

A. Staško, P. Rapta und F. Malik

# Charakterisierung der Bierstabilität mit Hilfe von Radikalfängern (eine EPR-Studie)

Die Bierstabilität wurde mit Hilfe einer neueren Methode untersucht, die auf den Radikalmechanismen der Alterung beruht. Die Alterung wird bei 60 °C beschleunigt und der Zusammenbruch der Stabilität durch ein rasches Anwachsen der Radikalkonzentration mit Hilfe von Radikalfängern im EPR-Spektrometer verfolgt. Die Länge der Induktionsperiode bei der Radikalbildung ist ein Maß für die Haltbarkeit. Die vorgestellte Methode ermöglicht einen schnellen Vergleich und eine Voraussage der Stabilität der untersuchten Bierproben.

BC 3 Chemisch-technische Brauereibetriebskontrolle/ 36 Bier

(Descriptor: Bierstabilität, Radikalreaktionen, EPR).

Descriptors: beer stability, radical reactions, EPR).

## 1 Einleitung

Mit den wachsenden Ansprüchen an die Qualität und Haltbarkeit von Lebensmitteln orientiert sich die Forschung in wachsendem Masse an den Alterungsprozessen dieser Waren. Die Lagerfähigkeit von Lebensmitteln wird vor allem durch die Temperatur, durch Licht und durch den Luftsauerstoff beeinflusst. In der Literatur sind zahlreiche Hinweise zu finden, die auf Radikalmechanismen solcher Prozesse hinweisen. Unter der Voraussetzung, daß die oben genannten Parameter die Radikalreaktionen bei der Alterung initiieren, wurde eine neue Methode zur Charakterisierung der Bierstabilität entwickelt (1 – 6), welche es erlaubt, die Haltbarkeit zeitlich zu verfolgen und entsprechende Voraussagen zu treffen.

Die stationäre Radikalkonzentration bei der Bieralterung unter Normalbedingungen (ohne Luftzutritt, im Dunkeln, bei Raumtemperatur) ist sehr niedrig und experimentell nicht zugänglich. Um die Alterungsprozesse für die Versuche auf eine annehmbare Länge zu verkürzen, werden die Untersuchungen bei erhöhter Temperatur (z.B. bei 60 °C) durchgeführt. Zum Studium der Radikalprozesse ist die EPR (Paramagnetische Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie) sehr gut geeignet. Trotz der hohen Empfindlichkeit dieser Methode (Konzentrationsbereiche bis zu 10<sup>-8</sup> Mol) sind besondere Techniken notwendig, da die stationären Radikalkonzentrationen auch bei der thermisch erzwungenen Alterung unter der Nachweisgrenze liegen. Es wird deshalb eine Nachweismethode mit Radikalfängern angewendet (Spin-Trap-Technik). Der Fänger ist eine nicht-radikalische Substanz (folglich hat er kein EPR-Spektrum). Nach dem Abfangen eines reaktiven Radikals R<sup>•</sup> wandelt sich das Radikalfänger-Molekül in ein Radikaladdukt um und zeigt ein charakteristisches EPR-Spektrum. Wir haben als Radikalfänger α-Phenyl-t-butyl-nitron

(PBN) verwendet. Den Additionsverlauf und das so erhaltene EPR-Spektrum des R-PBN<sup>•</sup> Adduktes gibt Abb. 1 wieder.

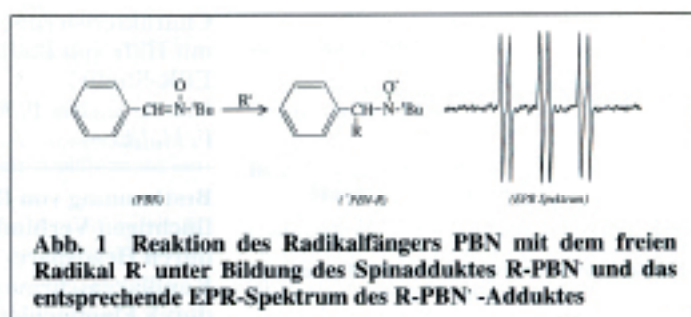


Abb. 1 Reaktion des Radikalfängers PBN mit dem freien Radikal R<sup>•</sup> unter Bildung des Spinadduktes R-PBN<sup>•</sup> und das entsprechende EPR-Spektrum des R-PBN<sup>•</sup>-Adduktes

Die Änderung der Intensität des EPR-Spektrums mit der Zeit während der thermisch erzwungenen Alterung ermöglicht die Beurteilung der Bierstabilität. Es wird angenommen, daß vor allem der Luftsauerstoff und seine Folgeprodukte (z.B. OH-Radikale Lit (2)) zu Oxidationsreaktionen und somit zur Bildung von unerwünschten Produkten führen, welche die Eigenschaften verschlechtern und die Haltbarkeit verringern.

Ein typischer Verlauf so eines Prozesses, der mit Hilfe der EPR-Spin-Trap-Technik bei 60 °C verfolgt wurde, ist in der Abb. 2

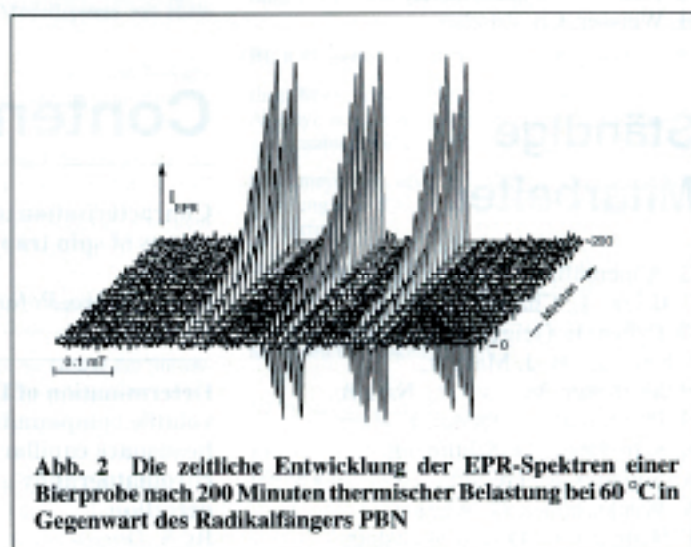


Abb. 2 Die zeitliche Entwicklung der EPR-Spektren einer Bierprobe nach 200 Minuten thermischer Belastung bei 60 °C in Gegenwart des Radikalfängers PBN

Autoren: Prof. Andrej Staško, DrSc., und Ing. Dr. Peter Rapta, Lehrstuhl für physikalische Chemie, Prof. Fedor Malik, DrSc., Lehrstuhl für biochemische Technologie, Slowakische Technische Universität, SK-812 37 Bratislava, Slowakische Republik

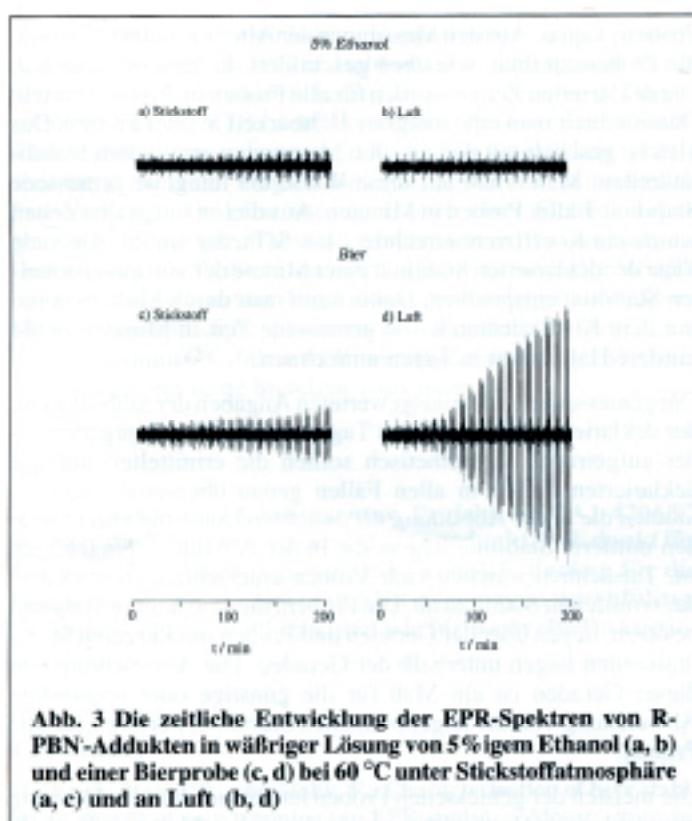


Abb. 3 Die zeitliche Entwicklung der EPR-Spektren von R-PBN-Addukten in wässriger Lösung von 5% iger Ethanol (a, b) und einer Bierprobe (c, d) bei 60 °C unter Stickstoffatmosphäre (a, c) und an Luft (b, d)

dargestellt. Jede Biersorte hat eine eigene Antioxidationskapazität, die bis zu einem gewissen Grad, d.h. während eines bestimmten Zeitraums, imstande ist, die entstandenen reaktiven Radikale  $R^{\cdot}$  abzufangen. Deshalb sehen wir im Anfangsstadium der thermischen Alterung keine oder nur kleine Konzentrationen der Radikaladdukte. Nach einer gewissen Zeit (je nach Bierqualität) sind die im Bier vorhandenen Antioxidantien verbraucht und können die entstehenden Radikale  $R^{\cdot}$  nicht mehr abfangen. Diese gelangen dann zum Spintrap PBN und bilden Addukte R-PBN. So kommt es zu einem dramatischen Anstieg der Adduktkonzentrationen, der sich in einem entsprechenden Anstieg der Intensität der EPR-Spektren äußert. Die Zeitspanne, in welcher das Bier aus eigener Antioxidationsreserve die Radikalbildung unterdrückt (d.h. die Probe behält ein EPR-Spektrum niedriger Intensität während der thermischen Alterung), ist ein Maß für die Bierstabilität.

## 2 Experimenteller Teil

### 2.1 Standardversuch

Um das überschüssige Kohlendioxid zu entfernen, werden 5 ml einer frisch geöffneten Bierprobe 5 Minuten bei einer Beschleunigung von 1000 g zentrifugiert. (Das Weglassen des Zentrifugierens ist jedoch bei den meisten Proben ohne Einfluß auf das Endergebnis). Zu 1 ml der zentrifugierten Probe werden 50  $\mu$ l 1 M PBN gelöst in Alkohol gegeben. Dann wird die Probe in eine EPR-Flachzelle gefüllt, in das EPR-Spektrometer gebracht und bei 60 °C temperiert. Die EPR-Spektren werden in Intervallen von 10 Minuten aufgenommen. Bevor die Messungen unter Stickstoff oder unter Luftatmosphäre ausgeführt wurden, waren die Proben 2 Minuten lang mit dem entsprechenden Gas gesättigt worden. Die Messungen wurden an einem EPR-Spektrometer EMX der Firma Bruker durchgeführt. Der Radikalfänger  $\alpha$ -Phenyl-t-butyl-nitron (PBN) war ein Produkt der

Sigma Chemicals USA. Als Bierproben wurden mehr als 20 verschiedene Biersorten Pilsner Art aus Deutschland und drei Sorten tschechischen Bieres verwendet. Das Datum der Messung und die angegebene Haltbarkeit der Biere wurden, wie weiter unten beschrieben, bei der Auswertung berücksichtigt.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Vergleich einer Bierprobe mit 5% iger wässriger Ethanollösung

Die in der Einleitung geäußerte Vorstellung, daß Bier Antioxidant-Eigenschaften besitzt und daß die Alterungsprozesse über Radikalreaktionen verlaufen, wird durch die Abb. 3 veranschaulicht. Wir haben als Referenzprobe eine wässrige 5% ige Ethanol-Lösung gewählt, die eigentlich die Basis des Bieres repräsentiert. Diese Lösung wird in Abb. 3 a, b in einem Versuch bei thermischer Alterung mit einer durchschnittlichen Bierprobe verglichen (Abb. 3 c, d). Die Messung wurde unter Stickstoff- (Abb. 3 a, c) und Luftatmosphäre (Abb. 3 b, d) durchgeführt. Die Abbildung zeigt die zeitliche Entwicklung der EPR-Spektren der einzelnen Proben bei 60 °C. Ohne eingehende Analyse ist bereits erkennbar, daß sich die Bierprobe (Abb. 3 c, d) durch eine viel höhere Aktivität der Radikale auszeichnet als die wässrige Ethanol-Lösung (Abb. 3 a, b). Dies äußert sich in einer größeren Intensität der entsprechenden EPR-Spektren. Aus der Abbildung ist auch ersichtlich, daß die Radikalreaktionen in der Bierprobe an Luft (Abb. 3 d) viel intensiver sind als unter Stickstoff (Abb. 3 c). Das ist auch ein Beweis dafür, daß der Sauerstoff in entscheidendem Maße die Radikalprozesse bei der Bieralterung beeinflusst und daß die verwendete Methode die Radikalprozesse bei der Bieralterung gut charakterisiert.

### 3.2 Merkmale der Proben mit unterschiedlicher Stabilität

Abb. 4 demonstriert die Merkmale von Proben mit unterschiedlicher Stabilität am Beispiel von vier Proben aus der Serie unserer

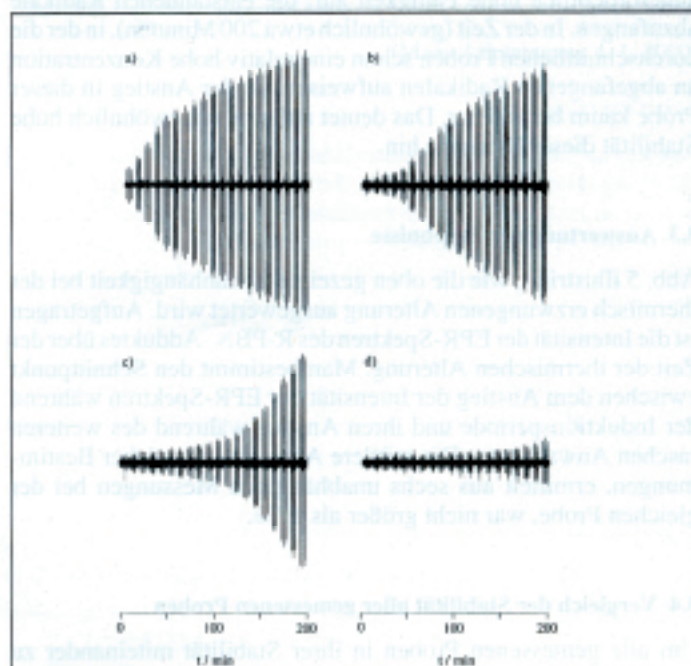


Abb. 4 Die zeitliche Entwicklung der EPR-Spektren von vier Bierproben verschiedener Stabilität bei 60 °C in Gegenwart des PBN-Radikalfängers

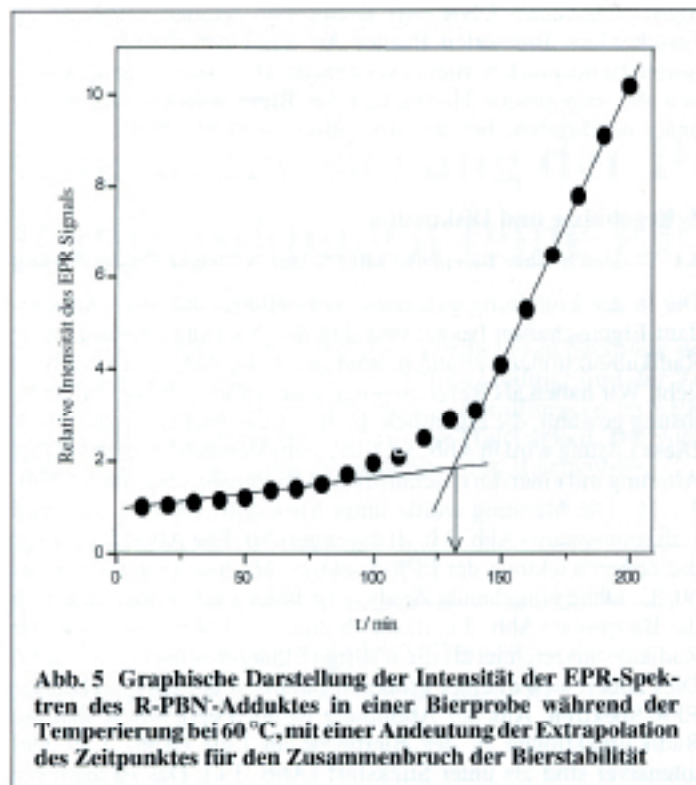


Abb. 5 Graphische Darstellung der Intensität der EPR-Spektren des R-PBN-Adduktes in einer Bierprobe während der Temperierung bei 60 °C, mit einer Andeutung der Extrapolation des Zeitpunktes für den Zusammenbruch der Bierstabilität

Messungen. Die erste Probe (Abb. 4 a) zeigt praktisch unmittelbar nach der Temperierung ein starkes Anwachsen der Radikalkonzentration ohne eine nennenswerte Induktionsperiode. Man sollte deshalb annehmen, daß die Probe bereits am Punkt des Stabilitätsverlustes angelangt ist. Eine bessere Stabilität deutet die zweite Probe in der Abb. 4 b an, bei der die Induktionsperiode des Zerfalls schon deutlich sichtbar ist. Noch deutlicher ist das bei der dritten Probe in Abb. 4 c zu sehen. Die vierte Probe in Abb. 4 d weist eine außerordentlich hohe Fähigkeit auf, die entstandenen Radikale abzufangen. In der Zeit (gewöhnlich etwa 200 Minuten), in der die durchschnittlichen Proben schon eine relativ hohe Konzentration an abgefangenen Radikalen aufweisen, ist der Anstieg in dieser Probe kaum bemerkbar. Das deutet auf eine ungewöhnlich hohe Stabilität dieser Biersorte hin.

3.3 Auswertung der Ergebnisse

Abb. 5 illustriert, wie die oben gezeigte Zeitabhängigkeit bei der thermisch erzwungenen Alterung ausgewertet wird. Aufgetragen ist die Intensität der EPR-Spektren des R-PBN-Adduktes über der Zeit der thermischen Alterung. Man bestimmt den Schnittpunkt zwischen dem Anstieg der Intensität der EPR-Spektren während der Induktionsperiode und ihren Anstieg während des weiteren raschen Anwachsens. Die mittlere Abweichung solcher Bestimmungen, ermittelt aus sechs unabhängigen Messungen bei der gleichen Probe, war nicht größer als ±7%.

3.4 Vergleich der Stabilität aller gemessenen Proben

Um alle gemessenen Proben in ihrer Stabilität miteinander zu vergleichen und zugleich auch das Datum der Messung sowie die von den Herstellern deklarierte Haltbarkeit zu berücksichtigen, wurde folgendes Verfahren gewählt. Aus dem Datum der Messung und aus der von den Herstellern angegebenen Haltbarkeit errechnet man die Dauer der noch zu erwartenden Stabilität der

Probe in Tagen. Aus den Messungen der Alterung bei 60 °C wurde die Probenstabilität, wie oben geschildert, in Minuten ermittelt. Die deklarierten Zeiten wurden für alle Proben in Tagen ermittelt. Damit erhielt man eine integrale Haltbarkeit S aller Proben. Das gleiche geschah mit den aus den Messungen ermittelten Stabilitätszeiten. Man erhält auf diese Weise die integrale gemessene Stabilität T aller Proben in Minuten. Aus diesen integralen Zeiten wurde ein Koeffizient errechnet ( $k = S/T$ ), der angibt, wie viele Tage der deklarierten Stabilität einer Minute der von uns ermittelten Stabilität entsprechen. Damit kann man durch Multiplizieren mit dem Koeffizienten k die gemessene Zeit in Minuten in die mittlere Haltbarkeit in Tagen umrechnen.

Die gemessenen und so ausgewerteten Angaben der Stabilität und der deklarierten Haltbarkeit in Tagen sind in Abb. 6 gegeneinander aufgetragen. Hypothetisch sollten die ermittelten und die deklarierten Zeiten in allen Fällen genau übereinstimmen, so müßten die in der Abbildung dargestellten Daten auf einer Geraden mittlerer Stabilität liegen, die in der Abbildung eingetragen ist. Tatsächlich weichen viele Proben unterschiedlich stark von der ermittelten Stabilität ab. Die Proben, die eine höhere Stabilität besitzen, liegen über der Geraden und Proben mit kürzeren Stabilitätszeiten liegen unterhalb der Geraden. Die Abweichung von dieser Geraden ist ein Maß für die günstige oder ungünstige Abweichung von der angenommenen Stabilität, normiert für alle Proben.

Die meisten der gemessenen Proben hatten zur Zeit der Messung eine deklarierte Haltbarkeit von vier bis sieben Monaten. Deshalb gruppieren sich die meisten Punkte entlang der Achse der deklarierten Haltbarkeit im Bereich von 150 bis 200 Tagen. Es gibt auch einzelne Proben mit einer höheren deklarierten Haltbarkeit (bis 300 Tage). Die Streuung der Proben entlang der Achse der gemessenen Stabilität ist zum Teil relativ groß und sollte mit der relativen Stabilität der Proben korrelieren. Das heißt aber nicht, daß alle Proben, die unterhalb der Geraden der durchschnittlich deklarierten Haltbarkeit liegen, die von den Herstellern ausgewie-

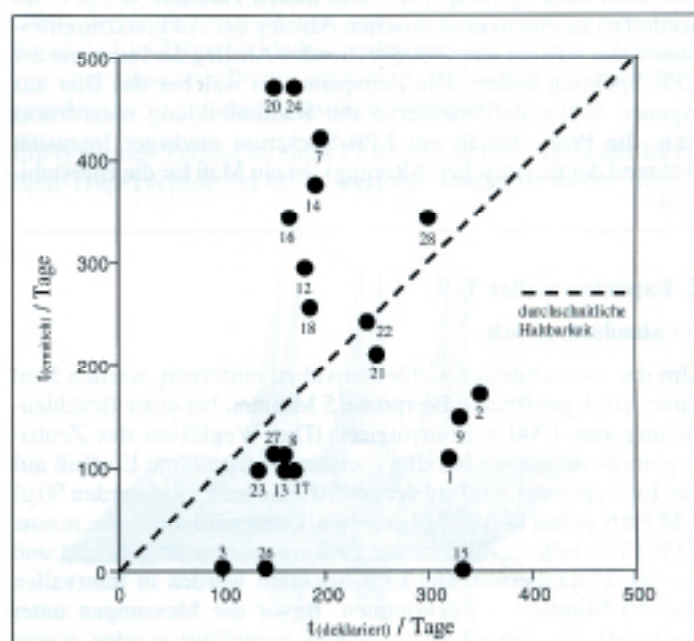


Abb. 6 Ein relativer Vergleich der Stabilität aller untersuchten Bierproben durch das Auftragen der gemessenen Stabilität gegen die deklarierte Haltbarkeit vom Hersteller

sene Haltbarkeit nicht einhalten. Einige Proben besitzen jedoch eine noch wesentlich höhere Haltbarkeit als angegeben. Somit heben sie die durchschnittliche Stabilität weit über die deklarierten Werte hinaus an. Die weniger haltbaren Proben zeigen demzufolge negative Abweichungen. Diese Auswertung ist damit relativ aber sie sollte gute Vergleichsmöglichkeiten der individuellen Proben bieten. Sie kann aber auch nach einer Eichung gegen genaue Referenzproben absolute Haltbarkeitswerte voraussagen. Gegenwärtig bleibt die Frage offen, inwieweit spezielle Verfahren oder Zusätze in der Bierproduktion die Ergebnisse dieser Methode wesentlich modifizieren. So haben wir z.B. festgestellt, daß mit Vitamin C stabilisierte Bierprodukte nach dieser Methode der Auswertung keine Stabilität vorweisen (6).

#### Dank

Der Slowakischen Grantagentur Projekt VEGA1-4206/97 wird für die finanzielle Unterstützung gedankt. P.R. dankt für das Humboldtstipendium und P.R. und A.S. danken für die Möglichkeit, im IFW Dresden EPR-Messungen durchführen zu können. Dr. A. Bartl möchten wir für wertvolle Diskussionen danken.

#### 4 Summary

Staško, A., Rapta, P., and Malík, F.: Characterisation of beer stability by means of spin trapping (an EPR study) — Monatschrift für Brauwissenschaft 53, No 1/2, 4 – 7, 2000

#### BC 3 Chemical and technical process control / 36 beer

The beer stability was investigated using a newly developed method based on the radical mechanisms of the deterioration processes. The deterioration is accelerated at 60 °C and the breakdown of the stability is indicated with a quick increase of radical concentration, which is followed by means of spin trapping agents in an EPR spectrometer. The induction period in radical formation is a criterion for the antioxidant activity and flavour stability. The method enables to obtain a rapid comparison and prediction of the stability of the investigated beer samples.

Staško, A., Rapta, P., et Malík, F.: Caractérisation de la stabilité de la bière à l'aide de capteurs de radicaux (une étude RPE) — Monatschrift für Brauwissenschaft 53, No 1/2, 4 – 7, 2000

#### BC 3 Contrôles physico-chimiques brassicoles/ 36 Bière

La stabilité de la bière a été évaluée à l'aide d'une nouvelle méthode basée sur les mécanismes radicalaires du vieillissement. Ce dernier a été accéléré à 60° C et la diminution de la stabilité a été suivie par l'accroissement rapide de la concentration des radicaux à l'aide de capteurs de radicaux au spectromètre RPE. La longueur de la période d'induction pour la formation des radicaux est une mesure de la stabilité. La méthode présentée permet une comparaison rapide et une prédiction de la stabilité des échantillons de bières examinés.

#### 5 Literatur

1. Kaneda, H., Kano, Y., Kamimura, M., Osava, T., Ramarathnam, N., Kawashi, S., and Kamada, K.: "Detection of free radicals in beer oxidation", *J. Food Sci.* 55, 885 – 888, 1988.
2. Uchida, M., and Ono, M.: "Improvement for Oxidative Flavor Stability of Beer – Role of OH-Radical in Beer Oxidation", *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 198 – 204, 1996.
3. Uchida, M., Suga, S., and 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, 205 – 211, 1996.
4. Tokaoka, S., Kondo, H., Uchida, M., and Kawasaki, Y.: "Improvement of Beer flavor Stability by Applying ESR Method to Industrial Plant", *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 35, 157 – 161, 1998.
5. Barr, D.: "Measuring Flavor Stability of Beer using the Bruker EMX Spectrometer" EPR Application Note, Bruker Report 1998.
6. Staško, A., Liptaková, M., Malík, F., and Mišik, V.: "Stabilita piva charakterizovaná pomocou lapačov radikálov", *Kvasny prum.* 45, 315 – 317, 1999.

(Manuskripteingang 4. 1. 2000)