer Gärtanks auf die antioxidative Aktivität von Bier.“, Proc. Congr. Eur. Brew. Conv., 1999.
8. Franz, O., und Back, W.: „DPPH-scavenging activity of beer and polyphenols measured by ESR“, Proc. Congr. Eur. Brew. Conv., 2001.

9. Janzen, E., Kotake, Y., und Hinton, R.: „Stabilities of Hydroxyl Radical Spin Adducts of PBN-Type Spin Traps“, Free Radical Biology & Medicine **12**, 169 – 173, 1992.
10. Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Ramarathnam, N., Kawakishi, S., und Kamada, K.: „Detection of Free Radicals in Beer Oxidation“, Journal of Food Science **53**, 885 – 888, 1988.
11. Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., und Kamada, K.: „The Role of Free Radicals in Beer Oxidation“, J. Am. Soc. Brew. Chem. **47**, 49 – 53, 1989.
12. Kaneda, H., Takashio, M., und Tamaki, T.: „Influence Of pH On Flavour Staling During Beer Storage.“, J. Inst. Brew. **103**, 21 – 23, 1997.
13. Kotake, Y., und Janzen, E.: „Decay and Fate of the Hydroxyl Radical Adduct of α -Phenyl-N-tert-butyl nitron in Aqueous Media“, J. Am. Chem. Soc. **113**, 9503 – 9506, 1991.
14. Moll, M.: „Determination of antioxidants in brewing“, Monatsschrift für Brauwissenschaft **54**, 1/2, 28 – 32, 2001.
15. Moll, M.: „Determination of antioxidants in brewing“, Monatsschrift für Brauwissenschaft **54**, 3/4, 64 – 69, 2001.
16. Nakamura, T., Franz, O., und Back, W.: „pH dependence of radical scavenging activity of polyphenols, phenolic acid and sulfite“, Proc. Congr. Eur. Brew. Conv., 2001.
17. Ohkuma, T., Kirino, Y., und Kwan, T.: „Some Physicochemical Properties of 2-Methyl-2-nitrosopropane, Phenyl N-tert-Butyl Nitron, 5,5-Dimethylpyrroline-N-oxide, and 2,5,5-Trimethyl-pyrroline-N-oxide and the Feasibility of their Use as Spin Traps in Aqueous Solution.“ Chem. Phar. Bull. **29**, (1), 25 – 28, 1981.
18. Reinke, L., Kotake, Y., McCay, P., und Janzen, E.: „Spin-Trapping Studies of Hepatic Free Radicals Formed Following the Acute Administration of Ethanol to Rats: In Vivo Detection of 1-Hydroxyethyl Radicals with PBN“, Free Radical Biology & Medicine **11**, 31 – 39, 1991.
19. Stasko, A., Rapta, P., und Malík, F.: „Charakterisierung der Bierstabilität mit Hilfe von Radikalfängern (eine EPR-Studie)“, Monatsschrift für Brauwissenschaft **53**, 1/2, 4 – 7, 2000.
20. Takaoka, S., Kondo, H., Uchida, M., und Kawasaki, Y.: „Improvement of Beer Flavor Stability by Applying ESR Method to Industrial Plant.“, Technical Quarterly **35**, (3), 157 – 161, 1998.
21. Torline, P., und Grimmer, H.: „Is Long Shelf-Life Beer Possible?“, Inst. & Guild of Brew. Africa Sect. (Proc. 8th Brewing Convention), 2001.
22. Uchida, M., und Ono, M.: „Improvement for Oxidation Flavor Stability of Beer – Role of OH-Radical in Beer Oxidation“, J. Am. Soc. Brew. Chem. **54**, (4), 198 – 204, 1996.
23. Uchida, M. Suga, S., und 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), 205 – 211, 1996.
24. Uchida, M. und Ono, M.: „Technological Approach to Improve Beer Flavor Stability: Analysis of the Effect of Brewing Process on Beer Flavor Stability by the Electron Spin Resonance Method“, J. Am. Soc. Brew. Chem. **58**, 8 – 13, 2000.
25. Uchida, M. und Ono, M.: „Technological Approach to Improve Beer Flavor Stability: Adjustments of Wort Aeration in Modern Fermentation Systems Using the Electron Spin Resonance Method“, J. Am. Soc. Brew. Chem. **58**, 30 – 37, 2000.

(Manuskripteingang: 17. 6. 2002)