

Versuchs- und Lehranstalt  
für Brauerei in Berlin e.V.



**VLB**  
BERLIN

*Forschungsthema:*

## **Untersuchung zur Senkung des Gehaltes an Magensäuresekretion fördernden Inhaltsstoffen in vergorenen, aber nicht destillierten, alkoholischen Getränken**



Forschungsnetzwerk  
Mittelstand

*AiF-Vorhaben-Nr.:*

16150 N

*Name der Forschungsstelle(n):*

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V. (VLB)

II. Medizinische Universitätsklinik, Medizinische Fakultät Mannheim

*Kontakt:*

Dr.-Ing. Roland Pahl, pahl@vlb-berlin.org

*Bewilligungszeitraum:*

1.9.2009 – 31.10.2011



Industrielle  
Gemeinschaftsforschung

# 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](http://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.

# Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V. (VLB)

II. Medizinische Universitätsklinik, Medizinische Fakultät Mannheim

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur  
Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie  
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **AiF 16150**

***Untersuchung zur Senkung des Gehaltes an Magensäuresekretion fördernden  
Inhaltsstoffen in vergorenen, aber nicht destillierten, alkoholischen Getränken***

(Bewilligungszeitraum: 1.9.2009 - 31.10.2011)

der AiF-Forschungsvereinigung

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V. (VLB)

Berlin, 20. Februar 2012

Ort, Datum

  
Thomas Tyrell

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)  
an der/den Forschungsstelle(n)

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

Schlussbericht zum Forschungsvorhaben AiF 16150:

Untersuchung zur Senkung des Gehaltes an Magensäuresekretion fördernden Inhaltsstoffen in vergorenen, aber nicht destillierten, alkoholischen Getränken

**Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung	3
Danksagung	4
Vorwort zu den Sachberichten	5
Sachbericht 1: Screening von Hefen auf Ihre Gäreigenschaften und Vergleich von Hefen auf ihr Profil organischer Säuren	6
Zugrunde liegende Literatur	7
Untersuchung und Zielstellung	12
Ergebnisse	14
Auswertung und Diskussion	22
Zusammenfassung	29
Literatur	30
Sachbericht 2: Screening von Gärparametern zur Beeinflussung des Gehaltes an Bernsteinsäure im Bier	33
Zugrunde liegende Literatur	34
Untersuchung und Zielstellung	41
Versuchsaufbau und Ergebnisse	43
Auswertung und Diskussion	54
Zusammenfassung	56
Literatur	59
Sachbericht 3: Untersuchung von Bieren mit unterschiedlichem Gehalt an Magensäuresekretion fördernder Bernsteinsäure in einer medizinischen Testreihe	64
Zugrunde liegende Literatur	65
Material und Methoden	65
Ergebnisse	71
Zusammenfassung und Ausblick	76
Literatur	77
Sachbericht 4: Untersuchung von Adsorbermaterialien zur Senkung des Gehaltes an Bernsteinsäure im Bier	79
Zugrunde liegende Literatur	80
Material und Methoden	41
Ergebnisse und Auswertung	90
Auswertung und Diskussion	98
Zusammenfassung	102
Literatur	103
Verwendung der Zuwendung	106
Gegenüberstellung der Verwendung der Zuwendung mit den Zielen des Projektes	107
Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	108



## **Zusammenfassung**

### **Untersuchung zur Senkung des Gehaltes an Magensäuresekretion stimulierenden Inhaltsstoffen in vergorenen, aber nicht destillierten, alkoholischen Getränken**

Ziel des Forschungsvorhabens war die Vertiefung ernährungsmedizinischer Erkenntnisse und zugleich ihre Umsetzung in die Praxis der Getränkeherstellung.

Speziell Brauern, aber auch Winzern und Produzenten anderer durch anaerobe Fermentation hergestellter Getränke sollten geeignete und praxistaugliche technologische Maßnahmen aufgezeigt werden, die ihnen ermöglichen, Bier, Wein und Apfelwein etc. mit geringerem Gehalt an Magensäuresekretion fördernder Bernsteinsäure herzustellen. Gleichzeitig sollte ihnen damit ermöglicht werden, die notwendigen Maßnahmen für ihren eigenen Betrieb abzuschätzen, um magenfreundlichere Produkte auf dem Markt anzubieten. Ein Vorteil im Rahmen zunehmender Marktpräsenz von funktionalen Getränken.

Gemäß dem Antrag wurden die technologischen Lösungsansätze

Auffindung eines geeigneten Hefestammes,

Untersuchung verschiedener verfahrenstechnischer Einflussmöglichkeiten auf den Prozess der alkoholischen Gärung,

sowie

Untersuchung verschiedener Adsorbermaterialien zur Absenkung des Gehaltes an Bernsteinsäure

zur Erreichung des vorgenannten Ziels näher untersucht. Darüber hinaus wurden Biere mit verringertem Bernsteinsäuregehalt in einer medizinischen Testreihe auf ihr Potential zur Magensäuresekretion hin untersucht.

#### **Im Projekt wurden folgende Ergebnisse erzielt:**

Es wurde eine Hefe ausfindig gemacht, welche den Bernsteinsäuregehalt im Bier reproduzierbar auf einem nach technischen Gesichtspunkten niedrigen Niveau hält.

Es wurden verschiedene verfahrenstechnische Einflussnahmen während der alkoholischen Gärung „gescreent“. Diese geben sehr gute Anhaltspunkte für die Produktion von Bieren mit niedriger Konzentration von Bernsteinsäure im Industriemaßstab.

Es wurden verschiedene Adsorbermaterialien zur nachträglichen Absenkung des Bernsteinsäuregehaltes im Bier getestet. Es zeigte sich die Möglichkeit, den Bernsteinsäuregehalt auf eine Konzentration nahe der Nachweisgrenze zu senken. Dies führte jedoch auch zur Beeinträchtigung anerkannter Qualitätsparameter für Bier.

In einer medizinischen Untersuchung konnte ein Effekt auf die Magensäuresekretion beim Menschen nachgewiesen werden. Biere mit stark verringertem Gehalt an Bernsteinsäure induzierten eine geringere Magensäuresekretion als Bier mit normalem Gehalt.

Damit wurden mit diesem Forschungsvorhaben sämtliche Lösungsansätze verfolgt und die Ziele erreicht.

## **Danksagung**

Die Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) und die II. Medizinische Klinik (Gastroenterologie, Hepatologie und Infektionserkrankungen), Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg möchten sich ganz herzlich bei der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF) und beim Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) für die Bewilligung und Finanzierung des Vorhabens bedanken.

Besonders herzlich bedanken möchten wir uns für die tatkräftige Unterstützung bei

Herrn Peter Fiegert, Hofbräuhaus Wolters,

Herrn Frank Liebhart, Liebharts Privatbrauerei,

Herrn Joachim Schneider, Dinkelacker Schwabenbräu,

Herrn Bernd Wörthmann, Dinkelacker Schwabenbräu,

Herrn Christian Dahncke, Paulaner Brauerei,

Herrn Christian Pohl, Klosterbrauerei Neuzelle,

Herrn Arie Kant, Biokal Labystems,

Herrn Stefan Polzer, Albert Handtmann Armaturenfabrik,

Herrn Michael Feische, Albert Handtmann Armaturenfabrik.

Ohne ihre kompetente Beratung und tatkräftige Unterstützung im Projektbegleitenden Ausschuss, der Bereitstellung von Bier, Adsorbermaterialien und Durchführung von Projektteilen in den Betrieben wäre es nicht möglich gewesen, dieses Projekt in diesem Maße durchzuführen.

Das IGF-Vorhaben 16150, der Forschungsvereinigung Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V., Seestraße 13, 13353 Berlin, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

### **Vorwort zum Sachbericht:**

Der Sachbericht teilt sich in 4 verschiedene Teile auf. Die Darstellung des Berichtes in dieser Form wurde gewählt, um 4 entsprechende Veröffentlichungen in wissenschaftlich-technischen Magazinen sinngemäß zu gestalten.

#### Sachbericht 1:

Screening von Hefen auf ihre Gäreigenschaften und Vergleich von Hefen auf ihr Profil organischer Säuren

#### Sachbericht 2:

Screening von Gärparametern zur Beeinflussung des Gehaltes an Bernsteinsäure im Bier

#### Sachbericht 3:

Untersuchung von Bieren mit unterschiedlichem Gehalt an Magensäuresekretion fördernder Bernsteinsäure in einer medizinischen Testreihe

#### Sachbericht 4:

Untersuchung von Adsorbermaterialien zur Senkung des Gehaltes an Bernsteinsäure im Bier

## **Sachbericht 1:**

### **Screening von Hefen auf Ihre Gäreigenschaften und Vergleich von Hefen auf ihr Profil organischer Säuren**

Die Hefesammlung der VLB bietet mit mehr als 70 Hefe-Stämmen ein breites Spektrum an ober- und untergärigen Reinzuchtheften für den Einsatz in der Brauerei, Brennerei und Winzerei. Untersuchungen der Hefe-Stämme, die sich mit den Bildungsraten von Bernsteinsäure unter normaler Gärbedingung bei der Herstellung von Bier befassen, existieren nicht. Ziel dieser Untersuchung ist folglich, durch ein breit angelegtes „Screening“ Stämme zu finden, die unter definierten, praxisähnlichen Bedingungen geringe Bildungsraten an Bernsteinsäure aufweisen und diese dem Anwender zu empfehlen.

### **Zugrunde liegende Literatur:**

Carbonsäuren sind organische Verbindungen, die zumindest eine Carboxylgruppe (-COOH) als funktionelle Gruppe besitzen. Je nach Art und Anzahl der restlichen sich am aliphatischen Rest (R) befindenden funktionellen Gruppen unterscheidet man zwischen Mono-, Di-, Tri-, Keto- und Hydroxycarbonsäuren [1]. Von entscheidender Bedeutung im Hinblick auf die im Bier enthaltenen Carbonsäuren sind die so genannten organischen Säuren und die Fettsäuren.

#### ***Entstehung der organischen Säuren***

Neben Ethanol und Kohlendioxid generiert die Hefe über ihren Aminosäure- und Kohlenhydratstoffwechsel während der Fermentation eine Vielzahl weiterer Nebenprodukte, von denen einige den Biergeschmack bzw. das Bieraroma nachhaltig beeinflussen können. Dazu zählen neben aliphatischen, höheren Alkoholen und Aldehyden noch organische Säuren, Fettsäuren bzw. Ester aus Alkoholen und Fettsäuren [2, 3, 4].

Die Bildung der zuvor genannten aromaaktiven Metabolite, so auch im Speziellen für die organischen Säuren, wird hauptsächlich durch den gewählten Hefestamm und die durch das verwendete Malz bestimmte Würzezusammensetzung festgelegt [5, 6, 1, 7, 8, 9]. Nach Püschner C. und Yang X. et al. [1, 9] werden dabei die im Malz vorliegenden Säurekonzentrationen durch die Parameter Gerstensorte, Düngung, Erntejahr, Anbaugesbiet, Reifungsstadium und Trockenheitszustand der Gerste, die malzspezifische Mikroflora sowie die Mälzungsbedingungen beeinflusst.

Die Menge an organischen Säuren, die über die Hopfengabe in die kochende Würze und dem entsprechend in das fertige Bier eingetragen wird, ist im Vergleich dazu vernachlässigbar [10].

Nach Briggs E., Klopper W., Enebo, Coote und Kirsop [11, 6, 10, 5] sind die in Tab. 1 gelisteten organische Säuren in ihren durchschnittlichen Konzentrationen im Bier enthalten Entscheidend ist dabei, dass die Konzentrationsangaben von Klopper, Enebo, Coote und Kirsop ausschließlich das spezifische quantitative Säureprofil der in ihren Versuchsreihen untersuchten Biere abbilden.

Tab. 1: Organische Säuren in Bier

organische Säuren [ppm]	Briggs 3	Klopper 6		Enebo 10		Coote/Kirsop 5	
		obergärig	untergärig	obergärig	Untergärig	Obergärig (Ale)	untergärig (Lager)
Acetat	10 bis 50	56-136	9-136			12-156	22-107
Citrat	100-150	173-211	107-186	90	88	71-133	56-158
Fumarat				11	15		
Lactat	50-300	15-901	10-284	51	31	44-276	48-233
Pyruvat	100-200	1-127	19-95	6	11	34-80	10-32
Malat	30-50	110-136	24-104	52	42	26-78	14-95
Succinat	50-150			67	41	36-166	51-153

Ergebnisse von Püschner C. et al. [1] belegen in diesem Zusammenhang, dass aus der Bestimmung der Zusammensetzung der organischen Säuren eines Bieres nicht zwangsläufig auf dessen Zugehörigkeit zu einer bestimmten Bierkategorie geschlossen werden kann.

Die Hauptmenge der im Bier vorhandenen organischen Säuren geht oxidativ via Pyruvat direkt aus dem Tricarbonsäurezyklus der Hefe hervor [19, 4, 1] (s. Abb. 1).

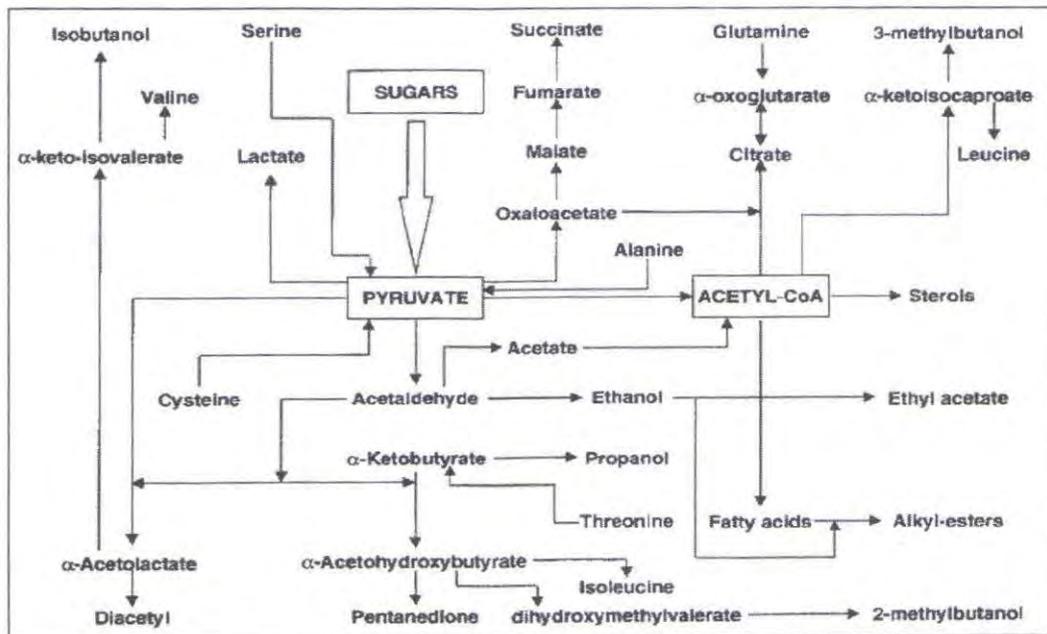


Abb. 1: Übersicht des Kohlenhydratstoffwechsels der Hefe

Eine weitere Möglichkeit ist die, ähnlich der Bildung höherer Alkohole (Ehrlich-Weg), verlaufende Desaminierung würespezifischer Aminosäuren zum Aufbau hefezelleigenen Proteins. Die daraus hervorgehenden organischen Säuren werden im Anschluss ins Bier ausgeschieden [2, 19].

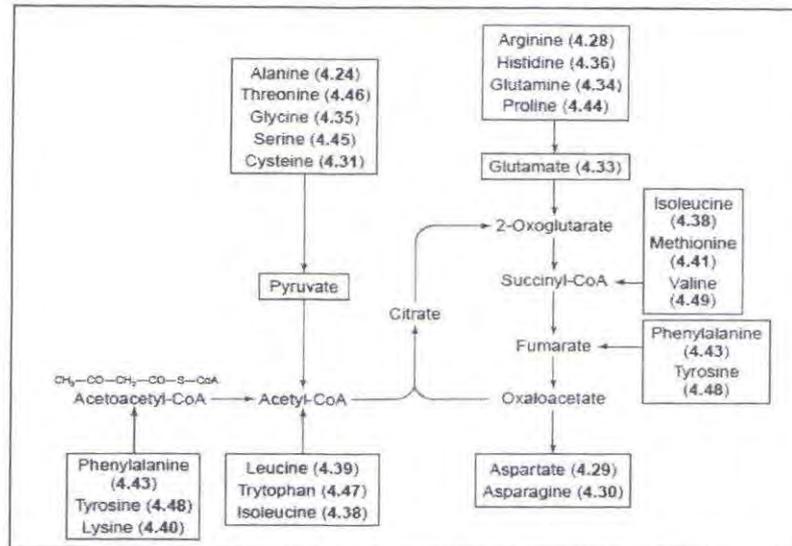


Abb. 2: Die Bildung organischer Säuren aus würespezifischen Aminosäuren

Nach Boulton C. [2] ist die Exkretion der organischen Säuren unter anaeroben Bedingungen seitens der Hefe im Wesentlichen auf drei Ursachen zurückzuführen:

- Sie sind für die Hefe im Hinblick auf die Synthese von zelleigenen Verbindungen (Anabolismus) nicht von Bedeutung.
- Unter den anaeroben Bedingungen der Gärung existieren keine weiterführenden Stoffwechselwege zur Oxidation und damit verbunden zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten, die ihrerseits für die Bereitstellung von Stoffwechselenergie in Form von ATP genutzt werden können.
- Zur Aufrechterhaltung des enzymkatalysierten Stoffwechsels benötigt die Hefe einen möglichst neutralen intrazellulären pH-Wert.

Darüber hinaus ist nach Briggs E. [3] der zunehmende Todanteil an der Gesamthefezellzahl zum Ende der Gärung und damit verbunden die Hefeautolyse ein weiterer Grund für die in einem Bier vorliegenden Konzentrationen an organischen Säuren.

Im Hinblick auf die Ausscheidung der organischen Säuren seitens der Hefe muss zusätzlich angemerkt werden, dass es sich dabei beginnend mit dem Anstellen bis zum Gärungsende nicht um einen fortlaufenden Prozess handelt. So belegen Untersuchungen von Coote, Kirsop, Heerde, Püschner und Whiting [5, 19, 1, 8], dass die verschiedenen Säuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die gärende Würze ausgeschieden werden bzw. in ihren Konzentrationen über den gesamten Gärverlauf zu- und abnehmen können. Beispielsweise zeigen die Untersuchungen, dass das zu Beginn der Gärung in die Würze ausgeschiedene extrazelluläre Pyruvat zum Ende hin reassimiliert und zu Acetat umgesetzt wird.

### ***Technologische Bedeutung der organischen Säuren für die Bierqualität***

Die pH-Wertsturz während der Gärung ist unter anderem auf die Bildung organischer Säuren durch die Hefe zurückzuführen [2, 3, 5, 12, 1, 8]. Der Bier-pH wird in diesem Zusammenhang nicht nur durch die Konzentrationen der organischen Säuren bestimmt, sondern im entscheidenden Maße durch die Zusammensetzung des jeweils vorliegenden Säureprofils. Untersuchungen von Coote und Kirsop [5] zeigen, dass verschiedene organische Säuren bei identischen Konzentrationen entsprechend ihrer Struktur und der damit verbundenen Anzahl an Carboxylgruppen mit unterschiedlichen  $pK_s$ -Werten verschiedene pH-Werte im Bier bedingen.

Für die Haltbarkeit eines Bieres sind organische Säuren von Bedeutung, da deren undissoziierte Moleküle leicht in das Zellinnere bierschädlicher Mikroorganismen eindringen können und dort die Stoffwechselfvorgänge durch Absenkung des intrazellulären pH-Werts stören [1, 9].

#### ***Geschmack***

Im Allgemeinen besitzen organische Säuren einen intrinsischen, sauren Geschmack [5, 8, 9]. Einigen Vertretern, wie z. B. Bernsteinsäure (salzig und bitter), wird darüber hinaus in Abhängigkeit ihrer Molekülstruktur noch ein eigenständiges, charakteristisches Aroma zugesprochen [2, 3, 12, 13, 8, 9]. Prinzipiell liegt die Gesamtheit der Carbonsäuren im Hinblick auf ihre durchschnittlich im Bier vorhandenen Konzentrationen unterhalb der Geschmacksschwelle von 300-400 ppm. Eine Relevanz der organischen Säuren für den Biergeschmack ist aber durch synergetische Effekte mit anderen Bierinhaltsstoffen und durch Esterbildung mit Alkohololen durchaus gegeben [1, 14, 15, 16]. Diese Esterbildung ist auch während der Bieralterung zu beobachten.

#### ***Entstehung unterschiedlicher org. Säuren bei der Gärung***

Nach Püschner et al. [1] zeigen Citrat, Fumarat und Formiat im Bezug auf die Bildung während der Fermentation keine signifikante Abhängigkeit von der Temperatur. Vielmehr spiegeln ihre Konzentrationen in den endvergorenen Würzen die Konzentrationen der Anstellwürze wider. Die vorliegenden Mengen werden dabei im Wesentlichen durch das organische Säureprofil des verwendeten Malzes bzw. den Stammwürzegehalt definiert. Im Gegensatz dazu kann für die Säuren Pyruvat, Lactat, Malat und Succinat neben der Abhängigkeit vom Säureprofil des Malzes und dem Stammwürzegehalt eine entsprechende Abhängigkeit von der Gärtemperatur festgestellt werden [1].

Der Einfluss des Hefestammes auf das organische Säureprofil eines Bieres ist allgemein anerkannt, da dies in vielen Untersuchungen für andere Fermentationsmedien belegt ist. Danach zeigt der Hefestamm großen Einfluss auf die Bildung von Bernsteinsäure während der Gärung [17, 18, 19]. Darüber hinaus wird davon berichtet, dass Hefen, welche geringere Mengen an Bernsteinsäure in das Medium abgeben, höhere Mengen an Essigsäure als Nebenprodukt während der Gärung produzieren. In einer japanischen Untersuchung wird von Gärversuchen mit verschiedenen Hefemutanten berichtet. Mutanten mit Defekt der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase weisen bei normaler Alkoholproduktion eine bis zu 40 % verringerte Bildung von Bernsteinsäure auf. Andere Mutanten mit Defekten in Fumaratreduktase oder Acotinase zeigten ein sehr schlechtes Wachstum in der Testlösung oder im Falle der Mutante mit Succinat-Dehydrogenase-Defekt gar eine verstärkte Bildung von Bernsteinsäure [20]. Darüber hinaus veröffentlichten in den letzten Jahren weitere japanische Forscher Artikel, die auf dieser Untersuchung aufbauen [21, 22]. Es jedoch zu bemerken, dass die Hefen durch diesen Defekt stark in ihrem Anabolismus eingeschränkt sind und daher nur ein sehr langsames Wachstum zeigen. Aus diesem Grunde ist anzunehmen, dass ein industrieller Einsatz solcher Stämme zur Produktion von

Schlussbericht zum Forschungsvorhaben AiF 16150:

Untersuchung zur Senkung des Gehaltes an Magensäuresekretion fördernden Inhaltsstoffen in vergorenen, aber nicht destillierten, alkoholischen Getränken

alkoholhaltigen Getränken wenig sinnvoll ist. Die Brauereihefen betreffend sind keine Daten veröffentlicht.

## **Untersuchung und Zielstellung**

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden 30 verschiedene Hefestämme aus der Stammsammlung der VLB unter exakt gleichen Bedingungen einem Gärversuch im Labormaßstab (200ml) unterzogen. Eine anschließende Maßstabsvergrößerung ausgewählter Hefestämme in EBC Gärrohren wurde herangezogen, um die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse des Screenings im Labormaßstab zu verifizieren. Die Zielstellung des Screenings lag darin, einen Hefestamm zu identifizieren, welcher einen vergleichsweise niedrigen Gehalt an Bernsteinsäure im entstehenden Bier hinterlässt.

### ***Material und Methoden:***

Gärgefäße: 500ml Erlenmeyerkolben und 2 Liter EBC Gärssäulen

Fermentationssubstrat: Die Würze wurde aus Malzextrakt Bavarian Pilsener (Fa. Weyermann) hergestellt. Die Hopfenbitter wurde durch Zugabe einer 30%igen Iso- $\alpha$ -Säurelösung auf 20 BE eingestellt.

### ***Probenaufbereitung und Analytik:***

Im Hinblick auf die enzymatische und ionenchromatographische Quantifizierung von organischen Säuren mussten die im Zuge des Hefescreenings und der Versuchsreihen in EBC-Gärrohren entstandenen endvergorenen Würzen für weitergehende Untersuchungen aufbereitet werden. Der damit einhergehende Aufreinigungsschritt umfasste die Abscheidung der jeweils verwendeten Hefe und des während des Autoklavierens bzw. Pasteurisierens im Nährmedium entstandenen Trubs. Dazu wurden die endvergorenen Würzen in Zentrifugenröhrchen (Fa. VWR, Volumen=50 mL) überführt und mittels einer Laborzentrifuge (Fa. Heraeus) für 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abdekantiert und bis zum Zeitpunkt weitergehender Untersuchungen eingefroren. Das verbliebene Sediment wurde verworfen.

Ionenchromatograph: DX-600 (Fa. Dionex), mit AS50 Autosampler, AS50 Thermal Compartment, GS50 Gradient Pump und ED50 elektrochemischer Detektor

Trennsäulen :

- AS11-HC (I.D. 2 mm x L. 250 mm), Vorsäule AG11 (I.D. 2 mm x L.50 mm),
- Suppressor ASRS Ultra II (2mm)
- Trennung von Butyrat, Formiat, Pyruvat, Maleat und Citrat
- Fluss: 0,45 mL/ min, Konzentrationsgradient: A: NaOH 100 mM / B: Reinstwasser 0,05  $\mu$ S, Säulentemperatur: 40 °C, Suppressorcurrent: 75 mA
- ICE-AS6 (9 mm x 250 mm)
- Eluent: 0,4 mM Heptafluorbuttersäure, isokratisch
- Fluss: 1,0 mL /min
- Trennung von Malat, Citrat, Formiat, Acetat, Lactat, Succinat
- AS9-HC (2 mm x 250 mm), Vorsäule AG9-HC (2 mm x 50 mm)
- Eluent: 9mM Natriumcarbonat isokratisch
- Fluss: 0,25 mL/ min, Suppressor: Suppressor ASRS Ultra II (2mm) Current: 14 mA

- Trennung von Oxalat und Fumarat
- Tray Temperatur: 10 °C, Injektionsvolumen: 10 µl;
- Temperatur d. Leitfähigkeitsmesszelle: 30 °C

Enzymtests für Succinat: Boehringer Mannheim

Analytik von Extrakt, pH, Zellzahl nach MEBAK

### **Durchführung:**

*Gärversuche im Labormaßstab:* Im Zuge des durchgeführten Hefescreening wurde 12-prozentige Würze hergestellt. Im Anschluss wurde die Würze zu jeweils 200 mL in 20 Erlenmeyerkolben (500 mL) abgefüllt und für 20 min bei 121° Celsius autoklaviert. Zur Vermeidung einer zu starken Bruchbildung während des Autoklavierens wurde der Polyphenol- und Proteingehalt der Würze durch einen Filtrationsschritt über Faltenfilter unter Verwendung von Kieselgur (grob) und Silicahydrogel vor dem Autoklavieren reduziert. Nach dem Animpfen unter Verwendung einer sterilen Impfföse wurden pro Versuchsreihe jeweils 10 Hefestämme unbelüftet als Standkulturen bei 20° Celsius für 5 bis maximal 7 Tage in Form einer Doppelbestimmung geführt. Jeweils am 3. und 5. Gärtag wurde eine Gärkontrolle durchgeführt bzw. bei schwach gärenden Hefen an jedem weiteren Gärtag. Bei Erreichen der vorgegebenen Endvergärung ( $E_s \leq 2,8$ ) wurde die Gärung zur Vermeidung der Hefeautolyse gestoppt und die Standkulturen für weitere Analysen aufbereitet. Es wurden 30 Hefestämme getestet. Für eine Auswahl von 10 dieser Stämme wurde eine Wiederholung angesetzt.

*Gärversuch in EBC Gärssäulen:* Die hergestellte Würze wurde vor Befüllen der Säulen bei 80° Celsius pasteurisiert und anschließend auf 20° Celsius temperiert.

Beim Anstellen der pasteurisierten Würze wurde jeweils 1 L der Lösung in den zuvor gereinigten und mittels Kryostaten auf die gewünschte Gärtemperatur von 15 ° Celsius eingestellten EBC-Gärrohren vorgelegt. Daraufhin erfolgte die Hefegabe mit einer Anstellmenge von jeweils  $10 \cdot 10^6$  Zellen/ mL. Zur Gewährleistung einer ausreichenden, uniformen Belüftung der Hefe und um den gewünschten 2L-Maßstab einzustellen, wurde jeweils ein weiterer Liter der Würze draufgelassen“.

Zur Voranzucht wurde Hefe analog zu den Gärversuchen im Labormaßstab in Erlenmeyerkolben angezogen. Nach dem „Ankommen“ wurde die gärende Würze auf 2 Liter EBC Säulen im Verhältnis 1:10 überführt. Die aus dieser Gärung geerntete Hefe wurde für den folgenden Versuch verwendet.

Für die Bestimmung der Gärverläufe wurden, wenn vorgesehen, täglich unter Verwendung eines sterilen Probenehmers jeweils 50 mL der Würze mittig aus der in den EBC-Gärrohren vorliegenden Flüssigkeitssäule entnommen. Die Proben wurden auf ihre Gesamtzellzahl untersucht. Das entstandene Bier wurde wie nachfolgend beschrieben für die weitere Analytik aufbereitet.

## Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt sollen die im Zuge der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der technologischen Einflussmöglichkeiten auf die Bildung organischer Säuren während der Gärung unter besonderer Hervorhebung von Succinat (Bernsteinsäure) näher beschrieben und grafisch dargestellt werden.

### Ergebnisse des Hefescreening

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse des durchgeführten Hefescreening näher beschrieben und ausgewertet werden.

In diesem Zusammenhang sind in den Abb. 3 und 4 die Gärverläufe für die im Screening untersuchten Hefen im Hinblick auf die Abnahme des scheinbaren Extrakts der Würze gegenüber der Zeit abgebildet.

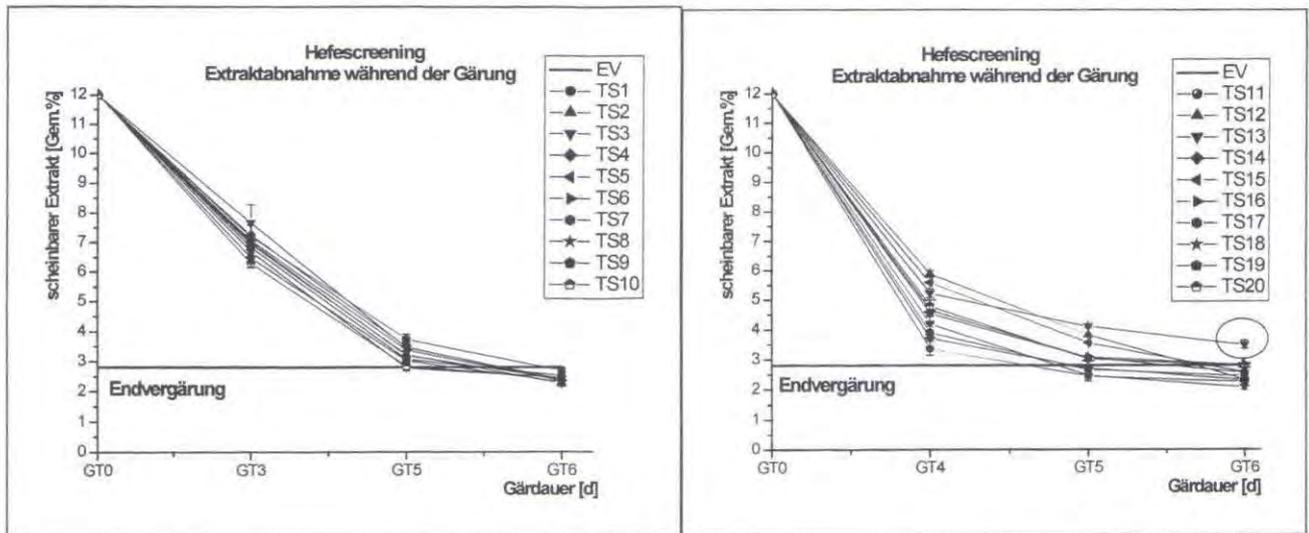


Abb. 3: Die Extraktabnahme während der Gärung für die untersuchten Hefestämme 1-20

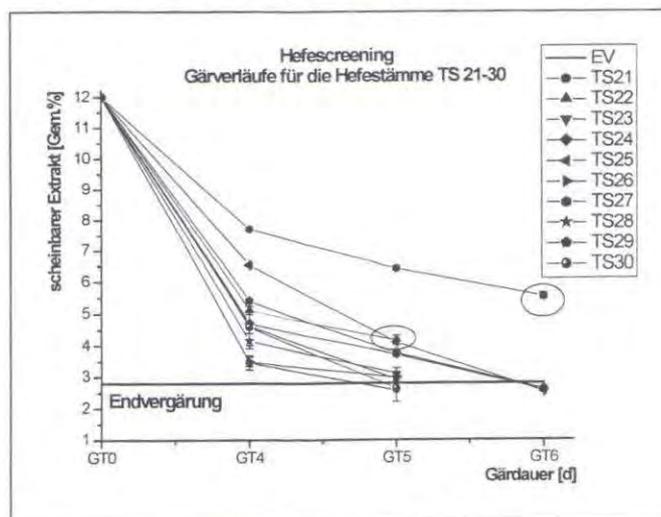
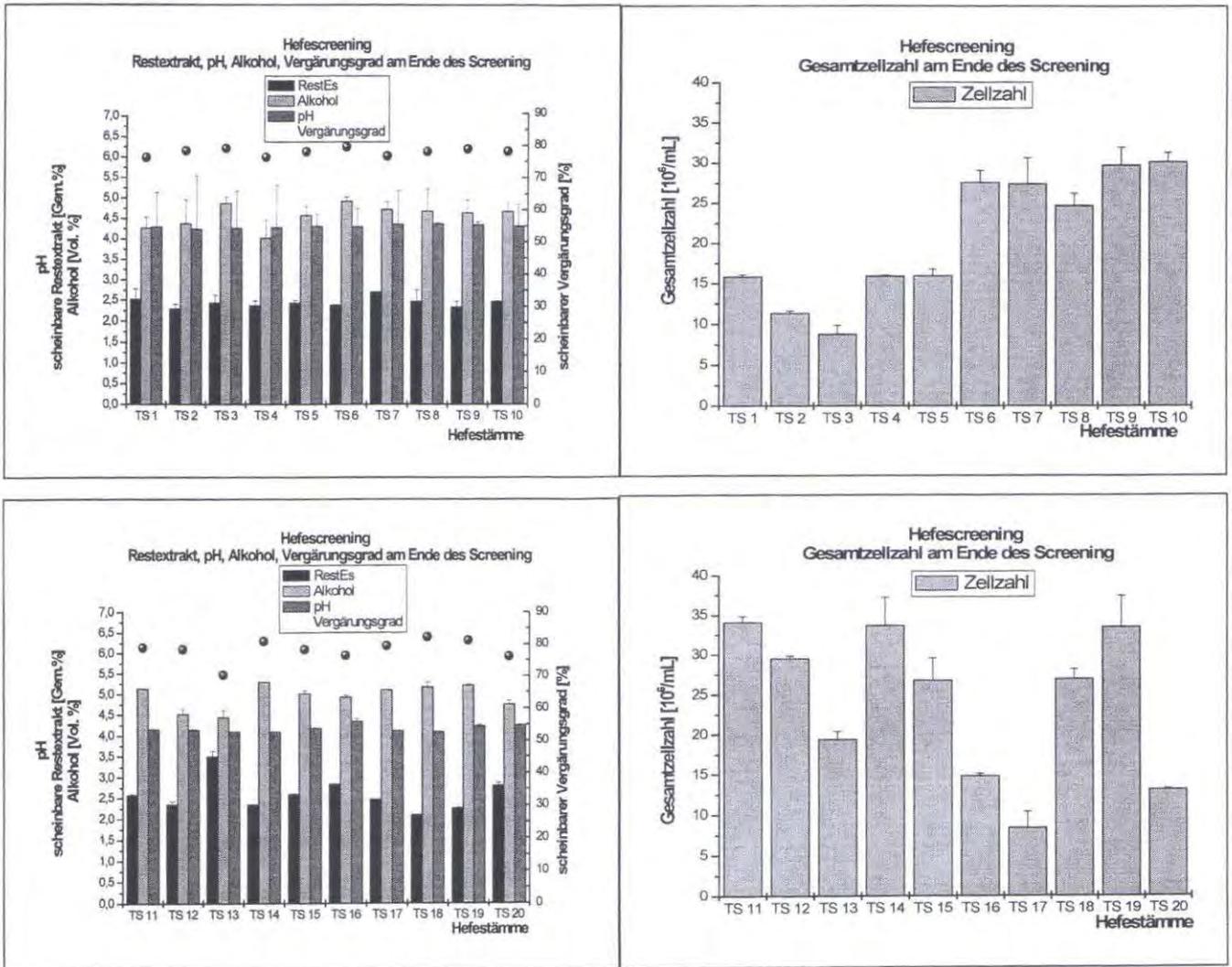
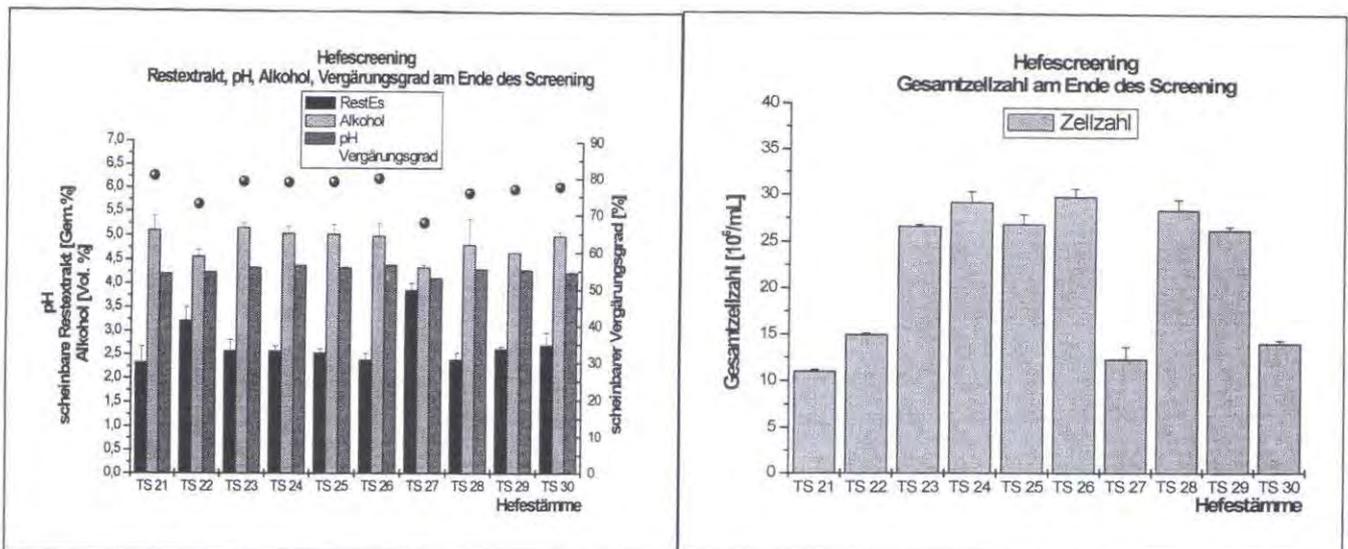


Abb. 4: Die Extraktabnahme während der Gärung für die untersuchten Hefestämme 21-30

Wie aus den Ergebnissen der Abbildungen hervorgeht, erreichen alle Hefen mit Ausnahme der Stämme 13, 22 und 27 den für das Screening angestrebten scheinbaren Restextrakt von  $\leq 2,8$  [Gem. %] während einer Gesamtgärdauer von 5 bzw. 6 Tagen.

In Abb. 5 sind zusätzlich für die einzelnen Hefestämme neben dem Restextrakt die Parameter pH-Wert, Alkoholgehalt [Vol.%], scheinbarer Vergärungsgrad [Gem.%] der endvergorenen Würzen und die Gesamtheferzellzahl [ $10^6$  Zellen/ mL] aufgetragen.





**Abb. 5: Hefespezifische(r) Gesamtzellzahl, Restextrakt, pH-Wert und Alkoholgehalt am Ende des Screening**

Äquivalent zu den zuvor beschriebenen Gärverläufen zeigen die endvergorenen Würzen der Hefestämme 13, 22 und 27 entsprechend dem erhöhten Restextrakt gegenüber den anderen Proben einen niedrigeren Vergärungsgrad und einen geringeren Alkoholgehalt. Im Hinblick auf den pH-Wert lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Bezüglich der Zellzahl ergibt sich für die einzelnen Hefen ein äußerst differenziertes Bild. Die Stämme 6 bis 11, 23 bis 26 und 1, 2, 4, 5, 14, 15, 18, 19, 28 und 29 zeigen ein Hefewachstum, das mit den zuvor beschriebenen Parametern der endvergorenen Würzen dahin gehend korreliert, dass eine entsprechend stärkere Hefevermehrung höhere Vergärungsgrade und Alkoholgehalte bedingt.

Dem gegenüber stehen die Stämme 3, 16, 17, 21 und 30, deren Würzen trotz eines geringeren Zellwachstums der Hefen ähnliche Parameter im Vergleich zu den Würzen der zuvor aufgezählten Hefestämme am Ende der Gärung aufweisen.

In Abb. 6 sind die durch die verschiedenen Hefestämme bedingten organischen Säureprofile der endvergorenen Proben dem Ausgangssäureprofil des als Nährmedium verwendeten Malzextrakts gegenüber gestellt. Dabei sind die einzelnen Hefestämme in Abhängigkeit der Zellzahlzunahme in Gruppen mit quantitativ vergleichbarem Wachstum zusammengefasst.

Aus den Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass keine der untersuchten Hefen während der Gärung Fumarat und Propionat über den Kohlenhydrat- bzw. Aminosäurekatabolismus synthetisiert und im Anschluss in das Nährmedium ausscheidet.

Im Hinblick auf die Konzentrationen der organischen Säuren Butyrat, Maleat und Oxalat ergeben sich nur geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen den Säureprofilen der endvergorenen Proben und dem Ausgangsprofil des Malzextrakts.

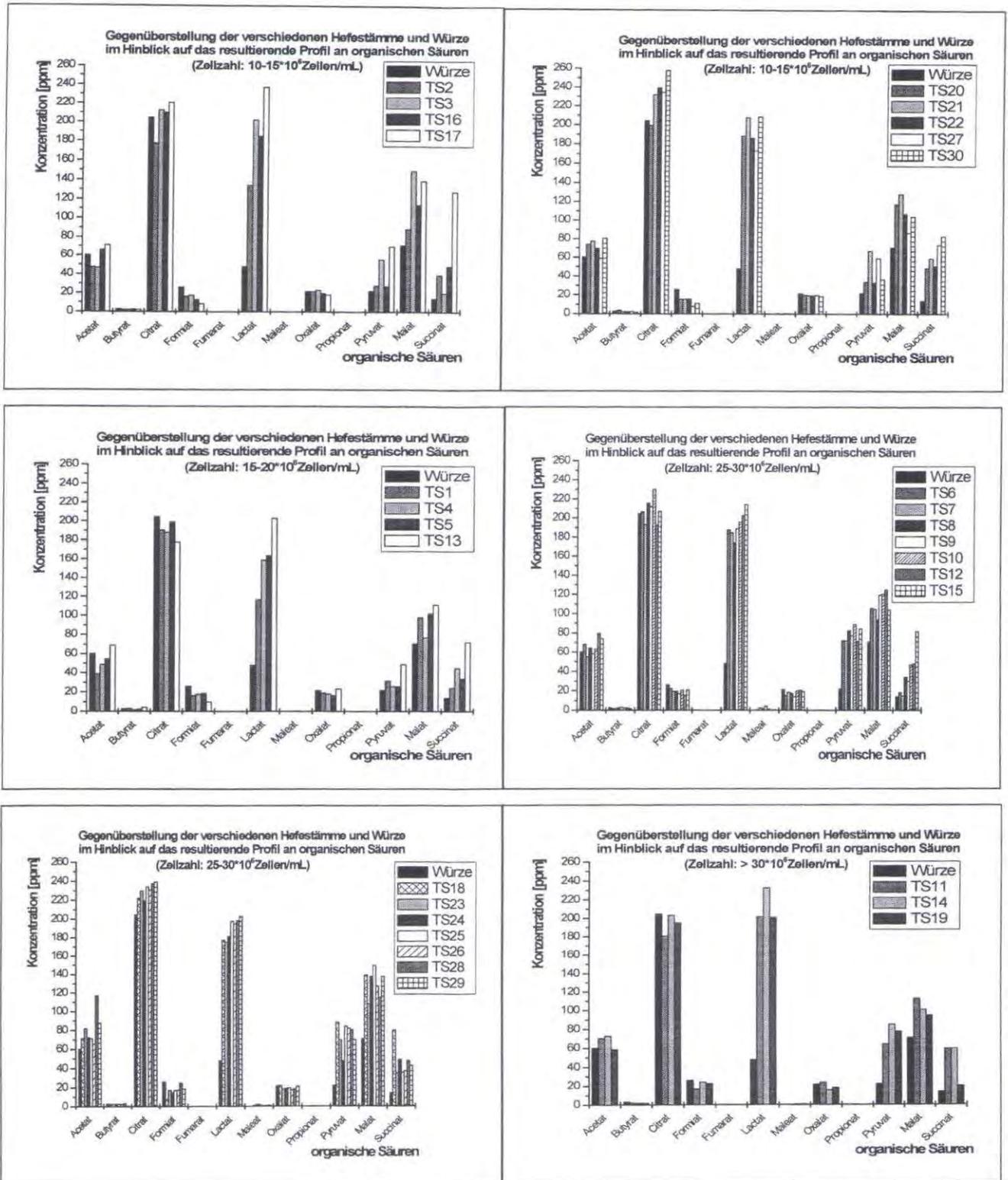


Abb. 6: Organisches Säureprofil der untersuchten Hefestämme (TS 1 bis 30)

Für ca. zwei Drittel der im Zuge des Screening untersuchten Hefestämme entspricht die Citrat-Endkonzentration der Proben der Ausgangskonzentration der Würze. Für die endvergorenen Würzen der Teststämme 10, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29 und 30 können eindeutige Anstiege der

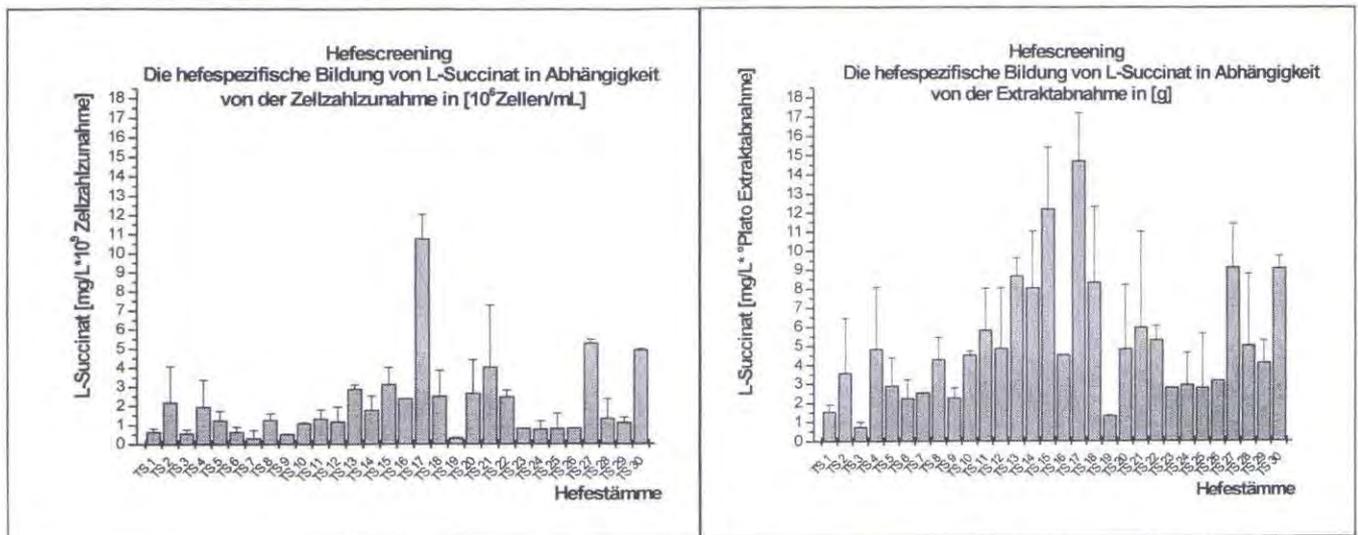
Citratkonzentration von 20 bis 50 ppm gegenüber dem Ausgangswert aufgezeigt werden. Im Gegensatz dazu bedingt die Fermentation der Würze unter Verwendung der Hefestämme 11 und 13 eine Abnahme der Citratkonzentration in einem Bereich von 25 bis 30 ppm.

Bezogen auf das ursprüngliche Säureprofil des Malzextrakts und der in diesem Zusammenhang vorliegenden Ausgangskonzentrationen der einzelnen organischen Säuren, ergeben sich für Pyruvat, Malat, Lactat und Succinat die deutlichsten Veränderungen während der Fermentation. Die dabei in der Literatur beschriebene Reassimilierung extrazellulären Pyruvats und dessen im Anschluss daran statt findende Umsetzung zu Acetat kann im Zuge des vorliegenden Hefescreening in Form einer negativen Korrelation zwischen Acetat- und Pyruvatgehalt der endvergorenen Würzen nicht bestätigt werden.

Im Fall der zuvor genannten organischen Säuren resultieren die Veränderungen gegenüber den Ausgangskonzentrationen ausschließlich in einer Zunahme der Säuregehalte. In diesem Zusammenhang können während des Screening jeweilig maximale Konzentrationsanstiege von 300 (Pyruvat; Teststamm 10), 100 (Malat; Teststamm 25), 400 (Lactat; Teststamm 17) und 800 (Succinat; Teststamm 17) Prozent ermittelt werden.

Das Hauptaugenmerk bezüglich der Entstehung organischer Säuren während der Fermentation lag auf der Synthese von Bernsteinsäure (Succinat). Äquivalent zu allen Stoffwechselendprodukten der Hefe wird diese nicht nur durch die hefespezifische Stoffwechselaktivität hinsichtlich der dafür benötigten kata- bzw. anabolen Reaktionswege bestimmt, sondern aus der Kombination von Stoffwechselaktivität und der im Zuge des Hefewachstums resultierenden Zellzahlzunahme.

Da sich die untersuchten Hefen hinsichtlich ihres Wachstums unter den gewählten Gärbedingungen signifikant unterscheiden (s. Abb. 5), wurde zur genauen Darstellung der quantitativen Verhältnisse, die jeweils gebildete Succinatmenge in Relation zur Extraktabnahme [ $^{\circ}$  Plato] und Zellzahlzunahme [ $10^9$  Zellen/L] gesetzt (s. Abb. 7).



**Abb. 7: Die hefespezifische Bildung von L-Succinat in Abhängigkeit von der Zellzahlzunahme und des Extraktverbrauchs**

Aus den Ergebnissen der Abb. 7 geht eindeutig hervor, dass sich die untersuchten Hefen signifikant im Hinblick auf die in Abhängigkeit von der Zellzahlzunahme und der Extraktabnahme gebildeten Succinatmenge unterscheiden. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Stamm 17, der mit 10,73 [ $\text{mg/L} \cdot 10^9$  Zellen] bzw. 14,71 [ $\text{mg/L} \cdot ^{\circ}$  Plato Extraktabnahme] die größte Succinatmenge während

der Fermentation synthetisiert. Im Gegensatz dazu liegen in den endvergorenen Würzen der Hefen 7 und 19 bezogen auf die Gesamtzellzahl und den Hefen 3 und 19 bezogen auf den verstoffwechselten Extrakt am Ende der Gärung die niedrigsten Succinatkonzentrationen vor. Eine Wiederholung der Untersuchung für 10 ausgewählte Teststämme (TS 3, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 17, 19) bestätigte die Ergebnisse.

### Gärversuche im EBC-Gärrohr

Im Zuge des beschriebenen Up-Scaling wurden in anschließenden Untersuchungen ausgewählte Hefestämme des „Screening-Pools“ hinsichtlich ihres Einflusses auf die Succinat-Bildung während der Fermentation unter Verwendung von so genannten EBC-Gärrohren im nächst größeren Volumenmaßstab (2 Liter) untersucht. Da in der Brauindustrie überwiegend untergärige Bierhefen zum Einsatz kommen, wurde zur Gewährleistung einer entsprechenden Praxisnähe von weiterführenden Versuchsreihen mit den zuvor als geeignet erscheinenden Hefestämmen 3 und 19 abgesehen, da es sich jeweils um eine obergärige Weizenbier- bzw. Alehefe handelt.

In den folgenden Abb. 8 und Abb. 9 sind die Ergebnisse des Hefescreening in Form des organischen Säureprofils, der in Abhängigkeit von der Zellzahlzunahme und Extraktabnahme gebildeten Succinatmenge, der Würzparameter der endvergorenen Proben und der Gesamtzellzahl der Hefen 6, 7 und 15 nochmals zusammengefasst.

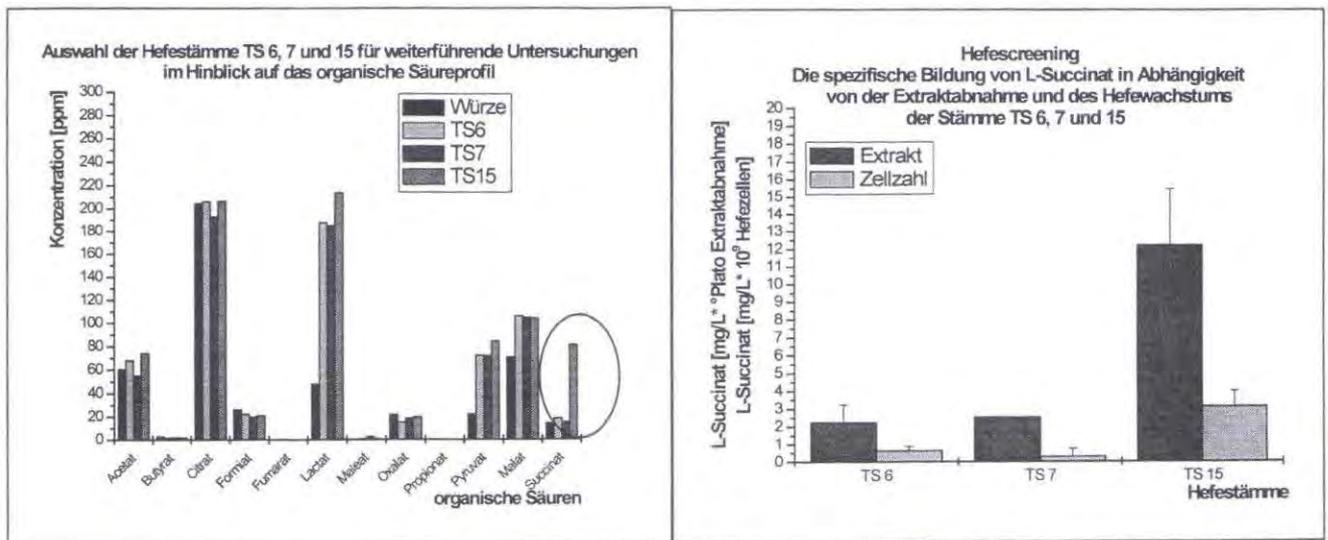
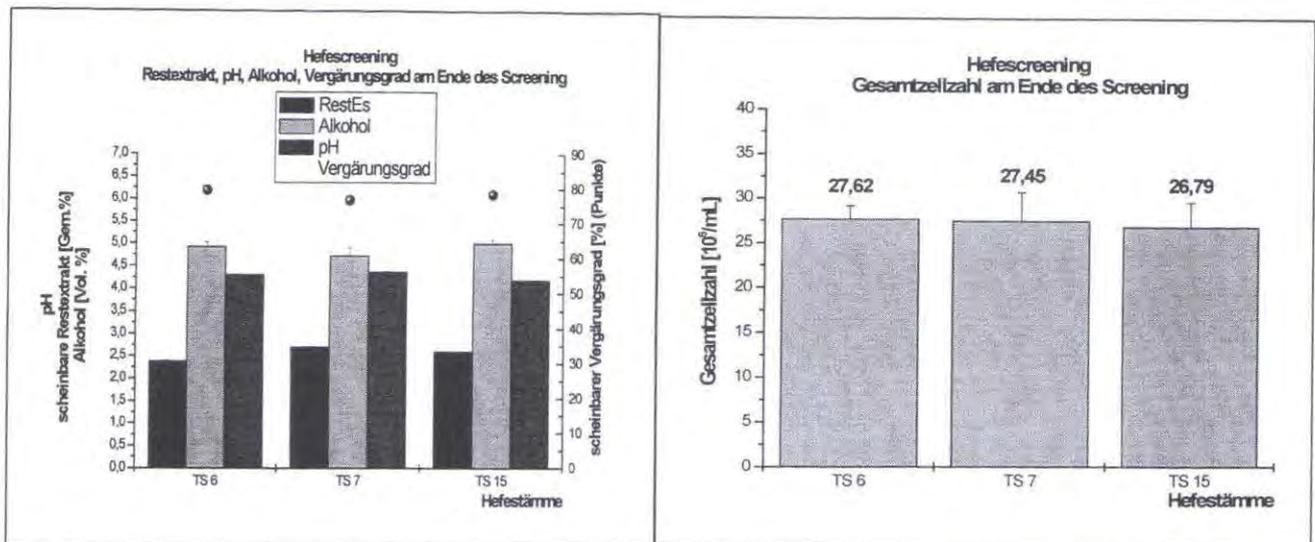


Abb. 8: Säureprofil und spezifisch gebildete Succinatmengen der ausgewählten Hefen



**Abb. 9: Würzparameter und Gesamtzellzahl der ausgewählten Hefen**

Wie aus den Ergebnissen der Abbildungen hervorgeht zeigen die endvergorenen Würzen der ausgewählten Hefen keine signifikanten Unterschiede im Vergärungsgrad, Alkoholgehalt, pH-Wert und Restextrakt. Darüber hinaus können die Gesamtzellzahlen der verschiedenen Stämme als nahezu identische betrachtet werden.

Signifikante Unterschiede im Hinblick auf das Säureprofil bestehen gegenüber den anderen organischen Säuren ausschließlich in der Succinat-Endkonzentration der vergorenen Proben und entsprechend in der spezifisch gebildeten, von der Zellzahlzunahme und der Extraktabnahme abhängigen Succinatmenge.

Anhand der zuvor beschriebenen Ergebnisse und des festgelegten, ausschließlichen Einsatzes untergäriger Bierhefen wurden, unter Verwendung der Hefe RH (TS 31) als Vergleichshefe, für die weiterführenden Untersuchungen in den EBC-Gärrohren die Stämme 6, 7 und 15 ausgewählt.

Die Versuche in den EBC-Gärrohren erfolgten in Form einer Doppelbestimmung nach der beschriebenen Vorgehensweise, wobei die einzelnen Hefen zeitgleich angestellt wurden.

In den Abb. 10 und Abb. 111 sind die Gärverläufe der zuvor beschriebenen Versuchsreihe in Form der Extrakt- [Gem. %] und pH-Wertabnahme, des Ethanolgehalts [Vol. %] und der Gesamtzellzahlzunahme [ $10^6$  Zellen/ mL] gegenüber der Gärdauer [d] aufgetragen.

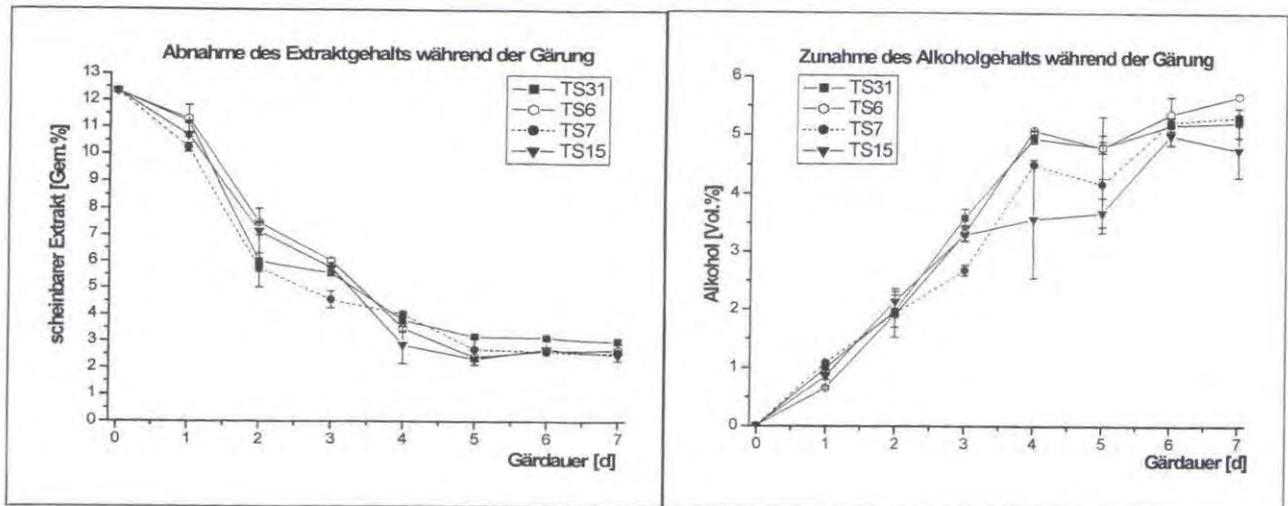


Abb. 10: Versuche in den EBC-Gärrohren: Extraktabnahme und Bildung von Ethanol

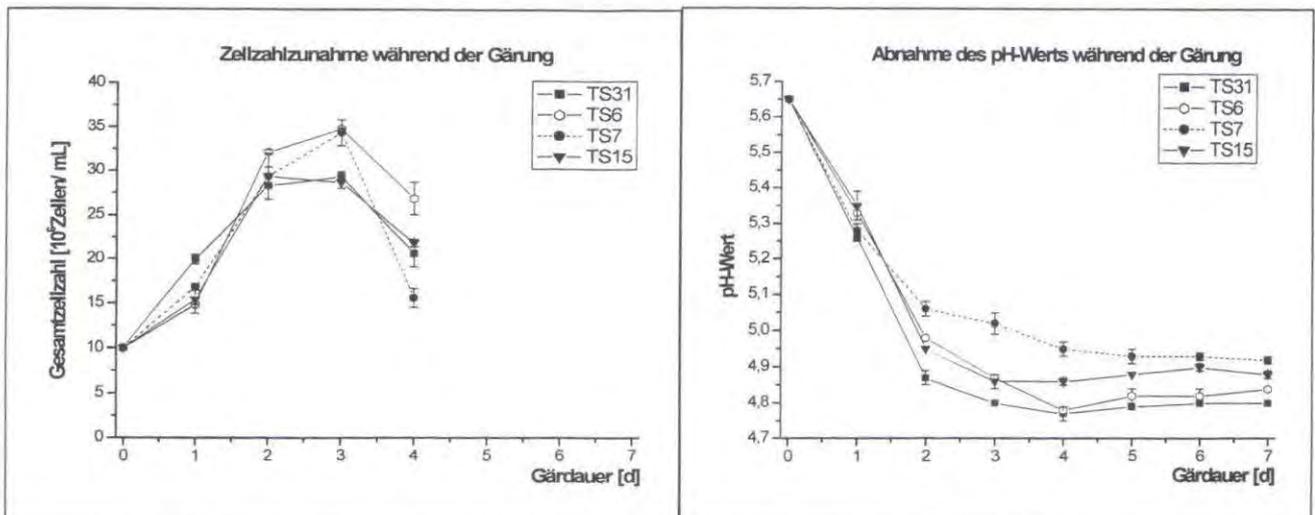
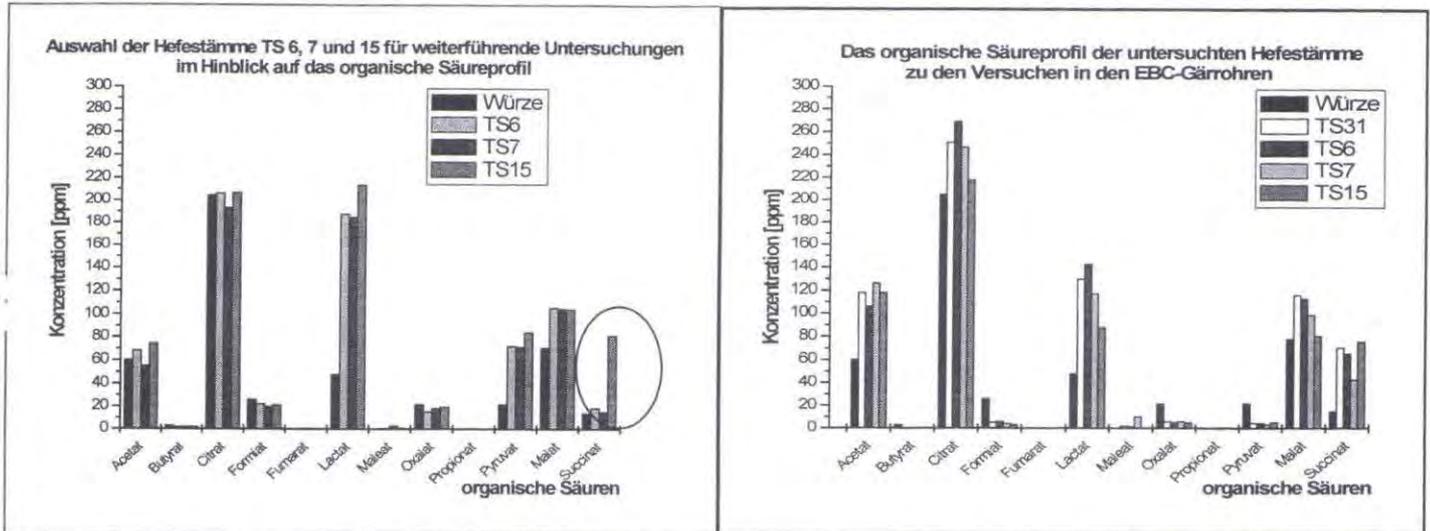


Abb. 11: Versuche in den EBC-Gärrohren: Zellzahlzunahme und Abnahme des pH-Wert

Anhand der Abb. 10 und Abb. 11 wird ersichtlich, dass zusammenfassend für alle Hefestämme im Zuge des durchgeführten Fermentationsversuchs, mit Ausnahme der Gesamtzellzahlzunahme, nahezu äquivalente Verläufe für die jeweiligen Gärparameter vorliegen. So differieren die endvergorenen Würzen der untersuchten Stämme maximal um 0,5 [Gem. %] bezüglich des verbliebenen Restextrakts zum Zeitpunkt des 7. Gärtages und des damit verbundenen Versuchsabbruchs (s. Abb. 10, links). Hinsichtlich des pH-Wertverlaufs zeigen alle Würzen den charakteristischen pH-Wertsturz innerhalb der ersten 48 Stunden und die in Folge dessen geringe weiterführende Abnahme bis zum Ende der Gärung. Dabei ist jedoch ersichtlich, dass die mit Teststamm 7 angestellte Würze gleich bleibend während der gesamten Fermentation gegenüber den anderen Würzen einen um bis zu 0,2 höheren pH-Wert aufweist (s. Abb. 11, rechts). Der Ethylalkoholgehalt der endvergorenen Würze des Teststamm 15 liegt mit ca. 4,8 [Vol. %] deutlich unterhalb des Wertebereichs von 5,2 bis 5,7 [Vol. %] der anderen Würzen.

Unterschiede zeigen sich ausschließlich im Wachstum der einzelnen Hefestämme. So erreichen die Hefen 15 und 31 mit ca.  $29 \cdot 10^6$  Zellen/ mL nach dem 2. bzw. 3. Gärtag ihre maximale, sich in Schwebelag befindende Gesamtzellzahl, die Hefen 6 und 7 mit ca.  $35 \cdot 10^6$  Zellen/ mL erst am Ende des 3. Gärtages (s. Abb. 11, rechts).

Im Folgenden sind die Säureprofile der jeweils endvergorenen Würzen der Teststämme 6, 7 und 15 aus dem Hefescreening und dem Fermentationsversuch in den EBC-Gärrohren einander gegenüber und ins Verhältnis zum Ausgangssäureprofil des Weyermann-Extrakts gestellt. Zusätzlich wird in der Abb. 12, rechts das Säureprofil der Vergleichshefe 31 dargestellt.



**Abb. 12: Vergleich der Säureprofile der Hefen 6, 7 und 15 des Hefescreening und des Fermentationsversuchs in den EBC-Gärrohren**

Grundlegend kann anhand des Vergleichs der aus den zuvor genannten Versuchsreihen hervorgehenden Säureprofile darauf geschlossen werden, dass im Hinblick auf die spezifische Synthese der einzelnen organischen Säuren seitens der untersuchten Hefestämme eine Abhängigkeit gegenüber der Dimensionierung des Versuchsaufbaus besteht.

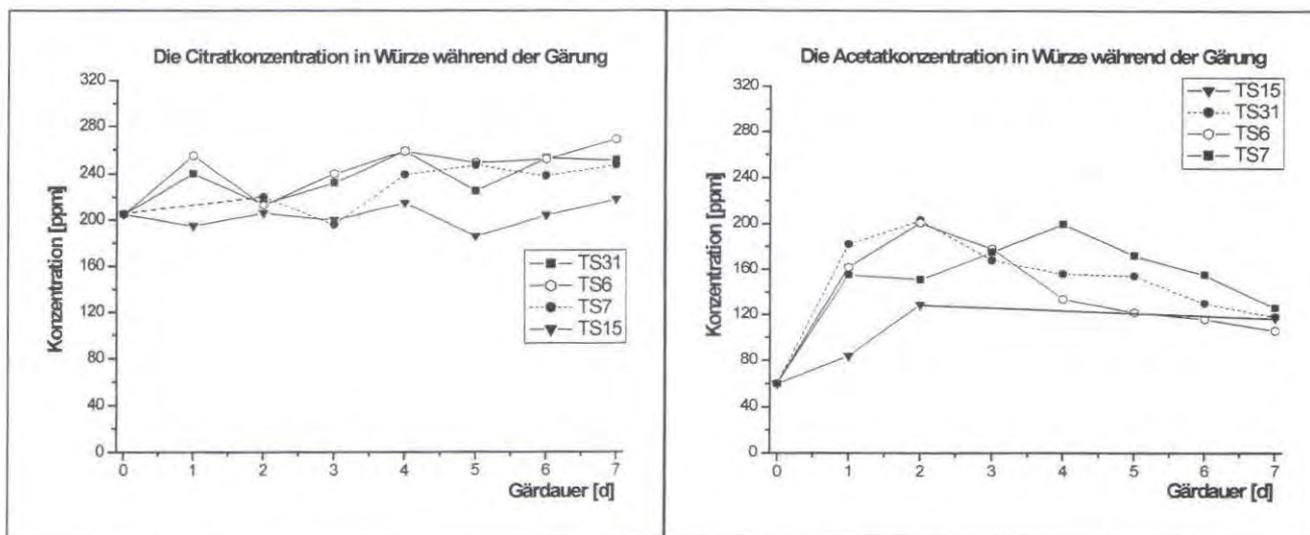
Entgegen dem Hefescreening resultieren aus den Fermentationsversuchen in den EBC-Gärrohren neben den Unterschieden in der Succinatkonzentration der verschiedenen endvergorenen Würzen weitere signifikante Abweichungen für die Endkonzentrationen der Säuren Citrat, Lactat und Malat.

Für die organischen Säuren Butyrat, Formiat, Oxalat und Pyruvat bestehen entsprechend dem Screening zwischen den vergorenen Proben der einzelnen Hefen keine signifikanten Unterschiede. In diesem Zusammenhang wird jedoch ersichtlich, dass die Fermentation der Würze mittels der verwendeten Stämme unter den gegebenen Versuchsbedingungen in den EBC-Gärrohren entgegen dem Hefescreening eine generelle Abnahme der Konzentrationen der zuvor genannten Säuren bedingt. Diesbezüglich sind die Veränderungen für die organische Säure Pyruvat am deutlichsten ausgeprägt. Im Gegensatz zu den Laborgärversuchen kann für die Gärungen in EBC Gärssäulen die in der Literatur beschriebene Reassimilierung extrazellulären Pyruvats und dessen im Anschluss daran statt findende Umsetzung zu Acetat bestätigt werden. Wie aus Abb. 12 hervorgeht synthetisieren die untersuchten Hefen in den Gärrohrversuchen verstärkt Acetat. Die Abweichungen in der Succinatkonzentration der endvergorenen Würzen der Stämme 6 und 7 gegenüber der Würze von Stamm 15 fallen deutlich geringer aus. Für den Teststamm 7 kann jedoch auch hier eine verhältnismäßig geringere Bildung von Succinat während der Gärung bestätigt werden.

In den Abb. 13 bis 16 sind mit Ausnahme von Butyrat, Propionat und Fumarat für alle weiteren organischen Säuren die in den durch die jeweiligen Hefestämme vergorenen Würzen vorliegenden Konzentrationen gegenüber der Gärdauer aufgetragen.

Von der Darstellung der zeitlichen Konzentrationsverläufe für Butyrat, Propionat und Fumarat wird an dieser Stelle bewusst abgesehen, da während des Fermentationsversuchs in den EBC-Gärrohren äquivalent zum Screening keine signifikanten Mengen der zuvor genannten organischen Säuren durch die Hefen gebildet bzw. verstoffwechselt werden.

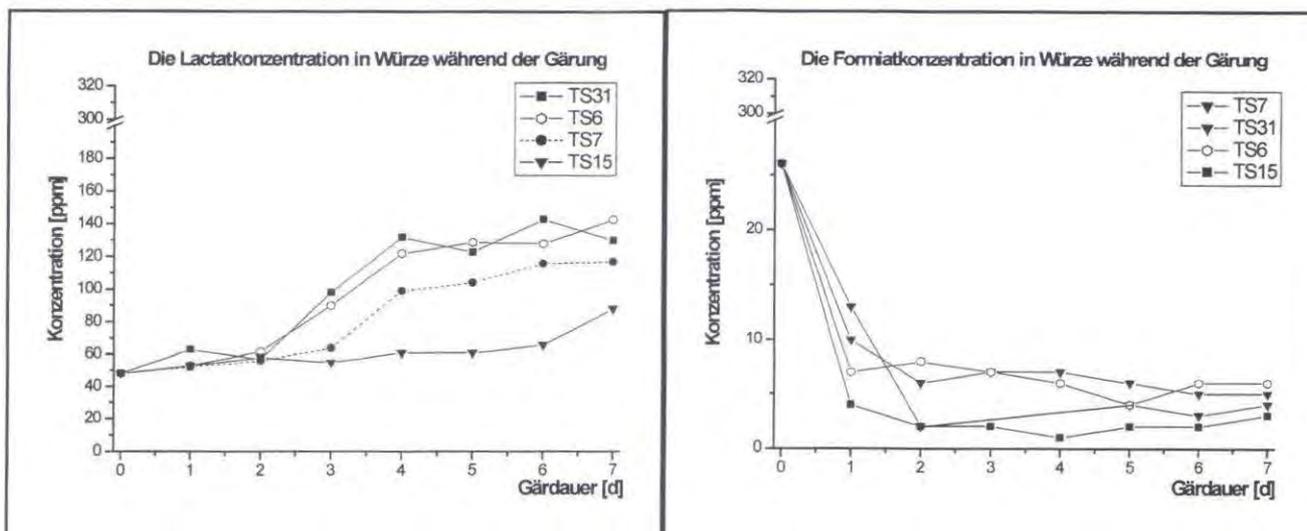
Im Allgemeinen können die vorliegenden Ergebnisse dahin gehend zusammengefasst werden, dass sich unabhängig von der jeweils verwendeten Hefe für alle organischen Säuren in der Tendenz ein spezifischer, zeitlicher Konzentrationsverlauf aufzeigen lässt.



**Abb. 13: Die zeitlichen Konzentrationsverläufe für Citrat und Acetat**

Aus der Abb. 13 können die Konzentrationsverläufe für die organischen Säuren Citrat (links) und Acetat (rechts) entnommen werden. Bezüglich des Citrats resultieren für die untersuchten Würzen der Stämme 7 und 15 hinsichtlich der Konzentration keine signifikanten, durch die jeweiligen Hefen bedingten Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert des Malzextraktes innerhalb der ersten 48 Gärstunden. Dem gegenüber steigen die Citratgehalte der Würzen der Hefen 6 und 31 in den ersten 24 Gärstunden deutlich an, um sich während des 2. Gärtages wieder an die Konzentrationen der anderen Würzen anzunähern. Im weiteren Verlauf nehmen die Citratmengen, mit Ausnahme für die Würze des Stammes 15, bis zum Ende der Gärung im Verhältnis zum Ausgangswert geringfügig zu.

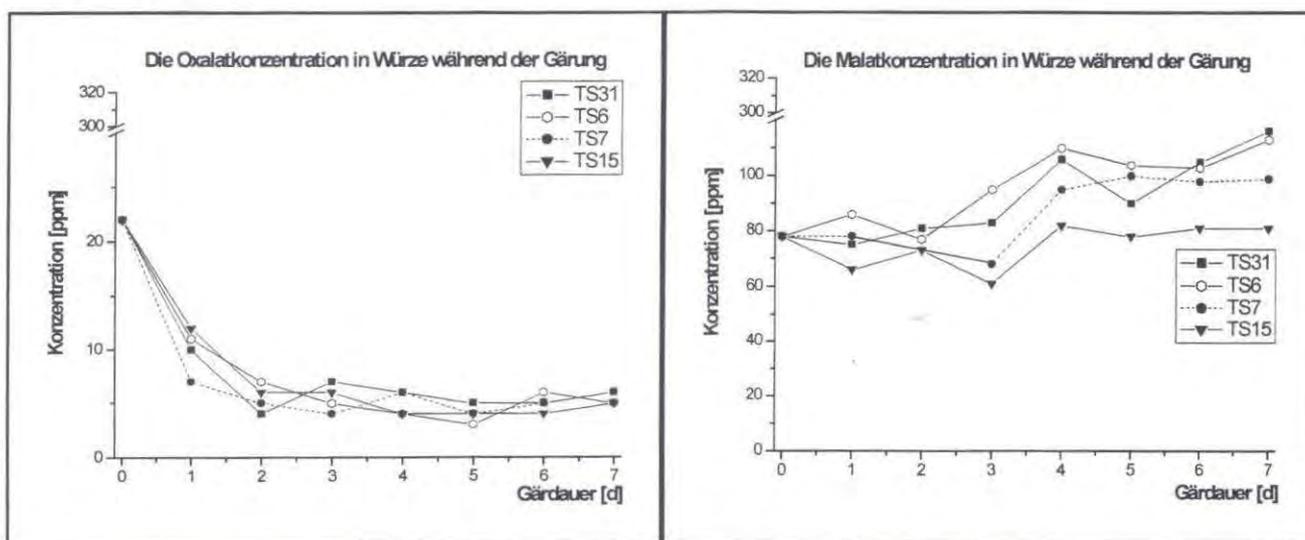
Bezüglich der Acetatkonzentration erreichen die Würzen der Stämme 6, 15 und 31 in den ersten 48 Gärstunden ihre Maximalwerte, die Würze der Hefe 7 erst nach 72 Stunden. Bei allen untersuchten Würzen nimmt die Acetatkonzentration nach dem Erreichen der Maximalwerte bis zum Gärende wieder kontinuierlich ab, wobei sich die Würzen in diesem Zusammenhang hinsichtlich der Endkonzentrationen einander angleichen.



**Abb. 14: Die zeitlichen Konzentrationsverläufe für Lactat und Formiat**

Aus der Abb. 14 können die Konzentrationsverläufe für die organischen Säuren Lactat (links) und Formiat (rechts) entnommen werden. Bezüglich des Lactats resultieren für alle untersuchten Würzen hinsichtlich der Konzentration keine signifikanten, durch die jeweiligen Hefen bedingten Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert innerhalb der ersten 48 Gärstunden. Im weiteren Verlauf steigen für die Würzen der Stämme 6, 7 und 31 die Lactatkonzentrationen bis zum Ende der Gärung kontinuierlich an, wobei die maximale Zunahme während des 3. und 4. Gärtages erfolgt. Für die Würze des Teststamms 15 bleibt die Lactatkonzentration bis einschließlich des 6. Gärtages nahezu konstant. Erst zum Ende der Gärung kann ein Anstieg, in Form einer Zunahme festgestellt werden.

Der Konzentrationsverlauf für die organische Säure Formiat ist für alle untersuchten Würzen nahezu identisch. Wesentliche Merkmale sind dabei die signifikante Konzentrationsabnahme während des ersten Gärtages und die daraus hervorgehenden gleich bleibenden Formiatgehalte der Würzen bis zum Ende der Gärung.



**Abb. 15: Die zeitlichen Konzentrationsverläufe für Oxalat und Malat**

Hinsichtlich der Oxalatgehalte der Würzen ergeben sich im Vergleich zur organischen Säure Formiat über die gesamte Gärdauer ähnliche Konzentrationsverläufe. Dem entsprechend nimmt der

Oxalatgehalt für alle Würzen innerhalb der ersten 48 Stunden deutlich ab, um im weiteren Verlauf bis zum Abbruch der Gärung auf einem konstanten Niveau zu verweilen (s. Abb. 15, links).

Für die organische Säure Malat kann ebenfalls anhand der vorliegenden Ergebnisse (s. Abb. 15, rechts) in der Tendenz und unabhängig vom jeweils eingesetzten Hefestamm ein charakteristischer Konzentrationsverlauf über die Gesamtdauer der Gärung festgehalten werden. Signifikante Merkmale sind in diesem Zusammenhang die gleich bleibenden Malatgehalte der Würzen während der ersten beiden Gärtage und der eindeutige Konzentrationsanstieg während des 3. und 4. Gärtages.

Im Anschluss daran sind in den Würzen der Stämme 7 und 15 keine weiteren Veränderungen des Malatgehalts festzustellen. Im Gegensatz dazu vollzieht sich in den Würzen der Hefen 6 und 31 zum Ende der Gärung eine weitere Zunahme der Malatkonzentration.

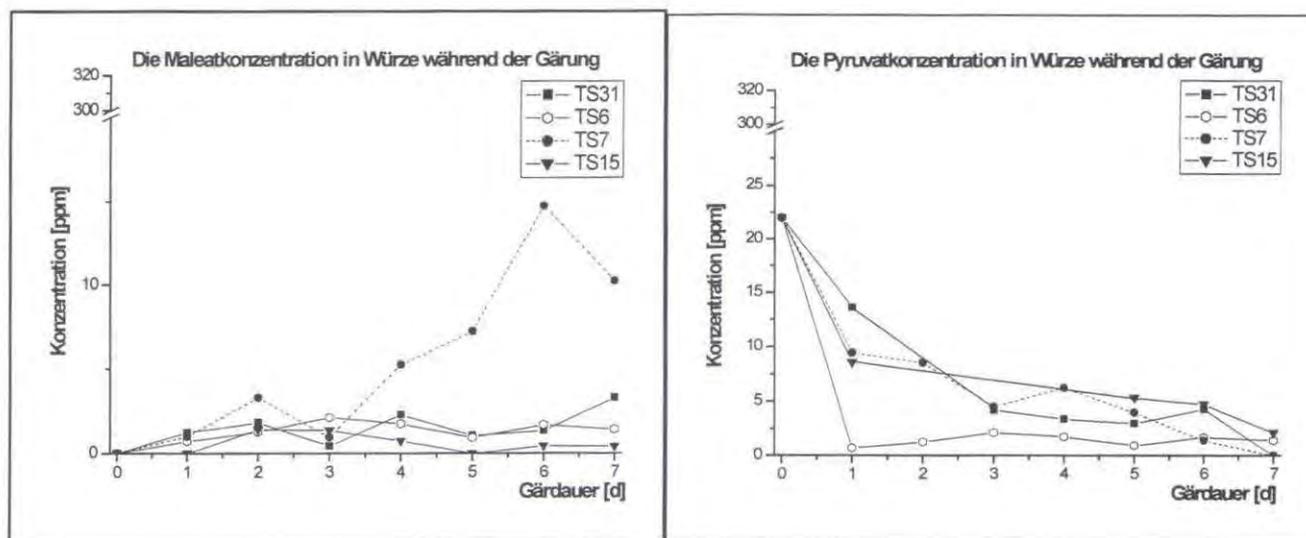


Abb. 16: Die zeitlichen Konzentrationsverläufe für Maleat und Pyruvat

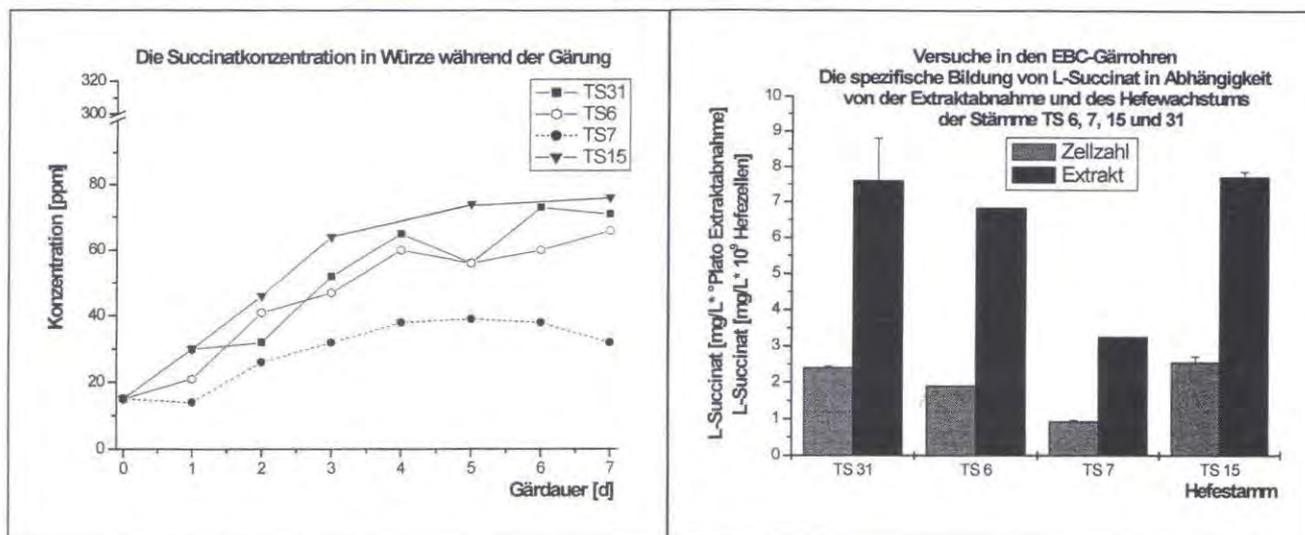
Aus der Abb. 16 können die Konzentrationsverläufe für die organischen Säuren Maleat (links) und Pyruvat (rechts) entnommen werden. Entgegen den zuvor beschriebenen Verläufen der Würzegehalte für die organischen Säuren Citrat, Acetat, Lactat, Formiat, Oxalat und Malat führt die Verstoffwechslung der Würzeinhaltsstoffe durch die Hefen 6, 15 und 31 während der Gärrohrversuche im Hinblick auf den Maleatgehalt zu keinen signifikanten Veränderungen gegenüber der Ausgangskonzentration des Malzextraktes. Die an den jeweiligen Gärtagen bestimmten Maleatkonzentrationen liegen in ihrer Gesamtheit innerhalb der gerätebedingten Streuung der Ionenchromatographie. Lediglich für die Würze des Stammes 7 kann vom 3. bis zum 6. Gärtage ein Anstieg des Maleatgehalts festgestellt werden, wobei Selbiger im Verlauf des 7. Gärtages auf eine Endkonzentration von ca. 10 ppm absinkt. In diesem Zusammenhang muss jedoch darauf verwiesen werden, dass sich der Konzentrationsverlauf der organischen Säure Maleat für die untersuchte Würze des Hefestammes 7 äquivalent zu den zuvor beschriebenen Würzen im Bereich der Nachweisgrenze der Ionenchromatographie bewegt und dem entsprechend die Veränderungen im Maleatgehalt nicht eindeutig auf die spezifische Stoffwechselaktivität der Hefe 7 zurückgeführt werden können.

Hinsichtlich der organischen Säure Pyruvat resultieren aus den Gärrohrversuchen für die untersuchten Hefestämme ähnliche Konzentrationsverläufe im Vergleich zu den Säuren Formiat und Oxalat. Ausgehend von einer Anfangskonzentration der Würze von 22 ppm wird der Großteil der organischen Säure von Seiten der Hefestämme 6 und 15 innerhalb der ersten 24 Stunden, von Seiten der

Hefestämme 7 und 31 innerhalb der ersten 72 Stunden der Gärung verstoffwechselt. Abgesehen von geringfügigen Unterschieden in den Pyruvatgehalten der untersuchten Würzen im weiteren Verlauf der Fermentation, liegen zum Zeitpunkt des Gärabbruchs nahezu äquivalente Endkonzentrationen des Pyruvats in den endvergorenen Proben vor.

Wie bereits erwähnt, lag das Hauptaugenmerk bezüglich der Bildung organischer Säuren während der Gärung auch in den Gärrohrversuchen auf der Synthese von Bernsteinsäure.

Dem entsprechend ist in der folgenden Abb. 17 die spezifische Succinat-Bildung der Hefen 6,7, 15 und 31 in Abhängigkeit von der Zeit (links) und im Verhältnis zur Extraktabnahme bzw. Zellzahlzunahme (rechts) während des Fermentationsversuchs dargestellt.



**Abb. 17: Die spezifische Succinat-Bildung während der Gärung in den EBC-Gärrohren**

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, ergeben sich für die Würzen der untersuchten Hefen hinsichtlich der jeweils vorliegenden Succinatkonzentration in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf der Gärung deutliche Unterschiede.

In diesem Zusammenhang wird ersichtlich, dass für die gärende Würze des Hefestammes 15 im Vergleich zu den anderen Würzen in Folge eines kontinuierlichen Konzentrationsanstieges über den gesamten Gärverlauf an jedem Gärtag die höchsten Gehalte an Bernsteinsäure vorliegen. Dem gegenüber liegen in der Würze des Stammes 7 die niedrigsten Succinatgehalte vor, wobei der signifikante Unterschied der endvergorenen Würze der Hefe 7 gegenüber den anderen Würzen vorwiegend auf die Konzentrationsabnahme zwischen dem 6. und 7. Gärtag zurückzuführen ist.

Die nahezu äquivalenten Verläufe für die Hefen 6 und 31 (mit Ausnahme des 6. Gärtages) bewegen sich zwischen den zuvor beschriebenen Konzentrationsveränderungen.

Wie in der zugrunde liegenden Literatur bereits beschrieben, ist die hefespezifische Succinat-Bildung sowohl von der Stoffwechselaktivität der Hefen als auch von der im Zuge des Wachstums resultierenden Zellzahlzunahme abhängig. Da sich im Vergleich zum Screening (s. Abb. 9, rechts) die untersuchten Stämme hinsichtlich des Zellwachstums während der Gärrohrversuche unterscheiden (s. Abb. 11, links), sind die Succinatkonzentrationen der endvergorenen Würzen erneut ins Verhältnis zur Zellzahlzunahme bzw. Extraktabnahme gesetzt (s. Abb. 17, rechts).

Die Ergebnisse des Hefescreening können diesbezüglich im Zuge der Gärrohrversuche ausschließlich in ihrer Tendenz bestätigt werden, da nur zwischen den spezifischen Succinatgehalten der

endvergorenen Würzen der Hefen 7 und 15 signifikante Abweichungen bestehen. Der Vergleich der Bernsteinsäurekonzentrationen der endvergorenen Würzen der Hefen 6 und 15 führt zu keinen nennenswerten Unterschieden.

### **Auswertung und Diskussion**

Im vorliegenden Arbeitspaket lag das Hauptaugenmerk bezüglich der Entstehung organischer Säuren während der Fermentation auf der Synthese von Succinat.

Die Bildung organischer Säuren, auch im Speziellen von Succinat, seitens der Hefe wird nicht nur durch die spezifische Stoffwechselaktivität hinsichtlich der dafür benötigten kata- bzw. anabolen Reaktionswege bestimmt, sondern durch die Kombination von Stoffwechselaktivität und der im Zuge des Hefewachstums ansteigenden Hefemenge.

Da sich die untersuchten Hefen hinsichtlich ihres Wachstums unter den gewählten Gärbedingungen signifikant unterschieden (s. Abb. 5), war der ausschließliche Vergleich der Stämme im Hinblick auf die organische Säure Succinat anhand der Gegenüberstellung der jeweiligen Endkonzentrationen in seiner Aussagekraft unzureichend. Dem entsprechend wurden zur genauen Darstellung der quantitativen Verhältnisse zwei hefespezifische Kenngrößen eingeführt. Dazu wurde anfänglich die jeweils gebildete Succinatmenge in Relation zum verstoffwechselten Extrakt [ $^{\circ}$ Plato] und zur Zellzahlzunahme [ $10^6$  Zellen/ mL] gesetzt (s. Abb. 7). Beide Kenngrößen belegen eindeutig, dass die im Screening untersuchten Hefen hinsichtlich der gebildeten Succinatmenge bezogen auf den verstoffwechselten Extrakt bzw. die Zellzahlzunahme deutlich voneinander abweichen. Dabei sind die nachgewiesenen Konzentrationsunterschiede im Bezug zur vorliegenden Extraktabnahme wesentlich ausgeprägter. Da jedoch nicht zwingend davon ausgegangen werden kann, dass die identischen Gesamtzellzahlen zweier Hefen zum Ende der Gärung äquivalent gebildete Biomassen widerspiegelt, wurde im weiteren Verlauf der Diskussion von der Kenngröße [spezifische Succinatmenge bezogen auf die Zellzahlzunahme] als Argumentationsgrundlage zur Beurteilung des technologischen Einflusses von Hefe auf die Bildung organischer Säuren abgesehen.

Unter Berücksichtigung der zuvor ausgewerteten Ergebnisse kann an dieser Stelle zusammenfassend formuliert werden, dass die Hefe entsprechend den Angaben der Literatur bedingt durch ihre spezifische Stoffwechselphysiologie während der Gärung nachweislich einen signifikanten Einfluss auf das organische Säureprofil von Bier im Allgemeinen und hinsichtlich der Konzentration von Bernsteinsäure im Speziellen aufweist.

In weiteren Versuchsreihen sollten die beschriebenen Ergebnisse der Laborgärungen im Hinblick auf ihre Reproduzierbarkeit unter besonderer Hervorhebung der spezifisch gebildeten Succinatmenge überprüft werden. Dazu wurden im Zuge des beschriebenen Up-Scaling drei untergärrige Bierhefen des Screening-Pools hinsichtlich ihres Einflusses auf die Succinat-Bildung während der Fermentation unter Verwendung von so genannten EBC-Gärrohren im nächst größeren Volumenmaßstab (2 Liter) untersucht.

Ausschlag gebend für die Auswahl der Stämme 6, 7 und 15 war der Umstand, dass sich einerseits die endvergorenen Würzen der Hefen im Vergärungsgrad, Alkoholgehalt, pH-Wert und Restextrakt nicht signifikant unterschieden und andererseits auf Grund der Gesamtzellzahlen zum Ende der Gärung für alle Stämme ein nahezu äquivalentes Hefewachstum ermittelt wurde Abb. 9. Des Weiteren lagen zwischen den endvergorenen Würzen im Hinblick auf das Säureprofil ausschließlich signifikante Unterschiede in den jeweiligen Succinat-Endkonzentrationen und dem entsprechend in der, in Relation zur Extraktabnahme, gebildeten Succinatmenge vor (Abb. 8).

Äquivalent zum Screening resultierten für die Hefestämme 6, 7 und 15 in den Fermentationsversuchen des Up-Scaling, unter Berücksichtigung der in den Abb. 10 und Abb. 11 dargestellten Veränderungen der untersuchten Fermentationsparameter, nahezu identische Gärverläufe. Lediglich im Wachstum der einzelnen Hefestämme konnten, unter Berücksichtigung der guten Reproduzierbarkeit der Messergebnisse auf Grund der gewählten Methode zur Zellzahlbestimmung, Unterschiede im Hinblick auf die maximale, sich in Schwebelage befindende Gesamtzellzahl ermittelt werden.

Auf der Basis dieser Ergebnisse können die aus den Versuchen des Up-Scaling hervorgehenden, Unterschiede zwischen den einzelnen Hefestämmen bezüglich des organischen Säureprofils der endvergorenen Würzen, entsprechend dem Screening, auf die spezifische Stoffwechselphysiologie der Hefen zurückgeführt werden. Dabei zeigt sich jedoch, dass die Säureprofile der endvergorenen Würzen aus dem Hefescreening für die Stämme 6, 7 und 15 mit den EBC-Gärrohrversuchen nur bedingt reproduzierbar waren. Gerade im Hinblick auf die organische Säure des Succinats liegt für die Hefestämme 6 und 7 gegenüber dem Hefescreening eine deutliche verstärkte Produktbildung vor. Jedoch verbleibt die Konzentration im Substrat, welches mit Hefestamm 7 vergoren wurde, auf einem sehr niedrigen Niveau.

Eine mögliche Ursache für die nicht darstellbare Wiederholung der Ergebnisse ist die in der Literatur angeführte Beeinflussung des Hefestoffwechsels durch physikalisch-chemische Faktoren während der Fermentation. Die Flüssigkeitssäule in den EBC Gärssäulen war erheblich größer im Vergleich zu den Fermentationen im Erlenmeyerkolben, auch ist ein Sauerstoffeintrag in den kleinen Gefäßen wesentlich wahrscheinlicher als in den größeren.

Eine Betrachtung der Konzentrationsverläufe der weiteren organischen Säuren über die Gesamtdauer der Fermentation belegt, dass äquivalent zu den Ergebnissen dieser Arbeit sowohl Coote und Kirsop als auch Püschner in ihren Untersuchungen für die organische Säure des Citrats keine signifikanten Konzentrationsveränderungen im Verlauf der Gärung belegen. Dem entsprechend postulieren die genannten Autoren, dass der Citratgehalt in Bier und Würze hauptsächlich durch das verwendete Malz bestimmt wird.

Hinsichtlich der Konzentrationsverläufe der organischen Säuren des Acetats (s. Abb. 13) und Pyruvats (s. Abb. 16) konnten die Ergebnisse der Autoren nicht bestätigt werden. Aus den Ergebnissen der Gärrohrversuche ging in diesem Zusammenhang hervor, dass der Gehalt an Pyruvat für alle untersuchten Würzen innerhalb der ersten 72 Stunden signifikant abnimmt und bis zum Ende der Gärung nur noch geringen Schwankungen unterliegt. Eine von den Autoren Coote, Kirsop und Püschner beschriebene negative Korrelation zwischen den Konzentrationsverläufen von Pyruvat und Acetat konnte im Zuge dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Für die organischen Säuren Lactat (s. Abb. 14) und Succinat (s. Abb. 17) konnten die in der Literatur [1] angegebenen Konzentrationsverläufe während der Gärung durch die Ergebnisse der EBC-Gärrohrversuche bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Stoffwechselaktivität der Hefe spezifische Konzentrationsverläufe der organischen Säuren Pyruvat, Acetat, Lactat, Malat und Succinat während der Gärung zur Folge hat. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die im Zuge des Aminosäurekatabolismus zeitlich versetzte Assimilierung der Würzeaminoacids seitens der Hefe.

### **Zusammenfassung**

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes sollte die technologischen Einflussmöglichkeiten auf die Bildung organischer Säuren während der alkoholischen Gärung unter besonderer Hervorhebung von Bernsteinsäure näher untersucht werden. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der detaillierten Darstellung des Einflusses verschiedener Hefestämme auf die Ausbildung des Säureprofils in gärender Würze mit Hilfe einer eigens im Verlauf dieser Arbeit entwickelten Screening-Methode. Eine weitere Zielsetzung bestand darin, die Ergebnisse des Hefescreening im Zuge eines up-scaling auf ihre Reproduzierbarkeit hin zu untersuchen und mögliche Einflüsse von physikalisch-chemischen Gärparametern auf die hefespezifische Bildung organischer Säuren aufzuzeigen.

Unter Betrachtung der in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse ist zusammenfassend zu sagen, dass der in der in der Literatur beschriebene spezifische Einfluss des Hefestammes auf die Bildung organischer Säuren während der Gärung eindeutig bestätigt werden konnte. Darüber hinaus zeigten weiterführende Untersuchungen dieser Arbeit, dass die Sekretion der untersuchten organischen Säuren durch die Hefe zu verschiedenen Zeitpunkten während der Fermentation erfolgt und dem entsprechend säurespezifische Konzentrationsverläufe in der gärenden Würze vorliegen. Aus dem Vergleich der Säureprofile des Hefescreenings und der EBC-Gärrohrversuche ging hervor, dass die Entstehung organischer Säuren nicht nur auf der spezifischen Stoffwechselphysiologie der jeweils verwendeten Hefestämme beruht, sondern darüber hinaus auf in Abhängigkeit der gewählten Gärbedingungen vorliegende, chemisch-physikalische Einflussfaktoren, wie dem statischen Druck, zurückgeführt werden kann.

## Literatur

---

- 1 Püschner C., Zenz H., Schwarz H.  
Änderung des Carbonsäureprofils während des Brauprozesses  
Mitteilungen Österreichisches Getränke Institut, Nr. 5/6, 52–59, 1995
- 2 Boulton C. and Quain D.  
Brewing yeast and fermentation  
Blackwell science Ltd., 2001
- 3 Briggs D. E.  
Brewing science and practice  
Woodhead publishing limited, Cambridge England, 2004
- 4 Oura E.  
Reaction products of yeast fermentation  
Process biochemistry, 19–35, 1977
- 5 Coote N. and Kirsop B. H.  
The content of some organic acids in beer and other fermented media  
Journal of the Institute of Brewing, Vol. 80, 474–482, 1974
- 6 Klopper W. J., Angelino S. A. G. F., Tunning B. and Vermeire H. A.  
Organic acids and glycerol in beer  
Journal of the Institute of Brewing, Vol. 92, 225–228, 1986
- 7 Sroka P., Tuszyński T.  
Changes in organic acid contents during mead wort fermentation  
Food Chemistry, 104, 1250–1257, 2007
- 8 Whiting G. C.  
Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages – a review  
Journal of the Institute of Brewing, Vol. 82, 84–92, 1976
- 9 Yang X. and Yin L.  
Factors Influencing the Organic Acids Content in Final Malt  
ASBC Journal, Volume 64, Number 4, 222–227, 2006
- 10 Enebo L., Blomgren G and Johnsson E.  
Low molecular non-volatile organic acids in wort and beer  
Journal of the Institute of Brewing, Vol. 61, 408–411, 1955
- 11 Briggs D. E.  
Brewing science and practice

Woodhead publishing limited, Cambridge England, 2004

12 Montanari L., Perretti G., Natella F., Guidi A. and Fantozzis P.

Organic and phenolic acids in beer

Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 32, 535–539, 1999

13 Shindo S., Sahara H., Koshino S.

Relationship of production of Succinic acid and methyl citric acid pathway during alcohol fermentation with immobilized yeast

Biotechnology letters, Vol. 15, No. 1, 51–56, 1993

14 Vanderhaegen B., Neven H., Coghe St., Verstepen K. J., Verachtert H., Derdelinckx G.

Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top Fermented Beer

J. Agric. Food Chem., 51, 6782–6790, 2003

15 Vanderhaegen B., Delvaux F., Daenen L., Verachtert H., Delvaux F. R.

Aging characteristics of different beer types

J. Agric., 103, 404–412, 2007

16 Saison D., de Schutter D. P., Uyttenhove B., Delvaux F. and F. R.

Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds

Food Chemistry, 114, 1206–1215, 2009

17 Castellari, L., Magrini, A., Passarelli, P., Zambonlli, C.

Effect of must fermentation temperature on minor products by cryo and non-cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains

Italian Journal of Food Science 7(2), 1995, 125-132

18 Shimazo, Y., Watanabe, M.

Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids an must during fermentation, J. Ferment. Technol. 59(1), 1981, 27-32

19 Heerde, E., Radler, F.

Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*

Arch. Microbiol. 117, 1978, 269-276

20 Arikawa, Y., Kuroyahagi, T., Shiosaka, M., Muratsubaki, H., Enomoto, K., Kodaira, R., Okazaki, M.

Effect of genedisruptions of the TCA Cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*

Journal of Bioscience and Bioengineering 88(1), 1999, 28 – 36

21 Kubo, Y., Takagi, H., Nakamori, S.

Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain

Journal of Bioscience and Bioengineering 90(6), 2000, 619-624

22 Yano, S., Asano, T., Kurose, N., Hiramtsu, J., Shimoi, H., Ito, K. Characterization of an  $\alpha$ -ketoglutarate resistant sake yeast mutant with high organic acid productivity

Journal of Bioscience and Bioengineering 96(4), 2003, 332 – 336



**Sachbericht 2:**

**Screening von Gärparametern zur Beeinflussung des Gehaltes an  
Bernsteinsäure im Bier**

Zu den Möglichkeiten der Einflussnahme im Brauprozess auf die Entstehung von Bernsteinsäure gibt es nur wenige Untersuchungen. Speziell mit dem Ziel, möglichst geringe Konzentrationen zu erzielen, gibt es keine. Ziel dieser Arbeit war es, durch ein breit angelegtes Screening von Brauprozessparametern eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen im größeren Maßstab zu schaffen. Die untersuchten Parameter wurden zuvor nach einer eingehenden Beurteilung relevanter Literaturstellen gewichtet. Versuche wurden sowohl in 2 Liter EBC Gärsäulen als auch in zylindrokonischen Gärtanks mit 40 Liter Netto-Inhalt durchgeführt.

## Zugrunde liegende Literatur:

### *Entstehung der organischen Säuren*

Neben Ethanol und Kohlendioxid generiert die Hefe über ihren Aminosäure- und Kohlenhydratstoffwechsel während der Fermentation eine Vielzahl weiterer Nebenprodukte, von denen einige den Biergeschmack bzw. das Bieraroma nachhaltig beeinflussen können. Dazu zählen neben aliphatischen, höheren Alkoholen und Aldehyden noch organische Säuren, Fettsäuren bzw. Ester aus Alkoholen und Fettsäuren [1, 2, 3].

Die Bildung der zuvor genannten aromaaktiven Metabolite, so auch im Speziellen für die organischen Säuren, wird hauptsächlich durch den gewählten Hefestamm und die durch das verwendete Malz bestimmte Würzezusammensetzung festgelegt [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Nach Püschner C. und Yang X. et al. [6, 9] werden dabei die im Malz vorliegenden Säurekonzentrationen durch die Parameter Gerstensorte, Düngung, Erntejahr, Anbauggebiet, Reifungsstadium und Trockenheitszustand der Gerste, die malzspezifische Mikroflora sowie die Mälzungsbedingungen beeinflusst.

Die Menge an organischen Säuren, die über die Hopfengabe in die kochende Würze und dem entsprechend in das fertige Bier eingetragen wird, ist im Vergleich dazu vernachlässigbar [10].

Ergebnisse von Püschner C. et al. [6] belegen in diesem Zusammenhang, dass aus der Bestimmung der Zusammensetzung der organischen Säuren eines Bieres nicht zwangsläufig auf dessen Zugehörigkeit zu einer bestimmten Bierkategorie geschlossen werden kann.

Die Hauptmenge der im Bier vorhandenen organischen Säuren geht oxidativ via Brenztraubensäure direkt aus dem Tricarbonsäurezyklus der Hefe hervor [11, 3, 6] (s. Abbildung 1).

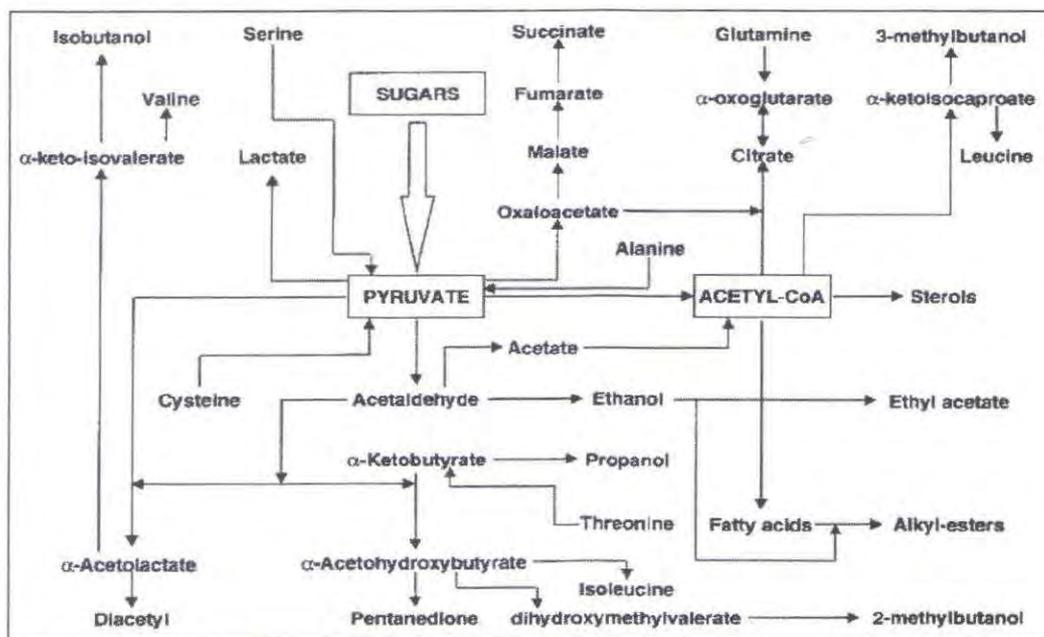
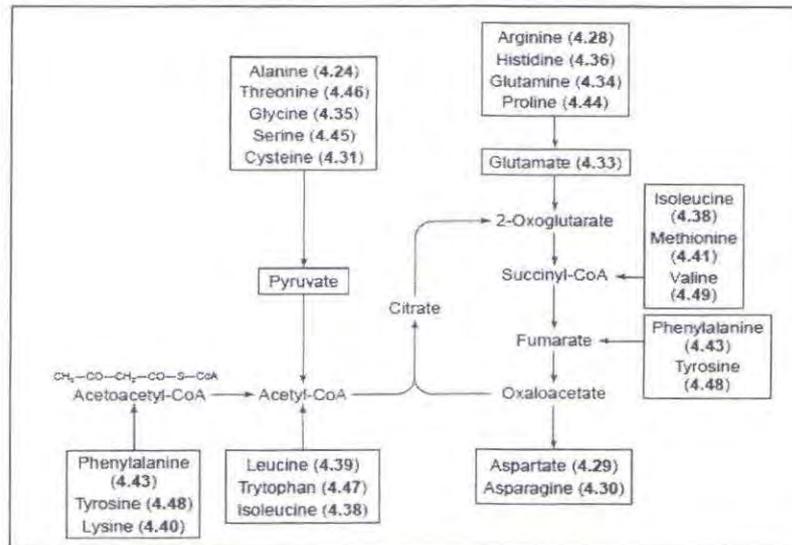


Abbildung 1: Übersicht des Kohlenhydratstoffwechsels der Hefe, organische Säuren sind als Ihre Salze genannt.

Eine weitere Möglichkeit ist die, ähnlich der Bildung höherer Alkohole (Ehrlich-Weg), verlaufende Desaminierung würespezifischer Aminosäuren zum Aufbau hefezelleigenen Proteins. Die daraus hervorgehenden organischen Säuren werden im Anschluss ins Bier ausgeschieden [1, 12].



**Abbildung 2: Die Bildung organischer Säuren aus würespezifischen Aminosäuren, organische Säuren sind als Ihre Salze genannt**

Nach Boulton C. [1] ist die Exkretion der organischen Säuren unter anaeroben Bedingungen seitens der Hefe im Wesentlichen auf drei Ursachen zurückzuführen:

- Sie sind für die Hefe im Hinblick auf die Synthese von zelleigenen Verbindungen (Anabolismus) nicht von Bedeutung.
- Unter den anaeroben Bedingungen der Gärung existieren keine weiterführenden Stoffwechselwege zur Oxidation und damit verbunden zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten, die ihrerseits für die Bereitstellung von Stoffwechselenergie in Form von ATP genutzt werden können.
- Zur Aufrechterhaltung des enzymkatalysierten Stoffwechsels benötigt die Hefe einen möglichst neutralen intrazellulären pH-Wert.

Darüber hinaus ist nach Briggs E. [2] der zunehmende Todanteil an der Gesamthefezellzahl zum Ende der Gärung und damit verbunden die Hefeautolyse ein weiterer Grund für die in einem Bier vorliegenden Konzentrationen an organischen Säuren.

Im Hinblick auf die Ausscheidung der organischen Säuren seitens der Hefe muss zusätzlich angemerkt werden, dass es sich dabei, beginnend mit dem Anstellen bis zum Gärungsende, nicht um einen fortlaufenden Prozess handelt. So belegen Untersuchungen von Coote, Kirsop, Heerde, Püschner und Whiting [4, 12, 6, 8], dass die verschiedenen Säuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die gärende Würze ausgeschieden werden bzw. in ihren Konzentrationen über den gesamten Gärverlauf zu- und abnehmen können. Beispielsweise zeigen die Untersuchungen, dass die zu Beginn der Gärung in die Würze ausgeschiedene extrazelluläre Brenztraubensäure zum Ende hin re-assimiliert und zu Essigsäure umgesetzt wird.

### ***Technologische Bedeutung der organischen Säuren für die Bierqualität***

Die pH-Wertabsenkung während der Gärung ist unter anderem auf die Bildung organischer Säuren durch die Hefe zurückzuführen [1, 2, 4, 13, 6, 8]. Der Bier-pH wird in diesem Zusammenhang nicht nur durch die Konzentrationen der organischen Säuren bestimmt sondern im entscheidenden Maße durch die Zusammensetzung des jeweils vorliegenden Säureprofils. Untersuchungen von Coote und Kirsop [4] zeigen, dass verschiedene organische Säuren bei identischen Konzentrationen entsprechend ihrer Struktur und der damit verbundenen Anzahl an Carboxylgruppen mit unterschiedlichen  $pK_S$ -Werten verschiedene pH-Werte im Bier bedingen.

Für die Haltbarkeit eines Bieres sind organische Säuren von Bedeutung, da deren undissoziierte Moleküle leicht in das Zellinnere bierschädlicher Mikroorganismen eindringen können und dort die Stoffwechselfvorgänge durch Absenkung des intrazellulären pH-Werts stören [6, 9].

### ***Geschmack***

Im Allgemeinen besitzen organische Säuren einen intrinsischen, sauren Geschmack [4, 8, 9]. Einigen Vertretern, wie z. B. Bernsteinsäure (salzig und bitter), wird darüber hinaus in Abhängigkeit ihrer Molekülstruktur noch ein eigenständiges, charakteristisches Aroma zugesprochen [1, 2, 13, 14, 8, 9]. Prinzipiell liegen die meisten Carbonsäuren im Hinblick auf ihre durchschnittlich im Bier vorhandenen Konzentrationen unterhalb der Geschmacksschwelle von 300-400 ppm. Eine Relevanz der organischen Säuren für den Biergeschmack ist aber durch synergetische Effekte mit anderen Bierinhaltsstoffen und durch Esterbildung mit Alkoholen durchaus gegeben [6, 15, 16, 17]. Diese Esterbildung ist auch während der Bieralterung zu beobachten. Bernsteinsäure wird in größeren Konzentrationen auch als Geschmacksverstärker in Lebensmitteln eingesetzt.

### ***Entstehung unterschiedlicher org. Säuren bei der Gärung***

Nach Püschner et al. [6] spiegeln Konzentrationen von Zitronen-, Fumar- und Ameisensäure in den endvergorenen Würzen die Konzentrationen der Anstellwürze wider. Die vorliegenden Mengen werden dabei im Wesentlichen durch das organische Säureprofil des verwendeten Malzes bzw. den Stammwürzegehalt definiert. Im Gegensatz dazu kann für die Brenztrauben-, Milch-, Äpfel und Bernsteinsäure neben der Abhängigkeit vom Säureprofil des Malzes und dem Stammwürzegehalt eine entsprechende Abhängigkeit von der Gärtemperatur festgestellt werden [6].

Der Einfluss des Hefestammes auf das organische Säureprofil eines Bieres ist allgemein anerkannt, da dies in vielen Untersuchungen für andere Fermentationsmedien belegt ist. Danach zeigt der Hefestamm großen Einfluss auf die Bildung von Bernsteinsäure während der Gärung [18, 19, 12]. Darüber hinaus wird davon berichtet, dass Hefen, welche geringere Mengen an Bernsteinsäure in das Medium abgeben, höhere Mengen an Essigsäure als Nebenprodukt während der Gärung produzieren. Japanische Untersuchungen mit Hefemutanten gehen eingehender auf die Mechanismen ein [11, 20, 21].

### ***Bildung von Bernsteinsäure durch Saccharomyces-Hefen während der alkoholischen Gärung und technologische Einflussmöglichkeiten***

Die Bernsteinsäure ist ein reguläres Nebenprodukt der alkoholischen Gärung durch Hefe. Sie ist in geringen Mengen, aber auch in Konzentrationen von bis zu 2 g/l in allen Fermentationsprodukten zu finden [8], und somit sind sehr hohe Gehalte in Wein und Bier anzutreffen. Gleichzeitig ist die Bernsteinsäure eine der am stärksten gebildeten organischen Säuren bei der Gärung (Tabelle 1).

Bier [14]	Bier [22]	Bier [23]	Cider [29]	Wein [19]	Wein [24]	Sake [21]
0,049 – 0,145	0,011 – 0,33	0,05 – 0,07	1,6 – 2,4	0,33 – 1,61	0,7 – 0,9	0,63 – 1,36

Die Bernsteinsäure gilt in vergorenen, undestillierten alkoholischen Getränken meist als unwesentliches Gärungsnebenprodukt und findet in den meisten Publikationen nur am Rande Erwähnung. Aus Japan sind Untersuchungen bekannt, die sich mit den Gärungsnebenprodukten in der Sake-Fermentation befassen und möglichst hohe Bildung von organischen Säuren, und somit auch der Bernsteinsäure, zum Ziel haben [11, 20, 21].

Eine andere Sichtweise auf diese organische Säure findet sich in der Literatur, welche sich mit der Herstellung von Alkohol als Energieträger befasst. Hier wird sie neben dem Glycerin und anderen Gärungsnebenprodukten als reiner Ausbeuteverlust angesehen [25, 26, 27].

Prozesstechnisch sind neben der Auswahl des Hefestammes mehrere in der Literatur beschriebene Einflussmöglichkeiten bekannt:

*Temperaturführung:* Die wissenschaftliche Meinung zu dem Einfluss der Temperatur während der Gärung auf die Bildung der Bernsteinsäure ist nicht einheitlich. Verschiedene Autoren beschreiben eine verstärkte Bildung von Bernsteinsäure während der Gärung bei höheren Temperaturen [6, 18, 19, 24, 28], andere können keinen Einfluss dieses Parameters feststellen [29, 30].

*Immobilisierung von Hefen:* Eindeutig scheint sich der Einfluss einer Immobilisierung von Hefe im Gärprozess auf die Bildung von Bernsteinsäure auszuwirken. In verschiedenen Literaturquellen wird darüber berichtet, dass dieses Verfahren zu erhöhter Bildung von Bernsteinsäure führt [31]. Eine genauere Betrachtung von Shindo und Mitarbeitern beschreibt einen veränderten Aminosäurehaushalt der Hefen durch die Immobilisierung [14].

*Substratzusammensetzung:* In ihrer sehr ausführlichen Betrachtung des Stoffwechsels der anaeroben Bildung von Bernsteinsäure durch *Saccharomyces cerevisiae* berichten Heerde und Radler von verschiedenen Einflüssen des Substrates auf die Bildung von Bernsteinsäure [12]. So beschreiben sie den schon von Pasteur [32] erwähnten Zusammenhang zwischen der Bildung von Bernsteinsäure und dem Glucosegehalt der Nährlösung. In ihren Versuchen mit einem Stamm der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* fanden sie eine lineare Abhängigkeit zwischen der Bildung von Bernsteinsäure und dem Glucosegehalt der Nährlösung bis zu einer Konzentration von 8% Glucose. Diese Linearität konnte unabhängig von der Stickstoffquelle festgestellt werden. Ab dieser Glucosekonzentration war in zwei von drei Ansätzen ein Plateau erreicht. Die Gesamtmenge der gebildeten Bernsteinsäure hing jedoch sehr stark von der Zusammensetzung der Stickstoffquelle ab. Stand Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle zur Verfügung, bildeten sich nur geringe Mengen an Bernsteinsäure. Höhere Konzentrationen konnten bei den Aminosäuren Prolin, Glutamin, Threonin und Aspartat festgestellt werden, wenn diese als einzige Stickstoffquelle vorlagen. Der höchste Gehalt an Bernsteinsäure fand sich jedoch, wenn Glutaminsäure als einzige Stickstoffquelle vorhanden war. Auch fanden die Autoren eine starke Bildung von Bernsteinsäure, wenn Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle zusammen mit  $\alpha$ -Ketoglutarat der gärenden Zelle zur Verfügung stand. Bei einem analog geführten

Versuch mit Äpfelsäure konnte ein ähnlicher Effekt festgestellt werden, wenn auch nicht in dem Maße. Bestätigen können diese Ergebnisse Albers und Mitarbeiter [33]. Sie stellten ebenfalls eine erhöhte Bildung von Bernsteinsäure in ihrer vergorenen Versuchslösung fest, wenn Glutamat als einzige Stickstoffquelle zur Verfügung stand. Im Vergleich dazu erzielten Versuche mit einer Mischung aller 20 Aminosäuren oder nur mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle sehr geringe Konzentrationen an Bernsteinsäure nach der Gärung. Die hier gefundenen Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren: Wie in mehreren Veröffentlichungen beschrieben [34, 35, 36] nimmt die Hefe zunächst eine Gruppe von bestimmten Aminosäuren aus dem Substrat auf. Zu dieser ersten Gruppe gehören alle oben genannten Bernsteinsäure-fördernden Aminosäuren und Ammoniumsulfat. Aminosäuren, welche nicht dieser Gruppe angehören, werden erst im späteren Verlauf der Gärung oder gar nicht aufgenommen. Aus dieser Stickstoffquelle synthetisiert die Hefe die für ihren Metabolismus notwendigen Aminosäuren. Als Abfallprodukt fallen desaminierte Kohlenstoffgerüste an. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist die Bernsteinsäure eines der möglichen Kohlenstoffgerüste, welches als Abfallprodukt aus der Zelle geschleust wird. Wird der Zelle jedoch eine Stickstoffquelle wie Ammoniumsulfat zur Verfügung gestellt, welche ebenfalls zur ersten Gruppe gehört, bei der aber kein Kohlenstoffgerüst als Abfallprodukt entstehen kann, ist eine verringerte Bildung von Bernsteinsäure festzustellen [12].

Die relative Zusammensetzung der freien Aminosäuren in Würze aus Gerstenmalz sind sehr ähnlich bzw. nahezu identisch [37]. Nach dem Reinheitsgebot stellt demnach eine Einflussnahme auf den Absolutwert des freien Aminostickstoffes die einzige Möglichkeit dar, technologisch einzugreifen.

*Konzentration in Rohstoffen:* Nach Püschner wird ungefähr ein Viertel der Bernsteinsäurekonzentration aus dem Gerstenmalz in das Bier eingebracht. Die Abweichung der wenigen Proben war sehr gering [6].

*SO<sub>2</sub>-Konzentration:* Die Zugabe von SO<sub>2</sub> zum Most bewirkt eine Abnahme der Bildung von Bernsteinsäure. Diese Abnahme ist stammabhängig [19]. Die in dieser Untersuchung zugegebenen Mengen überschreiten die deklarierungspflichtige Konzentration dieser Unverträglichkeitsreaktionen hervorrufenden Substanz von 10 mg SO<sub>2</sub>/l bei weitem.

*pH-Wert:* Shimazu und Watanabe stellten bei Probegärung von Most mit zwei verschiedenen Saccharomyces-Stämmen fest, dass ein geringerer pH-Wert während der Gärung zu einer geringeren Bildung von Bernsteinsäure führt [19].

*Vermehrung:* Bezüglich der Auswirkungen der Vermehrungsraten sind keine Literaturstellen bekannt. Da mit stärkerer Vermehrung von Hefen während der Gärung auch die Konzentration der aus dem Baustoffwechsel stammenden Gärungsnebenprodukte (höhere Alkohole) im Substrat steigt, ist anzunehmen, dass bei stärkerer Hefevermehrung ebenfalls höhere Konzentrationen von Bernsteinsäure zu erwarten sind.

*CO<sub>2</sub>-Konzentration:* Zu der Fragestellung, ob eine so genannte „Druckgärung“ (Gärführung bei höherer CO<sub>2</sub>-Konzentration im Substrat) einen Einfluss auf die Bildung von Bernsteinsäure besitzt, bestehen keine veröffentlichten Erkenntnisse. Da jedoch der Baustoffwechsel bei „Druckgärung“ gehemmt wird und somit auch die Produktion von höheren Alkoholen und anderen Gärungsnebenprodukten [38], liegt der Schluss nahe, dass dies auch für die Bernsteinsäure gilt [39].

*Belüftung:* Aus der Brauereitechnologie ist bekannt, dass die Versorgung der Hefe mit Luft vor, zu Beginn und während der Gärung einen Einfluss auf die Bildung von Gärungsnebenprodukten hat. So wird von stärkerer Freisetzung von höheren Alkoholen und verminderter Bildung von Estern bei

Belüftung während der Hauptgärung berichtet [40]. Aus der Produktion von Bioethanol ist bekannt, dass eine geringe Belüftung während der Hauptgärung zu einer signifikant verringerten Bildung von Bernsteinsäure führt [41]. Es wird von einer um 60% verminderten Bildung bei geringer Luftzufuhr berichtet. Somit kann die Variation der Belüftungsparameter eine interessante Möglichkeit darstellen, den Gehalt von Bernsteinsäure im Bier und anderen durch Fermentation hergestellten Getränken zu senken.

Zusammenfassung der Literatur im Bezug auf die Relevanz der einzelnen Parameter:

In der folgenden Tabelle 2 wird der Versuch unternommen, die genannten „Stellschrauben“ gegeneinander zu gewichten.

Tabelle 2: Mögliche Gewichtung von technologischen Einflussparametern bei der Biergärung zur Senkung der Konzentration von Bernsteinsäure im fertigen Bier – basierend auf vorangegangener Literaturrecherche			
Einflussparameter	++ großer Einfluss, + geringer Einfluss, 0 kein Einfluss	Anmerkung	Ein-schätzung beruht auf Studien mit Substrat Bierwürze
Hefestamm	++	Ausführliches Hefescreening ging dieser Untersuchung voraus	ja
Temperatur	+	Eine höhere Gärtemperatur führt zu höherem Gehalt an Bernsteinsäure	ja
Substrat (Stickstoffquelle)	++; +	Bestimmte Aminosäuren im Substrat begünstigen die Freisetzung von Bernsteinsäure während der Fermentation	nein
Konzentration vergärbare Extrakt	+	Mit 8g vergärbarem Extrakt/ 100ml scheint ein Maximum für die Bernsteinsäurebildung erreicht	nein
Erhöhung CO <sub>2</sub> Konzentration	+; 0	Einfluss analog anderer Gärungsnebenprodukte vermutet, keine Literaturstellen aus anderen Bereichen vorhanden	
pH-Wert	+; 0	Geringerer pH-Wert des Substrats führt zu geringerer Bildung von Bernsteinsäure	nein
Hefegabe	+; 0	Einfluss analog anderer Gärungsnebenprodukte vermutet, keine Literaturstellen aus anderen Bereichen vorhanden	
Belüftung	+	Mit erhöhter Sauerstoffverfügbarkeit geringere Bildung	nein
Immobilisierung der Hefe	+	Die Immobilisierung erhöht den Gehalt an Bernsteinsäure im fertigen Bier	Zum Teil
Zugabe von SO <sub>2</sub> zum Substrat	+; 0	Je höher die SO <sub>2</sub> -Zugabe zum Most, desto geringere Bernsteinbildung während der Gärung	nein

## Untersuchung und Zielstellung

Die Zielstellung war es, die vielversprechendsten technologischen Parameter zur Senkung des Gehaltes an Bernsteinsäure in Bier zu finden.

*Vorüberlegungen zur Umsetzbarkeit in der Wirtschaft bei Auswahl der zu testenden Parameter:*

- **Die Immobilisierung** der Hefe wird in der Literatur eindeutig als Promotor der Bernsteinsäurebildung während der Gärung beschrieben. Da dies konträr zur Zielstellung ist, wurde auf eine Betrachtung dieses Parameters verzichtet.
- **Die Zugabe von SO<sub>2</sub>** ins Gärsubstrat ist ein Prozessparameter der Weinfermentation. Dieser wird angewandt, um den Selektionsprozess aus der natürlich vorhandenen Mikroflora zu lenken. SO<sub>2</sub> ist eine Zutat, welche Unverträglichkeitsreaktionen hervorrufen kann. Daher sind Konzentrationen über 10 mg/l im Bier deklarierungspflichtig. Konzentrationen, welche in der zitierten Untersuchung angewandt wurden, lagen weit über dieser Konzentration. Aus diesem Grund wurde auf eine Betrachtung dieses Parameters verzichtet.

*Vorüberlegung zur Versuchsaufstellung der zu testenden Parameter:*

- Aus einer vorangegangenen Untersuchung standen zwei Hefestämme zur Verfügung, wovon der eine übliche und der andere eine vergleichsweise niedrige Bernsteinsäurekonzentration im Substrat hinterließ.
- Da nahezu alle genannten Parameter Bezug auf die Gärung nehmen ist die im Institut vorhandene Anlagentechnik von entscheidender Bedeutung. An der VLB gibt es eine EBC-Gärsäulenbatterie mit 8 Fermentationsröhren, welche mit maximal 2 verschiedenen Gärtemperaturen gefahren werden kann. Diese diente als Versuchsstand. Darüber hinaus gibt es zylindro-konische Gärgefäße mit einem Volumen von 40 Litern.

*Versuchsplanung:*

Aus der vorgenannten Tabelle und den geschilderten Vorüberlegungen ergab sich, die fünf Parameter Belüftung, Temperatur, High Gravity, pH-Wert und Stickstoffquelle zu untersuchen. Eine Betrachtung der Hefevermehrung erfolgte zusätzlich bei allen Versuchen. Der Einfluss einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration wurde in einer nachgelagerten Versuchsreihe in 40 Liter zylindro-konischen Gärtanks untersucht, da eine Druckbeaufschlagung bei den Glas-Gärsäulen nicht möglich ist. Die Versuchsreihe in 40-Liter-Maßstab diente der Vertiefung der vorgegangenen Versuchsreihe, zudem wurde eine Kombination der Parameter getestet.

*Material und Methoden:*

Enzymtests für Bernsteinsäure: Boehringer Mannheim  
Analytik von Extrakt, pH, Zellzahl nach MEBAK

Probenaufbereitung für den Enzymtest: Im Hinblick auf die enzymatische Quantifizierung der Bernsteinsäure mussten die entstandenen endvergorenen Würzen für weitergehende Untersuchungen aufbereitet werden. Dazu wurden die endvergorenen Würzen in Zentrifugenröhrchen (Fa. VWR, Volumen=50 ml) überführt und mittels einer Laborzentrifuge (Fa. Heraeus) für 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abdekantiert und bis zum Zeitpunkt weitergehender Untersuchungen eingefroren. Das verbliebene Sediment wurde verworfen.

Gärgefäße: Erlenmeyerkolben (500ml) und EBC Gärsäulen (2000 ml)

Fermentationssubstrat: Die Würze wurde aus Malzextrakt Bavarian Pilsener (Fa. Weyermann) hergestellt. Die Hopfenbitter wurde durch Zugabe einer 30%igen Iso- $\alpha$ -Säurelösung auf 20 BE eingestellt.

#### *Gärversuch in EBC Gärsäulen:*

Die hergestellte der Würze wurde vor Befüllen der Säulen bei 80 °C pasteurisiert und anschließend auf 20 °C temperiert.

Beim Anstellen der pasteurisierten Würze wurde jeweils 1 L der Lösung in den zuvor gereinigten und mittels Kryostaten auf die gewünschte Gärtemperatur von 15 °Celsius eingestellten EBC-Gärrohren vorgelegt. Daraufhin erfolgte die Hefegabe mit einer Anstellmenge von jeweils  $10 \cdot 10^6$  Zellen/ mL. Zur Gewährleistung einer ausreichenden, uniformen Belüftung der Hefe und um den gewünschten 2L-Maßstab einzustellen, wurde jeweils ein weiterer Liter der Würze „draufgelassen“.

Hefe stand aus vorangegangenen Führungen als „dickbreiige“ Hefe in ausreichender Menge zur Verfügung.

Für die Bestimmung der Gärverläufe wurden, wenn vorgesehen, täglich unter Verwendung eines sterilen Probennehmers jeweils 50 ml der Würze aus der in den EBC-Gärrohren vorliegenden Flüssigkeitssäule entnommen. Die Proben wurden auf ihre Hefezellzahl, pH-Wert und scheinbaren Extrakt untersucht. Das entstandene Bier wurde bei Erreichen des Endvergärungsgrades, wie oben beschrieben, für die weitere Analytik aufbereitet.

Die entsprechenden Versuchsaufbauten sind im Ergebnisteil beschrieben.

#### *Gärversuch in 40-Liter-Zylindrokonzischen-Gärtanks:*

Analog der Versuche in EBC-Gärsäulen wurden ebenfalls mehrere Versuchsanstellungen parallel in größeren Gärgefäßen angesetzt. Das Nettofüllvolumen dieser Reaktoren betrug 40 Liter. Die Würze wurde im VLB-Standardverfahren hergestellt. Es handelte sich dabei um eine Vollwürze. Zur Erzielung höherer Stammwürzegehalte wurde Malzextrakt zugesetzt.

Die entsprechenden Versuchsaufbauten sind im Ergebnisteil beschrieben.

## Versuchsaufbau und Ergebnisse

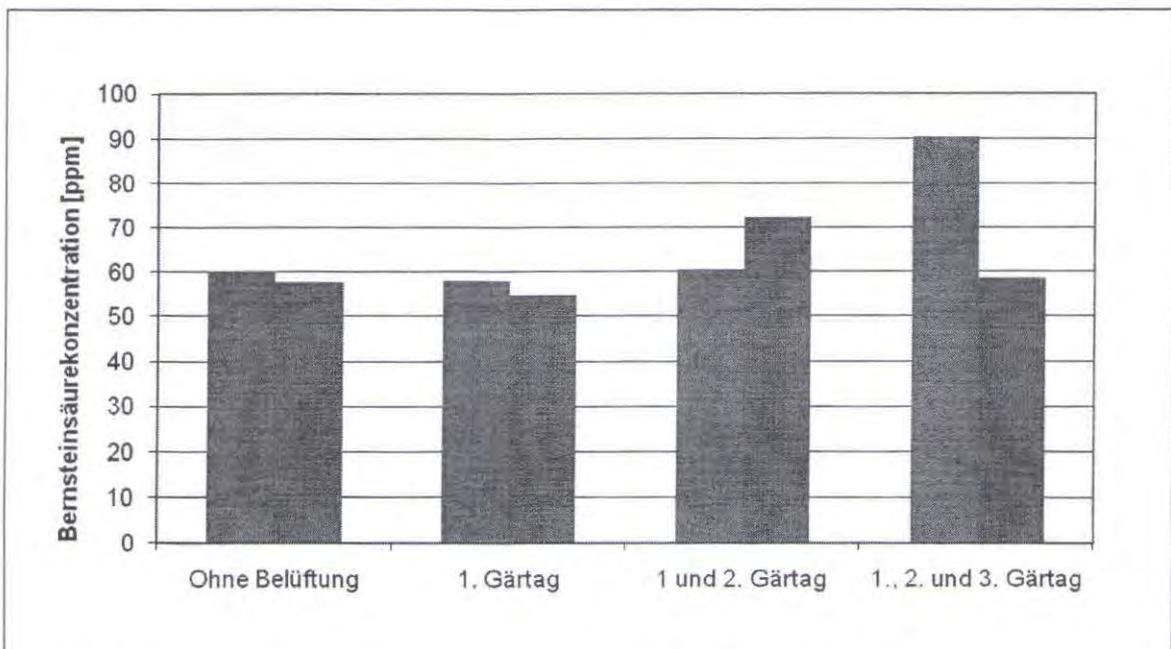
### *Versuchsaufbau Fermentationserie 1 in EBC Gärsäulen: Vergleich unterschiedlicher Belüftungsparameter*

Angewandte Parameter:

- Verwendete Hefe: Teststamm 31 Erntehefe
- Anstellkonzentration 15 Millionen Zellen/ml
- Isotherme Fermentation bei 15°C
- Der Stammwürzegehalt der Ausgangswürzen entsprach dem eines Vollbieres

**Tabelle 3: Versuchsaufbau Vergleich unterschiedlicher Belüftungsparameter**

Würze, 100% Malz aus Extrakt	Ohne zusätzliche Belüftung
	Zusätzliche Belüftung 1. Gärtag für 10 Minuten
	Zusätzliche Belüftung 1. und 2. Gärtag für jeweils 10 Minuten
	Zusätzliche Belüftung 1., 2. und 3. Gärtag für jeweils 10 Minuten
Eine Belüftung mit den angesetzten Parametern von 10 Minuten führte zu einem Sauerstoffeintrag von jeweils ca. 1 ppm	



**Abbildung 3: Vergleich verschiedener Belüftungsintensitäten und die resultierende Bernsteinsäurekonzentration. Einzeldarstellung der Ergebnisse der Doppelbestimmung. Beobachtungen während der Gärung: Extrakt- und Hefezellzahlverläufe während der Gärung zeigten nur geringe Abweichungen .**

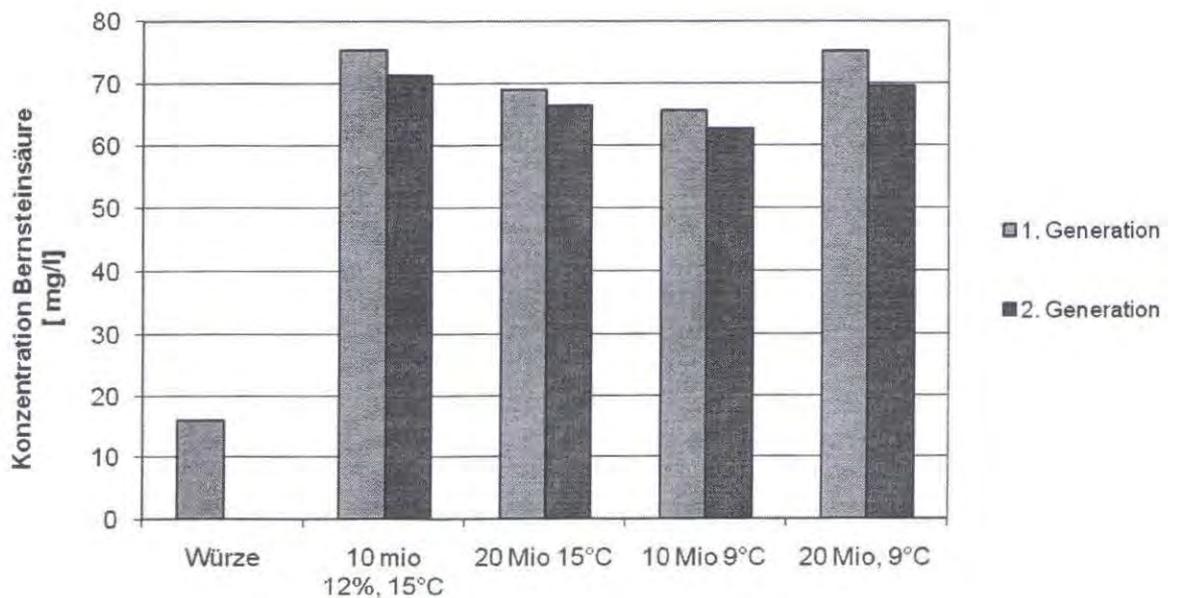
**Versuchsaufbau Fermentationserie 2 in EBC Gärssäulen: Vergleich unterschiedlicher Temperaturen bei zusätzlich unterschiedlicher Anstellrate**

Angewandte Parameter:

- Verwendete Hefe: Teststamm 31 Erntehefe
- Der Stammwürzegehalt der Ausgangswürzen entsprach dem eines Vollbieres

**Tabelle 4: Versuchsaufbau Vergleich unterschiedlicher Anstellraten und Gärtemperaturen**

	9°C Gärtemperatur, isotherm	15°C Gärtemperatur, isotherm
Konzentration Hefe beim Anstellen	10 Millionen Zellen/ml	10 Millionen Zellen/ml
	20 Millionen Zellen/ml	20 Millionen Zellen/ml

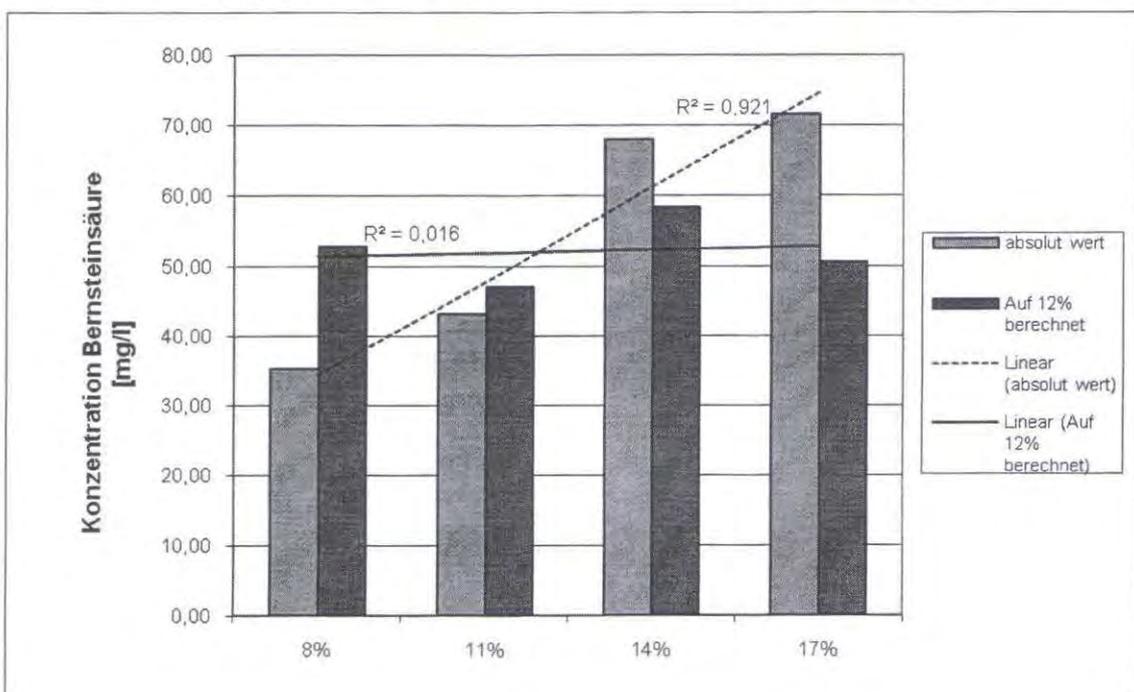


**Abbildung 4: Bernsteinsäurekonzentration im Bier bei unterschiedlicher Anstellrate und Gärtemperatur: Vergleich über zwei Führungen.** Beobachtungen während der Gärung: Die Extraktabnahme und die Hefezellzahlzuwächse während der Gärung zeigen zu erwartende Verläufe: Doppelte Hefegabe und erhöhte Gärtemperatur ergeben eine schnellere Extraktabnahme.

### ***Versuchsaufbau Fermentationserie 3 in EBC Gärsäulen: Vergleich unterschiedlicher Stammwürzegehalte***

Angewandte Parameter:

- Verwendete Hefe: Teststamm 31, Erntehefe
- Anstellrate: 15 Millionen Zellen pro ml
- Isotherme Fermentation bei 15°C
- Stammwürzegehalte der Ausgangswürzen variierten jeweils um 3g Extrakt/100ml



**Abbildung 5: Bernsteinsäurekonzentration im Bier bei verschiedenen Stammwürzekonzentrationen.**

**Ergebnisse Mittelwert aus Parallelfementationen.** Beobachtungen während der Gärung: Die Zuwachsrates an Hefe steigt mit dem Stammwürzegehalt. Die Gärzeit verlängert sich entsprechend mit höherem Stammwürzegehalt.

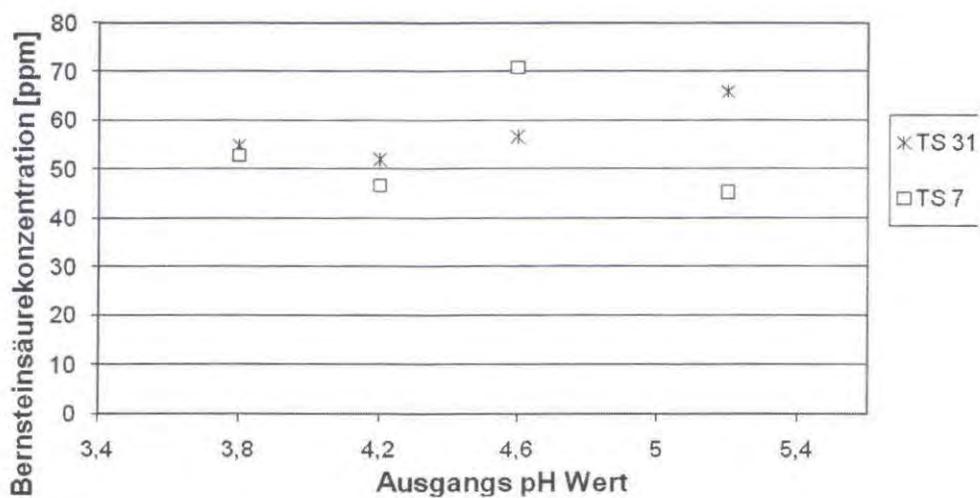
**Versuchsaufbau Fermentationserie 4 in EBC Gärsäulen: Vergleich unterschiedlicher pH-Werte der Würze**

Angewandte Parameter:

- Verwendete Hefe: Teststämme 31 und 7
- Anstellrate: 10 Millionen Zellen pro ml
- Isotherme Fermentation bei 15°C
- Der Stammwürzegehalt der Ausgangswürzen entsprach dem eines Vollbieres

**Tabelle 5. Versuchsaufbau zum Vergleich unterschiedlicher pH-Werte**

Substrat, Würze mit Zugabe von	Ausgangs pH Wert	Hefe TS 31	Hefe TS 7
15 ml/l 9%iger Milchsäure	3,8	X	X
6,5 ml/l 9%iger Milchsäure	4,2	X	X
2,5 ml/l 9%iger Milchsäure	4,6	X	X
Ohne Zusatz	5,2	X	X



**Abbildung 6: Bernsteinsäurekonzentration in Bier bei unterschiedlichem pH-Wert der Würze. Vergleich von 2 verschiedenen Hefestämmen. Angaben Mittelwerte aus jeweils zwei Parallelfertigungen. Beobachtungen während der Gärung:** Die Zuwachsrate der jeweiligen Hefe TS 7 war bei allen Substraten nahezu identisch war nahezu identisch. Ein niedrigerer pH Wert scheint beim Teststamm 31 einen Zellzuwachs zu begünstigen. Die Extraktabnahme zeigt kaum Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Substraten.

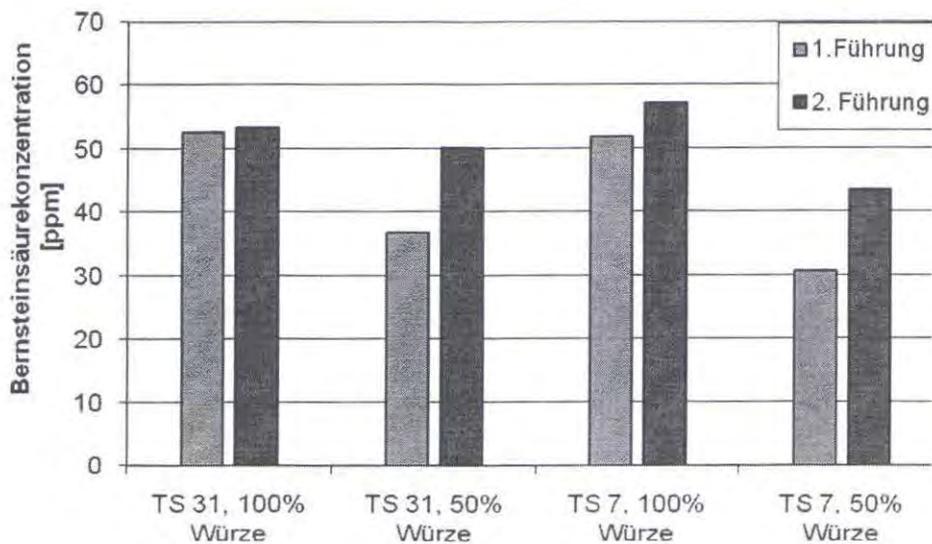
**Versuchsaufbau Fermentationserie 5 in EBC Gärsäulen: Vergleich Substrat mit gezielt veränderter Stickstoffquelle**

Angewandte Parameter:

- Verwendete Hefe: Teststämme 31 und 7
- Anstellrate: 15 Millionen Zellen pro ml
- Isotherme Fermentation bei 15°C

**Tabelle 6: Versuchsaufbau Substratveränderung**

	Hefe TS 31	Hefe TS 7
Substrat	Würze 100% Malz: hergestellt aus Extrakt, 12°P	
	50% Würze 12°P: 50% Maltose-Lösung 12°P mit 200mg FAN/l aus Ammoniumsulfat	



**Abbildung 7: Vergleich verschiedener Gärsubstrate und ihre Auswirkung auf die Bildung von Bernsteinsäure während der Gärung. Beobachtungen während der Gärung:** Die Extraktabnahme verlief für beide Hefen in der ersten Generation verlangsamt für das zu 50% künstliche Substrat. In der zweiten Generation war dieser Unterschied kaum ausgeprägt. Die Zellzahlzunahme ist bei beiden Hefen in der ersten Generation leicht verringert im zu 50% künstlichen Substrat. In der zweiten Generation zeigt sich dieser Unterschied nur für den Teststamm 7.

**Versuchsaufbau Gärversuche in 40 Liter zylindro-konischen Gärgefäßen**

In weiteren Ansätzen wurden die Auswirkungen der Variation verschiedener Parameter, wie in den vorangegangenen Versuchsreihen dargestellt, untereinander gewichtet. Der Ansatz der pH-Wert Senkung des Ausgangssubstrates wurde auf Grund der in der ersten Versuchsanstellung bereits sehr breit aufgestellten pH - Ausgangswerte nicht weiterverfolgt. Eine Betrachtung einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration wurde erstmalig durchgeführt.

Bei der Kombination der weiteren Parameter wurde darauf geachtet, dass in der ersten Versuchsreihe nur geringfügig variierte Parameter, die keine Auswirkungen zeigten, stärker variiert oder anders umgesetzt wurden. Gleichzeitig wurde eine tiefe Gärtemperatur gewählt, um der Einschätzung aus der Literatur Folge zu leisten, dass diese eine geringe Bernsteinsäurekonzentration im Bier zur Folge hat.

Im Bezug auf die Zugabe einer künstlichen Stickstoffquelle ohne Kohlenstoffgerüst (Ammoniumsulfat) wurde der Versuch dahingehend variiert, dass lediglich das Stickstoffangebot erhöht wurde, aber keine Veränderung der Kohlenhydratzusammensetzung erfolgte.

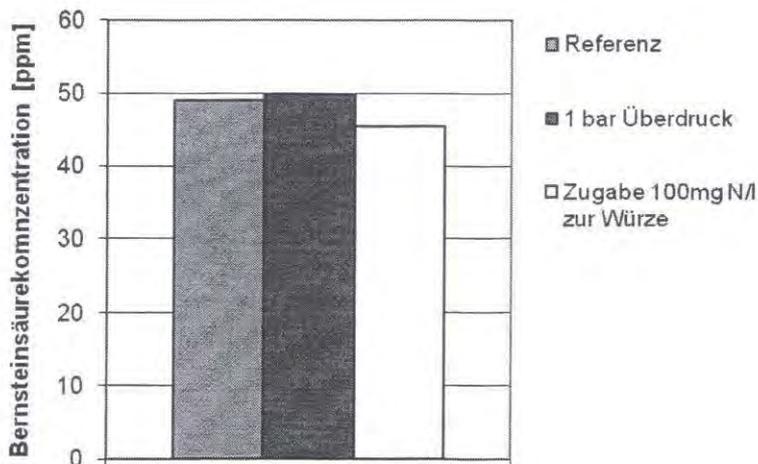
**Tabelle 7: Übersicht der variierten Versuchsparameter in Fermentationen im 40-Liter-Maßstab**

Fermentationen im 40 Liter Maßstab: Gärtemperatur isotherm 9 °C	Hefe TS 31						Hefe TS 7			
	Stammwürzegehalt [g Extrakt/100ml]	12	12	12	15	15	15	12	15	15
Überdruck [bar]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Anstellhefekonzentration [Millionen Zellen/ml]	7	7	7	7	7	30	7	7	7	30
Sauerstoffzufuhr Ja/Nein: Belüftung am 1. und 2. Gärtag für je 10 min → Sauerstoffzufuhr: ca. 1 mg/l je Belüftung	N	N	N	N	J	J	N	N	J	J
Ammoniumsulfatgabe 100 mg/l	N	N	J	J	J	J	N	J	J	J

**Ergebnisse Gärversuche in 40 Liter zylindro-konischen Gärgefäßen: Vergleich Druckgärung und Zugabe von Ammoniumsulfat**

**Tabelle 8: Versuchsaufbau Vergleich Druckgärung und Zugabe von Ammoniumsulfat**

Fermentationen im 40 Liter Maßstab	Hefe TS 31		
Stammwürzegehalt °P	12	12	12
Überdruck [bar]	0	1	0
Anstellhefekonzentration in Millionen Zellen/ml	7	7	7
Sauerstoffzufuhr Ja/Nein: Belüftung am 1. und 2. Gärtag für je 10 min → Sauerstoffzufuhr: ca. 1 mg/Liter je Belüftung	N	N	N
Ammoniumsulfatgabe 100 mg/l	N	N	J

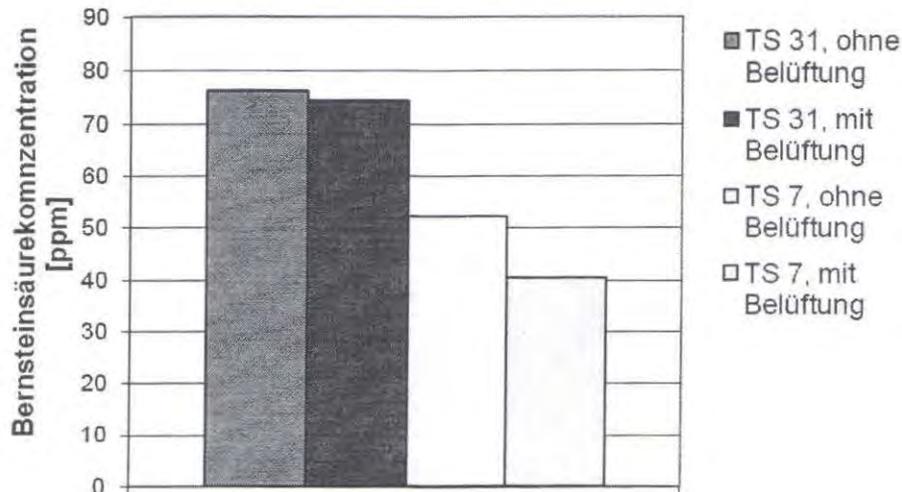


**Abbildung 8: Vergleich Zugabe von 100 mg Ammoniumsulfat zur Würze mit Referenzbier (einmal unter 1 bar Ü Druck und einmal unter atmosphärischem Druck vergoren). Beobachtungen während der Gärung:** Die Extraktabnahme verlief bei atmosphärischen Druck parallel, das Bier vergoren unter 1 bar Ü zeigte einen verzögerten Gärverlauf. Die Zellzahlzunahme war für die Ansätze ohne Überdruck ähnlich. Ein gehemmtes Wachstum konnte für den Ansatz unter Druck beobachtet werden (ca. 30 % reduziert).

**Ergebnisse Gärversuche in 40 Liter zylindro-konischen Gärgefäßen: Vergleich verschiedener Belüftungsintensitäten**

**Tabelle 9: Versuchsaufbau Vergleich Belüftung**

Fermentationen im 40 Liter Maßstab	Teststamm 31		Teststamm 7	
	Stammwürzegehalt [g Extrakt/100ml]	15	15	15
Überdruck [bar]	0	0	0	0
Anstellhefekonzentration in Millionen Zellen/ml	7	7	7	7
Sauerstoffzufuhr Ja/Nein: Belüftung am 1. und 2. Gärtag für je 10 min → Sauerstoffzufuhr: ca. 1 mg/Liter je Belüftung	N	J	N	J
Ammoniumsulfatgabe 100 mg/l	J	J	J	J

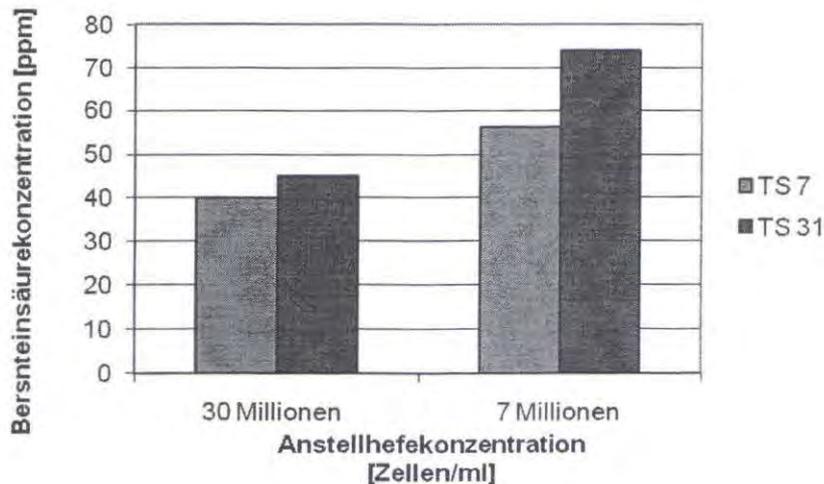


**Abbildung 9: Vergleich der Bernsteinsäurekonzentration im fertigen Bier vergoren mit unterschiedlichen Teststämmen (TS) mit und ohne zusätzlicher Belüftung. Beobachtungen im Gärverlauf:** Für beide Hefen bewirkte die zusätzliche Belüftung einen leicht beschleunigten Extraktabbau. Die Zellzahlzunahme war je Hefe als ähnlich zu betrachten. Gärverläufe während der 2. Führung waren sehr unausgeglichen, so dass Biere aus diesen Fermentationen nicht miteinander vergleichbar waren.

**Ergebnisse Gärversuche in 40 Liter zylindro-konischen Gärgefäßen: Vergleich unterschiedlicher Anstellraten**

**Tabelle 10: Versuchsaufbau Vergleich unterschiedlicher Anstellraten**

Fermentationen im 40 Liter Maßstab	Teststamm 31		Teststamm 7	
	Stammwürzegehalt [g Extrakt/100ml]	15	15	15
Überdruck [bar]	0	0	0	0
Anstellhefekonzentration in Millionen Zellen/ml	7	30	7	30
Sauerstoffzufuhr Ja/Nein: Belüftung am 1. und 2. Gärtag für je 10 min → Sauerstoffzufuhr: ca. 1 mg/Liter je Belüftung	J	J	J	J
Ammoniumsulfatgabe 100 mg/l	J	J	J	J

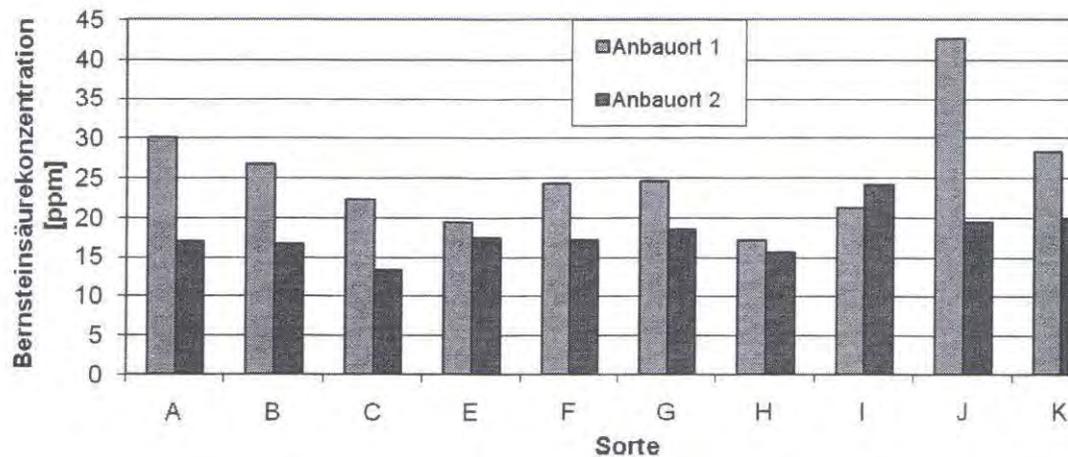


**Abbildung 10: Bernsteinsäurekonzentration im fertigen Bier: Vergleich zweier Hefestämme und unterschiedlicher Anstellhefekonzentrationen. Beobachtungen während der Gärung:** Die Hefezuwachsrate für Teststamm 31 war für beide Ansätze mit ca. 25-30 Millionen Zellen/ml ähnlich. Die Hefezuwachsrate für Teststamm 7 ist jedoch höchst unterschiedlich. Sowohl bei geringer als auch hoher Hefegabe wird eine nahezu identische Maximalkonzentration von 50 Millionen Zellen/ml erreicht. Der Extraktabbau verläuft für beide Hefen bei höherer Anstellhefekonzentration beschleunigt. Gärverläufe während der 2. Führung waren sehr unausgeglichen, so dass Biere aus diesen Fermentationen nicht miteinander vergleichbar waren.

**Zusatzversuch: Vergleich von Kongresswürzen aus Malzen zweier unterschiedlicher Anbaugebiete**

**Tabelle 11: Versuchsaufbau Vergleich Kongresswürzen aus Malzen verschiedener Gerstensorten und zweier Anbaugebiete**

Sorte	Anbauggebiet 1	Anbauggebiet 2
A - J	Durchführung einer Kleinmälzung Extraktion mittels Kongressmaischverfahren [MEBAK] Bestimmung der Konzentration der Bernsteinsäure in der Kongresswürze	



**Abbildung 11: Bernsteinsäurekonzentration in Kongresswürzen aus Malzen verschiedener Gerstensorten und zweier Anbauorte. Konzentrationen auf einen Stammwürzegehalt von 12 g/100 ml berechnet. Anbauort 1 zeigt eine größere Streuung in den Ergebnissen als Anbauort 2.**

### **Zusatzversuch: Vergleich von Bieren aus industrieller Bierproduktion, aber unterschiedlichen Hefegenerationen**

Ziel:

Es sollte herausgefunden werden, ob es einen Unterschied gibt zwischen Bier aus:

- der Propagation der Hefe
- Bier aus unterschiedlichen Führungen

Durchführung:

- 4 Brauereien wurden gebeten Bier, aus ihrem Betrieb zu entnehmen und zur Analyse einzuschicken. Es handelte sich dabei durchweg um untergärige Fermentationen.
- Bier aus der Propagation wurde vor dem „Drauffassen“ separat zu Ende vergoren.

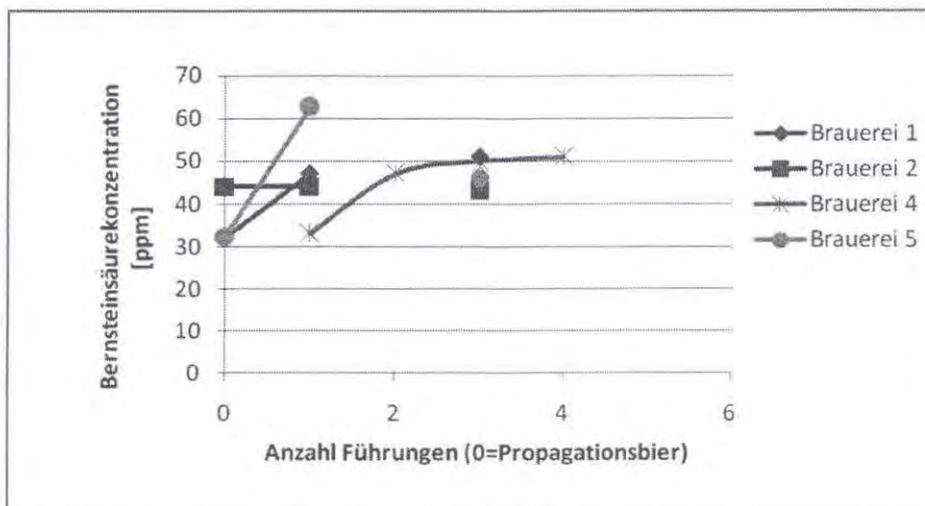


Abbildung 12: Bernsteinsäurekonzentration im Verlauf über verschiedene Führungen. Es zeigt sich tendenziell eine geringere Bernsteinsäurekonzentration bei Bier aus der Propagation.

## Auswertung und Diskussion

*Im folgenden Abschnitt sollen die im Zuge der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der technologischen Einflussmöglichkeiten auf die Bildung von Bernsteinsäure eingehend diskutiert werden und diese auf die Möglichkeit der Produktion eines Bieres mit geringer Konzentration an Bernsteinsäure gewichtet werden. Dabei werden zunächst die einzelnen untersuchten Parameter diskutiert und anschließend ein Vergleich mit kommerziell erhältlichen Biersorten vorgenommen.*

*Belüftung:* Die Versuche mit veränderter Sauerstoffverfügbarkeit ergeben ein unterschiedliches Bild. Wie in Abbildung 3 dargestellt, ergibt sich eine zum Teil erhöhte Konzentration bei zusätzlicher Belüftung. Bei den in Abbildung 9 dargestellten Ergebnissen sind diese tendenziell eher geringer bei erhöhter Sauerstoffverfügbarkeit im Substrat. Ergebnisse aus der industriellen Hefeherführung (Abbildung 12) zeigen bei Bieren aus der Propagation eine leicht verringerte Bernsteinsäurekonzentration. Alles in Allem scheint ein Einfluss durch die Belüftung vorzuliegen, welcher aber mit der hier angewandten Versuchsanstellung nicht eindeutig gefasst werden konnte.

*Hefegabe:* Ein Vergleich der in Abbildung 4 und Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse mit unterschiedlicher Hefegabe zeigt, dass bei starker Variation dieses Parameters ein Lenkung der Bernsteinsäureproduktion durch die Hefe möglich ist. Zu beachten ist hier, dass die in Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse in Versuchsreihen mit zusätzlicher Belüftung erzielt wurden. Daher ist es möglich, dass erst die Kombination dieser Parameter die niedrigen Werte bei hoher Hefegabe ermöglichte. Geringe Veränderungen der Hefegabe scheinen keine Auswirkungen zu haben.

*Temperatur:* Die verschiedenen Versuche mit unterschiedlicher Gärtemperatur zeigten keine Wirkung auf die absoluten Bernsteinsäurekonzentrationen (Abbildung 4). Damit können die in der Literatur genannten Erkenntnisse, dass eine geringere Fermentationstemperatur geringere Bildung von Bernsteinsäure hervorruft nicht gestützt werden.

*Extrakt:* In der Literatur wurde eine mögliche maximale Bildung von Bernsteinsäure für vergärbare Substrat von 8 g/100ml beschrieben. Folglich sollte ab einem Stammwürzegehalt von über 12 % (Annahme 65 % Endvergärungsgrad) keine Zunahme der Bernsteinsäurekonzentrationen mehr erfolgen und durch eine Rückverdünnung dieser Biere auf 12 % Stammwürze sollten niedrigere Bernsteinsäuregehalte erzielbar sein. Diese beschriebene maximale Konzentration konnte für das Substrat Bierwürze nicht bestätigt werden (Abbildung 5). Damit scheint dieser Parameter nicht geeignet für die Herstellung von Bieren mit niedriger Konzentration dieser org. Säure.

*Stickstoffquelle:* Eine Variation der Stickstoffquelle wurde mit zwei verschiedenen Versuchsanstellungen getestet. Diesen Versuchen lag folgende Überlegung zu Grunde: Wie in mehreren Veröffentlichungen beschrieben [34; 35; 36] nimmt die Hefe zunächst eine Gruppe von bestimmten Aminosäuren aus dem Substrat auf. Zu dieser ersten Gruppe gehören alle oben genannten Bernsteinsäure-fördernden Aminosäuren und Ammoniumsulfat. Aminosäuren, welche nicht dieser Gruppe angehören, werden erst im späteren Verlauf der Gärung oder gar nicht aufgenommen. Aus dieser Stickstoffquelle synthetisiert die Hefe die für ihren Metabolismus notwendigen Aminosäuren. Als Abfallprodukt fallen desaminierte Kohlenstoffgerüste an. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist die Bernsteinsäure eines der möglichen Kohlenstoffgerüste welches als Abfallprodukt aus der Zelle geschleust wird. Wird der Zelle jedoch eine Stickstoffquelle wie Ammoniumsulfat zur Verfügung gestellt, welche ebenfalls zur ersten Gruppe gehört, bei der aber kein Kohlenstoffgerüst als Abfallprodukt entstehen kann, ist eine verringerte Bildung von Bernsteinsäure festzustellen [12]. Aus diesem Grunde wurde die Zugabe von Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle getestet. Abbildung 7 und

Abbildung 8 geben die Ergebnisse wieder. Es zeigt sich, dass bei gleichzeitiger Absenkung des freien Aminostickstoffes (FAN) – erzielt durch Teilersatz des Würzeextraktes durch Maltosesirup – eine geringere Bildung der Bernsteinsäure mit beiden Hefestämmen erreicht werden kann (Abbildung 7). Es ist jedoch anzumerken, dass auch das Wachstum beeinflusst wird. In einer zweiten Generation scheint sich die Hefe schließlich an die neuen Bedingungen gewöhnt zu haben, zeigt normales Wachstum und normale Bernsteinsäurebildungsraten – kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Substraten. Die einfache Zugabe von Ammoniumsulfat in der hier angewandten Dosis zeigt keine Wirkung (Abbildung 8). Es bleibt festzuhalten, dass in gewissem Maße eine Einflussnahme möglich erscheint, diese jedoch durch Hefeadaptierung wieder wett gemacht wird.

*pH:* Die Versuchsanstellung mit einer weiten Bandbreite an Würze pH-Werten brachte zum Vorschein, dass der pH-Wert der Würze keinen Einfluss auf die Bildung von Bernsteinsäure hat (Abbildung 6).

*Druck:* Die Anwendung von Druck und damit erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration im Substrat zeigt den bekannten Einfluss auf die Hefevermehrung, dies hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Bildung von Bernsteinsäure während der Gärung.

*Ausgangskonzentration im Substrat:* Da bereits 10 bis 15 mg Bernsteinsäure/Liter in der Bierwürze vorliegen, sollte auch der Einfluss des Rohstoffes betrachtet werden. Die in Abbildung 11 wiedergegebenen Konzentrationen in Kongresswürzen aus Malzen verschiedener Gerstensorten und zweier Anbaugebiete zeigen, dass im Besonderen die Herkunft der Gerste einen Einfluss zu haben scheint. Es zeigt sich aber auch, dass eine Mindestkonzentration von 15 mg/Liter nicht unterschritten wird.

### **Zusammenfassung:**

Das Gesamtergebnis fasst Tabelle 12 zusammen. Im Vergleich mit **Tabelle 2** wird ersichtlich, dass dem Brauer nun ein sehr guter Überblick über die technologischen Möglichkeiten zur Produktion eines Bieres mit verhältnismäßig niedriger Bernsteinsäurekonzentration vorliegt. Viele vorher nur in anderen Fermentationssubstraten getestete Parameter können nun auch für die Bierwürzefermentation abgeschätzt werden.

Die vielversprechenden Stellschrauben zur Produktion eines Bieres mit verhältnismäßig geringer Bernsteinsäurekonzentration sind demnach die richtige Auswahl des Hefestammes und eine hohe Anstellhefekonzentration. Weitere Möglichkeiten können in der Belüftung und der Zusammensetzung der Stickstoffquellen des Substrates gesehen werden. Letztere bedürfen jedoch noch genauerer Betrachtung.

Um die hier durchgeführten Versuche zu gewichten, soll eine Übersicht von Konzentrationen aus kommerziell erhältlichen Bieren den Versuchsergebnissen gegenübergestellt werden (Abbildung 13 und Abbildung 14). Sowohl bei den kommerziell erhältlichen Bieren, als auch den Versuchsbieren ergibt sich ein ähnliches Bild: Es gibt eine Basiskonzentration von ca. 35 mg Bernsteinsäure/Liter, welche in allen Bieren zu finden ist. Es scheint nur schwer möglich, mit den hier in dieser Untersuchung angewandten Parametern diese Basiskonzentration zu unterschreiten.

<b>Tabelle 12: Mögliche Gewichtung von technologischen Einflussparametern bei der Biergärung zur Senkung der Konzentration von Bernsteinsäure im fertigen Bier – fettgedruckt: basierend auf dieser Untersuchung</b>			
Einflussparameter	++ großer Einfluss, + geringer Einfluss, 0 kein Einfluss	Anmerkung	Ein-schätzung beruht auf Studien mit Substrat Bierwürze
Hefestamm	++	Ausführliches Hefescreening ging dieser Untersuchung voraus	ja
Temperatur	0	Ein Vergleich der beiden Gärtemperaturen 9 und 15°C zeigte keinen Unterschied zwischen beiden Temperaturen	ja
Substrat (Stickstoffquellen)	+	Die Zugabe von Ammoniumsulfat als eine alternative Stickstoffquelle zeigt einen Weg auf, dass bei Verringerung von Bernsteinsäure-erhöhenden Aminosäuren eine Senkung möglich ist.  Weitere Betrachtungen notwendig!	ja
Konzentration vergärbaren Extrakt	0	Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang, ein maximales Plateau konnte bis zu 17 °P Stammwürzegehalt nicht beobachtet werden	ja
Erhöhung CO <sub>2</sub> - Konzentration	0	In einer Versuchsgärung wurde kein Einfluss beobachtet	ja
pH-Wert	0	Geringerer pH-Wert des Substrats, führt zu geringerer Bildung von Bernsteinsäure	ja
Hefegabe	+	Eine stark erhöhte Hefegabe führt zu geringerer Bildung von Bernsteinsäure	ja
Belüftung	+	Erhöhte Hefegabe in Kombination mit zusätzlicher Belüftung scheint zu geringer Bildung von Bernsteinsäure zu führen. Ein anderer Versuchsaufbau zeigt keinen Einfluss.  Weitere Betrachtungen notwendig!	ja
Propagation/ Hefevermehrung	+; 0	Bier aus industrieller Propagation zeigt einen geringeren Bernsteinsäuregehalt, als Bier aus Gärungen mit Erntehefe.	ja
Immobilisierung der Hefe	+	Die Immobilisierung erhöht den Gehalt an Bernsteinsäure im fertigen Bier.	Zum Teil
Zugabe von SO <sub>2</sub> zum Substrat	+; 0	Je höher die SO <sub>2</sub> Zugabe zum Most desto geringere Bernsteinbildung während der Gärung	nein

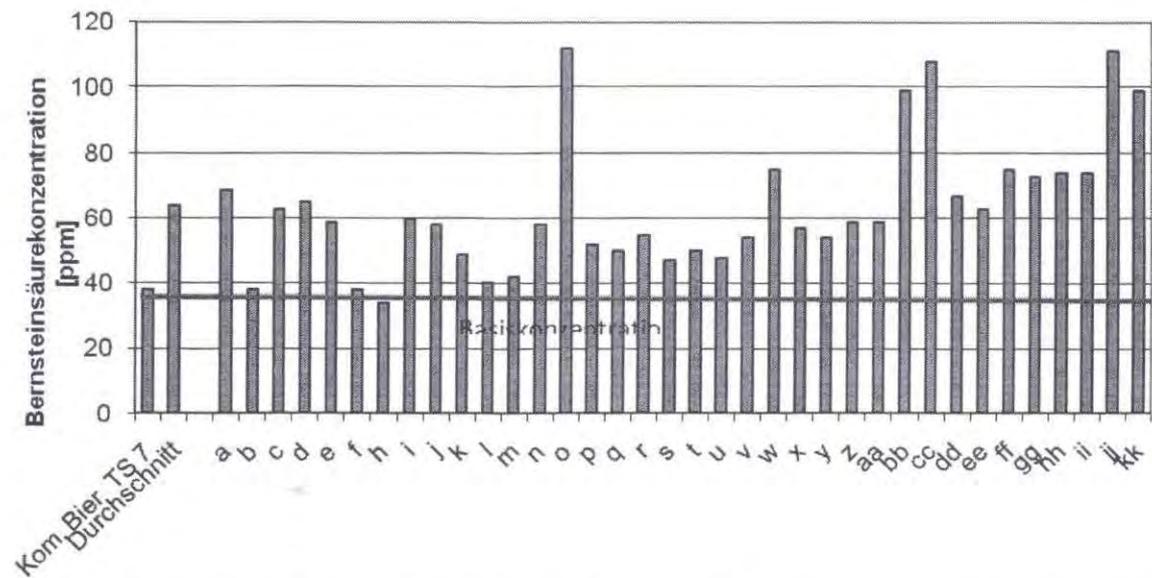


Abbildung 13: Vergleich Bernsteinsäuregehalt eines kommerziellen Bieres vergoren mit Teststamm 7 mit einem Marktdurchschnitt der Bier a – kk. Bier vergoren mit Teststamm 7 liegt auf dem niedrigsten im Markt zu findenden Niveau an Bernsteinsäurekonzentration im Bier.

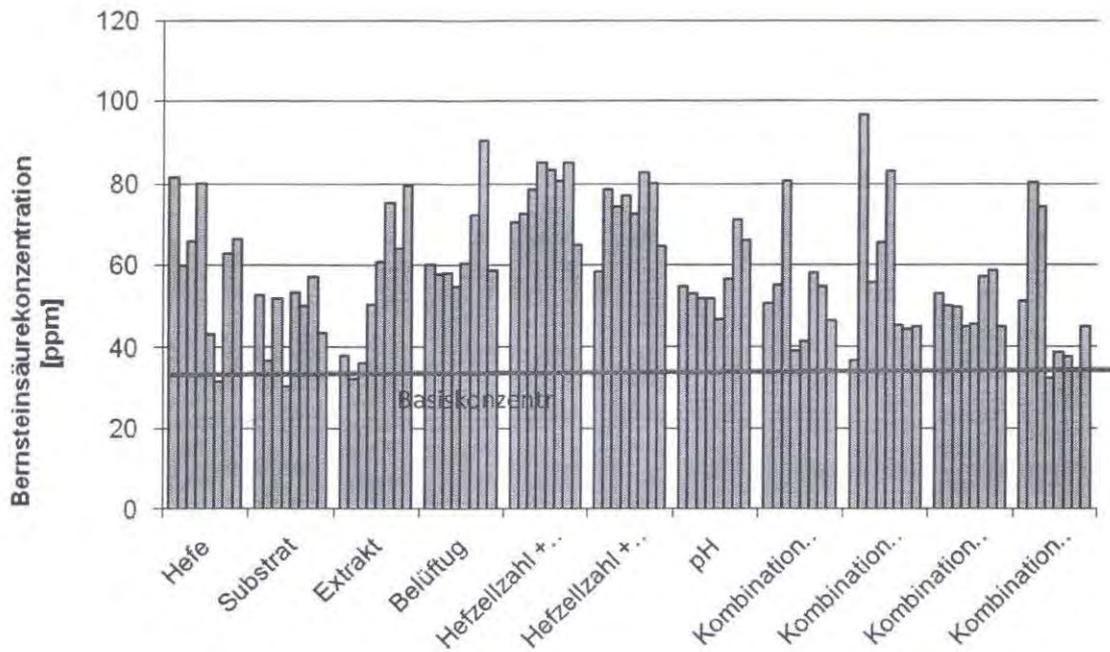


Abbildung 14: Vergleich Bernsteinsäuregehalt in Bieren aus allen Versuchen. Das niedrigste erzielte Niveau liegt bei ca. 35 ppm.

### Literatur:

---

- 1 Boulton C. and Quain D.  
Brewing yeast and fermentation  
Blackwell science Ltd., 2001
- 2 Briggs D. E.  
Brewing science and practice  
Woodhead publishing limited, Cambridge England, 2004
- 3 Oura E.  
Reaction products of yeast fermentation  
Process biochemistry, 19–35, 1977
- 4 Coote N. and Kirsop B. H.  
The content of some organic acids in beer and other fermented media  
Journal of the Institute of Brewing, Vol. 80, 474–482, 1974
- 5 Klopper W. J., Angelino S. A. G. F., Tunning B. and Vermeire H. A.  
Organic acids and glycerol in beer  
Journal of the Institute of Brewing, Vol. 92, 225–228, 1986
- 6 Püschner C., Zenz H., Schwarz H.  
Änderung des Carbonsäureprofils während des Brauprozesses  
Mitteilungen Österreichisches Getränke Institut, Nr. 5/6, 52–59, 1995
- 7 Sroka P., Tuszyński T.  
Changes in organic acid contents during mead wort fermentation  
Food Chemistry, 104, 1250–1257, 2007
- 8 Whiting G. C.  
Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages – a review  
Journal of the Institute of Brewing, Vol. 82, 84–92, 1976
- 9 Yang X. and Yin L.  
Factors Influencing the Organic Acids Content in Final Malt  
ASBC Journal, Volume 64, Number 4, 222–227, 2006
- 10 Enebo L., Blomgren G and Johnsson E.  
Low molecular non-volatile organic acids in wort and beer  
Journal of the Institute of Brewing, Vol. 61, 408–411, 1955
- 11 Arikawa, Y., Kuroyahagi, T., Shiosaka, M., Muratsubaki, H., Enomoto, K., Kodaira, R., Okazaki, M.  
Effect of gene disruptions of the TCA Cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*  
Journal of Bioscience and Bioengineering 88(1), 1999, 28 – 36
- 12 Heerde, E., Radler, F.  
Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*  
Arch. Microbiol. 117, 1978, 269-276

- 13 Montanari L., Perretti G., Natella F., Guidi A. and Fantozzis P.  
Organic and phenolic acids in beer  
*Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 32, 535–539, 1999
- 14 Shindo S., Sahara H., Koshino S.  
Relationship of production of Succinic acid and methyl citric acid pathway during alcohol fermentation with immobilized yeast  
*Biotechnology letters*, Vol. 15, No. 1, 51–56, 1993
- 15 Vanderhaegen B., Neven H., Coghe St., Verstepen K. J., Verachtert H., Derdelinckx G.  
Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top Fermented Beer  
*J. Agric. Food Chem.*, 51, 6782–6790, 2003
- 16 Vanderhaegen B., Delvaux F., Daenen L., Verachtert H., Delvaux F. R.  
Aging characteristics of different beer types  
*J. Agric.*, 103, 404–412, 2007
- 17 Saison D., de Schutter D. P., Uyttenhove B., Delvaux F. and F. R.  
Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds  
*Food Chemistry*, 114, 1206–1215, 2009
- 18 Castellari, L., Magrini, A., Passarelli, P., Zambonli, C.  
Effect of must fermentation temperature on minor products by cryo and non-cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains  
*Italian Journal of Food Science* 7(2), 1995, 125-132
- 19 Shimazo, Y., Watanabe, M.  
Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation  
*J. Ferment. Technol.* 59(1), 1981, 27-32
- 20 Kubo, Y., Takagi, H., Nakamori, S.  
Effect of gene disruption of succinate dehydrogenase on succinate production in a sake yeast strain  
*Journal of Bioscience and Bioengineering* 90(6), 2000, 619-624
- 21 Yano, S., Asano, T., Kurose, N., Hiramatsu, J., Shimoi, H., Ito, K.  
Characterization of an  $\alpha$ -ketoglutarate resistant sake yeast mutant with high organic acid productivity  
*Journal of Bioscience and Bioengineering* 96(4), 2003, 332 – 336
- 22 Krüger, E., Anger, H. M.  
Kennzahlen der Brauwirtschaft  
Behr's Verlag, Berlin 1990, Bier allgemein, Kapitel 9.1
- 23 Barber, L.E.  
The analices of organic acids by ion chromatography in beer and wort  
*ASBC Journal* 48(1), 1990, 44-46
- 24 Torija, M. J., Rozés, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A.  
Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*  
*Int. Journal of Food Microbiology* 80, 2003, 47 - 53

- 25 Kwiatkowski, J.R., McAloon, A.J., Taylor, F., and Johnston, D.B.  
Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process  
*Ind Crops Products* 23, 2006, 288-296
- 26 Taylor, F., Kurantz, M.J., Goldberg, N., McAloon, A.J., Craig, J.C., Jr.  
Dry-grind process for fuel ethanol by continuous fermentation and stripping  
*Biotechnol Prog* 16, 2000, 541-547
- 27 McAloon, A.J., Taylor, F., and Yee, W.  
Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks  
National Renewable Energy Laboratory, 2000, NREL/TP-580-28893
- 28 Sütterlin, K., Hoffmann-Boller, P., Pfenninger, H., Pulver, D., Gafner, J.  
Glycerol formation in dependence on use of pure yeast cultures and fermentation temperature  
*Obst- und Weinbau* 137(19), 2001, 526-528
- 29 Herrero, M., Cuesta, I., García, L., Díaz, M.  
Changes in organic acids during malolactic fermentation at different temperatures in yeast-fermented apple juice  
*J. Inst. Brew.* 105(3), 1999, 191-195
- 30 Suárez Valles, B., Pando Bedriñan, R., Fernández Tascón, N., Gonzáles Garcia, A., Rodríguez Madrera, R.,  
Analytical differentiation of cider inoculated with yeast isolated from Asturias apple juice  
*LWT – Food Science and Technology* 38, 2005, 455 - 461
- 31 Yamauchi, Y., Kashiara, T.  
Immobilised yeast applications in the brewing industry  
EBC Symposium, Monograph XXIV, 1995, 99-117
- 32 Pasteur, L.  
Memoire sur la fermentation alcoolique  
*Annales Chim. Phys. Troisième Serie* 58, 1860, 323-426
- 33 Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., Gustafsson, L.,  
Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* – Anaerobic growth and product formation  
*Applied and Environmental Microbiology* 62(9), 1996, 3187-3195
- 34 Jones, M., Prgnell, M.J., Pierce, J.S.  
*Journal Institute of brewing* 75, 1969, 520
- 35 Clapperton, J.F.  
*Journal Institute of Brewing* 77, 1971, 177
- 36 Da Cruz, S.H., Cilli, E.M., Ernandes, J.R.  
Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation  
*Journal Institute of Brewing* 108 (1), 2002, 54-61
- 37 Gunkel, J.  
Untersuchung zu den Grundlagen unterschiedlicher Vergärungseigenschaften von Braugersten  
Dissertation der Fakultät III (Prozesswissenschaften) der Technischen Universität Berlin 2001

38 Zufall, C., Kunerth, S., Tietje, N., Wackerbauer, K.  
Beeinflussung der Hefevitalität durch physikalischen Druck  
Monatsschrift für Brauwissenschaft 3/4, 2000, 44 - 49

39 Jones, R. P., Greenfield, P. F.  
Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation  
Enzyme Microbial. Technology, 4, 1982, 210 - 223

40 Zepf, M., Geiger, E., Nieten, I.  
Parametersteuerung bei der aeroben Hefevermehrung  
Brauwelt 44, 2000, 1849-1851

41 Cyr, N.  
Effect of aeration strategy on the performance of a very high gravity continuous fuel ethanol  
fermentation process  
Thesis, McGill University, Québec, Canada, 2006

Schlussbericht zum Forschungsvorhaben AiF 16150:

Untersuchung zur Senkung des Gehaltes an Magensäuresekretion fördernden Inhaltsstoffen in vergorenen, aber nicht destillierten, alkoholischen Getränken

---

## Danksagung

Die Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) und die II. Medizinische Klinik (Gastroenterologie, Hepatologie und Infektionserkrankungen), Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg möchten sich ganz herzlich bei der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF) und beim Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) für die Bewilligung und Finanzierung des Vorhabens bedanken.

Besonders herzlich bedanken möchten wir uns für die tatkräftige Unterstützung bei

Herrn Peter Fiegert, Hofbräuhaus Wolters,

Herrn Frank Liebhart, Liebharts Privatbrauerei,

Herrn Joachim Schneider, Dinkelacker Schwabenbräu,

Herrn Bernd Wörthmann, Dinkelacker Schwabenbräu,

Herrn Christian Dahncke, Paulaner Brauerei,

Herrn Christian Pohl, Klosterbrauerei Neuzelle,

Herrn Arie Kant, Biokal Labystems,

Herrn Stefan Polzer, Albert Handtmann Armaturenfabrik,

Herrn Michael Feische, Albert Handtmann Armaturenfabrik.

Ohne ihre kompetente Beratung und tatkräftige Unterstützung im Projektbegleitenden Ausschuss, der Bereitstellung von Bier, Adsorbermaterialien und Durchführung von Projektteilen in den Betrieben wäre es nicht möglich gewesen, dieses Projekt in diesem Maße durchzuführen.

Das IGF-Vorhaben 16150, der Forschungsvereinigung Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V., Seestraße 13, 13353 Berlin, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

### **Zugrunde liegende Literatur**

Ausgangspunkt des Forschungsprojektes waren Befunde, die nachwiesen, dass alkoholische Getränke neben den bekannten positiven Wirkungen auf das kardiovaskuläre System zu einer Schädigung der Magenschleimhaut führen können. Dies kann sich in Magenschleimhautentzündungen (Gastritis) und Magengeschwüren (Ulcera ventriculi) äußern [1, 2, 3]. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Schädigung der Magenschleimhaut spielt die Magensäure. Die Sekretion von Magensäure und die Freisetzung von Gastrin, dem wesentlichen hormonalen Vermittler der durch eine Mahlzeit stimulierten Magensäuresekretion, werden durch fermentierte alkoholische Getränke (z.B. Bier, Wein), nicht aber durch destillierte alkoholische Getränke (z.B. Whiskey, Cognac) gesteigert [4, 5, 6, 7]. Darin enthaltene nicht-alkoholische Inhaltsstoffe wie die Dicarbonsäuren Maleinsäure und Bernsteinsäure sind die entscheidenden Stimulatoren der Magensäureproduktion, haben aber keinen Einfluss auf die Gastrin-Freisetzung [8]. Diese wichtige Beobachtung belegte, dass nicht der Gehalt an Ethanol in den fermentierten alkoholischen Getränken entscheidend für die Magensäuresekretion ist, sondern andere Inhaltsstoffe dieser Getränke, und dies hat auch Auswirkungen für Getränke, die alkoholfrei sind.

### **Material und Methoden:**

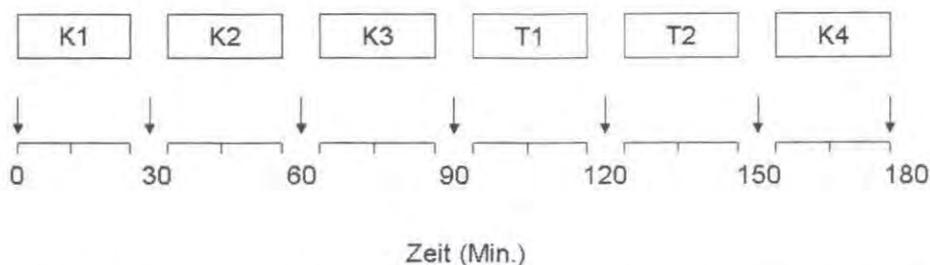
#### ***Probanden:***

Insgesamt wurden 15 freiwillige Probanden (10 männlich und 5 weiblich) im Alter von 18-29 Jahren getestet. Sie waren alle gesund, nahmen keine Medikamente ein, waren Nichtraucher und konsumierten gar keinen oder weniger als 20 g Alkohol pro Tag. Zwei Tage vor jedem Versuch wurde kein Alkohol mehr getrunken und 12 Std. vor Versuchsdurchführung nahmen die Probanden weder feste noch flüssige Nahrung mehr zu sich.

Die Stimulierbarkeit der Magensäuresekretion wurde mit Eichbaum Pilsener als Standardbier bestimmt. Dabei stellte es sich heraus, dass 5 Probanden eine für die Fragestellung zu niedrige Magensäuresekretionsantwort hatten. Zwei Probanden vertrugen am zweiten Versuchstag die Magensonde nicht mehr und brachen die Testreihe ab. Somit verblieben 8 Probanden (6 männlich und 2 weiblich, 22-28 Jahre alt), die die komplette Versuchsreihe durchlaufen haben. Jeder dieser Probanden wurde mehrmals an verschiedenen Tagen getestet, wobei zwischen den einzelnen Tests eines Probanden eine Pause von mindestens 48 Std. war. Als Kontrolllösung wurde bei jedem Test isotonische Glukoselösung (5,76 % wt/vol) gegeben.

### **Bestimmung der Magensäuresekretion:**

Die Magensäuresekretion als Antwort auf die verschiedenen Biertestlösungen wurde mittels der automatischen intragastralen Titration auf pH 5,5, d.h. der mengenmäßigen Bestimmung der freigesetzten Magensäure durch Neutralisation mit 0,5 N Natronlauge, bestimmt. Dazu wurde am Tage der Untersuchung im Nüchternzustand, d.h. nach 12-stündiger Nahrungskarenz, eine dünne, biegsame (flexible) Sonde durch die Nase der Probanden bis in den Magen eingeführt. Über diese Sonde wurden den Probanden sechs flüssige Mahlzeiten (je 500 ml, pH 5,5) in 30-minütigen Intervallen in den Magen eingeflößt (Abbildung 1). Nach jedem Zeitabschnitt wurde der Mageninhalt entleert und das Volumen bestimmt. Anschließend wurde das nächste Mahl instilliert. Die ersten drei Mahlzeiten (K1 – K3) bestanden aus isotonischer Glukoselösung (5,76% wt/v), von der gezeigt wurde, dass sie die Magenentleerung verzögert, ohne die Säuresekretion zu beeinflussen. Auf diese Weise bleibt genügend Volumen im Magen für die intragastrale Titration. Die durch die zweite Glukoselösung hervorgerufene Säuresekretion gibt die basale Sekretionsrate an, die dritte diente als deren Kontrolle.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. K1 – K4 sind Kontrollen (5,76 % (wt/vol) Glukose) und T1 – T2 das Testbier. Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Blutentnahmen für die Gastrinbestimmung an.**

Danach wurden zweimal je 500 ml der verschiedenen Biertestlösungen (T1 und T2) in den Magen gegeben und die Säuresekretion innerhalb von je 30 Minuten gemessen. Zum Abschluss wurde noch einmal isotonische Glukoselösung (K4) für 30 Minuten verabreicht, um die Auswirkung der durch die Testlösung stimulierten Säuresekretion festzustellen und auf den Basalwert zurückzukommen.

Zur Bestimmung der maximalen Magensäuresekretion und zur Sicherstellung, dass die Säuresekretionsraten der Probanden im normalen Bereich liegen (d.h., dass keine Hypo- oder Hyperresponder an der Studie teilnehmen) sollte - wie in den ursprünglichen Versuchen von Singer und seinen Mitarbeitern beschrieben [6, 7, 8] mit jedem Teilnehmer ein Pentagastrintest durchgeführt werden. Da Pentagastrin (6 µg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert wird und die Substanz in Deutschland nicht mehr auf dem Markt ist, wäre die Beschaffung aus dem Ausland aus Sicherheitsgründen mit hohen Auflagen und auch Kosten verbunden gewesen, so dass auf diesen Test verzichtet wurde. Da bekannt war, dass normales Bier die Magensäuresekretion bis zu 90% der durch Pentagastrin induzierten Maximalsekretion stimuliert, wurde die Stimulierbarkeit der Magensäuresekretion der Probanden mit Eichbaum Pilsener als Standardbier getestet.

### ***Bestimmung der Gastrinfreisetzung:***

Zur Bestimmung der Freisetzung des die Magensäuresekretion steigernden Hormons Gastrin wurden bei jedem Probanden sieben Blutentnahmen durchgeführt. Dazu wurde eine Venenverweilkanüle in eine Oberarmvene gelegt, aus der zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten jeweils 4 ml Blut entnommen wurden. Das Blut wurde nach 20-minütiger Koagulationszeit zentrifugiert und das Serum bei -20°C tiefgefroren. Die Bestimmung des Gastrins erfolgte mittels Lumineszenzimmunoassay durch das Labor *synlab Medizinisches Versorgungszentrum*, Leinfelden.

### ***Bier-Testlösungen:***

#### Methoden:

Ionenchromatograph: DX-600 (Fa. Dionex), mit AS50 Autosampler, AS50 Thermal Compartment, GS50 Gradient Pump und ED50 elektrochemischer Detektor

#### Trennsäulen:

- AS11-HC (I.D. 2 mm x L. 250 mm), Vorsäule AG11 (I.D. 2 mm x L.50 mm),
- Suppressor ASRS Ultra II (2mm)
- Trennung von Butyrat, Formiat, Pyruvat, Maleat und Citrat
- Fluss: 0,45 mL/ min, Konzentrationsgradient: A: NaOH 100 mM / B: Reinstwasser 0,05 µS, Säulentemperatur: 40 °C, Suppressorcurrent: 75 mA

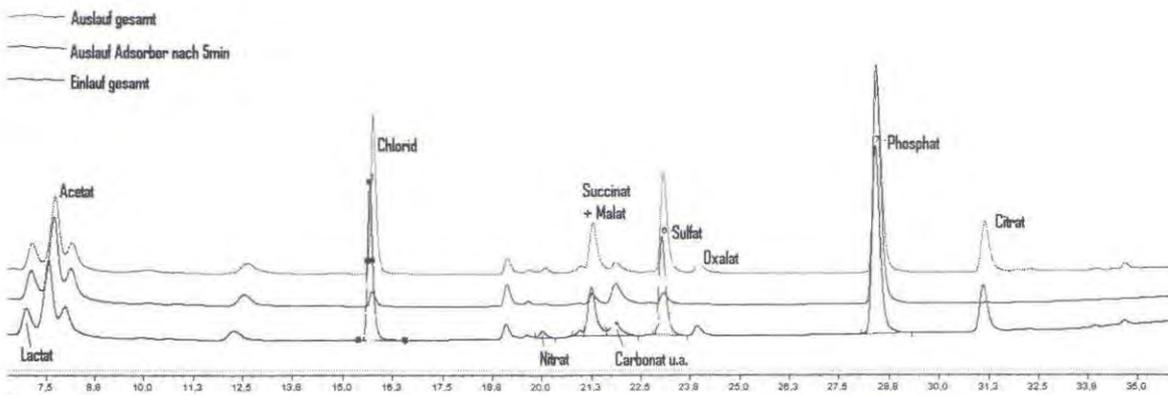
Enzymtests für Succinat und Malat: Boehringer Mannheim

Analytik von Extrakt, Farbe, Fettsäuren, Bierschaumhaltbarkeit nach MEBAK

### ***Verwendete Biere:***

Im Zuge der Vorbereitung der Biere für diesen Versuch wurden an der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin verschiedene Möglichkeiten evaluiert, um ein Bier mit möglichst geringer Konzentration an Bernsteinsäure herzustellen. Da die Bernsteinsäure im Bier zu gut 80 % bei der alkoholischen Gärung gebildet wird [9], wurden entsprechend dieser Kenntnis typische Prozessparameter der Biergärung variiert. Letztendlich konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Basiskonzentration im Bier von rund 35 mg Bernsteinsäure/Liter auf diese Weise nicht unterschritten werden kann. Aus diesem Grunde wurden andere Überlegungen angestellt. Dabei fiel das Augenmerk auf das Bierstabilisierungssystem Combined Stabilization System (CSS) der Fa. Handtmann [10]. Das CSS ist ein Adsorberapparat, welcher zunehmend in der Brauindustrie zum Einsatz kommt, um die Trübungsneigung des abgefüllten Bieres zu senken und damit die Haltbarkeit zu verlängern. Dies geschieht nach Angaben der Fa. Handtmann durch selektive Adsorption von Polyphenolen und Eiweißen, welche im speziellen für die Trübungsbildung im Bier verantwortlich gemacht werden. Neben diesem Effekt ist bekannt, dass das erste Bier, welches den Adsorber durchläuft, einen stark angehobenen pH-Wert besitzt. Im normalen Prozess wird dieses erste Bier verworfen bzw. fällt die leicht veränderte Eigenschaft dieses ersten Teilstromes im Gesamtstabilisierungszyklus im späteren Sammelgefäß nicht ins Gewicht. Auf Grund der bekannten pH-Wertverschiebung lag es nahe, diesen ersten Bierteilstrom auf den Gehalt an Bernsteinsäure zu testen. In Abbildung 2. ist ein Chromatogramm dieses Bieres nach der Behandlung dargestellt und mit einem unbehandelten Bier verglichen. Es zeigt sich eine starke Reduktion der Konzentration der Bernsteinsäure im behandelten Bier.

Zum Zeitpunkt der Bereitstellung der Biere für die medizinische Versuchsreihe war dieses Bier die einzig bekannte, erprobte und lebensmittelrechtlich zugelassene Variante zur Herstellung eines Bieres arm an Bernsteinsäure. Ein Bier aus diesem Prozessschritt diente für die Untersuchung.



**Abbildung 2** Ausschnitt Ionenchromatogramm Bier: Mittlere Linie (blau) zeigt das Chromatogramm eines Bieres, welches zu Beginn eines Stabilisierungszyklusses den Adsorber verlässt. Im Vergleich dazu ist das Chromatogramm eines Bieres vor Behandlung (schwarze Linie, unten) und aus dem Sammelgefäß nach der Behandlung (rosa Linie, oben) dargestellt. Eine Auftrennung der Bernsteinsäure vom Malat ist mit dieser Methode nicht möglich. Es zeigt sich eine Verringerung der Konzentration beider Säuren (durch enzymatische Tests bestätigt) sowie des Gehaltes und Chlorid, Nitrat, Oxalat, und Citrat.

Um zusätzlich die oben beschriebene mit herkömmlicher Brauprozesssteuerung erzielbare geringe Konzentration im Bier zu testen, wurden die in Tabelle 1 genannten Biere für die Versuche bereitgestellt. Zur eingehenden Charakterisierung wurden weitere Analysen vorgenommen, welche das Bier eingehender beschreiben (Tabelle 2).

### **Statistik:**

Die Unterschiede der Wirkungen auf die Magensäuresekretion und die Gastrinfreisetzung zwischen den Kontroll- und den Biertestlösungen als auch den verschiedenen Testlösungen untereinander wurden mit dem Students t-Test ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Ein signifikanter Unterschied wurde für  $p < 0,05$  angenommen.

**Tabelle 1: Übersicht Testbiere**

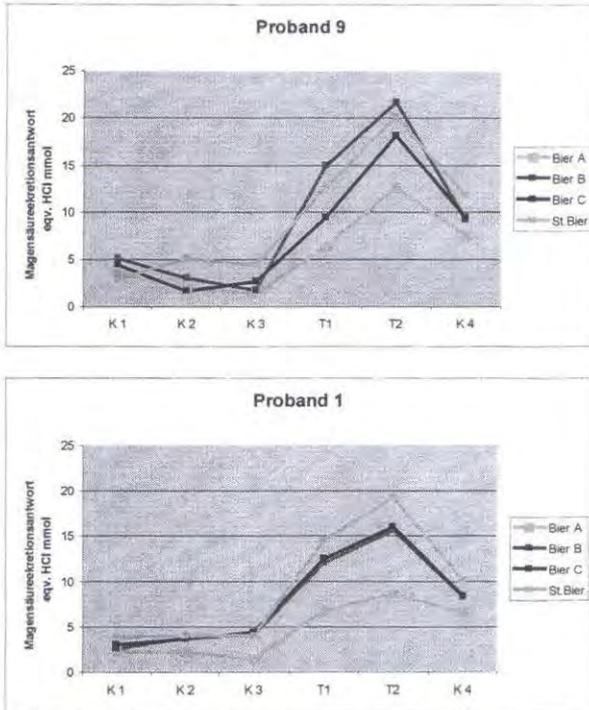
<b>Bier</b>	<b>Probenahme Zeitpunkt</b>	<b>pH</b>	<b>Bernsteinsäure- konzentration [mg/l]</b>
A: Bier mit sehr niedrigem Gehalt an Bernsteinsäure	Auslauf Adsorber CSS: 5 Minuten vor Umschalten auf Drucktank*	5,89	14
B: Bier mit Gehalt an Bernsteinsäure auf technisch erreichbarem Niveau	Auslauf Adsorber CSS: 5 Minuten nach Umschalten auf Drucktank	5,39	34
C: Bier mit leicht überdurchschnittlichem Bernsteinsäuregehalt	Auslauf Adsorber CSS: 130 Minuten nach Umschalten auf Drucktank	4,48	52** 81***
	* Brauerei sammelt erstes Bier zunächst im Puffertank auf Grund leicht veränderter Charakteristik		**Original ***nach Zugabe von Succinat, für Versuch verwendet

**Tabelle 2: Analytische Parameter der Testbiere**

Parameter	Methode	Einheit	Bier A	Bier B	Bier C
<b>Fettsäuren</b>					
Buttersäure	MEBAK III, 2. Auflage 1996, Kap. 1.1.4	[mg/l]	1,0	0,7	0,6
Iso-Valeriansäure	MEBAK III, 2. Auflage 1996, Kap. 1.1.4	[mg/l]	0,6	0,6	0,7
n-Valeriansäure	MEBAK III, 2. Auflage 1996, Kap. 1.1.4	[mg/l]	0,1	0,1	<0,1
Capronsäure	MEBAK III, 2. Auflage 1996, Kap. 1.1.4	[mg/l]	2,1	2,0	1,8
Caprylsäure	MEBAK III, 2. Auflage 1996, Kap. 1.1.4	[mg/l]	4,8	6,2	3,5
Caprinsäure	MEBAK III, 2. Auflage 1996, Kap. 1.1.4	[mg/l]	1,3	1,7	0,7
Laurinsäure	MEBAK III, 2. Auflage 1996, Kap. 1.1.4	[mg/l]	1,3	1,5	0,7
<b>Sammelparameter der Bieranalytik</b>			<b>Bier A</b>	<b>Bier B</b>	<b>Bier C</b>
Schaumhaltbarkeit (HLT)	MEBAK II, 4. Aufl. 2002, Kap. 2.19.3	HLT	84	75	78
Bittereinheiten	MEBAK II, 4. Aufl. 2002, Kap. 2.18.1	BU	12,3	17,1	23,7
Alkohol	MEBAK	% (V/V)	4,97	4,68	4,85
Stammwürzegehalt	MEBAK	g/100ml	11,57	11,10	11,38
Farbe	MEBAK	EBC	3,8	4,9	6,91
<b>Anionenprofil der Testbiere</b>			<b>Bier A</b>	<b>Bier B</b>	<b>Bier C</b>
Chlorid	Siehe Methoden	[mg/l]	5	12	42
Nitrat	Siehe Methoden	[mg/l]	3,5	3,3	3,6
Sulfat	Siehe Methoden	[mg/l]	10	15	66
Acetat	Siehe Methoden	[mg/l]	25	28	36
Citrat	Siehe Methoden	[mg/l]	1	1	40
Lactat	Siehe Methoden	[mg/l]	97	104	120
Maleat	Siehe Methoden	[mg/l]	n.d.	n.d.	n.d.
Oxalat	Siehe Methoden	[mg/l]	n.d.	n.d.	13
Pyruvat	Siehe Methoden	[mg/l]	8	9	11
Phosphat	Siehe Methoden	[mg/l]	283	290	270

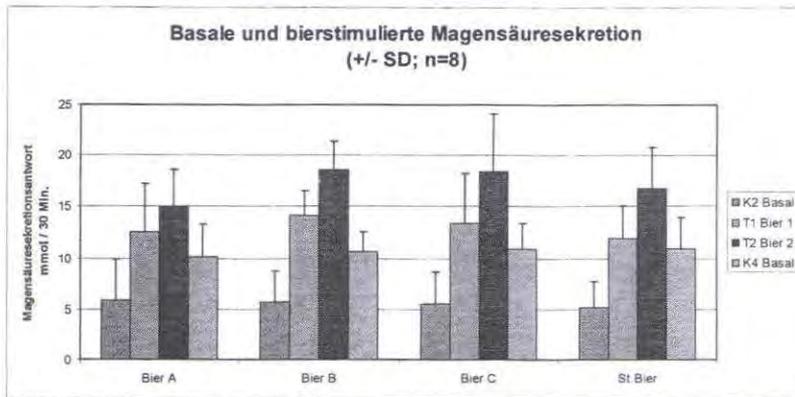
**Ergebnisse:*****Einfluss der Testbiere auf die Magensäuresekretion:***

Der Mittelwert der basalen Magensäuresekretion betrug  $10,3 \pm 2,6$  mmol/Std. ( $n=8$ ). Der Mittelwert für die Magensäuresekretion als Antwort auf die Gabe von Eichbaum Pilsener betrug  $28,6 \pm 5,5$  mmol/Std. und der des 1-stündigen Anstiegs war  $18,3 \pm 7,1$  mmol/Std.



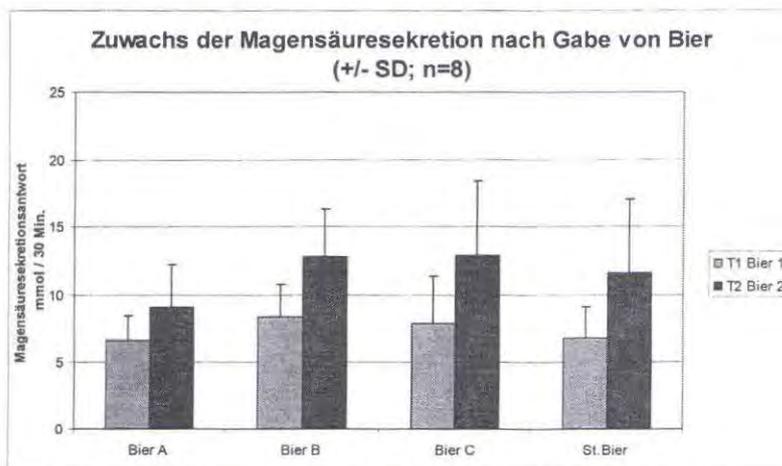
**Abbildung 3: Exemplarische Darstellung des Zeitverlaufes der Magensäuresekretionsantwort von zwei Probanden auf die drei Testbiere und das Standardbier.**

In Abbildung 3 sind beispielhaft die Zeitverläufe der Magensäuresekretion für zwei Probanden gezeigt und in Abbildung 4 die Mittelwerte für die basale Magensäuresekretion und die durch die Biere induzierte Sekretion (in mmol/30 Minuten). Alle drei Testbiere führten zu einem signifikanten Anstieg der Magensäuresekretion über den Basalwert. Nach Gabe der vierten Kontrolllösung fielen die Werte deutlich ab und erreichten 60 Minuten nach Bier wieder annähernd den basalen Ausgangswert (nicht gezeigt).



**Abbildung 4:** Basale und Anstieg der Magensäuresekretion nach der Instillation der Testbiere A, B und C im Vergleich zu Standardbier.  $P < 0,05$  für den Vergleich zwischen T1 bzw. T2 und K2 sowie zwischen T2 und K4 ( $n = 8$ ).

Um den Einfluss der einzelnen Testbiere auf die Magensäuresekretion deutlich zu machen, wurde die Basalrate subtrahiert und die 30-minütige Magensäuresekretionsantwort auf die Biere bestimmt (Abbildung 5). Dabei zeigten Bier B ( $8,4 \pm 2,4$  u.  $12,8 \pm 3,5$  mmol/30 Min.) und C ( $7,8 \pm 3,5$  u.  $12,9 \pm 5,5$  mmol/30 Min.) die gleiche Steigerung, während Bier A ( $6,6 \pm 1,8$  u.  $9,1 \pm 3,1$  mmol/30 Min.) eine deutlich niedrigere Antwort hervorrief. Um die Wirkung der Biere untereinander besser vergleichen zu können, wurde die Antwort auf Testbier C auf 100% gesetzt und die Antworten der Testbiere A und B darauf bezogen (Abbildung 6). Dabei zeigte sich, dass sich die Wirkung von B und C nicht voneinander unterschied, während Bier A zu einer signifikanten 30%-igen Reduktion der Magensäuresekretionsantwort führte.



**Abbildung 5:** Anstieg der Magensäuresekretion nach Instillation der Testbiere A, B und C und des Standardbieres ( $n = 8$ ).

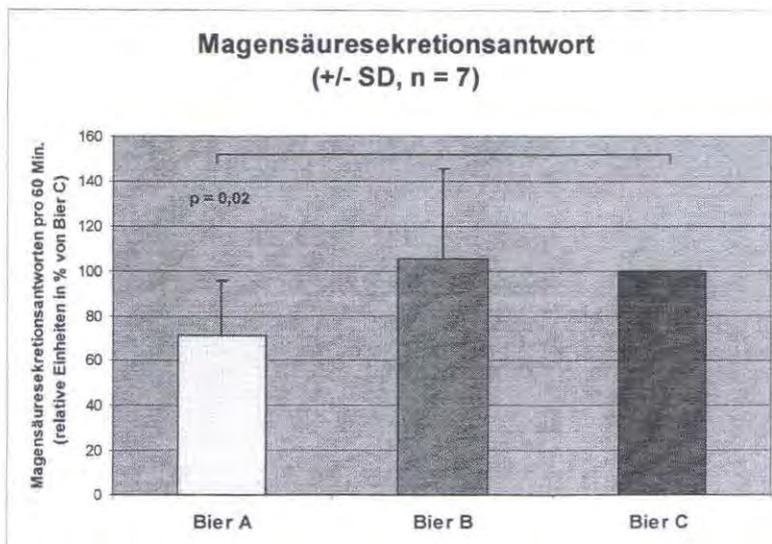
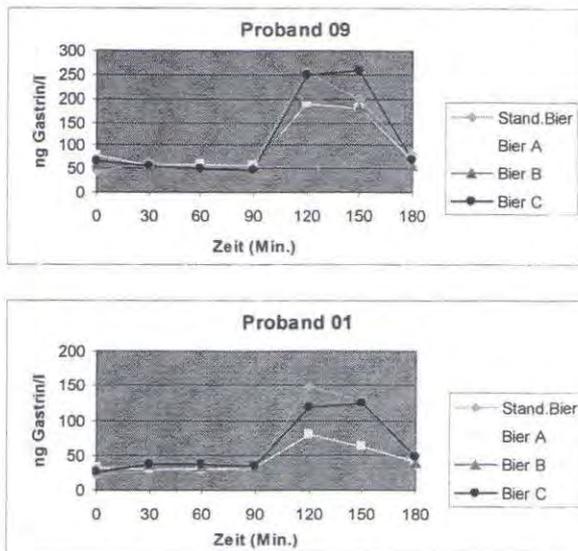


Abbildung 6: 1-Stunde Magensäuresekretionsantwort auf die Testbiere A und B in Relation zu Testbier C (Bier C = 100%, n = 7)

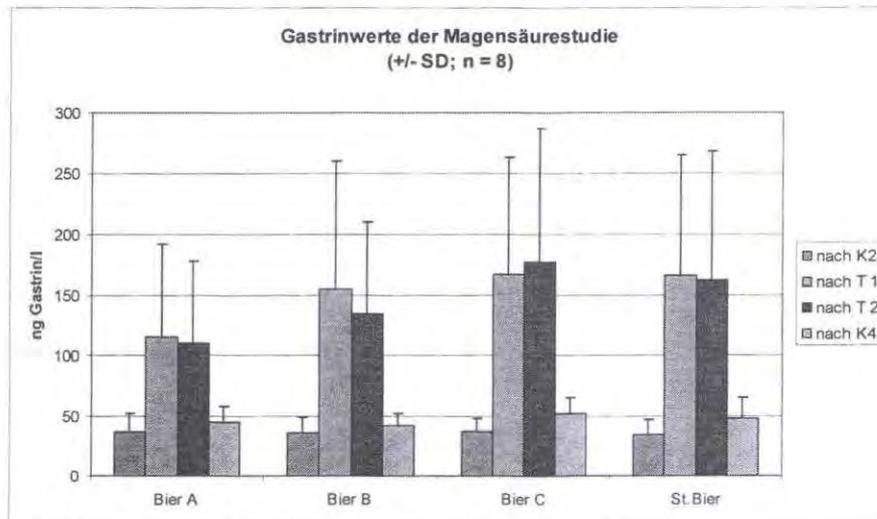
#### *Einfluss der Testbiere auf die Gastrinfreisetzung:*

Bei den dem Forschungsvorhaben zugrunde liegenden Untersuchungen von M.V. Singer und seinen Mitarbeitern wurde festgestellt, dass Bier sowohl die Magensäuresekretion stimuliert als auch die Freisetzung von Gastrin erhöht [5]. Im Gegensatz dazu stimulieren Bernsteinsäure und Maleinsäure die Magensäuresekretion über einen gastrinunabhängigen Mechanismus, d.h. es scheint im Bier noch eine Substanz zu geben, die die Gastrin-Freisetzung stimuliert [8]. Um nun zu überprüfen, ob das von der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin hergestellte Bier nicht nur einen geringeren Gehalt an Bernsteinsäure hat, sondern ob auch dessen gastrinfreisetzende Aktivität reduziert ist, wurde die Gastrinbestimmung durchgeführt.

In Abbildung 7 sind beispielhaft die Zeitverläufe der Gastrinfreisetzung für zwei Probanden gezeigt und in Abbildung 8 die Mittelwerte für die basale Plasmagastrinkonzentration und die durch die Biere induzierte Freisetzung (in ng/l). Alle drei Testbiere führten zu einem signifikanten Anstieg der Plasmagastrinkonzentration über den Basalwert. Nach Gabe der vierten Kontrolllösung fielen die Werte deutlich ab und erreichten 30 Minuten nach Bier wieder annähernd den basalen Ausgangswert. Die hohe Standardabweichung der Mittelwerte in Abbildung 8 ist auf den unterschiedlichen Anstieg der Konzentration in den männlichen und weiblichen Probanden zurückzuführen. Während die Plasmagastrinkonzentration bei den männlichen Probanden mit einer Ausnahme auf durchschnittlich 120 ng/l anstieg, erreichte sie bei den weiblichen Probanden 258 bzw. 398 ng/l.



**Abbildung 7: Exemplarische Darstellung des Zeitverlaufes der Plasmagastrinfreisetzung von zwei Probanden auf die drei Testbiere und das Standardbier.**



**Abbildung 8: Basale und Anstieg der Plasmagastrinkonzentration nach Instillation der Testbiere A, B und C im Vergleich zu Standardbier.  $P < 0,05$  für den Vergleich zwischen T1 bzw. T2 und K2 sowie zwischen T2 und K4 ( $n = 8$ ).**

Zum genaueren Vergleich wurde die Fläche unter der Kurve ermittelt und die Plasmagastrinfreisetzung als integrierte Plasmagastrin-Antwort in pM pro 60 Minuten berechnet. Auf Grund der hohen Standardabweichung und um die Wirkung der Biere untereinander besser vergleichen zu können, wurde die Antwort auf Testbier C auf 100% gesetzt und die Antworten der Testbiere A und B darauf bezogen (Abbildung 9). Dabei zeigte sich, dass sich die Wirkung von B um 17% geringer war als die von Bier C und Bier A zu einer signifikanten 42%-igen Reduktion der integrierten Plasmagastrin-Antwort führte.

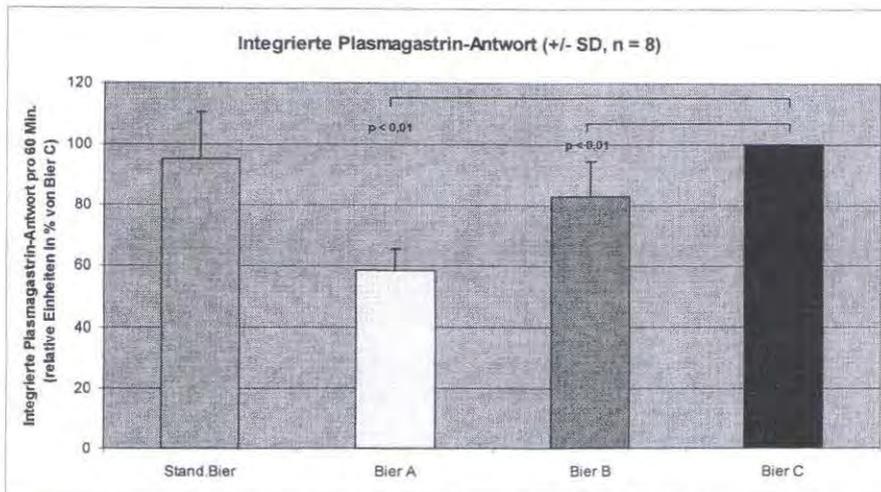


Abbildung 9: Integrierte Plasmagastrinantwort pro 60 Minuten in relativer Beziehung zum Testbier C (Bier C = 100%, n = 8).

Wenn man die 1-Stunden-Magensäuresekretionsantwort und die integrierte Gastrin-Antwort als Dosiswirkungsbeziehung gegen die in den Testbieren vorhandene Konzentration an Bernsteinsäure aufträgt (Abbildung 10), so zeigt sich, dass die Antworten konzentrationsabhängig sind. Eine Bernsteinsäure-Konzentration von mehr als 30 mg/l Bier bewirkt eine maximale Steigerung beider Antworten. Die Verringerung der Bernsteinsäurekonzentration auf 14 mg/l reduziert die Antworten um ~30%.

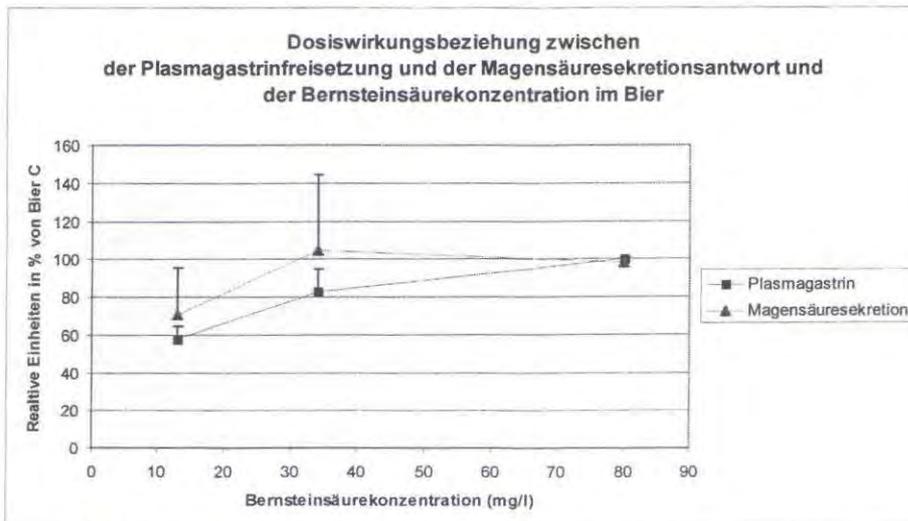


Abbildung 10: Dosiswirkungsbeziehung zwischen Plasmagastrinfreisetzung und der Magensäuresekretionsantwort und der Bernsteinkonzentration im Bier.

### **Zusammenfassung und Ausblick**

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass alle drei Testbiere sowohl die Magensäure-sekretion als auch die Plasmagastrinfreisetzung signifikant stimulierten. Bier B und C hatten ungefähr die gleiche Wirkung auf die Magensäuresekretion, während Bier A zu einer signifikanten ~30%igen Reduktion der Sekretion im Vergleich zu Bier C führte.

Auf die Plasmagastrinfreisetzung hat Bier C den stärksten Effekt; Bier B führte zu einer 17%igen Reduktion und Bier A zu einer 42%igen Reduktion der integrierten Plasmagastrin-Antwort; beide Reduktionen waren signifikant.

Die Testbiere hatten die Bernsteinsäurekonzentrationen 14 mg/l (A), 34 mg/l (B) und 81 mg/l (C), d.h., dass die Reduktion von Bernsteinsäure im Bier zu einer Verminderung der Magensäuresekretion als auch der Plasmagastrinfreisetzung führt. Eine Verringerung der Bernsteinsäurekonzentration um den Faktor 6 (80 auf 14 mg/l) im Bier führt zu einer ~30%igen Reduktion der Magensäuresekretionsantwort als auch der Plasmagastrinfreisetzung.

Die Kurven in Abbildung 10 legen den Schluss nahe, dass die weitere Verringerung der Bernsteinsäurekonzentration auf weniger als 10 mg/l zu einer starken Reduktion der Magensäuresekretionsantwort und der Plasmagastrinfreisetzung führen müsste.

Die Versuche haben aber noch ein anderes Ergebnis gebracht. Mit abnehmender Bernsteinsäurekonzentration im Bier nimmt auch die integrierte Plasmagastrin-Antwort ab. Da Bernsteinsäure allein aber keinen Effekt auf die Plasmagastrinfreisetzung hat [8], lässt dies vermuten, dass es noch andere Substanzen im Bier geben muss, die für die Freisetzung von Gastrin verantwortlich sind. Allerdings wurde die Konzentration dieser Substanz(en) durch die Behandlung des Bieres ebenfalls verringert.

## Literatur:

---

- <sup>1</sup> Harder H, Teyssen S, Singer MV. Wirkung von Alkohol und Tabak auf periphere Organe: Magen. In: Singer MV, Batra A, Mann K (Hrsg.) Alkohol und Tabak – Grundlagen und Folgeerkrankungen. Thieme Verlag Stuttgart 2010, 280-294.
- <sup>2</sup> Knoll MK, Kölbl CB, Teyssen S, Singer MV. Action of pure ethanol and some alcoholic beverages on gastric mucosa in healthy humans. *Endoscopy* 1998; 30:293-301.
- <sup>3</sup> Uppal R, Lateef SK, Korsten MA, Paronetto F, Lieber CS. Chronic alcoholic gastritis. Roles of alcohol and helicobacter pylori. *Arch Intern Med* 1991; 151:760-764.
- <sup>4</sup> Singer MV, Eysselein VE, Goebell H. Beer and wine but not whisky and pure ethanol do stimulate release of gastrin in humans. *Digestion* 1983; 26:73-79.
- <sup>5</sup> Singer MV, Leffmann C, Eysselein VE, Calden H, Goebel H. Action of ethanol and some alcoholic beverages on gastric acid secretion and release of gastrin in humans. *Gastroenterology* 1987; 93:1247-1254.
- <sup>6</sup> Teyssen S, Lenzing T, Gonzalez-Calero, Korn A, Riepl RL, Singer MV. Alcoholic beverages produced by fermentation but not by distillation are powerful stimulants of gastric acid secretion in humans. *Gut* 1997; 40:49-56.
- <sup>7</sup> Singer, M. V., Teyssen, S., Eysselein, V. E. Action of beer and its ingredients on gastric acid secretion and the release of gastrin in humans. *Gastroenterology* 1991; 101:935 – 942.
- <sup>8</sup> Teyssen, S., González-Calero, G., Schimiczek, M., Singer, M. V. Maleic acid and succinic acid in fermented alcoholic beverages are powerful stimulants of gastric acid release. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103:707 – 713.
- <sup>9</sup> Püschner C., Zenz H., Schwarz H.  
Änderung des Carbonsäureprofils während des Brauprozesses  
Mitteilungen Österreichisches Getränke Institut, Nr. 5/6, 52–59, 1995
- <sup>10</sup> Taylor, B., Verwendung des Combined Stabilization System und dessen Einflüsse auf die Bierstabilität, *Brauwelt* 24, 698-706, 2006



#### **Sachbericht 4:**

### **Untersuchung von Adsorbermaterialien zur Senkung des Gehaltes an Bernsteinsäure im Bier**

Die Möglichkeiten zur Beeinflussung der Konzentration einzelner, aber auch des Gesamtprofils organischer Säuren in Getränken aus alkoholischer Gärung ist bisher kaum untersucht. Generell gibt es dazu verschiedene verfahrenstechnische Ansätze. In der hier vorliegenden Untersuchung wird die Anwendung von unterschiedlichen Adsorbermaterialien vorgestellt. Als Beispielgetränk wurde Bier verwendet. Die Zielsubstanz war die Bernsteinsäure. Diese wurde als eine die Magensäure stimulierende Substanz im Bier identifiziert [1] und es wird angenommen, dass bei einem Bier mit geringer Konzentration dieser Säure die Bekömmlichkeit erhöht ist.

Ziel der Untersuchung war es, Antworten auf folgende die Fragen zu erhalten:

Welches Adsorbermaterial ist in der Lage innerhalb der komplexen Biermatrix einzelne organische Säuren bevorzugt zu adsorbieren?

Welche Prozessparameter (Temperatur, pH-Wert, Durchsatz, Regenerierung und Konditionierung des Adsorbermaterials) sind dazu vorteilhaft?

Welche Nebeneffekte auf die Gesamtproduktqualität des Bieres (Sensorik, Stabilität, pH, Bittere, Farbe, u.a.) hat die Anwendung des Adsorbermaterials auf das Produkt?

## **Zu Grunde liegende Literatur:**

### ***Möglichkeiten der Reduktion von Bernsteinsäure im Bier***

Im fertigen Bier liegt die Bernsteinsäurekonzentration im Bereich von 50-150 mg/l [2]. Ein verhältnismäßig geringer Anteil (< 20 mg/l) findet sich bereits in der Würze des Brauprozesses wieder. Hauptquelle ist das Malz. Im Verlauf der Gärung steigt die Konzentration stark an. Während der Lagerung wird nur noch wenig Bernsteinsäure gebildet. Der Stoffwechsel der Hefe ist für die Bildung der Bernsteinsäure verantwortlich [3]. Die Hauptmenge der im Bier vorhandenen organischen Säuren geht oxidativ via Pyruvat direkt aus dem Tricarbonsäurezyklus der Hefe hervor. Während der Gärung kommt es zu einem Abfall des pH-Werts. Dieser ist u.a. auf die anaerobe Bildung organischer Säuren durch die Hefe zurückzuführen. Ein weiterer Weg, durch den die Hefe organische Säuren bildet, ist die Desaminierung würespezifischer Aminosäuren zur Bildung eigener Proteine [4, 5].

Möchte man den Gehalt der Bernsteinsäure im fertigen Bier beeinflussen, ergeben sich somit verschiedene Möglichkeiten. Die Auswahl der Rohstoffe erfolgt vor Beginn des Brauvorgangs und beeinflusst das Profil der organischen Säuren im Bier. Da der Hauptteil der Bernsteinsäure aber während der Gärung entsteht, liegt es nahe, die Prozessparameter sowie den Hefestamm näher auf dessen Einflüsse bezüglich der Genese der Säuren zu untersuchen. Letztlich besteht die Möglichkeit im Nachhinein das fertige Bier zu behandeln. Hier ist im Besonderen an den Einsatz von Adsorbiermaterialien zu denken, welche für andere Zielstellungen in der Bier- und Getränkeherstellung bereits zum Einsatz kommen und etablierte Verfahren sind [6].

Für die chemische Industrie stellt Bernsteinsäure einen begehrten Rohstoff dar. Die Produktion aus nachwachsenden Rohstoffen wird dabei immer interessanter [7]. Dafür muss die biotechnologisch hergestellte Bernsteinsäure aufgereinigt werden. Ein vielversprechendes Verfahren dazu wird in der Adsorption gesehen. Die dort gewonnenen Kenntnisse können wichtige Informationen über Adsorbiermaterialien und Prozessparameter für die Adsorption von Bernsteinsäure aus Bier liefern.

Analog zur Aufreinigung biotechnologisch hergestellter Bernsteinsäure aus Fermentationsbrühe ergibt sich eine Reihe verschiedener Verfahren, mit denen die Bernsteinsäurekonzentration im Produkt gesenkt werden kann (siehe folgender Absatz). Der große Unterschied zwischen den Experimenten dieser Arbeit und den Verfahren der Biotechnologie besteht darin, dass die Zielgröße nicht möglichst reine Bernsteinsäure ist, sondern ein Bier, das neben einem geringeren Bernsteinsäuregehalt, möglichst wenig verändert wird. Daher muss das Verfahren möglichst spezifisch und im Einklang mit dem Reinheitsgebot erfolgen.

### ***Bernsteinsäure in der chemischen Industrie (allgemein)***

Bernsteinsäure ist auf Grund der vielen Einsatzmöglichkeiten ein begehrter Rohstoff der chemischen Industrie. Zur Produktpalette zählen unter anderem der Einsatz im Lebensmittelbereich, Pharmazeutika, Kosmetika, biologisch abbaubare Kunststoffe und andere Polymere [8].

Derzeit wird Bernsteinsäure überwiegend petrochemisch durch Oxidation aus Butan und Hydrierung von Maleinsäureanhydrid gewonnen. Aufgrund der hohen erforderlichen Temperaturen und Drücke sowie des Einsatzes von Schwermetallkatalysatoren ist dieses Verfahren nur beschränkt wettbewerbsfähig. Der Bedarf ist mit derzeit 30.000 t/a als eher gering einzuordnen [9].

Einen anderen Weg zur Gewinnung von Bernsteinsäure stellt die Fermentation durch Mikroorganismen dar. Verschiedene anaerobe und fakultativ anaerobe Mikroorganismen vermögen Bernsteinsäure, ausgehend von Kohlenhydraten oder Proteinen, in größeren Mengen zu synthetisieren. Dabei wird Bernsteinsäure im Rahmen der gemischten Säuregärung gebildet. Neben Bernsteinsäure entstehen auch Ethanol, Lactat, Acetat, Formiat, Propionat sowie andere Säuren und Alkohole.

Es wurde gezeigt, dass diese fermentative Herstellung aus erneuerbaren Rohstoffen kosten-effizienter sein

kann als die Gewinnung auf petrochemischem Weg [5]. Zudem ist sie mit der Nachfrage nach erneuerbaren Rohstoffen in Einklang zu bringen. Daher wird der Bernsteinsäure eine große Zukunft zugesprochen, laut dem Department of Energy der USA gehört sie zu den zwölf Plattformchemikalien mit besonders großem biotechnologischen Herstellungspotenzial [10].

Eine biotechnologische Produktion erfordert stets die Aufreinigung der Bernsteinsäure, also die Abscheidung, aus dem Produktgemisch, das auch als Fermentationsbrühe bezeichnet wird. Dieser Thematik widmen sich mehrere Forschungsgruppen. Es stehen verschiedene Trennverfahren von Bernsteinsäure aus wässrigen Lösungen zur Verfügung. Dazu gehören Destillation, Fällung, Flüssig-Flüssig-Extraktion, Membrantechniken und Elektrodialyse.

Die Fällung von Bernsteinsäure wurde 1992 von Datta untersucht. Durch Zugabe von Calciumhydroxid zum Fermentationsmedium fiel Succinatsalz aus. Anschließend wurde Schwefelsäure beigesetzt, um die freie Bernsteinsäure zu erhalten. Dabei entsteht als Nebenprodukt Gips. Zur Aufreinigung waren mehrere Waschschriffe nötig. Die großen Mengen an Abfall wurden als wirtschaftlich und umwelttechnisch bedenklich angesehen [11].

Ein anderes Verfahren wurde von Glassner et al. untersucht [12]. Mit der Kombination der konventionellen Elektrodialyse und anschließender elektrodialytischer Wasserdissoziation konnte eine hohe Reinheit der Bernsteinsäure erzielt werden. Die für dieses Verfahren erforderliche Energiemenge ist jedoch sehr hoch.

In der Reaktivextraktion von Bernsteinsäure mit Tri-n-octylamin wurde ein wirtschaftlicherer Weg gesehen, die Aufbereitung erfolgte durch Vakuumdestillation und Kristallisation. Problematisch für den Einsatz in Fermentationsbrühe ist jedoch die unspezifische Wechselwirkung mit anderen organischen Säuren [13, 14]

### ***Bernsteinsäure in der chemischen Industrie – Gewinnung durch Adsorption***

Das derzeit größte Potenzial zur Entfernung der Bernsteinsäure aus Fermentationsbrühe wird in der Adsorption gesehen. Darunter versteht man die vollständige oder teilweise Anlagerung (Adsorption) einer Substanz (Adsorptiv) aus einer fluiden Phase an der Oberfläche einer festen Phase (Adsorbens, Adsorptionsmittel, Adsorbent). In der Regel liegt keine funktionelle Gruppe vor. Die Bindung beruht auf van der Waals Kräften (Physisorption) und ist somit reversibel. Die adsorbierte Substanz lässt sich durch Waschen wieder Ablösen (Regenerierung).

Sehr ähnlich dazu ist die Verwendung von Ionenaustauschern. Der Übergang zwischen Adsorption und Ionenaustausch ist fließend. Ionenaustauscher sind anorganische und organische Substanzen mit einem Fest- und Gegenion, die Ionen gezielt und reversibel austauschen können. Dabei ist das Anlagern der Stoffe auf elektrostatische Kräfte zurückzuführen. Die ionische Bindung kann nicht durch einfaches Waschen mit Wasser gelöst werden. Es ist stets ein Austausch von Ionen erforderlich.

Die Bernsteinsäure hat einen  $pK_{s1}$ -Wert von 4,16 und einen  $pK_{s2}$ -Wert von 5,61 [15]. Somit liegt sie im Bier (pH 4,68) vorwiegend einfach protoniert als Succinat-Anion vor. Für eine Entfernung kommen folglich Anionenaustauscher in Frage. Man unterscheidet zwischen schwach- und starkbasischen Materialien. Starkbasische Anionenaustauscher enthalten quaternäre Ammoniumgruppen als funktionelle Gruppen, während bei den schwachbasischen Anionenaustauschern Amingruppen die Säureanionen reversibel binden.

Wie schon beschrieben ist der Übergang von der Adsorption zum Ionenaustausch fließend. Fast immer sind beide Mechanismen gleichzeitig nebeneinander wirksam. Daher wird im Folgenden der Begriff Adsorption für beide Phänomene synonym verwendet.

Anforderungen an Adsorbentmaterialien sind vor allem eine möglichst selektive Aufnahme des zu adsorbierenden Stoffes (Adsorptiv), hohe Kapazität, auch bei geringer Konzentration des Adsorptivs, leichte Desorbierbarkeit, gute Regenerierbarkeit und chemische, mechanische und thermische Beständigkeit. Außerdem sollten die Adsorptionsmittel keine unerwünschten Reaktionen katalysieren.

Mögliche Materialien lassen sich in drei Klassen einteilen [16]:

- Kohlenstoffhaltige (Aktivkohlen und -kokse, Kohlenstoffmolekularsiebe)
- Oxidische (Kieselgele, Zeolithe (Molekularsiebe), Metalloxide und -hydroxide)
- Polymere Adsorbentharze (hergestellt auf Basis von Styren und Divinylbenzen, substituierten Acrylate und Divinylbenzen oder Phenol- Formaldehyd-Harzen.)

2005 testeten Davison et al. 25 Adsorbentmaterialien bezüglich ihrer Aufnahmefähigkeit von Bernsteinsäure in einem simulierten Medium. Es wurden sowohl Satz- als auch Kolonnenversuche durchgeführt. Die besten Harze hatten eine Kapazität von 0,06 g/g Harz bei einer Säurekonzentration von 1–5 g/l im Flüssigmedium [17].

Jun et al. berichteten 2007 erstmals vom Einsatz aminofunktionalisierten Kieselgels - SBA-15 zur Aufreinigung der Bernsteinsäure. Weitere Versuche gaben zudem Aufschluss über die Einflüsse u.a. von Temperatur, Ausgangskonzentration und pH-Wert auf das Adsorptionsverhalten. Auch hier wurden Kapazitäten von ca. 0,065 g/g Adsorbentmaterial bei einer Säurekonzentration von 1-5 g/l im Flüssigmedium erzielt. Der Breakthrough erfolgte zwischen 40 und 60  $V/V_R$  (Durchflussvolumen/Reaktorvolumen) [18].

Die Verwendung von schwach alkalischen Anionenaustauschern wurde von Li et al. untersucht. Es wurden Kapazitäten von bis zu 0,11 g/l bei einer anfänglichen Säurekonzentration von 5 g/l in der Lösung erreicht. Der Breakthrough in der Kolonne liegt bei ca. 50  $V/V_R$  [19].

In weiteren Studien wurden die Mechanismen der Adsorption an oxidischen Verbindungen untersucht darunter: delta- $Al_2O_3$  [20], Hematit [21], Calcit 104 [22] sowie an basischem Metalloxid betrachtet [23].

### ***Vorversuche an der VLB-Berlin***

*Adsorption im Satzversuch:* In einer weiteren Studie wurden Adsorptionsversuche mit drei Materialien durchgeführt (Strata X-AW: ein schwaches Anionenaustauscher Harz der Firma Phenomenex; Oasis; MAX: ein schwaches Anionenaustauscher Harz der Firma Waters; Mesoporöses Silikat SBA-15 funktionalisiert mit primärem Aminosilan: bereitgestellt vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung). In den Versuchen wurde jeweils eine kleine Menge Bier durch die mit dem Adsorbermaterial gepackten Säule (15mm x 7mm) gezogen. Alle Materialien hatten einen Einfluss auf die Bernsteinsäurekonzentration. Zum Teil traten große Nebeneffekte in der Produktmatrix auf. Ob sich diese im akzeptablen Rahmen befanden, konnte auf Grund des sehr kleinen Probenvolumens nicht beurteilt werden. An diese Versuche knüpfte sich die hier vorliegende Arbeit an.

*Combined Stabilization System (CSS):* In der Getränkeindustrie ist der Einsatz von Adsorbermaterialien gängige Praxis. Gemeinhin werden diese zur Verringerung der Trübungsneigung von Wein und Bier und Fruchtsaft basierten Getränken eingesetzt. Aus diesem Grunde wurden diese näher betrachtet. Dabei fiel das Augenmerk auf das Bierstabilisierungssystem Combined Stabilization System (CSS) der Fa. Handtmann [24]. Das CSS ist ein Adsorberapparat, welcher zunehmend in der Brauindustrie zum Einsatz kommt, um die Trübungsneigung des abgefüllten Bieres zu senken und damit die Haltbarkeit zu verlängern. Dies geschieht nach Angaben der Fa. Handtmann durch selektive Adsorption von Polyphenolen und Eiweißen, welche im speziellen für die Trübungsbildung im Bier verantwortlich gemacht werden. Neben diesem Effekt ist bekannt, dass das erste Bier, welches den Adsorber durchläuft, einen stark angehobenen pH-Wert besitzt. Im normalen Prozess wird dieses erste Bier verworfen bzw. fällt die leicht veränderte Eigenschaft dieses ersten Teilstromes im Gesamtstabilisierungszyklus im späteren Sammelgefäß nicht ins Gewicht. Auf Grund der bekannten pH-Wertverschiebung wurde dieser erste Bierteilstrom in einer Voruntersuchung auf den Gehalt an Bernsteinsäure getestet. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Konzentration der Bernsteinsäure im behandelten Bier. Damit war ein erstes Adsorbermaterial bekannt, welches unter anderem Bernsteinsäure aus dem Bier entfernte und welches zudem eine Zulassung für die Getränkeproduktion besitzt. Daher bot sich dieses Material als Referenz für die weiteren Versuche an.

## Material und Methoden

Für die Adsorptionsversuche wurde das Residenz-Bio-Pils der Liebhart's Privatbrauerei GmbH & Co. KG (Detmold, Deutschland) verwendet.

### *Adsorbentmaterialien*

- Agarose Beads - Handtmann Holding GmbH & Co. KG (Biberach, Deutschland)
- DIAION MA03SS - Resindion S.R.L (Binasco (MI) - Italy)
- WorkBeads™ 40 Q - Bio-Works GmbH (Putzbrunn, Deutschland)
- Interchrom UP60-60SAX - Interchim SA (Montluçon France)
- Ein Metalloxid bereitgestellt von Fraunhofer Umsicht (Oberhausen, Deutschland)

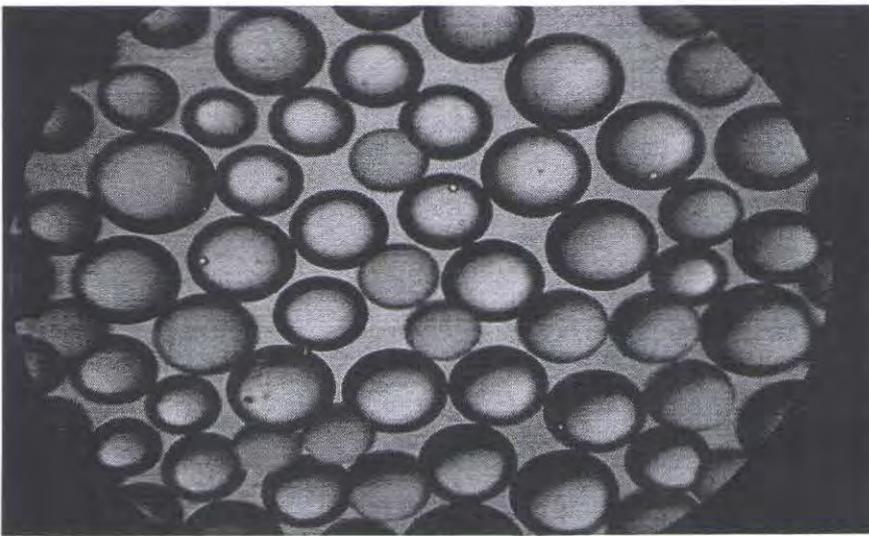


Abbildung 1: Das Adsorbentharz Dialon MA03SS unterm Mikroskop bei 300-facher Vergrößerung. Die Aufnahme erfolgte nach 10 maliger Verwendung des Materials in der Adsorbentssäule.

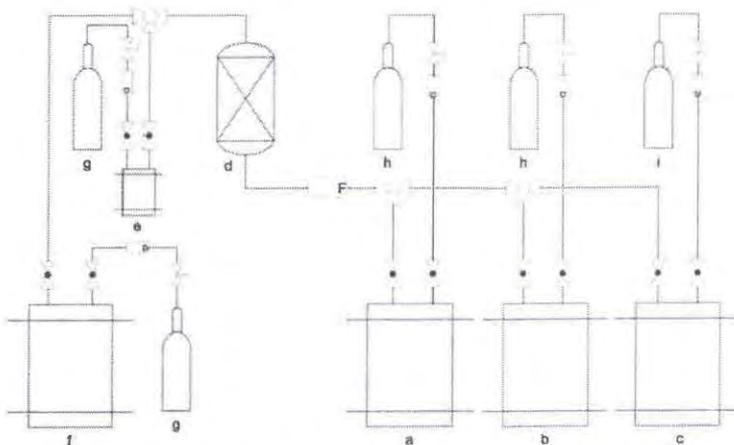


Abbildung 2: Skizze Fließbild, a - Bier, b - Karbonisiertes und entgastes Wasser, c - Regenerierlösung, d - Adsorbentkolonne, e - Probenentnahme, f - Auffangbehältnis, g -  $p_{CO_2} = 2,5$  bar Überdruck, h -  $p_{CO_2} = 3$  bar Überdruck, i -  $p_{luft} = 3$  bar Überdruck

### ***Versuchsaufbau***

Im Zentrum der Versuche steht das Adsorbermodul, in dem das jeweilige Adsorbermaterial gepackt ist. Das Modul besteht aus einer (Radius = 1,6 cm, Höhe = 5,5 cm) Glasröhre, die von zwei Siebböden begrenzt ist. Diese halten die Partikel des Adsorbermaterials zurück, während kleinere Teilchen und Flüssigkeiten passieren können. Das Volumen der Säule betrug damit in etwa 44 ml.

Direkt hinter dem Adsorber lässt sich der Produktstrom umleiten - entweder zum Auffangfass oder zur Probenahme mit dem Handfüller. Der Apparatur vorgeschaltet ist ein Kugel-Rotameter mit dem der Volumenstrom des Zulaufs kontrolliert wird (Abbildung 2).

Im Kräftegleichgewicht von Schwerkraft, Auftrieb und Reibung befindet sich die Kugel des Rotameters in der Schwebelage, es gilt:

$$F_{G\downarrow} = F_{A\uparrow} + F_{R\uparrow}$$

Das Rotameter ist auf 20°C warmes Wasser geeicht. Die Temperatur des Bieres betrug aber ca. 1 °C. Bei dieser Temperatur ist die Viskosität von Wasser und Bier mit 1,7 mPa\*s fast doppelt so hoch wie bei Raumtemperatur. Dadurch erhöht sich die Reibungskraft  $F_R$ :

$$F_R = 6 * \pi * \eta * r * v^1$$

an der Kugel entsprechend. Dies muss bei der Bestimmung des Durchflusses berücksichtigt werden. Geht man davon aus, dass sich bei einer Änderung der Viskosität lediglich die Reibungskraft ändert, heben sich die anderen beiden Kräfte auf. Es folgt:

$$F_{R\ 20^\circ\text{C}} = F_{R\ 1^\circ\text{C}}$$

und somit

$$F_R = 6 * \pi * \eta_{20^\circ\text{C}} * r * v = 6 * \pi * \eta_{1^\circ\text{C}} * r * v^*$$

Damit schwebt die Kugel also in 1°C kaltem Wasser bei beispielsweise  $v = 10$  l/h auf der Skala des Rotameters, liegt der tatsächliche Volumenstrom wegen der erhöhten Viskosität auf nur  $v^* \approx 7$  l/h.

### ***Rückschlüsse von Erkenntnissen aus der Literaturrecherche auf die Versuchsdurchführung***

Im Großteil der zitierten Studien erfolgte die Adsorption pH-Wert abhängig. Je nach Material lag das Optimum der Adsorption von Bernsteinsäure in unterschiedlichen pH-Bereichen. Dies ist auf die Dissoziationsstufen der Bernsteinsäure zurückzuführen. Bei den beiden pKs-Werten (4,2 & 5,6) der Bernsteinsäure wird jeweils ein Wasserstoffion abgespalten. Die resultierenden Änderungen der Eigenschaften haben großen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten.

Außerdem hing die Kapazität der Adsorbermaterialien im hohen Maße von der Ausgangskonzentration der Bernsteinsäure ab. Je mehr Bernsteinsäure in der Lösung war, desto mehr konnte am Adsorber gebunden werden. Wurden bei einer anfänglichen Konzentration von 50 g/l bis zu 0,6 g Bernsteinsäure pro Gramm Material adsorbiert, sank die Kapazität proportional auf 0,06 g/g, wenn die Konzentration nur 5 g/l betrug. Der Gehalt der Bernsteinsäure im Bier ist mit 0,05 bis 0,15 g/l vergleichsweise gering [2] Geht man von einer linearen Abnahme der Kapazität bei sinkender Konzentration aus, ist eine Kapazität im Bereich von 0,001 g/g zu erwarten.

Das Adsorbermaterial wog weniger als 1 g/ml. Das Volumen der Säule betrug 44 ml. Es standen also weniger als 44 g Adsorptionsmittel für die Versuche zur Verfügung.

---

<sup>1</sup> Viskosität  $\eta$ , Radius  $r$ , Fließgeschwindigkeit  $v$

Unter Annahme der errechneten theoretischen Kapazität von 0,001 g/g könnten die Menge Material 0,044 g Bernsteinsäure adsorbieren. Bei einer Konzentration von 0,06 g/l Bernsteinsäure im Bier würden in diesem Versuchsaufbau etwa 0,7 Liter Bier vollständig von Bernsteinsäure befreit werden können.

Der Vorgang der Adsorption von Bernsteinsäure wurde als sehr schnell beschrieben. Trotzdem ist eine ausreichende Kontaktzeit von Bier am Adsorber wichtig. Geeignete Anströmgeschwindigkeiten für Festbettadsorber liegen bei 0,08 bis 0,33 m/s [16].

Die Grundfläche des Adsorbers beträgt ca. 0,001 m<sup>2</sup>. Damit lässt sich die Anströmgeschwindigkeit zu 0,00222 m/s bestimmen. Sie ist sehr langsam. Folglich ist so eine ausreichende Kontaktzeit in diesem Bereich des Volumenstroms gewährleistet.

### ***Versuchsdurchführung***

Zur Beeinflussung des Profils organischer Säuren im Bier wurden fünf Adsorbermaterialien getestet. In der ersten Versuchsreihe, den Vorversuchen, wurden mit jedem Adsorber zwei bis vier Adsorptionszyklen durchgeführt, um die Fähigkeit zur Aufnahme von Bernsteinsäure zu untersuchen. Das geeignetste Adsorbermaterial wurde anschließend genauer geprüft. Um die Regenerierbarkeit zu beurteilen, wurden dann mit diesem Adsorptionsmittel insgesamt zehn+1 Zyklen gefahren. Im letzten Zyklus wurde das Material mit 1 M HCl regeneriert. Ein vollständiger Zyklus bestand aus vier Phasen: Der Vorbehandlung des Adsorbers mit karbonisiertem Wasser, der eigentlichen Adsorptionsphase mit Bier als Feed, dem Regenerieren durch 2 %ige NaOH und der Neutralisierung - wieder mit karbonisiertem Wasser.

Der Zulaufstrom wurde kontinuierlich aus dem Feed-Fass mit 3 bar Überdruck durch das Adsorbermodul hindurch in das Auffangfass mit 2,5 bar Überdruck gefördert (siehe Abbildung 2). Während der Adsorptionsphase mit Bier wurden in definierten Zeitabständen Proben genommen. Die Volumenströme variierten in den verschiedenen Versuchsreihen zwischen 100 und 200 V<sub>R</sub>/h. Für die Auswertung wurden sämtliche Volumen in Relation zum Reaktorvolumen gesetzt.

### ***Übersicht der Versuche***

*Packen des Adsorbers:* Die Adsorbentien/Adsorbermaterialien wurden in eine gesättigte NaCl Lösung gegeben und 30 Min. ruhen gelassen. Eine Wasserstrahlpumpe wurde mit dem unteren Ende des Adsorbers verbunden und das Adsorbermodul oben geöffnet. Nun wurde die Suspension aus NaCl Lösung und Adsorbermaterial stetig auf den Adsorber gegeben. Durch das Vakuum wurde die Lösung abgesaugt und auf dem unteren Siebboden entstand ein homogener Adsorberkuchen in der Säule. Damit sich der Adsorberkuchen nicht frühzeitig entspannen konnte, wurde das Vakuum aufrecht erhalten, bis der obere Siebboden wieder aufgesetzt war.

*Probennahme:* Für die Probennahme wurde der Produktstrom auf den manuellen Abfüllgerät umgeleitet. Sauerstofffreies Abfüllen gelang, indem die Proben-Flaschen erst mit Wasser gefüllt wurden, das wiederum anschließend durch CO<sub>2</sub> mit einem Überdruck von 2,5 bar verdrängt wurde. Anschließend wurde die Probe in die vorgespannte (d.h. erhöhter Druck) Flasche gelassen. Die Proben wurden in definierten Zeitabständen genommen. Im Rahmen der ersten Versuchsreihe wurden in möglichst kleinen Abständen 60 ml Probe gezogen. In der zweiten Versuchsreihe wurden auch größere Volumina für Schaumtests und sensorische Beurteilung gezogen.

*Vorbehandlung und Neutralisieren des Adsorbers:* Vor jedem Adsorptionsdurchlauf wurde der Adsorber bei 100-200 V<sub>R</sub>/h 30 Minuten mit karbonisiertem Wasser gespült. Dadurch wurde Sauerstoff ausgetrieben bzw. das Adsorbermaterial nach der Reinigung mit NaOH neutralisiert und gewaschen.

*Karbonisieren des Brauwassers:* Das Brauwasser wurde über mehrere Tage bei 1 °C im Keg (Bierfass) mit CO<sub>2</sub> gesättigt bis sich ein Gleichgewichtsdruck von 0,8 bar eingestellt hatte. Bei diesem Dampfdruck lösten sich etwa cCO<sub>2</sub> = 5 g/l im Wasser, während sämtlicher Sauerstoff verdrängt wurde. (Der pH-Wert lag bei 4,8.)

Tabelle 1: Durchgeführte Analysen im Rahmen der ersten Versuchsreihe

Material	Zyklus	V [l/h]	Analysen
Agarose QXL	1	8	cSA, pH-Wert, Farbe, Extrakt- und Alkoholgehalt
Agarose QXL	2	8	cSA, pH-Wert, Farbe, Extrakt- und Alkoholgehalt
Agarose QXL	3	4	cSA, pH-Wert, Farbe, Extrakt- und Alkoholgehalt
Agarose QXL	4	4	cSA, pH-Wert, Farbe, Extrakt- und Alkoholgehalt
Diaion MA03SS	1	4	cSA, pH-Wert, Farbe, Extrakt- und Alkoholgehalt
Diaion MA03SS	2	4	cSA, pH-Wert, Farbe, Extrakt- und Alkoholgehalt
Workbeads 40Q	1	4	cSA, pH-Wert, Farbe, Extrakt- und Alkoholgehalt
Interchim UP40	1	4	cSA und pH-Wert

Tabelle 2: Durchgeführte Analysen an den Zyklen mit Diaion MA 03SS

Zyklus	cSA, pH, Farbe	Polyphenole	Stickstoff	Geschmack	Schaum	Trübung
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	-
7	+	-	-	+	-	+
8	+	-	-	+	-	+
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-

*Regenerierung des Adsorbermaterials:* Zur Regenerierung des gebrauchten Adsorbermaterials / der Adsorbens wurde die Anlage bei 100-200 V<sub>R</sub>/h für 20 Minuten mit 2 %iger Natronlauge gespült. Für die Natronlauge wurden 1,6 l 50 %iger NaOH in 38,4 l Wasser gelöst. Der pH-Wert lag bei 13,9. Die treibende Druckdifferenz zum Fördern der Natronlauge wurde durch Druckluft hergestellt.

**Tabelle 3: Übersicht über die Vorgehensweise bei Einbringung und Regenerierung des Materials**

Lauf	Einbringung in den Adsorber	Regenerierung	Neutralisierung
1*	+	ohne	karb. Wasser
2**	+	2% NaOH	karb. Wasser
3	+	1% NaOH + NaCL	karb. Wasser
4	-	2% NaOH	karb. Wasser
5	-	2% NaOH	karb. Wasser
6	-	2% NaOH	karb. Wasser
7	-	2% NaOH	karb. Wasser
8	-	2% NaOH	karb. Wasser
9	-	2% NaOH	karb. Wasser
10	-	2% NaOH	karb. Wasser
11	+	2% NaOH	1 mol Hcl

\*Material war neu    \*\* Material wurde zu 50% erneuert

*Reinigen des Adsorbers:* Zwischen der Versuchen wurde der Aufbau demontiert, gereinigt und in einer alkalischen Reinigungslösung gelagert.

#### *Weitere Versuche*

Da das basische Metalloxid zu feinkörnig und somit nicht für die Verwendung im kontinuierlichen Adsorber geeignet war, wurde mit diesem Adsorptionsmittel ein Satzversuch durchgeführt.

Die Vorbehandlung des Materials wurde mit 1 M HCl durchgeführt. Die Flüssigkeit mittels Vakuumpumpe abgezogen. 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 g des Materials wurden je mit 50 ml Bier versetzt und 24 Stunden auf Schüttler dem Schüttler langsam gemischt.

Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit sich die Bernsteinsäure in Form von Calciumsuccinat fällen lässt. Dafür wurden jeweils 0,5 l Bier mit Calciumchlorid (Dihydrat) versetzt (Mengenverhältnis Ca zu Sa: 1, 5, 10, 20-fach), kurz geschüttelt und zwei Wochen bei 1°C ruhen gelassen.

Im Bier sind 50-150 mg/l Bernsteinsäure enthalten [2]. Die molare Masse beträgt 118,2 g/mol [15]. Somit sind im Liter Bier weniger als 1,27 mmol Bernsteinsäure vorhanden. Die molare Masse vom Calciumchlorid Dihydrat entspricht 147,02 g/mol. Der 1-fachen Menge Bernsteinsäure entsprechen folglich 0,19 g Calciumchlorid Dihydrat pro Liter Bier. Das 20-fache Mengenverhältnis wird durch die Zugabe von 3,73 g Calciumchlorid Dihydrat erreicht.

#### *Analytik*

Die gezogenen Proben wurden anschließend ausgiebig analysiert. Das Hauptaugenmerk lag auf dem Einfluss, den das jeweilige Adsorbermaterial auf den Verlauf der Bernsteinsäurekonzentration hatte. Je mehr Bernsteinsäure aus dem Bier entfernt wurde, desto besser. Außerdem wurden bei den Proben der Vorversuche die Verläufe von Farbe, pH-Wert, Dichte und Extraktgehalt analysiert, da diese Werte gute Indizien über die

weiteren Effekte des Adsorbermaterials auf das Bier liefern. Danach wurde das geeignetste Adsorbermaterial intensiver getestet. Zu den oben genannten Verläufen wurden die Einflüsse auf Geschmack, Haltbarkeit des Schaums, Proteingehalt, Polyphenolgehalt sowie auf das Gesamtionenprofil untersucht.

*Bernsteinsäurekonzentration:* Der Nachweis der Bernsteinsäure erfolgte mittels Enzymtest der Firma R-Biopharm AG [25].

*pH-Wert:* Die Bestimmung des pH-Wertes ( $\text{pH} = -\log \text{CH}_3\text{O}^+$ ) erfolgte elektrometrisch mit einem pH-Meter von Mettler Toledo [26].

*Farbe, Dichte, Extraktwert, Alkohol:* Die Verläufe von Farbe, Dichte, Extraktwert und Alkohol wurden mit dem Alcoalyzer-Bieranalysensystem von Anton Paar ermittelt. Der Beer Analyzer von Anton Paar sowie die Kombination aus Dichtemessung und NIR-Spektroskopie (DMA und Alcoalyzer) sind als anerkannte Methoden für die Messung von Alkohol, Extrakt und Stammwürze in Bier im Methodenbuch der MEBAK, vol. II, 2002 angeführt [26].

*Polyphenolgehalt:* Polyphenole reagierten mit Eisen(II)-Ionen in alkalischer Lösung unter Bildung gefärbter Eisenkomplexe; die entstehende bräunliche Farbe wurde spektralphotometrisch gemessen [26].

*Proteingehalt:* Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl wird in folgende Schritte eingeteilt: a) Aufschluss der Probe (Oxidation der Stanz zu  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ) b) Destillation (Überdestillieren des  $\text{NH}_3$  in eine Borsäurelösung) c) Titration (Ermittlung der nach der Destillation in der Vorlage vorhandenen Menge an  $\text{NH}_3$ ) [26].

*Geschmack:* In braungefärbten zylindrischen 200 ml-Prüfgläsern wurde das Bier möglichst schaumfrei eingeschenkt und von ausgewählten und geschulten Prüfern getestet und in den Kategorien Geruch, Reinheit des Geschmacks, Vollmundigkeit, Rezenz und Qualität der Bittere nach DLG Schema sensorisch bewertet [26]. Zusätzlich wurde den getesteten Bieren, entsprechend der Präferenz, ein Rang zugeteilt.

*Schaumhaltbarkeit:* Die Schaumbestimmung wurde mit dem Lg-Foamtester durchgeführt. Die Schaumerzeugung erfolgte dafür durch Pressen eines konstanten Biervolumens durch eine 0,6 mm weite Düse. Dahinter entwickelte sich der Schaum in einem Glaszylinder, wo sein Zerfall durch optische Messung erfasst wird. Die genaue Dosierung der vorgegebenen Biermenge erfolgte durch Vorspannen der Probenflasche mit 2,5 bar (+ 5 mbar) [26].

*Gesamtionenprofil:* Das Profil der Gesamtionen wurde mit folgendem Ionenchromatograph mit anschließender Leitfähigkeitsdetektion ermittelt:

*Ionenchromatograph:* ICS 5000 der Firma Dionex, einschließlich Gradientenpumpe, Autosampler, Leitfähigkeitsdetektor, Eluentengenerator und Säulenofen

*Trennsäulen:* AS11-HC (I.D. 2 mm x L. 250 mm), Vorsäule AG11 (I.D. 2 mm x L. 50 mm)

*Suppressor:* ASRS Ultra II (2mm)

*Fluss:* 0,28 mL/ min, Konzentrationsgradient: A: NaOH 100 mM / B: Reinstwasser 0,05  $\mu\text{S}$ , Säulentemperatur: 40 °C, Suppressorcurrent: 31 mA

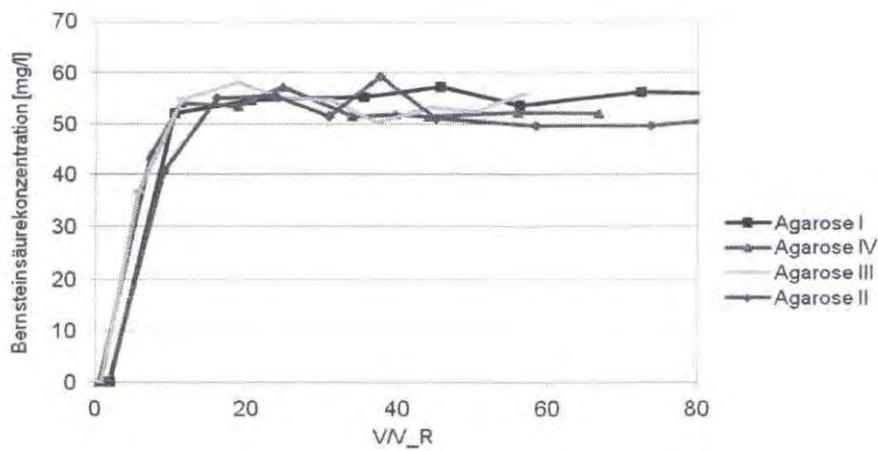
*Forciertest zur Bestimmung der Trübungsstabilität:* Die Feststellung der voraussichtlichen trübungsfreien Lebensdauer des Bieres erfolgte durch die Forciermethode. Hierbei wurden das behandelte Bier und (zum Vergleich) das unbehandelte Referenzbier abwechselnd 24h Temperaturen von 40°C und 0 °C ausgesetzt. Die Trübung wurde jeweils nach der 24h-Kältephase gemessen [26].

## Ergebnisse und Auswertung

Die Messdaten wurden gegen das relative Reaktorvolumen  $VR = V/V_0$  aufgetragen. Dabei ist  $V_0$  das Volumen des Adsorbers. Dadurch sind die Ergebnisse der Versuche mit denen anderer Studien vergleichbar und erleichtern Überlegungen zur Skalierbarkeit.

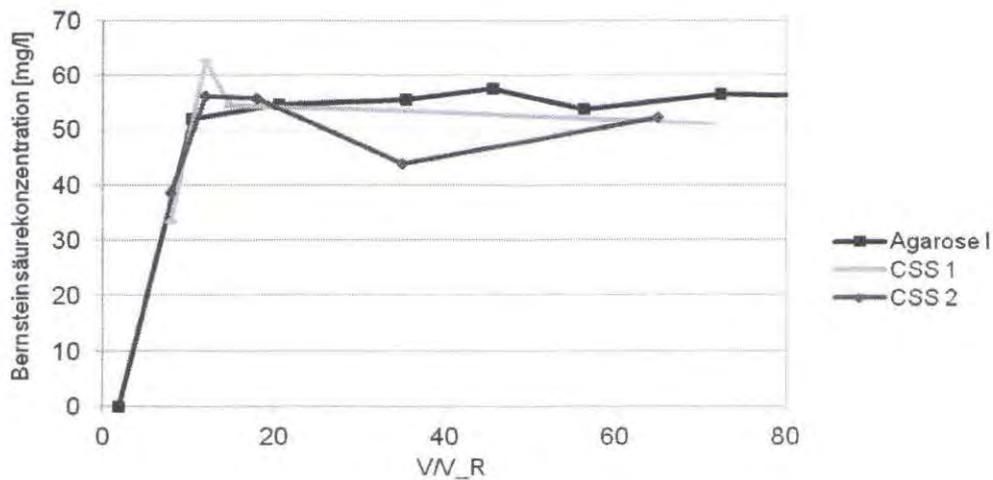
### *Erste Versuchsreihe*

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe wurden vier Adsorbermaterialien auf ihre Aufnahmefähigkeit von Bernsteinsäure untersucht. Zu Beginn wurden die Agarose Beads QXL von GE Healthcare getestet. Dabei handelte es sich um dasselbe Material, das im Combined-Stabilization-System (CSS) der Handtmann Holding GmbH & Co. KG Einsatz findet. Es wurden vier vollständige Adsorptionszyklen gefahren. Dabei wurde der Volumenstrom zwischen 4 und 8 l/h variiert.



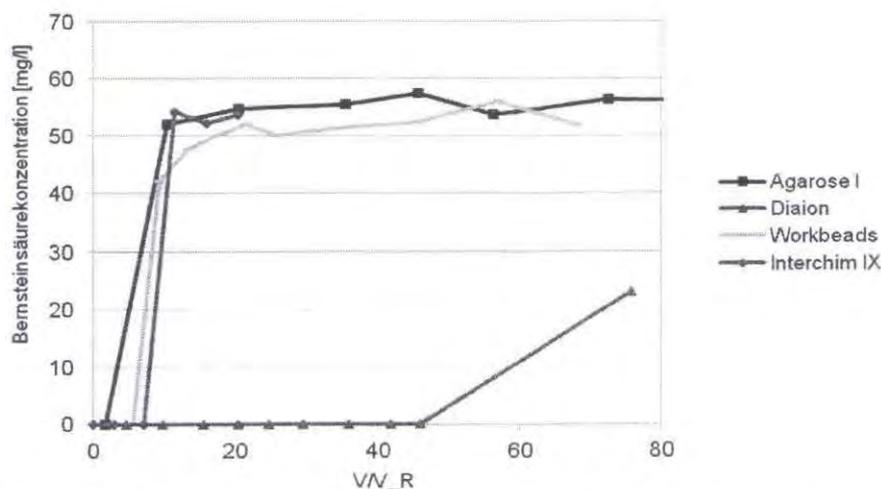
**Abbildung 3: Verläufe der Bernsteinsäurekonzentration bei Adsorption mit Agarose QXL – Läufe 1 und II: Volumenstrom 8 l/h; Läufe III und IV: Volumenstrom 4 l/h**

Die Versuche haben gezeigt, dass das Adsorptionsverhalten innerhalb dieses Bereichs unabhängig vom Volumenstrom war. Es konnte reproduzierbar gearbeitet werden (Abbildung 3). Die Adsorptionsrate war über die vier Zyklen konstant. Die Bernsteinsäurekonzentration wurde über die ersten zehn Reaktorvolumen (VR) herabgesetzt. Zu Beginn lag durch die Verwendung karbonisierten Wassers ein Verdünnungseffekt ( $VR < 10$ ) vor. Dieser spiegelte sich im Verlauf des Extraktwerts wieder. Der Farbwert war nach zehn Reaktorvolumen um zwei EBC Einheiten reduziert und erreichte erst nach über 50 Reaktorvolumen annähernd den Ausgangswert. Der pH-Wert stieg kurz an bis auf fast 6 ( $VR = 10$ ), fiel danach wieder ab und erreichte ab ca.  $35 \times VR$  den Ausgangswert. Der Effekt der Agarose Beads QXL wurde von der VLB-Berlin auch im Industriemaßstab untersucht (Abbildung 4). Die Ergebnisse von Labor- und Industrierversuch decken sich nahezu perfekt.



**Abbildung 4: Vergleich der Verläufe der Bernsteinsäurekonzentration bei Adsorption mit Agarose QXL im Labor- und Industrierversuch (Combined Stabilization System)**

Die weiteren Materialien wurden ebenfalls in je zwei Zyklen getestet (Abbildung 5). Die Workbeads 40 Q und das Interchim UP60-SAX hatten anfangs einen etwas größeren Effekt auf die Bernsteinsäurekonzentration. Im Folgenden stieg Wert wie auch bei Agarose QXL sehr schnell an und erreichte bei zehn bzw. 20 x VR den Ausgangswert. Die Verläufe von pH-Wert und Farbe waren ebenfalls vergleichbar. Ein anderes Bild ergab die Analyse der ersten beiden Zyklen des Diaion MA03SS. Das Niveau der Bernsteinsäurekonzentration im Bier blieb fast 50 Reaktorvolumen unter der Nachweisbarkeitsgrenze von 7,5 mg/l. Allerdings dauerte der Effekt des Adsorbers auf den pH-Wert ähnlich lange an. Einem schnellen Anstieg auf bis zu pH 6 folgte ein sehr langsamer Abfall, bis ca. VR = 80. Farbe und Extraktgehalt wurden nur zu Beginn beeinflusst (Abbildung 6).



**Abbildung 5: Übersicht über die Verläufe der Bernsteinsäurekonzentration bei Adsorption mit verschiedenen Materialien**

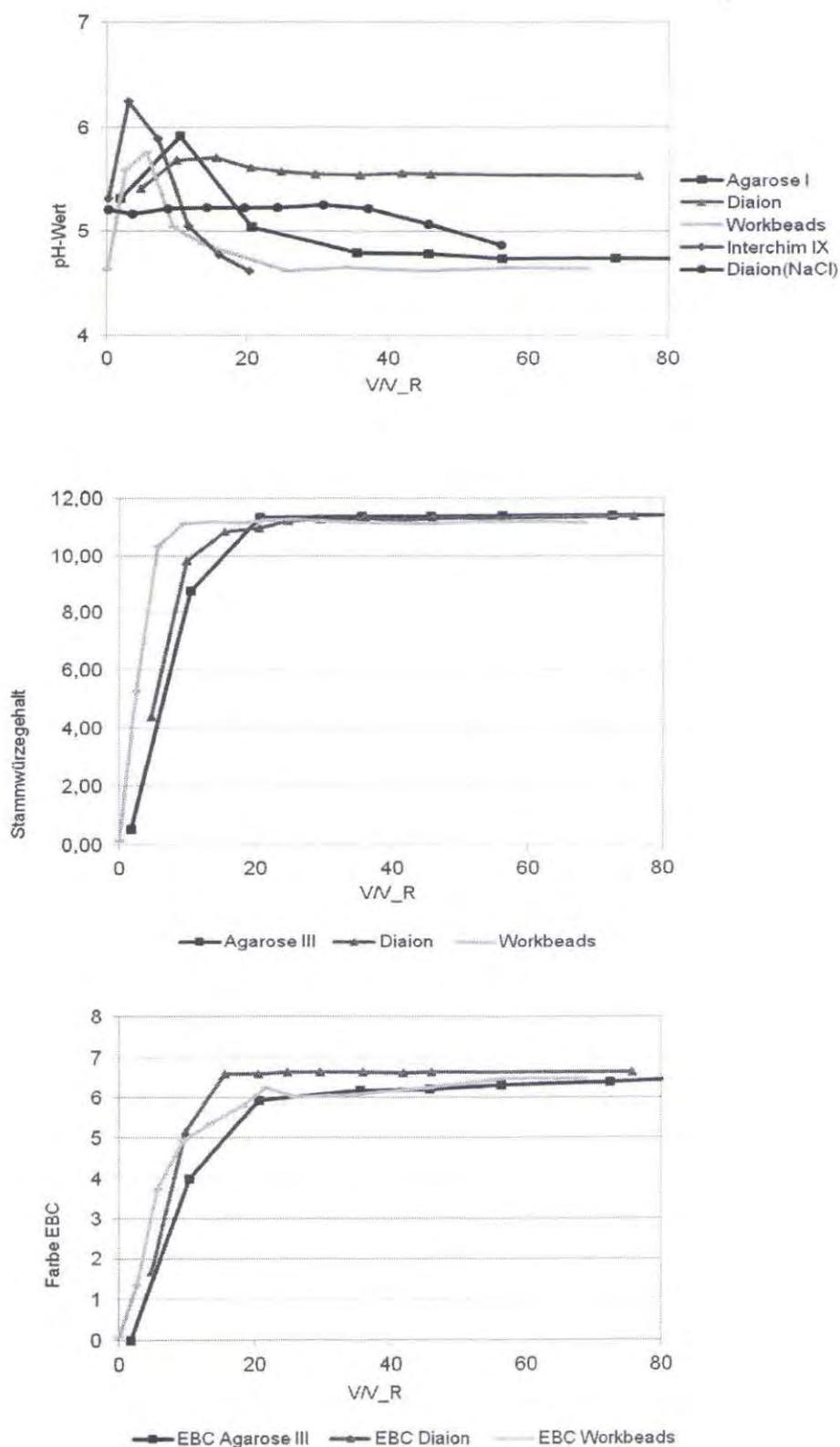


Abbildung 6: Übersicht über die Nebeneffekte auf pH, Extrakt- und Farbwerte bei Adsorption mit verschiedenen Materialien

### *Zweite Versuchsreihe*

Wegen des deutlich größeren Effektes des Diaion MA03SS auf die Konzentration der Bernsteinsäure wurde nur dieses Material für die intensivere zweite Versuchsreihe berücksichtigt. Es folgten acht Zyklen, um Rückschlüsse auf die Regenerierbarkeit zu ziehen.

Der Effekt des Adsorbermaterials MA03SS war über zehn Zyklen stabil und reproduzierbar. Bis zum 50. Reaktorvolumen wurde die Konzentration der Bernsteinsäure im Bier unter die Nachweisbarkeitsgrenze gebracht. Danach stieg sie steil an und überschritt kurz den Gehalt im unbehandelten Bier. Es ist anzunehmen, dass bereits adsorbierte Bernsteinsäure sich vom Material löste und mit dem Bier ausgewaschen wurde.

Nach normaler Regenerierung mit NaOH und anschließender Neutralisierung mit karbonisiertem Wasser hatte das Material einen stark pH-Wert steigernden Effekt. Von Anfangs pH 6 senkte sich der pH-Wert sehr langsam und erreichte erst nach 80 x VR wieder den Ausgangswert von pH 4,68. Bei Durchlauf 1 wurde das regenerierte MA03SS in einer gesättigten Salzlösung auf den Adsorber gezogen. Dabei wurden OH-Ionen durch Cl- Ionen ersetzt. Der pH-Wert steigernde Effekt des Adsorbermaterials wurde dadurch abgesenkt. Beim dritten Durchlauf wurde das Material in einer Lösung aus NaOH und NaCl aufgezogen. Der resultierende pH-Wert war etwas höher als im ersten Durchlauf.

Vergleicht man die Verläufe von Bernsteinsäurekonzentration und pH-Wert, so fällt auf, dass der Gehalt der Bernsteinsäure schlagartig ansteigt, sobald der pH-Wert unter den pKs2-Wert von 5,61 sinkt. Das behandelte Bier wurde anfangs stark entfärbt. Nach 15 x VR erreichte die Farbe einen EBC-Wert von über 6. Die Art der Regenerierung schien keinen Einfluss auf die Farbe zu haben.

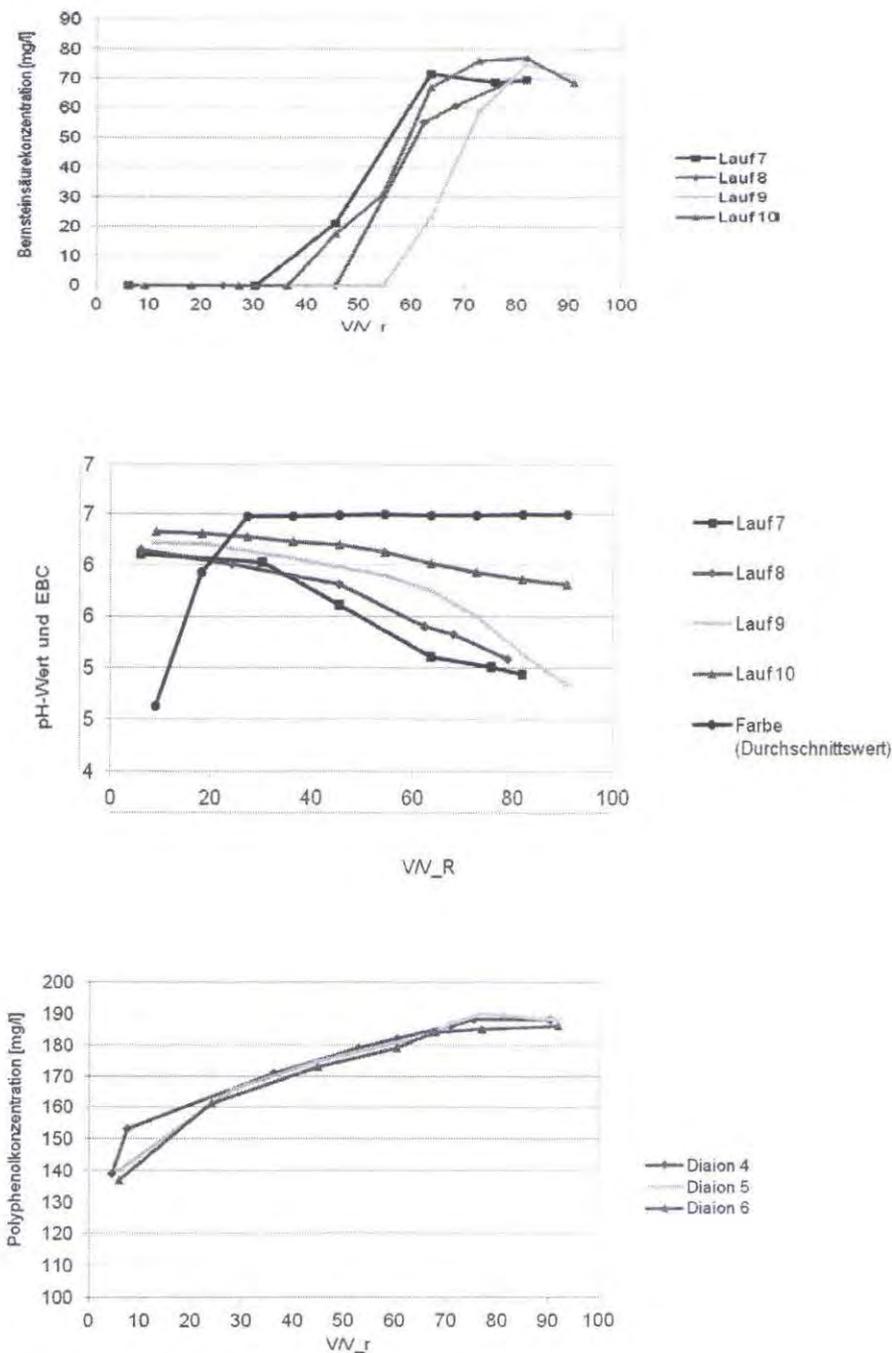


Abbildung 7: Verläufe von Bernsteinsäurekonzentration (oben), pH-Wert und Farbe [EBC] (mittig), Polyphenolgehalt (unten) bei der Adsorption mit DiaIon MA03SS

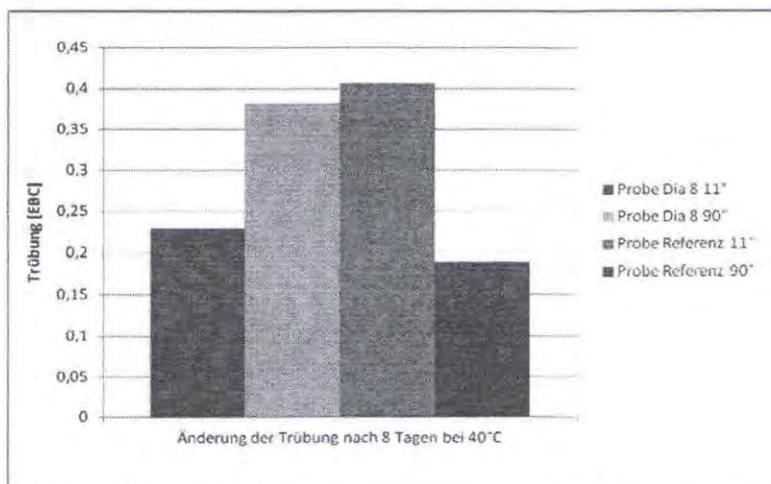
Der Stickstoffanteil wurde bei Adsorption nach normaler Regenerierung stark reduziert. Hatte das Bier im unbehandelten Zustand einen Stickstoffanteil von 654 ppm, sank dieser im Bier hinter dem Adsorber auf 435-546 ppm ab. Obwohl die Qualität des Schaumes maßgeblich von den Proteinen im Bier abhängt, wurde die Schaumhaltbarkeit überhaupt nicht beeinträchtigt (vgl. Bierbestandteile). In den Reihen 1 & 3, in denen der Adsorber in einer NaCl-Lösung aufgezogen wurde, konnte weder ein Einfluss auf den Stickstoffanteil

noch auf die Schaumhaltbarkeit beobachtet werden. Die Unterschiede der Stickstoffgehalte beruhen auf verschiedenen Zeitpunkten, zu denen die Proben genommen wurden. Die Probenvolumina für die Analysen wurden aus mehreren Verlaufsproben zusammengestellt, wobei die genaue Zusammensetzung variierte (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Ergebnisse des Schaumhaltbarkeitstests und der Messung des Gesamtstickstoffes**

Probe	Schaumhaltbarkeit [s]	Eiweiß [g/100ml]	Stickstoff [ppm]
Referenz 1	86	0,42	654
Dialon 3	85	0,41	654
Referenz 2	89	0,41	661
Dialon 4	86	0,22	546
Dialon 5	84	0,3	488
Dialon 6	85	0,27	425

Zur Trübung können auch Polyphenole beitragen. Der Polyphenolgehalt wurde durch die Anwendung des Adsorbers anfangs auf 140 mg/l herabgesetzt und erreichte erst nach 80 x VR den Ausgangswert von 185 mg/l (Abbildung 7). Eine Auswirkung dieser verringerten Polyphenolgehalte bei behandelten Bieren bewirkte jedoch kaum einen Unterschied in der Trübungsbildung nach 8 tägiger Lagerung bei 40 °C.



**Abbildung 8: Vergleich der Trübungszunahme nach 8 Warmtagen bei 40 °C**

Das Ionenchromatogramm veranschaulicht gut den Effekt des Adsorbers auf das Gesamtionenprofil. Es zeigt sich, dass unterschiedliche Affinitäten der Ionen existieren. So zeigen nach Durchfluss von 50 Reaktorvolumen bereits einige Ionen einen Durchbruch (z.B. Phosphat) andere sind weiterhin unter der Nachweisgrenze (Succinat). Im Vergleich dazu ist ersichtlich, dass unterschiedliche Vorbehandlungen des Adsorbers Unterschiede in der Kapazität hervorrufen können (Abbildung 10).



Abbildung 9: Ionenchromatogramm der Proben zu Beginn der Adsorption  $V_R = 10$  (unten), bei  $V_R = 50$  (mitte) sowie des unbehandelten Bieres (oben). Sowohl nach Durchlauf des 10- als auch dem 50-fachem Reaktorvolumen ist die Bernsteinsäure (Succinat) nicht nachzuweisen. Andere Ionen sind bei  $V_R 50$  bereits wieder vorhanden. Das Chromatogramm wurde mit Proben aus Lauf 4 erstellt. Die Pfeile weisen auf den Punkt im Chromatogramm hin, an dem normalerweise Maleat sich befindet (Eine Dicarbonsäure mit ähnlichem physiologischem Effekt wie Bernsteinsäure).

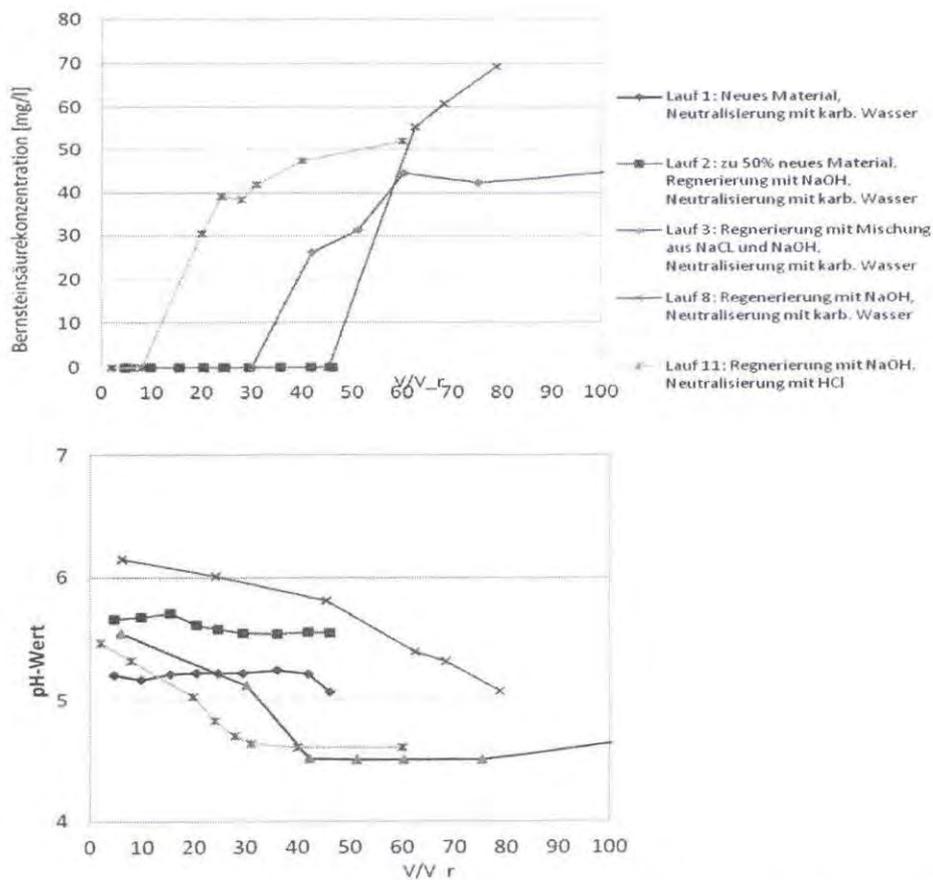


Abbildung 10: Verläufe für pH-Wert und Bernsteinsäurekonzentration bei verschiedenen Läufen über Adsorbentmaterial DiaIon MA03SS. Die Läufe hatten unterschiedliche Regenerations- und Vorbereitungsschritte (vergleiche Tabelle 3). Darstellung von Lauf 8 stellvertretend für die Läufe 4-10. Bernsteinsäurekonzentration für Lauf 1 und 2 sind identisch (auf der o Linie) und wurden bereits bei 40 Reaktorvolumen abgebrochen.

*Ergebnis des sensorischen Tests:* Der Geschmack ist wahrscheinlich das wichtigste Kriterium zur Beurteilung der Bierqualität. Durch den Einsatz des Adsorbers wurde der pH-Wert stark angehoben. Dies hat auch einen starken Effekt auf den Geschmack. Im Besonderen die Bittere des Bieres wird bei höherem pH-Wert als unangenehm und kratzig empfunden [27].

In einem sensorischen Test wurden sowohl das behandelte Bier mit erhöhtem pH-Wert als auch eine auf pH 5 angesäuerte Probe des behandelten Bieres dem Referenzbier gegenübergestellt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Geschmack durch den Adsorber beeinträchtigt wird (Proben Dia 4 und 5). Durch Ansäuerung kann der Effekt jedoch fast ausgeglichen werden:

**Tabelle 5: Ergebnisse der Verkostung nach Schema DLG:**

Probe	Dia 6 angesäuert	Referenz	Dia 4	Dia 5
Geruch	4,8	4,8	4,3	4,3
Reinheit des Geschmacks	4,3	4,5	3,8	3,8
Vollmundigkeit	4,0	4	4,0	4,0
Rezenz	4,0	4,5	4,0	5,0
Qualität der Bittere	4,5	4,5	3,8	3,3
Rang	2,8	1,5	3,3	3,3

#### *Weitere Versuche*

*Ergebnisse des Metalloxids im Satzversuches:* Im Satzversuch wurden je 1, 3, 6, 8 und 10 ml Metalloxid (< 1 g/ml) mit 50 ml Bier versetzt. 1 g Adsorbermaterial senkte die Bernsteinsäurekonzentration in 50 ml Bier um ca. 5 mg.

*Ergebnisse des Fällungsversuchs mit Calciumchlorid:* Es wurde keine signifikante Änderung der Bernsteinsäure erzielt.

## Diskussion

Im kontinuierlichen Adsorptionsprozess wurden vier Materialien bezüglich ihrer Aufnahmefähigkeit von Bernsteinsäure in Bier untersucht. Des Weiteren wurden Effekte der Materialien auf die Größen pH-Wert, Farbe, Extrakt- und Alkoholgehalt analysiert. Im Satzversuch kam ein weiteres Material zum Einsatz. Zudem wurde die Fällbarkeit von Bernsteinsäure durch  $\text{CaCl}_2$  getestet.

In Hinsicht auf die Adsorptionsfähigkeit der Materialien war das Diaion MA03SS den anderen stark überlegen. Zusätzliche Analysen wurden durchgeführt, die den Einfluss auf Geschmack, Schaumhaltbarkeit, Alterungsverhalten, Polyphenol- und gesamt Stickstoffkonzentration sowie auf das Gesamtionenprofil aufzeigten. Diese waren wichtig, um ein möglichst gesamtheitliches Bild über das finale Produkt zu bekommen, ein Bier, das durch reduzierten Bernsteinsäuregehalt magenfreundlicher und bekömmlicher sein kann.

Während bei den Adsorbentien Agarose QXL, Workbeads 40Q und Interchim UP40 der Effekt auf die Bernsteinsäurekonzentration nach zehn Reaktorvolumen nicht mehr nachweisbar war, konnten durch den Einsatz des Diaion MA03SS in bis zu 50 Reaktorvolumen Bier die Bernsteinsäure unter die Nachweisbarkeitsgrenze gesenkt werden. Bei der Fällung und dem Satzversuch konnten keine großen Effekte beobachtet werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert. Der Schwerpunkt liegt dabei auf dem geeignetsten Material, dem Diaion MA03SS.

Bei Adsorptionsversuchen der Aufreinigung von biotechnologisch hergestellter Bernsteinsäure aus einem simulierten Fermentationsmedium war die Ausgangskonzentration der Bernsteinsäure (5 g/l) um ein vielfaches höher als im Bier (0,060 g/l). Es wurde beschrieben, dass die Kapazität im hohen Maße von der Konzentration abhing. Je mehr Bernsteinsäure in der Lösung war, desto höher die jeweilige Kapazität. Wurden von den besten Materialien bei einer anfänglichen Konzentration von 50 g/l bis zu 0,6 g Bernsteinsäure pro Gramm Material adsorbiert, sank die Kapazität proportional auf 0,06 g/g, wenn die Konzentration nur 5 g/l betrug [28, 17]. Ausgehend von einer linearen Abnahme der Kapazität bei sinkender Konzentration, war eine Kapazität im Bereich von 0,001 g/g zu erwarten.

Das Reaktorvolumen betrug 0,044 ml. Das Diaion MA03SS hatte eine Dichte kleiner 1 g/ml. Es standen also weniger als 44 g Material für die Adsorption zur Verfügung. In 50 Reaktorvolumen wurde die Bernsteinsäurekonzentration unter die Nachweisbarkeitsgrenze gebracht. Die Ausgangskonzentration lag bei ca. 60 g/ml. Somit wurden 132 mg Bernsteinsäure von weniger als 44 g Adsorbentmaterial aufgenommen. Die resultierende Kapazität war mindestens 0,003 g/g. Im Vergleich zu Ergebnissen aus der Literatur ist die erreichte Kapazität von 0,003 g/g ein hoher Wert.

Die Kapazität war über zehn Zyklen stabil. Die Regenerierung mit 2%iger Natronlauge gefolgt von der Neutralisierung mit karbonisiertem Wasser war geeignet, um die Kapazität vollständig wiederherzustellen. Der Volumenstrom unterlag messtechnisch bedingten Schwankungen, die es nicht erlaubten einen Kapazitätsverlust im Prozentbereich beobachten zu können. Gemäß einer persönlichen Mitteilung von Biokal Labystems gibt es Anwendungen, in denen das Material über mehr als zwei Jahre stabil regenerierbar bleibt. Mechanisch verursachte Materialschäden können als 'gebrochene Bead' unter dem Mikroskop kontrolliert werden (Abbildung 1). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit gab es keine sichtbare Abnutzung.

Ein Nebeneffekt, den alle kontinuierlich durchgeführten Adsorptionsversuche hatten, war der mindestens zu Beginn stark angehobene pH-Wert. Von pH 4,68 stieg dieser bis auf pH 6 an.

Dieses Phänomen kann verschiedene Ursachen gehabt haben. Zum einen könnten Säuren aus dem Bier adsorbiert werden, dadurch stiege der pH-Wert direkt.

Eine andere Ursache könnte auf die Vorbereitung beziehungsweise die Regenerierung des jeweiligen

Materials zurückzuführen sein. Dies soll am Beispiel des Diaion MA03SS erläutert werden. Als funktionelle Gruppe hat der starkbasische Anionenaustauscher eine quaternäre Ammoniumgruppe. An dieser können Anionen binden. So auch Succinat, das Anion der Bernsteinsäure. Wichtig für das Verständnis ist, dass diese nur durch Substitution abgelöst werden können.

Bei der Vorbehandlung/Regenerierung des Adsorbers werden sämtliche Anionen durch Hydroxidionen ( $\text{OH}^-$ ) ersetzt. Durch das Neutralisieren mit karbonisiertem Wasser werden diese vor der eigentlichen Adsorptionsphase durch die Anionen der Kohlensäure ausgetauscht. Da der pH-Wert während der Adsorption mit Bier dennoch so stark ansteigt, ist denkbar, dass diese Verdrängung von  $\text{OH}^-$ -Ionen durch Carbonat-Ionen bei der Neutralisierung nicht vollständig stattfindet. Das kann an dem Dissoziationsverhalten der Kohlensäure liegen. Die Grundlage für diese Überlegung wird in Abbildung 11 gezeigt. Solange  $\text{OH}^-$ -Ionen vom Adsorber gelöst wurden, wurde ebenfalls der pH-Wert im karbonisierten Wasser angehoben. Das Gleichgewicht der Kohlensäure verschob sich in Richtung von Carbonat und Hydrogencarbonat (rechts in Abbildung 11). Diese Anionen waren in der Lage, Hydroxidionen zu ersetzen. Fiel in der Folge der Neutralisation der pH-Wert weiter ab, lag die Säure protoniert vor und war somit kein Anion mehr. Eine weitere Verdrängung fand folglich nicht statt. Dieser Sachverhalt lässt die Annahme zu, dass sich beim Neutralisieren mit karbonisiertem Wasser kein tieferer pH-Wert erreichen lässt. Erst Anionen aus dem Bier substituierten dann wieder Hydroxidionen. Der pH-Wert steigt an.

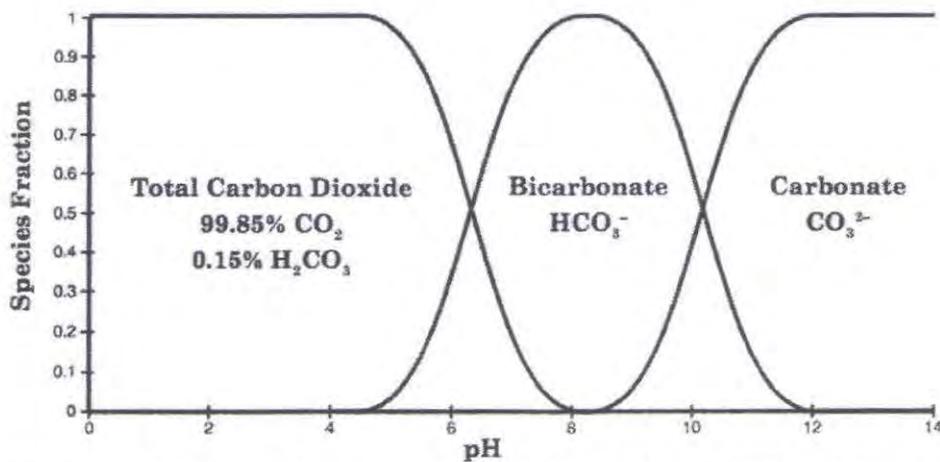


Abbildung 11: Carbonat-Gleichgewichte-pH - Die pH-Wert-Abhängigkeit der Dissoziationsstufen von Kohlensäure in Wasser [29]

In Abbildung 10 wurden die Verläufe von Bernsteinsäurekonzentration und pH-Werte bei verschiedenen Regenerierungsweisen gegenübergestellt. Die Läufe 1-3 und 11 stellen Sonderfälle da. Lauf 8 repräsentiert den Standard (Läufe 4-10). Es wurde nur mit NaOH regeneriert und karbonisiertem Wasser neutralisiert. Die Läufe 2 und 11 wurden davor mit NaOH regeneriert. Die Regenerierung von Lauf 3 erfolgte in einer Lösung aus NaCl und NaOH. Neutralisiert wurden Lauf 1, 2 und 3 mit karbonisiertem Wasser. Lauf 11 mit 1 M HCl. Zudem war das Adsorbermaterial im Lauf 1 neu und in Lauf 2 zur Hälfte erneuert worden.

Betrachtet man die resultierenden Ausgangs-pH-Werte, so ergibt sich folgende Reihenfolge. Am niedrigsten war der pH-Wert, wenn das Material wie in Lauf 1 frisch war und nicht mit NaOH regeneriert wurde. Deutlich höher lag der pH-Wert von Lauf 8 nach Regenerierung mit NaOH und anschließender Neutralisierung mit HCl. Lauf 2 bewegt sich dazwischen.

Wurde das Material in NaOH und HCl regeneriert, ergab sich lediglich ein leicht erhöhter pH-Wert (Lauf 11) im Vergleich zu Lauf 8. Allerdings war hier auch die Adsorptionskapazität sehr schnell erschöpft. Im Vergleich kann Lauf 3 betrachtet werden. Auch hier wurden wie in Lauf 11  $\text{Cl}^-$ -Ionen in das System

eingebraucht, allerdings während des Regenerationszyklus. Der Verlauf für den pH-Wert (nicht so stark verändert, wie für Lauf 8), aber auch die Kapazität zur Adsorption der Bernsteinsäure (bei weitem nicht so stark abgesenkt wie für Lauf 11) scheinen hier einen guten Kompromiss zu finden.

Lauf 1 und 2 dagegen stellen eine völlig andere Vergleichsläufe dar. Es scheint als würde die Vorkonditionierung durch den Hersteller eine große Kapazität bereitzuhalten, bei gleichzeitig moderater pH-Wert Beeinflussung.

Folglich kann festgehalten werden, dass die Konditionierung des Adsorbermaterials entscheidend ist für den Adsorptionserfolg. Dazu ist es sinnvoll einen Blick auf das für Lauf 4 exemplarisch erstellt Ionenchromatogramm zu werfen. Abbildung 9 zeigt das Ionenchromatogramm von Lauf 4 (Standardregeneration) zu drei Zeitpunkten. Zu Beginn ( $V_R = 10$ ) ist die Konzentration vieler Ionen reduziert. Bei Reaktorvolumen 50 steigt die Konzentration einiger Ionen wieder an. Der Bernsteinsäuregehalt (Succinat/Malat-peak) ist noch sehr gering. Die obere Linie zeigt das unbehandelte Bier. Neben dem Peak der Bernsteinsäure ist die Konzentration des Chlorids besonders interessant. Man erkennt, dass zwischen den Größen der Peaks des Chlorids bei Reaktorvolumen 10 und 50 kaum ein Unterschied besteht. Erst (irgendwann) danach steigt der Gehalt an. Nun ist zu bemerken, dass bei einem Ionenchromatogramm einer Lösung mit solch komplexer Matrix wie der von Bier, Überlagerungen von Substanzen vorliegen können. Es ist denkbar, dass sich im Peak des Chlorids eine weitere Substanz verbirgt. Diese Substanz könnte für die nahezu identische Peakgröße bei Reaktorvolumen 10 und 50 verantwortlich sein. Zu diesen Zeitpunkten wäre dann die Konzentration des Chlorids nicht nachweisbar.

Es ist möglich, dass der Anstieg der Konzentrationen von Chlorid und Succinat zu einem ähnlichen Zeitpunkt eintritt und beide Anionen konkurrieren. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die reduzierte Aufnahmefähigkeit von Bernsteinsäure bei den Läufen 3 und 11 dar. Trifft diese Erklärung zu, eignet sich Salzsäure nicht zur Neutralisation des Adsorbermaterials. Eine Alternative könnte Phosphorsäure sein. Der Gehalt des Phosphats ist zu Beginn ebenfalls stark reduziert. Nach 50 Reaktorvolumen steigt er aber bereits wieder an, während die Konzentration der Bernsteinsäure unter der Nachweisbarkeitsgrenze verbleibt. Dies deutet an, dass der Adsorber möglicherweise eine höhere Selektivität bezüglich der Bernsteinsäure hat und diese die Anionen der Phosphorsäure verdrängen mag.

Der hohe pH-Wert ist für Bier problematisch. Das hat die sensorische Beurteilung des behandelten Bieres gezeigt. Durch den Einsatz des Adsorbers wird nicht nur Bernsteinsäure, sondern auch eine Reihe weiterer Substanzen aus dem Bier entfernt. Die Beeinträchtigung des Geschmacks durch den Adsorber ist enorm. Jedoch konnte durch Korrektur des pH-Wertes, also durch Ansäuern des Bieres, diese Beeinträchtigung aufgehoben werden. Sie war also vorwiegend auf den erhöhten pH-Wert zurückzuführen.

Neben der Bedeutung für den Geschmack ist ein niedriger pH-Wert enorm wichtig für die biologische Stabilität des Bieres, da viele pathogene Keime wie Salmonella und Staphylococcus nicht überleben können. Daher ist eine Ansäuerung des Produktes unerlässlich [30].

Eine in dieser Untersuchung nicht verfolgte Möglichkeit könnte die natürliche Säuerung mit Hilfe von Milchsäure sein. Da diese während der Adsorption nicht aus dem Bier genommen wird (Abbildung 9), könnte die Säuerung auch schon vor der Behandlung erfolgen, sofern die Adsorption ähnlich gut im sauren Medium erfolgt. Dieser Punkt sollte in weitergehenden Untersuchungen verfolgt werden.

Untersucht wurde auch die Stabilität bezüglich der Trübungsproblematik. Durch die Adsorption wurden der Polyphenol- und der gesamt Stickstoffgehalt im Bier reduziert. Diese beiden Stoffgruppen spielen eine große Rolle bei der Trübungsbildung. Werden diese Substanzen entfernt, könnte sich die Stabilität erhöhen. Ein durchgeführter Stabilitätstest mit den Bieren der Versuche zeigte jedoch, dass der verminderte Gehalt an Proteinen (Tabelle 4) und Polyphenolen (Abbildung 7) kaum Einfluss auf die Trübungsstabilität in einem Forciertest hat (Abbildung 8). Daher scheint es so, dass durch die Adsorption keine Trübungsbildenden Substanzen entfernt wurden.

Die Qualität des Schaumes hängt vor allem von der Proteinzusammensetzung ab. Trotz der Reduktion des Stickstoffanteils wurde die Haltbarkeit des Schaumes nicht beeinflusst. Daraus lässt sich schließen, dass keine schaumpositiven Proteine durch den Adsorber entfernt wurden (Tabelle 4).

Im Bezug auf die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens lässt sich folgende Berechnung anstellen: Wurden in den Versuchen 50 Reaktorvolumen Bier von Bernsteinsäure befreit, so ist die Größe erst mal unabhängig vom jeweiligen Reaktorvolumen. Im vorliegenden Fall konnten in einem 44 ml großen Reaktor 2,2 l behandelt werden. Somit lassen sich ungefähr mit 2 Liter Material ein Hektoliter Bier von Bernsteinsäure befreien. Nach unbestätigter Mitteilung der Firma Biokal Labystems liegen die Kosten für das Adsorbermaterial bei ca. 30 Euro pro kg. Bei einmaliger Verwendung wären die Kosten pro Hektoliter Bier mit 60,- Euro anzusetzen. Bei 100-facher Verwendung wären die Kosten bereits auf 0,60 Euro gesunken und damit in einem Bereich, der für den Endkunden lediglich 0,2 ct pro 0,33 l Flasche ausmachen würde. Das Verfahren kann somit als wirtschaftlich angesehen werden, sollte damit ein Mehrwert für den Verbraucher verbunden sein.

### **Zusammenfassung:**

Mit dem Diaion MA03SS wurde ein Material gefunden, mit dem die Konzentration der Bernsteinsäure im Bier für die ersten 50 Reaktorvolumen unter die Nachweisbarkeitsgrenze gebracht werden konnte. Das Material war in über zehn Zyklen verlustfrei regenerierbar. Den größten Nebeneffekt hatte die Adsorption auf den pH-Wert. Dieser stieg deutlich an. Nach anschließender Ansäuerung lag jedoch ein Produkt vor, das durch seine äußeren Eindrücke, wie Geschmack, Farbe und Schaumverhalten, weiterhin als gutes Bier zu bezeichnen ist. Die Adsorberkapazität des Materials schwankte je nach Regenerierungs- und Konditionierungsverfahren.

Das Material ist kommt bei der Demineralisierung von Molke zum Einsatz. Die Anwendung im Bier wäre dem zu Folge als unbedenklich einzuschätzen. Allerdings ist eine nachträgliche Ansäuerung des Produktes nach der Behandlung als kritisch einzustufen und eher schwierig im Bezug auf das Reinheitsgebot. Neben einer Ansäuerung entweder schon vor dem Adsorptionsprozess oder danach könnten weitere Methoden zur Regenerierung und Neutralisation Verbesserungen bringen. Allerdings beschränkt das deutsche Reinheitsgebot die Vielfalt der zur Wahl stehenden Verfahren.

## **Literatur:**

---

- <sup>1</sup> Teyssen, S., González-Calero, G., Schimiczek, M., Singer, M. V. Maleic acid and succinic acid in fermented alcoholic beverages are powerful stimulants of gastric acid release. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103:707 – 713.
- 2 Eckhard Krüger and Heinz-Michael Anger. Kennzahlen zur Betriebskontrolle und Qualitätsbeschreibung in der Brauwirtschaft. 1990.
- 3 C. Püschner, H. Zenz, and H. Schwarz. Änderung des Carbonsäureprofils während des Brauprozesses. *Mitteilung Österreichisches Getränke Institut*, 5/6:52– 59, 1995.
- 4 E. Heerde and F. Radler. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 117(3):269–276, June 1978.
- 5 E. Oura. Reaction Products of Yeast Fermentations. *Process Biochem*, 12(3):19– 21, 1977
- 6 Kunze, W., *Technologie Brauer und Mälzer*, 9. Auflage 2007, VLB Berlin
- 7 Th. Willke and K.-D. Vorlop. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(2):131–142, 2004.
- 8 Michael Sauer, Danilo Porro, Diethard Mattanovich, and Paola Branduardi. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in biotechnology*, 26(2):100–8, 2008.
- 9 H Song and S Lee. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3):352–361, July 2006.
- 10 Joseph J. Bozell and Gene R. Petersen. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates, *the US Department of Energy, "Top 10" revisited*. *Green Chemistry*, 12(4):539, 2010.
- 11 R. Datta. Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation, September 1992.
- 12 D.A. Glassner. Process for the production and purification of succinic acid, September 1992.
- 13 Y Jun, E Lee, Y Huh, Y Hong, W Hong, and S Lee. Kinetic study for the extraction of succinic acid with TOA in fermentation broth; effects of pH, salt and contaminated acid. *Biochemical Engineering Journal*, 36(1):8–13, August 2007.
- 14 YK Hong and WH Hong. Application of reactive extraction to recovery of carboxylic acids. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(6):386–394, December 2001.
- 15 ChemieOnline. <http://www.chemieonline.de/>.
- 16 Klaus Sattler. *Thermische Trennverfahren*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, July 2001.
- 17 B.H. Davison, N.P. Nghiem, and G.L. Richardson. Succinic acid adsorption from fermentation broth and regeneration. *Applied biochemistry and biotechnology*, 114(1):653–669, March 2004.
- 18 Y.-S. Jun, Y.S. Huh, H.S. Park, a. Thomas, S.J. Jeon, E.Z. Lee, H.J. Won, W.H. Hong, S.Y. Lee, and Y.K. Hong. Adsorption of Pyruvic and Succinic Acid by Amine-Functionalized SBA-15 for the Purification of Succinic Acid from Fermentation Broth. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(35):13076– 13086, September 2007.
- 19 Q. Li, Jianmin Xing, Wangliang Li, Qingfen Liu, and Zhiguo Su. Separation of succinic acid from fermentation broth using weak alkaline anion exchange adsorbents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(7):3595–3599, April 2009.

- 20 Hsi-liang Yao and Hsuan-hsien Yeh. Fumarate, Maleate, and Succinate Adsorption on Hydrous  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . 2. Electrophoresis Observations and Ionic-Strength Effects on Adsorption. *Adsorption Journal Of The International Adsorption Society*, 7463(14):2989–2994, 1996.
- 21 Y.S. Hwang. Adsorption of naturally-occurring dicarboxylic acids at the hematite/water interface. PhD thesis, The Ohio State University, 2008.
- 22 Donald I. Maitland and N. SAHAI. Molecular simulations on calcite, 04. *Geochimica et Cosmochimica Acta Supplement*, 73(2000) : 889, 2009
- 23 Stephan Kabasci. Biotechnologische Herstellung von Bernsteinsäure aus nachwachsenden Rohstoffen, chemische Konversion und Polymerisation zu technischen Kunststoffen Abschlussveranstaltung. Technical report, Fraunhofer UMSICHT, Oberhausen, 2011.
- <sup>24</sup> Taylor, B., Verwendung des Combined Stabilization System und dessen Einflüsse auf die Bierstabilität, *Brauwelt* 24, 698-706, 2006
- 25 Boehringer Mannheim / B-Biopharm. L-Succinat, UV-Test zur Bestimmung von L-Succinat in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.
- 26 Brautechnische Analysemethoden Band II. Selbstverlag der Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission, 2(1), 2002.
- 27 Dalgliesh, C.E.; Flavour stability, *Proceedings of the European Brewery Convention*, 623-659, 1977
- 28 Lisa A. Tung and C. Judson King. Sorption and extraction of lactic and succinic acids at  $\text{pH} > \text{pK}_a$ . I. Factors governing equilibria. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 33(12):3217–3223, 1994.
- 29 John A. Wojtowicz. The Carbonate System in Swimming Pool Water. *Journal of the Swimming Pool and Spa Industry*, 4(1):54–59, 2001.
- 30 Werner Back, *Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie*. Hans Carl, Nürnberg, Auflage: 1. Edition, 2001



**Verwendung der Zuwendung****Untersuchung zur Senkung des Gehaltes an Magensäuresekretion stimulierenden Inhaltsstoffen in vergorenen, aber nicht destillierten, alkoholischen Getränken**

Wie bereits im Zwischenbericht 2010 mitgeteilt, wurden im Laufe des Projektes Änderungen in der Aufteilung der Mittel auf die einzelnen Arbeitspakete vorgenommen. Diese Änderungen beruhten in erster Linie auf der Erkenntnis, dass bereits mit der Auswahl des richtigen Hefestammes eine Senkung des Gehaltes an Magensäuresekretion fördernder Bernsteinsäure von ca. 50 % gegenüber einem durchschnittlichen Bier erzielt werden konnte. Daher lag die Überlegung nahe, sich zunächst auf leichter in der Bierherstellungspraxis umzusetzende fermentationstechnologische Maßnahmen zu konzentrieren. Aus diesem Grunde wurde das Arbeitspaket 1 ausgeweitet.

Im weiteren Projektverlauf war es nötig, auch dem Arbeitspaket 2 intensivere Betrachtung zu schenken.

Für das Arbeitspaket 5 war ursprünglich eine weitergehende Betrachtung der gewonnenen Erkenntnisse in einer Maßstabsvergrößerung vorgesehen. Die Erkenntnisse aus den Arbeitspaketen 1-3 legten jedoch nahe, bestehende Prozesse in der Industrie näher zu betrachten.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick, wie das beantragte und bewilligte wissenschaftlich technische Personal eingesetzt wurde:

Jahr	Arbeitsschritte im Antrag	Eingesetztes Personal in den Forschungsstellen in MM				Sachbericht
		1: A1	A2	2: A1	A2	
2009	Koordination und Projektplanung	1		0,3		
2009	Arbeitsschritte 1 Teil 1 Hefescreening	2,5	4		Sachbericht 1	
2010	Arbeitsschritte 1, Teil 2 und Arbeitsschritt 3	6	9		Sachbericht 1 und Sachbericht 2	
2010	Arbeitsschritt 2	2	3		Sachbericht 4	
2011	Arbeitsschritte 4			2,2	4,0	Sachbericht 3
2011	Arbeitsschritt 2	3	6		Sachbericht 4	
2011	Arbeitsschritt 5	1	2		Sachbericht 2, 3 und 4	
2011	Dokumentation und Veröffentlichung	1		0,6		

**Die Zuordnung des eingesetzten wissenschaftlich-technischen Personals zu den einzelnen Sachberichten macht die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit deutlich. Diese entspricht damit in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag und war daher für die Durchführung des Vorhabens notwendig und angemessen.**

### Gegenüberstellung der Verwendung der Zuwendung mit den Zielen des Projektes

Ziel des Forschungsvorhabens war die Vertiefung ernährungsmedizinischer Erkenntnisse und zugleich ihre Umsetzung in die Praxis der Getränkeherstellung.

Speziell Brauern, aber auch Winzern und Produzenten anderer durch anaerobe Fermentation hergestellter Getränke sollten geeignete und praxistaugliche technologische Maßnahmen aufgezeigt werden, die ihnen ermöglichen, Bier, Wein und Apfelwein etc. mit geringerem Gehalt an magensäurefördernder Bernsteinsäure herzustellen. Gleichzeitig sollte ihnen damit ermöglicht werden, die notwendigen Maßnahmen für ihren eigenen Betrieb abzuschätzen, um magenfreundlichere Produkte auf dem Markt anzubieten.

1. Erstes Ziel dieser Untersuchung war es, zunächst durch ein breit angelegtes „Screening“ Stämme zu finden, die unter definierten, praxisähnlichen Bedingungen geringe Bildungsraten an Bernsteinsäure aufweisen und diese dem Anwender zu empfehlen. Dieses Ziel wurde erreicht. Es konnte festgestellt werden, dass es Hefen gibt, die reproduzierbar geringere Mengen an Bernsteinsäure ins Bier abgeben. Dies konnte auch durch die Überprüfung von kommerziell erhältlichen Bieren, die mit dieser Hefe hergestellt wurden, bestätigt werden.
2. Das Zusammenspiel technologischer Einflussmöglichkeiten sollte ebenfalls untersucht werden, um dem Anwender genaue Informationen für die Praxis geben zu können. Auch dieses Ziel wurde erreicht. Es konnte festgestellt werden, dass es eine Grenze von ungefähr 35 mg Bernsteinsäure/l Bier gibt, welche mit herkömmlichen Methoden und Variation technologischer Parameter kaum unterschritten werden kann.
3. Als weiterer Ansatz sollte untersucht werden, ob eine Senkung der Bernsteinsäure im Produkt durch Adsorbentmaterialien in der Art und Weise möglich ist, dass die Produktmatrix möglichst erhalten bleibt und das Adsorbentmaterial wiederverwendet werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass mit einem der getesteten Materialien eine Absenkung unter die Nachweisgrenze möglich ist. Dieses Material war regenerierbar. Da dieses Material bereits in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird, ist eine Anwendung sehr realistisch.
4. Um ein Getränk damit zu kennzeichnen, die Magensäuresekretion weniger zu stimulieren als vergleichbare Produkte und um dies an der Konzentration einzelner Substanzen festzumachen, war zu beweisen, dass diese Substanzen auch in der komplexen Matrix des Produktes diesen Effekt besitzen. Dazu sollte ein aus den ersten Arbeitsschritten entstehendes Fermentationsprodukt, welches äußerst geringe Konzentrationen an Bernsteinsäure besitzt, auf sein Potential, die Magensäure zu stimulieren, getestet werden. Auf der Matrix dieses Produktes aufbauend sollte es dann möglich sein, einen Schwellenwert bezüglich der Magensäuresekretionsantwort für diese organische Säure zu erstellen. Dieses Ziel wurde erreicht. Es konnte festgestellt werden, dass eine Reduktion der Bernsteinsäurekonzentration im Getränk auch eine um 30% reduzierte Magensäuresekretion hervorruft. **Jedoch ist hier anzumerken, dass wegen zeitlicher Überlappung der Arbeitspakete lediglich ein Bier mit niedriger Bernsteinsäurekonzentration (und nicht unterhalb der Nachweisgrenze, wie parallel entwickelt) getestet wurde. Die Vermutung, dass ein Bier mit einer Bernsteinsäurekonzentration unterhalb der Nachweisgrenze einen stärkeren Effekt hat, liegt nahe. Eine Fortführung der Untersuchung wäre daher sehr sinnvoll.**

Somit kann festgestellt werden, dass die Ziele vollständig erreicht wurden.

## Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

Ziel ist die Forschungsergebnisse den besonders mittelständisch geprägten Unternehmen des Brauereisektors, aber auch den Herstellern von Wein und Apfelwein etc. zugänglich zu machen. Dazu wurden bereits Vertreter aus verschiedenen mittleren Unternehmen im Projektbegleitenden Ausschuss während des Projektes eingebunden.

Die weitere Verbreitung der gewonnenen Erkenntnisse ist bzw. wird durch die vielfältigen Organe und Aktivitäten der Forschungsstelle I erfolgen. Die VLB in Berlin wird durch ca. 400 Mitgliedsbrauereien und –mälzereien sowie durch weitere Förderer aus Industrie und Handel getragen. Der überwiegende Teil dieser Mitgliedsbetriebe ist mittelständischer Natur. Für diese Unternehmen verlegt die VLB eine eigene Fachzeitschrift (Brauerei Forum) und veranstaltet regelmäßig Kongresse, in denen über Forschungsergebnisse berichtet wird. Zusätzlich werden Arbeitsergebnisse auf der eigenen Homepage und durch einen monatlichen „Newsletter“ veröffentlicht. Die VLB unterhält für ihre Mitglieder verschiedene Fachgremien, in denen regelmäßig die Arbeitsergebnisse mit Experten der Industrie und des Handels diskutiert werden, um weitere Anregungen für die eigenen Forschungsarbeiten zu erhalten.

Durch Publikationen in Fachzeitschriften für Wein- und auch Bioethanolhersteller, aber auch durch Vorträge auf entsprechenden Fachtagungen soll über die Forschungsergebnisse berichtet werden.

### *Konkrete Transfermaßnahmen:*

#### *Bereits erfolgt:*

- Veröffentlichung einer zusammenfassenden Literaturrecherche: Ausgabe Brauerei Forum 11.2010; diese Veröffentlichung ist als eine dreiteilige Veröffentlichung geplant und wird sukzessive fortgesetzt werden.
- Vorstellung des Projektes im technisch-wissenschaftlichen Ausschuss der VLB Berlin, während der Oktobertagung 2009 in Berlin.
- Vorstellung erster Ergebnisse in einem Fachvortrag auf der VLB Oktobertagung am 4. Oktober 2010 vor einem Fachpublikum von rund 300 Teilnehmern und der Presse.
- Vorstellung der Endergebnisse im technisch-wissenschaftlichen Ausschuss der VLB Berlin am 5. März 2012 in Siegen, während der VLB Frühjahrstagung, mit Verweis auf den Abschlussbericht.

#### *Geplant:*

- Veröffentlichung der 4 Sachberichte als wissenschaftliche Artikel in renommierten wissenschaftlichen Magazinen mit Verweis auf den Abschlussbericht.
- Zusammenfassende Vorstellung der Ergebnisse in 3 Fachvorträgen auf einer der nächsten VLB Tagungen mit Verweis auf den Abschlussbericht.
- Verfügbar machen des Abschlussberichts auf Anfrage an der VLB Berlin.