

L. Narziß, H. Miedaner und S. Lustig

# Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Alterung des Bieres

Mittels multidimensionaler Gaschromatographie mit Massenspektrometrie konnten gegenüber den früheren Untersuchungen weitere Aromastoffe gefunden werden, die bei der Bieralterung eine signifikante Zunahme zeigten. Das detektierbare Aromastoffspektrum ließ sich den schon bekannten Alterungsindikatoren zuordnen. Darüberhinaus wurde eine Unterteilung in solche Substanzen vorgenommen, die zu Beginn der Bieralterung einen starken Anstieg zeigten und solchen, die erst im fortgeschrittenen Alterungsstadium eine erhöhte Konzentration aufwiesen. Erstere dienten der Berechnung des dimensionslosen „Forcierindex“; die letzteren wurden unter Einbeziehung von Streckeraldehyden und Furfural dem „Alterungsindex“ zugeordnet. Beim Verfolg der Bieralterung war naturgemäß eine Mehrung von Carbonylen zu verzeichnen, die aber durch (Gärungs-)SO<sub>2</sub> eine Abschwächung erfuhr. Auch sauerstoffheterocyclische Substanzen wie Furane und Furanone traten im gealterten Bier vermehrt auf. (E)-2-Nonenal konnte nicht als Leitkomponente für die Bieralterung bestätigt werden.

BC 25 Bier

(Descriptor: Haltbarkeit, Geschmacksstabilität, Bieralterung, Alterungskomponenten, Bieraroma.

Descriptors: shelf life, flavour stability, staling, staling compounds, beer flavour).

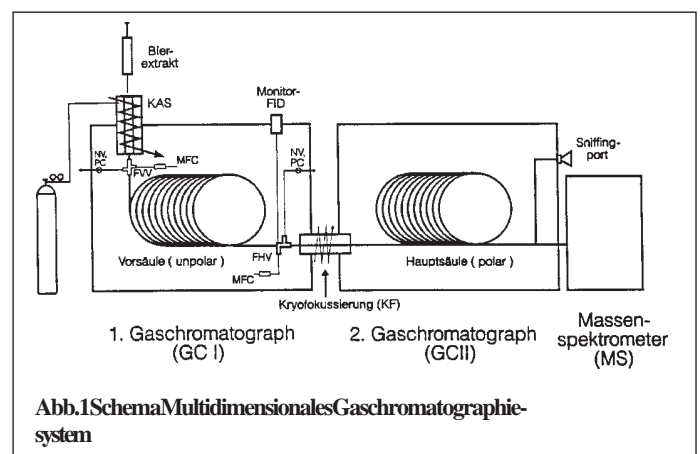
## Allgemeines

In einer vorausgehenden Arbeit (1) wurde das Thema „Geschmacksstabilität“ mit Hilfe der gaschromatographischen/massenspektrometrischen Analyse zur Definition der Veränderung der Bieraromastoffe im Verlauf der „normalen“ oder forciert herbeigeführten Alterung des Bieres, in Verbindung mit spezifischen organoleptischen Prüfungen, dargestellt. Dabei gelang es, anhand von Rückstellproben von 34 Brauereien mit bekannter Technologie eine hohe Korrelation zwischen der Summe der analytisch erfassbaren Alterungssubstanzen und dem Alterungsgeschmack eines Bieres abzuleiten. Es kam auch der Einfluß einer Reihe von technologischen Faktoren zur Untersuchung, wie der Einfluß einer luftfreien Arbeitsweise beim Maischen und Läutern, der Einfluß der Kühltrubabtrennung mittels Flotation, der Einfluß des Druck- bzw. Spanngases bei Filtration und Abfüllung, der Einfluß der PVPP-Stabilisierung und schließlich der Einfluß der Transport- und Lagerbedingungen. In der dem Artikel zugrundeliegenden Dissertation sollte nun eine Weiterentwicklung der Analytik (multidimensionale Gaschromatographie, Sniffing-Tests) zu einer Optimierung der Bestimmung von alterungsrelevanten Substanzen führen, um so den Einfluß weiterer technologischer Parameter auf die Geschmacksstabilität der Biere studieren zu können.

## Analytik

Die bei (1) beschriebenen Methoden der GC-MS-Analyse und SIM-Technik wurden in die Richtung einer multidimensionalen Gaschromatographie weiterentwickelt. Hier werden zwei GC mit ihren entsprechenden Kapillarsäulen miteinander gekoppelt, um verbesserte Trenneigenschaften, vor allem bei analytischen Problemen zu erhalten (2). Dabei werden komplexe Aromastoffgemische über eine Vorsäule getrennt und entscheidende Teile des entstandenen Vorchromatogramms auf eine zweite Säule überführt. Diese Verfahrensweise wird „Heart-Cutting-Technik“ genannt (3). In dieser zweiten Kapillare von unterschiedlicher Polarität wird dieser „Schritt“ erneut chromatographisch getrennt und in einen Detektor überführt. Der prinzipielle Aufbau des multidimensionalen Gaschromatographiesystems ist in Abb. 1 dargestellt.

Gemische aus Aromastoffen werden im Kaltaufgabesystem (KAS) temperaturprogrammiert verdampft und über die unpolare Vorsäule getrennt. Das so entstehende Vorchromatogramm wird am Monitor-detektor (MD) aufgezeichnet. Mittels mikroprozessorgesteuerter Pneumatikschaltung können interessierende Teile dieses Vorchromatogramms herausgeschnitten und auf die Hauptsäule (GC II) überführt werden (= „Heart-Cutting-Technik“). Die Wirkungsweise des multidimensionalen Gaschromatographie-Systems (MDGC) zeigt Abb. 2.



em. Prof. Dr. Ludwig Narziß, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, 85350 Freising-Weihenstephan, Prof. Dr. Heinz Miedaner, Staatliche Brautechnische Prüf- und Versuchsanstalt, 85350 Freising-Weihenstephan, Dr. Stefan Lustig, Brauerei Beck & Co, Bremen — Auszug aus der Dissertation von Dr. Stefan Lustig Dezember 1994

**Tabelle 1 Geruchseindrücke bei Sniffing-Versuchen mit unterschiedlichen Fraktionen aus gealtertem Bier-höheren Konzentrationen vorhanden**

(⊗): in gealtertem Bierin

Aromastoff	Aromaindruck
<input type="checkbox"/> <b>1. Fraktion</b> (unpolare Kohlenwasserstoffe)	Keine relevanten Geruchseindrücke
<input type="checkbox"/> <b>2. Fraktion</b>	
Essigsäure-2-Methyl-1-Propyl-Ester	bananenartig, süßlich, fruchtig
Buttersäure-Ethyl-Ester	ananas-, erdbeerenartig
Essigsäure-3-Methyl-1-Butyl-Ester	weingummiartig, fruchtig, stechend, bananenartig
2-Ethyl-Furfuryl-Ether (⊗)	süßlich, ranzig, nussig
Benzaldehyd	nußartig
Hexansäure-Ethyl-Ester	grün-fruchtig, stechend (estrig), apfelartig
Heptansäure-Ethyl-Ester	dumpf, grün, stechend (estrig)
Octansäure-Ethyl-Ester	grün-fruchtig, stechend (estrig), apfelartig
<input type="checkbox"/> <b>3. Fraktion</b>	
2-Furfural (⊗)	caramelartig, nussig
2-Heptanon	dumpf, faulig
2-Ethyl-Furfuryl-Ether (⊗)	süßlich, ranzig, nussig
Benzaldehyd	nußartig, mandelartig, röstaromatisch
Essigsäure-Hexyl-Ester	grün, etherisch
2-Propionyl-Furan (⊗)	nußartig, röstaromatisch
2-Phenyl-Ethanal (⊗)	hyazinthartig
Essigsäure-3-Methyl-1-Thiopropyl-Ester	gemüseartig
2-Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester	süßlich, nektarähnlich
Essigsäure-2-Phenyl-Ethyl-Ester	veilchenartig
β-Damascenon	dumpf-grasig
<input type="checkbox"/> <b>4. Fraktion</b>	
2- und 3-Methyl-1-Butanol	tranartig, dumpf, ranzig, lösungsmittelartig
3-Methyl-1-Thio-Propanal	gemüse-, kartoffelartig
2-Acetyl-Furan (⊗)	röstaromatisch
5,5-Dimethyl-2(5H)-Furanon	süßlich, honigartig
1-Heptanol	dumpf, grün
2-Acetyl-5-Methyl-Furan	maggiartig, ähnlich wie Sojasoße
2-Phenyl-Ethanal (⊗)	hyazinthartig
γ-Hexalacton	grablig
1-Octanol	seifig, dumpf
Guajacol	süßlich
Linalool	grasig, etherisch
2-Phenyl-Ethanol	rosenartig, süßlich
4-Vinyl-Guajacol	gewürznelkenartig
γ-Nonalacton (⊗)	kokosartig, süßlich
<input type="checkbox"/> <b>5. Fraktion</b>	
2-Furfuryl-Methanol	säuerlich, dumpf, fruchtig
Dihydro-2 (3H)-Furanon	süßlich, nussig, röstaromatisch
2-Phenyl-Ethanal (⊗)	hyazinthartig
2-Phenyl-Alkohol	rosenartig
<input type="checkbox"/> <b>6. Fraktion</b>	Keine relevanten Geruchseindrücke

### Untersuchungen zur Identifizierung und quantitativen Erfassung alterungsrelevanter Aromastoffe

Diese erfolgte durch Extraktion und Säulenchromatographie und Fraktionierung mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität. Ihre Identifizierung geschah mittels GC und MS auf zwei Kapillarsäulen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften. Im GC-Sniffing-System war dann eine sensorische Bewertung der Aromastoffextrakte möglich. Es kamen hier sowohl frische als auch forciert gealterte Biere zur Untersuchung. Dabei konnten den jeweiligen Substanzen spezifische Geruchseindrücke zugeordnet werden, wie Tabelle 1 zeigt.

Aromastoffe, die bei der Bieralterung zunahmen, bestätigten die bekannten, alterungsrelevanten Aromastoffe (1) wie 3-Methyl-

Butan-2-on, 2-Furfural, Benzaldehyd, 2-Phenyl-Ethanal, Nicotinsäure-Ethylester und γ-Nonalacton.

Die Substanzen, die im gealterten Bier in höheren Konzentrationen vorliegen, weisen süßliche, caramel- bis honig-/nektarartige Aromaeindrücke auf. Um den Beitrag der einzelnen Aromastoffe zum Bieraroma zu bewerten, wurde eine Aromaextraktverdünnungsanalyse (4, 5, 6, 7) durchgeführt.

Die Identifizierung von Aromastoffen z. B. von frischen, forciert gealterten und extrem alten Bieren erlaubte das MDGC-System. Es ergab rund 40 Verbindungen, deren Konzentration sich im Laufe der Bieralterung änderte. Neben der Bestätigung der Bedeutung bereits bekannter Aromastoffe konnten neue Substanzen identifiziert werden, die bisher noch nicht in Zusammenhang mit

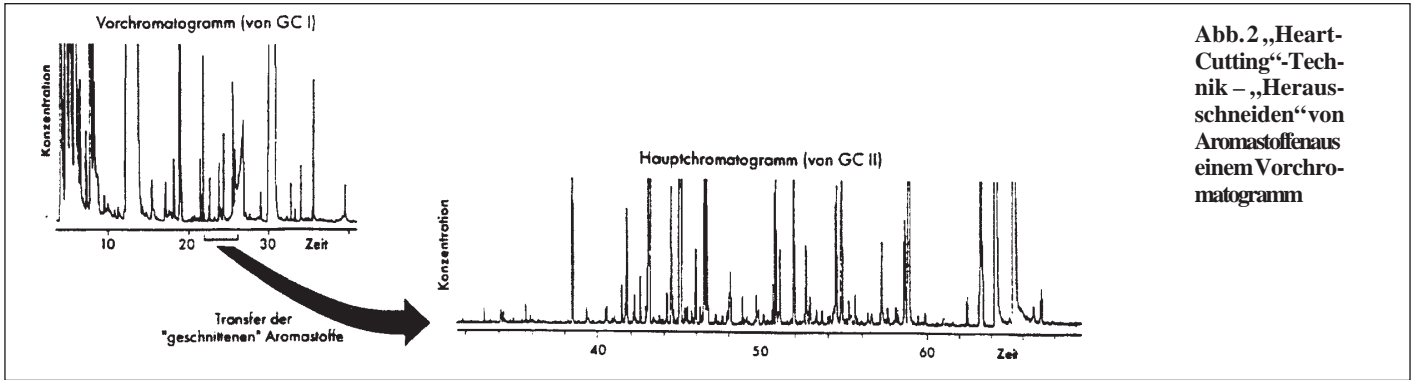


Abb. 2 „Heart-Cutting“-Technik – „Heraus-schneiden“ von Aromastoffen aus einem Vorchromatogramm

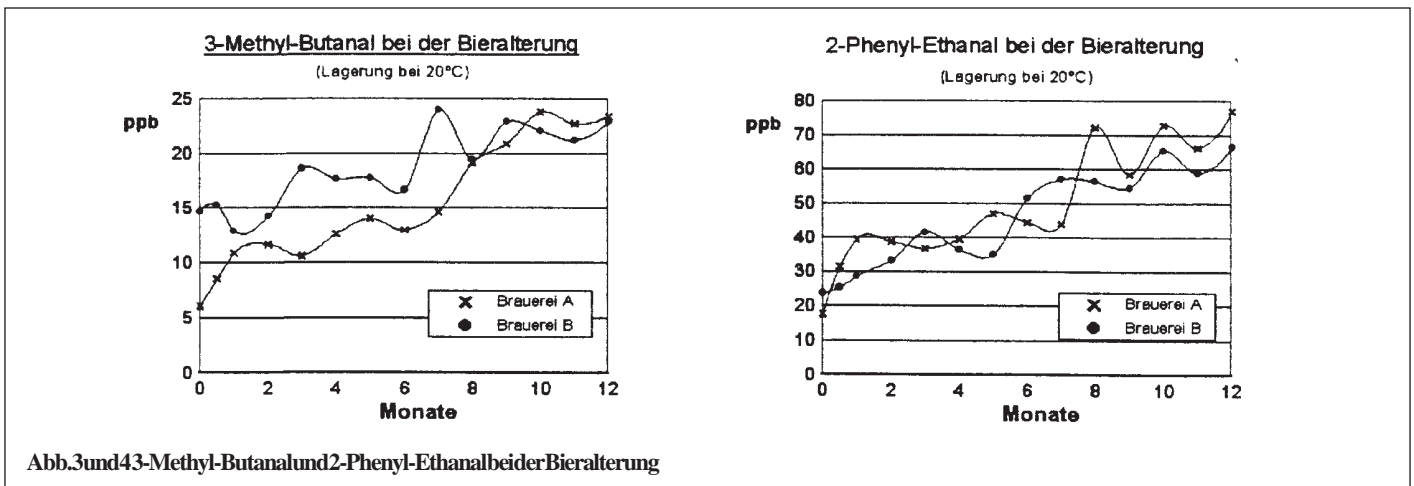


Abb. 3 und 4 3-Methyl-Butanal und 2-Phenyl-Ethanal bei der Bieralterung

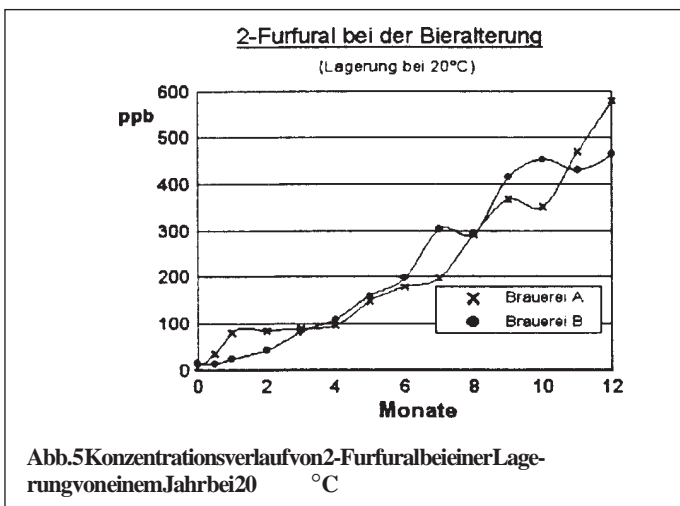


Abb. 5 Konzentrationsverlauf von 2-Furfural bei einer Lagerung von einem Jahr bei 20 °C

wies einen leichten Anstieg auf, wie auch der Bitterstoffgehalt eine geringfügige Abnahme zeigte (ohne Verschiebung der einzelnen Homologen der Isohumulone).

Die schon bekannten Anstiege von 3-Methyl-Butanal, 2-Phenyl-ethanal, 2-Furfural, Nicotinsäure-Ethyl-Ester und  $\gamma$ -Nonalacton vermitteln die Abb. 3 – 7.

**Lagerversuch von fünf Bieren aus unterschiedlichen Brauereien über 9 Monate**

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die vorgenannten Ergebnisse durch eine Lagerung von fünf Pils-Bieren über 9 Monate analytisch zu bestätigen und dazu Verkostungen vorzunehmen.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 8 – 17 dargestellt. Eine eindeutige Zunahme, vor allem zu Beginn des Alterungsprozesses zeigten Furane und einige andere aufgeführte Substanzen. Wie schon früher erwähnt (1), nahm der Essigsäure-Furfurylester in den ersten drei Monaten der Alterung auf praktisch null ab.

**Definition von Indexpunkten zur Beurteilung des Alterungsstandes eines Bieres**

Um die Vorgänge bei der Bieralterung summarisch zu erfassen, wurden in anderen Forschungsprojekten (1) die Konzentrationen einiger alterungsrelevanter Aromastoffe zu einer Summenzahl addiert. Zudem konnten Indexpunkte für die Sauerstoffkontamination bei der Abfüllung sowie für die Lagertemperatur und -dauer des abgefüllten Bieres definiert werden.

Bei den nunmehr erhaltenen Ergebnissen des zweiten Lagerversuchs wurden die bekannten summarischen Indexpunkte um die

der Bieralterung erwähnt wurden. Insbesondere erwiesen sich Substanzen mit Furanstruktur als bedeutsam.

Nachdem sich die Methode der multidimensionalen GC für einen höheren Probendurchsatz als schlecht geeignet erwies, kam wiederum die einfachere Bestimmung einer modifizierten Kombination aus Wasserdampfextraktion und flüssig-flüssig-Extrakten zur Anwendung (1, 8, 9).

**Beispielhafte Untersuchungen an Bieren zweier Brauereien während der Lagerung über ein Jahr**

Nach den chemisch-technischen bzw. HPLC-Analysen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen, lediglich die Bierfarbe

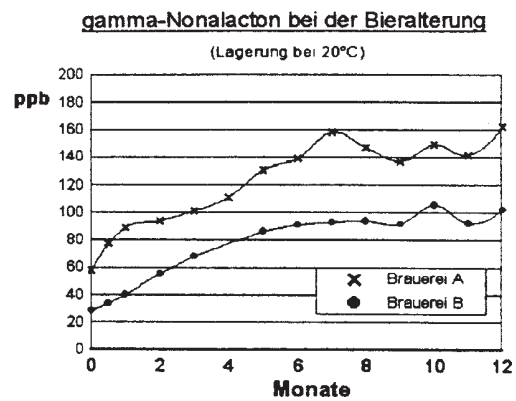
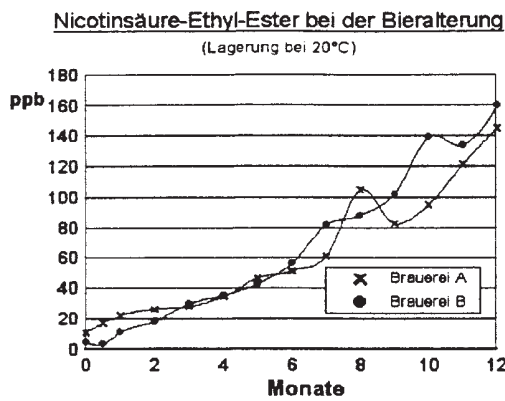


Abb.6und7 Nicotinsäure-Ethyl-Ester und  $\gamma$ -Nonalacton bei der Bieralterung

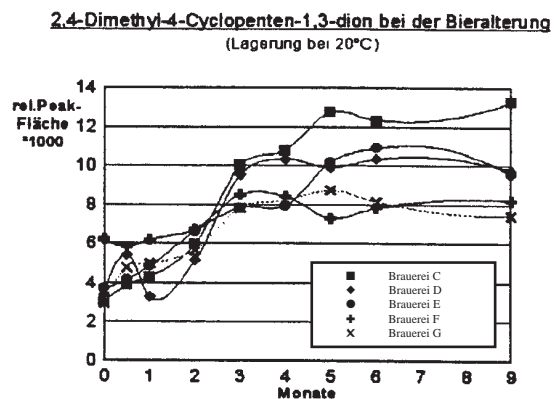
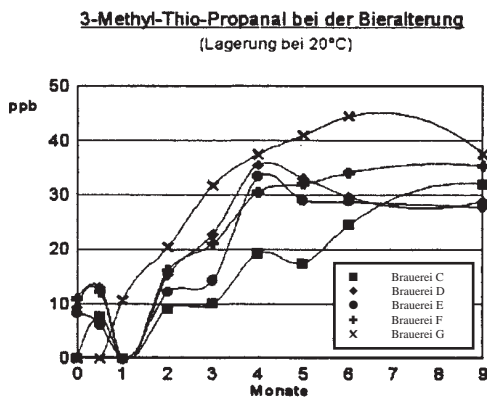


Abb.8und9 3-Methyl-Thio-Propanal und 2,4-Dimethyl-4-Cyclopenten-1,3-dion bei der Bieralterung

neu gefundenen Alterungssubstanzen erweitert; darüberhinaus wurden die Konzentrationen der Furanverbindungen (mit Ausnahme der konzentrationsstarken Komponente 2-Furfural) zusammengefaßt.

Eine weitere Ergänzung stellt eine Unterteilung dar, in der Substanzen zum einen in Aromastoffe, die in der Anfangsphase in ihrer Konzentration zunehmen, addiert werden. Andererseits werden Aromastoffe aufsummiert, die erst im späteren Stadium der Bieralterung einen Zuwachs in ihrer Konzentration erfahren. Hieraus leiten sich die Indexpfahlen „Forcierindex“ und „Alterungsindex“ ab. Dabei wird berücksichtigt, daß einige Substanzen, wie z. B. 2-Furfural oder  $\gamma$ -Nonalacton aufgrund sehr hoher Konzentrationen diese Summenzahlen sehr stark beeinflussen. Durch Anwendung von Multiplikationsfaktoren, die empirisch aufgrund der Erkenntnisse dieser Lagerversuche gewählt wurden, sollte versucht werden, den einzelnen Aromastoffen eine ihrer Bedeutung entsprechende Gewichtung zu geben. Eine Übersicht über die Summenzahlen gibt Tabelle 2.

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden die Substanzen 2-Methyl-Butanal und Nicotinsäure-Ethylester bei der Definition dieser Indexpfahlen nicht berücksichtigt.

Die Untersuchung der Indexpfahlen über die Lagerzeit ergibt eine starke Korrelation mit fortlaufender Lagerdauer. Auch die starke prozentuale Zunahme derselben im gealterten Bier im Vergleich zum frischen Bier zeigt, daß diese Indexpfahlen dazu geeignet sind, den Alterungszustand eines Bieres summarisch zu erfassen (Tabelle 3).

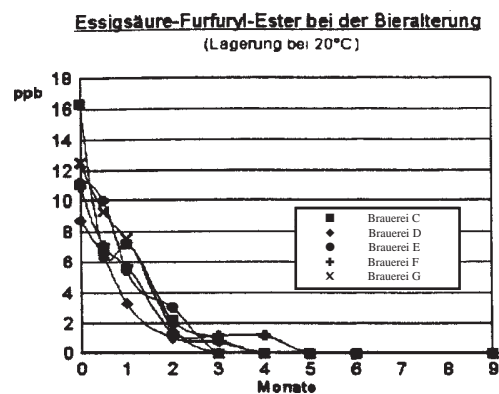
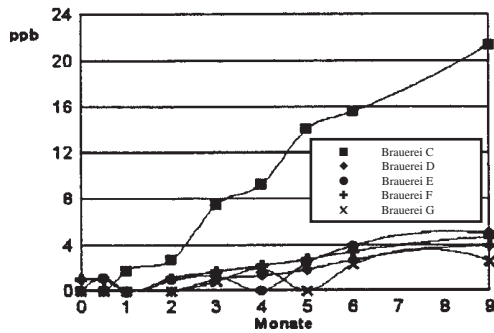


Abb.10 Konzentrationsabnahme von Essigsäure-Furfuryl-Ester bei der Bieralterung

Abb. 18 macht deutlich, daß die Summenkonzentration der relevanten Alterungssubstanzen vom Beginn der Lagerung an stetig ansteigt. Ähnlich verhalten sich nach Abb. 19 und 20 die dimensionslosen Kennzahlen „Forcierindex“ und „Alterungsindex“. Der Forcierindex zeigt – wie erwähnt – einen starken Anstieg im Anfangsstadium der Bieralterung (nach Abb. 19 in den ersten vier Monaten). Der Alterungsindex vermittelt dagegen analog zur Summe der Alterungskomponenten auch im weiteren Verlauf der Alterung einen Zuwachs.

**Bemsteinsäure-Diethyl-Ester bei der Bieralterung**  
(Lagerung bei 20°C)



**2-Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester bei der Bieralterung**  
(Lagerung bei 20°C)

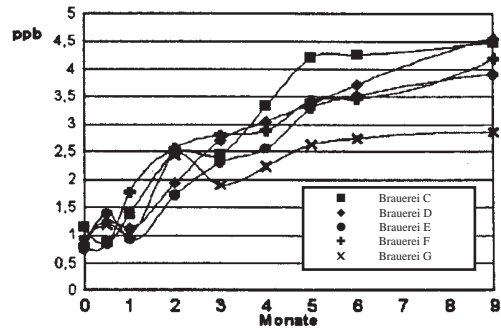
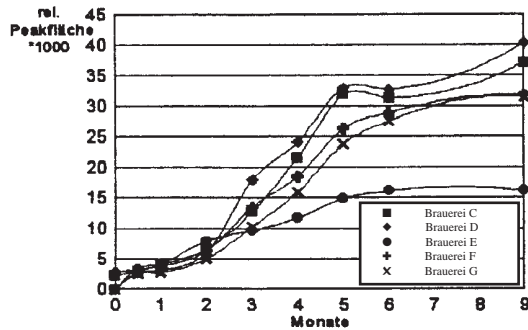


Abb.11 und 12 Verhalten von Bemsteinsäure-Diethyl-Ester und 2-Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester bei der Bieralterung

**2-Ethyl-Furfuryl-Ether bei der Bieralterung**  
(Lagerung bei 20°C)



**2-Propionyl-Furan bei der Bieralterung**  
(Lagerung bei 20°C)

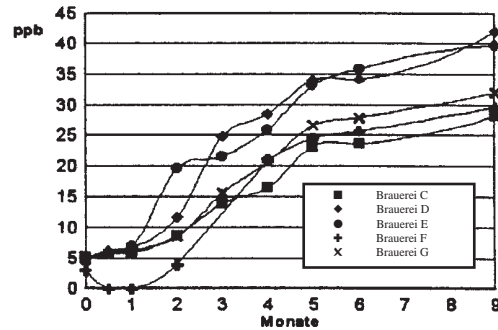
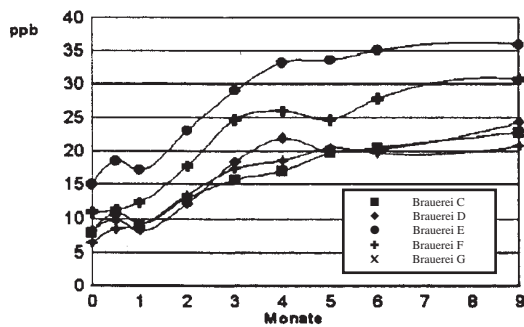


Abb.13 und 14 Verhalten von 2-Ethyl-Furfuryl-Ether und 2-Propionyl-Furan bei der Bieralterung

**2-Acetyl-Furan bei der Bieralterung**  
(Lagerung bei 20°C)



**Dihydro-5,5-Dimethyl-2(3H)-Furanon bei der Bieralterung**  
(Lagerung bei 20°C)

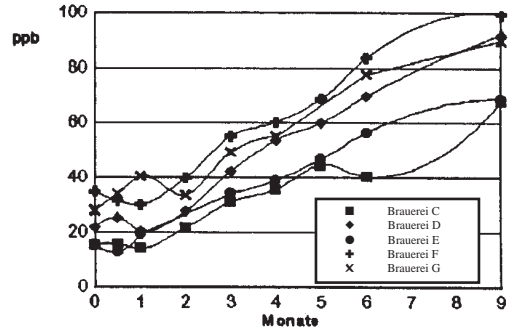
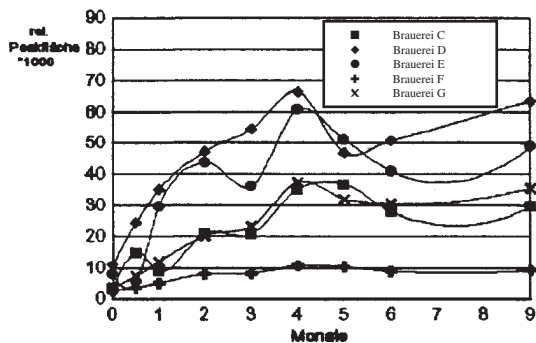


Abb.15 und 16 Das Verhalten von 2-Acetyl-Furan und Dihydro-5,5-Dimethyl-2(3H)-Furanon bei der Bieralterung

**2,4,5-Trimethyl-1,3-Dioxolan bei der Bieralterung**  
(Lagerung bei 20°C)



**Summe der Konzentrationen der Alterungskomponenten bei der Bieralterung**  
(=Summe der Alterungskomponenten - Lagerung bei 20°C)

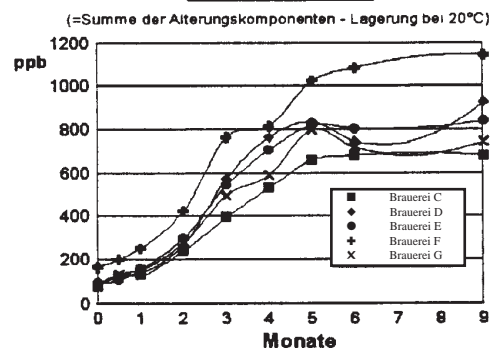


Abb.17 2,4,5-Trimethyl-1,3-Dioxolan bei der Bieralterung

Abb.18 Summe der Konzentrationen der Alterungssubstanzen bei der Lagerung von Flaschenbier

Tabelle 2 Zusammensetzung der Indexzahlen zur summarischen Erfassung der Alterungskomponenten	
Indexzahl	Berechnung
Summe der Sauerstoffindikatoren ( $\mu\text{g/l}$ )	Summe der Konzentrationen von <input type="checkbox"/> 2-Methyl-Butanal <input type="checkbox"/> 3-Methyl-Butanal <input type="checkbox"/> Benzaldehyd <input type="checkbox"/> 2-Phenyl-Ethanal
Summe der Wärmeindikatoren ( $\mu\text{g/l}$ )	Summe der Konzentrationen von <input type="checkbox"/> 2-Furfural <input type="checkbox"/> $\gamma$ -Nonalacton
Summe der Furane (dimensionslos)	Summe der Konzentrationen von <input type="checkbox"/> 5-Methyl-2-Furfural <input type="checkbox"/> 2-Acetyl-Furan <input type="checkbox"/> 2-Propionyl-Furan <input type="checkbox"/> 2-Acetyl-5-Methyl-Furan <input type="checkbox"/> Dihydro-5,5-Dimethyl-2(3H)-Furanon <input type="checkbox"/> 5,5-Dimethyl-2(5H)-Furanon <input type="checkbox"/> 2-Ethyl-Furfuryl-Ether (relative Fläche)
Summe der Alterungskomponenten ( $\mu\text{g/l}$ )	Summe der Konzentrationen von <input type="checkbox"/> 3-Methyl-Butanal <input type="checkbox"/> 2-Furfural <input type="checkbox"/> 5-Methyl-2-Furfural <input type="checkbox"/> Benzaldehyd <input type="checkbox"/> 2-Phenyl-Ethanal <input type="checkbox"/> Bernsteinsäure-Diethyl-Ester <input type="checkbox"/> 2-Phenyl-Essigsäure-Ethyl-Ester <input type="checkbox"/> 2-Acetyl-Furan <input type="checkbox"/> 2-Propionyl-Furan <input type="checkbox"/> $\gamma$ -Nonalacton
Forcierindex (dimensionslos)	Summe aus <input type="checkbox"/> 2 x Konzentration von 3-Methyl-Butanal <input type="checkbox"/> 0,25 x Konzentration von 2-Furfural <input type="checkbox"/> 0,5 x Konzentration von 2-Phenyl-Ethanal <input type="checkbox"/> 2 x Konzentration von 2-Acetyl-Furan <input type="checkbox"/> 2 x Konzentration von 2-Propionyl-Furan <input type="checkbox"/> 0,5 x Konzentration von $\gamma$ -Nonalacton <input type="checkbox"/> Relative Peakfläche von 2,4,5-Trimethyl-1,3-Dioxolan
Alterungsindex (dimensionslos)	Summe aus <input type="checkbox"/> 2 x Konzentration von 3-Methyl-Butanal <input type="checkbox"/> 0,25 x Konzentration von 2-Furfural <input type="checkbox"/> 0,5 x Konzentration von 2-Phenyl-Ethanal <input type="checkbox"/> 3 x Relative Peakfläche von 2,4-Dimethyl-4-Cyclopenten-1,3-dion <input type="checkbox"/> Konzentration von Bernsteinsäure-Diethyl-Ester <input type="checkbox"/> Konzentration von 2-Phenylessigsäure-Ethyl-Ester <input type="checkbox"/> 2 x Konzentration von 2-Acetyl-Furan <input type="checkbox"/> 4 x Konzentration von 2-Propionyl-Furan <input type="checkbox"/> 0,5 x Konzentration von $\gamma$ -Nonalacton <input type="checkbox"/> Relative Peakfläche von 2,4,5-Trimethyl-1,3-Dioxolan <input type="checkbox"/> 5 x Relative Peakfläche von 2-Ethyl-Furfuryl-Ether

**Tabelle 3 Korrelation zwischen Indexzahlen und Lagerdauer bzw. prozentuale Veränderung vom frischen zum gealterten Bier**

Indexzahlen	Brauerei C (r/%)	Brauerei D (r/%)	Brauerei E (r/%)	Brauerei F (r/%)	Brauerei G (r/%)
Summe der Wärmeindikatoren	0,93/1600	0,92/1800	0,91/1500	0,94/910	0,90/1600
Summe der Sauerstoffindikatoren	0,87/230	0,92/290	0,93/280	0,88/300	0,88/280
Summe der Furane	0,91/230	0,97/320	0,82/350	0,98/240	0,96/210
Summe der Alterungskomponenten	0,93/880	0,95/1200	0,92/910	0,94/690	0,91/920
Forcierindex	0,94/460	0,93/590	0,92/460	0,93/480	0,92/520
Alterungsindex	0,96/610	0,95/790	0,93/540	0,94/520	0,95/680

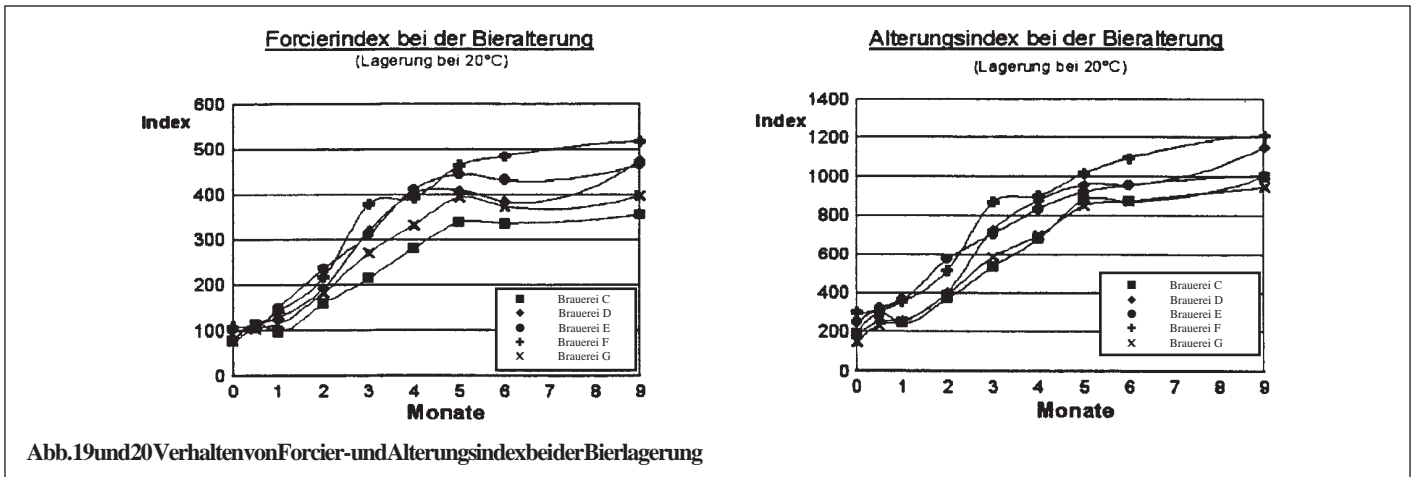


Abb. 19 und 20 Verhalten von Forcier- und Alterungsindex bei der Bierlagerung

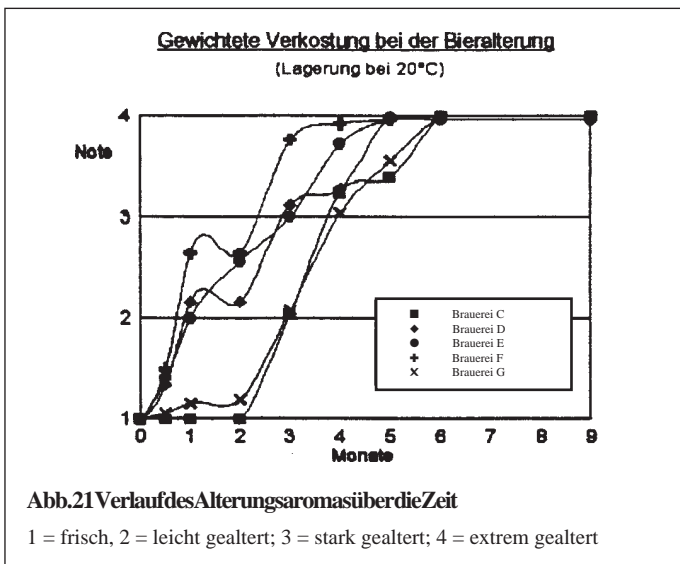


Abb. 21 Verlauf des Alterungsaromas über die Zeit

**Ergebnisse der Alterungsverkostung**

Hier wurde ein speziell definiertes Alterungsverkostungsschema entwickelt (1). Dabei wird die gewichtete Note wie folgt definiert:

Gewichtete Alterungsnote = (2 x Note Alterungsgeruch + 2 x Note Alterungsgeschmack + 1 x Alterungszustand der Bittere) : 5

Die Entwicklung des Alterungsaromas, die anhand der gewichteten Alterungsnote dargestellt wird, zeigt Abb. 21. Die sensorische Bewertung des Alterungsaromas ist nur bis zu einem gewissen Alterungsstadium sinnvoll – ab demselben können keine Differenzierungen hinsichtlich der Intensität des Alterungsaromas ge-

macht werden, da die Benotung bereits am Ende der Bewertungsskala angelangt ist.

In Abb. 22 ist die hohe Korrelation von  $r = 0,98$  zwischen gewichteter Alterungsnote und Summenkonzentration der Alterungskomponenten am Beispiel der Brauerei E dargestellt. Eine Korrelation von  $r = 0,99$  errechnet sich auch zwischen der gewichteten Alterungsnote und dem Alterungsindex (Abb. 23).

Damit ist die Voraussetzung geschaffen, den Einfluß technologischer Maßnahmen auf das Alterungsverhalten des Bieres zu studieren.

Im Rahmen bestätigender Untersuchungen wie z. B. anhand eines Wasserdampfdestillat-flüssig/flüssig-Extrakts aus einem extrem gealterten Bier mittels GC/MS-IR-System wurden eine Vielzahl von Bieraromastoffen anhand ihrer IR-Spektren identifiziert.

Eine weitere Untersuchung von frischem und gealtertem Bier erfolgte mittels Vakuum-Extraktion und GC/MS. Diese schonendere Methode zur Gewinnung leichtflüchtiger Substanzen lieferte ähnliche Werte wie die Wasserdampf-Methylenchlorid-Extraktion.

**Untersuchungen zur Definition einer forcierten Behandlung zur schnelleren Bestimmung der Geschmacksstabilität eines Bieres**

Ursprünglich kam ein „Forciertest“ zur Anwendung, bei dem die Biere nach 24 h Schütteln bei Raumtemperatur anschließend 7 Tage bei 40 °C gelagert wurden. Hierbei erwies sich die Verweilzeit von 7 Tagen als zu lang, so daß Unterschiede, die aufgrund technologischer Maßnahmen erzielt wurden, wohl analytisch dargestellt, aber sensorisch nicht mehr erfaßt werden konnten. Wie

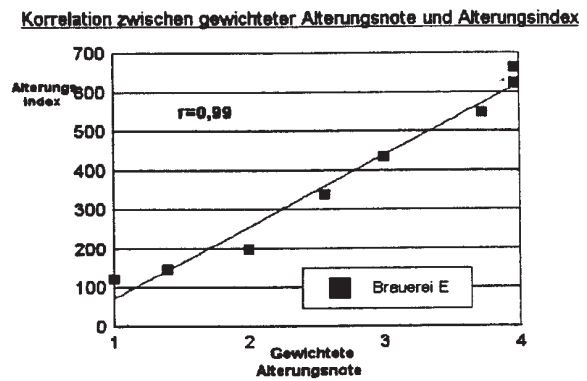
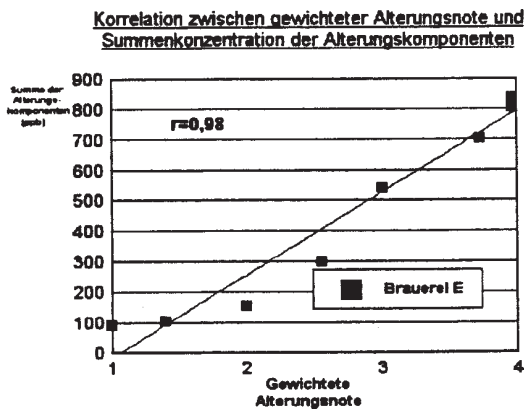


Abb.22und23 Korrelation zwischengewichteter Alterungsnote und Summe der Alterungskomponenten bzw. Alterungsindex (Brauerei E)

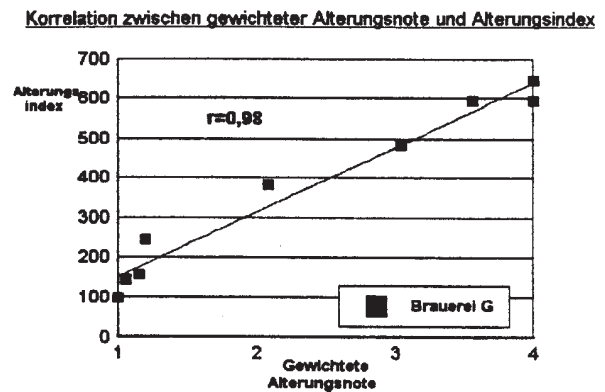
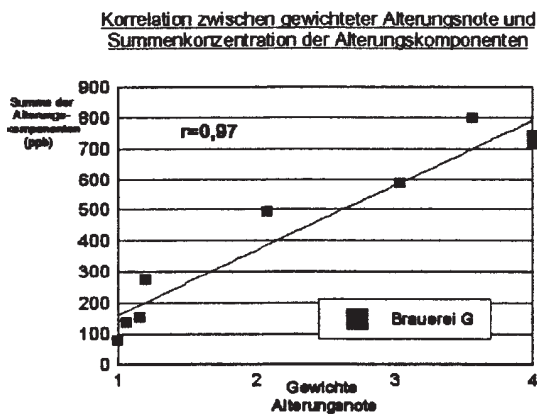


Abb.24 Korrelation zwischengewichteter Alterungsnote und Summe der Alterungskomponenten (Brauerei G)

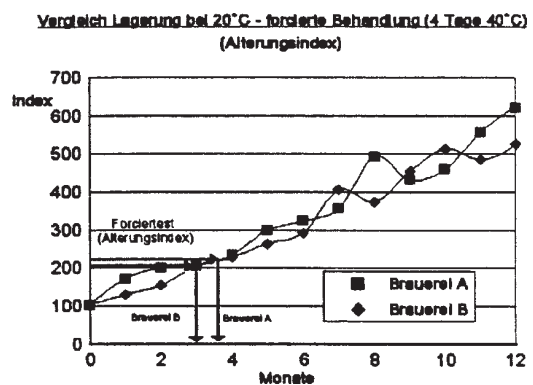
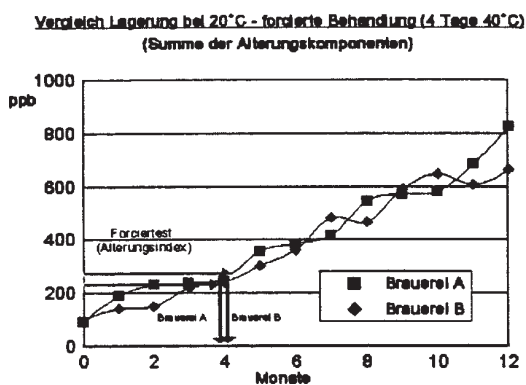


Abb.25und26 Vergleich forciertes Behandlung mit Lagerung bei 20

°C

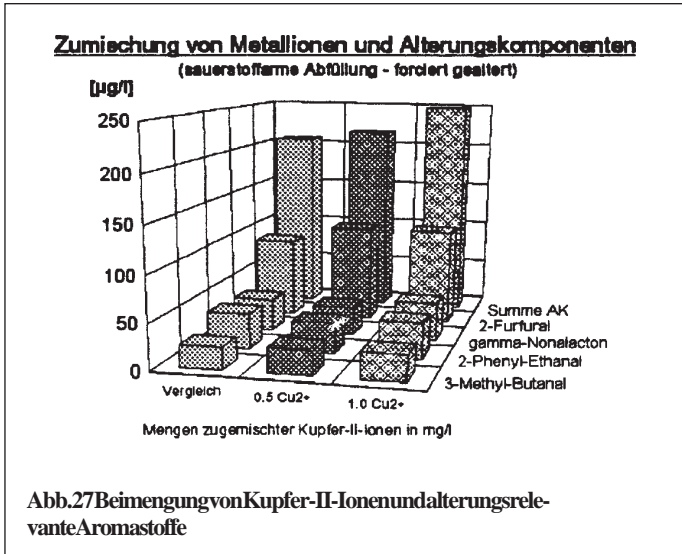
Abb. 24 zeigt, befinden sich die Biere bei 4 Tagen in einem mittleren Alterungszustand (gewichtete Note 2,3, d.h. Bewertung zwischen „leicht gealtert“ und „gealtert“). Bei einer fünftägigen Lagerung fällt die Akzeptanz deutlich ab.

Die Abb. 25 und 26 zeigen für die Biere aus den beiden Brauereien A und B den Vergleich der forcierten Behandlung mit einer natürlichen Alterung bei 20 °C. Dabei zeigten die Alterungskomponenten bzw. der Alterungsindex, daß die forcierte Behandlung einer natürlichen Lagerung von 4 bzw. 3 Monaten entspricht.

**Versuche zur Beurteilung der Reaktionsmechanismen bei der Bieralterung**

**Der Einfluß von Metallionen auf die Konzentration von alterungsrelevanten Verbindungen**

Metallionen können aufgrund ihrer Fähigkeit, Elektronen zu übertragen, Oxidationsreaktionen katalysieren (10). Je nach Oxidationsstufe erfolgt dies über einen direkten Elektronenübergang von dem Metallion mit höherem Redoxstatus auf Bierbestandteile



bzw. mittels Bildung von Sauerstoff- und Hydroxylradikalen unter Einbeziehung von molekularem Sauerstoff und dem Metallion mit niedriger Oxidationsstufe.

Bei der Versuchsreihe wurden 0,5 bzw. 1,0 mg/l Metallionen (Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup>) zugesetzt, wobei das Bier einmal nur 0,13 mg/l O<sub>2</sub>, enthielt, zum anderen aber 0,33 mg/l. Nach der forcierten Alterung ergab sich, daß bei O<sub>2</sub>-armer Abfüllung nur Cu<sup>2+</sup> in steigenden Mengen (0,5 – 1,0 mg/l) eine stärkere Bildung von Alterungskomponenten bewirkte (Abb. 27); bei höherem Sauerstoffgehalt wirkten alle Ionen im Sinne einer Mehrung der Alterungssubstanzen, und zwar bei höherer Dosage (mit Ausnahme von Fe<sup>3+</sup>) verstärkt.

**Die Rolle von SO<sub>2</sub> bei der Bieralterung**

Im Rahmen von Lagerversuchen wurde der Konzentrationsverlauf des SO<sub>2</sub> verfolgt (11). Da in neueren Forschungsarbeiten auf das Vorkommen von SO<sub>2</sub>-Carbonyl-Komplexen verwiesen wird (12, 13, 14, 15), sollte im Rahmen von praxisgerechten Modellversuchen mittels Zumischung von Carbonylen, Acetaldehyd und SO<sub>2</sub> das Reaktionsgleichgewicht zwischen den einzelnen Partnern nachvollzogen werden.

Bier enthält SO<sub>2</sub> als Gärungsnebenprodukt. Bei allen Faktoren, die Gärung und Hefevermehrung fördern, resultieren geringere Ge-

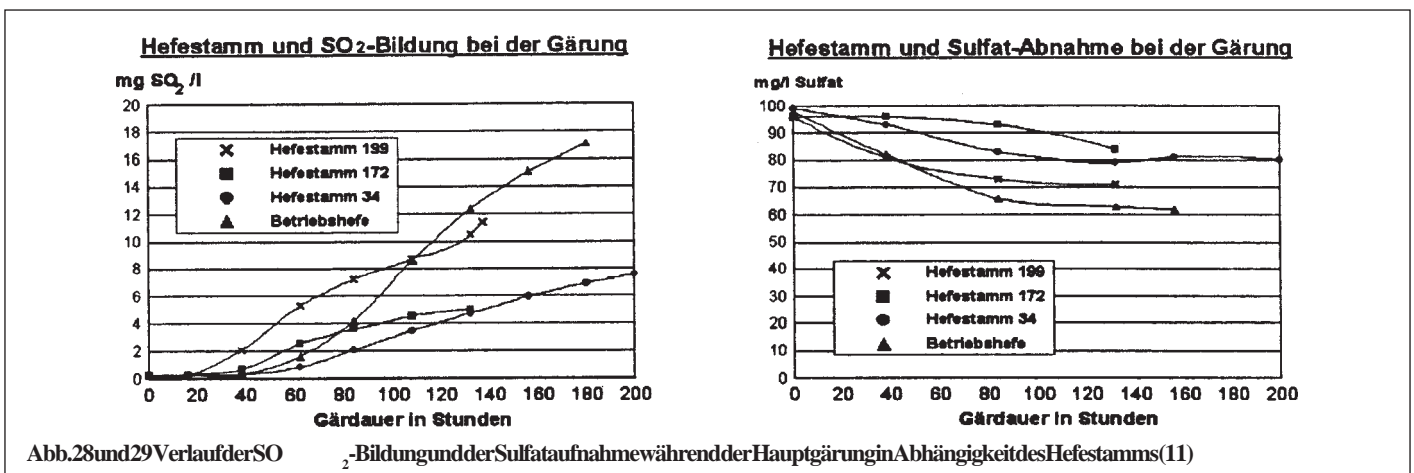
halte an SO<sub>2</sub>, da mehr schwefelhaltige Aminosäuren für den Aufbau von Zellmaterial benötigt werden (16, 17). Enzymsysteme, die an der Bildung von SO<sub>2</sub> beteiligt sind, stellen ein genetisches Merkmal dar. Die SO<sub>2</sub>-Bildung ist somit durch den Hefestamm festgelegt. In Pilotgärversuchen ergaben vier verschiedene Hefestämmen bei identischer Würzequalität die in Abb. 28 dargestellten SO<sub>2</sub>-Gehalte. Dabei wurde der Sulfat-Gehalt der Würze (Abb. 29) von den Hefen umso stärker verwertet, je mehr SO<sub>2</sub> sich entwickeln konnte (Korrelation r = 0,995). Versuche, die SO<sub>2</sub>-Bildung durch eine Erhöhung des SO<sub>4</sub>-Gehaltes der Würze um 350 mg/l zu verstärken, erbrachten nur eine bescheidene Mehrung des SO<sub>2</sub>-Gehaltes der Jungbiere von z. B. 5,7 auf 9,6 mg/l bzw. von 0,5 auf 2,7 mg/l. Da das SO<sub>4</sub> als Calcium-Salz dosiert wurde, erfuhr der Würze-pH eine Absenkung, wodurch die Gärung gefördert wurde, was wiederum die SO<sub>2</sub>-Bildung dämpfte.

Das Verhalten von SO<sub>2</sub> bei der Lagerung von Flaschenbier geht aus der Abb. 30 hervor: je höher der SO<sub>2</sub>-Gehalt des frischen Bieres, umso größer ist die antioxidative Wirkung. Bei einem Forciertest (1 Tag Schütteln 7 Tage 40 °C) mit Bieren verschiedener Brauereien zeigte sich, daß die Abnahme des SO<sub>2</sub>-Gehalts umso stärker ist, je höher der Ausgangsgehalt war. Es wurde also mehr SO<sub>2</sub> während des Alterungstests umgesetzt. Bei der sensorischen Bewertung ergab sich ein klarer Zusammenhang zwischen der Intensität des Alterungsaromas und der verbrauchten SO<sub>2</sub>-Menge. Je höher diese war, umso stabiler wurde das Bier befunden.

**Nachweis der Existenz von Carbonyl-Sulfit-Komplexen durch Zumischen von Acetaldehyd, SO<sub>2</sub> und anderen Carbonylen**

Die Fähigkeit von SO<sub>2</sub> zur Verbesserung der Geschmacksstabilität beizutragen, beruht nicht nur auf der antioxidativen Wirkung dieser Verbindung, sondern liegt mit darin begründet, daß Schwefeldioxid Carbonyle in Komplexe binden kann.

In einer Versuchsreihe wurden nun einzelne Reaktionspartner wie Acetaldehyd, SO<sub>2</sub> oder ein Gemisch aus beiden Substanzen zugeben und im Vergleich zum unbehandelten Bier auf Heptanal und (E)-2-Nonenal mittels GC/MS-SIM-Methode (1) untersucht (11). Parallel dazu erfolgte eine Beimengung von zwei Konzentrationen Heptanal und (E)-2-Nonenal zu den jeweils vier Acetaldehyd-Kombinationen (29). Es sollte festgestellt werden, ob durch die Addition von SO<sub>2</sub> die Konzentration an freien Carbonylen abnimmt durch Bildung von Carbonyl-Sulfit-Komplexen oder bei Addition von Acetaldehyd diese hingegen freigesetzt werden (Abspaltung von Carbonylen aus den Komplexen durch Bindung des SO<sub>2</sub> an Acetaldehyd).



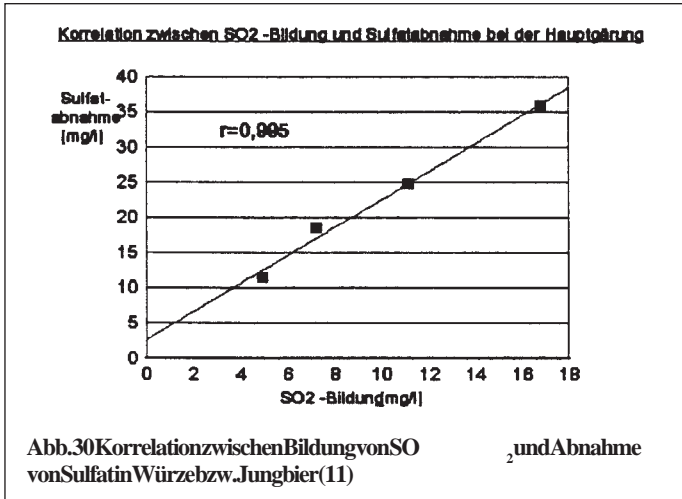


Abb.30 Korrelation zwischen Bildung von SO<sub>2</sub> und Abnahme von Sulfid in Würzel bzw. Jungbier (11)

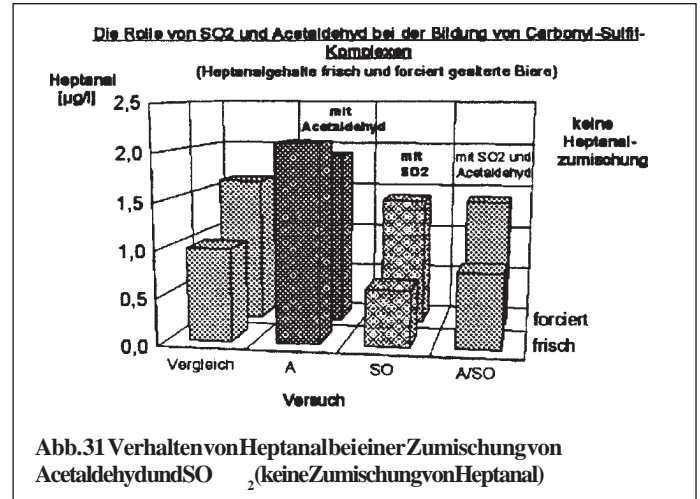


Abb.31 Verhalten von Heptanal bei einer Zumischung von Acetaldehyd und SO<sub>2</sub> (keine Zumischung von Heptanal)

Die Ergebnisse waren:

Für (E)-2-Nonenal kann weder im frischen noch im forciert gealterten Zustand eine deutliche Veränderung nachgewiesen werden, die auf Carbonyl-Sulfit-Komplexe schließen läßt.

Eine eindeutige Entwicklung zeichnet sich bei den Konzentrationen des Heptanals ab (Abb. 31, 32, 33). Nach Abb. 31 steigt die Konzentration des Heptanals sowohl im frischen als auch im forciert gealterten Bier an, wenn Acetaldehyd zugegeben wird. Es kommt zu einer Freisetzung des längerkettigen Carbonyls, da die Affinität von SO<sub>2</sub> zu Acetaldehyd größer ist. Zugegebenes SO<sub>2</sub> bindet im frischen Bier noch vorhandenes freies Heptanal, es kommt zu einer Verringerung des Aldehyds. Die Zugabe von einem Gemisch aus Acetaldehyd und SO<sub>2</sub> ergibt wiederum einen Heptanalgehalt, der einem „Mittelzustand“ entspricht und der sich im Rahmen des Analysenfehlers auf der Höhe des Vergleichsbieres bewegt. Es wird offenbar die Wirkung von Acetaldehyd und SO<sub>2</sub> auf die Carbonyl-Sulfit-Komplexe aufgehoben.

Die Zumischung von jeweils 3,6 bzw. 7,2 µg/l Heptanal zu den entsprechenden Acetaldehyd-/SO<sub>2</sub>-Komplexen bestätigt die in Abb. 31 dargestellten Ergebnisse. Auch hier ergibt sich in beiden Konzentrationsstufen eine Erhöhung der Heptalkonzentration bei Zugabe von Acetaldehyd und eine Abnahme der Gehalte bei einer Zumischung von SO<sub>2</sub> (Abb. 32, 33).

Als Ergebnis dieser Versuche ist abzuleiten, daß im Bier Carbonyl-Sulfit-Komplexe vorliegen. Liegt im frischen Bier die SO<sub>2</sub>-

Konzentration höher, so können mehr Carbonyle in Carbonyl-Sulfit-Komplexe gebunden werden. Diese tragen nicht zum Alterungsaroma bei; die Geschmacksstabilität der Biere ist besser. Kommt es im Verlauf der Bieralterung zu einer Oxidation von SO<sub>2</sub> zu SO<sub>4</sub> bzw. zu einer Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd welcher als kurzkettiges Aldehyd eine stärkere Affinität zu Sulfit hat, so daß längerkettige Aldehyde aus ihrer Sulfitbindung freigesetzt werden und so zum Alterungsaroma beitragen.

Nach dem Reinheitsgebot ist der Zusatz von SO<sub>2</sub> bei der Abfüllung nicht möglich. Es muß daher durch die vorerwähnten Maßnahmen der SO<sub>2</sub>-Gehalt der Biere möglichst an die Grenze von 10 mg/l herangeführt werden.

### Das Verhalten ausgewählter Carbonyle bei der Bieralterung

Die Frage, inwieweit Carbonylverbindungen (besonders solche aus dem Lipidabbau) an den Vorgängen bei der Bieralterung beteiligt sind, beschäftigte in den letzten 25 Jahren zahlreiche Forscherkreise. Insbesondere die Verbindung (E)-2-Nonenal, die am Cardboard-Aroma beteiligt sein soll (19 – 28) wurde mit aufwendigen Analysensystemen verfolgt. Mit Hilfe des vorgeschilderten Analysensystems konnten (E)-2-Nonenal und andere Carbonyle im sub-ppb-Bereich quantifiziert werden. Es gelangten die fünf Biere aus den verschiedenen Brauereien (die 5 Monate bei 20 °C gelagert wurden) zur Untersuchung.

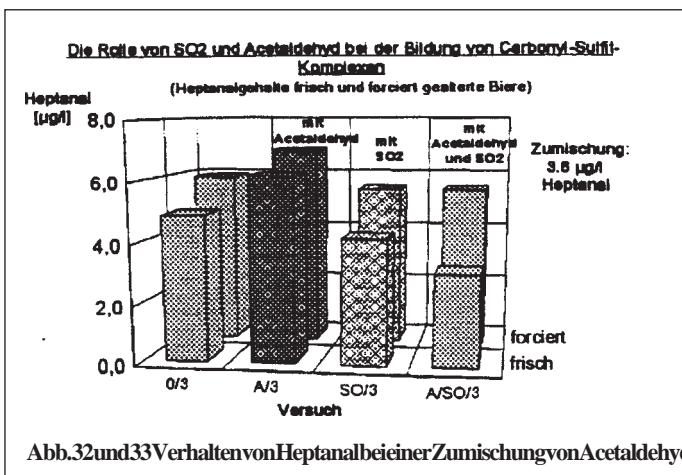
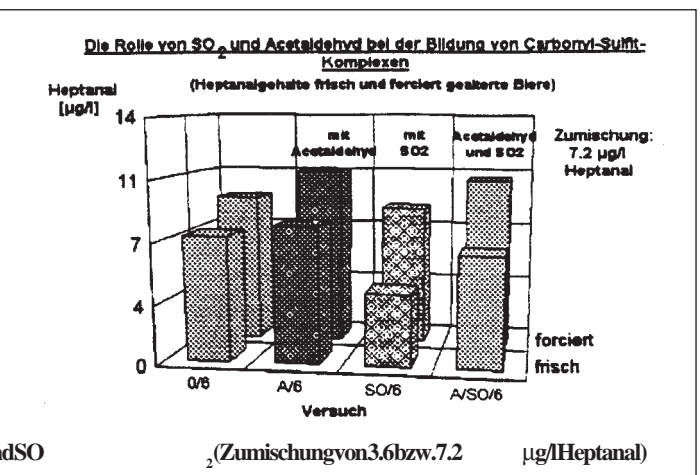


Abb.32 und 33 Verhalten von Heptanal bei einer Zumischung von Acetaldehyd und SO<sub>2</sub>



(Zumischung von 3,6 bzw. 7,2 µg/l Heptanal)

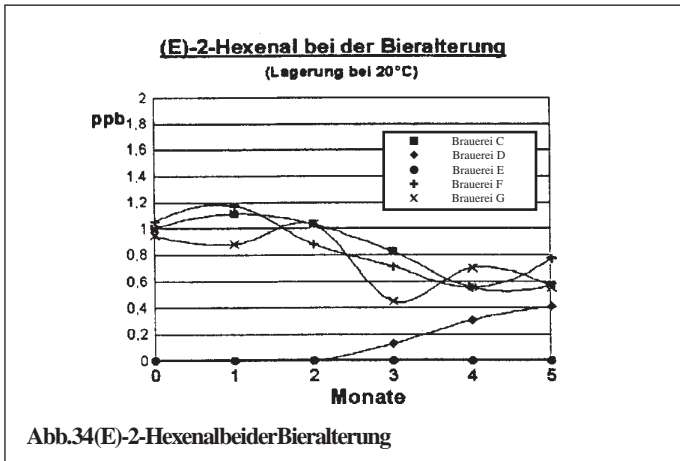


Abb.34(E)-2-HexenalbeiderBieralterung

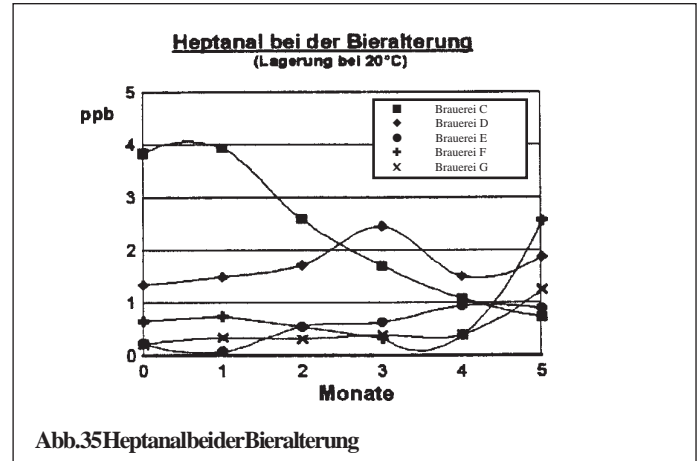


Abb.35HeptanalbeiderBieralterung

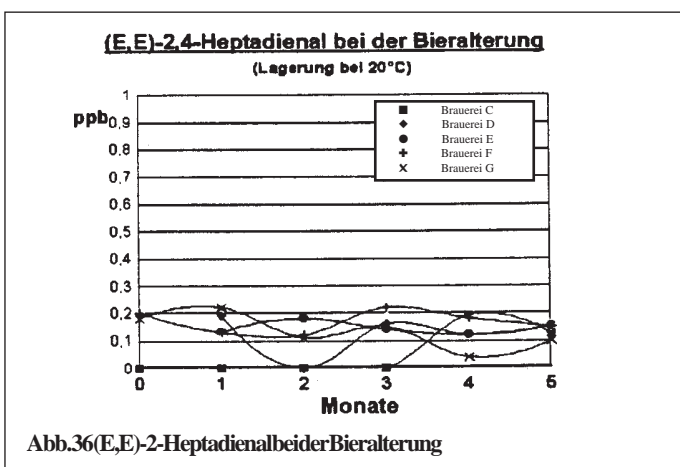


Abb.36(E,E)-2-HeptadienalbeiderBieralterung

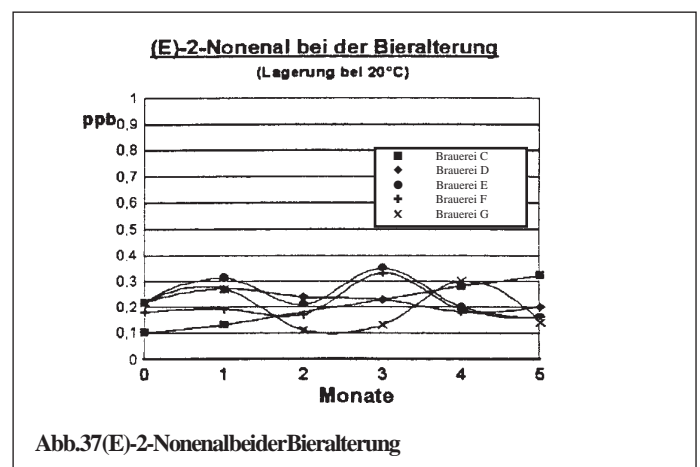


Abb.37(E)-2-NonenalbeiderBieralterung

Neben (E)-2-Nonenal sollten die Mengen von Hexanal, (E)-2-Hexenal, Heptanal und (E, E)-2,4-Heptadienal erfasst werden. Hexanal war aber durch Coelutionen mit anderen Substanzen nicht zuverlässig zu bestimmen.

Abb. 34 zeigt den Konzentrationsverlauf von (E)-2-Hexenal über fünf Monate hinweg. Diese Substanz nimmt in vier Brauereien tendenziell ab, lediglich zu einem Bier ist gegen Ende des Untersuchungszeitraumes eine Zunahme feststellbar. In einem Falle waren nur Spuren vorhanden (Bier E).

Heptanal ist in anderen Untersuchungen als eines der Carbonyle der Bieralterung gefunden worden (18). Der Konzentrationsverlauf in Abb. 35 läßt nur bei drei Bieren einen höheren Gehalt im gealterten denn im frischen Bier finden.

Das (E, E)-2-4-Heptadienal weist nach Abb. 36 nur Werte im Konzentrationsbereich bis 0,2 µg auf. Eine eindeutige Zu- und Abnahme ist während der Alterung nicht nachzuweisen. Ähnliches gilt für die Entwicklung des (E)-2-Nonenals (Abb. 37).

Die Konzentration des (E)-2-Nonenals liegt zwischen 0,1 – 0,3 mg/l. Bereits bei 0,1 µg/1 soll die Substanz ein cardboardähnliches Aroma verursachen. Dieses konnte aber in keinem Alterungszustand sensorisch festgestellt werden.

Von den untersuchten Carbonylen kann höchstens das Heptanal als zusätzliche Information zur Beurteilung des Alterungszustandes herangezogen werden. Sein Anstieg am Ende der Bieralterung kann trotz eines nicht immer eindeutigen Konzentrationsverlaufs als Indikator für eine Beteiligung von Heptanal bei der Bieralterung gewertet werden. Dafür sprechen auch frühere Forschungsarbeiten.

### Schlußfolgerungen

Mittels multidimensionaler Gaschromatographie wurden alle detektierbaren Aromastoffe in frischem, forciert gealterten und extrem altem Bier verfolgt und im halbqualitativen Maßstab verglichen. Es wurde versucht, die Aromastoffe, die sich bei der Bieralterung deutlich verändern, auf eine Analysenmethode zu übertragen, die einen höheren Probendurchsatz erlaubt. Aus den beschriebenen Untersuchungen lassen sich folgende wichtige Veränderungen im Aromastoffprofil der Biere während der Alterung ableiten:

- Einige der im Rahmen der Stoffwechselfähigkeit der Hefe gebildeten Ethyl- und Acetat-Ester nahmen mit zunehmender Lagerdauer signifikant ab. Andere Ester werden aus sich ausbildenden Reaktionspartnern neu formiert; sie liegen im gealterten Bier in höheren Mengen vor.
- Es wurde bestätigt, daß Carbonylverbindungen an den Aromaveränderungen im abgefüllten Bier durch einen Anstieg ihrer Konzentration Anteil haben.
- Sauerstoffheterocyclische Substanzen wie Furane und Furanone zeigten im gealterten Bier ein höheres Niveau.
- Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte (E)-2-Nonenal nicht als Leitkomponente für die Bieralterung bestätigt werden.

Zwischen der Konzentration an Alterungssubstanzen und der Intensität des Alterungsaromas ergab sich wie schon bei (1) eine starke Korrelation. Die Gehalte der wichtigsten Substanzen wurden zu Summenzahlen addiert, die geeignet sind, den Alterungszustand eines Bieres zu beschreiben. Um den Einfluß konzentra-

tionsstarker Substanzen zu relativieren, wurden dimensionslose Kennzahlen geschaffen.

Im Laufe der Bieralterung verliefen die Veränderungen im Aromastoffprofil in ähnlicher Weise, lediglich die Zunahme der Konzentration gestaltete sich je nach technologischen Gegebenheiten unterschiedlich.

Darüberhinaus konnte in Aromastoffe unterschieden werden, die zu Beginn der Bieralterung einen starken Zuwachs in ihren Mengen zeigen und solchen, die erst im fortgeschrittenen Alterungsstadium des Bieres zunehmen.

Im Anfangsstadium der Bieralterung nahmen folgende Aromastoffe zu: 3-Methyl-Butanal, 2-Furfural, 2-Phenyl-Ethanal, Nicotinsäure-Ethyl-Ester, 2-Acetylfuran,  $\gamma$ -Nonalacton, 2-Ethyl-Furfuryl-Ester, 2,4,5-Trimethyl-1,3-Dioxolan. Sie gingen (s. Tabelle 2) in die dimensionslose Berechnung des „Forcierindex“ ein.

Im fortgeschrittenen Alterungsstadium wiesen folgende Aromastoffe eine erhöhte Konzentration auf:

5-Methyl-2-Furfural, 2,4-Dimethyl-4-Cyclopenten-1,3-dion, Milchsäure-Ethyl-Ester, Bernsteinsäure-Diethyl-Ester, 2-Phenyl-essigsäure-Ethyl-Ester, 2-Propionyl-Furan, Dihydro-5,5-Dimethyl-1-(3H)-Furanon, 5,5-Dimethyl-2(5H)-Furanon. Sie wurden, zusammen mit einigen der ersten Kategorie in den dimensionslosen „Alterungsindex“ eingearbeitet.

Von großem Einfluß auf die Bieralterung war das bei der Gärung gebildete Schwefeldioxid. Das  $\text{SO}_2$  des Bieres nimmt bei der Alterung desselben ab. Es bilden sich  $\text{SO}_2$ -Carbonyl-Komplexe aus, wobei kurzkettige Aldehyde eine stärkere Affinität zum  $\text{SO}_2$  zeigen als längerkettige.

## Summary

**Narziß, L., Miedaner, H., and Lustig, S.: The behaviour of volatile aromatic substances as beer ages** — Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, No. 9/10, 164 – 175, 1999

## BC25Beer

It has been possible by means of multidimensional gas chromatography with mass spectrometry to detect further aromatic substances which show a significant increase as beer ages unlike in previous studies. The detectable range of aromatic substances can be classified according to the already known ageing indicators. Over and above this their substances were subdivided into those that showed a strong increase at the beginning of the beer ageing process and those with an increased concentration in the advanced ageing stage. The first substances are used in the calculation for the dimensionless „forcing index“; the latter were classified under the „ageing index“ with the incorporation of Strecker aldehydes and furfural. When following the beer ageing process there was a natural growth in carbonyls which were, however, weakened by (fermentation) $\text{SO}_2$ . Even oxygen heterocyclic substances such as furane and furanone occur more in aged beer. (E)-2-nonenal could not be confirmed to be the leading component responsible for the ageing of beer.

**Narziß, L., Miedaner, H., et Lustig, S.: Le comportement de composés volatils aromatiques au cours du vieillissement de la bière** — Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, No 9/10, 164 – 175, 1999

## BC25Bière

Au moyen de la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse multidimensionnelle on a trouvé, en plus des examens antérieurs, d'autres composés aromatiques qui au cours du vieillissement de la bière augmentaient de façon significative. Le spectre de composés aromatiques

détectables permettait de classer ces composés parmi les indicateurs de vieillissement déjà connus. De plus on a entrepris une subdivision des substances: celles qui présentaient une augmentation forte dès le début du vieillissement et celles qui présentaient une concentration accrue après un vieillissement avancé. Les premières servaient au calcul d'un «indice d'accélération», sans dimensions, les dernières, en intégrant les aldéhydes de Strecker et le furfural, servaient au classement de «l'indice de vieillissement». En suivant le vieillissement de la bière on a remarqué naturellement une augmentation des carbonyles qui toutefois subissaient une diminution par le  $\text{SO}_2$  (de la fermentation). Des substances hétérocycliques oxygénées également, telles que les furanes, les furanones apparaissaient de façon accrue dans la bière vieillie. Le (E)-2-nonenal ne pouvait pas être confirmé en tant que marqueur du vieillissement de la bière.

## Literatur

In der Originalarbeit waren 309 Literaturstellen bis 1993 aufgeführt. Hier sollen um der Übersichtlichkeit willen nur die für diese Ausführungen relevanten genannt werden.

1. Narziß, L., Miedaner, H., und Eichhorn, P.: Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, 49 – 57 und 80 – 85, 1999.
2. Mosandl, A., Fischer, K., Hener, U., Kreis, P., Rettinger, K., Schubert, V., und Schmarr, H.G.: Journ. of Agric. Food Chem. 39, 1131, 1991.
3. Mosandl, A.: Kontakte, Schriftreihe der Fa. Merk 3, 38, 1993.
4. Grosch, W.: in Lebensmittelqualität: Wissenschaft und Technik, Rolf Stute (Hrsg.), VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim 47, 1989.
5. Schieberle, P., und Grosch, W.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 185, 111, 1987.
6. Schieberle, P., und Grosch, W.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 189, 26, 1989.
7. Schieberle, P., Grosch, W., Z. Lebensm. Unters. Forsch. 192, 130, 1991.
8. Mück, E.: Der Weihenstephaner 53, 134, 1984.
9. Narziß, L., Miedaner, H., und Schöndorfer, H.: Monatsschrift für Brauwissenschaft 36, 236 – 241, 1983.
10. Irwin, A.J., Baker, R.L., und Pipasts, P.: Journal of ASBC 49, 140, 1991.
11. Kübrich, J.: Diplomarbeit TU München-Weihenstephan 1992.
12. Barker, R.L., Gracey, D.E.F., Irwin, A.J., Pipasts, P., und Leiska, E.: Journal of ASBC 47, 9, 1989.
13. Gyllang, H., Winge, M., und Korch, C.: EBC Proceedings 346, 1989.
14. Gyllang, H., Winge, M., und Korch, C.: Bulletin of the EBC-Biochemistry-Group Meeting, Copenhagen 127, 1990.
15. Nordlöv, H., und Winell, B.: EBC Proceedings 271, 1983.
16. Brewer, J.D., und Fenton, M.S.: Proc. of the Conv. of Inst. of Brewing Australia & New Zealand Sect. 16, 158, 1980.
17. Ohno, T., und Takahashi, R.: Rep. Res. Lab. Kirin Brewery & Co. 30, 15, 1987.
18. Eichhorn, P.: Dissertation TU München-Weihenstephan, 1991.
19. Eichhorn, P., Komori, T., Miedaner, H., und Narziß, L.: EBC Proceedings 717, 1989.
20. Garza-Ulloa, H., Villareal-Garza, R., und Canales, A.M.: The Brewers Digest 48, 1976.
21. Graf, H.: Dissertation TU München-Weihenstephan 1985.
22. Jamieson, A.M., und Chen, E.C.H.: ASBC-Proceedings 30, 92, 1972.
23. Jamieson, A.M., und Ghelhuwe, G.: ASBC-Proceedings 28, 192, 1970.
24. Meilgaard, M., und Moya, E.: MBAA Technical Quarterly 7, 135, 1970.
25. Sakuma, S., und Kowaka, M.: Journal of ASBC 51, 1993.
26. Steenros, L.E., Siebert, K.J., Meilgaard, M.C., und Wang, P.: MBAA Technical Quarterly 13, 227, 1976.
27. Verhagen, L.C., Strating, J., und Tjaden, U.R.: Journal of Chromatography 393, 85, 1987.
28. Zufall, C.: Diplomarbeit TU Berlin 1990.