

C. Forster, J. Schwieger, L. Narziß, W. Back, M. Uchida, M. Ono und K. Yanagi

Untersuchungen zur Geschmacksstabilität von Bier mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie freier Radikale

Die Oxidationsvorgänge bei der Bieralterung werden durch reaktive Sauerstoffformen eingeleitet. Besondere Bedeutung kommt dabei den äußerst reaktiven Hydroxylradikalen zu. Mit einer neuen Methode wird der Anstieg der Hydroxylradikale in einem oxidativen Forciertest von Bier ermittelt. Die Erfassung der Radikale erfolgt durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie. Die hierbei ermittelte „Lag-Time“ ist eine Kennzahl für die endogene antioxidative Aktivität von Bier. Sie liegt in hellen, untergärigen Bieren im Bereich von 0 bis 130 Minuten. Zwischen der antioxidativen Aktivität frischer Biere und der sensorisch ermittelten Geschmacksstabilität besteht ein signifikanter Zusammenhang. Je höher die antioxidative Aktivität eines Bieres ist, umso später tritt der Alterungsgeschmack nach der Abfüllung in Erscheinung. Eine hohe antioxidative Aktivität mit einer Lag-Time im Bereich von über 80 Minuten stellt eine wichtige Grundlage dar, um die Alterungsvorgänge im abgefüllten Bier zu verzögern. Der Gehalt an phenolischen Verbindungen, als auch die Bestimmung des Reduktionsvermögens in Bier, lassen keinen direkten Zusammenhang mit der antioxidativen Aktivität erkennen. Lediglich zwischen der Lag-Time und dem Gesamtschwefeldioxidgehalt im Bier konnte eine Beziehung nachgewiesen werden.

BC 3 Chemisch-technische Brauereibetriebskontrolle / 25 Bier

(Descriptor: Geschmacksstabilität, antioxidative Aktivität, Lag-Time, Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR), Hydroxylradikale.

Descriptors: flavour stability, antioxidant activity, lag time, electron spin resonance spectroscopy (ESR), hydroxyl radicals).

1 Einleitung

Die Erwartung der Konsumenten hinsichtlich der Qualität eines Lebensmittels nimmt ständig zu. Es ist deshalb für eine Brauerei wichtig, für eine gleichbleibende Qualität zu sorgen. Der Verbraucher mißt das Produkt am Aussehen und Aroma. Das Aroma, das aus dem Zusammenwirken von Geruchs- und Geschmacksempfindungen resultiert, sollte deshalb über den gesamten Zeitraum der angegebenen Mindesthaltbarkeit möglichst gleichbleiben. Der Voraussage und analytischen Bewertung der Geschmacksstabilität von Bier kommt daher eine immer stärkere Bedeutung zu.

Die sensorische Beurteilung von Bier ist das wichtigste Merkmal, um die Geschmacksstabilität zu überprüfen. Hierbei wird das Auftreten von Alterungsnoten in einem definierten Alterungsstadium von einem entsprechend geschulten Verkosterpanel ermittelt. Der zeitliche Aufwand hierfür ist zum einen relativ hoch, zum

anderen ist es nicht möglich, schon direkt nach der Abfüllung oder in einem früheren Stadium der Bierbereitung, eine Aussage über die zu erwartende Geschmacksstabilität zu treffen.

Der Entwicklung analytischer Methoden zur Ermittlung der Geschmacksstabilität von Bier wird daher große Bedeutung beigegeben. Die Erfassung flüchtiger Aromaverbindungen, die für das Auftreten von Alterungsnoten verantwortlich sind, ist äußerst schwierig, da diese zum Großteil im Spurenbereich vorliegen und im Laufe der Flaschenbierlagerung teilweise einer dynamischen Veränderung unterliegen. Die meisten Methoden zur Vorhersage der Geschmacksstabilität in Bier beruhen auf statistischen Korrelationen mit dem Auftreten des Alterungsgeschmacks während der Flaschenbierlagerung.

Die in jüngerer Zeit entwickelten Methoden basieren auf der Erfassung flüchtiger Verbindungen, die einen signifikanten Anstieg im Laufe der Bieralterung erfahren (17, 18), auf analytischen Kennzahlen, die mit einer Zunahme des Alterungsgeschmacks einhergehen (12, 20) und auf der Bestimmung nichtflüchtiger Bierinhaltsstoffe (7), die bei der Flaschenbierlagerung abnehmen. Daneben existieren Methoden, mit denen auf elektrometrischem Weg durch die Bestimmung des Redoxpotentials versucht wird, eine Aussage über die Geschmacksstabilität zu treffen (5) sowie auf photoelektronischem Weg über die Messung der Chemilumineszenz (9).

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine neuentwickelte Methode (21, 22) zur Beurteilung der Geschmacksstabilität in Bier untersucht. Die Methode beruht auf der Messung reaktiver Hydroxylradikale in Bier mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR).

Nachfolgend wird der Zusammenhang zwischen dieser neuen Methode und der Geschmacksstabilität von Bier dargestellt. Desweiteren wird die Beziehung mit Inhaltsstoffen des Bieres, die in Zusammenhang mit der Geschmacksstabilität und im besonderen mit dieser Methode stehen, untersucht.

Autoren: Dr. Clemens Forster, Dipl.-Ing. Jan Schwieger, em. Prof. Dr. Ludwig Narziß, Prof. Dr. Werner Back, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, TUM, D-85350 Freising-Weihenstephan und M. Uchida, M. Ono, K. Yanagi, Suntory Ltd., Technological Development Center, Osaka 618/ Japan

2 Material und Methoden

2.1 Verwendetes Probenmaterial und forcierte Alterung der Biere

Untergärige, helle Biere (helle Vollbiere, Pilsener Biere) wurden direkt von verschiedenen deutschen Brauereien bezogen. Dadurch wurde sichergestellt, daß die Biere innerhalb einer Woche nach der Flaschenabfüllung zur Untersuchung herangezogen werden konnten. Bis zu ihrer Verarbeitung wurden die Biere dunkel bei 0 °C gelagert.

Zur Darstellung einer künstlich beschleunigten Alterung wurde ein Teil der Flaschen einem Forciertest unterzogen. Hierbei werden die Biere 24 Stunden bei ca. 20 °C auf einem Horizontalschüttler mit einer Frequenz von 100 min⁻¹ geschüttelt und anschließend 96 Stunden bei 40 °C dunkel gelagert (6, 14).

2.2 Die Bestimmung der endogenen antioxidativen Aktivität mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie freier Radikale

2.2.1 Aktivierung von Sauerstoff und Entstehung des Hydroxylradikals bei der Bieralterung

Molekularer Sauerstoff gelangt vor allem bei der Abfüllung ins Bier und diffundiert aus dem Kopfraum ins Bier. Da molekularer Sauerstoff ein relativ stabiles Molekül ist, muß er aktiviert werden, bevor er mit anderen Verbindungen Reaktionen eingehen und seine schädigende Wirkung im abgefüllten Bier entfalten kann.

Abbildung 1 zeigt die Beziehung zwischen Sauerstoff und aktivem Sauerstoff (21).

Im Grundzustand liegt molekularer Sauerstoff O₂ im Triplett- oder Singulett-Zustand vor, d.h. er besitzt zwei ungepaarte Elektronen mit parallelem Spin. Durch Aufnahme eines Elektrons mit entgegengesetztem Spin erhöht sich das Energieniveau und es entsteht das reaktivere Superoxidradikalanion. Die Aktivierung mit einem Elektron führt zum Peroxidation und die weitere Aufnahme eines Elektrons und Protonierung mit zwei Wasserstoffionen schließlich zu Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid wird unter katalytischer Wirkung von Metallionen, wie es die Fenton- und die Haber-Weiss-Reaktion beschreiben, in das äußerst reaktive Hydroxylradikal und Hydroxylion gespalten.

Um die Aktivierung bzw. Reduktion von Sauerstoff bei der Bieralterung einzuleiten, werden Bierinhaltsstoffe oxidiert (Abb. 2). Das unter Beteiligung von Metallionen im Grundzustand aus Wasserstoffperoxid entstehende Hydroxylradikal reagiert seinerseits mit Alterungsvorstufen und oxidiert diese zu den entsprechenden Alterungsaromastoffen. Abbildung 2 zeigt die Hypothese der Ausbildung des Alterungsgeschmacks in Bier (21).

Das Hydroxylradikal ist außerordentlich reaktiv und reagiert unselektiv mit organischen Bierinhaltsstoffen. Es nimmt bei der

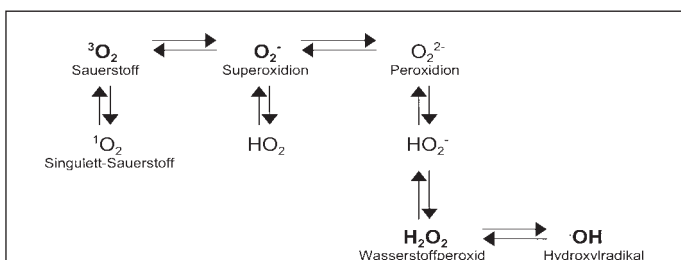


Abb. 1 Die Aktivierung von Sauerstoff bei der Bieralterung (21)

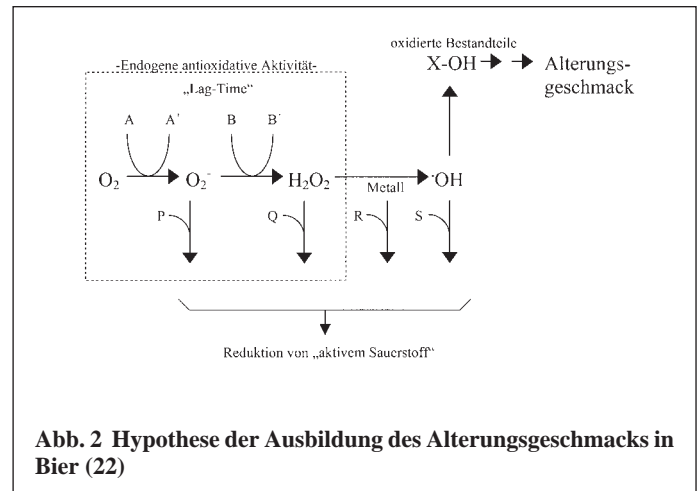


Abb. 2 Hypothese der Ausbildung des Alterungsgeschmacks in Bier (22)

Bieralterung als letzte und reaktivste Stufe eine Schlüsselposition ein. Kann die Entstehung des Hydroxylradikals verhindert werden, so wird das Auftreten des Alterungsgeschmacks verzögert. Bier ist aufgrund seiner Inhaltsstoffe in der Lage, über einen bestimmten Zeitraum, der sogenannten „Lag-Time“, die Bildung von Hydroxylradikalen zu verhindern und somit die Ausbildung des Alterungsgeschmacks zu verzögern.

Reduzierenden Verbindungen kommt hierbei eine bedeutende Rolle zu, da sie durch Abfangen der aktivierten Formen von Sauerstoff die Entstehung des reaktiven Hydroxylradikals verhindern. Da diese reduzierenden Verbindungen, wie Reduktone, Polyphenole (23), Maillardreaktionsprodukte (25) oder Bisulfitverbindungen (10, 11, 22) natürliche Inhaltsstoffe des Bieres sind, spricht man von „endogener antioxidativer Aktivität“ von Bier. Die Lag-Time stellt somit ein Maß für die antioxidative Aktivität von Bier dar.

2.2.2 Funktionsprinzip der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die Anwendung der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie in der Brauereianalytik ist eine neue Entwicklung, daher sollen nachfolgend die Hintergründe näher erläutert werden.

Der direkte Nachweis von Radikalen ist nur durch die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie möglich. Dabei macht man sich bei der ESR-Spektroskopie die Tatsache zunutze, daß ungepaarte Elektronen, welche das Wesensmerkmal von Radikalen darstellen, sich aufgrund ihres Spins in einem äußeren Magnetfeld parallel mit den Feldlinien oder genau entgegengesetzt dazu ausrichten (19).

Der schematische Aufbau eines Elektronenspinresonanz-Spektrometers ist in Abbildung 3 dargestellt (1). Eingestrahlte Energie wird von Materie absorbiert, wodurch das ungepaarte Elektron von einem niedrigen in einen höheren Energiezustand überführt wird. Die Energie für einen Übergang vom niedrigen in den höheren Energiezustand, liegt hierbei im Mikrowellenbereich (X-Band). Sie wird von der Mikrowellenstrecke in den Hohlraumresonator eingespeist, der die Probe mit den ungepaarten Elektronen enthält. Wird durch das Umklappen der Elektronen Energie absorbiert, dann registriert die Detektordiode in der Mikrowellenstrecke diesen Verlust. Um ein Absorptionsspektrum aufzunehmen, werden die freien Elektronen in einem modulierten Magnetfeld in Resonanzschwingung versetzt. Die von den Elektronen absorbierte Energie wird detektiert und in ein Signal umgewandelt.

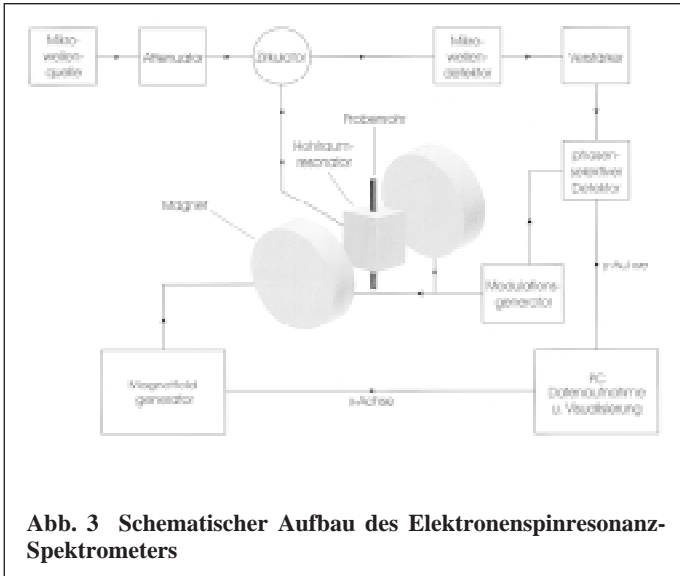


Abb. 3 Schematischer Aufbau des Elektronenspinresonanz-Spektrometers

2.2.3 Ermittlung der Lag-Time in einem oxidativen Forciertest

Zur Ermittlung der Lag-Time wird Bier einem oxidativen Forciertest bei 60 °C unterworfen. Der Luftsauerstoff, der sich über der Bierprobe befindet, diffundiert hierbei ins Bier und wird bei 60 °C in seine aktiven Formen überführt. Aufgrund der hohen Reaktivität der Hydroxylradikale ist es erforderlich, diese mit Hilfe eines „Spintrap-Reagenzes“ einzufangen und zu stabilisieren, um sie auf diese Weise der ESR-Messung zugänglich zu machen. *N-tert-Butyl-α-phenylnitron* (PBN) wird daher zu Beginn des Forciertests der Bierprobe zugesetzt. Hierdurch werden stabile PBN-Spin-Addukte gebildet (Abb. 4). Von diesen werden im ESR-Spektrometer die Spektren aufgenommen. Abbildung 5 zeigt den Mechanismus der Erfassung freier Radikale in Bier (24). Jüngste Untersuchungen ziehen die Möglichkeit in Betracht, daß es sich bei den mit PBN detektierten Radikalen nicht um Hydroxylradikale, sondern um 1-Hydroxyethyl-Radikale handelt (15). Diese könnten mit gelöstem Sauerstoff weiter zu 1-Hydroxyethylperoxy-Radikalen reagieren, die möglicherweise zu Wasserstoffperoxid reduziert werden und so die Radikalkette durch Reaktion mit Eisen- und Kupferionen aufrecht erhalten (15).

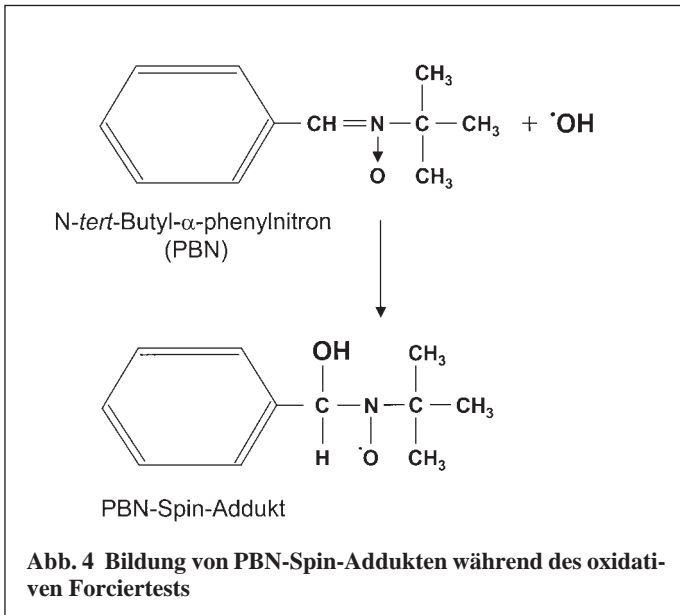


Abb. 4 Bildung von PBN-Spin-Addukten während des oxidativen Forciertests

Reagenzien:

N-tert-Butyl-α-phenylnitron (PBN) 98% (Aldrich Chemical Co., Nr. 18,027-0); Ethanol puriss. p.A. (Fluka); 4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpyridin-1-oxyl (4-Oxo-tempo), (Aldrich Chemical Co., Nr. 17,948-5); Wasser zweifach demineralisiert (Millipore Corp.).

Durchführung:

Auf 0 °C gekühltes Bier wird 1 Minute lang im Ultraschallbad von Kohlendioxid befreit. 5 ml entgastes Bier werden in ein braunes Reagenzglas mit Schliff pipettiert. 100 µl 2,55 M PBN-Lösung (in 50% EtOH) werden der Bierprobe zugesetzt, mit einem Glasstopfen verschlossen und intensiv durchmischt.

Bevor der oxidative Forciertest im 60 °C Wasserbad gestartet wird, wird zum Zeitpunkt t = 0 das erste ESR-Spektrum aufgenommen. Die Aufnahme des ESR-Spektrums erfolgte mit einem ESR-Spektrometer (JES-FR30, Jeol Ltd. Tokyo, Japan) mit einem TE011 Hohlraumresonator. Hierzu werden ca. 80 µl Probe aus dem braunen Reagenzglas in eine flache ESR-Quartzküvette (ES-LC12, Jeol Ltd.) gesaugt. Die Quartzküvette wird in den Hohlraumresonator des ESR-Spektrometers eingeführt und die Spektren bei folgenden Bedingungen aufgenommen: micro wave power, 4 mW; magnetic field center, 336 mT; sweep-width, 5 mT; sweep time, 4 min.; modulation width, 0.1 mT; amplification, 200; time constant, 1 s; Temperatur, 20 °C (Raumtemperatur).

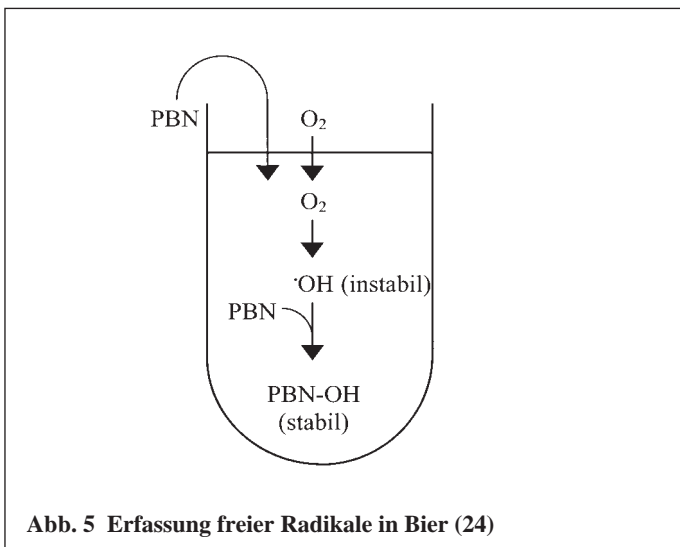


Abb. 5 Erfassung freier Radikale in Bier (24)

Anschließend wird der oxidative Forciertest im 60 °C Wasserbad gestartet. Im Abstand von 20 min. werden über eine Zeitspanne von 180 min. die ESR-Spektren der gebildeten PBN-Spin-Addukte aufgenommen. Die Konzentration der PBN-Spin-Addukte ist der Höhe der 1. Transition am linken Ende des Spin-Addukt-Spektrums proportional (ΔS in Abb. 6). Die relativen Signalintensitäten der PBN-Spin-Addukte, gebildet aus dem Quotienten aus der Signalintensität des PBN-Spin-Addukts und der Signalintensität von Mn²⁺ werden über den Forciertestzeiten aufgetragen (Abb. 7). Durch die linearen Abschnitte der erhaltenen Kurve wird jeweils eine Ausgleichsgerade gelegt und aus dem Schnittpunkt der beiden Geraden die Lag-Time in Minuten berechnet. Durch Kalibrierung mit dem freien Radikal 4-Oxo-tempo kann die Konzentration der Hydroxylradikale als 4-Oxo-tempo-Äquivalent ausgedrückt werden (Abb. 7). Die ESR-Bedingungen werden täglich mit der Signalintensität von Mn²⁺ überprüft.

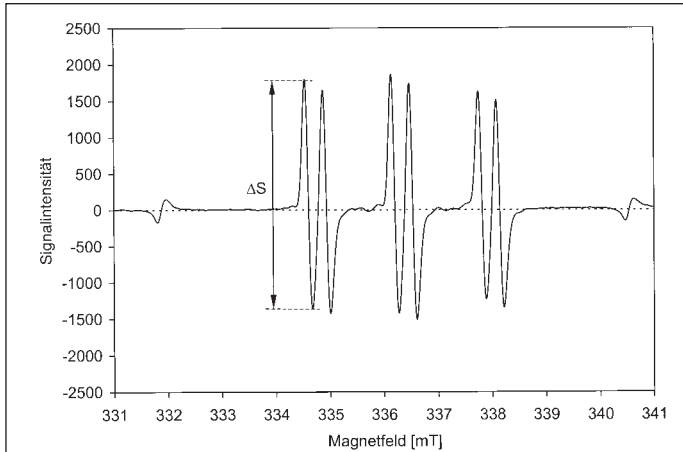


Abb. 6 Aufnahme des PBN-Spin-Addukt-Spektrums (das erste und das letzte ESR-Signal stammen von Mn^{2+})

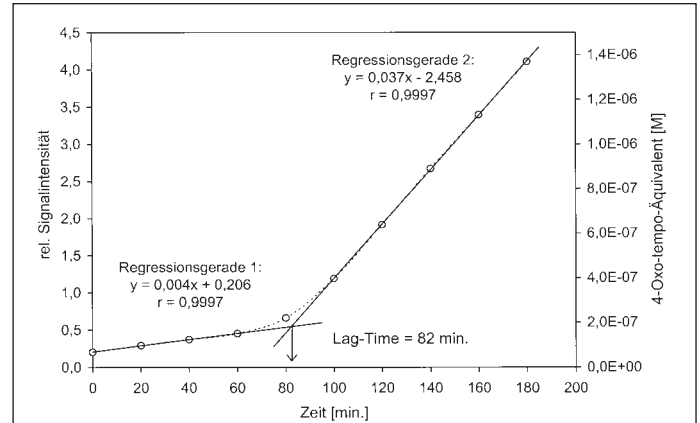


Abb. 7 Berechnung der Lag-Time

2.2.4 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Lag-Time-Bestimmung wurde durch vierfache Wiederholungsmessung bei verschiedenen Bieren überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Der Variationskoeffizient liegt bei einer vierfachen Wiederholung aus einer Flasche im Durchschnitt bei 1,9 % (95%-Konfidenzintervall bei 2,1 min.) (13). Bei der vierfach-Wiederholung aus 4 unterschiedlichen Flaschen derselben Abfüllung liegt der Variationskoeffizient durchschnittlich bei 3,1 % (95%-Konfidenzintervall bei 3,8 min.).

2.3 Sonstige Methoden

2.3.1 Alterungsverkostung

Die sensorische Beurteilung der untersuchten Biere erfolgte im frischen und forciert gealterten Zustand durch ein geschultes Verkosterpanel. Es kam ein Alterungsverkostungsschema zur Anwendung, bei dem nur das Auftreten von Alterungsaromanoten in die Bewertung eingeht (6). Die Bewertung erfolgt in Halbnotenschritten jeweils für die Kriterien Geruch, Trunk und Bittere mit folgenden Abstufungen: 1 = frisch, 2 = leicht gealtert, 3 = stark gealtert, 4 = extrem gealtert. Die resultierende Alterungsnote wird

aus den Einzelnoten nach der Formel $(2 \times \text{Geruch} + 2 \times \text{Trunk} + \text{Bittere})/5$ errechnet.

2.3.2 Alterungsindikatoren

Mit der gaschromatographischen Bestimmung der Alterungsindikatoren in Bier werden flüchtige Substanzen erfasst, die bei der Lagerung von Flaschenbier in Abhängigkeit von Temperatur, Sauerstoffgehalt des Bieres und Zeit einen signifikanten Anstieg erfahren (14, 2). Aus der Zunahme der Alterungskomponenten während der Lagerung, kann in Kombination mit der sensorischen Analyse des Bieres, eine Aussage über die Geschmacksstabilität getroffen werden. Die Indikatorsubstanzen zeigen eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten des Alterungsgeschmacks im Bier.

2.3.3 Analytische Methoden für die Bestimmung des Reduktionsvermögens, Schwefeldioxid und phenolischer Verbindungen

Das Reduktionsvermögen in Bier wurde spektralphotometrisch nach MEBAK Methode 2.20.1, der Gesamtschwefeldioxidgehalt mit der Destillationsmethode nach MEBAK 2.29.2, die Gesamt-

Tabelle 1 Reproduzierbarkeit der Lag-Time-Messung

Lag-Time (min.)	Bier A ¹	Bier B ¹	Bier C ¹	Bier D ¹	Bier E ²	Bier F ²
Nr. 1	52	67	87	80	60	98
Nr. 2	50	64	87	80	57	103
Nr. 3	52	65	90	83	62	99
Nr. 4	50	65	88	80	60	103
Mittelwert	51	65	88	81	60	101
Standardabweichung	1,2	1,3	1,4	1,5	2,1	2,6
Variationskoeffizient	2,3	1,9	1,6	1,9	3,5	2,6
Konfidenzintervall (95%)	1,8	2,0	2,2	2,4	3,3	4,2

1 Wiederholung aus derselben Flasche

2 Wiederholung aus verschiedenen Flaschen derselben Abfüllung

polyphenole nach MEBAK 2.21.1, die Anthocyanogene nach MEBAK 2.21.2 (3) und die Tannoide nach MEBAK 2.17.3 (4) bestimmt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Zusammenhang zwischen der endogenen antioxidativen Aktivität und der Geschmacksstabilität

Es wurde die endogene antioxidative Aktivität von 169 untergärigen, hellen Bieren verschiedener deutscher Brauereien im frischen Zustand untersucht. Abbildung 8 zeigt die Verteilung der Lag-Time dieser Biere. Die ermittelten Lag-Time-Werte lagen zwischen 0 und 130 Minuten. Bei einer Lag-Time von 0 Minuten war gleich zu Beginn des oxidativen Forciertests ein stetiger Anstieg der Hydroxylradikalkonzentration zu verzeichnen. Die durchschnittliche Lag-Time der untersuchten Biere lag bei 59 Minuten. Bei ca. 60% der untersuchten Biere lag die Lag-Time im Bereich von 40 bis 70 Minuten.

Die sensorische Analyse stellt das wichtigste Kriterium dar, mit der die Veränderungen des Bieraromas nach der Flaschenabfüllung direkt erfaßt werden können. Da die Veränderungen des Bieraromas im Laufe der Flaschenbieralterung oft erst nach einigen Wochen bis Monaten deutlich in Erscheinung treten, wird eine forcierte Alterung des Bieres bei erhöhten Temperaturen durchgeführt (vgl. 2.1).

Abbildung 9 gibt den Zusammenhang zwischen der Lag-Time frischer Biere und der Alterungsnote im forciert gealterten Zustand wieder. Es zeigt sich, daß zwischen der Lag-Time im frischen Zustand und der Alterungsnote im forciert gealterten Zustand eine lineare Abhängigkeit mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,781 besteht. Bei der Prüfung des Korrelationskoeffizienten über die Nullhypothese ergibt sich mit einer Konfidenzzahl von 99,9% ein gesicherter linearer Zusammenhang zwischen der Lag-Time und der Alterungsverkostung (13). Legt man die Hypothese zur Ausbildung des Alterungsgeschmacks (siehe Abb. 2) zugrunde, so besteht zwischen der endogenen antioxidativen Aktivität, bestimmt durch die Lag-Time, und der Geschmacksstabilität nicht nur ein formaler, sondern auch ein kausaler Zusammenhang.

Aus dem Zusammenhang zwischen der Lag-Time und der Alterungsnote der 96 untersuchten Biere kann ferner abgelesen werden, daß Biere mit einer Lag-Time unter 20 Minuten im allgemei-

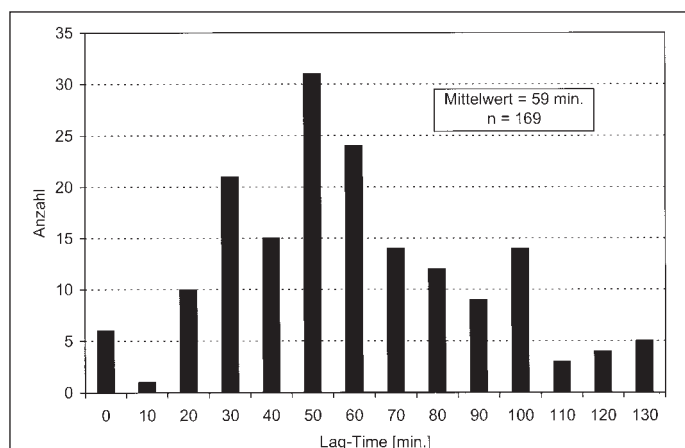


Abb. 8 Verteilung der Lag-Time von 169 untersuchten Bieren

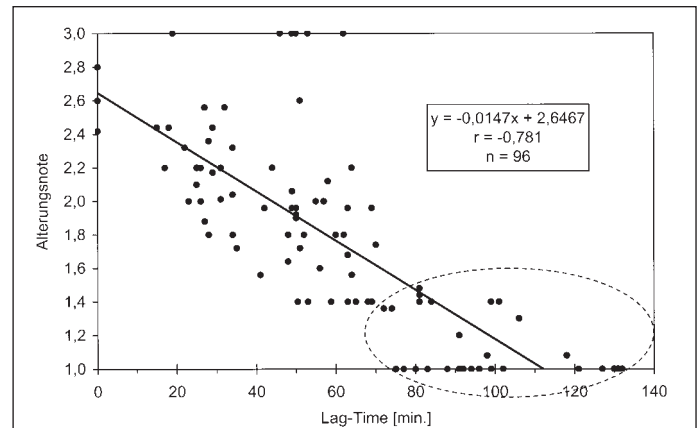


Abb. 9 Zusammenhang zwischen der Lag-Time in frischem Bier und dem Alterungsgeschmack

nen eine geringe Geschmacksstabilität aufweisen. Die Alterungsnote der forciert gealterten Biere liegt dann über 2,2. Bei einer Lag-Time im Bereich von 80 Minuten oder darüber, war bei allen untersuchten Bieren eine hohe Geschmacksstabilität festzustellen. Die Alterungsnote lag in diesem Fall unter 1,5. Im mittleren Bereich von 30 bis 70 Minuten kann keine genaue Aussage getroffen werden, da es hier sowohl Biere gibt, die im forciert gealterten Zustand eine geringe Geschmacksstabilität aufweisen, als auch Biere mit einer guten Geschmacksstabilität. Im Lag-Time-Bereich über 80 Minuten scheint die endogene antioxidative Aktivität einen guten Schutz gegenüber schädlichen Radikalreaktionen im abgefüllten Bier zu bieten, was sich in einer hohen Geschmacksstabilität der Biere äußert.

3.2 Veränderung der antioxidativen Aktivität bei der Bieralterung

Die Überprüfung der Geschmacksstabilität in forciert gealtertem Bier stellt eine praktikable Möglichkeit dar, das Auftreten des Alterungsaromas zu einem möglichst frühen Zeitraum nach der Flaschenabfüllung zu erfassen. Die forcierte Alterung ist aber letztendlich eine Momentaufnahme, die die Vorgänge während einer sechsmonatigen Lagerzeit des Bieres nach der Abfüllung nur bedingt wiedergeben kann.

Über einen Zeitraum von 32 Wochen wurde bei einer Lagertemperatur von ca. 25 °C die Veränderung der Lag-Time von zwei untergärigen, hellen Bieren nach der Abfüllung untersucht. Abbildung 10 zeigt die Veränderung der Lag-Time beider Biere in diesem Zeitraum. Die Lag-Time von Bier A fällt innerhalb von 14 Wochen nach der Abfüllung von 88 min. im frischen Zustand auf ca. 50 min ab. Dies entspricht ungefähr der Abnahme der Lag-Time vom frischen zum forciert gealterten Bier (vgl. 2.1). Im weiteren Verlauf der 32wöchigen Lagerung bleibt dieser Wert relativ konstant. Nach 15 Monaten lag die Lag-Time noch bei 20 Minuten.

Bei Bier B mit einer Lag-Time im frischen Zustand von 46 min ist bereits nach 8 Wochen keine Lag-Time mehr feststellbar (Lag-Time = 0 min). Dieser Wert erfährt im weiteren Verlauf keine Veränderung mehr und liegt nach 15 Monaten noch bei 0 Minuten. Im forciert gealterten Zustand lag bei Bier B die Lag-Time bereits bei 0 Minuten.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Alterungsverkostung der Veränderung der Lag-Time während der Lagerung bei 25 °C gegenübergestellt. Bier B mit einer Lag-Time von 46 min im

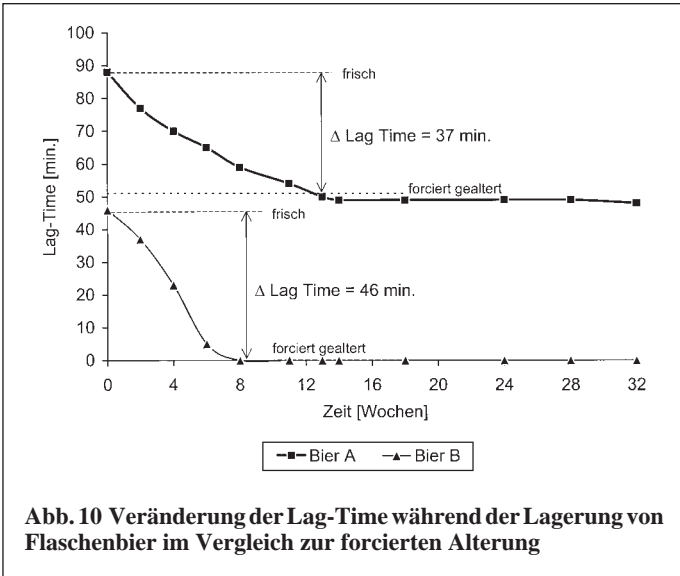


Abb. 10 Veränderung der Lag-Time während der Lagerung von Flaschenbier im Vergleich zur forcierten Alterung

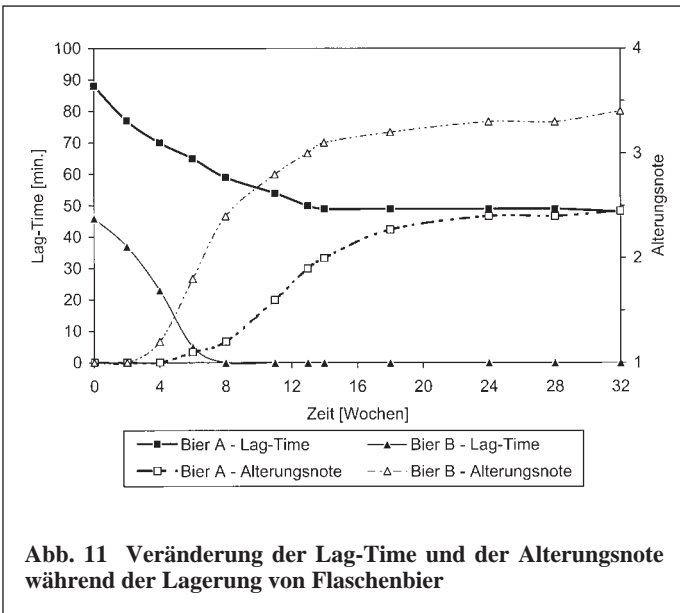


Abb. 11 Veränderung der Lag-Time und der Alterungsnote während der Lagerung von Flaschenbier

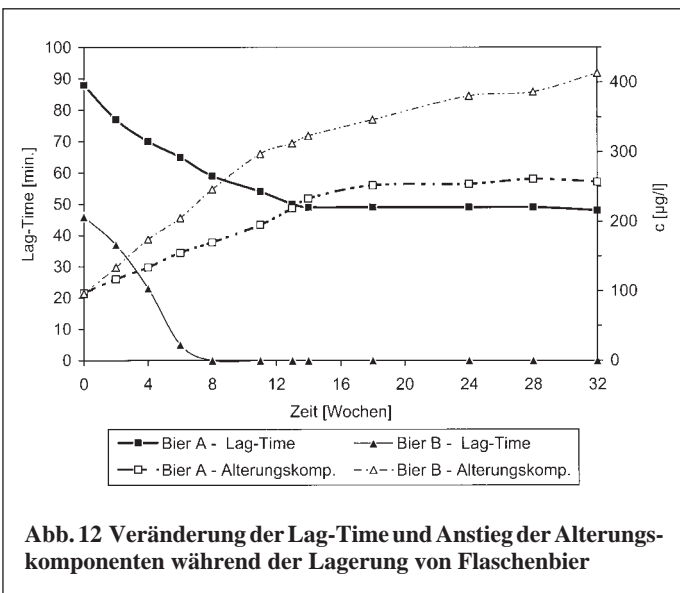


Abb. 12 Veränderung der Lag-Time und Anstieg der Alterungskomponenten während der Lagerung von Flaschenbier

frischen Zustand erfährt einen relativ steilen Anstieg der Alterungsnote. 9 Wochen nach der Abfüllung erreicht die sensorisch ermittelte Alterungsnote bereits das Niveau des forciert gealterten Bieres (Alterungsnote 2,5), wohingegen das Bier mit der hohen Lag-Time (Bier A) erst gegen Ende der 32wöchigen Lagerzeit diesen Alterungszustand erreicht.

Der stärkste Anstieg des Alterungsgeschmacks fällt bei beiden Bieren in den Bereich der steilsten Abnahme der Lag-Time.

Entsprechend den Verläufen der Lag-Time und der Alterungsverkostung verzeichnet das Bier mit der höheren Lag-Time einen geringeren Anstieg der Alterungsindikatoren (Abb. 12).

3.3 Korrelation der Lag-Time mit bestimmten Inhaltsstoffen des Bieres

Aus den vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lag-Time und der Geschmacksstabilität. Um weiterreichende Erkenntnisse zu gewinnen, wurden von 9 Bieren mit unterschiedlicher Lag-Time zusätzliche Analysen durchgeführt, die u.U. eine Beziehung zur endogenen antioxidativen Aktivität erwarten lassen. Hierbei handelt es sich um die Bestimmung phenolischer Verbindungen wie Gesamtpolyphenole, Anthocyanogene, Tannine, des Reduktionsvermögens und des Gehalts an Gesamtschwefeldioxid, die in den frischen Bieren analysiert wurden. Außerdem wurde die Korrelation zwischen der Lag-Time und der Konzentration alterungsrelevanter Verbindungen in frischem und forciert gealtertem Bier untersucht.

Zwischen der Lag-Time und dem Gehalt an Gesamtpolyphenolen, Anthocyanogenen, Tanninen und dem Reduktionsvermögen konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Tabelle 2). Bei den phenolischen Verbindungen spielt die Struktur, d.h. die Anordnung funktioneller Gruppen, eine wesentliche Rolle für pro- oder antioxidatives Verhalten (23). Spezifischere Analysemethoden wie die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie müssen herangezogen werden, um genauere Erkenntnisse über diese Stoffgruppen und ihren Einfluß auf die antioxidative Aktivität von Bier zu erhalten.

Zwischen der Lag-Time und dem Gehalt an Gesamtschwefeldioxid im Bier besteht ein mit einer Konfidenzzahl von 99% signifikanter, linearer Zusammenhang (Abb. 13). Schwefeldioxid kann auf zwei Wegen einen positiven Einfluß für die Geschmacksstabilität leisten: Zum einen kann es als natürliches Antioxidans Sauerstoff reduzieren. Zum anderen kann Schwefeldioxid mit

Tabelle 2 Antioxidative Aktivität im Bier und der Gehalt an phenolischen Verbindungen					
Bier-Nr.	Lag-Time (min.)	Reduktionsvermögen (%)	Gesamtpolyphenole (mg/l)	Anthocyanogene (mg/l)	Tannine (mg/l)
1	112	50	124	25	0
2	104	59	142	40	22
3	91	53	190	34	33
4	79	55	197	51	43
5	65	57	134	28	0
6	64	58	186	51	39
7	35	59	129	25	0
8	28	48	142	31	0
9	16	56	145	33	0

Carbonylverbindungen Sulfite-Komplexe bilden. Hierdurch werden zum Teil aromaaktive Carbonyle gebunden und tragen so nicht mehr zum Alterungsaroma bei (8).

Obwohl der zulässige Gehalt an Schwefeldioxid in Deutschland auf 10 mg/kg begrenzt ist und der Zusatz gänzlich verboten ist, sollte man im Hinblick auf eine gute Geschmacksstabilität möglichst im oberen Bereich von 8 – 10 mg/kg liegen. Da es sich bei Schwefeldioxid um ein Stoffwechselprodukt der Hefe handelt, ist durch die Verwendung geeigneter Hefe und durch eine entsprechende Anstelltechnik eine Erhöhung des SO₂-Gehalts durch technologische Maßnahmen möglich (16).

Der Zusammenhang zwischen der Lag-Time im frischen Bier und der Differenz der Alterungskomponenten ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Differenz der Alterungskomponenten resultiert aus dem Anstieg der gaschromatographisch erfaßten, alterungsrelevanten Verbindungen während der forcierten Alterung des Bieres und wird in Kombination mit der sensorischen Analyse zur Beurteilung der Geschmacksstabilität herangezogen (18). Zwischen der endogenen antioxidativen Aktivität von frischem Bier und der Zunahme der Alterungsindikatoren bei der Flaschenbierlagerung ist eine signifikante Beziehung gegeben.

4 Schlußfolgerung

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß zwischen der endogenen antioxidativen Aktivität in frischem Bier, die durch die Lag-Time mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie bestimmt wird, und der sensorisch ermittelten Geschmacksstabilität untergäriger, heller Biere ein signifikanter Zusammenhang besteht. Liegt die Lag-Time im Bereich von über 80 Minuten, so kann im allgemeinen von einer guten Geschmacksstabilität der Biere ausgegangen werden. Der Schwefeldioxidgehalt des abgefüllten Bieres hat deutlichen Einfluß auf die antioxidative Aktivität. Über die Auswirkung phenolischer Verbindungen auf die antioxidative Aktivität konnte mit den angewandten Globalbestimmungsmethoden keine Aussage erzielt werden. Hier müssen noch gezielte Untersuchungen sowohl aus analytischer Sicht als auch hinsichtlich technologischer Maßnahmen zur gezielten Beeinflussung antioxidativ wirksamer phenolischer Verbindungen beim Brauprozess vorgenommen werden.

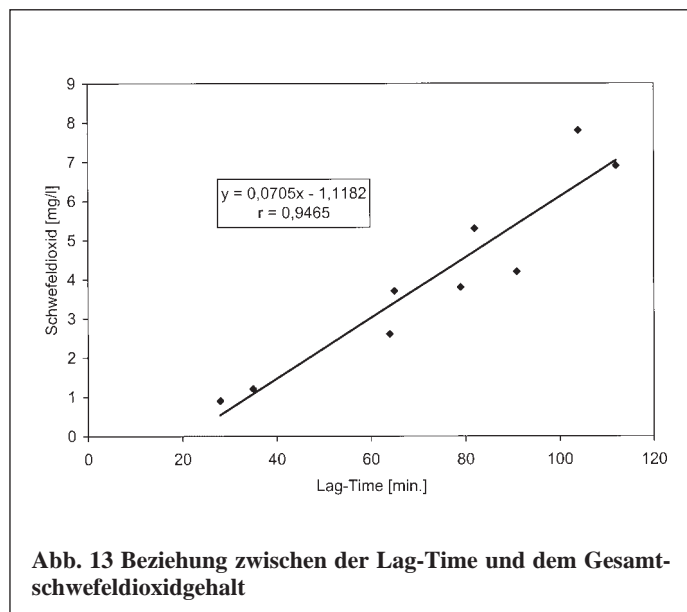


Abb. 13 Beziehung zwischen der Lag-Time und dem Gesamtschwefeldioxidgehalt

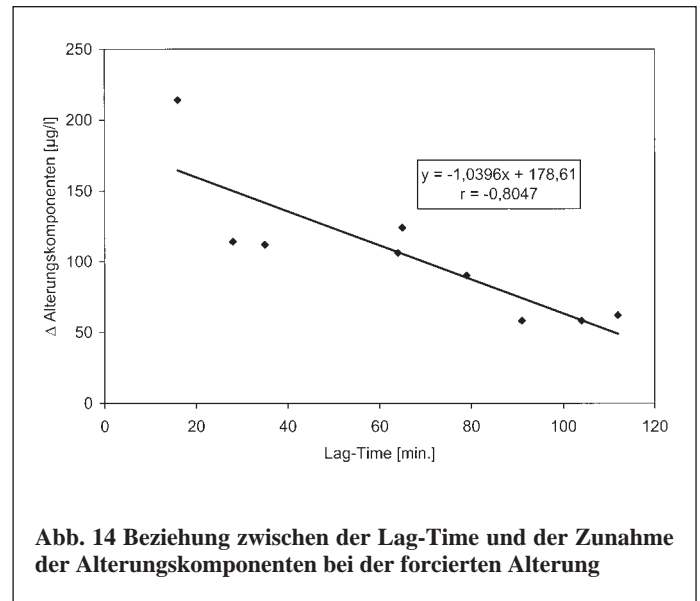


Abb. 14 Beziehung zwischen der Lag-Time und der Zunahme der Alterungskomponenten bei der forcierten Alterung

Die endogene antioxidative Aktivität von Bier stellt einen Teilaspekt der Geschmacksstabilität dar. Aufgrund des Meßprinzips ist es offensichtlich, daß nicht alle Einflußgrößen auf die Geschmacksstabilität mit dieser Methode erfaßt werden können. Eine hohe endogene antioxidative Aktivität, d.h. eine gute Ausstattung des Bieres mit reduzierenden Verbindungen, stellt aber eine optimale Ausgangssituation dar, um die Oxidationsvorgänge bei der Bieralterung zu verzögern.

Danksagung

Wir bedanken uns bei den Suntory Brauereien Limited für die stete freundliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

5 Summary

Forster, C., Schwieger, J., Narziß, L., Back, W., Uchida, M., Ono, M., and Yanagi, K.: Investigations into flavour stability of beer by electron spin resonance spectroscopie of free radicals — Monatschrift für Brauwissenschaft 52, No. 5/6, 86 – 93, 1999

BC 3 Analysis method/ 25 Beer

Oxidation during beer staling is initiated by reactive oxygen species. Being one of the most reactive forms, hydroxyl radicals play an important role in oxidation processes. A new method for the prediction of flavour stability of beer is based on the measurement of the increase of hydroxyl radicals in an oxidative forcing test of beer. Detection and quantification of the radicals are carried out by electron spin resonance spectroscopy. The “lag time”, which is determined in this test, is a measure for the endogenous antioxidant activity of beer. In pale lager beers, the lag time ranges between 0 and 130 minutes. The investigation of 96 lager beers revealed a highly significant correlation between the antioxidant activity of fresh beer and the taste stability. The higher the lag time of a beer was, the later appeared a stale flavour during shelf life. A high antioxidant activity of beer with a lag time over 80 minutes was found out to be an important factor to delay staling reactions in bottled beer. No relation could be found between phenolic compounds measured in different beers and the antioxidant activity. A high total sulphur dioxide content contributed to a high lag time.

Forster, C., Schwieger, J., Narziß, L., Back, W., Uchida, M., Ono, M., et Yanagi, K.: Examen de la stabilité de flaveur de la bière à l'aide de la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) des radicaux libres — *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 52, No 5/6, 86 – 93, 1999

BC 3 Contrôles physico-techniques brassicoles/ 25 Bière

Les phénomènes d'oxydation au cours du vieillissement de la bière sont amorcés par des formes d'oxygène réactionnelles. Une influence prépondérante est apportée par les radicaux hydroxyles extrêmement réactifs. Grâce à une nouvelle méthode on a déterminé l'augmentation des radicaux hydroxyles dans un test forcé d'oxydation de la bière. L'évaluation des radicaux s'effectue à l'aide de la RPE. Le « temps de retard » (Lag-time) ainsi déterminé est un chiffre indicateur de l'activité antioxydante endogène de la bière. Ce chiffre se situe pour des bières blondes de fermentation basse dans un domaine de 0 à 130 minutes. Il y a une relation significative entre l'activité antioxydante des bières fraîches et la stabilité de flaveur évaluée par l'analyse sensorielle. Plus l'activité antioxydante d'une bière est élevée, plus le goût de vieillissement après le soutirage est retardé. Une activité antioxydante avec un temps de retard situé au-dessus de 80 minutes représente une base pour retarder les phénomènes de vieillissement d'une bière soutirée. La teneur en composés phénoliques, ainsi que la détermination du pouvoir réducteur de la bière ne permet pas d'obtenir une relation directe avec l'activité antioxydante. Seule a pu être établie une relation entre le temps de retard et la teneur en dioxyde de soufre total de la bière.

6 Literatur

- Atherton N. M.: Principles of Electron Spin Resonance. Ellis Horwood Limited, 1993, S. 29 – 31.
- Back, W., Forster, C., und Thum, B.: „Geschmacksfehler im Bier – Ursachen und Analytik“, *Der Weihenstephaner* 64, Nr. 1, 55 – 60, 1996.
- Brautechnische Analysenmethoden: Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), Band II, 3. Auflage, Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weihenstephan, 1993.
- Brautechnische Analysenmethoden: Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), Band II, 2. Auflage, Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weihenstephan, 1987.
- Buckee, G.K., Mom, M., Nye, J.W.S., und Hammond, R.V.: Measurement and significance of oxidation-reduction levels in beer, *Proc. Eur. Brew. Conv.* 1997, 607 – 614.
- Eichhorn, P.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität des Bieres, Dissertation, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaft der Technischen Universität München-Weihenstephan, 1991.
- Hill, P., Lustig, S., und Sawatzki, V.: „Die Aminosäure Glutamin als Parameter zur Bestimmung des Alterungszustandes von Bieren“, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 51, Nr. 3/4, 36 – 38, 1998.
- Ilet, D.R.: „Aspects of the analysis, role and fate of sulphur dioxide in beer – A review.“, *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 32, Nr. 4, 213 – 221, 1995.
- Kaneda, H., Kano, Y., Kamimura, M., Osawa, T., und Kawakishi, S.: „Evaluation of beer deterioration by chemiluminescence“, *J. Food Science* 55, Nr. 5, 1361 – 1364, 1990.
- Kaneda, H., Masachika, T., Osawa, T., Kawakishi, S., und Tamaki, T.: „Behavior of sulfites during fermentation and storage of beer“, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, Nr. 2, 115 – 120, 1996.
- Kaneda, H., Osawa, T., Kawakishi, S., Munekata, M., und Koshino, S.: „Contribution of carbonyl-bisulfite adducts to beer stability“, *J. Agr. Food Chem.* 42, 2428 – 2432, 1994.
- Klein, H., Krammer, R., und Natter, M.: Schnellbestimmung zur Vorhersage der Geschmacksstabilität von Bier, *Proc. Eur. Brew. Conv.* 1997, 553 – 562.
- Kreyszig, E.: Statistische Methoden und ihre Anwendung, 7. Auflage, Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen, 1988.
- Lustig, S.: Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Lagerung von Flaschenbier und deren technologische Beeinflussung beim Brauprozess. Dissertation, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaft der Technischen Universität München-Weihenstephan, 1994.
- Mogens, L. A., und Skibsted, L. H.: „Electron spin resonance trapping identification of radicals formed during aerobic forced aging of beer“, *J. Agric. Food Chem.* 46, 1272 – 1275, 1998.
- Narziß, L., Reicheneder, E., und Nothaft, H.: „Über den Schwefeldioxidgehalt des Bieres“, *Brauwelt* 122, Nr. 15, 627 – 636, 1982.
- Narziß, L., Miedaner, H., Eichhorn, P., und Lustig, S.: „Technologische Faktoren der Geschmacksstabilität“, *Mitt. Österr. Getränke-Institut* 51, Nr. 5/6, 52 – 64, 1997.
- Narziß, L., Miedaner, H., Graf, H., Eichhorn, P., und Lustig, S.: „Technological approach to improve flavor stability“, *MBAA Tech. Quart.* 30, Nr. 2, 48 – 53, 1993.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., und Symons, M.C.R.: Techniques in free radical research. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1991, S. 51 – 65.
- Thalacker, R., Bößendorfer, G., und Birkenstock, B.: „Eine neue Kennzahl in der brautechnischen Analyse – die Anilinzahl (AZ)“, *Brauwelt* 138, Nr. 10/11, 421 – 425, 1998.
- Uchida, M., und Ono, M.: „Improvement for oxidative flavor stability of beer – role of OH-radical in beer oxidation“, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, Nr. 4, 198 – 204, 1996.
- 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, Nr. 4, 205 – 211, 1996.
- Walters, M. T.: „Natural antioxidants and flavour stability“, *Ferment* 10, Nr. 2, 111 – 119, 1997.
- Yanagi, K., Ishibashi, Y., Oka, K., und Uchida, M.: „Neue Methoden zur Beurteilung von Geschmacksstabilität, Schaumeigenschaften und -stabilität von Bier“, *Brauwelt* 137, Nr. 21/22, 841 – 859, 1997.
- Yoshimura, Y., Iijima, T., Watanabe, T., und Nakazawa, H.: „Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system“, *J. Agr. Food Chem.* 45, Nr. 10, 4106 – 4109, 1997.

(Manuskripteingang: 11. März 1999)