



VLB
BERLIN

Forschungsthema:

Weiterentwicklung der Lag-Time-Bestimmungsmethode mittels ESR-Spektroskopie für Bier (Aussagekraft, Analysenkosten) und Anwendung der neuen Analysenmethode zur Untersuchung der Wesentlichen Einflüsse auf die oxidative Bierstabilität



AiF-Vorhaben-Nr.:

14772

Name der Forschungsstelle(n):

Technische Universität Berlin / Institut für Biotechnologie
Fachgebiet Brauwesen



Forschungsnetzwerk
Mittelstand

Kontakt:

Prof. Dr. Eckhard Flöter, eckhard.floeter@tu-berlin.de

Bewilligungszeitraum:

1.06.2006 – 31.12.2008

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

SCHLUSSBERICHT



WISSEN
SCHAFFT
QUALITÄT

Impressum

Herausgeber:

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.
Forschungskoordination - Gerhard Andreas Schreiber
Seestraße 13, 13353 Berlin, Deutschland

Vereinsregister-Nr.: 24043 NZ, Amtsgericht Berlin-Charlottenburg

www.vlb-berlin.org

Gefördert durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Alle Rechte vorbehalten, sofern nicht im Text nicht anders angegeben.

Kein Teil des Berichts darf ohne schriftliche Genehmigung des Herausgebers in irgendeiner Form reproduziert werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen in Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

All rights reserved (including those of translation into other languages).

No part of this book may be reproduced in any form.

Name der Forschungsstelle(n)

14772 / 5

IGF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.06.2006 - 30.09.2008

Bewilligungszeitraum

Schlussbericht für den Zeitraum : 01.06.2006-31.12.2008

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

Normalverfahren

Fördervariante ZUTECH

Forschungsthema :

„Weiterentwicklung der Lag-Time-Bestimmungsmethode mittels ESR-Spektroskopie für Bier (Aussagekraft, Analysenkosten) und Anwendung der neuen Analysenmethode zur Untersuchung der Wesentlichen Einflüsse auf die oxidative Bierstabilität“

Für ein ZUTECH-Vorhaben sind folgende zusätzliche Angaben zu machen:

Der fortgeschriebene Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

ist beigelegt

liegt bereits vor

wird fristgerecht nachgereicht

Berlin, d.30.01.2009

Ort, Datum

Unterschrift der/des Projektleiter(s)

Brauerei

AiF-Mitgliedsvereinigung (MV)

2/2005

Aktenzeichen der MV

AiF-Vorhaben-Nr: 14772

AiF-Antrags-Nr.: /

Blatt-Nr./BA-Nr.: /

Schlussbericht

1. Forschungsthema

„Weiterentwicklung der Lag-Time-Bestimmungsmethode mittels ESR-Spektroskopie für Bier (Aussagekraft, Analysenkosten) und Anwendung der neuen Analysenmethode zur Untersuchung der wesentlichen Einflüsse auf die oxidative Bierstabilität“

2. Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Die Geschmacksstabilität eines Bieres als ein wesentliches Qualitätsmerkmal nimmt einen immer höheren Stellenwert ein, dem jedoch der natürliche Alterungsvorgang des Bieres entgegenwirkt.

Mit dem Ziel, eine Aussage über die zu erwartende Geschmacksstabilität eines Bieres treffen zu können, wird seit einigen Jahren die Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) Spektroskopie eingesetzt, um über eine beschleunigte Bieralterung bei erhöhten Temperaturen (60 °C) die so genannte Lag-Time eines Bieres bestimmen zu können. Der über diese Messmethode ermittelte Wert der Lag-Time wird dabei als ein Kriterium für das endogene antioxidative Potenzial des Bieres betrachtet, das auf reduzierenden Verbindungen (SO₂, Maillard-Reaktionsprodukte, etc.) basiert und seinerseits mit der oxidativen Bierstabilität in einem direkten Zusammenhang steht.

Eigene Untersuchungen und Literaturdaten belegen, dass die nach der bisherigen Vorgehensweise gemessene Lag-Time von einer Reihe physiko-chemischer Parameter (u.a. pH-Wert) und der Spin-Trap-Konzentration abhängt. Damit zuverlässige Aussagen über das endogene antioxidative Potenzial in routinemäßigen Qualitätskontrollen von verschiedenen Bieren oder Abfüllungen abgeleitet werden können, muss der quantitative Einfluss dieser Parameter bekannt sein. Dabei ist insbesondere der Einfluss zu berücksichtigen, der durch die Zugabe des Spin-Traps verursacht wird. Werden die Verhältnisse in einer Bierprobe durch entsprechende Reaktionen des Spin-Traps verändert, lässt sich kein direkter Zusammenhang zum endogenen antioxidativen Potenzial eines Bieres herstellen.

Bisher wird die Lag-Time-Methode mit PBN (N-tert-Butyl- α -phenylnitron) als Spin-Trap durchgeführt. Spezielle Messungen zum Fenton-System haben gezeigt, dass PBN fast ausschließlich mit den im Bier entstehenden Hydroxyethylradikalen stabile Spin-Trap-Addukte ausbildet, deren Bildung als sekundäre Radikale zudem von der vorliegenden Ethanolkonzentration abhängt. Es handelt sich um einen indirekten Nachweis der Radikalgenerierung im Bier, der durch das vorherige Lösen des Spin-Traps (PBN) in einer Ethanolösung beeinflusst wird.

Noch entscheidender für die Zukunft der Analysenmethode sind unsere Forschungsergebnisse zum Einfluss des Spin-Traps PBN auf das Bier. In diesem Zusammenhang ist insbesondere der Einfluss auf die Radikalgenerierung über einen vorliegenden pH-Wert-Effekt hervorzuheben. Dieser führt dazu, dass die Verhältnisse im Bier grundsätzlich verfälscht dargestellt werden. Da die Abweichungen des

endogenen antioxidativen Potenzials gegenüber der gemessenen Lag-Time, bei einer mittleren bis hohen oxidativen Bierstabilität, bis zu 500 % betragen und in verschiedenen Lag-Time-Bereichen unterschiedlich stark ausgeprägt sind, ist eine Weiterentwicklung der Analysenmethode dringlich.

Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass es möglich ist, den pH-Wert-Effekt mit alternativen Spin-Traps zu umgehen, um so die Aussagekraft der Analysenmethode signifikant zu erhöhen.

Mit bewährten Versuchsanordnungen (Fenton-System, Bestrahlung) und spezieller Art der Probenvorbereitung lassen sich aus den handelsüblichen Spin-Traps (z.B. Spin-Trap-Liste im Anhang) die besser geeigneten herausfinden und ihre Eignung für den Routineeinsatz überprüfen.

Die Vorversuche lassen außerdem erkennen, dass die Umgehung des pH-Wert-Effekts praktisch zu einer neuen Analysenmethode führen wird, deren Ergebnisse sich nicht nur durch eine sehr hohe Auflösung auszeichnen, sondern signifikant von den bisher ermittelten Lag-Time Werten abweichen.

Mit einer derart optimierten Analysenmethode wird es möglich sein, die grundlegenden Einflüsse auf die Radikalgenerierung, die für die oxidative Bierstabilität von Bedeutung sind, direkt zu beobachten und nachzuweisen. Im Speziellen soll sie dazu eingesetzt werden um die Einflüsse bestimmter Bierinhaltsstoffe (Sauerstoff, Schwefeldioxid, Metallionen, Ascorbinsäure,...) auf die oxidative Bierstabilität unverfälscht darzustellen und zu bewerten.

Zusätzlich soll überprüft werden, ob eine derart optimierte Analysenmethode einen besseren Zugang zu den bei der Bierherstellung (-lagerung) ablaufenden radikalischen Reaktionen ermöglicht.

In Bezug auf die Geschmacksstabilität ist der Abgleich der Ergebnisse mit chromatographisch und sensorisch ermittelten Daten von Bedeutung. Ein weiterer Anwendungsbereich für die neue Analysenmethode ergibt sich direkt aus dem Einfluss der Verpackungsmaterialien auf die oxidative Bierstabilität. Eine Umgehung des pH-Wert-Effekts wird insbesondere im oberen Lag-Time-Bereich zu einer bedeutend höheren Auflösung der Ergebnisse führen. Daraus kann abgeleitet werden, dass die neue Analysenmethode prädestiniert ist, die durch die Sauerstoffpermeation über die verschiedensten Verpackungsmaterialien (Verschluss, PET-Flaschen, ..) hervorgerufenen Einflüsse auf die oxidative Bierstabilität mit einer hohen Genauigkeit aufzuzeigen. Diese Hypothese gilt es zu überprüfen und durch erste Vorversuche zu belegen, um eine Basis für einen zukünftigen Abgleich der neuen Analysenmethode mit anderen Analysenmethode im Bereich der Verpackungsmaterialien zu schaffen.

Nicht zuletzt ist die bisherige Analysenmethode mittels PBN bei routinemäßigem Einsatz mit erheblichen Kosten verbunden. Auch hier haben erste Messreihen Wege aufgezeigt, mit deren Hilfe die Kosten für die Spin-Traps um bis zu 80 % reduziert werden können.

Zusätzlich bietet die ESR-Spektroskopie die Möglichkeit, spezifische Radikalreaktionen und deren Reaktionsprodukte anhand der charakteristischen Spektren durch Verwendung von isotonen-substituierten Reagenzien zu identifizieren. Spezielle Untersuchungen und die detaillierte Interpretation der erhaltenen ESR-Spektren haben gezeigt, dass in diesem Bereich das Potenzial der ESR-Spektroskopie noch nicht ausgeschöpft ist, respektive erkannt wurde. Im Rahmen dieses Forschungsprojekts soll diese Vorgehensweise dazu eingesetzt werden, um die Ursache der von uns nachgewiesenen ESR-Hintergrundsignale, die je nach Biersorte und Brauerei unterschiedlich stark ausgeprägt sind, aufzuklären. Aufgrund der auftretenden Hintergrundsignale ist für solche Biere auch die bisherige Auswertungsmethode über die Signalintensität des hauptsächlich durch die stabilen PBN- $C_2H_5O\cdot$ Spin-Addukte hervorgerufenen ESR-Spektrums (Triplet von Dublett) zu modifizieren.

3.1 Forschungsziele / Ergebnisse / Lösungswege

Die in diesem Antrag angestrebten Forschungsziele und Lösungswege lassen sich in vier wesentliche Gruppen einteilen:

- A) Die Weiterentwicklung der Analysenmethode zur Bestimmung des endogenen antioxidativen Potenzial eines Bieres mittels ESR-Spektroskopie zielt darauf ab, die in der bisherigen Vorgehensweise (Lag-Time Bestimmung mittels PBN) begründete Verfälschung der Ergebnisse zu umgehen, um so ein Maß für das eigentliche („wahre“) endogenen antioxidative Potenzial eines Bieres zu erhalten.

Mit dem Ziel die Aussagekraft signifikant zu erhöhen, sollen neue, zu PBN alternative Spin-Traps (z.B. Spin-Trap-Liste im Anhang) hinsichtlich ihrer Reaktivität, Stabilisierung diverser Radikale und ihrer Eignung zur Bestimmung des endogenen antioxidativen Potenzials eines Bieres geprüft werden. Dazu ist der Einsatz bewährter Versuchsanordnungen zur Radikalgenerierung (Fenton-System, Bestrahlung) und ein Abgleich mit den durch PBN erzielten Ergebnissen vorgesehen, um die besser geeigneten zu selektieren.

Die Ergebnisse aus unseren Voruntersuchungen haben gezeigt, dass zur anschließenden Standardisierung und Optimierung der neuen Analysenmethode eine weitergehende Erfassung und Kontrolle des Einflusses einer Reihe physiko-chemischer Parameter (Spin-Trap-Konzentration, Temperatur, pH-Wert, EtOH-Gehalt) notwendig ist, um zuverlässige, vergleichbare und reproduzierbare Daten zur Bestimmung des „wahren“ endogenen antioxidativen Potenzials eines Bieres zu erhalten. Hierbei stehen, neben der Umgehung des pH-Wert-Effekts, die Handhabung beim routinemäßigen Einsatz in der Qualitätssicherung der Brauereien und eine Kostenreduzierung im Bereich der Spin-Trap-Reagenzien im Vordergrund.

Im Hinblick auf die zu erkennenden signifikanten Unterschiede gegenüber der bisher angewendeten Methode (Lag-Time mittels PBN), wird die neue Analysenmethode über die „EAP-Bestimmung“ zur Ermittlung des eigentlichen endogenen antioxidativen Potenzials eines Bieres beschrieben („EAP-Wert“ (*EAP / Endogenes Antioxidatives Potenzial bzw. Endogenous Antioxidant Potential*)).

- B) Die *anwendungsorientierte Bestimmung der „EAP-Werte“ (EAP-Bestimmung)* zielt auf eine erste Erfassung und Bewertung des Einflusses einiger essentieller Komponenten der oxidativen Bierstabilität ab (Sauerstoff, Schwefeldioxid, Metallionen (Fe/Cu), etc.). In diesem Arbeitsbereich stellen *erste Vorversuche* zu bestimmten phenolischen Inhaltsstoffen (Flavonoide, Phenolcarbonsäuren) und die Ascorbinsäure in ihrer Wirkungsweise als Pro- und Antioxidans im Bier, unter Berücksichtigung neuer Forschungsergebnisse, einen Schwerpunkt dar.

Im Anschluss soll die aus der hohen Auflösung der Ergebnisse abzuleitende Eignung der EAP-Bestimmung zur Analytik bestimmter Zwischenstufen des Brauprozesses (Würzekochung, Gärung, Filtration, ...) überprüft und in ersten Messreihen dargestellt werden. Außerdem soll überprüft werden, ob die neuen EAP-Werte durch begleitende Messungen anderer Methoden (GC-MS, Sensorik Panel) mit der Bildung bestimmter Alterungscarbonyle (Phenylacetaldehyd, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, Methional,...) und der sensorischen Geschmacksstabilität korreliert werden können.

- C) Über die *anwendungsorientierte Bestimmung der „EAP-Werte“ (EAP-Bestimmung) im Bereich der Verpackungsmaterialien* soll die Eignung der EAP-Bestimmung zum Nachweis der Einflüsse der Verpackungsmaterialien auf die oxidative Bierstabilität überprüft und dargestellt werden.

In diesem Arbeitsbereich ist der Einfluss des über den Kronenkorken oder Bügelverschluss diffundierenden Sauerstoffs im direkten Vergleich zu den Auswirkungen des im Bier und Kopfraum vorhandenen Sauerstoffs auf die oxidative Bierstabilität von besonderem Interesse.

Basierend auf den Ergebnissen erster Vorversuche unter Sauerstoffzugabe (Luftzugabe) sollen einige der handelsüblichen Kronenkorken (z.B. Compoundmassen mit O₂-Scavenger) und verschiedene Bügelverschlusstypen (3 K-, DIN-, Kugel-Knopf) hinsichtlich ihrer Eignung (Qualität) zur Bewahrung der oxidativen Bierstabilität gegenübergestellt werden.

Ebenso soll überprüft werden, ob die neue Analysenmethode dazu geeignet ist, die Auswirkungen bestimmter PET-Flaschen auf die oxidative Bierstabilität aufzuzeigen.

Die Eignung vorausgesetzt, bilden die Ergebnisse dieser Vorversuche die Basis für einen zukünftigen Abgleich der EAP-Bestimmung mit anderen Analysenmethode der Verpackungsmaterialien (z.B. Sauerstoffpermeationsmessung).

- D) *Neue Aspekte der Anwendung der ESR-Spektroskopie in der Brauwissenschaft* ergeben sich aus der gezielten Untersuchung der im Bier bzw. beim Forciertest ablaufenden radikalischen Mechanismen über die detaillierte Interpretation charakteristischer ESR-Spektren (simulatorischer Ansatz).

In diesem Bereich kann die ESR-Spektroskopie unter Verwendung von isotopensubstituierten Reagenzien und mittels gezielter Radikalgenerierung zur Identifizierung spezifischer Radikalreaktionen und deren Reaktionsprodukte eingesetzt werden.

Im Rahmen dieses Forschungsprojekts steht die Aufklärung der nachgewiesenen und je nach Biersorte und Brauerei unterschiedlich stark ausgeprägten ESR-Hintergrundsignale im Vordergrund.

3.2 Forschungsergebnisse

Zu Beginn des Forschungsprojekts stand die Weiterentwicklung der Analysenmethode zur Bestimmung des endogenen antioxidativen Potenzials von Getränken mittels ESR-Spektroskopie im Vordergrund.

Für die Weiterentwicklung war es erforderlich ein geeignetes Spin-Trap-Reagenz zu finden mit dem sich der von uns nachgewiesene pH-Wert-Effekt, der zu einer Verfälschung der Messergebnisse führt und durch das bisher eingesetzte Spin-Trap-Reagenz PBN (Lag-Time Messung [1-21]) verursacht wird, umgehen lässt.

Basierend auf den dem Forschungsantrag zugrunde liegenden Vorversuchen wurden die Arbeiten auf das Spin-Trap-Reagenz 4-POBN (N-tert-Butyl- α -(4-pyridyl) nitron N-oxide) fokussiert. Aus den Vorversuchen konnte abgeleitet werden, dass das Spin-Trap-Reagenz POBN spezifische Eigenschaften aufweist mit deren Hilfe es möglich sein wird die Verfälschung der Ergebnisse zu umgehen, um über diesen Weg die Aussagekraft der Analysenmethode signifikant zu erhöhen. Unter Verwendung eines speziellen Aufbaus, bei dem mittels eines Fenton-Reaktions-Systems direkt in der Messküvette Radikale erzeugt werden und ihre Stabilisierungsreaktion mit Spin-Traps bzw. deren Zerfall über die Time-Sweep-Funktion des ESR-Spektrometers unmittelbar verfolgt werden kann, war es möglich, die besonderen Eigenschaften des Spin-Trap-Reagenz 4-POBN gegenüber PBN aufzuzeigen (Abb. 1).

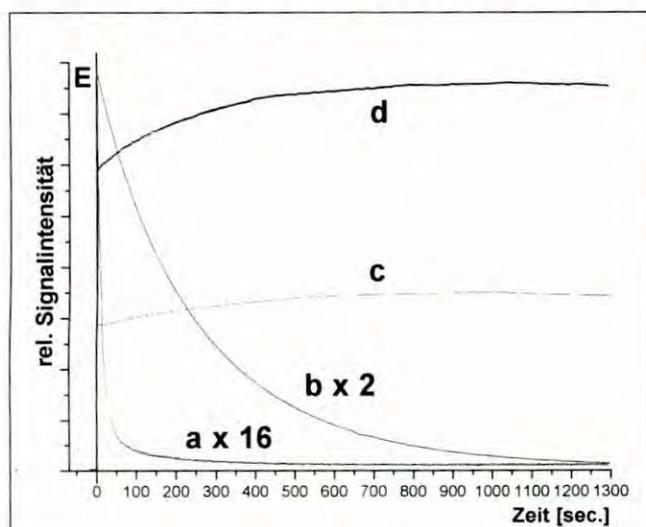


Abb. 1: Fenton-Reaktion-System zum Nachweis der Stabilität der PBN // POBN Spin-Trap Addukte ($\text{OH}\cdot$ / $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}\cdot$)

Fenton-PBN-System ohne (a) und mit EtOH 3 Vol. % (c)
 Fenton-POBN-System ohne (b) und mit EtOH 3 Vol % (d)
 [$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/5 ml; PBN (25 mM) 0,0245 g/5 ml;
 H_2O_2 (30 %) 0,025 ml/5 ml, 0,1 M Phosphat-Puffer; pH = 4,01]

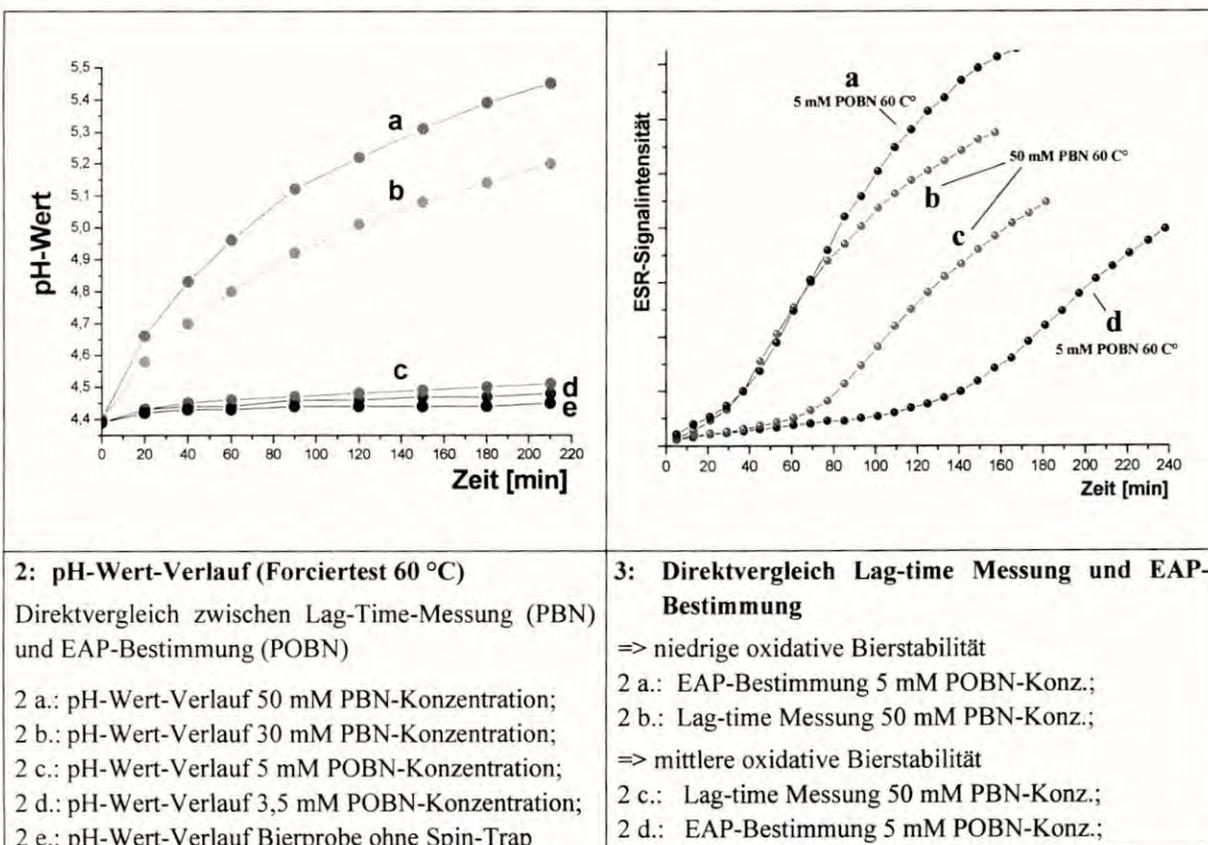
Aus den Ergebnissen (Abb.1) geht hervor, dass es sich bei der Lag-time Messung nach bisheriger Vorgehensweise um einen indirekten Nachweis der Radikalgenerierung im Bier handelt. Dies liegt darin begründet, dass die ESR-Signalintensität hauptsächlich durch das sekundär gebildete Hydroxyethylradikal hervorgerufen wird, das offensichtlich wesentlich stabilere PBN-Spin-Trap-Addukte ausbildet (Abb. 1 a-c). Während die nach Generierung (Anstieg während der Injektion bis E) gebildeten, stabilisierten PBN- $\text{OH}\cdot$ -Addukte innerhalb einer Minute fast vollständig ausreagieren, liegen die PBN- $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}\cdot$ -Addukte (c) auch nach 17 min. praktisch unverändert vor.

Analog ist auch bei Verwendung von POBN eine sehr viel höhere Stabilität der $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}\cdot$ -Addukte (d) gegenüber den $\text{OH}\cdot$ -Addukte (b) festzustellen. Zusätzlich zeichnet sich POBN gegenüber PBN, durch eine signifikant höhere Stabilität der Spin-Trap-Addukte und eine höhere Affinität gegenüber den generierten Hydroxyl- und Hydroxyethylradikalen aus. Der zusätzliche Anstieg der Signalintensität nach Injektion (l. c, d) ist auf die Bildung weiterer Radikale (Fenton-Reaktion), deren Reaktion mit dem EtOH und die hohe Stabilität der daraus resultierenden Spin-Trap-Addukte zurückzuführen.

Weitere Messreihen haben aufgezeigt, dass die aus den Ergebnissen in Abb. 1 hervorgehenden spezifischen Eigenschaften des Spin-Trap-Reagenz POBN genutzt werden können um die Analysenmethode zu verbessern.

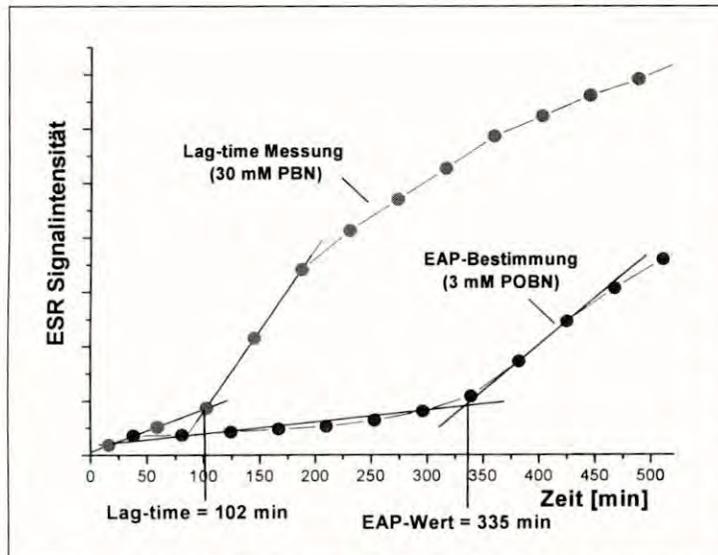
Das Prinzip beruht hierbei, auf dem indirekten Nachweis der Radikalgenerierung im Bier unter Ausnutzung der höheren Affinität des Spin-Trap Reagenz POBN gegenüber den sekundären Hydroxyethylradikalen (Faktor 15-20, Reaktionsgeschwindigkeit: POBN $3.1 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ [24], PBN $1.5 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ [24]), wodurch die erforderliche Spin-Trap Konzentration auf einen Bruchteil der bisher eingesetzten Konzentration gesenkt werden kann. In Kombination mit der höheren Stabilität der POBN Spin-Trap-Addukte gegenüber der pH-Wert verändernden Inaktivierungsreaktion (Abb. 1), ist es möglich, die aus dem pH-Wert-Effekt resultierenden Auswirkungen auf die Radikalgenerierung [22/23] zu umgehen, um die im Bier vorliegenden Verhältnisse (pH-Wert Bier: 4,1-4,5) unverfälscht darzustellen. Aus Abb. 2 gehen die entsprechenden pH-Wertverläufe gegenüber der Messzeit für beide Spin-Traps bei unterschiedlichen Spin-Trap-Konzentrationen hervor (Forciertest 60°C).

Anhand eines direkten Vergleichs beider Vorgehensweisen, wie er in Abb. 3 dargestellt ist, lassen sich die beschriebenen Zusammenhänge und die Auswirkungen auf die Messmethode am Beispiel von Bieren mit einer kleinen bis mittleren oxidativen Bierstabilität verdeutlichen. Zum einen ist zu erkennen, dass die EAP-Bestimmung mit einer 5 mM POBN-Konzentration gegenüber einer 50 mM PBN-Konzentration zu einer vergleichbaren bzw. höheren Signalintensität bei den ESR-Spektren führt. Zum andern geht aus dem Vergleich der Ergebnisse zwischen den Bereichen der kleinen und der mittleren oxidativen Bierstabilität der Einfluss des pH-Wert-Effekts auf die Lag-Time-Messung hervor. In den ersten 20-30 Min. (Forciertest 60°C) ist der Einfluss über den pH-Wert-Anstieg noch relativ gering (Abb. 2a, 30min => pH-Wert von 4,38 auf 4,7) und es lassen sich nur geringfügige Unterschiede zwischen der Lag-time- und der neuen EAP-Bestimmung erkennen. Im mittleren Bereich der oxidativen



Bierstabilität liegt der pH-Wert nach 75 min schon bei > 5 (Lag-time = 75 min) und die Radikalgenerierung wurde über einen entsprechend langen Zeitraum beschleunigt. Der daraus resultierende Unterschied der EAP-Bestimmung gegenüber der Lag-time-Messung ist mit ≈ 80 min (über 100 %) augenscheinlich.

Aufgrund der vorliegenden hohen ESR-Signalintensität bei den POBN-Spin-Addukten war es möglich die Analysenmethode über entsprechende Vergleichsmessungen hinsichtlich der Temperatur, POBN- und EtOH-Konzentration weitergehend zu optimieren.



4: Direktvergleich Lag-time Messung und EAP Bestimmung im Bereich einer mittleren bis hohen oxidativen Bierstabilität (Forciertest 63 °C)
 a.: Lag-Time-Messung - 30 mM PBN-Konzentration
Lag-Time = 102 min
 b.: EAP-Bestimmung - 3 mM POBN-Konzentration
EAP-Wert = 335 min

In Abb. 4 ist eine entsprechende Vergleichsmessung unter veränderten Analysenparametern für den Bereich einer mittleren bis hohen oxidativen Bierstabilität beispielhaft dargestellt. Die Ergebnisse spiegeln den signifikanten Unterschied beider Analysenmethoden wider. Eine Abweichung der Lag-time von ca. 4 Std. (328 %) gegenüber den im Bier gemessenen EAP-Werten macht deutlich, dass die bisherige Lag-Time-Messung nicht dazu geeignet ist das endogene antioxidative Potenzial eines Bieres im Bereich einer mittleren bis hohen oxidativen Bierstabilität darzustellen.

Bei einer normalerweise eingesetzten PBN-Konzentration von 50 mM [1-14] wird die Diskrepanz gegenüber dem eigentlichen „wahren“ Wert aufgrund des schnelleren pH-Wert-Anstiegs zusätzlich verstärkt (Abb. 2).

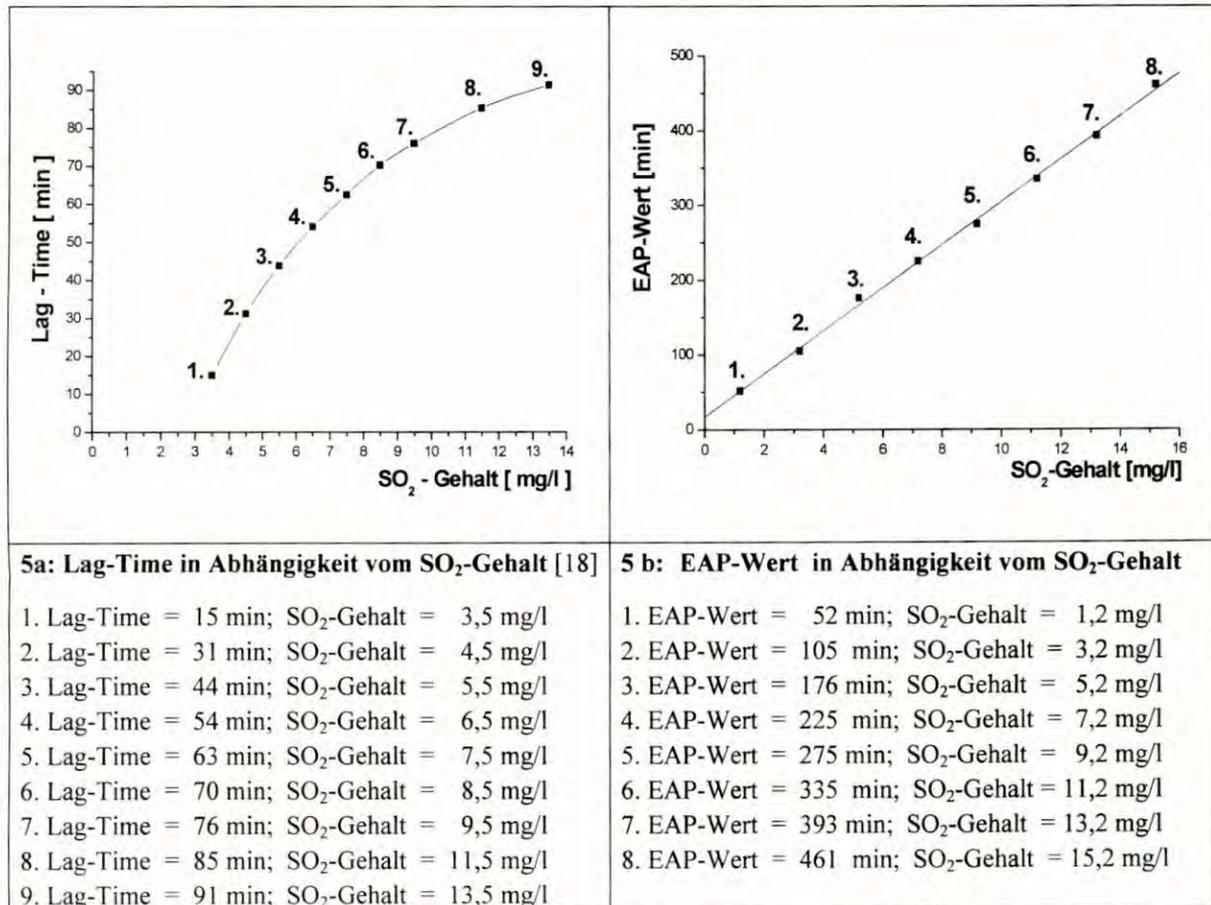
Basierend auf den Ergebnissen und der Tatsache, dass bei anderen Getränken höhere EAP-Werte zu erwarten sind wurde für die Standardmessung eine 3,5-3,6 mM POBN-Konzentration und eine Temperatur des Forciertest von 60 / 63°C festgelegt (pH-Wertverlauf Abb. 2 d). Dies führt neben der signifikant höheren Aussagekraft und Auflösung der Ergebnisse (EAP-Werte) zu einer nicht unerheblichen Kostenreduzierung im Bereich der Spin-Trap Reagenzien von ca. 80 %.

Ein weiteres Ziel des Forschungsprojekts lag in der Überprüfung der Anwendbarkeit der neuen Analysenmethode zur Untersuchung der Einflüsse bestimmter Bierinhaltsstoffe auf das endogene antioxidative Potential. Aufgrund der signifikanten Abhängigkeit der bisherigen Lag-time Werte vom SO_2 -Gehalt eines Bieres standen die Untersuchungen zur SO_2 -Abhängigkeit der EAP-Werte zunächst im Vordergrund. In den Abbildungen 5 a, b sind entsprechende Ergebnisse aus Vergleichsmessungen unter Zudosierung von Natriumdisulfit in verschiedenen Konzentrationen dargestellt.

Aus den Ergebnissen in Abb. 5 a geht die nicht lineare Abhängigkeit der Lag-time Werte gegenüber dem SO_2 -Gehalt im Bier hervor. Dieser Zusammenhang kann direkt mit dem von der Spin-Trap Reagenz PBN verursachten pH-Wert Effekt und der damit verbundenen Verfälschung der

Messergebnisse korreliert werden. Umso höher die Lag-time eines Bieres desto stärker macht sich der pH-Wert Effekt bemerkbar (s. Abb. 2) und der gemessene Lag-time Wert weicht immer weiter von den im Bier vorliegenden Verhältnisse ab.

Im Gegensatz dazu konnte bei der EAP-Bestimmung ein linearer Zusammenhang zwischen den EAP-Werten und dem SO_2 -Gehalt bis zu einer Konzentration von 15 mg/l festgestellt werden (Abb. 5 b). Auch dieser Zusammenhang ist nachvollziehbar und kann auf die Umgehung des pH-Wert Effekts mittels des Spin-Trap Reagenz POBN (s. Abb. 2) zurückgeführt werden.



5a: Lag-Time in Abhängigkeit vom SO_2 -Gehalt [18]

1. Lag-Time = 15 min; SO_2 -Gehalt = 3,5 mg/l
2. Lag-Time = 31 min; SO_2 -Gehalt = 4,5 mg/l
3. Lag-Time = 44 min; SO_2 -Gehalt = 5,5 mg/l
4. Lag-Time = 54 min; SO_2 -Gehalt = 6,5 mg/l
5. Lag-Time = 63 min; SO_2 -Gehalt = 7,5 mg/l
6. Lag-Time = 70 min; SO_2 -Gehalt = 8,5 mg/l
7. Lag-Time = 76 min; SO_2 -Gehalt = 9,5 mg/l
8. Lag-Time = 85 min; SO_2 -Gehalt = 11,5 mg/l
9. Lag-Time = 91 min; SO_2 -Gehalt = 13,5 mg/l

5 b: EAP-Wert in Abhängigkeit vom SO_2 -Gehalt

1. EAP-Wert = 52 min; SO_2 -Gehalt = 1,2 mg/l
2. EAP-Wert = 105 min; SO_2 -Gehalt = 3,2 mg/l
3. EAP-Wert = 176 min; SO_2 -Gehalt = 5,2 mg/l
4. EAP-Wert = 225 min; SO_2 -Gehalt = 7,2 mg/l
5. EAP-Wert = 275 min; SO_2 -Gehalt = 9,2 mg/l
6. EAP-Wert = 335 min; SO_2 -Gehalt = 11,2 mg/l
7. EAP-Wert = 393 min; SO_2 -Gehalt = 13,2 mg/l
8. EAP-Wert = 461 min; SO_2 -Gehalt = 15,2 mg/l

Um den linearen Zusammenhang zwischen den EAP-Werten und dem SO_2 -Gehalt eines Bieres zu verifizieren mussten zusätzliche Messreihen unter Zudosierung von Natriumdisulfit bei verschiedenen Bieren durchgeführt werden. Die Messreihen führten zu der interessanten Erkenntnis, dass zwar ein linearer Zusammenhang zwischen dem EAP-Wert und dem SO_2 -Gehalt eines Bieres besteht aber die Zunahme des EAP-Werts pro mg SO_2 /l von Bier zu Bier sehr verschieden ist. D.h. der Verbrauch des vorliegenden SO_2 -Gehalts im Bier ist von der vorliegenden Biermatrix (andere Bierinhaltsstoffe, pH-Wert, etc.) abhängig und Biere mit gleichem SO_2 -Gehalt können aus diesem Grunde sehr unterschiedliche EAP-Werte aufweisen. Um die Biere in ihrem Verbrauch des vorliegenden endogenen antioxidativen Potentials besser charakterisieren zu können wurde eine neue Kenngröße, der so genannte BAX-Wert (Beverage Antioxidative Index) eingeführt.

In einer Ausführung wird der Bierprobe SO_2 mittels Natriumdisulfit zudosiert (Standard: 2, 4, 6 mg SO_2/l), und es wird ein Quotient $\text{BAX}_{(\text{sp})}$ aus dem Anstieg der EAP-Werte in der Probe und dem Probengehalt an SO_2 nach folgender Formel bestimmt:

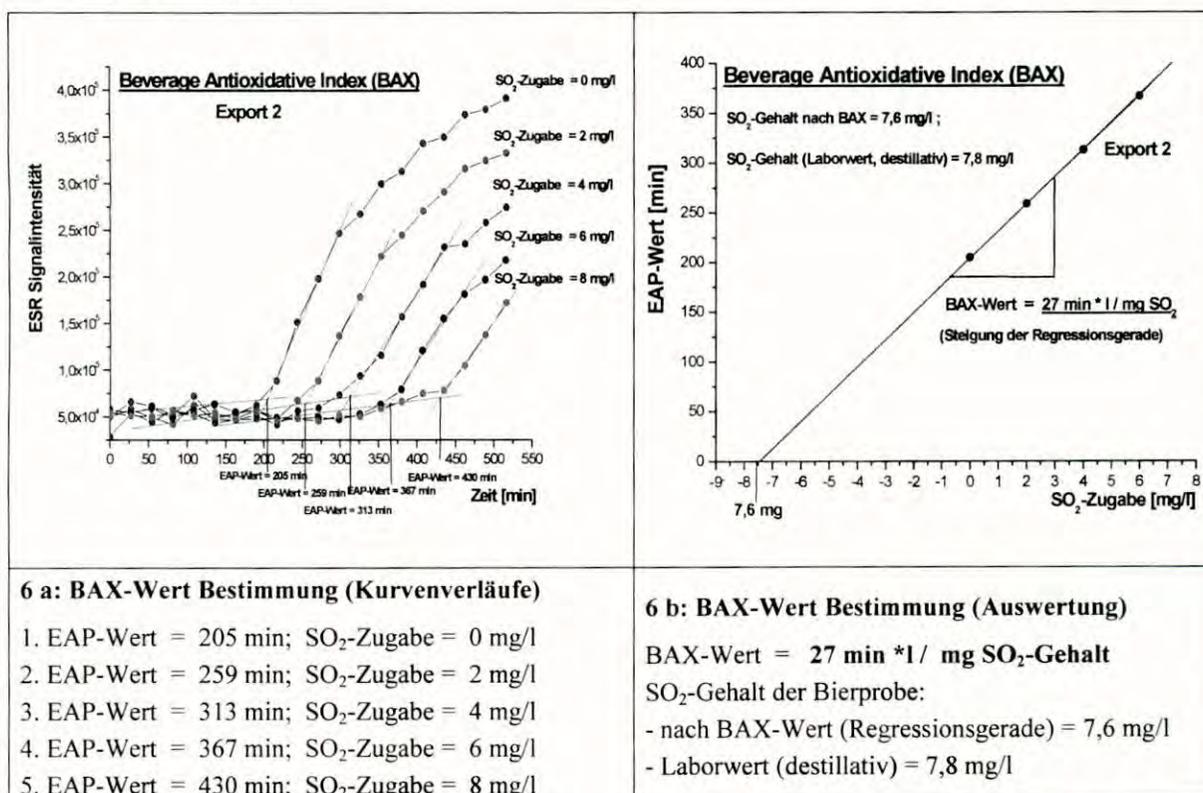
$$\text{BAX}_{(\text{sp})} = \Delta \text{EAP-Wert} / \Delta \text{SO}_2\text{-Gehalt}_{(\text{sp})} [\text{min} \cdot \text{l}/\text{mg}]$$

wobei ΔEAP der EAP-Wert nach SO_2 -Zudosierung minus EAP-Wert vor SO_2 -Zudosierung ist, und wobei ΔSO_2 -Gehalt der durch Zudosierung hervorgerufene SO_2 -Gehalt ist (sp = spiked).

In einer alternativen und annähernden Ausführung wird ein Quotient (BAX) aus dem Gesamt-EAP der Bierprobe und dem Gesamtgehalt an SO_2 nach der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{BAX} = \Delta \text{EAP-Wert}_{(\text{gesamt})} / \Delta \text{SO}_2\text{-Gehalt}_{(\text{gesamt})} [\text{min} \cdot \text{l}/\text{mg}]$$

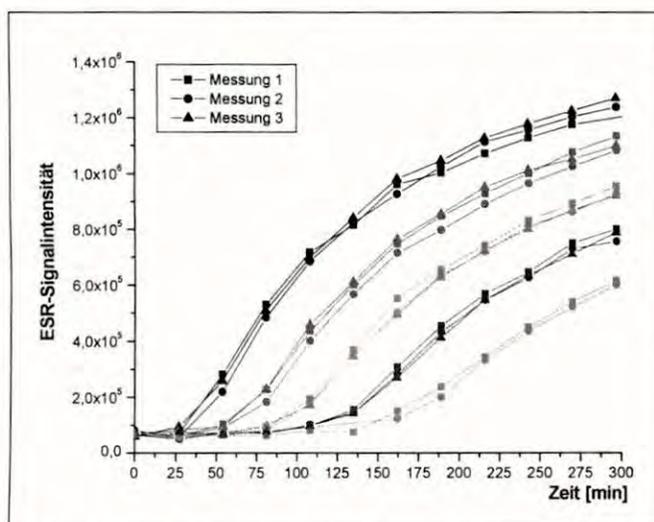
In den Abb. 6 a, b ist die Durchführung und Auswertung der BAX-Wert Bestimmung beispielhaft für eine Bierprobe dargestellt.



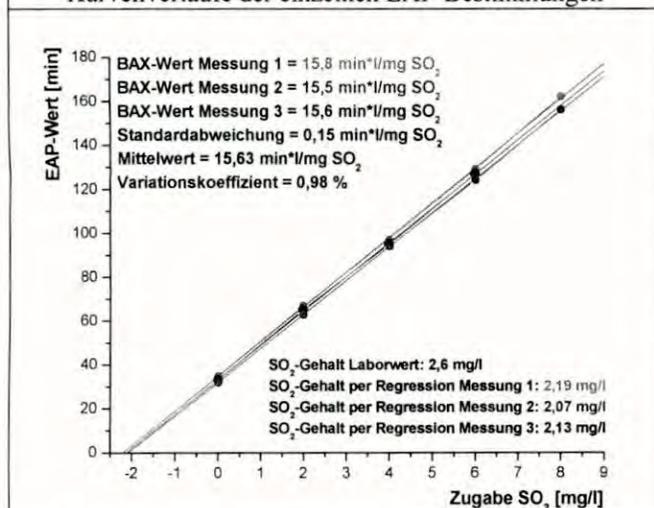
Das Ergebnis der Messung ohne SO_2 -Zugabe/l (Abb. 6a 1.) entspricht im Wesentlichen dem Wert der auch bei der normalen EAP-Bestimmung ermittelt wird (Kleine Abweichungen ergeben sich durch die Verdünnung die dem Volumen der Zugabe der Natriumdisulfitlösung entspricht – 0,150 ml Natriumdisulfitlösung / 12,35 ml Gesamtvolumen).

Die Zunahme der EAP-Werte im Bier, die aus der SO_2 -Zugabe resultiert (Abb. 6a, Standard 2, 4, 6, mg SO_2/l), wird im Anschluss in einem Diagramm gegen die SO_2 -Zugabe eingetragen (Abb. 6b). Der BAX-Wert kann nach beschriebener Formel berechnet werden oder direkt aus der Steigung der Regressionsgerade ermittelt werden. Die $\text{BAX}_{(\text{sp})}$ -Werte aller bisher überprüften Biere lagen hauptsächlich im Bereich von 15–60 min * l / mg SO_2 -Gehalt.

Bei den meisten Bieren ergab sich als positiver Nebeneffekt des BAX-Wertes die Möglichkeit, den ursprünglichen SO_2 -Gehalt der Bierproben durch Extrapolation der Regressionsgerade auf die X-Achse ermitteln zu können.



7 a: Reproduzierbarkeit der BAX-Wert Bestimmung
Kurvenverläufe der einzelnen EAP-Bestimmungen



7 b: Reproduzierbarkeit der BAX-Wert Bestimmung
Auswertung der BAX-Wert Bestimmung

Als Beispiel für die durchgeführten Messreihen zur Reproduzierbarkeit des BAX-Wertes sind in Abb. 7a und 7b die Ergebnisse von Weizenbierproben aus gleicher Abfüllung, die im Abstand von zwei Tagen gemessen wurden, gegenübergestellt. Die Lagertemperatur zwischen der ersten und zweiten Messung wurde mit 2 °C möglichst niedrig gewählt, um gleiche Voraussetzungen zu gewährleisten.

Aus Abb. 7 a, b gehen die Ergebnisse der Doppelbestimmung am ersten Messtag (0, 2, 4, 6, 8 mg/l SO_2 -Zudosierung) und das Ergebnis der zweiten Probe nach eintägiger Lagerung hervor (2 °C – 0, 2, 4, 6 mg/l SO_2). Die ermittelte Standardabweichung beträgt 0,15 min*/l/mg SO_2 , was bezogen auf die Mittelwerte der drei Messungen einen Variationskoeffizienten von 1 % entspricht. Auch die bereits angesprochene Möglichkeit der Bestimmung des SO_2 -Gehaltes der Probe ergibt eine gute Reproduzierbarkeit. Die Standardabweichung liegt bei 0,06 mg/l und der Variationskoeffizient bezogen auf den Mittelwert der drei Ergebnisse beträgt 2,8 %.

Allerdings unterscheidet sich der SO_2 -Mittelwert mit 2,13 mg/l um 0,47 mg/l von dem mittels der Destillationsmethode ermittelten Laborwert von 2,6 mg/l. Die gute Reproduzierbarkeit des EAP- und BAX-Wertes konnte durch weitere Messreihen bis zum Bereich einer mittleren oxidativen Bierstabilität bestätigt werden. Bei Bierproben die einen hohen EAP-Wert aufweisen, nimmt jedoch die Standardabweichung aufgrund der geringeren ESR-Signalintensität und des schlechter werdenden Signal-Rauschverhältnisses bei der Reproduzierbarkeit zu.

In Abb. 8 ist eine Auswahl an BAX-Wert Bestimmungen für unterschiedliche Biere dargestellt, um die Unterschiede zwischen verschiedenen Bieren zu verdeutlichen.

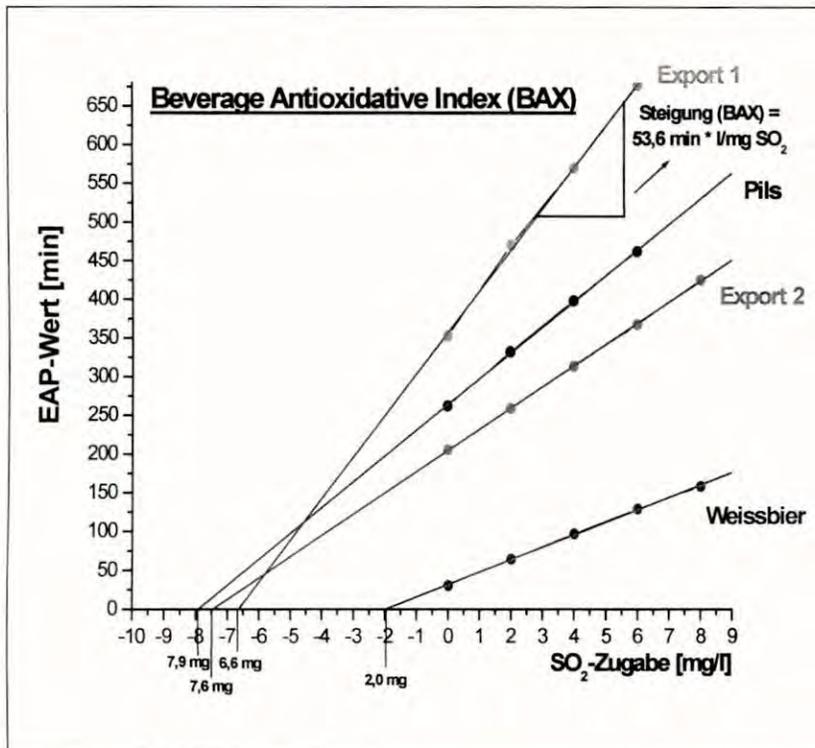


Abb. 8: BAX-Wert Bestimmung

Export 1: BAX-Wert = 53,6 min·l/mg SO₂ / SO₂-Gehalt x-Achse = 6,6 mg/l
SO₂-Gehalt (Laborwert, destillativ) = 7,1 mg/l

Pils: BAX-Wert = 33,3 min·l/mg SO₂ / SO₂-Gehalt x-Achse = 7,9 mg/l
SO₂-Gehalt (Laborwert, destillativ) = 7,6 mg/l

Export 2: BAX-Wert = 27,0 min·l/mg SO₂ / SO₂-Gehalt x-Achse = 7,6 mg/l
SO₂-Gehalt (Laborwert, destillativ) = 7,8 mg/l

Weissbier: BAX-Wert = 15,8 min·l/mg SO₂ / SO₂-Gehalt x-Achse = 2 mg/l
SO₂-Gehalt (Laborwert, destillativ) = 2,5 mg/l

Mittels der BAX-Wert Bestimmung kann man zum einen das unterschiedliche endogene antioxidative Potenzial der verschiedenen Biere aufzeigen (Abb. 9, EAP-Werte bei 0 mg SO₂-Zugabe), zum anderen gibt der BAX-Wert eine Auskunft darüber, wie schnell das vorhandene endogene antioxidative Potenzial verbraucht wird. Die BAX-Wert Bestimmung macht so gesehen die Auswirkungen zusätzlicher Faktoren neben dem SO₂-Gehalt auf die oxidative Bierstabilität in ihrer Gesamtheit zugänglich.

Neben den Einflüssen bestimmter Bierinhaltsstoffe stellt der pH-Wert der Bierprobe einen zusätzlichen Faktor der Biermatrix dar, dessen Einfluss näher zu

untersuchen war. Erste Messreihen haben gezeigt, dass der pH-Wert der Bierprobe einen entscheidenden Einfluss auf den EAP- und BAX-Wert ausübt. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass basierend auf sensorischen Analysen den Bieren mit niedrigeren pH-Werten eine höhere Geschmacksstabilität unterstellt wird. Der Einfluss des pH-Wertes auf den EAP- und BAX-Wert wurde überprüft, indem die pH-Werte von Bierproben mittels einer In HCl- und In KOH-Lösung eingestellt wurden. Vor den jeweiligen Messreihen zum pH-Wert Einfluss wurde eine entsprechende Testreihe unter HCl- bzw. KOH-Zugabe durchgeführt, um die Zugabe für das jeweilige Bier zu ermitteln und den pH-Wert auf bestimmte Werte einzustellen.

Die Untersuchungsergebnisse zum pH-Wert-Einfluss sind beispielhaft in der Abb. 9 für ein Exportbier mit niedriger und in Abb. 10 für ein Pils mit mittlerer oxidativer Bierstabilität dargestellt. Bei beiden Bieren kann mit sinkendem pH-Wert ein EAP-Wert-Anstieg bei gleichzeitiger Abnahme der ESR-Signalintensität beobachtet werden. Mit steigendem pH-Wert, nehmen die EAP-Werte entsprechend ab, wobei die ESR-Signalintensität ab einem pH-Wert von 4,6 einen Maximalwert erreicht.

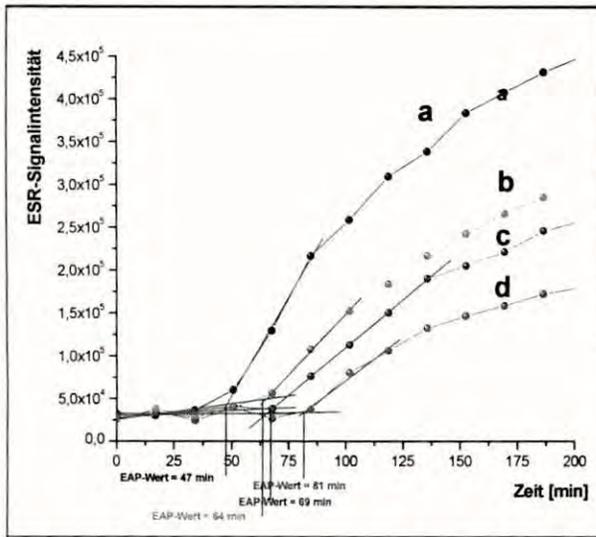


Abb.9: EAP-Wert Bestimmung – pH-Wert Einfluss
Bereich einer niedrigen oxidativen Bierstabilität

- 9 a.: Original pH-Wert = 4,55; EAP-Wert = 47 min
- 9 b.: pH-Wert = 4,35; EAP-Wert = 64 min
- 9 c.: pH-Wert = 4,15; EAP-Wert = 69 min
- 9 d.: pH-Wert = 3,95; EAP-Wert = 81 min

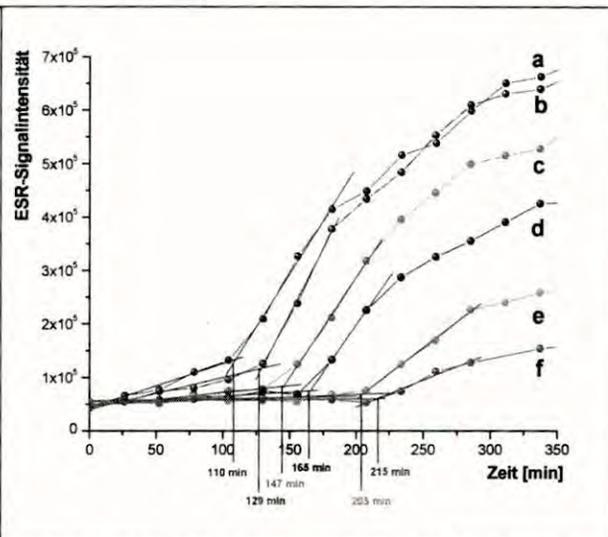


Abb.10: EAP-Wert Bestimmung – pH-Wert Einfluss
Bereich einer mittleren oxidativen Bierstabilität

- 10 a.: pH-Wert = 4,86; EAP-Wert = 110 min
- 10 b.: pH-Wert = 4,60; EAP-Wert = 129 min
- 10 c.: pH-Wert = 4,34; EAP-Wert = 145 min
- 10 d.: pH-Wert = 4,10; EAP-Wert = 165 min
- 10 e.: pH-Wert = 3,81; EAP-Wert = 204 min
- 10 f.: pH-Wert = 3,60; EAP-Wert = 212 min

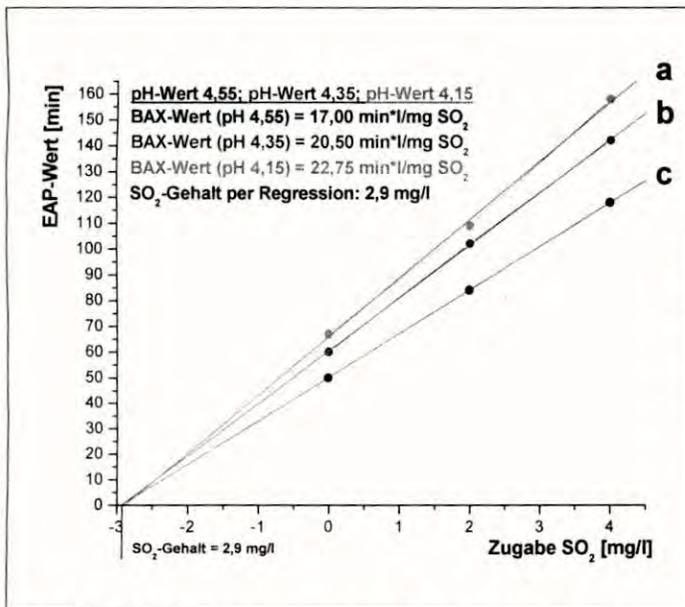


Abb.11: BAX-Wert Bestimmung – pH-Wert Einfluss

- 11 a.: BAX-Wert (pH-Wert 4,55) = 22,75 min*/l/mg SO₂
- 11 b.: BAX-Wert (pH-Wert 4,35) = 20,50 min*/l/mg SO₂
- 11 c.: BAX-Wert (pH-Wert 4,15) = 17,00 min*/l/mg SO₂

Die Ergebnisse zum pH-Wert-Einfluss auf den BAX-Wert bestätigen den vorliegenden Zusammenhang. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, steigt der BAX-Wert mit Erniedrigung des pH-Wertes an. Gegenüber dem Anfangswert steigen die BAX-Werte bei dem verwendeten Exportbier durch die Senkung des pH-Wertes von 4,55 auf 4,35 um etwa 3,5 min*/l/mg SO₂ auf 20,5 min*/l/mg SO₂ an. Bei einer weiteren Senkung von pH 4,35 auf 4,15 ist ein zusätzlicher Anstieg von 2,3 min*/l/mg SO₂ auf 22,75 min*/l/mg SO₂ zu beobachten. Einschränkend bleibt jedoch festzustellen, dass bei allen

Versuchsreihen die einzelnen EAP-Werte der Proben mit SO₂-Zugabe bei pH-Werten < 4 aufgrund der niedrigen ESR-Signalintensität nicht mehr auswertbar sind. Grundsätzlich gilt für den pH-Wert-Bereich von 3,6 – 4,9, umso niedriger der pH-Wert der Bierprobe desto größer ist der EAP-Wert bei gleichem SO₂-Gehalt bzw. desto höher wird der BAX-Wert. In diesem Zusammenhang ist auch noch einmal auf den Einfluss des pH-Werts auf die Radikalgenerierung (Fenton-System) hinzuweisen.

In Verbindung mit den ersten Untersuchungen zum Sauerstoffeinfluss wurde der Einfluss des Eisengehalts auf den BAX-Wert betrachtet. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 beispielhaft anhand von BAX-Wert-Bestimmungen unter definierter Sauerstoff- und Eisenzudosierung dargestellt.

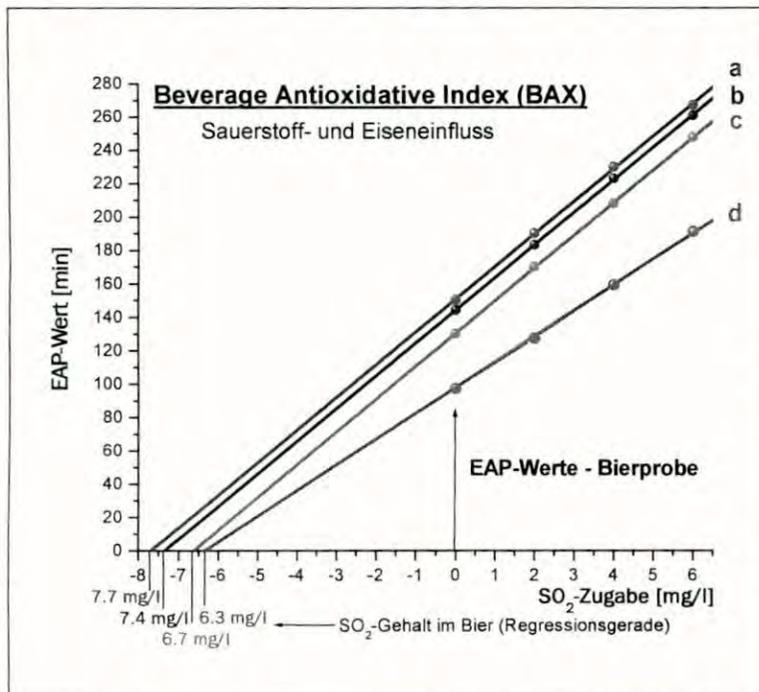


Abb.12: BAX-Wert Bestimmung – Sauerstoff- und Eiseneinfluss

12 a.: Bierprobe – Ausgangswert (Handelsbier - 2 Mon. gelagert RT):
EAP-Wert = 150 min; BAX-Wert = 19.5 min*/l/mg
12 b.: Bierprobe - 1 Tag forciert gealtert / 40 °C:
EAP-Wert = 144 min; BAX-Wert = 19.6 min*/l/mg
12 c.: Bierprobe - O₂-zudosiert - 1 Tag forciert gealtert / 40 °C:
EAP-Wert = 130 min; BAX-Wert = 19.5 min*/l/mg
12 d.: Bierprobe - Fe²⁺ (0,5 ppm) und O₂-zudosiert - 1 Tag gealtert/ 40°C
EAP-Wert = 97 min; BAX-Wert = 15.4 min*/l/mg

Dazu wurde einem Bier einmal definiert Sauerstoff und einmal Sauerstoff in Kombination mit Eisen (Eisen (II) – Sulfat - Heptahydrat) zudosiert. Im Anschluss wurden die Bierproben bei 40 °C forciert gealtert (1. Warmtag). Die Ergebnisse der BAX-Wert-Bestimmungen nach forciertem Alterung sind in Abb. 12 dem BAX-Ausgangswert und einer Bierprobe ohne Zudosierung gegenübergestellt. Die Ergebnisse spiegeln nicht nur den starken Einfluss von Sauerstoff auf das endogene antioxidative Potenzial eines Bieres wider, sondern zeigen gleichzeitig auf, dass der Verbrauch durch einen höheren Eisengehalt beschleunigt wird. Während der Sauerstoff das antioxidative Potenzial eines Bieres gemäß der Biermatrix verbraucht

und der EAP-Wert bei 0 mg SO₂-Zugabe entsprechend abnimmt ist der Einfluss des Sauerstoffs auf den BAX-Wert als eher gering einzustufen. Durch einen höheren Eisengehalt hingegen wird der BAX-Wert direkt beeinflusst, was eine entsprechend beschleunigte Abnahme des EAP-Werts (0 mg/l SO₂-Zugabe) zur Folge hat.

Weitere Untersuchungsergebnisse, wie sie im Späteren auch am Beispiel der Messergebnisse zum Filtrationsprozess dargestellt sind, zeigen auf, dass der Einfluss von Eisen auf den BAX-Wert im direkten Zusammenhang mit der katalytischen Wirkung von Eisen im Fenton-System zu betrachten ist. Mit zunehmendem Eisengehalt steigt die Radikalgenerierung im Bier stark an, was eine entsprechend beschleunigte Bildung der sehr reaktiven Hydroxylradikale und deren Reaktion mit anderen Bierinhaltsstoffen zur Folge hat. Das endogene antioxidative Potenzial des Bieres wird dadurch schneller verbraucht, was sich entsprechend in einer schnelleren Abnahme der EAP-Werte widerspiegelt.

Der negative Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die oxidative Stabilität und die damit verbundenen Geschmacksstabilität im Verlauf der Bieralterung konnte im Ansatz auch schon mit der bisher eingesetzten Lag-time-Messung aufgezeigt werden. Im Rahmen des Forschungsprojekts sollte die neue Methode dazu eingesetzt werden, die bisherigen Erkenntnisse hinsichtlich des Sauerstoffeinflusses während der Bierlagerung zu verifizieren und die Einflüsse präziser darzustellen.

Ein weiterer Anwendungsbereich für die neue EAP-Bestimmung ergibt sich direkt aus dem Einfluss der Verpackungsmaterialien auf die oxidative Bierstabilität [26, 27, 28]. Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungen zum Einfluss des Sauerstoffs während der Lagerung mit den ersten Vorversuchen zur Anwendbarkeit der EAP-Bestimmung bei Kronkorken mit O_2 -Scavengereigenschaften kombiniert. Um möglichst realistische Bedingungen zu gewährleisten wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten Vergleichsmessungen bei Bieren durchgeführt, denen zu Lagerbeginn unterschiedlich Luft zudosiert wurde. In Abb. 13 ist die Auswertung der EAP-Werte am Beispiel der Einzelmessungen nach zweiwöchiger Lagerzeit bei Raumtemperatur dargestellt. Die dazugehörigen EAP-Wert-Verläufe über den Zeitraum des Lagerversuches gehen aus dem Diagramm in Abb. 14 hervor.

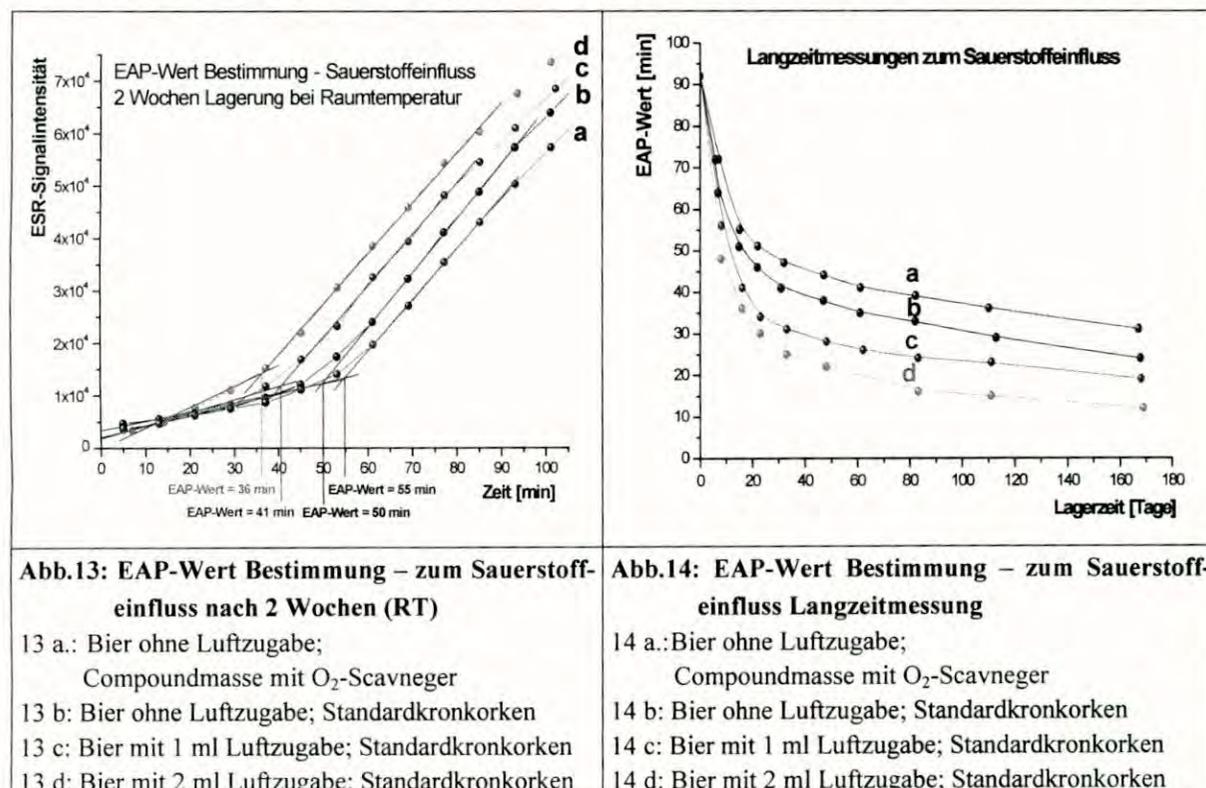


Abb.13: EAP-Wert Bestimmung – zum Sauerstoffeinfluss nach 2 Wochen (RT)

- 13 a.: Bier ohne Luftzugabe; Compoundmasse mit O_2 -Scavenger
 13 b.: Bier ohne Luftzugabe; Standardkronkorken
 13 c.: Bier mit 1 ml Luftzugabe; Standardkronkorken
 13 d.: Bier mit 2 ml Luftzugabe; Standardkronkorken

Abb.14: EAP-Wert Bestimmung – zum Sauerstoffeinfluss Langzeitmessung

- 14 a.: Bier ohne Luftzugabe; Compoundmasse mit O_2 -Scavenger
 14 b.: Bier ohne Luftzugabe; Standardkronkorken
 14 c.: Bier mit 1 ml Luftzugabe; Standardkronkorken
 14 d.: Bier mit 2 ml Luftzugabe; Standardkronkorken

Der negative Einfluss des Sauerstoffgehalts spiegelt sich experimentell in der Reduktion der EAP-Werte in Abhängigkeit vom O_2 -Gehalt wider. Generell ist bei höchster Luftzugabe die schnellste EAP-Wert-Abnahme und bei den Bierproben ohne Sauerstoffzugabe die langsamste Abnahme des EAP-Wertes zu beobachten. Nach etwa einem Monat liegt nur noch eine verlangsamt EAP-Wert-Abnahme in stark unterschiedlichen EAP-Wert Bereichen vor. Die Abnahme des EAP-Wertes lässt sich entsprechend in zwei Phasen unterteilen und bestätigt die Erkenntnisse, die schon aus der Anwendung der Lag-Time-Messung gegenüber der Lagerung gewonnen wurden. Während in der ersten Alterungsphase der EAP-Wert-Verlust hauptsächlich durch den im Bier nach der Abfüllung vorhandenen Sauerstoff bestimmt wird, spielen in der zweiten Alterungsphase andere Prozesse die entscheidende Rolle (z.B. O_2 -Permeation). Folglich stellen die Minimierung des O_2 -Eintrags im Brauprozess (incl. Abfüllung) und die Vermeidung von einem O_2 -Eintrag während der Lagerzeit, wesentliche Maßnahmen zur Erhöhung der oxidativen Bierstabilität dar, die qualitativ und quantitativ durch die EAP-Bestimmung zugänglich werden. Aus dem Verlauf der EAP-Wert-Abnahme unter Verwendung eines O_2 -Scavenger-Kronkorken geht die grundsätzliche Eignung der EAP-Bestimmung zum Nachweis der Einflüsse der Verpackungsmaterialien auf die oxidative Bierstabilität hervor. Aus

diesem Grunde wurde die EAP-Bestimmung in weiteren Lagerversuchen dazu eingesetzt, die Einflüsse verschiedener O₂-Scavenger-Kronkorken bzw. Bügelverschlussflaschen gegenüber den normalerweise eingesetzten Kronkorken aufzuzeigen. Des Weiteren sollte im Rahmen des Forschungsprojekts überprüft werden, ob die EAP-Werte durch begleitende Messungen anderer Methoden (GC-MS [29, 30], Sensorik Panel) mit der Bildung bestimmter Alterungscarbonyl (2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, Phenylacetaldehyd, Methional, ...) und der sensorischen Geschmacksstabilität korreliert werden können. Unter diesem Aspekt wurden die Lagerversuche zur Verpackungstechnik durch entsprechende Analysen mittels GC-MS (Tab. 1) und einem Sensorik Panel begleitet.

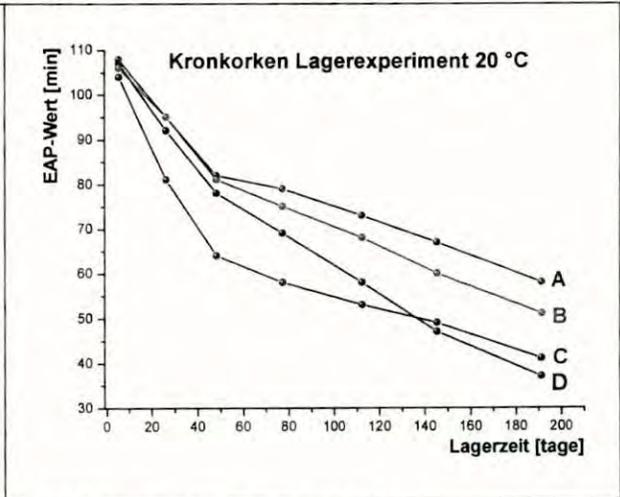
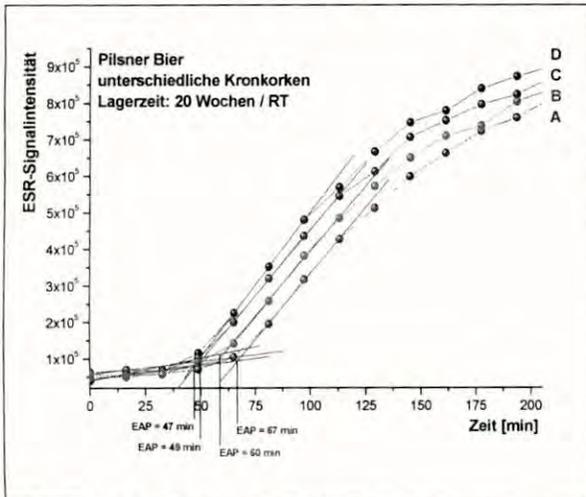


Abb.15: EAP-Wert Bestimmung Lagerversuch / Kronkorken – 20 Wo. (RT)
 15 a: - Compoundmasse mit O₂-Scavenger (Typ A)
 15 b: - Compoundmasse mit O₂-Scavenger (Typ B)
 15 c: - mit Barriere Compound
 15 d: - Standardkronkorken

Abb.16: EAP-Wert Bestimmung Lagerversuch / Kronkorken
 16 a: - Compoundmasse mit O₂-Scavenger (Typ A)
 16 b: - Compoundmasse mit O₂-Scavenger (Typ B)
 16 c: - mit Barriere Compound
 16 d: - Standardkronkorken

Tab. 1: Alterungskomponenten mittels GC-MS / Lagerversuch Kronkorken

Lagerzeit Raumtemperatur [Wochen]	Probe	3-Methylbutanal [ppb]	2-Methylbutanal [ppb]	2-Furfural [ppb]	Phenyl-ethanal [ppb]	Ethyl-nicotinate [ppb]	γ-Nonanoic-lactone [ppb]
Start	Startwert	2,5	1,2	2,4	13,1	10,5	55
11 Wochen	A (O ₂ -Sca-type A)	4,5	2,2	42,5	20,4	47,2	83,7
	B (O ₂ -Sca-type B)	4,8	2,4	41,1	21,1	46,4	82,3
	C (O ₂ -Barriere)	5,7	2,6	41,7	19,7	48,4	84,3
	D	5,5	2,7	44,8	22,5	51,6	83,5
	Standard	5,5	2,7	44,8	22,5	51,6	83,5
16 Wochen	A (O ₂ -Sca-type A)	4,8	2,7	44,4	19,4	62,2	88,8
	B (O ₂ -Sca-type B)	5	2,4	47,3	18,3	63,2	90,6
	C (O ₂ -Barriere)	6,4	2,9	50,7	19,4	64,6	94,1
	D	6,9	2,9	50,9	23,6	61,8	92,2
	Standard	6,9	2,9	50,9	23,6	61,8	92,2
20 Wochen	A (O ₂ -Sca-type A)	4,8	2,8	52,9	20	77,8	99,6
	B (O ₂ -Sca-type B)	5,2	3,1	54,5	19,8	79,4	97,3
	C (O ₂ -Barriere)	6,2	2,8	61,6	20	79,2	98
	D	7,3	3,4	55,6	23,1	74,5	96,1
	Standard	7,3	3,4	55,6	23,1	74,5	96,1

Prüfmerkmal	Standard Startwert nach Abfüllung und Transport	O ₂ -Scav A Startwert nach Abfüllung und Transport	O ₂ -Scav B Startwert nach Abfüllung und Transport	Barriere O ₂ Startwert nach Abfüllung und Transport
Geruch (aroma)	4,8	4,8	4,8	4,7
Reinheit des Geschmacks (flavour)	4,8	4,8	4,8	4,6
Vollmundigkeit (palatefulness)	4,8	4,6	4,8	4,7
Rezenz	4,6	4,6	4,8	4,7
Qualität der Bittere (bitterness)	4,6	4,4	4,6	4,3
Kommentar (comment)				

Tab. 2: Verkostungsergebnis direkt nach Abfüllung

Prüfmerkmal	Standard 16 Wochen Raum- temperatur	O ₂ -Scav A 16 Wochen Raum- temperatur	O ₂ -Scav B 16 Wochen Raum- temperatur	Barriere O ₂ 16 Wochen Raum- temperatur
Geruch (aroma)	3,6	4,0	3,9	3,9
Reinheit des Geschmacks (flavour)	3,4	4,0	3,9	3,6
Vollmundigkeit (palatefulness)	4,2	4,5	4,1	4,1
Rezenz	4,4	4,4	4,4	4,3
Qualität der Bittere (bitterness)	3,9	3,8	3,8	3,8
Kommentar (comment)	4 * oxidiert	1 * oxidiert	2 * oxidiert	2 * oxidiert

Tab. 4: Verkostungsergebnis Lagerversuch (16 Wo. / RT)

Prüfmerkmal	Standard 11 Wochen Raum- temperatur	O ₂ -Scav A 11 Wochen Raum- temperatur	O ₂ -Scav B 11 Wochen Raum- temperatur	Barriere O ₂ 11 Wochen Raum- temperatur
Geruch (aroma)	4,0	4,3	4,3	4,3
Reinheit des Geschmacks (flavour)	4,0	4,3	4,5	4,3
Vollmundigkeit (palatefulness)	4,6	4,9	4,7	4,8
Rezenz	4,6	4,7	4,7	4,8
Qualität der Bittere (bitterness)	4,4	4,4	4,3	4,4
Kommentar (comment)				

Tab. 3: Verkostungsergebnis Lagerversuch (11 Wo. / RT)

Prüfmerkmal	Standard 27 Wochen Raum- temperatur	O ₂ -Scav A 27 Wochen Raum- temperatur	O ₂ -Scav B 27 Wochen Raum- temperatur	Barriere O ₂ 27 Wochen Raum- temperatur
Geruch (aroma)	3,5	4,0	3,8	3,7
Reinheit des Geschmacks (flavour)	3,2	3,8	3,7	3,3
Vollmundigkeit (palatefulness)	3,7	3,8	3,7	3,8
Rezenz	3,8	4,0	3,8	3,7
Qualität der Bittere (bitterness)	3,7	3,7	3,7	3,7
Kommentar (comment)	6 * oxidiert 2 * sauer	1 * oxidiert	3 * oxidiert	4 * oxidiert

Tab. 5: Verkostungsergebnis Lagerversuch (27 Wo. / RT)

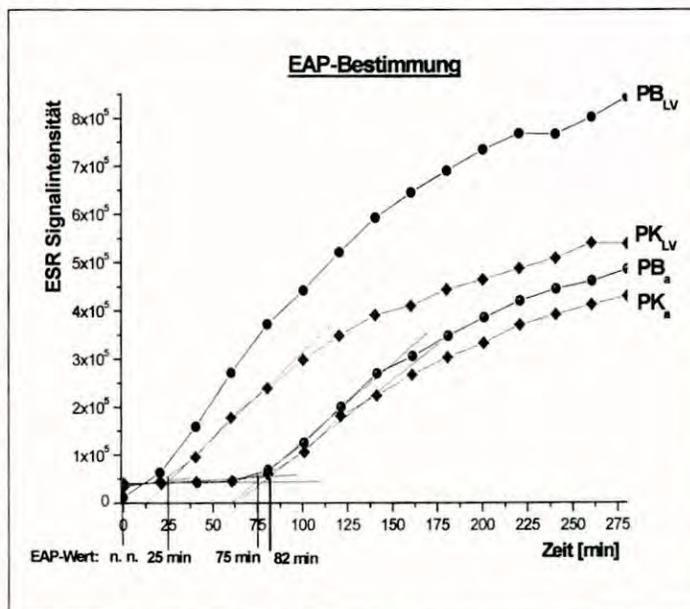
Die Ergebnisse der EAP-Wert-Bestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Lagerung spiegeln die Einflüsse der jeweils verwendeten O₂-Scavenger-Compoundmassen in den Kronkorken wider. Zunächst kann bei allen Bierproben eine schnelle EAP-Wertabnahme in den ersten zwei Lagermonaten beobachtet werden, die auf den Sauerstoffgehalt nach der Abfüllung (1. Alterungsphase) zurückzuführen ist. In der 2. Alterungsphase, die sehr wesentlich durch die O₂-Permeation beeinflusst wird, werden die Einflüsse der eingesetzten Compoundmassen augenscheinlich. Hierbei weisen die O₂-Scavenger Typ A und B gegenüber dem Standardkronkorken die besten antioxidativen Eigenschaften auf, wodurch der Verbrauch des endogenen antioxidativen Potenzials verlangsamt wird. Bei dem Barriere-Compound hingegen ist zu Beginn der Lagerung (ersten 2 Monate) eine verstärkte Abnahme im EAP-Wert zu beobachten. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Materialbeschaffenheit der Compoundmasse zu finden sein. Die Compoundmasse des Barrierecompounds zeichnete sich gegenüber den anderen durch eine höhere Materialhärte aus. Bei gleichem Anpressdruck in der Abfüllanlage der Brauerei könnte dies dazu geführt haben, dass der Anpressdruck für diese Compoundmasse nicht ausreichte und die Flasche nicht dicht genug verschlossen wurde. Erst im Verlauf der Lagerung passte sich die Compoundmasse dem Flaschenmund an, wodurch die Wirkung des Barrierecompounds erst zu einem späteren Zeitpunkt der Lagerung in Erscheinung trat.

Durch den direkten Vergleich der EAP-Wertentwicklung mit der Entwicklung der Alterungscarbonyl konnte nachgewiesen werden, dass eine Korrelation zwischen der EAP-Wertabnahme und den Sauerstoffindikatoren 2- und 3-Methylbutanal besteht. Beim Sauerstoffindikator Phenylethanal und den anderen Alterungscarbonylen konnte kein eindeutiger Zusammenhang zur EAP-Wertentwicklung nachgewiesen werden.

Anhand der durchgeführten sensorischen Analysen war in den ersten zwei bis drei Monaten, neben einer allgemeinen Abnahme im Geruch und Geschmack, kein signifikanter Unterschied zwischen den Bieren festzustellen. Im weiteren Verlauf der Lagerung wurden die beiden Biere mit den niedrigeren

EAP-Werten im Geruch und Geschmack jedoch eindeutig schlechter bewertet (Standardkronkorken, Barrierecompound). Die Ergebnisse weisen somit zusätzlich darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen dem EAP-Wert und der oxidativen Geschmackstabilität besteht.

In Abb. 16 ist eine Messreihe für den Vergleich von Bügelverschlussflaschen und Bierflaschen mit Standardkronkorken dargestellt. Die Ergebnisse zeigen auf, dass Bierflaschen mit Kronkorken gegenüber Bügelverschlussflaschen einen besseren Schutz gegenüber der O₂-Permeation aufweisen. Dem entsprechend wird das vorhandene antioxidative Potenzial der Biere gegenüber der Lagerzeit etwas langsamer verbraucht, wodurch die aus den Oxidationsprozessen resultierenden Fehleraromen später wahrgenommen werden.



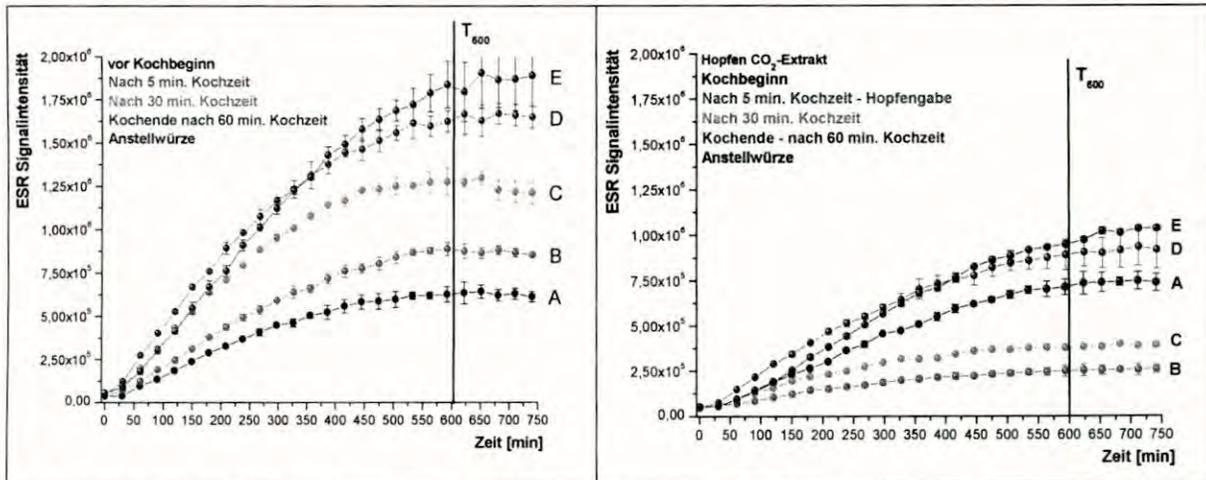
**Abb. 16: Lagerversuch Pilsener Bier
Bügelverschluss / Standardkronkorken**

- 16. PK_a: EAP-Ausgangswert (Standardkronkorken) = 82 min (Pilsner Handelsbier - nach Transport)
- 16. PB_a: EAP-Ausgangswert (Bügelverschluss) = 75 min (Pilsner Handelsbier - nach Transport)
- 16. PK_a: EAP-Wert (Standardkronkorken) = 25 min (Pilsner Handelsbier - 3,5 Mon. gelagert RT)
- 16. PB_a: EAP-Wert (Bügelverschluss) = nicht nachweisbar (Pilsner Handelsbier - 3,5 Mon. gelagert RT)

Ein weiterer Aufgabenbereich des Forschungsprojekts bestand in der Überprüfung der Eignung der neuen Analysenmethode zur Untersuchung bestimmter Zwischenstufen des Brauprozesses (Würzekochung, Gärung, Filtration, ...). Dazu wurde die EAP-Bestimmung erstmalig im Bereich der Würzekochung eingesetzt. Die ersten Vorversuche ließen schnell erkennen, dass die für Biere erarbeiteten Parametereinstellungen der EAP-Bestimmung im Hinblick auf die Spin-Trap-Konzentration, Ethanolzugabe und die ESR-Parametereinstellungen nicht direkt auf die Würze zu übertragen sind. Dies liegt im Wesentlichen in der pH-Wert abhängigen Stabilität der Spin-Trap-Addukte und dem nicht vorhandenen Alkoholgehalt in der Würze begründet.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen zu Beginn des Forschungsprojekts (s. Abb 1) konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass erst die sekundär gebildeten Hydroxyethylradikale ausreichend stabile Spin-Trap-Addukte ausbilden. Aus diesem Grunde ist auf der Basis durchgeführter Versuchsreihen eine Zudosierung von 5 Vol % Ethanol zur Würze vor Messbeginn zu empfehlen. Bezüglich der pH-Wert abhängigen Stabilität der Spin-Trap-Addukte ist für den pH-Wertbereich der Würze (pH 5,6-5,8) ebenso eine etwas erhöhte POBN-Konzentration erforderlich, um ein ausreichend gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Die durchgeführten Versuchsreihen haben aufgezeigt, dass eine POBN-Konzentration von 7,5 mM ausreicht, um bei einer möglichst geringen Beeinflussung der Ergebnisse durch das eingesetzte Spin-Trap-Reagenz aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

In den folgenden Abbildungen ist der Einfluss der Würzekochung auf die Radikalgenerierung und den EAP-Wert unter Anwendung der EAP-Bestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Würzekochung beispielhaft dargestellt. Dazu wurde eine Würzekochung ohne Hopfengabe (Abb. 17) einer normalen Würzekochung (Abb. 18) unter Zugabe von Hopfenextrakt gegenübergestellt, um die Möglichkeiten der EAP-Bestimmung im Bereich der Brauprozessstufe „Würzekochung“ aufzuzeigen.



**Abb.17: EAP-Wert Bestimmung Würzekochung
- ungehopfte Würze**

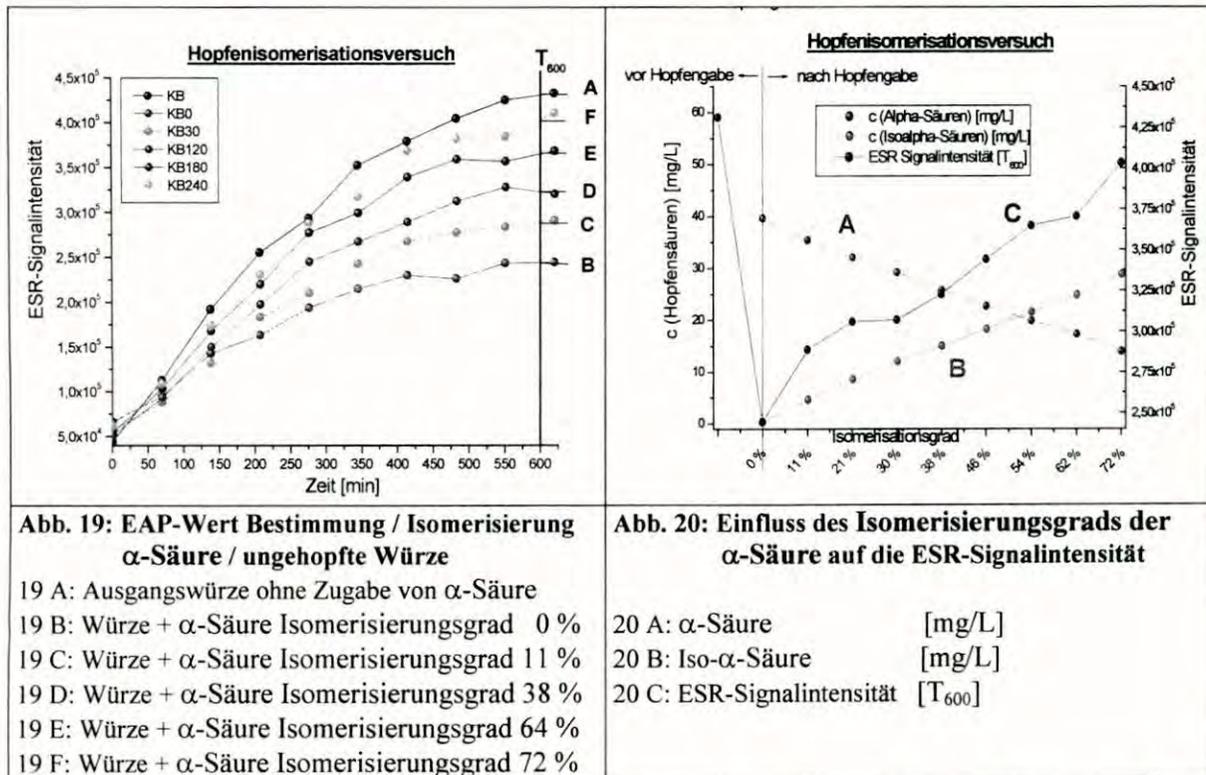
17 A: - vor Kochbeginn
17 B: - nach 5 min. Kochzeit
17 C: - nach 30 min. Kochzeit
17 D: - nach 60 min. Kochende
17 E: - Anstellwürze

**Abb.18: EAP-Wert Bestimmung Würzekochung
- gehopfte Würze (Hopfen CO₂-Extrakt)**

18 A: - vor Kochbeginn
18 B: - nach 5 min. Kochzeit => nach Hopfengabe
18 C: - nach 30 min. Kochzeit
18 D: - nach 60 min. Kochende
18 E: - Anstellwürze

Anhand der Entwicklung der ESR-Signalintensität (T_{600}) in Abbildung 17 ist zu erkennen, dass im Verlauf der Würzekochung ohne Hopfengabe die Radikalgenerierung von Kochbeginn bis Kochende kontinuierlich zunimmt. Hierbei ist die Zunahme der ESR-Signalintensität gegenüber der Kochzeit zu Beginn der Würzekochung am stärksten ausgeprägt und nimmt im Verlauf der Kochung kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu kann bei der Würzekochung unter Hopfenzugabe ein grundlegend anderer Zusammenhang nachgewiesen werden. Die Hopfenzugabe 5 min. nach Kochbeginn (Abb. 17 B) führt zu einer signifikanten Abnahme in der ESR-Signalintensität. Der weitere Kochprozess führt wiederum zu einem Anstieg in der ESR-Signalintensität, so dass zum Kochende hin eine ESR-Signalintensität etwas oberhalb der ESR-Ausgangssignalintensität in der Würze vorliegt. Aus der Gesamtbetrachtung beider Ergebnisse geht hervor, dass die Radikalgenerierung nach der Würzekochung durch die Hopfengabe gegenüber der ungehopften Würze um mehr als die Hälfte reduziert werden konnte. Diese Reduzierung kann auf das hohe antioxidative und antiradikalische Potential der verschiedenen Hopfeninhaltsstoffe zurückgeführt werden.

In einer Vielzahl weiterer Messreihen konnte die Eignung der EAP-Wert-Bestimmung zum Nachweis der Einflüsse bestimmter Hopfeninhaltsstoffe (z.B. α -Säuren bzw. Iso- α -Säuren, β -Säuren bzw. Iso- β -Säuren, Polyphenole) aufgezeigt werden. In Abbildung 19 ist beispielhaft eine Versuchsreihe zum Einfluss der α -Säuren dargestellt. In dieser Versuchsreihe wurde der 5 min. gekochten Würze eine reine α -Säure, respektive α -Säure mit unterschiedlichen Isomerisierungsgraden, direkt vor Messbeginn zugesetzt (EAP-Wert Bestimmung).



Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die durch die α -Säure verursachte Reduzierung der ESR-Signalintensität mit steigendem Isomerisierungsgrad abnimmt. Daraus kann abgeleitet werden, dass das antioxidative und antiradikalische Potenzial der α -Säure durch die bei der Würzekochung vorliegende Isomerisierung verringert wird und die entstandene Iso- α -Säure gegenüber der α -Säure ein geringeres antioxidatives Potenzial aufweist. Aufgrund ihres hohen antioxidativen Potenzials üben die α -Säuren einen direkten Einfluss auf die Radikalgenerierung aus, so dass die Abnahme der ESR-Signalintensität durch die Hopfengabe im Brauprozess auch auf α -Säuren zurückzuführen ist. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der α -Säuren ist es jedoch entscheidend wie viel der vorhandenen α -Säure in Lösung vorhanden ist. Bei der angewendeten Versuchsreihe wurde eine Konzentration von 40 mg α -Säure/L gewählt, um eine vollständige Lösung der α -Säure zu gewährleisten. Grundsätzlich bilden sich aus den zuerst schlecht löslichen α -Säuren durch Isomerisierung die Iso- α -Säuren, die in der Würze gelöst vorliegen und den Bitterstoff im fertigen Bier abgeben. Aus den vorliegenden Ergebnissen abgeleitet, bedingt die Bildung der Iso- α -Säuren, neben anderen Reaktionen, eine Zunahme der ESR-Signalintensität durch den weiteren Kochprozess nach der Hopfengabe. Ebenso sind die Iso- α -Säuren sauerstoffempfindlich und bilden während der Würzekochung bestimmte Mengen an Oxidationsprodukten, die zusätzlich den Biergeschmack beeinflussen können.

Im Weiteren wurde die Eignung der EAP-Bestimmung für den Einsatz im Brauprozessschritt „Gärung“ überprüft. Im Verlauf einer Gärung wird das endogene antioxidative Potenzial, die Radikalgenerierung, die Entstehung von stabilen Spin-Trap-Addukten aus sekundär gebildeten Hydroxyethylradikalen und die Stabilität der entstandenen Spin-Trap-Addukte aufgrund der sich stetig ändernden Würze/Biermatrix durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Zum einen wird im Verlauf der Gärung endogenes antioxidatives Potenzial durch Reduktionsprozesse ausgebildet, was eine entsprechende EAP-Wert-Zunahme im Verlauf der Gärung zur Folge hat (z.B. SO₂-Bildung). Zum anderen wird die Biermatrix durch die pH-Wert-Abnahme und die Alkoholbildung beeinflusst. Wie aus

den Untersuchungen hervorgeht (s. Abb. 9, 10, 11), beeinflusst die pH-Wert-Abnahme im Verlauf der Gärung den EAP-Wert positiv und führt zu einer höheren Stabilität der Spin-Trap-Addukte. Die aus der Gärung resultierende Zunahme im Alkoholgehalt führt hingegen zu einer vermehrten Bildung entsprechender Sekundärradikale - hauptsächlich Hydroxyethylradikale - die stabile Spin-Trap-Addukte ausbilden können und zu einem Anstieg in der ESR-Signalintensität führen.

In den Abbildungen 21 - 25 sind die Ergebnisse der Aufnahme des Gärungsverlaufs (Extraktabbau Abb.21-23, Hefezellzahl Abb. 21, pH-Wert Abb. 22, SO₂-Gehalt Abb. 23) und der EAP-Wert-Bestimmung (Abb. 24) zu verschiedenen Zeitpunkten des Gärungsverlaufs beispielhaft gegenüber gestellt. Aus den Ergebnissen in Abbildung 24 gehen die Kurvenverläufe der EAP-Bestimmung zu verschiedenen Zeitpunkten des Gärungsverlaufs hervor. In Abbildung 25 ist die Entwicklung der ESR-Signalintensität (T_{400}) und die Bildung des Alkoholgehalts im Verlauf der Gärung gegenübergestellt.

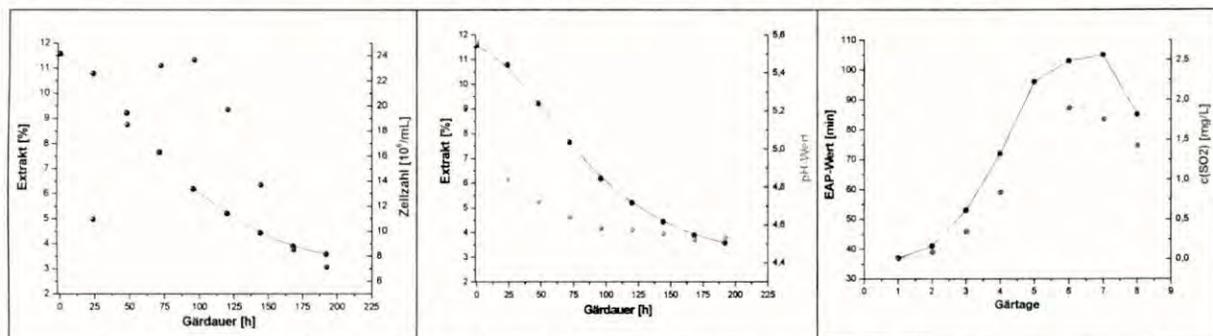


Abb. 21: Gärungsverlauf Extraktabbau / Hefezellzahl

Abb. 22: Gärungsverlauf Extraktabbau / pH-Wert

Abb. 23: Gärungsverlauf SO₂-Gehalt / EAP-Wert

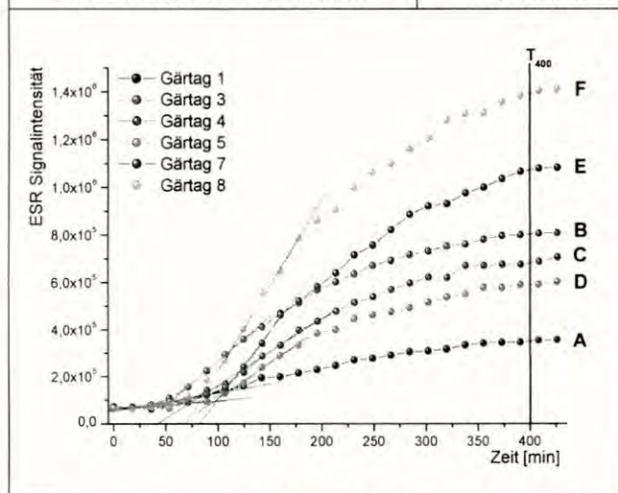


Abb. 24: Gärungsverlauf / EAP-Wert Bestimmung
 24 A: Gärtag 1 / Kurvenverlauf EAP-Wert Bestimmung
 24 B: Gärtag 3 / Kurvenverlauf EAP-Wert Bestimmung
 24 C: Gärtag 4 / Kurvenverlauf EAP-Wert Bestimmung
 24 D: Gärtag 5 / Kurvenverlauf EAP-Wert Bestimmung
 24 E: Gärtag 7 / Kurvenverlauf EAP-Wert Bestimmung
 24 F: Gärtag 8 / Kurvenverlauf EAP-Wert Bestimmung

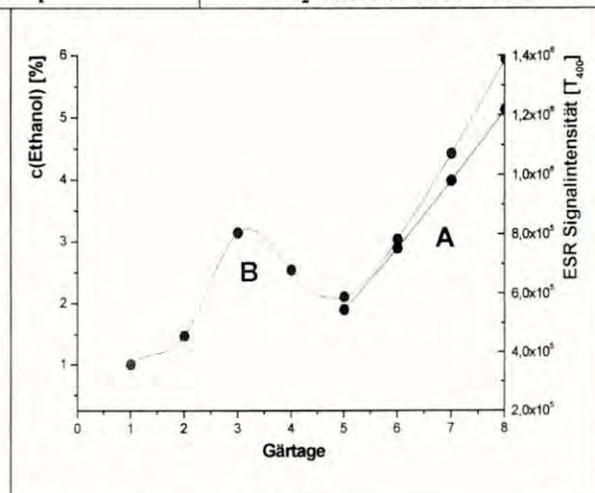


Abb. 25: Gärungsverlauf ESR-Signalintensität / Alkoholbildung [T₄₀₀]
 25 A: Alkoholbildung gegenüber den Gärtagen
 25 B: Entwicklung der ESR-Signalintensität [T₄₀₀] gegenüber den Gärtagen

Die Kurvenverläufe in Abbildung 24 spiegeln alle Einflussfaktoren im Verlauf einer Gärung wider. Zu Beginn der Gärung führt der pH-Wert-Sturz dazu, dass die ESR-Signalintensität (Abb. 25) bis zum 3. Gärtag ansteigt. Dies kann im Wesentlichen auf die pH-Wert-abhängige höhere Stabilität der Spin-Trap-Addukte zurückgeführt werden, da die Alkoholbildung zu diesem Zeitpunkt der Gärung noch sehr gering ist, d.h. der Anstieg in der ESR-Signalintensität kann zu Beginn der Gärung noch nicht entscheidend auf die höhere Konzentration an entstehenden Hydroxyethylradikalen zurückgeführt

werden. Im weiteren Verlauf der Gärung ist zwischen dem 3. und 5. Gärtag wieder eine Abnahme in der ESR-Signalintensität zu beobachten (Abb. 25). Dies liegt in der beschleunigten Ausbildung des endogenen antioxidativen Potenzials bzw. EAP-Wertes (Abb. 23) zwischen dem 3. und 6. Gärtag begründet. Die Ausbildung des endogenen antioxidativen Potenzials führt im Verlauf der Messung (forcierte Alterung 60 °C) zu einer späteren und geringeren Radikalgenerierung im Bier. Entsprechend kann zunächst eine Abnahme in der ESR-Signalintensität beobachtet werden. Ab dem 5. Gärtag wird jedoch pro Gärtag soviel Alkohol gebildet, dass der daraus resultierende Anstieg in der ESR-Signalintensität durch die vermehrte Entstehung von Hydroxyethylradikalen (stabile Spin-Trap-Addukte) die Abnahme der ESR-Signalintensität durch die EAP-Wertzunahme übersteigt. Entsprechend kann ab dem 5. Gärtag eine entsprechende Zunahme in der ESR-Signalintensität beobachtet werden. In diesem Zusammenhang ist auch auf eine beobachtete Abnahme der EAP-Werte und des SO₂-Gehaltes im Bier zum Ende der Gärung hinzuweisen. Durch einen abnehmenden EAP-Wert am Ende der Gärung wird der Anstieg der ESR-Signalintensität zusätzlich unterstützt. Der abnehmende EAP-Wert kann auf die beginnende Autolyse der Hefezellen und eine verminderte Bildung an Schwefeldioxid zurückgeführt werden, d.h. die durch die Gärung entstehenden antioxidativ wirkenden Bierinhaltsstoffe reichen zum Ende der Gärung hin nicht mehr aus, um die stattfindenden oxidativen Prozesse im Gärtank auszugleichen. Insgesamt ist der Einsatz der EAP-Bestimmung in der Brauprozessstufe „Gärung“ aufgrund der beschriebenen komplizierten Zusammenhänge als problematisch zu beurteilen.

Im Weiteren wurde die neue EAP-Bestimmung erstmalig im Bereich der Filtration bei der Gegenüberstellung der Kieselgur- und Cross-Flow Membranfiltration eingesetzt. Es hat sich herausgestellt, dass die EAP- und BAX-Wert-Bestimmung sehr gut dazu geeignet ist, die unterschiedlichen Einflüsse beider Filtrationssysteme auf die Radikalgenerierung im Bier und den entsprechenden Einfluss auf das endogene antioxidative Potenzial aufzuzeigen.

Im Rahmen eines Großversuchs wurde die Cross-Flow-Membranfiltration der Kieselgurfiltration unter CO₂-Begasung bei gleichzeitiger Verwendung einer Kieselgur mit niedrigerem Eiseneintrag gegenübergestellt und ein Bier aus gleichem Lagertank getrennt filtriert. Hierbei lag der durch die Kieselgurfiltration verursachte Sauerstoffeintrag um ca. 0,02 mg/l über dem der Membranfiltration (s.Tab. 6).

Tab. 6: Alterungskomponenten mittels GC-MS / Lagerversuch Kronkorken

Membranfiltration		Kieselgurfiltration	
Probenahmestelle/ Zeitpunkt	Sauerstoffgehalt [mg/l]	Probenahmestelle/ Zeitpunkt	Sauerstoffgehalt [mg/l]
ZKG	0,033	ZKG	0,034
<u>Anfang Filtration:</u> nach Membranfiltration	0,036	<u>Anfang Filtration:</u> nach Separator	0,039
nach Karbonisierung	0,043	nach Kieselgurfiltration	0,066
<u>Mitte Filtration:</u> nach Membranfiltration	0,033	<u>Mitte Filtration:</u> nach Separator	0,035
nach Karbonisierung	0,042	nach Kieselgurfiltration	0,048
<u>Ende Filtration:</u> nach Membranfiltration	0,033	<u>Ende Filtration:</u> nach Separator	0,036
nach Carbonisierung	0,037	nach Kieselgurfiltration	0,058
<u>vor der Abfüllung:</u> Drucktank-Auslauf	0,049	<u>vor der Abfüllung:</u> Drucktank-Auslauf	0,048

Bei der Membranfiltration war lediglich zu Beginn der Filtration ein Sauerstoffeintrag von ca. 0,01 mg/l festzustellen. Da beim membranfiltrierten Bier ein stärkerer Sauerstoffeintrag über die Carbonisierung bis hin zum Drucktank vorlag, konnte vor der Abfüllung ein ungefähr gleicher Sauerstoffgehalt im Drucktank festgestellt werden.

In Abb. 26 sind die entsprechenden Ergebnisse der EAP-Bestimmungen, nach Probenahme zu Beginn der Kieselgur- und Membranfiltration, gegenübergestellt. Aus den Messergebnissen in Abb. 26 a, b, c

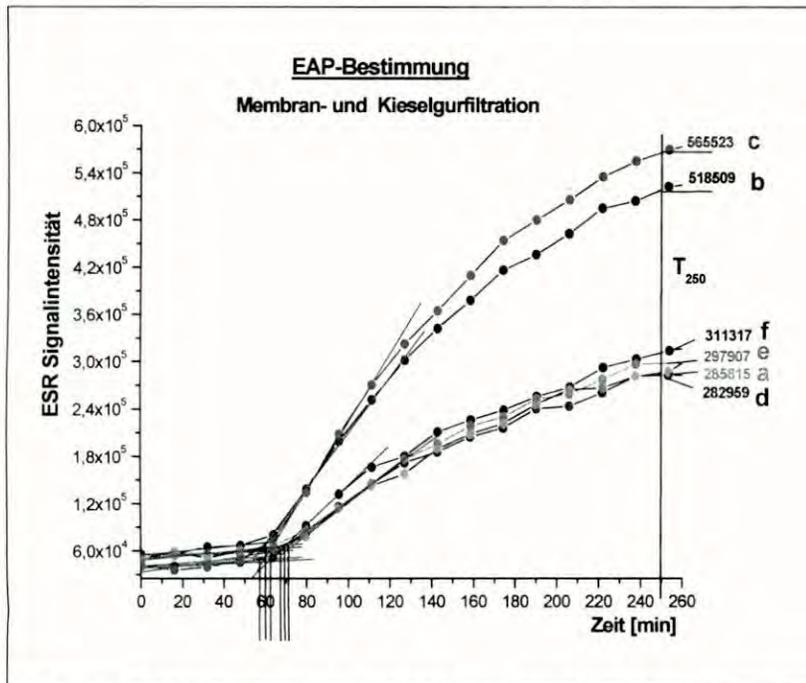


Abb. 26: EAP-Wert Bestimmung /Membran- und Kieselgurfiltration

- 26 a.: Bierprobe - vor Kieselgurfiltration, EAP-Wert = 72 min;
 26 b.: Bierprobe - nach Kieselgurfiltration, EAP-Wert = 60 min;
 26 c.: Bierprobe - abgef. Bier, Kieselgurfiltration, EAP-Wert=59 min
 26 d.: Bierprobe - vor Membranfiltration, EAP-Wert = 69 min;
 26 e.: Bierprobe - nach Membranfiltration, EAP-Wert = 67 min;
 26 f.: Bierprobe - abgef. Bier, Membranfiltration, EAP-Wert=63min

geht der Zusammenhang für ein kieselgurfiltriertes Bier hervor. Vor der Filtration (Abb. 26 a) weist das Bier ein EAP-Wert von 72 min bei geringer Radikalgenerierung auf (niedrige ESR Signalintensität). Direkt nach der Kieselgurfiltration (Abb. 26 b) ist ein auffällig starker Anstieg bei der Radikal-generierung und eine Abnahme beim EAP-Wert auf 60 min festzustellen (Die Abnahme ist über den gesamten Filtrations-prozess etwas unterschiedlich und steht im Zusammenhang mit der Kieselgurzufdosage). Bis zum abgefüllten Bier (Abb. 26 c) ist ein zusätzlicher Anstieg in der

ESR-Signalintensität und eine weitere Abnahme im EAP-Wert (59 min) zu beobachten, der sich über den Abfüllprozess erklären lässt.

Im Gegensatz dazu konnte beim membranfiltrierten Bier (Abb. 26 d, e, f) kein wesentlicher, durch die Filtration verursachter Anstieg bei der Radikalgenerierung festgestellt werden. Auch die Abnahme der EAP-Werte fiel allgemein geringer aus. Lediglich beim Vergleich der abgefüllten Bierproben mit den Proben direkt nach der Filtration konnte, in Analogie zum kieselgurfiltrierten Bier, ein Anstieg in der Signalintensität und eine Abnahme im EAP-Wert (Bsp. Abb. 26: von 67 min auf 63 min) beobachtet werden (Abfüllprozess). Letztendlich entscheidend ist der Direktvergleich der abgefüllten Bierproben in Abb. 26 c und f, aus dem der Gesamteinfluss beider Filtrationssysteme auf die Radikalgenerierung und das endogene antioxidative Potenzial eines Bieres hervorgeht. Durch zusätzliche EAP-Bestimmungen und dem Abgleich der Ergebnisse mit den mittels AAS bestimmten Eisenwerten, konnte der gefundene Zusammenhang erklärt und belegt werden. Er liegt im Wesentlichen in dem durch die Kieselgur verursachten Eiseneintrag während der Filtration begründet. Für die in Abb. 26 dargestellte Messreihe konnten folgende Eisengehalte in den Bierproben ermittelt werden: Lagertank 0,02-0,03 ppm, abgefülltes Bier - membranfiltriert 0,03 ppm, abgefülltes Bier - kieselgurfiltriert 0,06 ppm.

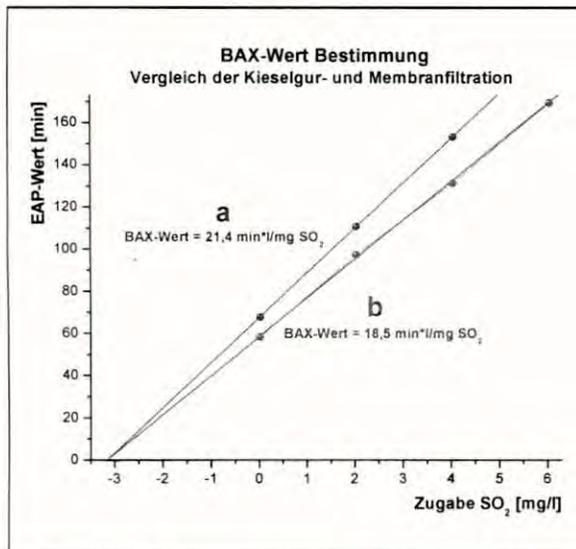


Abb.27: BAX-Wert-Vergleich Membran- und Kieselgurfiltration

27 a.: Membranfiltration nach Abfüllung
 BAX-Wert = 21,4 min*/l/mg SO₂
 SO₂-Gehalt per Regressionsgerade = 3,2 mg/l
 SO₂-Gehalt Laborwert = 3,5 mg/l

27 b.: Kieselgurfiltration nach Abfüllung
 BAX-Wert = 18,5 min*/l/mg SO₂
 SO₂-Gehalt per Regressionsgerade = 3,2 mg/l
 SO₂-Gehalt Laborwert = 3,6mg/l

Letztendlich lag im abgefüllten kieselgurfiltrierten Bier ein doppelt so hoher Eisengehalt gegenüber dem membranfiltrierten Bier vor. Bei älteren Kieselgurfiltrationsanlagen konnte ein zusätzlicher Einfluss durch den höheren Sauerstoffeintrag über die Kieselgurfiltration aufgezeigt werden.

Die in Abb. 27 dargestellten BAX-Wert-Bestimmungen spiegeln die Auswirkungen des Eiseneintrags auf das Bier wider. Das nach der Kieselgurfiltration abgefüllte Bier weist mit 18,5 min*/l/mg SO₂ einen niedrigeren BAX-Wert gegenüber dem membranfiltrierten Bier mit 21,4 min*/l/mg SO₂ auf.

Zur Überprüfung des Einflusses der Lagerzeit bei Raumtemperatur auf die beiden Biere, wurden die Proben in monatlichen Abständen gemessen. Die Ergebnisse für den zweiten und dritten Lagermonat sind in Abb. 28 dem Ausgangswert gegenübergestellt. Die Lagerversuche ergaben über die Lagerzeit einen in etwa gleichen EAP-Wert-Verlust,

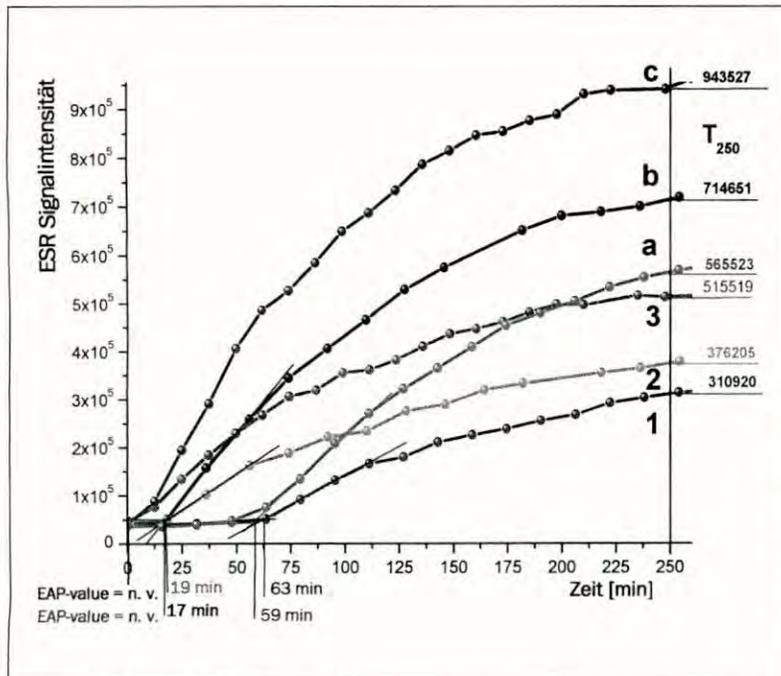


Abb.28: EAP-Wert Bestimmung Lagerversuch Membran- und Kieselgurfiltration

28 a.: nach der Abfüllung; Kieselgurfiltration; EAP-Wert = 59 min
 28 b.: 2 Monate Lagerung; Kieselgurfiltration; EAP-Wert = 17 min
 28 c.: 3 Monate Lagerung; Kieselgurfiltration; EAP-Wert = n. n.
 28.(1).: nach der Abfüllung; Membranfiltration; EAP-Wert = 63 min
 28.(2).: 2 Monate Lagerung; Membranfiltration; EAP-Wert = 17 min
 28.(3).: 3 Monate Lagerung; Membranfiltration; EAP-Wert = n. n

so dass für beide Biere nach dreimonatiger Lagerung kein EAP-Wert mehr nachzuweisen war. Der ursprünglich etwa gleiche SO₂-Gehalt von 3,5 - 3,6 mg/l nahm nach anderthalb Monaten bei dem membranfiltrierten Proben auf 2,3 mg/l und bei dem kieselgurfiltrierten Bier auf 1,8 mg/l ab. Die über die Lagerzeit durchgeführten DLG-Verkostungen (Tab. 7) spiegeln die zuvor ermittelten Ergebnisse im Ansatz wider. Da es sich um das gleiche Bier handelt und die Sauerstoffgehalte im abgefüllten Bier vergleichbar waren, liegen die Ergebnisse der sensorischen Analyse in den ersten Monaten relativ nahe beieinander. Am Anfang weist das kieselgurfiltrierte

Bier im Direktvergleich sogar etwas bessere Werte auf. Im Verlauf der weiteren Lagerung (Raumtemperatur) bleiben die Verkostungsergebnisse, auf einem für eine DLG-Verkostung mittleren Niveau und liegen bis zu einer Lagerzeit von drei Monaten sehr nahe beieinander. Erst nach dem dritten Monat der Lagerung lassen sich eindeutige Unterschiede in den Ergebnissen feststellen, so dass nach fünf Monaten Lagerzeit für das membranfiltrierte Bier bessere Werte vorliegen. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die EAP-Werte bei beiden Bieren erst nach drei Monaten Lagerzeit einen EAP-Nullwert erreicht haben und etwaige Unterschiede in der Radikalgenerierung erst danach im Bier in Erscheinung treten.

Tab. 7: Verkostungsergebnisse des Lagerversuches

Lagerzeit (Wochen bei RT) Sensorisches Kriterium	Start KF	Start MF	8 KF	8 MF	12 KF	12 MF	20 KF	20 MF
Geruch	4,5	4,2	4,0	4,0	3,5	3,7	3,4	3,8
Reinheit des Geschmacks	4,3	4,2	3,8	3,8	3,6	3,7	3,0	3,4
Vollmundigkeit	4,5	4,3	4,1	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Rezenz	4,6	4,2	4,3	4,0	4,2	4,2	3,8	4,1
Qualität der Bittere	4,3	4,0	3,8	4,0	3,8	3,8	3,9	4,0

Zusätzlich wurde die Entwicklung bestimmter Alterungskomponenten mittels SAFE und GC-MS über den Zeitraum von drei Monaten verfolgt. Anfänglich liegen bei den Sauerstoffindikatoren ungefähr gleiche Werte für beide Biere vor. Nach einer dreimonatigen Lagerung kann beim kieselgurfiltrierten Bier gegenüber dem membranfiltrierten für 2- und 3-Methylbutanal leicht erhöhte Werte festgestellt werden. Auch beim Phenylethanal und γ -Nonalacton sind nach drei Monaten beim kieselgurfiltrierten Bier höhere Werte aufgetreten.

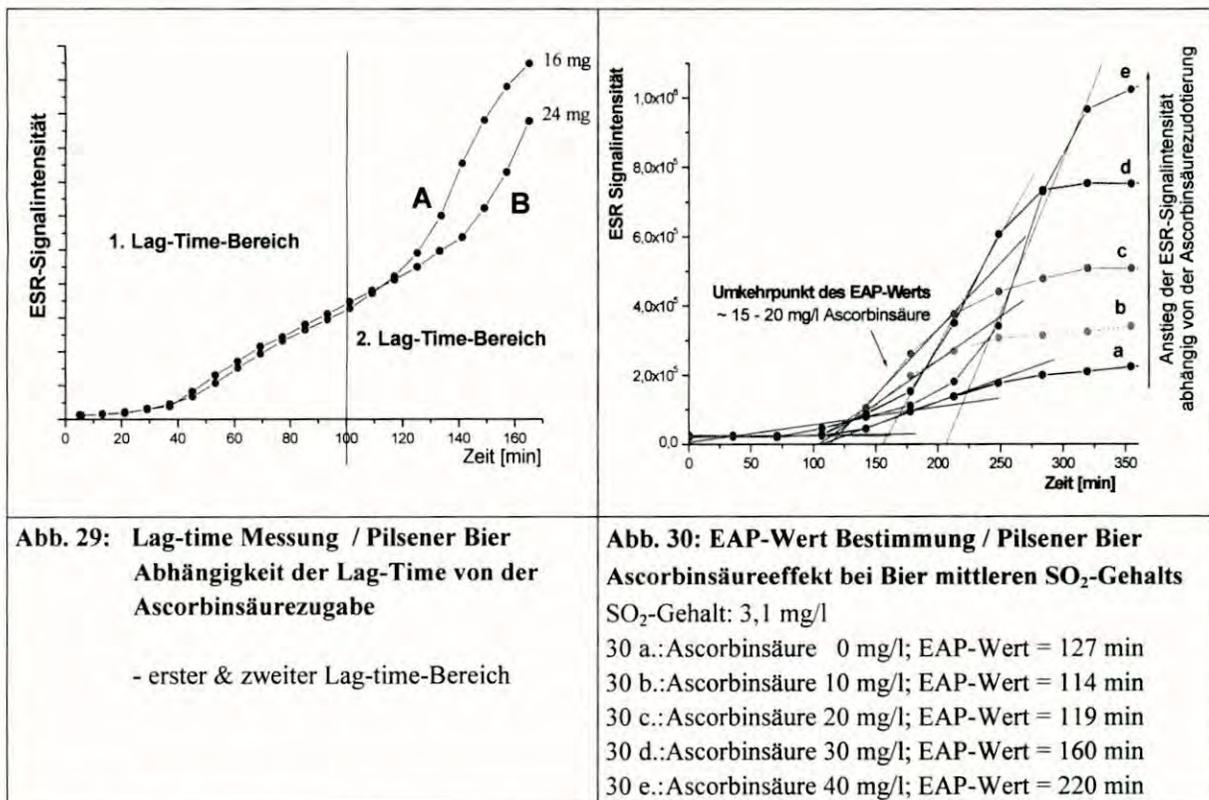
Tab. 8: Entwicklung ausgewählter Alterungskomponenten

Substanz	1 Woche nach der Abfüllung		nach 2 Monaten Lagerung (20 °)		nach 3 Monaten Lagerung (20 °)	
	Membran- filtration [ppb]	Kieselgur- filtration [ppb]	Membran- filtration [ppb]	Kieselgur- filtration [ppb]	Membran- filtration [ppb]	Kieselgur- filtration [ppb]
3-Methylbutanal	0,8	1	7,9	9,4	11,4	13,2
2-Methylbutanal	0,3	0,7	3	3,1	3,6	4,8
Phenylethanal	8,5	9,1	13	11,8	18	25,3
2-Furfural	2,1	1,9	54,6	54	102,2	119,2
Nicotinsäure- ethylester	4,7	7,1	26,3	23,8	37,3	40,2
γ -Nonalacton	27,5	33,1	31,6	31,1	36,5	45,7

Basierend auf den Vorversuchen zum Einfluss der Ascorbinsäure auf das endogene antioxidative Potenzial von Getränken, sollte im Rahmen des Forschungsprojekts die neue Analysenmethode dazu eingesetzt werden, den Einfluss der Ascorbinsäure in ihrer pro- und antioxidativen Wirkungsweise näher zu untersuchen.

Aus den Ergebnissen der Voruntersuchungen unter Anwendung der Lag-time-Messung (PBN) ergaben sich zwei Lag-time-Bereiche im Kurvenverlauf, wobei der Anstieg der zweiten Radikalgenerierung mit der vorhandenen Ascorbinsäurekonzentration korreliert (s. Abb. 29).

Für niedrige Konzentrationen wurde der Literaturbefund [9] einer Abnahme der Lag-Time in den bisher gemessenen Lag-Time-Bereichen (1. Lag-Time-Bereich, Abb. 29) bestätigt. Im oberen Bereich der Kurvenverläufe (2. Lag-Time-Bereich, Abb. 29) lässt sich eine ausgeprägte, von der Ascorbinsäurekonzentration abhängige Radikalgenerierung mit stark negativen Auswirkungen auf die Geschmacksstabilität erkennen. Wegen der charakteristischen Veränderung der Kurvenverläufe und Lag-Time-Werte (Abb. 29) deuten die Ergebnisse auf eine von der Konzentration abhängige pro- und antioxidative Wechselwirkung im Bier hin [19].



Bei den mittels der neuen Analysenmethode (EAP-Bestimmung) durchgeführten Untersuchungen wurde in Analogie zu den Vorversuchen den Bieren Ascorbinsäure in unterschiedlichen Konzentrationen zudosiert. In Abb. 30 ist eine entsprechende Messreihe am Beispiel eines Pilsener Bieres mit einem SO₂-Gehalt von 3,1 mg/l dargestellt. Aus den Kurvenverläufen geht hervor, dass die Umgehung des pH-Wert-Effekts nach bisheriger Vorgehensweise zum Verschwinden der signifikanten Ausprägung zweier Bereiche der Radikalgenerierung in Pilsener Bieren führt. In diesem Zusammenhang muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei zusätzlichen Messreihen im Bereich der Biermischgetränke je nach vorliegendem pH-Wert und Ascorbinsäurekonzentration auch bei der Anwendung der neuen EAP-Bestimmung im Ansatz zwei Bereiche der Radikalgenerierung zu erkennen sind.

Mittels der in Abb. 30 und 31 dargestellten Ergebnisse können zwei grundsätzlich vorliegende Zusammenhänge beschrieben werden. Zum einen steigt mit zunehmender Ascorbinsäurekonzentration die Radikalgenerierung bzw. die Konzentration an nachweisbaren Spin-Trap-Addukten, nach dem Verbrauch des EAP's, signifikant an. Hierbei handelt es sich um einen grundsätzlichen Mechanismus der auch bei anderen Getränken beobachtet wurde. Zum anderen führt die Ascorbinsäurezugabe in bestimmten Konzentrationsbereichen zunächst zu einer Abnahme des EAP-Wertes wie er auch schon im geringeren Maße bei der Lag-time Messung festgestellt wurde. Wird die Ascorbinsäurezugabe weiter erhöht ist ein Umkehrpunkt festzustellen, ab dem der EAP-Wert des Bieres wieder zunimmt. Zur Verifizierung des Umkehrpunktes wurden zusätzliche Messreihen durchgeführt, wovon eine Messreihe beispielhaft für Biere mit einem höheren SO_2 -Gehalt in Abb. 31 dargestellt ist.

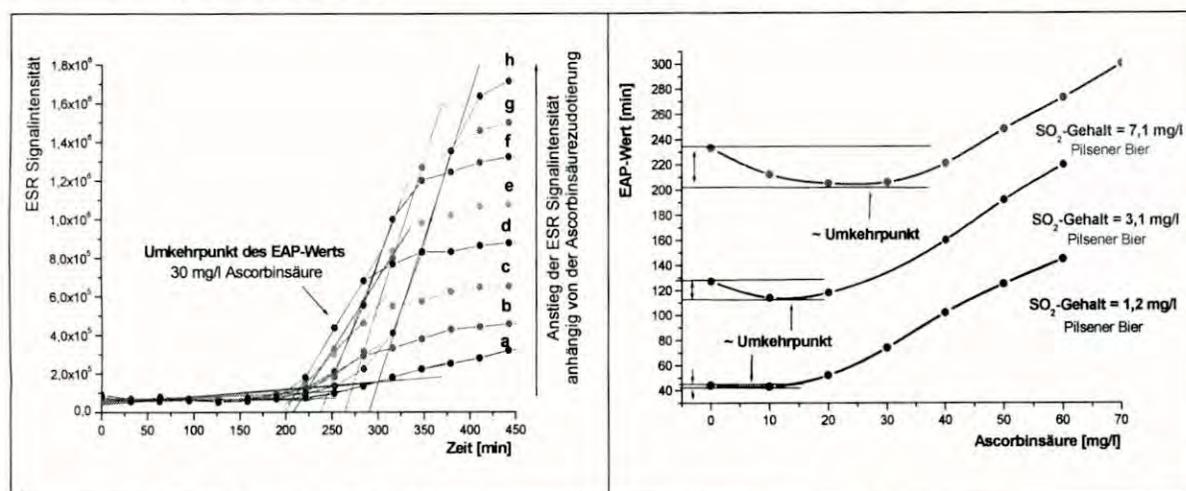


Abb. 31: EAP-Wert Bestimmung / Pilsener Bier
Ascorbinsäureeffekt bei Bier mittleren SO_2 -Gehalts
 SO_2 -Gehalt: 7,1 mg/l

31 a.: Ascorbinsäure 0 mg/l; EAP-Wert = 233 min
31 b.: Ascorbinsäure 10 mg/l; EAP-Wert = 212 min
31 c.: Ascorbinsäure 20 mg/l; EAP-Wert = 205 min
31 d.: Ascorbinsäure 30 mg/l; EAP-Wert = 206 min
31 e.: Ascorbinsäure 40 mg/l; EAP-Wert = 221 min
31 f.: Ascorbinsäure 50 mg/l; EAP-Wert = 248 min
31 g.: Ascorbinsäure 60 mg/l; EAP-Wert = 273 min
31 h.: Ascorbinsäure 70 mg/l; EAP-Wert = 300 min

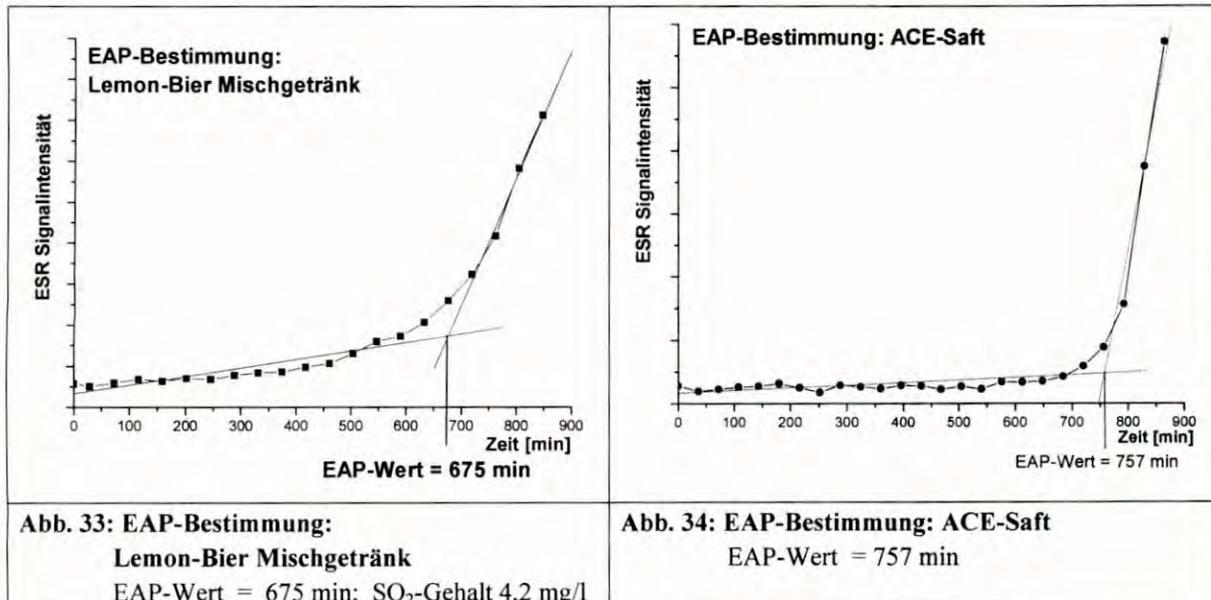
Abb. 32: EAP-Wert Bestimmung / Pilsener Bier
Wechselwirkung zwischen Ascorbinsäurekonzentration und SO_2 -Gehalt

32 a: Pilsener Bier SO_2 -Gehalt: 1,2 mg/l
Umkehrpunkt: ca. 7 mg/l Ascorbinsäuregehalt
32 b: Pilsener Bier SO_2 -Gehalt: 3,1 mg/l
Umkehrpunkt: ca. 14 mg/l Ascorbinsäuregehalt
32 c: Pilsener Bier SO_2 -Gehalt: 7,1 mg/l
Umkehrpunkt: ca. 27 mg/l Ascorbinsäuregehalt

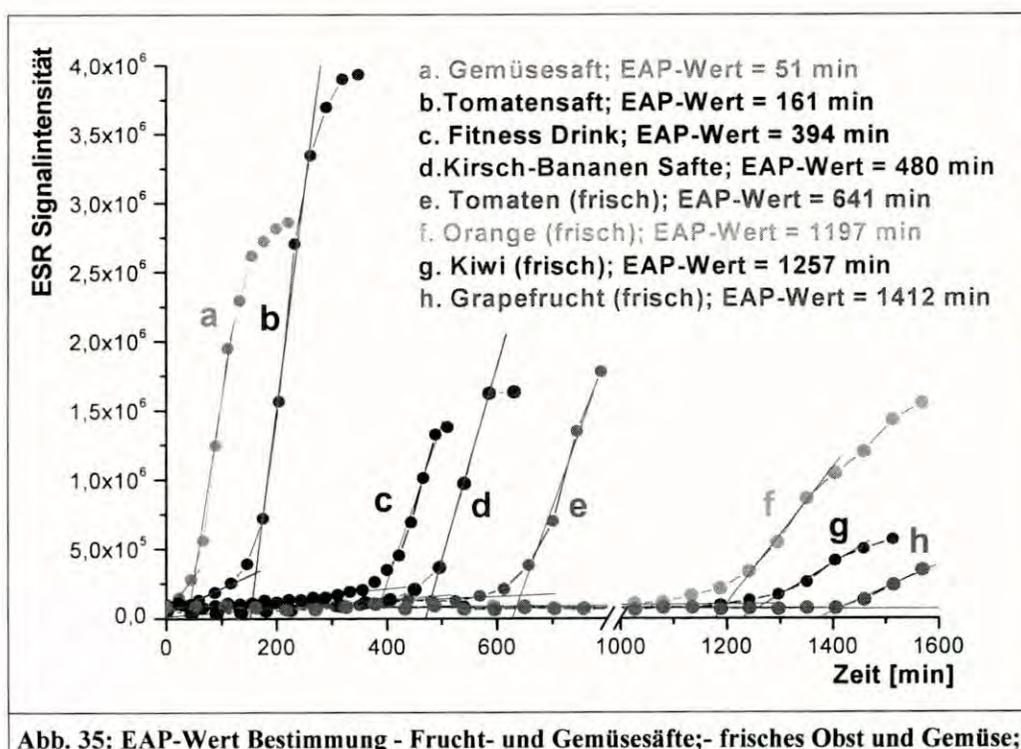
Die in Abb. 31 dargestellten Messergebnisse wurden bewusst ausgewählt, um einen weiteren grundsätzlich vorliegenden Zusammenhang zu verdeutlichen. Auch bei dem Bier mit einem höheren SO_2 -Gehalt von 7,1 mg/l liegt eine von der Ascorbinsäurekonzentration abhängige Radikalgenerierung und ein Umkehrpunkt bei den EAP-Werten vor. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse ist zu erkennen, dass für dieses Bier eine höhere Ascorbinsäurekonzentration eingesetzt werden musste, bevor der Umkehrpunkt erreicht bzw. überschritten wird. Durch weitere Messreihen konnte dieser Zusammenhang verifiziert werden. Wie in Abb. 32 dargestellt, besteht eine grundsätzliche Korrelation zwischen dem SO_2 -Gehalt eines Bieres und der notwendigen Konzentration an Ascorbinsäure, um den Umkehrpunkt zu erreichen. Es ist davon auszugehen, dass im Bier eine direkte Wechselwirkung zwischen der Ascorbinsäure und dem vorliegenden SO_2 -Gehalt auftritt. Dieser Mechanismus könnte auch für andere Bereiche von Interesse sein, da die Ascorbinsäure in Kombination mit Schwefeldioxid z.B. zur Konservierung eingesetzt wird.

Eine weitere Aufgabe des Forschungsprojekts besteht darin, die mögliche Eignung der neuen Analyse-methode zur Bestimmung des endogenen antioxidativen Potenzials in anderen Getränkebereichen zu überprüfen. Bei den durchgeführten Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass die EAP-Bestimmung nicht nur bei Bier und Biermischgetränken eingesetzt werden kann, sondern auch bei Frucht- und Gemüsesäften bzw. frischem Obst und Gemüse aussagekräftige Ergebnisse liefert.

Entsprechende Messergebnisse sind in Abb. 33 und 34 am Beispiel eines Biermischgetränks (Bier-Lemon) und einer Saftmessung (ACE-Saft) dargestellt.



Im Vergleich zum Bier muss berücksichtigt werden, dass das endogene antioxidative Potenzial anderer Getränke im Wesentlichen durch andere antioxidativ wirkende Getränkeinhaltsstoffe bestimmt wird. Dies kann zu vergleichsweise hohen EAP-Werten bei entsprechenden Getränken führen (s. ACE-Saft). In Abb. 35 ist eine Auswahl entsprechender Messreihen verschiedener Frucht- und Gemüsesäfte den Ergebnissen bei frischem Obst bzw. Gemüse (Tomate) gegenübergestellt.



Aus den in Abb. 35 aufgeführten Ergebnisse geht hervor, dass frisches Obst und Gemüse sehr hohe EAP-Werte aufweisen und somit ein hoher Anteil des eigentlich vorhandenen endogenen antioxidativen Potenzials durch die Verarbeitung verloren geht (s. frische Tomate und Tomatensaft). Bei Frucht- und Vitaminsäften wird dieser Verlust durch entsprechende Vitaminzusätze (insbesondere Ascorbinsäure) zum Teil kompensiert (s. ACE-Saft). Die vorliegenden Ergebnisse lassen zusätzlich erkennen, dass die EAP-Bestimmung in Zukunft ebenso dazu eingesetzt werden kann, die durch die einzelnen Prozessstufen bei der Safterstellung verursachten Verluste aufzuzeigen.

Zur Untersuchung eines möglichen weiteren Anwendungsbereichs wurde die EAP-Bestimmung bei Weinen durchgeführt. In Abb. 36 ist eine Auswahl an Ergebnissen für verschiedene Weine dargestellt. Bei Weinen wird der EAP-Wert sehr wesentlich durch den gegenüber Bieren relativ hohen SO_2 -Gehalt beeinflusst. Die Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass auch bei Weinen der EAP-Wert bei ungefähr gleichem SO_2 -Gehalt sehr verschieden sein kann (s. Abb. 36 d, g). Es ist in Analogie zu den Bieren davon auszugehen, dass die jeweilige Weinmatrix (pH-Wert, Metallionenkonzentration, zusätzliche Weininhaltsstoffe, ...) den EAP-Wert sehr wesentlich beeinflusst.

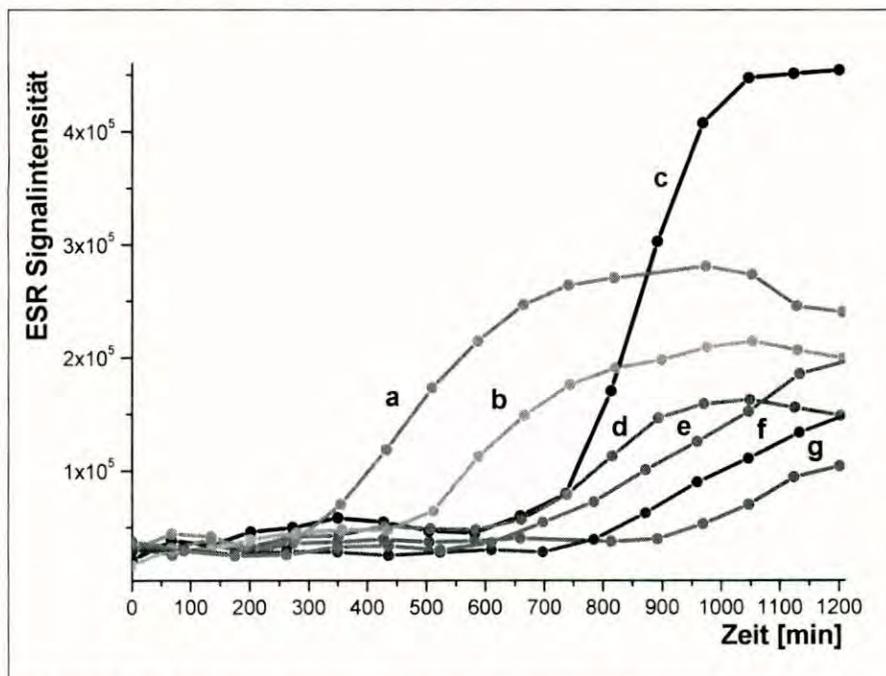


Abb. 36: EAP-Wert Bestimmung – Auswahl an verschiedenen Weinen

36 a.: Chianti Classico, 2003 13,5% vol., EAP = 292 min;	SO_2 -Gehalt = 29 mg/l
36 b.: Reserva, 2002, 13,5 % vol., EAP = 479 min;	SO_2 -Gehalt = 58 mg/l
36 c.: Samtrot, 2005, EAP = 726 min;	
36 d.: Dornfelder, 2006, 12,5 % vol., EAP = 675 min;	SO_2 -Gehalt = 111 mg/l
36 e.: Weißherbst, rose, 2006 10 % vol., EAP = 629 min;	
36 f.: Müller-Thurgau Weißwein, 2006, 11,5% vol., EAP = 752 min	
36 g.: Mazedonischer Rotwein, 10 % vol., EAP = 895 min;	SO_2 -Gehalt = 117 mg/l

4. Wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsvorhabens für kleine und mittlere Unternehmen (kmU)

4.1 Voraussichtliche Nutzung der angestrebten Forschungsergebnisse

- Zuordnung zum Fachgebiet: - Hauptsächliche Nutzung Lebensmittel-, Bio-, Gentechnik und hier bei der Überwachung der Rohstoffe und der Produktion; - Nutzung auch möglich für Firmen aus dem Fachgebiet der Mess-, Regel-, Automatisierungstechnik;
- Zuordnung zum Wirtschaftszweig: - Hauptsächliche Nutzung Ernährungsgewerbe;

4.2 Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der kmU

In Zeiten ständig steigender Verbrauchererwartungen an die Qualität eines Lebensmittels ist es für eine Brauerei wichtig, eine gleich bleibende Qualität beim Bier sicherzustellen und gegebenenfalls durch geeignete Maßnahmen die Qualität des Bieres weiter zu verbessern.

Die Voraussetzung, um die ESR-Spektroskopie in Zukunft bei der Qualitätsverbesserung, -sicherung, -kontrolle im Brauereibereich effektiver nutzen zu können, ist ein gutes Verständnis der vorliegenden Randbedingungen und Parameter, welche die Aussagekraft, Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit bedingen. Basierend auf den bisher gewonnenen Erkenntnissen war es möglich, die entsprechenden physiko-chemischen Parameter darzustellen und die Analysenmethode über den Einsatz eines besser geeigneten Spin-Trap-Reagenz entscheidend zu optimieren. Dies führte neben einer signifikant höheren Aussagekraft und Auflösung der Ergebnisse (EAP-Werte) zu einer nicht unerheblichen Kostenreduzierung im Bereich der Spin-Trap Reagenzien von ca. 80 %.

Da mit Hilfe der neuen Analysenmethode die grundlegenden Einflüsse auf die Radikalgenerierung, die für die Geschmacksstabilität eines Bieres entscheidende Bedeutung haben, direkt beobachtet und nachgewiesen werden können, besteht die Möglichkeit, zuverlässige Aussagen zum Status eines Bieres zu erhalten und die zeitliche Entwicklung der oxidativen Bierstabilität während der Lagerzeit abzuschätzen. Zum anderen bietet die neue Methode einen Zugang, um die bei der Bierherstellung und -lagerung ablaufenden radikalischen Reaktionen in Abhängigkeit von Parametern wie Sauerstoff-, SO₂-Gehalt, Metallionen, pH-Wert etc. zu detektieren und so konkrete Vorschläge zur Verbesserung der Prozessführung und -bedingungen zu liefern. Die erzielten Erkenntnisse dieses Vorhabens konnten, insbesondere im Bereich der Bierfiltration, direkt in brautechnische Maßnahmen zur Verbesserung der oxidativen Bierstabilität umgesetzt werden. Im Bereich der Verpackungsmaterialien kann die neue Analysenmethode nachweislich dazu eingesetzt werden, um die Auswirkungen bestimmter Verpackungsmaterialien (z.B. Kronkorken mit O₂-Scavenger, ...) auf die oxidative Bierstabilität zu überprüfen bzw. zu verbessern. Darüber hinaus können die mittels der neuen EAP-Bestimmung generierten Ergebnisse im Bereich der Verpackungsmaterialien als Grundlage für eine Kosten-Nutzen-Betrachtung direkt kommerziell genutzt werden.

Die Forschungsarbeiten wurden in enger Zusammenarbeit mit interessierten Brauereien durchgeführt und die Ergebnisse durch Publikationen und Vorträge (s. Seite 25) der gesamten Braubranche - mit einem 80 % igen kmU-Anteil - zugänglich gemacht. Dies führte dazu, dass in ersten Brauereien die bisher eingesetzte Lag-Time-Messung zum Nachweis der oxidativen Bierstabilität, aufgrund der nachgewiesenen Verfälschung der Ergebnisse im Zusammenhang mit dem verwendeten Spin-Trap-

Reagenz, durch die neue EAP-Bestimmung ersetzt wurde. Neben der daraus resultierenden höheren Aussagekraft der Ergebnisse, ergibt sich dadurch bei routinemäßigem Einsatz ein Einsparpotenzial von ca. 12.000-15.000 Euro/Jahr und Betrieb (Einsparung/Messung ca. 7,5 € (50 mM PBN / 20 ml Probe); 30-40 / Woche; 50 Wochen/Jahr). Außerdem können Abweichungen in bestimmten Brauprozessstufen rechtzeitig erkannt und gezielt eingegriffen werden.

Durch weitergehende Untersuchungen zur Anwendbarkeit der neuen EAP-Bestimmung in anderen Getränkebereichen, konnte die zusätzliche Eignung für Wein, Frucht- und Gemüsesäfte nachgewiesen werden. Außerdem waren erste Vorversuche im Bereich von frischem Obst und Gemüse erfolgreich. Es kann daher prognostiziert werden, dass die EAP-Bestimmung in Zukunft ebenso dazu eingesetzt werden kann, die durch die einzelnen Prozessstufen bei der Safftherstellung verursachten Verluste an endogenem antioxidativen Potenzial aufzuzeigen.

5. Beabsichtigte Umsetzung der angestrebten Forschungsergebnisse

Es ist beabsichtigt, die Ergebnisse des Forschungsvorhabens durch Publikationen in Fachzeitschriften (Brauwelt, Monatsschrift für Brauwissenschaft, etc.) und durch Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen der Brauindustrie, in ähnlicher Weise wie bisher (s. Seite 25), der interessierten Fachwelt zugänglich zu machen.

In enger Zusammenarbeit mit interessierten Brauereien soll der routinemäßige Einsatz der neu entwickelten Analysenmethode mittels ESR-Spektroskopie, die so genannte „EAP-Bestimmung“, zur Qualitätskontrolle (-sicherung) optimiert und vorangetrieben werden. Hierbei steht insbesondere die Einführung und weitere Etablierung der neuen Analysenmethode im Vordergrund.

Darüber hinaus sollen die bisher gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Verbesserung der oxidativen Bierstabilität und der damit verbundenen Verbesserung der Geschmacksstabilität in enger Kooperation technisch umgesetzt werden.

Bisherige bzw. anstehende Vorträge und Publikationen:

METHNER, F.J.; KUNZ, T.: A new „EAP determination“ method for beer and other beverages using ESR spectroscopy, Internationale Brauwelt, 04/06, 210-211, 2006

METHNER, F.J.; KUNZ, T.: Genauere Prognosen zur oxidativen Bierstabilität mittels ESR-Spektroskopie, Brauerei Forum, VLB Berlin, 09.2006

KUNZ, T.; METHNER, F.J.: Latest Results about an Advanced ESR-Determination Method of the Antioxidative Potential of Beer, 33rd brewing and malting conference, PLZEN, 18th-20th October, 2006

METHNER, F.J.; KUNZ, T.; SCHÖN, T.: Application of Optimized Methods to Determine the Endogenous Antioxidant Potential of Beer and Other Beverages, 31st International Congress of the European Brewery Convention, Venice, 6-10 May, 2007

METHNER, F.J.; KUNZ, T.; SCHÖN, T.: Application of Optimized Methods to Determine the Endogenous Antioxidant Potential of Beer and Other Beverages, Proceedings of the 31st International Congress of the European Brewery Convention, Fachverlag Hans Carl 2007

METHNER, F.J.; KUNZ, T.; SCHÖN, T.: The EAP determination and BAX value Powerful tools to determine differences in brewing technology, 71st Annual Meeting, ASBC Congress, Victoria, Columbia, Kanada, 16-20th June 2007

METHNER, F.J.; KUNZ, T.; SCHÖN, T.: Einsatz der ESR-Spektroskopie für praktische Anwendungen in der Brauerei und bei Getränken, 94. Internationale VLB-Oktoberagung, Berlin, 8.-9. Oktober 2007

KUNZ, T.; METHNER, F.J.: Eine neue Methode zur Bestimmung des endogenen antioxidativen Potenzials von Getränken mittels ESR-Spektroskopie, Dechema 2007, Lebensmittelwissenschaften im Fokus, Frankfurt / Main, 5.-6. November 2007

POLLOCK, G.; KUNZ, T.; METHNER, F.J.: Enhancements to the Flavor Stability of Beer Through Reaction Rate Improvements in Oxygen Scavenging Crown Liner Compounds, World Brewing Congress, Honolulu, Hawaii, USA, 2.-6. August 2008

METHNER, F.J.; KUNZ, T.; KOBAYASHI, N.: Investigations On The Behavior Of Organic Radicals In Barley And Malt During The Malting And Mashing Process Electron-Spin-Resonance Spectroscopy, World Brewing Congress, Honolulu, Hawaii, USA 2.-6. August 2008

METHNER, F.J.; KUNZ, T.: Antioxidative Potential in Barley and Malt, EBC Brewing Science Group 7 th Technical Meeting, University of Nottingham, Großbritannien 2008

KUNZ, T.; METHNER, F.J.: Anwendung neuer Analysenmethoden mittels Elektronenspinresonanz-(ESR)-Spektroskopie in der Malzanalytik, 4. VLB Seminar für die Brau- und Getränkeindustrie, St. Petersburg, Russische Föderation, 15. – 18. September, 2008

METHNER, F.J.; KUNZ, T.: A new Analytical Method To Investigate Organic Radical Formation in Barley and Malt, 34th Brewing and Malting Conference , Pilsen, Tschechische Republik, 2008

6. Durchführende Forschungsstelle

Technische Universität Berlin
Institut für Biotechnologie
Fachgebiet Brauwesen
Seestrasse 13
13353 Berlin

6.1 Leiter der Forschungsstelle

Prof. Dr.-Ing. Frank-Jürgen Methner

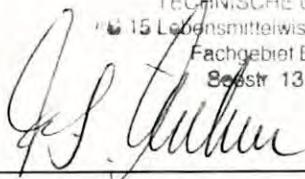
6.2 Projektleiter

Prof. Dr.-Ing. Frank-Jürgen Methner
Dipl. Ing. (FH) Thomas Kunz

Berlin, 30.01.2009

Ort, Datum

TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN
15 Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Fachgebiet Brauereitechnologie
Seestr. 13, D - 13353 Berlin



Unterschrift des Leiters und Stempelabdruck
der Forschungsstelle

7. Literaturverzeichnis

- 1 UCHIDA, M.; ONO, M.: Improvement for Oxidative Flavor Stability of Beer – Role of OH-Radical in Beer Oxidation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 4, 198-204, 1996
- 2 UCHIDA, M.; SUGA, S.; ONO, M.: Improvement for Oxidative Flavor Stability of Beer –Rapid Prediction Method for Beer Flavor Stability by Electron Spin Resonance Spectroscopy, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 4, 205-211, 1996
- 3 STASKO, A.; RAPTA, P.; MALIK, F.: Charakterisierung der Bierstabilität mit Hilfe von Radikalfängern (eine EPR-Studie), *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 53, 1/2, 4-7, 2000
- 4 UCHIDA, M.; ONO, M.: Determination of Hydrogen Peroxide in Beer and Its Role in Beer Oxidation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57, 4, 145-150, 1999
- 5 FORSTER, C.; SCHWEIGER, J.; NARZISS, L.; BACK, W.; UCHIDA, M.; ONO, M.; YANAGI, K.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität von Bier mittels Elektronen-spinresonanz-Spektroskopie freier Radikale, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 52, 5/6, 86-93, 1999
- 6 FORSTER, C.: Die antioxidative Aktivität von Bier - eine neue Methode zur Verbesserung der Geschmacksstabilität, *Mitteilungen österreichisches Getränkeinstitut*, 11/12, 132-139, 1998
- 7 YANAGI, K.; ISHIBASHI, Y.; OKA, K.; UCHIDA, M.: Neue Methoden zur Beurteilung von Geschmacksstabilität, Schaumeigenschaften und -stabilität von Bier, *Brauwelt*, 21/22, 841-859, 1997
- 8 BACK, W.; FRANZ, O.; NAKAMURA, T.: Das antioxidative Potenzial von Bier, *Brauwelt*, 141, 209-215, 2001
- 9 ANDERSEN, M. L.; OUTTRUP, H.; SKIBSTED, H.: Potential Antioxidants in Beer Assessed by ESR Spin Trapping, *J. Agr. Food Chem.* 48, 8, 3106-3111, 2000
- 10 TAKAOKA, S., KONDO, H., UCHIDA, M., und KAWASAKI, Y.: Improvement of Beer Flavor Stability by Applying ESR Method to Industrial Plant, *Technical Quarterly* 35, 3, 157 – 161, 1998
- 11 KANEDA, H.; MASACHIKA, T.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S.; TAMAKI, T.: Behavior of sulfites during fermentation and storage of beer, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54, 2, 115-120, 1996
- 12 WALTERS, M. T.: Natural antioxidants and flavour stability, *Ferment* 10, 2, 111-119 1997
- 13 UCHIDA, M.; ONO, M.: Technological Approach to Improve Beer Flavor Stability: Analysis of the Effect of Brewing Processes on Beer Flavor Stability by the Electron Spin Resonance Method, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58, 1, 8-13, 2000
- 14 KANEDA, H.; KANO, Y.; OSAWA, T.; RAMARATHNAM, N.; KAWAKISHI, S.; KAMADA, K.: Detection of Free Radicals in Beer Oxidation, *Journal of Food Science*, 53, 885-888, 1988
- 15 KANEDA, H., KANO, Y., OSAWA, T., KAWAKISHI, S., und KAMADA, K.: The Role of Free Radicals in Beer Oxidation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 47, 49-53, 1989
- 16 WACKERBAUER, K.; HARDT, R.: Radikalreaktionen und die Geschmacksstabilität des Bieres, *Brauwelt*, 40/41, 1880-1888, 1996
- 17 BACK, W.; FORSTER, C.; KROTTENTHALER, M.; LEHMANN, J.; SACHER, B.; THUN, B.: Neue Forschungserkenntnisse zur Verbesserung der Geschmacksstabilität, *Brauwelt*, 38, 1677-1692, 1997

- 18 KUNZ, T.; STEPHAN, A.; METHNER, F.J.; KAPPL, R.; HÜTTERMANN, J.: Grundlegendes zur Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) und Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen oxidativer Bierstabilität und dem SO₂-Gehalt, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 55, No 7/8, 140-153, 2002
- 19 KUNZ, T.: Untersuchungen zur oxidativen Bierstabilität mittels Elektronenspinresonanz (ESR), Diplomarbeit, FH Trier, 2002
- 20 ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H.: Electron Spin Resonance Spin Trapping Identification of Radicals Formed during Aerobic Forced Aging of Beer, *J. Agr. Food Chem.*, 46, 1272-1275, 1998
- 21 STEPHAN, A.; BIES, A.; KUNZ, T.; METHNER, F.J.: Determination of antioxidants in brewing: Some aspects about the use of selected chemical and physical assays, *European Brewery Convention, Monograph 31, Symposium Flavour and Flavour Stability, Nancy/France 2001*, Fachverlag Hans Karl, Nürnberg
- 22 FRANZ, O.; BACK, W.: Erfahrungen zur Messung von freien Radikalen mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometer in der Brauerei, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 55, No 7/8, 156-162, 2002
- 23 BISHOP, D.; STERN, G.; FLEISCHMANN, M.; MARSHALL, L.: Hydrogen Peroxide Catalytic Oxidation of Refractory Organics in Municipal Waste Water, *I&EC Process Design and Development*, 7, 110-117, 1968
- 24 MILLERO, F. J.; SOTOLONGO, S.; STADE, D. J.; VEGA, C. A.: Effect of Ionic Interactions on the Oxidation of Fe (II) with H₂O₂ in Aqueous Solutions, *Journal of Solution Chemistry*, Vol. 20, No. 11, 1079-1092, 1991
- 25 POU, S.; RAMOS C. L.; GLADWELL, T.; RENKS, E.; CENTRA, M.; YOUNG, D.; COHEN, M. S.; ROSEN, G. M.: A Kinetic Approach to the Selection of a Sensitive Spin Trapping System for the Detection of Hydroxyl Radical, *Analytical biochemistry* 217, 76-83, 1994
- 26 METHNER, F.-J.; PETERS, U.; MOCK, K.: Vergleich verschiedener PET-Flaschen für Bier, *Brauwelt*, 29, 1101-1108, 2001
- 27 ORZINSKI, M.; WEBER, I.; SCHNEIDER, J.: Hohe Genauigkeit und gute Reproduzierbarkeit – Permeationsmessungen in der VLB Berlin, *Brauindustrie* 11, 66-71, 2004
- 28 ORZINSKI, M.; WEBER, I.; SCHNEIDER, J.: Gas Permeation Measurement for Plastic Bottles, *PET Planet Insider*, Vol. 8, No. 9, 30-33, 2004
- 29 NARZIß, L.; MIEDANER, H.; EICHHORN, P.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität (Teil 1), *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 3/4, 49-57, 1999
- 30 NARZIß, L.; MIEDANER, H.; EICHHORN, P.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität (Teil 2), *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 5/6, 80-84, 1999

Dokumentationsblatt

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWA über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

Normalverfahren

Fördervariante ZUTECH

Versuchs- u. Lehranstalt für Brauerei in Berlin
Name der AiF-Mitgliedsvereinigung (MV)

14772 / 5
AiF- Vorhaben-Nr. / GAG

15.1
Wirtschaftszweig (WZ)

01.06.2006-30.09.2008
Bewilligungszeitraum

2/2005
Aktenzeichen der MV

145.700,00 €
Summe der beantragten
Zuwendung (bZ)

Forschungsstelle(n) :

Technische Universität Berlin, FG Brauwesen
Seestraße 13, 13353 Berlin

Forschungsthema :

„Weiterentwicklung der Lag-Time-Bestimmungsmethode mittels ESR-Spektroskopie für Bier und Anwendung zur Untersuchung der Wesentlichen Einflüsse auf die oxidative Bierstabilität“

Erzielte Ergebnisse und deren Anwendungsmöglichkeiten :

Entwicklung eines neuen Analysenverfahrens mittels ESR-Spektroskopie.
Die neue Analysenmethode kann angewendet werden zur Qualitätskontrolle und Prozessoptimierung in der Getränkeindustrie (Bier, Wein, Saft)

Name der Forschungsstelle

AiF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.06.2006-30.09.2008

Bewilligungszeitraum

Fragebogen zur Einschätzung der erzielten Forschungsergebnisse

- | | | | | |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | ja | zum Teil | nein | |
| 1. Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Die Bedeutung der Forschungsergebnisse ist folgendermaßen einzuschätzen : | hoch | mittel | gering | z.Zt. nicht absehbar |
| • wissenschaftlich-technischer Nutzen | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| • wirtschaftlicher Nutzen für KMU | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Die Forschungsergebnisse liefern einen innovativen Beitrag | | | | |
| • zu einem neuen Produkt | <input type="checkbox"/> | | | |
| • zur Weiterentwicklung eines Produkts | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| • zu einem neuen Verfahren | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| • zur Weiterentwicklung eines Verfahrens | <input type="checkbox"/> | | | |
| 4. Eine industrielle Anwendung der Forschungsergebnisse ist realisiert | ja | demnächst | nein | z.Zt. nicht absehbar |
| | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Eine weiterführende FuE kann in < 3 Jahren zur Innovation (z.B. Pilotanwendung) führen | ja | vielleicht | nein | z.Zt. nicht absehbar |
| | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Zuordnung der erzielten Forschungsergebnisse zu Fachgebieten gemäß Anlage 1 | | | | |
| 7. Zuordnung der erzielten Forschungsergebnisse zu Wirtschaftszweigen gemäß Anlage 2 | | | | |
| | ja | demnächst | nein | |
| 8. Die Forschungsergebnisse wurden in einer der entsprechend Abschnitt 3.6 des IGF-Leitfadens zulässigen Formen veröffentlicht | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| <u>Zusätzlich bei ZUTECH-Vorhaben:</u> | | | | |
| 9. Der Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft enthält ausreichend beschriebene Maßnahmen zu folgenden Punkten: | | ja | nein | |
| • zum möglichen Umfang der industriellen Nutzung der Forschungsergebnisse | | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| • zur konkreten Umsetzung der Forschungsergebnisse in KMU | | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| 10. Die Darstellung der Maßnahmen im Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft ist ausreichend, um eine spätere Evaluierung der Forschungsergebnisse zu ermöglichen | | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Berlin, 5.2.09
 Ort, Datum

Berlin, 30.01.09
 Ort, Datum



Rechtsverbindliche Unterschrift mit Stempelabdruck
 der AiF-Mitgliedsvereinigung (MV)
 Erstzuwendungsempfänger -

Rechtsverbindliche Unterschrift mit Stempelabdruck
 des Leiters der Forschungsstelle (FSt)
 - Letztzuwendungsempfänger -

TECHNISCHE UNIVERSITÄT
 Lebensmittelwissenschaft und
 Fachgebiet Brauereitechnologie
 Seestr. 13, D - 13353 Berlin

Name der Forschungsstelle

AiF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.06.2006-30.09.2008

Bewilligungszeitraum

Zuordnung der erzielten Forschungsergebnisse zu Fachgebieten

(Anlage 1 des Fragebogens zur Einschätzung der erzielten Forschungsergebnisse)

Fachgebiete	Hauptsächliche Nutzung	Nutzung auch möglich
Rohstoffe		X
Werkstoffe, Materialien		
Chemie		
Verfahrenstechnik		X
Lebensmitteltechnik, Bio-, Gentechnik	X	
Mikrobiologie, Hygiene		
Umwelttechnik		
Konstruktion		
Produktion		X
Elektrotechnik, Mikrosystemtechnik, Medizintechnik		
Mess-, Regel-, Automatisierungstechnik		X
Informations- und Kommunikationstechnik		
Betriebswirtschaft, Organisation		

Name der Forschungsstelle

AiF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.06.2006-30.09.2008

Bewilligungszeitraum

Zuordnung der erzielten Forschungsergebnisse zu Wirtschaftszweigen

(Anlage 2 des Fragebogens zur Einschätzung der erzielten Forschungsergebnisse)

Wirtschaftszweige		Hauptsächliche Nutzung	Nutzung auch möglich
Abteilung	Kurzname		
10	Kohlenbergbau und Torfgewinnung		
15	Ernährungsgewerbe	X	
17/18	Textil- und Bekleidungs-gewerbe		
19	Ledergewerbe		
20	Holzgewerbe		
21/22	Papier-, Verlags- und Druckgewerbe		
23	Kokerei, Mineralölverarbeitung, Spalt- und Brutstoffe		
24	Chemische Industrie		
25	Herstellung von Gummi- und Kunststoffwaren		
26	Glasgewerbe, Keramik, Verarbeitung von Steinen und Erden		
27/28	Metallerzeugung und -bearbeitung, Herstellung von Metallerzeugnissen		
29	Maschinenbau		X
30/31/ 32/33	Büromaschinen, Datenverarbeitungsgeräte, Elektrotechnik, Feinmechanik und Optik		
34/35	Fahrzeugbau		
36	Möbel, Schmuck, Musikinstrumente, Sportgeräte u. sonstige Erzeugnisse		
40/41	Energie- und Wasserversorgung		
45	Baugewerbe		
60	Landverkehr, Transport		
72/74	Erbringung von Dienstleistungen überwiegend für Unternehmen		X