



Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität

## **Entstehung, Abbau und potentielle Verlustquellen ausgewählter Aromastoffe während der Produktion von Weizenbieren**

Hubertus Josef Schneiderbanger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Horst-Christian Langowski  
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr.-Ing. Fritz Jacob  
2. Priv.-Doz. Dr.-Ing. Hartmut Evers  
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Engel

Die Dissertation wurde am 16.12.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.04.2016 angenommen.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde in keiner gleichen oder ähnlichen Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Freising, 13.Juni 2016

---

## SUMMARY

Wheat beer becomes trendier in the world over the last few years because of its full-flavored aroma and various flavor characteristics. Unfortunately, this type of beer is still quite rare in the focus of scientific research so far. The aim of this work was the determination of the influence on the aroma spectrum caused by yeast strain, fermentation-, maturation- and storage conditions or by flash pasteurization. For this purpose, five of the most popular yeast strains were tested under equal fermentation conditions. It could be shown by measuring the expression levels of different genes (ATF1, ATF2, BAT1, IAH1 and PAD1) that each yeast strain has its own expression behavior. Good correlations between the gene expression level and the correspondent aroma compound could be detected for the genes ATF1 and ATF2 (products: isoamyl acetate and ethyl acetate), IAH1 (degradation of isoamyl acetate) as well as for the gene BAT1 (product: higher alcohols), but not for the gene PAD1 (product: 4-vinylguajacol). It is assumed that, besides PAD1, other genes like FDC1 are involved in the production of 4-vinylguajacol.

Another important part of this study was the definition of the relative volatility of the most important wheat beer flavor compounds. In different trials it could be shown that isoamyl acetate is the most volatile compound of this group followed by ethyl acetate and isoamyl alcohol. 4-vinylguaiacol in contrast is very stable in beer and hard to cast out of the fluid. The main fermentations' temperature plays an important role regarding the aroma compounds. The higher the temperature and the greater the convection flow in the fermentation tank the higher the losses of acetate esters. Higher alcohols and 4-vinylguajacol remain in the wheat beer leading to a more phenolic kind of wheat beer.

This work gives an overview about the influence factors on the aroma spectrum of wheat beer. The build-up of aroma compounds was considered as well as the potential losses of these flavors by degasing or pasteurization. The gene expression monitoring of wheat beer yeast fermentations is a tool to compare, modify and optimize processes with regard to ATF1, ATF2 and IHA1 depended acetate ester production.

**"Das Gute am Weißbier: Es kann von elf Uhr morgens bis zum Frühstück  
getrunken werden."**

(Klaus Augenthaler)

## DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Fritz Jacob und Herrn Prof. Dr. Dr. Harun Parlar für die Überlassung dieses Themas sowie die Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen während dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn PD. Dr. Hartmut Evers und Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel dafür, dass Sie sich bereit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Kollegen Josef Englmann, Dr. Mathias Hutzler, Hubert Walter, Dario Cotterchio, Konrad Müller-Auffermann, Dr. Klaus Litzenburger, Prof. Dr. Mehmet Coelhan, Hans-Peter Schropp, Florian Mallok, Korbinian Haslbeck, Tim Meier-Dörnberg, Maximilian Michel und Robert Riedl für die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Diskussionen sowie das tolle Arbeitsklima bedanken. Auch gilt mein Dank Prof. Dr. Werner Back der mich während des Promotionsverfahrens stets unterstützte und den ich als ausgewiesenen Experten im Bereich Weizenbiere sehr schätze.

Viele Analysen, die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführt werden mussten, wären ohne die Mithilfe der Angestellten des Forschungszentrums nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank für die großartige Unterstützung gilt vor allem Susan Illing, Tanja Spranger, Sabine Dawidowitsch, Sabine Margeth, Markus Schmidt, Josef Pellmeier, Karl-Heinz Bromig, Manuela Tischliar, Margarethe Littel, Margit Grammer, Monika Mayerhofer, Anna Kleucker, Veronika Kaindl und Dominique Stretz.

Ich möchte es auch nicht versäumen, ein Dankeschön an die Sekretärinnen des Forschungszentrums Georgine Widmann, Jutta Betz-Vilser, Sylvia Hubensteiner, Maria Zellhuber, Natalie Böck und Elisabeth Kreidl für ihre große Hilfsbereitschaft und ihr stets offenes Ohr zu richten.

Besonders hervorzuheben sind alle Diplomanden, Bacheloranden etc., die ihre Studienarbeiten unter meiner Betreuung mit sehr viel Engagement und Arbeitseinsatz erstellt haben. Mein Dank gilt: Stephanie Poltinger, Christina Cotterchio, Svenja Schnabel, Kathrin Burdack, Yan Li, Nicola Buchner, Liuba Shylkina, Florian Drißl, Martin Acker, Marcelo Oehninger, Michael Strauß, Matthias Maier, René Rainer, Franz Weber, Andreas Marshall, Maximilian Frammelsberger, Tim Meier-Dörnberg, Christopher Bichel, Matthias Knöpfle, Florian Steininger und Christian Blüm.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern und meiner Freundin Jenny. Danke für die großartige Unterstützung und die Geduld, die ihr mit mir hattet. Angeblich wäre es in dieser Zeit nicht immer leicht mit mir gewesen. **Vielen Dank!**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>II</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>III</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>V</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XV</b>
<b>1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 GRUNDLAGEN.....</b>	<b>3</b>
2.1 Geschmacksvarianten von Weizenbieren .....	3
2.2 Bildungswege sowie Abbau relevanter Aromakomponenten in Weizenbieren .....	5
2.2.1 Bildungswege von Fettsäure- und Essigsäureestern .....	5
2.2.2 Bildungswege von höheren Alkoholen .....	9
2.2.3 Bildungswege von phenolischen Komponenten.....	12
2.3 Einflussfaktoren auf die Bildung von Aromasubstanzen .....	15
2.3.1 Rohstoffbedingte Einflussfaktoren.....	15
2.3.2 Einfluss der Würze-Zusammensetzung.....	16
2.3.3 Einfluss des Hefestammes .....	20
2.3.4 Einfluss der Gärungsparameter.....	21
2.3.4.1 Einfluss der Hefe .....	21
2.3.4.2 Einfluss der Gärtemperatur .....	21
2.3.4.3 Einfluss des CO <sub>2</sub> -Partialdrucks während der Gärung .....	22
2.3.4.4 Einfluss von Tankgeometrie sowie von Konvektion .....	23
2.4 Messung von Genexpressionen in Hefezellen mittels Real-Time PCR zur indirekten Bestimmung der Enzymaktivität mit Relevanz für die Aromabildung .....	24
2.5 Absolute und relative Flüchtigkeit von Aromasubstanzen .....	27
2.6 Sensorische Stabilität von Weizenbieren .....	31
2.6.1 Überblick über die wichtigsten Alterungsindikatoren.....	31
2.6.2 Einflussfaktoren auf das Alterungsverhalten von Bier.....	34
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>38</b>
3.1 Material .....	38
3.1.1 Material für Messungen mittels Real-Time PCR .....	38
3.1.2 Material zur Detektion von Ausgasungsverlusten .....	41
3.1.2.1 Verluste bei simulierter Gärung .....	41
3.1.2.2 Bestimmung der relativen Flüchtigkeit ausgewählter Aromakomponenten .....	42
3.1.2.3 Verluste an Aromastoffen im Weizenbier-Glas .....	43
3.1.3 Material für Gär- und Reifungsversuche .....	43
3.1.4 Material für KZE-Versuche .....	45
3.1.5 Material für Lagerungsversuche .....	46
3.1.6 Material zur Detektion von Gärungsnebenprodukten in Bier .....	47
3.1.7 Material zur Detektion von Alterungskomponenten.....	47
3.1.8 Material für weitere Analysen .....	48
3.1.9 Hefestämme .....	49
3.2 Methoden .....	50
3.2.1 Verkostungs-Schemata .....	50
3.2.2 Detektion von Gärungsnebenprodukten mittels Gaschromatographie .....	53
3.2.3 Detektion von 4-Vinylguajakol mittels HPLC .....	53
3.2.4 Detektion von Alterungsindikatoren mittels Gaschromatographie .....	54
3.2.5 Messungen von Genexpressionen mittels Real-Time PCR .....	56

3.2.6 Gär- und Reifungsbedingungen für Tank- und Flaschengärungen.....	60
3.2.7 Durchführung der KZE-Versuche .....	62
3.2.8 Lagerbedingungen für Geschmacksstabilitätsversuche.....	62
3.2.9 Weitere Analysen.....	63
3.2.10 Statistische Methoden .....	63
<b>4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>66</b>
4.1 Charakterisierung verschiedener Weizenbier-Hefestämme hinsichtlich der Aromastoffsynthese unter standardisierten Bedingungen .....	66
4.1.1 Definition der standardisierten Bedingungen .....	66
4.1.2 Allgemeine Gärungsparameter.....	67
4.1.3 Bildungsverlauf der wichtigsten Aromakomponenten .....	71
4.1.4 Aromaprofil des Hefestammes TUM 68 .....	77
4.1.5 Aromaprofil des Hefestammes TUM 127 .....	78
4.1.6 Aromaprofil des Hefestammes TUM 175 .....	79
4.1.7 Aromaprofil des Hefestammes TUM 214 .....	80
4.1.8 Aromaprofil des Hefestammes TUM 505 .....	80
4.2 Genexpressionsmessungen bei obergäriger Hefe während der Hauptgärung .....	82
4.2.1 Etablierung einer Messmethode für obergärende Hefen zur Detektion der Genexpression mittels Real-Time PCR .....	82
4.2.1.1 Ermittlung der PCR-Effizienz.....	84
4.2.1.2 Überprüfung der RNA-Qualität .....	86
4.2.1.3 Überprüfung der PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse .....	87
4.2.2 Einfluss des Hefestammes auf die Enzyymbildung im Verlauf einer Gärung .....	89
4.2.2.1 Bildung von Essigsäureestern .....	89
4.2.2.2 Abbau von Essigsäureestern.....	99
4.2.2.3 Bildung von höheren Alkoholen.....	102
4.2.2.4 Bildung phenolischer Komponenten.....	106
4.2.2.5 Korrelationen zwischen Expressionsmaxima und dem Maximum an gebildeter Aromakomponente .....	110
4.2.3 Einfluss von Druck auf die Enzyymbildung im Verlauf einer Gärung.....	112
4.3 Verluste an ausgewählten Aromakomponenten durch Ausgasung.....	117
4.3.1 Simulierung einer offenen Gärung und die damit verbundene Ausgasung mittels CO <sub>2</sub> im Versuchsmedium Wasser.....	119
4.3.1.1 Einfluss von Temperatur auf das Ausgasungsverhalten .....	120
4.3.1.2 Einfluss des pH-Wertes auf das Ausgasungsverhalten .....	122
4.3.1.3 Einfluss des Alkoholgehaltes auf das Ausgasungsverhalten .....	123
4.3.2 Ermittlung der relativen Flüchtigkeiten ausgewählter Gärungsnebenprodukte in Abhängigkeit von der Temperatur .....	124
4.3.3 Verluste wichtiger Aromakomponenten während des Trinkvorgangs .....	129
4.4 Einfluss der Reifung auf die Aromabildung im Weizenbier.....	130
4.4.1 Einfluss des Hefestammes .....	130
4.4.2 Einfluss der Speisegabe .....	132
4.4.3 Einfluss von Tank- oder Flaschengärung .....	134
4.5 Einfluss eines Kurzzeiterhitzers auf das Bieraroma .....	138
4.5.1 Einfluss auf das Aromaprofil des Bieres.....	138
4.5.2 Einfluss auf die sensorische Stabilität des Bieres .....	144
4.6 Einfluss der Lagerungsbedingungen auf das Aromaprofil sowie die sensorische Stabilität von Weizenbier .....	146
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>159</b>
<b>6 AUSBLICK.....</b>	<b>162</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>164</b>
7.1 Tabellen .....	164
7.2 Abbildungen .....	184
<b>8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>193</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>a</i>	Konfidenzintervall
$\alpha_{ij}$	relative Flüchtigkeit
$\alpha$ -Ketosäure	alpha-Ketosäure
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
AATase	Alkohol-Acetyl-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
barÜ	Überdruck
C	chemische Abkürzung für Kohlenstoff
cDNA	Copy-DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
C <sub>p</sub>	Crossing point
C <sub>t</sub>	Cycle threshold
$\Delta$	Delta
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Eff	Effizienz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAN	freier Aminostickstoff
FD	Flavor Dilution
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatograph(ie)
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
hl	Hektoliter
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HO•	Hydroxylradikal
hPa	Hektopascal
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	Headspace
K <sub>i</sub>	Verteilungsfaktor

$K_i^\infty$	Verteilungsfaktor in unendlicher Verdünnung
KZE	Kurzzeiterhitzung
$\Delta L$	Gewichtsdifferenz vor und nach der Begasung
LogPow	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LOX	Lipoxygenase
$m_{e0}$	Masse einer Komponente in der flüssigen Phase vor Beginn der Durchströmung mit Inertgas
$m_e$	Masse einer Komponente in der flüssigen Phase nach der Durchströmung mit Inertgas
MEBAK	Mitteleuropäische brautechnische Analysenkommission
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometer
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
$NAD^+$	oxidierte Form des NAD
$NADH_2$	reduzierte Form von NAD
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NRW	Nordrhein-Westfalen
$^1O_2$	Sauerstoff im Singulett-Zustand
$^3O_2$	Sauerstoff im Triplett-Zustand
$O_2^\cdot$	Superoxid
OAV	Odor Activity Value
P	Luftdruck
$^\circ P$	Stammwürzegehalt (Grad Plato)
p	Wahrscheinlichkeit (studentische t-Verteilung)
PE	Pasteureinheit
$P^L$	Druck in der Flüssigphase
$P^V$	Druck in der Gasphase
PCR	polymerase chain reaction

$P_i^L$	Partialdruck einer Komponente in der Flüssigphase
$P_i^S$	Dampfdruck einer Komponente
$P_i^V$	Partialdruck einer Komponente in der Gasphase
POF	Phenolic Off-Flavor
POF <sup>+</sup>	POF positiv (fähig, 4-VG zu bilden)
POF <sup>-</sup>	POF negativ (nicht fähig, 4-VG zu bilden)
ppb	parts per billion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
SKZ	Schaumkennzahl
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
SPME	Solid phase microextraction
$s_{\bar{x}}$	Standardabweichung
TBZ	Thiobarbitursäurezahl
T <sup>L</sup>	Temperatur in der Flüssigphase
T <sup>V</sup>	Temperatur in der Gasphase
$t_m$	Wert der studentischen t-Verteilung mit $m = n-1$ Freiheitsgraden
tRNA	transfer RNA
4-VG	4-Vinylguajakol
4-VP	4-Vinylphenol
%Vol.	Volumenprozent
$\Delta x$	Konzentrationsdifferenz vor und nach der Begasung
$x_i$	Konzentration einer Komponente in der flüssigen Phase
$x_{i0}$	Konzentration einer Komponente in der flüssigen Phase vor Beginn der Durchströmung mit Inertgas

## Abkürzungsverzeichnis

---

$X_{ie}$	Konzentration einer Komponente in der flüssigen Phase nach der Durchströmung mit Inertgas
$y_i$	Konzentration eines Aromastoffs in der Dampfphase
$\gamma_i$	Aktivitätskoeffizient
ZKT	zylindrokonischer Tank

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Überblick über die Ester-Bildung in der Hefezelle .....	6
Abbildung 2: Bildungswege von Isoamylacetat und Ethylacetat.....	8
Abbildung 3: Überblick über die Bildungswege von höheren Alkoholen.....	10
Abbildung 4: Überblick über den Ehrlich-Mechanismus .....	11
Abbildung 5: Bildungswege der Phenole 4-Vinylphenol und 4-Vinylguajakol .....	14
Abbildung 6: Maltasemaischverfahren nach <i>Herrmann</i> .....	20
Abbildung 7: Biosynthese in eukaryotischen Zellen .....	25
Abbildung 8: Darstellung der Bieralterung .....	32
Abbildung 9: Chemisch-reduktive Sauerstoffaktivierung .....	35
Abbildung 10: Überblick über Lipidabbau-Prozesse.....	36
Abbildung 11: Versuchsaufbau für eine simulierte offene Gärung.....	42
Abbildung 12: Darstellungen des Versuchsaufbaus zur Detektion der relativen Flüchtigkeiten .....	43
Abbildung 13: ZKTs der Versuchsbrauerei am Forschungszentrum .....	44
Abbildung 14: Flaschenfüllmaschine des Forschungszentrums.....	45
Abbildung 15: Flavorradi zur Beschreibung verschiedener Aromaeindrücke im Bier .	51
Abbildung 16: Spezifische Weizenbierverkostung nach <i>Herrmann</i> .....	52
Abbildung 17: Extraktabbau der verschiedenen Hefestämme im Verlauf der Hauptgärung .....	68
Abbildung 18: Zuckerspektrum vor und nach den Gärungen .....	69
Abbildung 19: Zuckerspektrum vor und nach der Gärung des Jungbieres mit TUM 127 .....	70
Abbildung 20: Bildungsverläufe von Isoamylacetat während der Hauptgärung.....	72
Abbildung 21: Bildungsverläufe von Ethylacetat während der Hauptgärung .....	73
Abbildung 22: Bildungsverläufe von 4-Vinylguajakol während der Hauptgärung .....	75
Abbildung 23: Bildungsverläufe der Amylalkohole während der Hauptgärung .....	76
Abbildung 24: Effizienzberechnung am Beispiel ATF1 .....	85
Abbildung 25: Logarithmische Auftragung der Messreihe ATF1 .....	86
Abbildung 26: Schmelzkurven von ATF1 .....	88
Abbildung 27: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68 .....	91
Abbildung 28: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127 .....	92
Abbildung 29: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175 .....	93
Abbildung 30: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214 .....	93
Abbildung 31: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505 .....	94
Abbildung 32: Faktorisierte Darstellung der einzelnen ATF1-Expressionsverläufe ...	94
Abbildung 33: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175 .....	95
Abbildung 34: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214 .....	96
Abbildung 35: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505 .....	96
Abbildung 36: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68 .....	97
Abbildung 37: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127 .....	97
Abbildung 38: Faktorisierte Darstellung der einzelnen ATF2-Expressionen.....	98
Abbildung 39: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68 .....	99
Abbildung 40: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175 .....	100
Abbildung 41: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214 .....	100
Abbildung 42: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127 .....	101
Abbildung 43: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505 .....	101
Abbildung 44: Faktorisierte Darstellung der einzelnen IAH1-Expressionsverläufe ..	102
Abbildung 45: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127 .....	103

Abbildung 46: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505 .....	103
Abbildung 47: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175 .....	104
Abbildung 48: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68 .....	105
Abbildung 49: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214 .....	105
Abbildung 50: Faktorierte Darstellung der einzelnen BAT1-Expressionen .....	106
Abbildung 51: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68 .....	107
Abbildung 52: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127 .....	107
Abbildung 53: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175 .....	108
Abbildung 54: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214 .....	108
Abbildung 55: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505 .....	109
Abbildung 56: ATF1-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung ....	113
Abbildung 57: ATF2-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung ....	114
Abbildung 58: IAH1-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung .....	115
Abbildung 59: BAT1-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung ....	116
Abbildung 60: PAD1-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung .....	117
Abbildung 61: Aromaverluste durch Ausgasung unter Variation der Temperatur ....	121
Abbildung 62: Aromaverluste durch Ausgasung unter Variation des pH-Wertes .....	122
Abbildung 63: Aromaverluste durch Ausgasung unter Variation des Ethanolgehaltes .....	123
Abbildung 64: Ermittlung der relativen Flüchtigkeit ausgewählter Aromakomponenten .....	126
Abbildung 65: Aromadifferenzen vor und nach einer Tankreifung mit drei unterschiedlichen Hefestämmen in Prozent .....	131
Abbildung 66: Aromadifferenzen vor und nach einer Tankreifung mit Würze, Glucose und Maltose als Speise-Zugabe .....	133
Abbildung 67: Aromadifferenzen vor und nach einer Flaschenreifung mit drei unterschiedlichen Hefestämmen in Prozent .....	134
Abbildung 68: Einfluss einer KZE auf den Ethylacetatgehalt im Kleinmaßstab .....	139
Abbildung 69: Einfluss einer KZE auf den Ethylacetatgehalt im Scale-up-Versuch im frischen Bier .....	140
Abbildung 70: Einfluss einer KZE auf den Ethylacetatgehalt im Scale-up-Versuch im forciert gealterten Bier .....	141
Abbildung 71: Einfluss einer KZE auf den Isoamylacetatgehalt im Kleinmaßstab ....	141
Abbildung 72: Einfluss einer KZE auf den Isoamylacetatgehalt im Scale-up-Versuch im frischen Bier .....	142
Abbildung 73: Einfluss einer KZE auf den Isoamylacetatgehalt im Scale-up-Versuch im gealterten Bier .....	143
Abbildung 74: Einfluss einer KZE auf den 4-Vinylguajakol-Gehalt im Scale-up- Versuch im frischen und im gealterten Bier .....	143
Abbildung 75: Einfluss einer KZE auf die Wärmeindikatoren im Scale-up-Versuch	145
Abbildung 76: Verkostungsergebnisse der abgefüllten Biere nach DLG-Schema ...	146
Abbildung 77: Verlauf der Schaumkennzahlen bei Weizenbier A .....	148
Abbildung 78: Verlauf der Schaumkennzahlen bei Weizenbier B .....	149
Abbildung 79: Verlauf der Ethylacetat-Konzentrationen bei Weizenbier A .....	149
Abbildung 80: Verlauf der Ethylacetat-Konzentrationen bei Weizenbier B .....	150
Abbildung 81: Verlauf der Isoamylacetat-Konzentrationen bei Weizenbier A .....	151
Abbildung 82: Verlauf der Isoamylacetat-Konzentrationen bei Weizenbier B .....	151
Abbildung 83: Verlauf der Wärmeindikatoren bei Weizenbier A .....	152
Abbildung 84: Verlauf der Wärmeindikatoren bei Weizenbier B .....	152

Abbildung 85: Verkostungsergebnisse von Bier A über 84 Tage Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen .....	153
Abbildung 86: Verkostungsergebnisse von Bier B über 84 Tage Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen .....	153
Abbildung 87: Bier A: Verlauf von Ethylacetat und Amylalkoholen während der Alterung.....	154
Abbildung 88: Bier B: Verlauf von Ethylacetat und Amylalkoholen während der Alterung.....	155
Abbildung 89: Bier A: Verlauf von Isoamylacetat, 4-Vinylguajakol und 4-Vinylphenol während der Alterung .....	156
Abbildung 90: Bier B: Verlauf von Isoamylacetat, 4-Vinylguajakol und 4-Vinylphenol während der Alterung .....	156
Abbildung 91: Bier A: Zeitlicher Verlauf der Alterungsindikatoren .....	157
Abbildung 92: Bier B: Zeitlicher Verlauf der Alterungsindikatoren .....	158
Abbildung 93: Würze-Zusammensetzungen für die Erstellung der Aromaprofile von Weizenbier-Hefestämmen.....	184
Abbildung 94: Hefezellen in Schwebelagerung während der Hauptgärung zur Charakterisierung der Aromaprofile unterschiedlicher Hefestämme .....	184
Abbildung 95: pH-Verlauf während der Hauptgärung zur Charakterisierung der Aromaprofile unterschiedlicher Hefestämme.....	185
Abbildung 96: Effizienzbestimmung von ATF2 .....	185
Abbildung 97: Effizienzbestimmung von BAT1 .....	186
Abbildung 98: Effizienzbestimmung von IAH1 .....	186
Abbildung 99: Effizienzbestimmung von RDN 18 .....	187
Abbildung 100: Schmelzkurven von ATF2 .....	187
Abbildung 101: Schmelzkurven von BAT1 .....	188
Abbildung 102: Schmelzkurven von IAH1 .....	188
Abbildung 103: Schmelzkurven von PAD1 .....	189
Abbildung 104: Schmelzkurven von RDN18.....	189
Abbildung 105: Faktorisierte Darstellung der ATF1-Expressionen bei TUM 68 unter Druck.....	190
Abbildung 106: Faktorisierte Darstellung der ATF2-Expressionen bei TUM 68 unter Druck.....	190
Abbildung 107: Faktorisierte Darstellung der IAH1-Expressionen bei TUM 68 unter Druck.....	191
Abbildung 108: Faktorisierte Darstellung der BAT1-Expressionen bei TUM 68 unter Druck.....	191
Abbildung 109: Faktorisierte Darstellung der PAD1-Expressionen bei TUM 68 unter Druck.....	192
Abbildung 110: Verlust an 4-Vinylguajakol nach einer Flaschengärung mit unterschiedlichen Trockenhefen .....	192

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Edukte und Produkte des Ehrlich-Mechanismus .....	12
Tabelle 2: Einteilung der Alterungsindikatoren .....	34
Tabelle 3: Gerätschaften und Materialien für Vorversuche zur Messung mittels Real-Time PCR.....	38
Tabelle 4: Zubehör für Messungen mittels Real-Time PCR .....	38
Tabelle 5: Reagenzien für Messungen mittels Real-Time PCR.....	39
Tabelle 6: Primer-Sequenzen.....	40
Tabelle 7: Gerätschaften für Messungen mittels Real-Time PCR .....	40
Tabelle 8: Material zur Detektion von Ausgasungsverlusten.....	41
Tabelle 9: Sonstige Materialien für Ausgasungsversuche.....	41
Tabelle 10: Material zur Bestimmung von Verlusten an Gärungsnebenprodukten beim Trinkvorgang .....	43
Tabelle 11: Material für Reifeversuche.....	44
Tabelle 12: Material für KZE-Versuche .....	46
Tabelle 13: Material für Lagerungsversuche .....	47
Tabelle 14: Materialien zur Messung von Alterungskomponenten .....	48
Tabelle 15: Grundsätzliche Erstellung des Mastermixes 1 für die Gewinnung von cDNA.....	58
Tabelle 16: Mastermix 2 für die Gewinnung von cDNA .....	58
Tabelle 17: Beispiel für Konzentrationseinstellung der cDNA .....	59
Tabelle 18: Reagenzien-Zusammensetzung für PCR-Messung.....	60
Tabelle 19: Temperatur-Zeit-Protokoll des LightCyclers .....	60
Tabelle 20: Verwendete Gärparameter in den Gär- bzw. Lagertanks .....	61
Tabelle 21: Sonstige am Forschungszentrum durchgeführte Analysen .....	63
Tabelle 22: Zuckerspektrum vor und nach der Gärung mit TUM 127.....	71
Tabelle 23: Untersuchungsparameter zur Charakterisierung der verschiedenen Hefestämme.....	77
Tabelle 24: Überprüfung des verwendeten Referenzgens an Hand der $c_t$ -Werte .....	84
Tabelle 25: PCR-Effizienz der verwendeten Primer .....	86
Tabelle 26: Basenlänge der PCR-Produkte für verschiedene Primer.....	88
Tabelle 27: Darstellung unterschiedlicher Korrelationsfaktoren.....	111
Tabelle 28: Dampfdrücke von Ethylacetat, Isoamylacetat und 4-Vinylguajakol bei 20°C.....	120
Tabelle 29: Übersicht über die Messergebnisse zur Bestimmung der relativen Flüchtigkeiten .....	128
Tabelle 30: Verluste an Aromakomponenten im Weizenglas .....	129
Tabelle 31: Vergleich der Konzentrationen an Gärungsnebenprodukten nach Tank- und Flaschenreifung mit TUM 68 .....	135
Tabelle 32: Vergleich der Konzentrationen an Gärungsnebenprodukten nach Tank- und Flaschenreifung mit TUM 127 .....	136
Tabelle 33: Vergleich der Konzentrationen an Gärungsnebenprodukten nach Tank- und Flaschenreifung mit TUM 505 .....	136
Tabelle 34: Verkostungsergebnisse von tank- und flaschengereiften Weizenbieren .....	137
Tabelle 35: Herführungs-Bedingungen für die verwendeten Hefestämme .....	164
Tabelle 36: Zuckerspektrum vor und nach der Gärung mit TUM 127 .....	164
Tabelle 37: Überprüfung des Referenzgens RDN18 - $c_t$ -Werte .....	165
Tabelle 38: Überprüfung der RNA-Reinheit.....	166

Tabelle 39: Genexpressionsdaten inklusive aller Konfidenzintervalle vor Normalisierung mit Formel 14 .....	167
Tabelle 40: Übersicht über Genexpressionsmessungen der einzelnen Hefestämme – Teil 1 .....	168
Tabelle 41: Übersicht über Genexpressionsmessungen der einzelnen Hefestämme – Teil 2 .....	170
Tabelle 42: Übersicht über Genexpressionsmessungen unter Druckverhältnissen.	172
Tabelle 43: Prozentuale Verluste an Aromakomponenten in Abhängigkeit der Temperatur während einer simulierten Gärung .....	174
Tabelle 44: Prozentuale Verluste an Aromakomponenten in Abhängigkeit des pH-Wertes während einer simulierten Gärung .....	174
Tabelle 45: Prozentuale Verluste an Aromakomponenten in Abhängigkeit des Ethanolgehaltes während einer simulierten Gärung .....	175
Tabelle 46: Simulierte Aromaverluste bei unterschiedlicher Behandlungsweise .....	175
Tabelle 47: Überblick über die Ergebnisse der Reifungsversuche .....	176
Tabelle 48: Übersicht über KZE-Versuche im Labormaßstab .....	177
Tabelle 49: Übersicht über die KZE- Versuche im Brauereimaßstab - frischer Zustand .....	177
Tabelle 50: Übersicht über die KZE-Versuche im Brauereimaßstab - forciert gealterter Zustand .....	178
Tabelle 51: Überblick über die Ergebnisse der Alterungsindikatoren bei den KZE-Versuchen .....	179
Tabelle 52: Analysenwerte der Lagerungsversuche von Bier A .....	180
Tabelle 53: Analysenwerte der Lagerungsversuche von Bier B .....	181
Tabelle 54: Analysenwerte der Gärungsnebenprodukte der Langzeit-Stabilitätsversuche von Bier A bei 20°C .....	181
Tabelle 55: Analysenwerte der Alterungsindikatoren der Langzeit-Stabilitätsversuche von Bier A bei 20°C .....	182
Tabelle 56: Analysenwerte der Gärungsnebenprodukte der Langzeit-Stabilitätsversuche von Bier B bei 20°C .....	182
Tabelle 57: Analysenwerte der Alterungsindikatoren der Langzeit-Stabilitätsversuche von Bier B bei 20°C .....	183

### 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Weizenbier ist eine überwiegend im süddeutschen Raum beheimatete Biersorte. Aber auch im Ausland wie z.B. in Belgien (Bière Blanche oder Witbeer) haben diese Biere Tradition. In der jüngeren Vergangenheit wuchs die Bedeutung der obergärigen Bierspezialität stetig an, so dass sie auch vermehrt im Norden Deutschlands sowie im Ausland produziert wird. Obwohl der Pro-Kopf-Konsum an Bier in Deutschland sukzessive sinkt, stiegen in den vergangenen Jahren die Absätze für Weizenvollbiere und auch für alkoholfreie Weizenbiere an (Brauerbund, 2011; Kelch, 2012; Lebok, 2013). Ein Grund für diese Entwicklung ist vermutlich der Konsumentenwunsch nach Vielfalt, der sich auch in der Anzahl an Spezialbieren, welche auf den Markt gebracht werden, äußert. Immer häufiger experimentieren Brauereien mit stark aromatischen Hopfensorten, Dry-Hopping oder mit gebrauchten Wein- und Whiskyholzfässern, um dem Bier eine besondere Aromanote zu verleihen und sich von Mitbewerbern abzuheben. Neben etwas exotisch anmutenden Biersorten wie z.B. „Indian Pale Ale“ oder gezielt gealterten Bockbieren bietet das traditionelle Weizenbier ebenfalls mannigfaltige Geschmacksausprägungen. Vor allem auf Grund der höheren Gärtemperaturen und der Verwendung von obergäriger Hefe beinhaltet Weizenbier mehr Gärungsnebenprodukte wie höhere Alkohole, Ester und Phenole, welche eine größere Geschmacksvielfalt zulassen. Die Ausprägung des gewünschten Weizenbieraromas ist zum einen von den verwendeten Rohstoffen, zum anderen auch vom verwendeten Hefestamm und der jeweils in der Brauerei vorherrschenden Technologie abhängig. Da es sich bei Weizenbier außerhalb von Süddeutschland jedoch um eine Randsorte handelt, ist dieses Produkt bislang weniger in den Fokus von Forschungsarbeiten gelangt.

Aromastoffe im Weizenbier stellen das zentrale Thema dieser Arbeit dar. Da die Bildung wertgebender Aromakomponenten bereits in der Mälzerei beginnt und die Komplexität dieses Themas den Umfang einer Dissertation bei Weitem übersteigen würde, liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf dem Kaltbereich einer Brauerei. Während der Hauptgärung sowie in den nachfolgenden Produktionsschritten wird der größte Teil an wertgebenden Aromakomponenten von Weizenbieren gebildet.

Aus diesem Grund sollen im Rahmen dieser Arbeit zunächst die wichtigsten Weizenbier-Hefestämmen hinsichtlich ihrer Aromastoffsynthese untersucht werden. Unter identischen Gärungsbedingungen soll eine Charakterisierung der

Aromabildungs- sowie Gäreigenschaften erfolgen. Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit gilt der Bildung von Enzymen in der Hefezelle, die während der Gärung für die Produktion der wichtigsten Leitkomponenten verantwortlich sind. Für die Komposition der Leitkomponenten im Weizenbier spielt die Hefe und ihre Vitalität eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu anderen Forschungsarbeiten zu diesem Thema soll diese Arbeit erstmals mittels Real-Time PCR einen Einblick in den Hefestoffwechsel während der Hauptgärung der Weizenbierproduktion geben.

Darüber hinaus werden in der Brauerei häufig verwendete Technologien hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Aromastoffsynthese untersucht sowie potentielle Verluste an Gärungsnebenprodukten, die während des Bierherstellungsprozesses auftreten, ermittelt. Erstmals sollen potentielle Verluste durch Ausgasungseffekte während der Gärung detektiert werden. Neben der Aromabildung sowie Verlusten während der Produktion stellt auch die sensorische Stabilität des Bieres einen wichtigen Aspekt dar, da das gewünschte Aroma möglichst lange im Bier vorhanden sein soll und nicht von sogenannten Alterungskomponenten überdeckt werden darf. Auch dieser Teilaspekt soll Berücksichtigung in der vorliegenden Arbeit finden.

## **2 GRUNDLAGEN**

### ***2.1 Geschmacksvarianten von Weizenbieren***

Weizenbiere gehören neben Alt- und Kölsch-Bieren in Deutschland zu den wichtigsten Vertretern von obergärigen Bierspezialitäten. Laut Deutschem Biersteuergesetz von 1923 dürfen für die Herstellung von obergärigem Bier neben Gerstenmalz, Hopfen, Wasser und Hefe auch andere Malzarten, technisch reiner Rohr- oder Invertzucker sowie aus Zucker hergestellte Farbstoffe zugesetzt werden. Für die Herstellung von obergärigen Bieren in Bayern ist die Verwendung von genannten Zuckern und Farbstoffen jedoch verboten (Narziß, 2005). Weizenbiere müssen darüber hinaus einen Schüttungsanteil von mind. 50 % Weizenmalz enthalten, um als solche deklariert werden zu dürfen. Für die Umsetzung des Zuckers zu Alkohol darf nur obergärige Hefe verwendet werden.

Die Aromausprägung eines Weizenbieres ist von einer Vielzahl von Einflussfaktoren abhängig. Neben den verwendeten Rohstoffen spielt die Technologie bei der Produktion eine große Rolle. Unabhängig von diesen Parametern werden Weizenbiere grundsätzlich in vier Aromagruppen eingeteilt (Back, 1998):

#### **1. Der neutrale Typ**

Dieser Weizenbier-Typ zeichnet sich, wie der Name bereits vermuten lässt, durch kein besonders ausgeprägtes Aroma aus. Der Geschmack ist weizenbier-typisch, ohne jedoch durch eine besonders estrige oder phenolische Note aufzufallen. Dieser Typ hat keine dominante Note.

#### **2. Der hefige Typ**

Der hefige Typ wird in erster Linie von einem frisch-hefigen und leicht angenehm schwefligen Aroma dominiert. Auch bei diesem Weizenbier-Typ treten im Geruch und im Geschmack keine dominant estrigen oder phenolischen Noten in den Vordergrund. Der hefige Typ kann jedoch auch von einer unangenehmen, alt-hefigen Note geprägt werden. In diesem Fall tritt anstelle der frisch-hefigen Note eine alt-hefige Geschmacksausprägung, welche sich sensorisch negativ bemerkbar macht. Zu den durch Hefeautolyse hervorgerufenen negativen Aromakomponenten des alt-hefigen Geschmacks zählen sowohl kurz- und mittelkettige Fettsäuren als auch bestimmte höhere Alkohole wie z.B. Heptanol (Back, 2005; Narziß, 1995).

### **3. Der phenolische Typ**

Von einem phenolischen Weizenbier-Typ wird gesprochen, wenn das Bieraroma an Gewürznelken erinnert. Diese spezielle Note wird in erster Linie von der Verbindung 4-Vinylguajakol verursacht. Ebenfalls einen positiven Beitrag zu dieser Aromanote kann 4-Vinylphenol leisten, jedoch wird in den meisten Fällen der Geschmacksschwellenwert dieser Komponente im Weizenbier nicht erreicht (Back, 2005).

### **4. Der estrige Typ**

Als estriger Typ wird ein Weizenbier beschrieben, das sich durch eine fruchtig-estrigen Note auszeichnet. Als Leitkomponenten für diesen Typ gelten in erster Linie Essigsäureester. Vor allem der sogenannte „Bananenester“ Isoamylacetat gilt hierbei als Leitkomponente. Diese Substanz ist hauptverantwortlich, dass in Weizenbieren oftmals von einem Bananenaroma gesprochen wird. Ebenfalls einen fruchtig-bananigen Geschmack bringt Isobutylacetat ein. Allerdings ist hierbei zu erwähnen, dass der Geschmacksschwellenwert dieser Komponente in Bier kaum erreicht wird (Geschmacksschwellenwert Isobutylacetat: 1,6 mg/l) (Meilgaard, 1975b). Des Weiteren trägt auch Ethylacetat zur estrigen Note bei. Dieser Aromastoff wird in seiner Reinsubstanz als fruchtig, süßlich und an Lösungsmittel erinnernd beschrieben (Meilgaard, 1975a, b). Es gibt darüber hinaus weitere Ester, die zwar ein fruchtiges, zumeist apfelartiges Aroma hervorrufen, das jedoch für diesen Weizenbier-Typ als negativ empfunden wird. Als Beispiel hierfür ist vor allem Ethylhexanoat (Hexansäureethylester) zu nennen (Back, 2005).

Der Fokus dieser Arbeit liegt hauptsächlich auf den aromaintensiven Essigsäureestern sowie auf dem für das Nelkenaroma verantwortlichen 4-Vinylguajakol. Untersuchungen zeigten, dass es für eine harmonische Komposition im Weizenbier empfehlenswert ist, wenn der Gehalt an Isoamylacetat bei ca. 4 mg/l liegt und ein Ethylacetatgehalt von 45 mg/l nicht überschritten wird. Laut Back wird auch eine Konzentration von 4,5 - 6,0 mg/l Isoamylacetat nicht mehr als angenehm fruchtig empfunden (Back, 2005). Weitaus häufiger als der durch Isoamylacetat geprägte bananig-estrigen Typ in Weizenbieren ist mittlerweile das nelkenartige Aroma zu finden. Begründet ist diese Tatsache vermutlich darin, dass in immer mehr Brauereien

zylindrokonische Tanks eingesetzt werden, durch deren Einsatz bei der Gärung in erster Linie neutrale oder phenolische Weizenbiere entstehen (Verstrepen, 2003b). Auch *Langos et al.* konnten 2013 aus handelsüblichen Weizenbieren die Relevanz von 4-Vinylguajakol für das Weizenbier-Aroma bestätigen. Aus dieser Studie geht hervor, dass neben 2-Phenylethanol auch 2-Methoxy-4-Vinylphenol (gleichbedeutend mit 4-Vinylguajakol) den höchsten FD-Faktor (Flavor Dilution Faktor) besitzt und somit vermutlich von größter Wichtigkeit im Hinblick auf das Aromaprofil sind. Die geruchsintensivsten Substanzen, die in Form des OAV (Odor-Activity Value) ermittelt wurden, waren neben Ethanol und anderen höheren Alkoholen vor allem 3-Methylbutylacetat (Isoamylacetat), 4-Vinylguajakol und Acetaldehyd. In dieser Studie gelang es sogar das Weizenbier-Aroma künstlich durch die Zugabe von Aromasubstanzen in karbonisiertes Wasser herzustellen. (Langos, 2013).

## **2.2 Bildungswege sowie Abbau relevanter Aromakomponenten in Weizenbieren**

### **2.2.1 Bildungswege von Fettsäure- und Essigsäureestern**

In Bier konnten bereits mehr als 100 verschiedene Ester identifiziert werden (Engan, 1972; Meilgaard, 1975b). Die beiden wichtigsten Gruppen an aromaintensiven Ester-Verbindungen stellen dabei die sogenannten Essigsäureester und die Fettsäureester dar. Eine Veresterung ist aus chemischer Sicht eine Reaktion zwischen einem Alkohol und einer Säure unter Abspaltung von Wasser. Diese chemische Ester-Bildung, welche zumeist durch einen Katalysator unterstützt wird, läuft im Gärungs- und Reifungsprozess jedoch nur in geringem Maße ab und spielt daher lediglich eine untergeordnete Rolle (Engan, 1974). Während des Bierherstellungsprozesses werden Ester in erster Linie intrazellulär durch die Hefe gebildet.

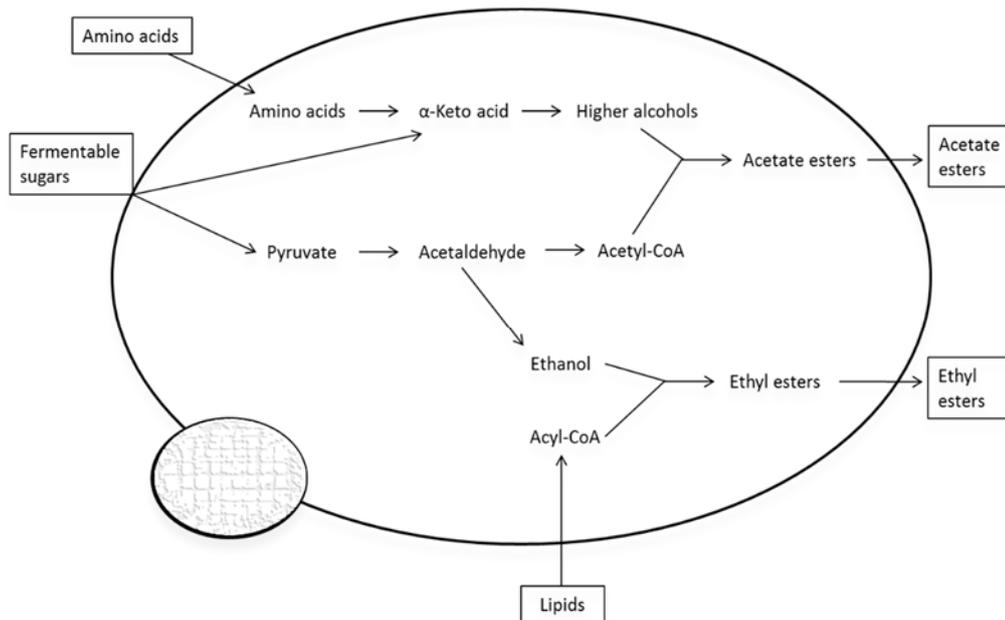


Abbildung 1: Überblick über die Ester-Bildung in der Hefezelle (Procopio, Qian, & Becker, 2011)

### Essigsäureester:

Zu den Hauptvertretern der Essigsäureester im Bier gehören Isoamylacetat, Isobutylacetat, Ethylacetat und Phenylacetat. Diese Ester werden als Stoffwechselprodukte der Hefe intrazellulär durch enzymatisch katalysierte Reaktionen unter Beteiligung von Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA) und den entsprechenden Gärungsalkoholen synthetisiert (Nordström, 1963, 1964). Die am häufigsten vorkommende Form des Acyl-CoA stellt das Acetyl-CoA dar. Dieses kann über die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat oder durch die direkte Aktivierung von Acetat mittels ATP gebildet werden (Thiele, 2006; Verstrepen, 2003b). Acetyl-CoA spielt im Hefestoffwechsel eine bedeutende Rolle, da diese Verbindung von der Hefe u.a. in der Wachstumsphase zur Bildung von Fettsäuren und Sterolen benötigt wird (Annemüller, 2009). Die Fettsäuresynthese ist jedoch von Sauerstoff abhängig, der nur zu Beginn der Gärung vorhanden ist. Bei Abwesenheit von molekularem Sauerstoff verlangsamt die Fettsäuresynthese und Acetyl-CoA steht für andere Reaktionen wie z.B. für die Ester-Bildung zur Verfügung. Die Gründe für die Ester-Bildung durch die Hefezelle sind bislang unklar. Es gibt jedoch einige Hypothesen, die diesen energieverbrauchenden Prozess der Hefe erklären können. So vermutet *Verstrepen*, dass aroma-aktive Ester wie Isoamylacetat oder Ethylacetat lediglich als Nebenprodukte für physiologisch relevante Reaktionen gebildet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Essigsäureester-Bildung notwendig ist, um spezifische Lipid-

Verbindungen unter anaeroben Bedingungen zu generieren. Ein alternativer Erklärungsansatz geht davon aus, dass die Ester-Bildung erforderlich ist, um bestimmte Lipide in Lipidpartikel einzubauen wie es auch bei Sterolen der Fall ist (Verstrepen, 2004b). Des Weiteren existiert die Hypothese, dass die Hefezelle unter Stressbedingungen versucht, ihre Membraneigenschaften durch die Veresterung von freien Hydroxyl-Gruppen für bestimmte Membrankomponenten zu verbessern. Einen weiteren Erklärungsansatz stellt das einfache Recyclen des freien CoAs dar. Darüber hinaus wird auch vermutet, dass es sich bei der Ester-Bildung durch die Hefezelle um einen Entgiftungsversuch gegenüber mittelkettigen Fettsäuren (C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub> Fettsäuren) handelt, welche während der anaeroben Fettsäuresynthese freigesetzt werden (Lilly et al., 2006a; Verstrepen, 2003d).

Auch wenn die Gründe für die Ester-Bildung bislang ungeklärt sind, so ist jedoch bekannt, dass die Essigsäureester-Bildung durch die Hefezelle enzymkatalysiert ist und nur bei Anwesenheit von Alkohol-Acetyl-Transferasen (AATase) ablaufen kann. Es konnten bislang drei unterschiedliche Enzyme identifiziert werden, die diese Reaktion katalysieren: AATase 1 (oder Atf1p), AATase 2 (oder Atf2p) und Lg-AATase. Diese AATasen sind in den Genen ATF1, ATF2 und Lg-ATF1 lokalisiert (Fujii, 1997; Malcorps & Dufour, 1992; Verstrepen, 2003d; Yoshimoto, 1998). Es ist jedoch zu erwähnen, dass das Lg-ATF1-Gen bislang nur in *Saccharomyces cerevisiae* var. *pastorianus* identifiziert werden konnte und somit für den obergärigen Gärungsprozess vermutlich keine Rolle spielt (Malcorps & Dufour, 1992). Als für die Bildung von Essigsäureestern bedeutendstes Enzym gilt Atf1p, das im Gen ATF1 kodiert ist. Das Atf2p-Enzym (in ATF2 kodiert) ist laut *Verstrepen* von untergeordneter Bedeutung (Verstrepen, 2003d). Auch *Lilly et al.* kommen in ihren Studien zu dieser Erkenntnis (Lilly et al., 2006a).

Die Bildung der für das Weizenbier-Aroma wichtigsten Vertreter der Essigsäureester, Isoamylacetat und Ethylacetat, wird von den gleichen Enzymen katalysiert. Isoamylacetat wird mit Hilfe der AATasen aus Isoamylalkohol und Acetyl-CoA, Ethylacetat aus Ethanol und Acetyl-CoA gebildet wie Abbildungen 2 zu entnehmen ist.

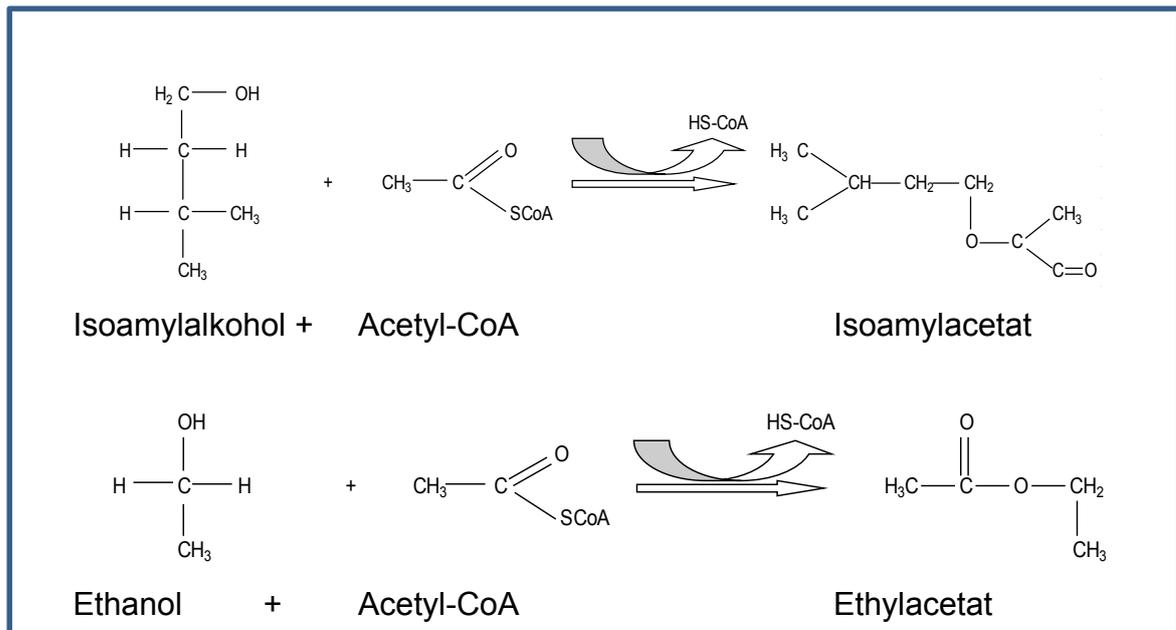


Abbildung 2: Bildungswege von Isoamylacetat und Ethylacetat

Isoamylacetat und Ethylacetat werden während der Gärung und Reifung des Bieres jedoch nicht nur auf den dargestellten Wegen gebildet, sondern können auch z.T. durch die Hefe wieder abgebaut werden (Verstrepen, 2003d). Verantwortlich für diese Hydrolyse-Reaktion ist das Enzym Iah1p, das im Gen IAH1 kodiert ist (Fukuda, 1998, 1999).

### Fettsäureester:

Im Gegensatz zu Essigsäureestern werden Fettsäureester aus Ethanol und einer Fettsäure (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-kettig) gebildet. Die Hauptvertreter dieser Estergruppe sind Hexansäureethylester (Ethylcaproat, Ethylhexanoat), Octansäureethylester (Ethylcaprylat, Ethyloctanoat) und Decansäureethylester (Ethylcaprat, Ethyldecanoat). Diese Fettsäureester besitzen einen charakteristischen Apfel-Geschmack, welcher dem Bier ebenfalls ein leicht fruchtiges Aroma verleihen kann (Verstrepen, 2003b). Im Gegensatz zu den lipid-löslichen Essigsäureestern, können Fettsäureester nur bedingt durch die Zellmembran der Hefe in das Jungbier diffundieren. Die Diffusion ist dabei von der Kettenlänge des Esters abhängig. So gelangen nach Untersuchungen von *Dufour* und *Nykänen* nahezu 100 % an Hexansäureethylestern in das Gärmedium, während nur noch 54 – 68 % an Octansäureethylestern und 8 – 17 % an Decansäureethylestern an das Jungbier abgegeben werden können (Defour, 1994; Nykänen, 1977). Für die Synthese von Fettsäureester werden die beiden Enzyme

Eeb1 und Eht1 verantwortlich gemacht (Mason & Dufour, 2000; Saerens et al., 2006). Vor allem das in Gen EEB 1 kodierte Enzym Eeb1 gilt als hauptverantwortlich für die Fettsäureester-Bildung, während Eht1 (in Gen EHT1 kodiert) eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Saerens et al., 2008a). *Lilly et al.* konnten jedoch auch zeigen, dass der Gehalt an Fettsäureester in Wein bei einer Überexpression von EHT1 deutlich ansteigt (Lilly et al., 2006a).

### **2.2.2 Bildungswege von höheren Alkoholen**

Neben Estern spielen auch höhere Alkohole eine bedeutende Rolle sowohl für das Aromabild eines Bieres als auch als Vorläufer für die Ester-Bildung. Es konnten bereits über 40 verschiedene höhere Alkohole, auch Fuselalkohole oder Fuselöle genannt, im Bier identifiziert werden. Organoleptische Bedeutung haben laut *Boulton* jedoch lediglich vier Vertreter dieser Gruppe: n-Propanol (Propanol-1), Isobutanol (2-Methylpropanol-1) sowie der optisch aktive Amylalkohol (2-Methylbutanol-1) und Isoamylalkohol (3-Methylbutanol-1) (Boulton, 2001). Neben den aliphatischen Alkoholen, die ca. 85 % der Gesamtmenge an höheren Alkoholen im Bier ausmachen, kommen auch höhere aromatische Alkohole im Bier vor. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist Phenylethanol, das in Geruch und Geschmack an Rosen erinnert (Annemüller, 2009). Mengenmäßig stellen die höheren Alkohole die größte Gruppe an Gärungsnebenprodukten im Bier dar (10-160 mg/l) (Verstrepen, 2003b). Allerdings sind große Mengen höherer Alkohole im Bier selten erwünscht, da sie dem Bier einen alkoholischen und z.T. leeren Geschmack verleihen (Narziß, 1979). Dennoch können sie auf Grund synergistischer Matrixeffekte auch einen positiven Beitrag zum Bieraroma leisten (Verstrepen, 2003b). Im Allgemeinen werden zwei Bildungswege von höheren Alkoholen unterschieden. Zum einen können diese über eine *de novo*-Synthese aus Kohlenhydraten über das Zwischenprodukt Pyruvat gewonnen werden, was als sogenannter anabolischer Weg der Synthese beschrieben wird, zum anderen besteht für die Hefe die Möglichkeit, höhere Alkohole katabolisch über den sogenannten Ehrlich-Mechanismus zu synthetisieren. Beide Möglichkeiten werden im Folgenden dargestellt.

Anabolischer Weg:

Ausgangsstoff für die Bildung höherer Alkohole über den anabolischen Weg ist Pyruvat. Wie in Abbildung 3 dargestellt ist, wird Pyruvat zunächst in eine  $\alpha$ -Ketosäure umgewandelt, bevor ein Aldehyd daraus entsteht. Im letzten Reaktionsschritt wird der Aldehyd zum korrespondierenden Alkohol reduziert. Der anabolische Weg spielt vor allem während des gesamten Verlaufs der Hauptgärung eine große Rolle. Auch können höhere Alkohole wie n-Propanol nur über den anabolischen Weg gebildet werden, da keine Aminosäure als Edukt für den Ehrlich-Mechanismus existiert (Boulton, 2001).

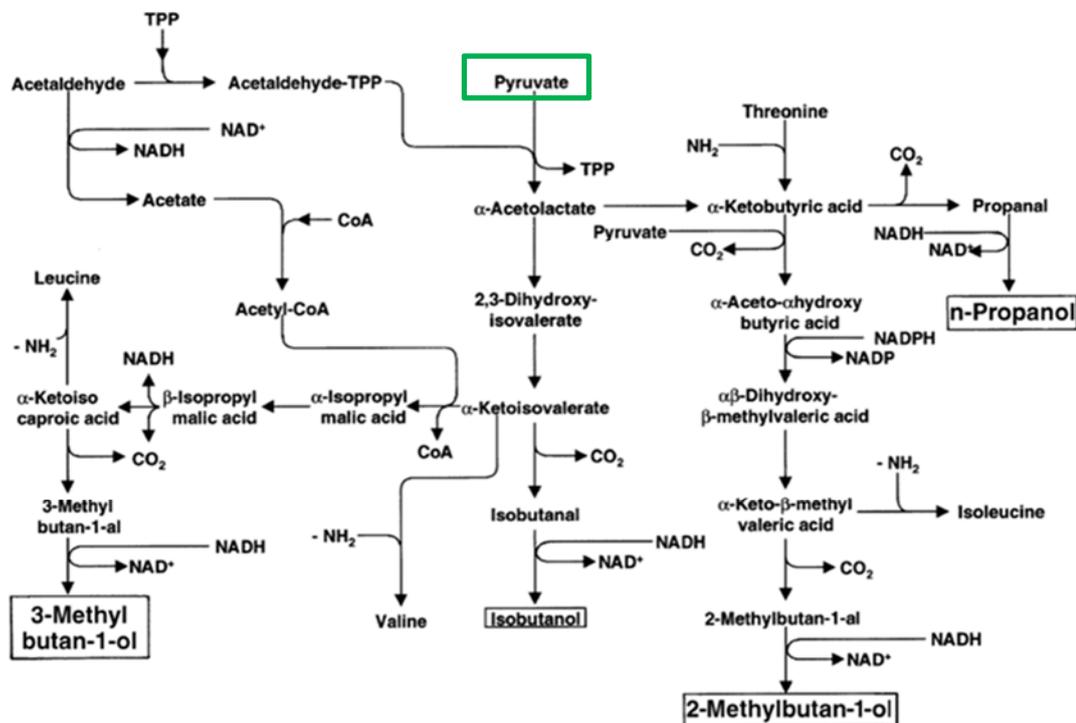


Abbildung 3: Überblick über die Bildungswege von höheren Alkoholen (Boulton, 2001)

Katabolischer Weg:

Bei der Synthese über den sogenannten Ehrlich-Mechanismus werden von der Hefe Aminosäuren aus dem Medium (Würze bzw. Jungbier) aufgenommen. Diese Aminosäuren werden in Ketosäuren umgewandelt und unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung (Decarboxylierung) zu einem Aldehyd umgebaut. Im letzten Reaktionsschritt wird aus dem Aldehyd unter Energieaufwendung der korrespondierende Alkohol gebildet (Hazelwood, 2009). Dieser Mechanismus ist für *Saccharomyces cerevisiae* einzigartig, da andere Eukaryonten Aminosäuren über den Citratzyklus abbauen.

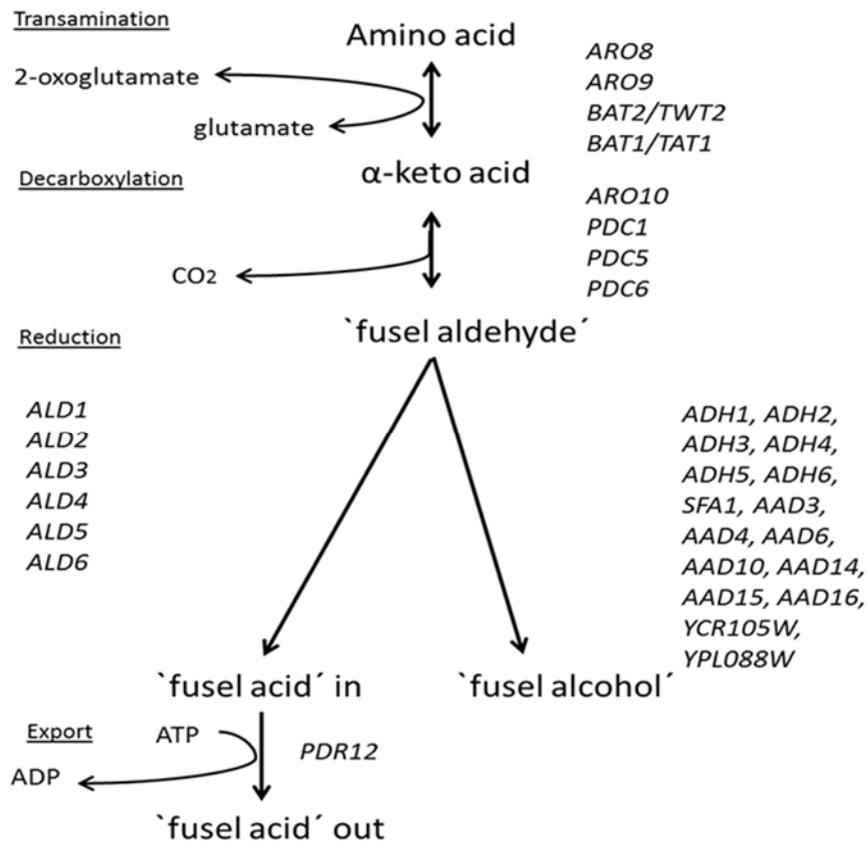


Abbildung 4: Überblick über den Ehrlich-Mechanismus (Hazelwood, 2008)

Der Ehrlich-Mechanismus spielt vor allem in der Angärphase eine große Rolle, da zu diesem Zeitpunkt noch sehr viele Aminosäuren zur Verfügung stehen. Im Verlauf der Gärung gewinnt der anabolische Weg an Bedeutung (Boulton, 2001). Nachfolgend sind die wichtigsten Aminosäuren und die aus dem Ehrlich-Mechanismus resultierenden höheren Alkohole dargestellt.

Tabelle 1: Edukte und Produkte des Ehrlich-Mechanismus  
(Annemüller, 2009)

Ausgangs-Aminosäure	Korrespondierender Alkohol
Threonin	n-Propanol
Leucin	3-Methylbutanol
Isoleucin	2-Methylbutanol
Valin	Isobutanol
Phenylalanin	Phenylethanol

Der erste und somit auch limitierende Schritt über den katabolischen Weg wird von Aminosäuren-Aminotransferasen katalysiert, welche vermutlich in den Genen BAT1 und BAT2 lokalisiert sind. *Lilly et al.* konnten zeigen, dass eine Überexpression des BAT1-Gens zu einem Anstieg in der Konzentration von Isoamylalkohol und in geringerem Maße auch von Isobutanol führt (Lilly, 2004). Weitere wichtige Enzyme, welche für die Aufnahme der Aminosäuren in die Hefezelle benötigt werden, sind die Aminosäure-Permeasen. Diese sind im sogenannten BAP2-Gen kodiert (Saerens, Verbelen, Vanbeneden, Thevelein, & Delvaux, 2008b).

### **2.2.3 Bildungswege von phenolischen Komponenten**

Phenolische Substanzen wie z.B. das in Geruch und Geschmack an Gewürznelke erinnernde 4-Vinylguajakol werden in erster Linie während der Gärung von obergärigen Hefen gebildet (Geschmacksschwellenwert ca. 250 ppb (Wackerbauer, 1982)). Untergärrige Hefen sind zur Synthese dieser Stoffe auf Grund mangelnder Enzymausstattung meist nicht in der Lage (Vanbeneden, Gils, Delvaux, & Delvaux, 2008). Eine phenolische Note im Bier wird jedoch in nahezu allen Fällen, mit Ausnahme von Weizen-, Rauch- und Spezialbieren, als negativ empfunden. Daher wurde der Begriff „Phenolic-Off-Flavor“ (POF) geprägt, welcher Hefe- und auch verschiedene Bakterien-Stämme in POF<sup>+</sup> (positiv) und POF<sup>-</sup> (negativ) einstuft (Madigan, McMurrough, & Smyth, 1994; Stratford, Plumridge, & Archer, 2007). Diese Einteilung ermöglicht es, die Aussage über einen Mikroorganismus zu treffen, ob er in der Lage ist, 4-Vinylguajakol (4-VG) oder 4-Vinylphenol (4-VP) zu bilden. Untersuchungen mit Weinhefen oder Hefen für die Sojasoßen-Produktion zeigten,

dass ein Großteil der Hefestämme POF<sup>+</sup> ist (Shinohara, Kubodera, & Yanagida, 2000; Suezawa & Suzuki, 2007). Für den Bierbereich ist dies nicht zutreffend.

4-Vinylguajakol kann jedoch nicht nur auf enzymatischem Weg durch die Hefe, sondern auch auf einem thermischen Weg aus der Ferulasäure gebildet werden (Vanbeneden, 2008). Für die thermische Umsetzung von Ferulasäure zu 4-VG werden Temperaturen von >80°C benötigt, die nur während des Würzekochprozesses gegeben sind (Vanbeneden, Gils, Delvaux, & Delvaux, 2007). Der thermische Bildungsprozess während der Würzebereitung spielt jedoch lediglich eine untergeordnete Rolle für die 4-VG-Bildung (Bildung während der Würze-Herstellung ca. 0,3 mg/l (Coghe, Benoot, Delvaux, Vanderhaegen, & Delvaux, 2004; McMurrough et al., 1996)). Nur durch sehr lange Kochzeiten der Würze kann eine entsprechende Menge Ferulasäure in 4-VG umgesetzt und so der Gehalt an 4-VG signifikant gesteigert werden, was jedoch andere technologische Probleme mit sich bringt. Das Edukt für die Gewinnung von 4-VG, die Ferulasäure, ist im Malz in der Aleuronschicht lokalisiert und dort an Arabinoxylan gebunden (Fincher, 1976; Herrmann, 2005a). Sie wird während des Maischprozesses von der Ferulasäurehydrolase aus dem Malz in Lösung gebracht. Das Optimum dieses Enzyms liegt bei Temperaturen zwischen 40 und 45,5°C und einem pH-Wert von 5,8 - 6,1 (Back, 2005, 2008; Narziß, 1990; Vanbeneden, Van Roey, Willems, Delvaux, & Delvaux, 2008). Auch aktuelle Studien von *Cui et al.* konnten zeigen, dass die Bildung von 4-Vinylguajakol u.a. durch Einmischtemperaturen von 44°C signifikant gesteigert werden kann (Cui, 2015).

Während der Gärung ist die Aktivität der Feruladecarboxylase der obergärigen Hefe für die Umsetzung der Ferulasäure zu 4-Vinylguajakol auf enzymatischem Weg verantwortlich (Annemüller, 2009). Andere Quellen berichten, dass die Phenylacrylsäure-Decarboxylase essentiell für die 4-VG-Synthese ist (Vanbeneden, 2008). Dieses Enzym ist im Gen PAD1 kodiert und steigert in Anwesenheit von Ferulasäure die 4-VG-Konzentration signifikant (Smit, Otero, Lambrechts, Pretorius, & Van Rensburg, 2003). *Vanbeneden et al.* zeigten darüber hinaus, dass 4-VG im Laufe der Bieralterung vermutlich zerfällt und daraus die Verbindungen Vanillin und Apocynol [4-(1-Hydroxyethyl)-2-Methoxyphenol] entstehen (Vanbeneden, 2008). Der Abbau von 4-VG zu Vanillin wird auch in anderen Studien nachgewiesen. Untersuchungen mit *Bacillus coagulans* zeigten ebenfalls einen Abbau von 4-VG zu Vanillin und im Folgenden zu Vanillin-Säure (Karmakar et al., 2000).

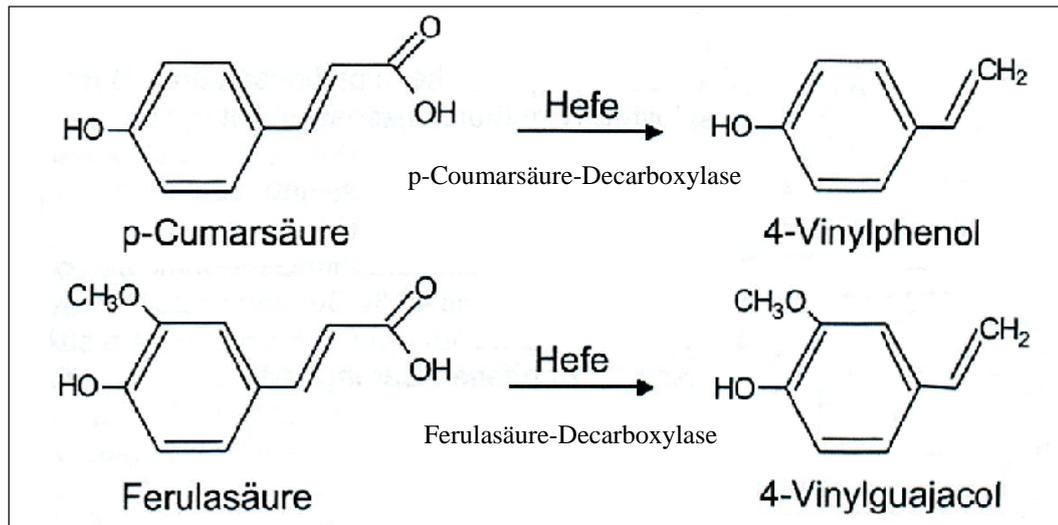


Abbildung 5: Bildungswege der Phenole 4-Vinylphenol und 4-Vinylguajakol (Annemüller, 2009)

Laut *Back* spielt die andere bekannte phenolische Komponente, das 4-Vinylphenol, für das Aromaprofil eines Weizenbieres eine untergeordnete Rolle, kann aber dennoch einen Beitrag zum phenolischen Aroma leisten (Back, 2005). Der Bildungsweg entspricht größtenteils dem des 4-VGs, allerdings dient p-Cumarsäure als Ausgangssubstrat. Auch die p-Cumarsäure wird decarboxyliert und zu 4-VP umgewandelt. Der Geschmacksschwellenwert dieser Substanz liegt im Bier bei ca. 200 ppb und wird als medizinisch-phenolisch und z.T. adstringierend charakterisiert (Wackerbauer, 1982).

Neben den beschriebenen Phenolen existiert eine Reihe weiterer phenolischer Verbindungen im Bier wie Vanillin, Eugenol und diverse Phenolcarbonsäuren wie z.B. Ferulasäure, Vanillinsäure, Sinapinsäure, Zimtsäure, p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Gallussäure und andere, die jedoch unbedeutend für das Weizenbier-Aroma sind (Herrmann, 2005b).

### **2.3 Einflussfaktoren auf die Bildung von Aromasubstanzen**

#### **2.3.1 Rohstoffbedingte Einflussfaktoren**

Das Aromaprofil eines Bieres wird bereits durch die Auswahl der Rohstoffe beeinflusst. Die Rohstoffauswahl innerhalb des deutschen Reinheitsgebotes ist auf Wasser, Malz und Hopfen (und Hefe) beschränkt. Für die Produktion eines Weizenbieres muss ein Anteil von mindestens 50 % Weizenmalz verwendet werden. Dieser Anteil kann somit zwischen 50 % und 100 % Weizenmalz schwanken.

Der Einfluss des Weizenmalzes auf die Ester-Bildung ist laut *Sacher* jedoch nur gering (*Sacher*, 1997). Diese Tatsache liegt vermutlich in den Bildungswegen der Ester begründet. Die Ester-Produktion wird durch zwei Faktoren limitiert. Zum einen können die beiden Substrate Acetyl-CoA und der jeweils benötigte höhere Alkohol limitierend sein, zum anderen gilt die Enzymaktivität, die diese Reaktionen katalysiert, als entscheidender Faktor (*Verstrepen*, 2003c). Die genannten Kriterien werden durch die Auswahl und das Mischungsverhältnis der Malzpartien so gut wie nicht beeinflusst. Jedoch berichtet *Back*, dass niedrige proteolytische Kennzahlen im Malz zu lebhafteren und estrigeren Bieren führen (*Back*, 1998).

Im Gegensatz zur Esterproduktion ist die Bildung von 4-VG und 4-VP von den Ausgangssubstraten Ferulasäure bzw. p-Cumarsäure abhängig. Beide Phenylcarbonsäuren gelangen durch das Malz in die Würze. Der phenolische Geschmack des Weizenbieres kann grundsätzlich durch die Wahl der Rohstoffzusammensetzung beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass Gerstenmalz im Vergleich zu Weizenmalz einen höheren Anteil an Ferulasäure aufweist (*Back*, 2005, 2008). Wird der Anteil an Weizenmalz auf ein Minimum von 50 % verringert (gemäß dem deutschen Reinheitsgebot), so steigen die Menge an enthaltener Ferulasäure und somit auch der Gehalt an 4-VG im fertigen Bier an.

Über den Einfluss des Hopfens auf die Bildung wertgebender Gärungsnebenprodukte ist bislang nichts bekannt. Es gilt als unwahrscheinlich, dass Hopfeninhaltsstoffe die Enzymaktivitäten der beschriebenen Stoffwechselwege beeinflussen. Allerdings gibt es die Möglichkeit, fruchtige Aromakomponenten über z.B. Lactone aus dem Hopfen in das Bier zu überführen (vor allem über Dry-Hopping-Methoden) (*Hotchko*, 2014). Für die Produktion von Weizenbieren werden jedoch im Vergleich zu untergärigen

Bieren in der Regel sehr geringe Mengen Hopfen verwendet, sodass auch diese Komponenten vernachlässigbar sind.

Ebenfalls keinen Einfluss auf die Bildung wertgebender Aromasubstanzen hat nach bisherigen Kenntnissen die Qualität des verwendeten Brauwassers.

### **2.3.2 Einfluss der Würze-Zusammensetzung**

Die Sudhausarbeit und die daraus resultierende Würze-Zusammensetzung sind entscheidend für die Bildung von Gärungsnebenprodukten. Sowohl höhere Alkohole als auch Ester und Phenole sind abhängig von Stoffkomponenten in der Würze. Hierbei spielen verschiedene Parameter eine entscheidende Rolle.

#### **Sauerstoffgehalt in der Würze:**

Der Sauerstoffgehalt in der Würze ist vor allem für die Ester-Bildung von großer Bedeutung. Ein hoher Sauerstoffgehalt bewirkt zum einen eine verbesserte Hefevermehrung, zum anderen eine Unterdrückung der AATasen-Aktivität. Eine intensive Hefevermehrung führt zu einem Mehrverbrauch an Acetyl-CoA, welches somit in geringerer Konzentration für die Ester-Bildung zur Verfügung steht. Demnach stellt die Substratmenge an Acetyl-CoA den limitierenden Faktor für die Ester-Bildung dar. Darüber hinaus ist bekannt, dass Sauerstoff die Aktivität der AATasen hemmt, was wiederum zu einer verminderten Ester-Bildung führt (Fujii, 1997; Mason & Dufour, 2000; Verbelen, Saerens, Van Mulders, Delvaux, & Delvaux, 2009). Diese Tatsachen erklären auch, warum in der Brauereipraxis fruchtigere und somit ester-reichere Biere bei sehr geringer Würzebelüftung entstehen. Allerdings kann die Ester-Bildung laut Back auch durch intensive Belüftung erhöht werden (Back, 2005).

Gegenteiligen Effekt hat der Sauerstoff auf die Bildung von höheren Alkoholen. Hohe Sauerstoffkonzentrationen in der Würze führen zu einer starken Hefevermehrung, die auch die Bildung von höheren Alkoholen fördert. Obwohl höhere Alkohole somit als Ausgangssubstrat für die Bildung von Estern (siehe Isoamylacetat) in höheren Konzentrationen vorliegen, führt eine starke Würzebelüftung aus genannten Gründen nicht zu einer vermehrten Bildung an resultierenden Estern (Kruger, 1998).

### **Aminosäuren:**

Aminosäuren sind für den Aufbau von Proteinen beim Zellwachstum essenziell. Die Bildung höherer Alkohole durch die Hefezelle geht parallel zum Zellwachstum vonstatten, während Ester wiederum aus höheren Alkoholen entstehen und somit indirekt vom Aminosäure-Gehalt abhängig sind. Die Produktion von höheren Alkoholen gilt dabei als proportional zum Angebot an Aminosäuren (Vollbrecht & Radler, 1973). Versuche von *Engan* zeigten, dass die Zugabe von Zucker in Verbindung mit unterschiedlichen Aminosäuren z.T. sehr große Auswirkungen auf das Spektrum von höheren Alkoholen und Estern hat. So konnte er nachweisen, dass die Zugabe von Leucin und Isoleucin mit steigender Zugabe von Glucose zu einer vermehrten Bildung von Amylalkoholen und folglich auch zu einem erhöhten Gehalt an Isoamylacetat führt (Engan, 1970). Auch *Procopio* konnte zeigen, dass die Zugabe von Leucin, Isoleucin und Valin zur Würze zu einer Steigerung an Isoamylalkohol, 2-Methylbutanol, Isoamylacetat und 2-Methylbutylacetat führt (Procopio, 2014). Ethylacetat, das aus Ethanol und Acetyl-CoA gebildet wird, war von der Zugabe von Aminosäuren nahezu unbeeinflusst. Durch die Zugabe der Aminosäure Valin konnten die Gehalte an Propanol und Isobutanol jedoch signifikant gesteigert werden (Engan, 1970).

### **Stammwürzegehalt:**

Ein aus der Brauereipraxis bekanntes Phänomen ist die erhöhte Bildung von Estern bei der Verwendung von High-Gravity-Würzen. Im untergärigen Sektor wird deshalb versucht, die vermehrte Ester-Bildung bei der Verwendung von extraktreichen Würzen durch Druckgärungen zu reduzieren. Auf die Auswirkung des Druckes auf die Aromastoffsynthese wird im Folgenden noch ausführlicher eingegangen. Bei der Verwendung von Ultra-High-Gravity-Würzen kann der Gehalt an Acetat-Estern sogar um bis zu 75 % im Vergleich zu Würzen mit einem normalen Stammwürzegehalt ansteigen (Anderson, 1974; Meilgaard, 2001).

Untersuchungen von *Saerens et al.* konnten bestätigen, dass die Konzentrationen an Acetat-Estern und Hexansäureethylestern mit steigendem Stammwürzegehalt zunehmen. Darüber hinaus bestätigten sie, dass sich ein erhöhter Stammwürzegehalt auf verschiedene Hefen unterschiedlich auswirken kann. So konnte bei der Verwendung eines untergärigen Lager-Hefestammes mit steigender Zuckerkonzentration in der Würze kein signifikanter Unterschied in der Produktion von

höheren Alkoholen festgestellt werden, während der Gehalt dieser Komponenten bei der Verwendung eines obergärigen Ale-Hefestammes signifikant anstieg (Saerens et al., 2008b).

### **Fettsäuren:**

Neben Sauerstoff können auch trüb abgeläuterte Würzen die Bildung von Estern unterdrücken. Dieser Effekt wird von ungesättigten Fettsäuren verursacht, welche die Ester-Bildung hemmen. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte der erhöhte Verbrauch an Acetyl-CoA bedingt durch verbessertes Hefewachstum aufgrund eines Überschusses an Fettsäuren sein. Somit käme es zu einem Substratmangel, der in einer verminderten Ester-Bildung resultieren würde. Ein weiterer Erklärungsansatz ist die direkte Hemmung der Enzymaktivität durch ungesättigte Fettsäuren, der erstmals von *Malcorps et al.* 1991 formuliert wurde (Malcorps, Cheval, Jamil, & Dufour, 1991). *Fujiwara et al.* konnten ebenfalls bestätigen, dass die Transkription des Alkohol-Acetyl-Transferasen-Gens ATF1 direkt durch ungesättigte Fettsäuren unterdrückt wird (Fujiwara, 1998, 1999; Verstrepen, 2004a). Auch *Thurston et al.* vermuteten, dass die reduzierte Bildung von Estern auf eine dieser beiden Theorien zurückzuführen ist. Sie fanden heraus, dass die Zugabe von 50 mg/l Linolsäure zu einer um 80 % reduzierten Produktion von Ethylacetat und Isoamylacetat führt (Thurston, 1981). Dieser Effekt tritt jedoch nicht bei der Synthese von Fettsäureestern auf, wie *Saerens et al.* 2008 herausfanden. Die Expressionen der Gene EEB1 und EHT1, die für die Bildung der Fettsäureester eine Schlüsselrolle spielen, wurden durch die Zugabe von Fettsäuren nicht beeinträchtigt.

Einen gegenteiligen Effekt haben ungesättigte Fettsäuren in der Würze auf die Produktion von höheren Alkoholen. Die Anwesenheit von Fettsäuren und Sterolen stimuliert die Zellvermehrung der Hefe und somit auch die Produktion von höheren Alkoholen (Taylor, 1979).

### **Zuckerspektrum:**

Die in der Würze enthaltenen vergärbaren Zucker Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose und Maltotriose spielen ebenfalls eine Rolle für das Aromaprofil eines Weizenbieres. *Engan et al.* konnten bereits 1972 nachweisen, dass vor allem Glucose- und auch Fructose-Zugaben zu einer Erhöhung der Isoamylacetat-Konzentration im Bier führen. Auch der Gehalt an Ethylestern und höheren Alkoholen stieg in diesen Studien durch die Zucker-Zugabe an (Engan, 1972). Ein gesteigerter Gehalt an Ethyl- und Isoamylacetat durch die Zugabe von Glucose oder Fructose im Vergleich zu Maltose konnte auch in weiteren Versuchen bestätigt werden (Stewart, 1999). Die genauen Zusammenhänge und Gründe für die unterschiedliche Bildung an Estern bei verschiedenen Zuckerspektren sind bislang noch unklar. Es wird vermutet, dass durch Glucose größere Mengen an Acetyl-CoA gebildet werden, welche wiederum verestert werden können. Auch eine vermehrte Bildung an Fuselalkoholen, dem zweiten Substrat für die Ester-Bildung, könnte diesen Vorgang forcieren. Darüber hinaus besteht laut *Verstrepen* auch die Möglichkeit, dass die Expression der Gene ATF1 und ATF2 durch Glucose verstärkt wird (Verstrepen, 2003a).

Um diesen Effekt nutzbar zu machen, entwickelte *Herrmann* während seiner Promotion ein spezielles Maischverfahren zur Steigerung der Glucose-Konzentration in der Würze. Das sogenannte „Maltasemaischverfahren“ sieht vor, eine Teilmaische bei 62°C und 70°C zu verzuckern, um Maltose für das Enzym Maltase bereitzustellen. Im zweiten Schritt wird diese Teilmaische auf 45°C mittels einer zweiten Teilmaische abgekühlt (Temperaturoptimum der Amylasen) und somit kann die Spaltung der Maltose in Glucose erfolgen (Herrmann, 2005b).

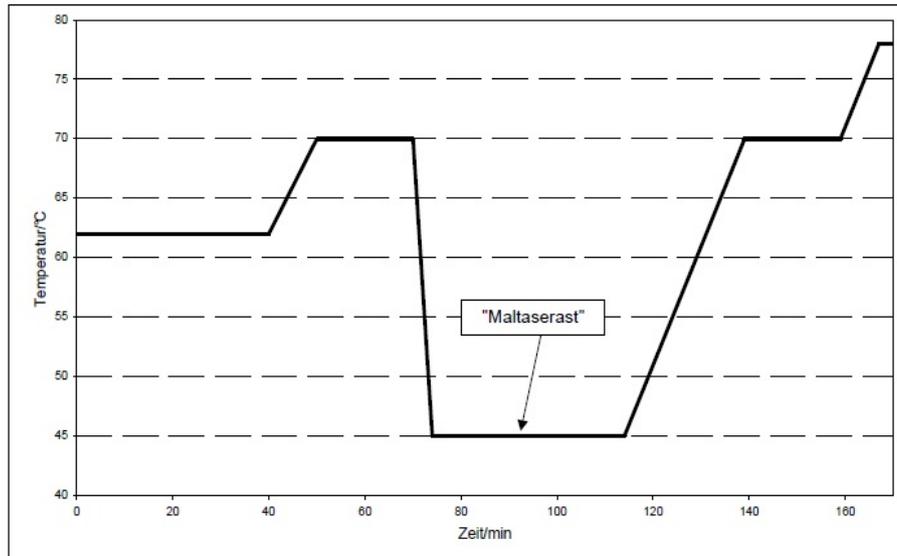


Abbildung 6: Maltasemaischverfahren nach *Herrmann*  
(Herrmann, 2005b)

### 2.3.3 Einfluss des Hefestammes

Im Gegensatz zu untergärigen prägen obergärige Hefen im Regelfall ein breiteres Aromaspektrum mit einer größeren Menge an Gärungsnebenprodukten. Die Differenzierung zwischen ober- und untergärigen Hefen auf Grund von physiologischen Unterschieden wurde erstmals zwischen 1883 und 1888 von *Hansen* beschrieben (Donhauser, 1995). Auf Grund der unterschiedlichen Enzymausstattung ist die Auswahl des Hefestammes für die Aromausprägung eines Bieres mitentscheidend. Bislang ist jedoch wenig bekannt über die genetische Ausstattung bzw. die Aromausprägung der einzelnen Hefestämme. *Donhauser et al.* untersuchten 1991 sieben obergärige Hefestämme mittels Versuchsgärungen im Kleinmaßstab und kamen zu dem Schluss, dass die Hefestämme 68, 149 und 214 aus der Hefebank Weihenstephan zu den besten Bieren führen (Donhauser, 1991). Auch *Narziß* untersuchte ausgewählte obergärige Hefestämme und stellte die Konzentrationen an Ethylacetat und 4-VG von vier Hefestämmen einander gegenüber. Die höchste Aromausstattung wies dabei der Hefestamm 175 auf (Narziß, 1995). In keinem Fall jedoch wurden die genetischen Eigenschaften der Hefen untersucht oder ein genaues Aromaprofil erstellt. Somit ist bislang nur sehr wenig darüber bekannt, welcher Hefestamm zum gewünschten Aromaprofil im fertigen Bier führt.

### **2.3.4 Einfluss der Gärungsparameter**

#### **2.3.4.1 Einfluss der Hefe**

Der physiologische Zustand der Hefe spielt eine entscheidende Rolle für die Bildung der Gärungsnebenprodukte. Neben der Auswahl des Hefestammes tragen weitere Faktoren wesentlich zur Aromausprägung bei. Zum einen ist die Vitalität, zum anderen die Viabilität der Hefe ausschlaggebend: Tote Hefezellen können autolysieren und ungesättigte Fettsäuren, Stickstoffverbindungen und andere Komponenten freisetzen. Diese Stoffe haben wiederum die in den vorherigen Kapiteln erwähnten Auswirkungen zur Folge (vgl. 2.3.1 und 2.3.2). Des Weiteren ist bekannt, dass eine gestresste Hefe mit einer geringeren Viabilität zu einer vermehrten Ester-Bildung neigt (Englmann, 2010).

Neben dem physiologischen Zustand der Hefe ist auch die Hefegabe bzw. die Anstellzellzahl entscheidend. Eine höhere Anstellzellzahl resultiert in einer geringeren Vermehrungsrate. Dies bedeutet, dass weniger höhere Alkohole, dafür jedoch zumeist mehr Essigsäureester wie Ethylacetat und Isoamylacetat gebildet werden (Kruger, 1998).

#### **2.3.4.2 Einfluss der Gärtemperatur**

Ein weiterer maßgeblicher Faktor, der die Aromastoffsynthese beeinflusst, ist die Gärtemperatur. Hierbei führt eine Erhöhung der Gärtemperatur zumeist zu einer vermehrten Bildung von höheren Alkoholen und Estern. Durch höhere Temperaturen wird das Zellwachstum der Hefe angeregt, was in einer vermehrten Produktion höherer Alkohole resultiert (Kruger, 1998; Landaud, Latrille, & Corrieu, 2001). Auch wird in den meisten Fällen von einer steigenden Ester-Produktion bei Temperaturerhöhungen berichtet. *Saerens et al.* konnten 2008 nachweisen, dass eine Temperaturerhöhung zu einer gesteigerten Produktion der Fettsäureester Octansäurethylester und Decansäurethylester führt (Saerens et al., 2008a). Weitere Untersuchungen an Lager-Hefestämmen bestätigen diese Ergebnisse (Boulton, 2001; Calderbank & Hammond, 1994; Engan, 1974; Nakatani, Fukui, Nagami, & Nishigaki, 1991; Peddie, 1990; Quain, 1988; Sendra, Todo, Pinaga, Izquierdo, & Carbonell, 1994). Allerdings existieren auch Quellen, die belegen, dass nicht alle Komponenten mit erhöhten Gärtemperaturen ansteigen. Studien von *Saerens et al.* erbrachten überdies, dass der

Gehalt an Ethylacetat bei bestimmten untergärigen Hefestämmen durch eine Erhöhung der Gärtemperaturen nicht zu forcieren war. Ebenso konnten in dieser Untersuchung keine Steigerungen der Ester-Konzentrationen bei der Verwendung von diversen Ale-Hefestämmen festgestellt werden (Saerens et al., 2008b). Eine Erhöhung der Gärtemperatur führt demnach in den meisten Fällen zu einer vermehrten Ester-Bildung, jedoch scheint dieser Anstieg vom Hefestamm abhängig zu sein.

### **2.3.4.3 Einfluss des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks während der Gärung**

Neben Parametern wie Temperatur, Hefestamm und physiologischem Zustand der Hefe stellt der physikalische Druck einen weiteren wichtigen Gärparameter bezüglich der Aromastoffbildung dar. Druck wird in Brauereien oftmals gezielt eingesetzt, um vor allem bei der Produktion von untergärigen Bieren die Bildung von Gärungsnebenprodukten wie z.B. höheren Alkoholen oder Estern zu unterdrücken. Dabei wird der Hefestoffwechsel jedoch nicht direkt durch den im Gärtank vorherrschenden statischen Druck beeinflusst, sondern indirekt durch den erhöhten CO<sub>2</sub>-Druck des Gärmediums (Zufall, 2000). Der statische Druck spielt vor allem bei sehr hohen zylindrokonischen Tanks (ZKT) insofern eine Rolle, als dass durch diesen der Gehalt an gelöstem CO<sub>2</sub> im Medium ansteigt, welcher so das Verhalten der Hefezelle beeinflusst. Durch einen erhöhten CO<sub>2</sub>-Partialdruck wird das Zellwachstum der Hefe unterdrückt und führt somit zu einer verlangsamten und z.T. unvollständigen Gärung. Durch zahlreiche Studien ist bekannt, dass es bei erhöhtem CO<sub>2</sub>-Partialdruck zu einem Anstieg der Jungbukettstoffe Diacetyl und Acetaldehyd sowie zu einer verminderten Bildung von höheren Alkoholen und Estern kommen kann (Arcay-Ledezma & Slaughter, 1984; Kruger, 1998; Landaud et al., 2001). Am Beispiel von immobilisierten Hefen konnten *Shen et al.* zeigen, dass eine permanente Begasung der Hefen mit CO<sub>2</sub> zu einer Wachstums-Reduzierung von 10 % bis 30 % führt sowie zu einer Reduzierung der höheren Alkohole und Ester um 15 – 18 % (Shen et al., 2004). Durch das gelöste CO<sub>2</sub> wird vor allem die Membranpermeabilität der Hefezelle verändert und beeinflusst somit den Baustoffwechsel der Hefe; der Energiestoffwechsel wird laut *Zufall* nur in geringem Maße beeinflusst (Zufall, 2000). Begründet ist die veränderte Permeabilität in einer Hemmung der Permeasen und in einer strukturellen Veränderung der Fettsäure-Acyl-Enden, welche in der Membran

lokalisiert sind (Jones, 1982). Es wird davon ausgegangen, dass diese veränderte Permeabilität dazu führt, dass Stickstoffverbindungen (FAN etc.) und andere Komponenten erschwert oder in geringerem Umfang von der Hefezelle aufgenommen werden können, was sich wiederum negativ auf die Bildung von höheren Alkoholen und Estern auswirkt (Knatchbull & Slaughter, 1987; Shen et al., 2004). Untersuchungen von *Kruger et al.* mit sogenanntem „yeast food“, welches den Gehalt an gelöstem CO<sub>2</sub> im Gärmedium reduziert, zeigten ebenfalls, dass ein reduzierter CO<sub>2</sub>-Gehalt im Medium zu einer vermehrten Aufnahme von Aminosäuren und somit zu einer vermehrten Bildung von höheren Alkoholen und Essigsäureestern führt (Kruger, Pickerell, & Axcell, 1992).

### **2.3.4.4 Einfluss von Tankgeometrie sowie von Konvektion**

Direkt verbunden mit dem statischen Druck im Gärmedium sind auch die Tankgeometrie und die daraus resultierenden Konvektionsströme. Hierbei gibt es große Unterschiede zwischen den in der Brauereipraxis üblichen Tankbauweisen. Im Allgemeinen gelten Gärbottiche auf Grund ihrer niedrigeren Bauweise als geeigneter für die Produktion von estrig-fruchtigen Weizenbieren als hohe, schlanke ZKTs. Auf Grund der niedrigeren Bauweise von Gärbottichen ist der hydrostatische Druck im Medium geringer als bei Tanks mit höheren Flüssigkeitssäulen. Dies führt wiederum zu einem geringeren CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Gärmedium und somit zu einer erhöhten Bildung an aromagebenden Estern. Durch eine schlanke und hohe Bauweise kommt es, bedingt durch die Wirkung der Kühlflächen und durch den Kohlensäureauftrieb, jedoch auch zu z.T. sehr starken Konvektionsströmungen (Narziß, 1979). Diese fördern im Besonderen eine homogene Verteilung der Nährstoffe im Gärmedium, wodurch es zu einer starken Hefevermehrung kommt, welche in einem Ungleichgewicht zwischen Estern und höheren Alkoholen zugunsten der Alkohole resultieren kann. Dies kann wiederum zu einem leeren Biergeschmack führen (Narziß, 1979). In wissenschaftlichen Untersuchungen werden Konvektionsströmungen oftmals mittels Rührgärungen simuliert, welche den Effekt am besten darstellen. So konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu ungerührten Gärungen der Ester-Gehalt bei der Verwendung bestimmter Stammwürzegehalte abnimmt (Anderson, 1974). Des Weiteren ist zu vermuten, dass sehr starke Konvektionen zu einem vermehrten

Austrag an flüchtigen Aromastoffen wie z.B. Estern durch CO<sub>2</sub> führen kann (Schneiderbanger et al., 2011).

### ***2.4 Messung von Genexpressionen in Hefezellen mittels Real-Time PCR zur indirekten Bestimmung der Enzymaktivität mit Relevanz für die Aromabildung***

Enzyme sind Proteine mit katalytischen Eigenschaften, ohne die Stoffwechselforgänge in Organismen kaum oder nur mit sehr geringer Geschwindigkeit stattfinden würden. Der entscheidende Vorteil gegenüber chemischen Katalysatoren liegt in der hohen Spezifität der Enzyme. Sie können substratspezifisch, stereospezifisch oder wirkungsspezifisch sein. Enzyme sind Proteine, die über ein oder mehrere sogenannte aktive Zentren verfügen. Diese Zentren können entweder ein bestimmter Teil des Proteinmoleküls selbst sein oder ein Coenzym (z.B. Metallionen) mit Nichtprotein-Charakter, dafür aber mit spezieller Struktur, welches sich mit dem allein nicht wirksamen Enzymprotein (Apoenzym) zum aktiven Enzym (Holoenzym) verbindet. Das Trägerprotein bestimmt im Allgemeinen die Substratspezifität, während das aktive Zentrum für die jeweilige Reaktion zuständig ist (Buddecke, 1970; Hoffmann-Ostenhof, 1954). Die Wirksamkeit von Enzymen ist von der Substratkonzentration, der Enzymkonzentration, der Temperatur und vom pH-Wert abhängig (Buddecke, 1970; Joergensen, 1956). Enzyme werden je nach Reaktionsmechanismus in verschiedene Klassen eingeteilt. Hierbei werden Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen unterschieden (Aebi, 1965).

Es existieren unterschiedliche Methoden, um Erkenntnisse über die Enzymaktivität in einem Organismus zu erlangen, wobei die direkte Erfassung nur dann möglich ist, wenn das Co-Enzym besondere Eigenschaften aufweist (z.B. Absorptionsspektrum der Häminenzyme). Eine Schwierigkeit bei der Detektion von Enzymaktivitäten besteht darüber hinaus in der Tatsache, dass Enzyme durch verschiedene Komponenten gehemmt werden können, wodurch sie zwar z.T. vorhanden, jedoch unwirksam sind (Bsp.: Kompetitive und nicht-kompetitive Hemmung) (Buddecke, 1970). Daher kann es unter Umständen zu großen Diskrepanzen zwischen Enzymmenge und Enzymwirkung kommen, weshalb die Enzymaktivität oftmals indirekt durch Erfassung der resultierenden Produkte bestimmt wird. Neben Methoden, die auf Biolumineszenz

oder auf Extinktionsdifferenzen zwischen oxidierten und reduzierten Formen des Coenzym NAD basieren, kann die Enzymaktivität auch mittels Biosensoren oder indirekt mittels Real-Time PCR (polymerase chain reaction) detektiert werden (Altug, Mengulluoglu, Kurt, Kaya, & Dinckaya, 2011; Schöenberg, 2010; Younes et al. 2011). In dieser Arbeit wurde die indirekte Bestimmung der Enzymaktivität in Hefezellen durch Genexpressionsmessungen mittels Real-Time PCR gewählt, da dieses Messprinzip in der Pharma- und Lebensmittelindustrie bereits etabliert ist und es sich darüber hinaus bewährt hat (Braune, 2003; Hutzler, 2009; Hutzler, 2008; Pfaffl, 2006c; Saerens et al., 2008b; Storgards, 2006; Verbelen et al., 2009; Wold, 2005).

Die Messung beruht hierbei auf folgendem Prinzip: Benötigt die Hefezelle Enzyme für eine spezifische Reaktion, so wird zunächst der „Bauplan“ für dieses Enzym im Zellkern von den Chromosomen „abgeschrieben“ (Transkription). Dieser Abschrieb eines spezifischen Gens oder auch Matrize, die sogenannte messenger RNA (mRNA), wird im Folgeschritt aus dem Zellkern zu den Ribosomen transportiert. An den Ribosomen, die ebenfalls zum größten Teil aus RNA (Ribonukleinsäure) bestehen (aus ribosomaler RNA (rRNA)), wird die mRNA mit Hilfe der aus dem Plasma stammenden transfer RNA (tRNA) übersetzt (Translation) und aus Aminosäuren in ein Protein bzw. Enzym umgewandelt (vgl. Abb. 7) (Voet, 2002).

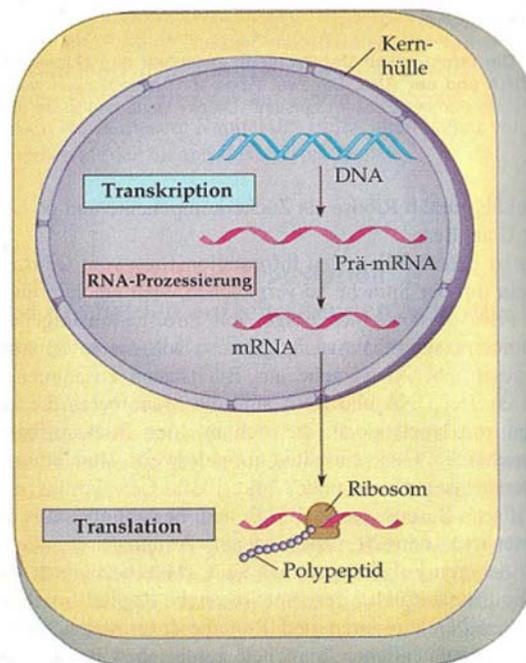


Abbildung 7: Biosynthese in eukaryotischen Zellen  
(Neil A. Campbell. Biologie, Vol. 2, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, 1998, S. 328)

Das Prinzip der Genexpressionsmessung mittels Real-Time PCR beruht darauf, die für jedes Gen/Enzym spezifische mRNA zu quantifizieren. Die PCR wurde bereits 1988 zur *in vitro* Vervielfältigung ausgewählter DNA-Bereiche (Desoxyribonukleinsäure) entwickelt (Saiki, 1988). Mit Hilfe einer PCR ist es möglich, ausgewählte DNA-Abschnitte in sehr kurzer Zeit zu vervielfältigen ( $10^{12}$ -fache Multiplikation in 1 - 2 h) (Mullis et al., 1992). Hierfür werden spezifische Primer (synthetische Oligonukleotide) und Polymerasen, welche in einer definierten thermischen Abfolge mit dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt reagieren, benötigt. Ein typischer Zyklus sieht wie folgt aus (Seyffert, 2003):

1. Denaturierung (denaturation): Auftrennung der doppelsträngigen DNA-Helix in Einzelstränge bei ca. 92 - 96°C
2. Anlagerung (annealing): Hybridisierung der Primer an den komplementären Sequenzen bei Temperaturen, welche um ca. 5°C niedriger sind, als die Schmelztemperaturen der Primer (40 - 72°C)
3. Verlängerung (elongation): DNA-Synthese bei ca. 72°C, in der die Taq-Polymerase (Polymerase, die aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert wird (Dorak, 2007)) die Matrize komplementiert.

Im Gegensatz zur sogenannten Standard- oder Endpunkt-PCR ist es mittels Real-Time PCR möglich, die Amplifikation der PCR-Produkte während der stattfindenden PCR-Zyklen zu messen (Hutzler, 2009). Dieses Messprinzip basiert auf der Verwendung eines Fluoreszenzdonors, dessen Fluoreszenzsignal direkt proportional zur Anzahl der PCR-Produkte ist (Fernandez- Espinar, 2006). Für die Fluoreszenzmessung können sowohl Farbstoffe wie z.B. SYBR-Green oder Fluoreszenzsonden eingesetzt werden. Der Einsatz von Farbstoffen, wie in dieser Arbeit der Fall, beruht auf der Tatsache, dass sich dieser in der doppelsträngigen DNA einlagern kann und somit das Fluoreszenzsignal mit zunehmender Konzentration an PCR-Produkten ansteigt (Pfaffl, 2006a). Da jedoch in dieser Arbeit mRNA quantifiziert werden sollte und eine PCR lediglich in der Lage ist DNA-Stränge zu vervielfältigen, ist es vor der Messung notwendig, die vorhandene einsträngige mRNA in die komplementäre doppelsträngige cDNA (Copy-DNA) umzuschreiben. Alle übrigen Schritte zur Quantifizierung der cDNA erfolgen analog zur Messung von DNA.

### **2.5 Absolute und relative Flüchtigkeit von Aromasubstanzen**

Da es im Bereich der Weizenbier-Produktion auf Grund der relativ hohen Gärtemperaturen zu sehr intensiven Gärungen kommt, bei denen vermutlich auch einige Aromasubstanzen über die Gasphase verloren gehen, sind Kenntnisse über die Flüchtigkeiten ausgewählter Aromakomponenten äußerst wichtig. Bislang gibt es jedoch kein Wissen darüber, welche Aromastoffe in welchen Mengen bei der Gärung durch das CO<sub>2</sub> aus dem Bier entweichen. Für die Untersuchung des Ausgasungsverhaltens einer Stoffkomponente wird oftmals die sogenannte relative Flüchtigkeit herangezogen. Mit Hilfe dieser Kenngröße ist es möglich, eine Aussage über die zu erwartenden Verluste eines Aromastoffes während des Würze-Herstellungprozesses oder während der Gärung zu treffen. Um diese Kenngröße definieren zu können, sind jedoch einige physikalische bzw. thermodynamische Grundlagen notwendig.

Ein System, das aus einer flüssigen und einer gasförmigen Phase eines Einstoffgemisches besteht (z.B. Wasser und Wasserdampf), befindet sich im sogenannten Phasengleichgewicht, wenn sowohl die Temperatur der beiden Phasen identisch ist als auch die gleichen Drücke herrschen (Scheuren, 2008).

**Formel 1:**  $T^V = T^L$

Mit  $T^V$ =Temperatur in der Gasphase und  $T^L$ =Temperatur in der Flüssigkeit

**Formel 2:**  $P^V = P^L$

Mit  $P^V$ =Druck in der Gasphase und  $P^L$ =Druck in der Flüssigkeit

Im Regelfall besteht ein System jedoch nicht nur aus einer Reinsubstanz, sondern es handelt sich bei den zu untersuchenden Gas-Wasser-Systemen um Zwei- oder Mehrstoffgemische. Hierfür werden weitere Formeln zur Berechnung von Ausgasungsvorgängen benötigt. Prinzipiell können Stoffkomponenten aus der flüssigen Phase über zwei unterschiedliche Mechanismen in die Gasphase entweichen. Es wird hierbei zwischen „Sieden“ und „Verdunsten“ unterschieden. Es existieren stets eine Dampf- und eine Flüssigkeitsphase, die bestrebt sind, an der Kontaktfläche, d.h. an der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen, ein Gleichgewicht herzustellen. Der Siedevorgang unterscheidet sich wesentlich vom

Verdunstungsvorgang durch die Tatsache, dass nach Erreichen der Siedetemperatur Dampfblasen entstehen, die die Grenzschicht durchdringen können. Ein Molekülaustausch ist beim Verdunstungsprozess lediglich an der Oberfläche der Flüssigkeit möglich. Zu einer Ausdampfung durch Sieden kommt es nur, wenn der temperaturabhängige Dampfdruck des flüssigen Mediums ( $P_i^L$ ) größer ist als der Partialdruck dieses Mediums in der Dampfphase ( $P_i^V$ ) (Scheuren, 2008, 2011), d.h. wenn folgendes gilt:

**Formel 3:** 
$$P_i^L > P_i^V$$

Mit  $P_i^L$  = Partialdruck in der Flüssigkeit und  $P_i^V$  = Partialdruck in der Gasphase

Der Partialdruck einer Stoffkomponente in der Gasphase wurde von *Dalton* beschrieben und wird wie folgt definiert (Scheuren, 2008):

**Formel 4:** 
$$P_i^V = y_i \cdot P$$

Der Partialdruck in der Gasphase ergibt sich demnach aus dem Produkt der Konzentration der Stoffkomponente in der Gasphase ( $y_i$ ) und dem umgebenden Luftdruck ( $P$ ).

Um den Partialdruck einer Komponente in einem flüssigen Medium beschreiben zu können, wird das sogenannte Raoult'sche Gesetz herangezogen (Gmehling, 1977):

**Formel 5:** 
$$P_i^L = x_i \cdot \gamma_i \cdot P_i^S$$

Im Gegensatz zur Definition des Partialdrucks in der Gasphase, wird der Partialdruck in der Flüssigphase als Produkt aus der Konzentration der Komponente in der Flüssigkeit ( $x_i$ ), dem Dampfdruck der Stoffkomponente ( $P_i^S$ ) und dem sogenannten Aktivitätskoeffizienten ( $\gamma_i$ ) gebildet. Der Aktivitätskoeffizient stellt einen Korrekturfaktor dar, der den Umstand, dass ein Flüssigkeitsgemisch unter realen Bedingungen betrachtet wird, berücksichtigt und der die Abweichung von einem idealen Zustand dieser flüssigen Phase ausdrückt (Scheuren, 2008).

Um die Konzentration einer Stoffkomponente in der flüssigen Phase mit der in der Dampfphase vergleichen zu können, werden Formel 4 und Formel 5 zusammengeführt, woraus sich Formel 6 ergibt (Hertel, 2006):

**Formel 6:** 
$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \gamma_i \cdot \frac{p_i^S}{P}$$

Das Verhältnis zwischen der Konzentration der Komponente in der Gasphase ( $y_i$ ) und der Konzentration dieser in der Flüssigphase ( $x_i$ ), wird auch als „Verteilungsfaktor ( $K_i$ )“ oder „absolute Flüchtigkeit“ bezeichnet (Hertel, Scheuren, Sommer, & Glas, 2007; Kopjar, Andriot, Saint-Eve, Souchon, & Guichard, 2010). Mit Hilfe des Verteilungsfaktors können verschiedene Aussagen über eine Stoffkomponente getroffen werden. Es werden drei Fälle unterschieden (Scheuren, 2008):

$K_i = 1$       Konzentration der Komponente in Dampf- und Flüssigkeitsphase stets gleich

$K_i > 1$       Es erfolgt die Austreibung der Komponente

$K_i < 1$       Konzentration der Komponente ist gasseitig stets geringer als flüssigkeitsseitig

Für Flüssigkeitsgemische muss jedoch eine andere Formel herangezogen werden. Die sogenannte relative Flüchtigkeit vergleicht das Verhältnis einer Komponente  $i$  zwischen Flüssigkeits- und Dampfphase mit dem Verhältnis einer Komponente  $j$  zwischen Flüssigkeits- und Dampfphase. Es werden demnach zwei Verteilungsfaktoren  $K_i$  und  $K_j$  miteinander verglichen. Die relative Flüchtigkeit ( $\alpha_{ij}$ ) ist somit wie folgt definiert (Hertel, 2006):

**Formel 7:** 
$$\alpha_{ij} = \frac{K_i}{K_j} = \frac{(\gamma_i \cdot p_i^S)}{(\gamma_j \cdot p_j^S)}$$

Für die Bestimmung der relativen Flüchtigkeit wird, wie in Formel 7 dargestellt, der Aktivitätskoeffizient benötigt. Dieser Koeffizient ist jedoch für jede Stoffkomponente unterschiedlich und sehr schwer zu ermitteln. *Hertel* beschreibt in seiner Dissertation detailliert verschiedene z.T. sehr aufwändige Methoden zur Berechnung dieser Koeffizienten von verschiedenen Stoffkomponenten. Auch erwähnt er diverse

Problematiken bei der Berechnung verschiedener Systeme (Hertel, 2006). Befindet sich ein wässriges System jedoch im Bereich einer unendlichen Verdünnung, dann verliert der Aktivitätskoeffizient seine Abhängigkeit von der Zusammensetzung und ist nur noch von der Temperatur abhängig. Die Aromastoffkomponente nimmt so das Verhalten des Lösungsmittels an. Somit ist die relative Flüchtigkeit ( $\alpha_{ij}^{\infty}(T)$ ) eines Flüssigkeitsgemisches mit sehr guter Näherung gleich der absoluten Flüchtigkeit ( $K_i^{\infty}(T)$ ) bzw. dem Verteilungsfaktor (Hertel, 2006). Eine unendliche Verdünnung ist je nach Molekülgröße in einem Bereich von  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  gegeben (Alessi, 1991; Grisher, 1999). Diese Verdünnung ist bei Betrachtung von Aromakomponenten (Ester und höhere Alkohole) im Bereich der Bierproduktion (ca. 0,5 - 100 mg/l) gewährleistet. In diesem Fall ist die Ermittlung der Flüchtigkeit eines Zweistoffgemisches durch folgende Formel möglich (Hertel, 2006):

**Formel 8:**

$$\alpha_{ij}^{\infty}(T) = K_i^{\infty}(T) = \lim_{\frac{x_i}{y_j} \rightarrow 0} \frac{y_i}{x_j}$$

Zur experimentellen Ermittlung der relativen Flüchtigkeit gibt es verschiedene Möglichkeiten. Neben aufwändigen Destillationsversuchen ist die sogenannte Rayleigh-Destillation eine einfache und gute Möglichkeit zur Bestimmung der relativen Flüchtigkeit eines Zwei- oder Mehrstoffgemisches. Hierbei wird Inertgas durch eine Fritte in eine Gaswaschflasche gefördert; dabei wird das fluide Stoffgemisch durchströmt. Dies simuliert einen Siedevorgang, da die Gasblasen die Grenzschicht zwischen Fluid und Gasphase durchtrennen. Das Prinzip ist dabei das gleiche wie auch bei der Gärung unter  $\text{CO}_2$ -Bildung. Vor und nach dem Durchströmen des Gases wird bei dieser Methode sowohl das Gewicht der Versuchsflüssigkeit als auch die Konzentration der Aromastoffkomponente auf Basis folgender Formel ermittelt (Hertel, 2006):

**Formel 9:**

$$K_i^{\infty} = 1 + \frac{\ln \frac{x_{ie}}{x_{i0}}}{\ln \frac{m_e}{m_0}}$$

Mit  $x_{i0}$  und  $x_{ie}$  werden die Stoffkonzentrationen vor und nach der Durchströmung des Fluides mit Inertgas bezeichnet, während  $m_0$  und  $m_e$  die Masse vor und nach der

Versuchsdurchführung beschreiben. Eine genaue Herleitung dieser Formel wird detailliert von *Dohnal und Horakova* beschrieben (Dohnal & Horakova, 1991).

### **2.6 Sensorische Stabilität von Weizenbieren**

#### **2.6.1 Überblick über die wichtigsten Alterungsindikatoren**

Neben Kenntnissen über die Aromabildung bzw. über mögliche Ausgasungsverluste bei der Bierproduktion ist es auch von größter Wichtigkeit, das Aroma möglichst lange in der Flasche zu behalten. Bier ist ein Lebensmittel, welches nach der Abfüllung ständig Veränderungsprozessen unterliegt. Damit das Bier gegen Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums (MHD) möglichst genauso schmeckt wie am Tag der Abfüllung, ist eine gute Geschmacksstabilität notwendig. Während der Bieralterung laufen jedoch eine Reihe von chemischen Reaktionen ab, die das Bieraroma negativ beeinflussen können. Verbindungen, deren Konzentrationen mit fortschreitendem Alter zunehmen, werden als Alterungskomponenten bezeichnet. Folgende Reaktionen laufen unter anderem während der Bierlagerung und –alterung ab:

- Caramelisierung
- Maillardreaktion
- Streckerabbau
- Reaktionen von Kohlenhydraten und Aminosäuren
- Oxidation höherer Alkohole
- Oxidation von Isohumulonen
- Lipidabbau
- Reaktionen von Fettsäuren (enzymatischer Abbau der Fettsäuren, Oxidation von Fettsäuren)
- Abbau von Carotinoiden

Durch diese chemischen Reaktionen wird das Bieraroma negativ beeinflusst und es kommt zur Ausprägung eines Alterungsgeschmacks (Back, 2005; Lustig, 1994; Narziß, 2005). Der Prozess der Bieralterung geht in mehreren Stufen vonstatten, die sensorisch über verschiedene Geschmacksrichtungen definiert werden. Im Anfangsstadium der Bieralterung wird eine fruchtige, an schwarze Johannisbeere

erinnernde Note wahrgenommen (Ribes-Flavor). Diese geht im Verlauf der Alterung in eine brotartige Oxidationsnote über, wobei auch die Bittere breiter und unangenehmer wird. Im Folgestadium macht sich eine an Pappkarton erinnernde Note bemerkbar (Cardboard-Flavor). Für dieses Aroma wird in erster Linie die Substanz (E)-2-Nonenal verantwortlich gemacht (Bärwald, 1974; Saison, De Schutter, Uyttenhove, Delvaux, & Delvaux, 2009b; Schieberle & Komarek, 2003; Svoboda et al., 2011; Techakriengkrai, Paterson, & Taidi, 2006). Diese Verbindung wird über enzymatische oder nicht-enzymatische Oxidation aus Lipiden oder freien Fettsäuren gebildet (Drost, Van Den Berg, Freijee, Van Der Velde, & Hollemans, 1990). Auch *Fickert* macht Lipid-Oxidationen und Streckerabbau-Reaktionen für die Bildung von (E)-2-Nonenal während des Mälzungsprozesses verantwortlich (Fickert, 1998). Allerdings gibt es auch Veröffentlichungen, die diese Verbindung nicht als alleinige Leitkomponente für den typischen Alterungsgeschmack bestätigen konnten (Foster, 2001; Lustig, 1994; Narziß, 1999). Im letzten Stadium der Bieralterung wird eine sherry-artige Note wahrgenommen, zu der es jedoch erst nach einer langen Lagerzeit kommt (Laws, 1982).

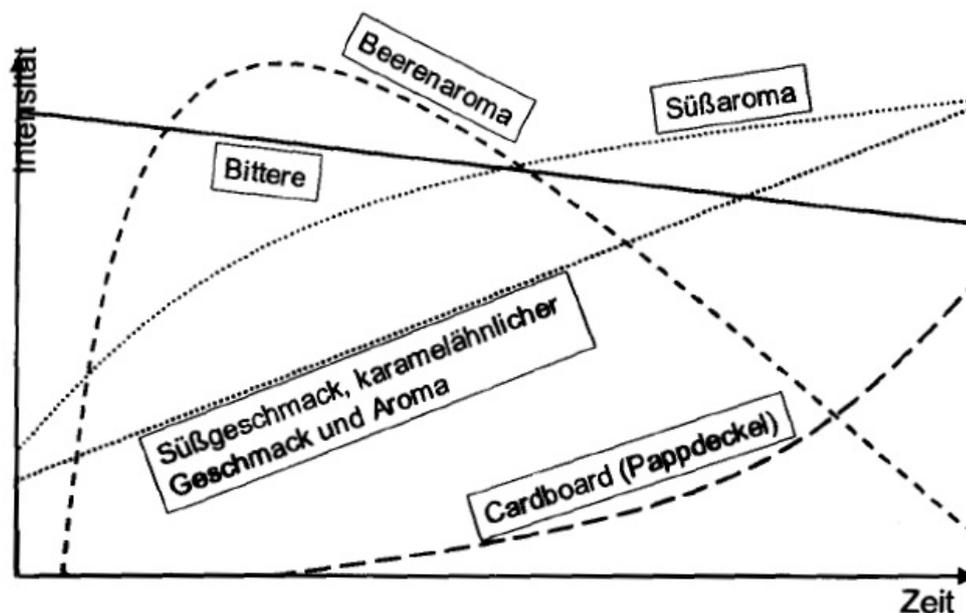


Abbildung 8: Darstellung der Bieralterung  
(Becker, 2011)

Neben diesen typischen Stufen der Bieralterung zeichnet sich die Alterung von Weizenbieren darüber hinaus durch zwei weitere Besonderheiten aus. Ester, phenolische Substanzen und auch hefige Komponenten, die in Weizenbieren

vorkommen, können einen Alterungsgeschmack z.T. sehr gut maskieren. Bevor es hier zu einem der genannten Alterungsstadien kommt, äußert sich die Weizenbieralterung zuerst durch den Abbau dieser aromapositiven Substanzen. Durch die Reduzierung der genannten Komponenten verliert das Weizenbier seine maskierenden Effekte (Back, 2005).

Eine weitere Besonderheit von Weizenbier während der Bieralterung liegt in seiner Trübung begründet. Im Gegensatz zu den meisten untergärigen Bieren sind Weizenbiere unfiltriert oder teilfiltriert und beinhalten somit noch Hefezellen in der abgefüllten Flasche oder im Fass. Diese Hefezellen können im Laufe der Alterung autolysieren und einen althefigen Autolysegeschmack hervorrufen. Es entsteht ein dumpfer, schweißig-käsiger bis erdiger Fehlgeschmack, der von kurzkettigen Fettsäuren wie 3-Methylbuttersäure oder von höheren Alkoholen wie Heptanol verursacht wird (Back, 2005).

Für die sensorische Veränderung eines Bieres während der Alterung werden allgemein verschiedene Komponenten verantwortlich gemacht. Neben diversen Aldehyden, Streckeraldehyden, Ketonen, Estern, Furanen und Hydroxysäuren gelten vor allem Carbonyl-Verbindungen als hauptverantwortlich für die Bieralterung (Eichhorn, 1987; Lustig, 1994; Narziß, 2005). *Eichhorn* konnte bereits 1987 Korrelationen zwischen verschiedenen Alterungssubstanzen und der Intensität des Alterungsgeschmacks ermitteln. Hieraus resultierten definierte Summenzahlen, die den Alterungszustand eines Bieres beschreiben (Eichhorn, 1987). Diese Einteilung konnte 1994 von *Lustig* im Rahmen seiner Promotion durch andere Komponenten erweitert werden (Lustig, 1994). Auf Grundlage dieser Arbeiten werden Alterungsindikatoren je nach ihrer Entstehungsweise in die in der folgenden Tabelle dargestellten Gruppen eingeteilt:



Allerdings kann dieser Zustand durch äußere Einflussfaktoren wie Licht, Wärme oder Katalysatoren wie z.B. Metallionen in reaktivere Formen ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ , etc.) umgewandelt werden (Kaneda et al., 1988). *Bamforth und Parsons* konnten bereits 1985 zeigen, dass Sauerstoff in Form des Superoxids ( $\text{O}_2^-$ ) eine Schlüsselrolle in der Bier-Oxidation spielt (Bamforth & Parsons, 1985). Als reaktivste Form des Sauerstoffs gilt jedoch das Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Andersen & Skibsted, 1998; Kaneda et al., 1988; Uchida & Ono, 1996). Eine Übersicht über die chemisch-reduktive Sauerstoffaktivierung gibt *Wurzbacher* in seiner Dissertation (siehe Abbildung 9).

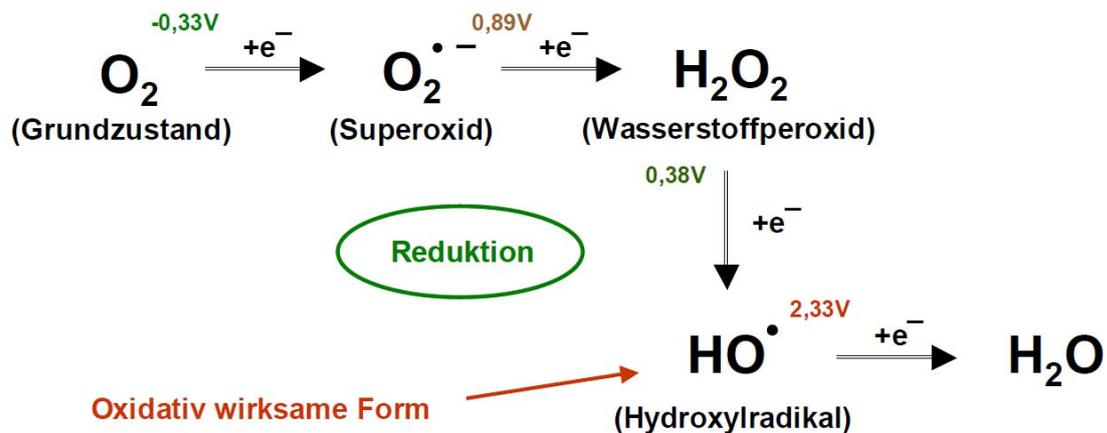


Abbildung 9: Chemisch-reduktive Sauerstoffaktivierung (Wurzbacher, 2011)

Da die reaktiven Sauerstoffformen in der Lage sind, organische Bierinhaltsstoffe zu oxidieren, gilt ein Sauerstoffeintrag während der Bierproduktion als äußerst schädlich für die sensorische Stabilität. Neben sauerstoffarmem Einmischen und sauerstoffarmem Arbeiten bei Gärung und Lagerung gilt es in der Brauerei, vor allem bei der Abfüllung des Produktes einen Sauerstoffeintrag zu vermeiden. Analytisch messbar ist die oxidative Schädigung durch Sauerstoff insbesondere anhand der Verbindungen 2- und 3-Methylbutanal, Benzaldehyd, 2-Phenylethanal und 5-Methylfurfural (Eichhorn, 1987). Als Indikatorsubstanzen für den Wärmeeinfluss während der Bierproduktion gilt neben  $\gamma$ -Nonalacton vor allem 2-Furfural. Diese Komponente wird laut *Bernstein und Laufer* aus Pentosanen gebildet und erfährt während des Maischens und des Hopfenkochens einen deutlichen Anstieg (Nachweisgrenze ca.  $5 \mu\text{g/l}$ ) (Bernstein & Laufer, 1976; Li, Yang, Yang, Shan, & Dong, 2009)). Auch *Herrmann et al.* bestätigen 2-Furfural als geeignetste Indikatorsubstanz für thermale Einflüsse im Sudhaus (Herrmann et al., 2010). Im Verlauf der Gärung sinkt der Gehalt an 2-Furfural diesen Studien zur Folge durch eine Reduzierung durch

die Hefe wieder stark ab (Bernstein & Laufer, 1976). Auch eine Pasteurisation des Bieres lässt diesen Wert ihrer Ansicht nach nicht mehr steigen. Anderen Studien zufolge steigt der Gehalt an Furfural durch Pasteurisation signifikant an (Brenner, 1976). Auch gibt es Korrelationen zwischen der Lagerungstemperatur und der Bildung von Furanaldehyden (Madigan, Perez, & Clements, 1998). Die zweite bekannte Leitsubstanz für den Wärmeeinfluss während der Bierproduktion, das  $\gamma$ -Nonalacton, kann eine kokosnuss-artige Note hervorrufen und wird als Primärprodukt (wie viele Carbonyle) beim Lipidabbau gebildet (Declerck, 2005; Yu et al., 2014). Eine gute Übersicht über die Mechanismen des Lipidabbaus gibt Gastl in ihrer Disseration (siehe Abbildung 10). Weitere Arbeiten zeigten ebenfalls gute Korrelationen zwischen Furfuryl-Ethyl-Ether und den Bierlagerungsbedingungen (Vanderhaegen et al., 2004).

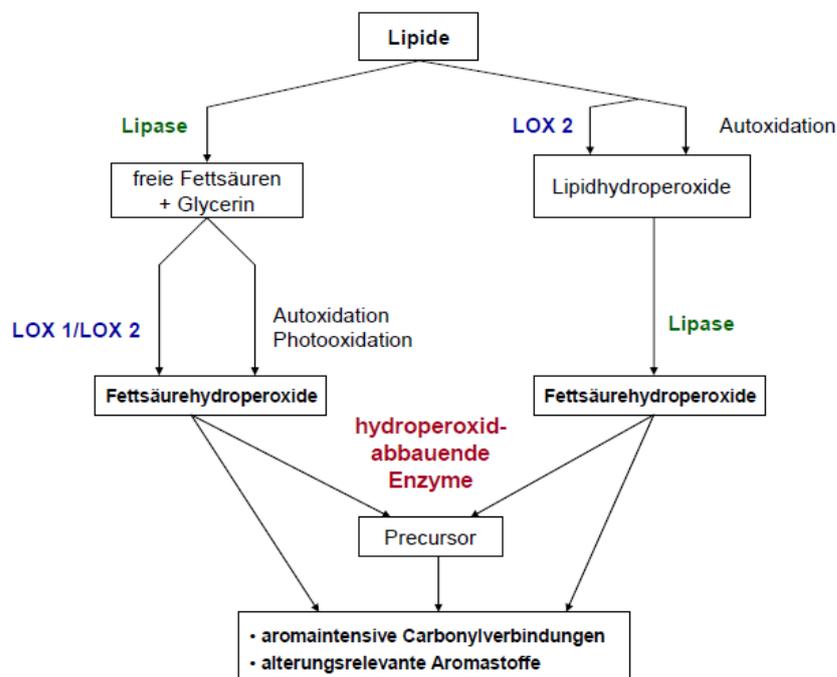


Abbildung 10: Überblick über Lipidabbau-Prozesse (Gastl, 2006)

Genannten Oxidationsreaktionen können jedoch auch Komponenten entgegenwirken. Zum einen verfügen Polyphenole wie Flavan-3-ole, Hydroxyzimtsäure-Derivate oder Flavonole, die überwiegend aus dem Malz in das Bier gelangen, über antioxidative Eigenschaften, zum anderen sind auch im Hopfen Inhaltsstoffe enthalten, die die Geschmacksstabilität verbessern können (Maillard, Soum, Boivin, & Berset, 1996; Mikyska, Krofta, Haskova, Culik, & Cejka, 2011). Auch der Hefe werden, solange sie vital ist, reduzierende Eigenschaften bestätigt (Saison, De Schutter, Overlaet-Michiels,

Delvaux, & Delvaux, 2009a). Als ein besonders wichtiges Antioxidationsmittel im Bier gilt  $\text{SO}_2$ , welches von der Hefe im Verlauf der Gärung gebildet wird. Es ist in der Lage, die Lipidautoxidation und somit die Bildung von Nonenal während des Würzekochprozesses zu senken, wenn es zu diesem Zeitpunkt zugesetzt wird (Back, 2005; Lermusieau, 1999). Des Weiteren wirken Ester, phenolische Substanzen und Hopfenöle maskierend und können typische Alterungsnoten wie das Cardboard-Flavor überdecken. Vor allem Isoamylacetat leistet hierbei einen positiven Beitrag zu einer verbesserten Geschmacksstabilität (Saison et al., 2009b).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Material für Messungen mittels Real-Time PCR

Die Messung der Genexpressionen mittels Real-Time PCR erfolgte in unterschiedlichen Schritten. Nachfolgend sind die hierfür benötigten Materialien tabellarisch dargestellt.

Tabelle 3: Gerätschaften und Materialien für Vorversuche zur Messung mittels Real-Time PCR

Geräte und Materialien	Herstellerfirma
Hefestämme TUM 68, TUM 127, TUM 175, TUM 214 und TUM 505	Hefezentrum Weihenstephan
Weizenbier-Würze mit Schüttungsverhältnis 60/40 (Weizenmalz zu Gerstenmalz)	Aus mittelständischer Brauerei
EBC-Gärröhren	unbekannt
Photometer Evolution 300	Thermo Fisher Scientific, USA
Thoma-Zählkammer	Assistent
Mikroskop 47 30 11-9901	Zeiss, Jena
Waage 1213 MP	Sartorius AG, Göttingen

Tabelle 4: Zubehör für Messungen mittels Real-Time PCR

Zubehör	Volumen	Herstellerfirma
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen	10 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorf-Tubes	1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Research® Pipetten	1-200 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	1-200 µl	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 5: Reagenzien für Messungen mittels Real-Time PCR

Reagenzien	Herstellerfirma
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg
cDNA Synthesis Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
MasterPure Yeast RNA Purification Kit	EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, USA
SensiMix SYBR No-ROX Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
Primer	biomers.net GmbH, Ulm

Die benötigten Primer-Sequenzen wurden im Vorfeld der Versuche mit Hilfe von „Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator“ ermittelt und z.T. individuell zusammengestellt (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Diese Sequenzen binden spezifisch auf die zu untersuchenden cDNA-Sequenzen, welche zuvor aus den RNA-Sequenzen übersetzt wurden. In diesen Untersuchungen war vor allem RNA von Bedeutung, die von für die Aromastoffsynthese (Ester- und Phenol-Bildung) zuständigen Genabschnitten abgeschrieben wurde. Nach einigen Vorversuchen erzielten folgende Primer-Sequenzen die besten PCR-Effizienzen und stellten sich somit als besonders geeignet heraus (siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: Primer-Sequenzen

Primer-Bezeichnung	Sequenzen 5´-3´
ATF1-F	GTACGAGGAGGATTACCA
ATF1-R	ATGATCTCGGTGACAAC
ATF2-F	AAGCCGTACTACGTTCCG
ATF2-R	CGCTCATGTCCATGTTC
IAH1-F	TCCGTACCAACGAGAAC
IAH1-R	TTGCCAAGCATCACCAC
BAT1-F	CCAAATCCATCCAAGCCAAG
BAT1-R	AGCAGATGGGTCAAGAGAAA
PAD1-F	GGAAACCCCTTTATCTTCCA
PAD1-R	GATGCCAAAGCAGTCTAGGA
RDN18-F	CGGCTACCACATCCAAGGAA
RDN18-R	GCTGGAATTACCGCGGCT

Von der Aufbereitung der Jungbierproben über die Isolierung und Reinigung der RNA bis hin zur Messung der daraus resultierenden cDNA wurde eine Reihe unterschiedlicher Gerätschaften benötigt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Gerätschaften für Messungen mittels Real-Time PCR

Gerätschaften	Herstellerrfirma
Mastercycler ep gradient	Eppendorf, Hamburg
Labofuge GL	Heraeus, Newport Pagnell, England
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Vortex Genie 2	Scientific Instruments, Bohemia, NY, USA
Nanodrop ND 1000 Spectralphotometer	Thermo Scientific, Wilmington, DE., USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
LightCycler® 480	Roche, Penzberg
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche, Penzberg

### 3.1.2 Material zur Detektion von Ausgasungsverlusten

#### 3.1.2.1 Verluste bei simulierter Gärung

Für die Simulation von Gärungsnebenprodukt-Verlusten während einer Gärung wurden die Behältnisse den für die Weizenbierproduktion typischen offenen Gärbottichen nachempfunden. Darüber hinaus wurden einige Reinsubstanzen und andere Materialien für diese Versuchsreihe benötigt.

Tabelle 8: Material zur Detektion von Ausgasungsverlusten

Reinsubstanz	Reinheit	Herstellerfirma
Acetaldehyd	≥ 98 %	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isoamylacetat	≥ 97 %	SAFC Supply Soluflons, USA
Diacetyl	≥ 97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-Vinylguajakol	≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	99,8 %	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe

Tabelle 9: Sonstige Materialien für Ausgasungsversuche

Art	Größe/ Volumen	Herstellerfirma
Pipette	10-1000 µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Pipetten-Spitzen	10-1000 µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Messkolben	50 ml und 100 ml	Schott, Mainz
Elektronische Feinwaage	Keine Angabe	Sartorius, Göttingen
Laborthermometer	-30 bis +50°C	Precision, West Dundee, USA
Fritten	Porosität 0	Brand, Wertheim
Gaswaschflasche	2000 ml	Schott, Mainz
TKA GenPure Wasseraufbereitungsanlage	Keine Angaben	Thermo Scientific, Niederelbert
Wasserbad mit Thermostat DC 1	Keine Angaben	Firma Haake, Karlsruhe
pH Meter, Typ: WTW pH 422	Keine Angaben	wissenschaftliche Werkstätten, Weilheim i. Ob.
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RED	Keine Angaben	Janke & Kunkel GmbH u. Co. KG, Staufen
HCl (6 mol/l)	Keine Angabe	Merk, Darmstadt

In Abbildung 11 ist der Aufbau des Versuchsstandes für die simulierte offene Gärung dargestellt:



Abbildung 11: Versuchsaufbau für eine simulierte offene Gärung

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, wurde am CO<sub>2</sub>-Wandanschluss mit Manometer ein Gasschlauch angeschlossen, der sich an seinem Ende in ein T-Stück aufzweigte. Mit Hilfe der Schwebekörperdurchflussmesser (für CO<sub>2</sub>) in den jeweiligen Messing-Gehäusen wurde der CO<sub>2</sub>-Durchfluss durch Drehkopfnadelventile exakt definiert. Ausgehend von den drei Ausgängen dieser Gehäuse führte jeweils ein Gasschlauch zu einem der entsprechenden Frittenanschlüsse. Die Fritten wurden durch zwei Stativständer mit jeweils zwei Universal-Stativklammern und Doppelmuffen fixiert, die für die nötige Befestigung und mittige Zentrierung im Becherglasboden sorgten. Die offenen, mit der Versuchsflüssigkeit befüllten Bechergläser wurden mittels Wasserbad und Einhänge-Umwälzthermostat konstant temperiert.

#### **3.1.2.2 Bestimmung der relativen Flüchtigkeit ausgewählter Aromakomponenten**

Für diese Versuchsreihe wurden die gleichen Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wie unter Punkt 3.1.2.1 beschrieben verwendet. Es kam lediglich eine Gaswaschflasche mit Deckel zum Einsatz. Um eine Kondensation des verdunsteten Wassers während der Versuchsreihe am Flaschenkopf und somit eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, wurde dort eine Rotlichtlampe angebracht. Darüber hinaus musste das Wasserbad durch einen Eimer ersetzt werden, da die

Flüssigkeitssäule des zuvor verwendeten Wasserbades die Flüssigkeitssäule in der Gaswaschflasche nicht erreicht hätte.



Abbildung 12: Darstellungen des Versuchsaufbaus zur Detektion der relativen Flüchtigkeiten

#### 3.1.2.3 Verluste an Aromastoffen im Weizenbier-Glas

Diese Versuchsreihe sollte einen Trinkvorgang in einem typischen Weizenbier-Glas simulieren und die dabei entstehenden Verluste an wichtigen Aromastoffen während des Trinkvorganges aufzeigen.

Tabelle 10: Material zur Bestimmung von Verlusten an Gärungsnebenprodukten beim Trinkvorgang

Art	Größe/ Volumen	Herstellerfirma
Weizenbier-Glas	500 ml	Sahm, Höhr-Grenzhausen
Handels-Weizenbier	500 ml	Anonym, Keine Angabe
Horizontalschüttler „Control“	Keine Angabe	Edmund Bühler GmbH, Hechingen

#### 3.1.3 Material für Gär- und Reifungsversuche

Alle Gär- und Reifungsversuche wurden in der Versuchsbrauerei des Forschungszentrums durchgeführt. Hierbei wurden zylindronische Tanks verwendet, die ein Höhen-Durchmesser-Verhältnis von 1 : 2,5 aufweisen. Dieses Verhältnis wird auch in der Praxis empfohlen, um eine gute und homogene Durchmischung der Hefe zu gewährleisten ohne zu große Konvektionsströme zu

erhalten. Die Tanks fassen ein Gesamtvolumen von 66,0 l (inkl. Steigraum) und sind für Sude von ca. 50 l ausgelegt. Alle Tanks verfügen sowohl über eine Zargenkühlung als auch über eine separate Konuskühlung.



Abbildung 13: ZKTs der Versuchsbrauerei am Forschungszentrum

Für die Reifungsversuche mittels Flaschengärung wurden 0,5 l NRW-Flaschen verwendet. Das Jungbier wurde im Anschluss an die Versuchsgärungen am Forschungszentrum mittels automatisierter Flaschenfüllmaschine der Firma SIDEL abgefüllt (vgl. Abbildung 14). Für die Reifungsversuche kamen des Weiteren folgende Zusätze zum Einsatz:

Tabelle 11: Material für Reifeversuche

Art	Größe/ Volumen	Herstellerfirma
D(+)-Glucose wasserfrei	Keine Angabe	Firma Carl Roth, Karlsruhe
D(+)-Maltose-Monohydrat	Keine Angabe	Applichem, Darmstadt
Saccharose	Keine Angabe	Südzucker, Mannheim
Weizenbier-Würze mit Schüttungsverhältnis 60/40 (Weizenmalz zu Gerstenmalz)	Keine Angabe	Mittelständische Brauerei
Kristallweizen mit Schüttungsverhältnis 60/40 (Weizenmalz zu Gerstenmalz)	Keine Angabe	Mittelständische Brauerei



Abbildung 14: Flaschenfüllmaschine des Forschungszentrums

#### **3.1.4 Material für KZE-Versuche**

Die KZE-Versuche wurden sowohl im Labormaßstab als auch in drei unterschiedlichen Brauereien im Großmaßstab durchgeführt. Für den Labormaßstab kamen folgende Materialien zum Einsatz:

Tabelle 12: Material für KZE-Versuche

Art	Größe/ Volumen	Herstellerfirma
Pipette	10-1000 µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Pipetten-Spitzen	10-1000 µl	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Rollrandglas ND11	1,5 ml	Zefa-Laborservice, München
Elektronische Feinwaage	Keine Angabe	Sartorius, Göttingen
Laborthermometer	-30 bis +50°C	Precision, West Dundee, USA
TKA GenPure Wasseraufbereitungsanlage	Keine Angaben	Thermo Science, Niederelbert
Wasserbad mit Thermostat DC 1	Keine Angaben	Firma Haake, Karlsruhe
Weizenbier mit 1 Mio. Hefezellen/ml	Keine Angaben	anonym
Kronkorken-Verschließer	Keine Angabe	ESCHENLOHR GmbH, Günzburg
Kronenkorken	Keine Angaben	Firma Rauh GmbH & Co KG, Küps
Kühlbox	Keine Angaben	Keine Angaben

Für die Versuchsdurchführung im Großmaßstab kam ein Handprobenehmer mit CO<sub>2</sub>-Anschluss zum Einsatz. Mittels dieser Apparatur kann die Probenahme nach der KZE schaumfrei mit Gegendruck vorgenommen werden, der je nach CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Bier an der CO<sub>2</sub>-Flasche individuell einstellbar ist. Darüber hinaus wurden sterile 0,5 l NRW-Flaschen benutzt, die mit einem Kronenkorken direkt nach den Probenahmen verschlossen wurden.

#### **3.1.5 Material für Lagerungsversuche**

Um die Veränderung von abgefüllten Weizenbieren während der Lagerung zu analysieren, wurden die Flaschenbiere bei unterschiedlichen Temperaturen aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen analysiert. Hierbei kamen folgende Gerätschaften bzw. Räumlichkeiten zum Einsatz:

Tabelle 13: Material für Lagerungsversuche

Art	Größe/ Volumen	Herstellerfirma
Bebrütungsschrank 30°C	Keine Angabe	Firma Memmert, Schwabach
Bebrütungsschrank 40°C	Keine Angabe	Firma Memmert, Schwabach
Kältekammer 10°C	Keine Angabe	Keine Angabe
Kältekammer 4°C	Keine Angabe	Keine Angabe

#### **3.1.6 Material zur Detektion von Gärungsnebenprodukten in Bier**

Die Detektion der Gärungsnebenprodukte erfolgte an einem Gaschromatographen mittels Headspace-Technik und FID. Die Methode entspricht MEBAK (1996) III 1.1.1 (Pfenninger, 1996).

Für diese Analyse wurden spezielle Rollrand-Flaschen (Zefa-Laborservice) verwendet. Als interner Standard diente eine 4%ige n-Butanol-Lösung, die jeder Probe zugegeben wurde.

Die Analyse von 4-Vinylguajakol erfolgte mittels HPLC. Am Forschungszentrum wurde hierfür das Model DINOEX UltiMate 3000 verwendet. Die Proben wurden für die Messung in 1 ml Autosampler-Flaschen überführt (Jacob, 2012).

#### **3.1.7 Material zur Detektion von Alterungskomponenten**

Die Ermittlung von Alterungskomponenten erfolgte am Forschungszentrum nach MEBAK 2.23.4 (Jacob, 2012). Für diese Methode wurden die im Folgenden dargestellten Materialien und Gerätschaften benötigt:

Tabelle 14: Materialien zur Messung von Alterungskomponenten

Art	Größe/ Volumen	Herstellerfirma
Eppendorf Transferpipette	100 – 1000 µl	Brand GmbH, Wertheim
Vollpipette	4 und 5 ml	Brand GmbH, Wertheim
Destillationskolben	Keine Angabe	Velp Scientifica, Usmate, Italien
Erlenmeyerkolben	100 und 300 ml	Schott, Mainz
Zentrifugenglas	Keine Angaben	Schott, Mainz
Rollrandglas ND11	1,5 ml	Zefa-Laborservice, München
Mircoeinsätze Klarglas mit Spitze	0,1 ml	Zefa-Laborservice, München
Semiautomatic Destillation Unit	Keine Angaben	Velp Scientifica, Usmate, Italien
HS 501 digital Schüttler	Keine Angaben	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
Waage iso CAL LC 6201S	Keine Angabe	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Rotina 420R	Keine Angaben	Hettich, Tuttlingen
Gaschromatograph Perkin Elmer Clarus 580	Keine Angaben	Perkin Elmer, Waltham, MA
Ethanol	99 %	Merck, Darmstadt
Essigsäure	100 %	Merck, Darmstadt
Dichlormethan	>99,8 %	Merck, Darmstadt
Ammoniak	25 %	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	99%	Merck, Darmstadt
Interner Standard 1: Buttersäuremethylester	99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### 3.1.8 Material für weitere Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Analysen im akkreditierten Labor des Forschungszentrums durchgeführt. Folgende Analysen wurden vom Fachpersonal des Forschungszentrums durchgeführt:

1. Messung des Extraktgehaltes
2. pH-Wert
3. Stammwürzedetektion
4. Endvergärungsgrad
5. Bestimmung des Zuckerspektrums
6. Detektion von Aminosäuren sowie FAN-Gehalts

Alle hierfür benötigten Materialien sind den Standardarbeitsanweisungen (SAA) des Institutes zu entnehmen.

### **3.1.9 Hefestämme**

Alle Hefen, die für Gär- und Reifungsversuche propagiert wurden, stammten aus dem Hefezentrum Weihenstephan. Hierbei fanden folgende Hefestämme Verwendung:

- **Hefestamm TUM 68**
- **Hefestamm TUM 127**
- **Hefestamm TUM 175**
- **Hefestamm TUM 214**
- **Hefestamm TUM 505**

Neben diesen Hefestämmen kamen auch Trockenhefen für Reifungsversuche zum Einsatz. Diese wurden von der Firma Lallemand in Montreal, Kanada, bezogen. Folgende Trockenhefen wurden hierbei verwendet:

- **Nottingham Ale Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)**
- **Munich Wheat Beer Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)**
- **Windsor British Style Beer Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)**
- **Wine Yeast Bry 465**
- **Wine Yeast EXP 2014 02**

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Verkostungs-Schemata**

Zur sensorischen Bewertung von Bieren bieten sich eine Reihe von unterschiedlichen Verkostungsschemata an. Hierbei wird prinzipiell zwischen bewertenden Verkostungen und Unterschiedsprüfungen differenziert. In dieser Arbeit wurden in erster Linie bewertende Verkostungen durchgeführt. Es kamen dabei folgende Verkostungstypen zum Einsatz:

#### **Beschreibende Verkostung**

Beschreibende Prüfungen werden dazu genutzt, Proben nach Aussehen, Geruch, Geschmack und Textur zu beschreiben. Bei einer Bierverkostung dient dazu das sogenannte Flavorrads, welches im Jahr 1973 entwickelt wurde. Kurz beschrieben stellt das Flavorrads eine Sammlung beschreibender Eindrücke für die sensorische Beurteilung von Bier dar. Es beinhaltet 14 Begriffsklassen mit 44 Oberbegriffen und 78 untergeordneten Begriffen. Für die Beschreibung des Geruchs sind die Klassen von eins bis acht maßgeblich, die Klassen von neun bis 14 beschreiben den Geschmack. Zusätzlich werden weitere sensorische Methoden durch die Terminologie des Flavorrads unterstützt (Back, 2005).

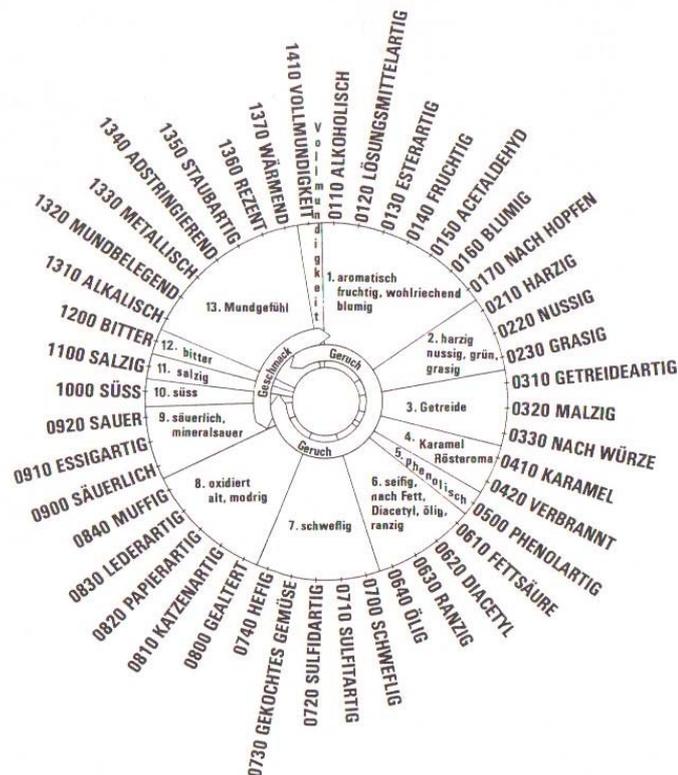


Abbildung 15: Flavorradd zur Beschreibung verschiedener Aromaeindrücke im Bier (Jacob, 2013)

### DLG-Verkostungsschema

In Deutschland wird insbesondere das Verkostungsschema der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft (DLG) eingesetzt. Dabei werden Parameter wie Geruch, Reinheit des Geschmacks, Vollmundigkeit, Rezenz und die Qualität der Bittere eines Bieres bewertet. Dazu dient eine hedonische Punkteskala von 1 bis 5 (Koch, 1986). Die Geruchs- und Geschmacksbewertung wird stark von der Reinheit abhängig gemacht und somit wird dem Erkennen von Off-Flavor-Noten wie Diacetyl, Dimethylsulfid, Lichtgeschmack (3-Methyl-2-Buten-1-Thiol) und lösungsmittelartiger Geschmack (Ethylacetat) viel Bedeutung beigemessen. Für die Beurteilung der Vollmundigkeit wurde der Ausdruck „sortentypisch“ eingeführt. Die Rezenz beschreibt den angenehmen bis schalen Geschmack des Bieres. Die Bittere umfasst Sinneseindrücke von „sehr fein“ bis „stark nachhängend“ (Schönberger, 2004). Zur Berechnung der Gesamtnote werden die Einzelbewertungen gemittelt. Hierbei gehen die Bewertung des Geruchs, des Geschmacks und der Bittere doppelt in die Bewertung ein. Die Note wird mit zwei Dezimalstellen angegeben.

**Spezifische Verkostung für Weizenbiere**

Die spezifische Verkostung für Weizenbiere beruht auf der DLG-Verkostung nach MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission). Die Prüfer bewerten Biere in Halbnotenschritten nach ihrem phenolischen, estrigen und hefigen Aroma. Bei dieser Art der Verkostung nach *Herrmann* wird sowohl die Intensität als auch die Qualität der genannten Aromaeindrücke bewertet (Herrmann, 2005b). Ein Beispiel für einen Prüfungsbogen ist in Abbildung 16 dargestellt:

Prüfer:		Probe:								
Datum										
Geruch	Trunk	Vollmundigkeit	Rezenz	Bittere						
<b>Estrige Note</b>										
Geruch				Geschmack						
1	2	3	4	5	Intensität	1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	Qualität	1	2	3	4	5
Beschreibung: .....										
.....										
.....										
<b>Phenolische Note</b>										
Geruch				Geschmack						
1	2	3	4	5	Intensität	1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	Qualität	1	2	3	4	5
Beschreibung: .....										
.....										
.....										
<b>Hefige Note</b>										
Geruch				Geschmack						
1	2	3	4	5	Intensität	1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	Qualität	1	2	3	4	5
Beschreibung: .....										
.....										
.....										
<b>Sonstige</b>										
Beschreibung: .....										
.....										
.....										
Intensität: 1 = nicht wahrnehmbar; 5 = sehr stark Qualität: 1 = unangenehm; 3 = neutral; 5 = angenehm										

Abbildung 16: Spezifische Weizenbierverkostung nach *Herrmann* (Herrmann, 2005b)

### **3.2.2 Detektion von Gärungsnebenprodukten mittels Gaschromatographie**

Die Analyse zur Detektion von Gärungsnebenprodukten wurde nach der Standardmethode aus MEBAK Band II, Kapitel 1.1.1 durchgeführt (Miedaner, 2002). Zur Analysenvorbereitung wurden 2 ml destilliertes H<sub>2</sub>O in einem 20 ml GC-Rollrandglas vorgelegt und mit 2 ml Bier und 1 ml internen Standard versetzt. Anschließend wurde das GC-Rollrandglas mit einer Bördelkappe und einem Gummistopfen rasch verschlossen, um einen Verlust der flüchtigen Substanzen zu vermeiden. Daraufhin wurde die Probe am GC mittels Headspace-Technik und FID analysiert. Erfasst wurden Acetaldehyd, die höheren Alkohole 1-Propanol, i-Butanol und Amylalkohole sowie die Ester Isoamylacetat und Ethylacetat.

#### **Bedingungen für die GC-Analysen:**

- Trennsäule: INNOWAX Crosslinked Polyethylenglycol  
60 m\*0,32 mm\*0,5µm
- Ofentemperatur: 200°C
- Injektortemperatur: 150°C
- Detektortemperatur: 250°C
- Injektionszeit: 4 s.
- Analysenzeit: 17 min.
- Temperierzeit: 45 min.

### **3.2.3 Detektion von 4-Vinylguajakol mittels HPLC**

Die Detektion von 4-Vinylguajakol erfolgte mittels Umkehrphasenchromatographie und UV-Detektor. Die Bierproben wurden hierfür im Vorfeld der Analyse in einem Ultraschallbad entkohlensäuert. Bei naturtrüben Bieren wie z.B. Weizenbier ist eine Zentrifugation bei 4000 Umdrehungen für 10 min. sowie die Verdünnung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 2 notwendig. Von diesem Substrat wird daraufhin 1 ml in ein Autosample-Fläschchen überführt und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Die Gerätebedingungen wurden wie folgt gewählt:

HPLC-Säule:	C18 Nucleosil 100-7-RP125*4 mm
Säulentemperatur:	27°C
Fließmittel:	Puffer (580 ml Reinstwasser mit 420 ml Methanol mischen und mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 2,50 einstellen, 15min. im Ultraschallbad entgasen)
Fließrate:	0,9 ml/min
Einspritzvolumen:	20 µl
Wellenlänge:	260 nm
Range:	0,005
Analysenzeit:	18 min

#### **3.2.4 Detektion von Alterungsindikatoren mittels Gaschromatographie**

Da die Konzentrationen der zu ermittelnden Alterungsindikatoren sehr gering sind (im µg/l-Bereich), war eine Aufkonzentrierung mittels Destillation als Vorschritt notwendig. Nach diesem Vorgang, der den Standardarbeitsanweisungen des Forschungszentrums entnommen werden kann, folgte die eigentliche Aufbereitung und Analyse.

Die einzelnen Arbeitsschritte sahen hierbei wie folgt aus:

- 200 ml des Destillats in einem in Eiswasser stehenden Erlenmeyerkolben auffangen
- Destillat mindestens 30 Minuten in den Kühlschrank stellen
- 22,0 g NaCl in Zentrifugenglas einwiegen
- mit ca. 80 g Destillat aufwiegen
- 1200 µl kaltes Dichlormethan und 4 ml Ammoniaklösung (25 %ig) zugeben
- Fest verschraubtes Zentrifugenglas 30 Minuten im Turbulaschüttler durchmischen
- Im Anschluss die Probe mindestens 30 Minuten in den Gefrierschrank stellen
- Probe 15 Minuten bei 3000 U/min und -5°C zentrifugieren

- Wässrigen Überstand mit Wasserstrahlpumpe bis auf die entstandene Methylenchloridperle abziehen
- Methylenchloridperle in Eppendorf-Tube überführen
- Methylenchlorid mittels GC-Spritze in HPLC-Autosampler-Fläschchen überführen
- Verschlussene Fläschchen bis zur Analyse im Gefrierschrank aufbewahren.

#### **Bedingungen für die GC-Analysen:**

- Trennsäule: M u. N 60 m \* 0,25 mm Optima-5-MS 1,00 µm
- Injektortemperatur: 250°C
- Ofentemperatur: 40°C
- Detektortemperatur: 310°C
- Temperaturprogramm:

40°C		Haltezeit 10 min
4°C/min	auf 160°C	Haltezeit 0 min
3°C/min	auf 210°C	Haltezeit 0 min
45°C/min	auf 300°C	Haltezeit 5 min

#### **Forcier-Methode**

Um die Zeit des natürlichen Alterungsprozesses zu reduzieren, wird die sogenannte Forcier-Methode angewandt, die eine künstliche Alterung simulieren soll. Hierzu wird das Bier 24 Stunden auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend bei 40°C im Trockenschrank für vier Tage aufbewahrt. Das Schütteln simuliert den Vertriebsweg eines Bieres per LKW und die hohen Temperaturen beschleunigen die Bildung von Alterungskomponenten. Dieses Procedere simuliert eine natürliche Alterung von ca. 3 – 4 Monaten (Eichhorn, 1987; Lustig, 1994).

### **3.2.5 Messungen von Genexpressionen mittels Real-Time PCR**

Für die Messung der Genexpression in Hefezellen war zuvor eine Reihe von Arbeitsschritten notwendig. Zunächst musste die Hefezellzahl in der Jungbier- bzw. Bierprobe möglichst exakt auf 100 Mio. Zellen pro ml eingestellt werden. War dies gewährleistet, wurden die Hefezellen aufgeschlossen. Nachfolgend musste die RNA und die ebenfalls in der Probe noch enthaltene DNA aufgereinigt werden, d.h. von übrigen Zellsubstanzen separiert werden. Im Folgeschritt wurde die RNA von der nicht benötigten DNA getrennt und auf eine bestimmte Konzentration eingestellt. Da es nicht möglich ist, RNA mittels Real-Time PCR zu messen, musste diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Nach einer exakten Einstellung der cDNA-Konzentration erfolgte die Real-Time PCR-Messung. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte ist im Folgenden dargestellt.

#### **Einstellung einer definierten Hefezellzahl**

- Jungbierprobe entnehmen
- Hefezellzahl mittels Thoma-Zählkammer bestimmen
- Benötigtes Probenvolumen in Sarstedt-Röhrchen geben, um 200 Mio. Zellen / 2 ml zu erhalten (Doppeltes Volumen der benötigten Zellzahl)
- 15 min bei 4000 U/min zentrifugieren (wenn möglich bei 4°C)
- Überstand verwerfen
- 2 ml destilliertes H<sub>2</sub>O hinzugeben
- Pellet mittels Vortexer lösen
- 1 ml entnehmen und in Eppendorf-Tube überführen

#### **Aufreinigen der RNA**

- Eppendorf-Tube zentrifugieren (2 min bei 14.000 rpm)
- Überstand mit Pipette abziehen
- 300 µl „Extraction Reagent“ und 1 µl „Proteinase K“ auf Pellet pipettieren
- Vortexen bis alle Plättchen gelöst sind (ca. 10 s)
- Für 15 min bei 70°C inkubieren und nach 5 min und 10 min vortexen
- Probe für 3 - 5 min auf Eis stellen

- 175 µl „MPC Protein Precipitation Reagent“ zu den Proben pipettieren
- 10 min bei 4°C und 11.200 rpm zentrifugieren (Probe auf Eis transportieren)
- Überstand mit Pipette in neues Eppendorf-Tube überführen
- 500 µl Isopropanol zu den Proben geben und 30 - 40 mal ruhig wenden
- Erneut 10 min bei 11.200 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand mit Pipette entfernen
- Pellet kann bei Bedarf eingefroren werden (-20°C)

#### **Trennung der RNA von der DNA**

- In steriles Eppendorf-Tube 200 µl „DNase 1“ geben
- DNase 1-Herstellung:
  - 175 µl destilliertes Wasser
  - 20 µl 10x-DNase Puffer
  - 5 µl RNase-free-DNase
- 200 µl DNase 1-Lösung auf Pellet pipettieren
- Vortexen
- Für 20 min bei 37°C inkubieren
- 200 µl „2XT and C Lysin Solution“ zupipettieren
- Vortexen
- 200 µl „MPC Protein Precipitation Reagent“ zupipettieren
- Vortexen
- Probe für 3 - 5 min auf Eis stellen
- 10 min bei 4°C und 11.200 rpm zentrifugieren
- Überstand mit Pipette in neues Eppendorf-Tube überführen
- 500 µl Isopropanol zu den Proben geben und 30 - 40 mal wenden
- 10 min bei 4°C und 11.200 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig mit Pipette entfernen
- Probe 2 mal mit 70 %igem Ethanol rinsen
- Ethanol vorsichtig entfernen
- RNA in 35 µl „TE-Puffer“ resuspendieren
- 1 µl „RiboGuardRNase“ zugeben
- Proben schütteln
- RNA-Konzentration mittels Nanodrop messen(260 nm)

**Gewinnung der cDNA aus RNA**

- RNA, Oligo dT, 10 mM dNTP und DEPC-treated water in ein Eppendorf-Tube pipettieren; die benötigten Volumina sind mittels Tabelle 15 zu berechnen; die aus dem vorangegangenen Schritt ermittelten RNA-Konzentrationen sind individuell für jede Probe zu berechnen. Hierfür ergibt sich ein exaktes Pipettierschema, um eine RNA-Konzentration von 1 µg zu gewährleisten.

Tabelle 15: Grundsätzliche Erstellung des Mastermixes 1 für die Gewinnung von cDNA

Reagenz	Menge
1 µg RNA	x µl, je nach ermittelter RNA Konzentration
Oligo (dT)18 Random Hexamer	1 µl
10 mM dNTP	1 µl
DEPC-treated water	auf 10 µl auffüllen

- Im Folgeschritt jeweils 10 µl jeder Probe (RNA, Oligo dT, dNTP-Gemisch und DEPCT Wasser) in PCR-Streifen (PCR-8er-strips, Firma Brandt GmbH & CoKG, Wertheim) pipettieren
- Proben werden bei 65°C für 10 min in Thermocycler inkubiert
- Proben für 2 min auf Eis stellen
- In der Zwischenzeit Mastermix 2 in Eppendorf-Tube gemäß Tabelle 16 pipettieren

Tabelle 16: Mastermix 2 für die Gewinnung von cDNA

Reagenz	Menge
5x RT Buffer	4 µl
RNAse Inhibitor	1 µl
Reverse Transkriptase (200 u/µl)	0,25 µl
DEPC-treated water	auf 10 µl auffüllen

- 10 µl des Gemisches zu den Proben pipettieren und vorsichtig einmal durchmischen
- Im Folgenden für 45 min bei 41°C inkubieren

- Anschließend 15 min bei 70°C inkubieren
- Proben auf Eis stellen
- cDNA-Konzentration mittels Nanodrop vermessen (260 nm)

#### **Konzentration der cDNA einstellen**

- Beispiel für die Konzentrationseinstellung der cDNA

Tabelle 17: Beispiel für Konzentrationseinstellung der cDNA

Reagenz	Menge
cDNA Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	382,2
Volumen für 0,35 $\mu\text{g}$ cDNA	0,92
$\mu\text{l}$ cDNA für 350 ng/ $\mu\text{l}$	18,32
$\mu\text{l}$ DEPC-treated water für 350 ng/2,5 $\mu\text{l}$	31,68

- Somit wird eine cDNA-Konzentration von 350 ng pro Reaktion (2,5  $\mu\text{l}$ ) eingestellt
- Die Mischungen werden in Eppendorf-Tubes hergestellt
- Verdünnungen 10 min auf Horizontalschüttler stellen

#### **Genexpressionsmessung mittels Real-Time PCR**

- Das Volumen für die Messung mittels PCR ergibt sich aus 22,5  $\mu\text{l}$  Mastermix und 2,5  $\mu\text{l}$  Probe. Die Mastermixe werden nach folgender Tabelle vorbereitet:

Tabelle 18: Reagenzien-Zusammensetzung für PCR-Messung

Reagenz	Menge
SensiMix Sybr No ROX	12,5 µl
Forward Primer	1,25 µl
Reverse Primer	1,25 µl
cDNA	2,5µl
DEPC-treated Water	auf 25 µl auffüllen
Template-Volumen	2,5 µl

- PCR starten, die nach dem Temperatur-Zeit-Protokoll in Tabelle 19 abläuft.

Tabelle 19: Temperatur-Zeit-Protokoll des LightCyclers

Schritt	Schrittprotokoll	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	Zyklen
Vorinkubation		95	10:00	1
Amplifikation	Denaturation	95	00:15	40
	Annealing	58	00:10	
	Elongation	72	00:10	
Schmelzkurve	Denaturation	95	00:05	1
	Annealing	72	01:00	
	Schmelzvorgang	97	kontinuierlich	
Kühlung		40	00:30	1

#### Messung des RNA- bzw. cDNA-Gehaltes mittels Nanodrop

- Probeklappe öffnen und 2 µl destilliertes Wasser einpipettieren
- DNA- oder RNA-Messung auswählen
- System zunächst mit 2 µl des verwendeten Puffers kalibrieren
- 2 µl Probe einpipettieren
- Nach Messungen Papiertuch mit destilliertem Wasser befeuchten und wiederum abwischen

### **3.2.6 Gär- und Reifungsbedingungen für Tank- und Flaschengärungen**

Für alle Gär- und Reifungsversuche wurden die ZKTs der Versuchsbrauerei am Forschungszentrum verwendet. Alle Versuche wurden als Dreifachversuch durchgeführt, d.h. es wurden stets exakt die gleichen Gärtanks für die Versuchsreihen

herangezogen. Das benötigte Anstellvolumen wurde durch Differenzwägung bestimmt und so verteilt, dass in jedem der Behälter exakt 30 bzw. 50 Liter Substrat enthalten waren. Zur genauen Berechnung wurde eine Dichte der Würze von 1,05 kg pro Liter angenommen. Die benötigte Hefemenge wurde durch die Ermittlung der Zellzahlen mittels Thoma-Zählkammer bestimmt.

Um das Gärsubstrat möglichst schaumfrei und unter kleinstmöglicher Sauerstoffaufnahme in die Tanks zu überführen, wurde die Würze von unten in die ZKTs mit einem CO<sub>2</sub>-Förderdruck von ca. 1,5 – 2,0 bar und entsprechender Gegendruck-Einstellung des Spundapparates eingebracht. Die Hefe wurde kurz vor dem Anstellen durch Rühren homogenisiert und mit Hilfe eines desinfizierten 4,0-Liter-Messbechers von oben in die offenen ZKTs gegeben. Abschließend wurden die Tanks mit der Domarmatur verschlossen und die mit Hefe versetzte Würze durch Einblasen von Sterilluft definiert belüftet.

Tabelle 20: Verwendete Gärparameter in den Gär- bzw. Lagertanks

Maßstab	30 oder 50 l Anstellwürze
Anstellzellzahl	10 Mio. Zellen pro ml
Gärtemperatur	20°C isotherm
Gärdauer	Variabel je nach Versuch
CO <sub>2</sub> -Druck	Drucklos oder 1 bar Überdruck

Für die Reifungsversuche in den ZKTs wurde die Temperatur dem jeweiligen Versuch angepasst. Als Substrat wurde Kristallweizen aus einer mittelständischen Brauerei in ausreichend großer Menge aus einer Charge bezogen. Das Kristallweizen wurde zunächst unter definiertem Schütteln entgast. Somit stand ein definiertes hefe-freies Reifungsmedium für alle Versuche zur Verfügung. Alle übrigen Vorgehensweisen sind identisch zu den beschriebenen Gärversuchen. Die Zugabe von verschiedenen Speisegaben für die Flaschengärung wurde durch Vorlegen der Speise bzw. der Zucker in die Flaschen und anschließender Zugabe des Jungbiers durch die automatische Flaschenfüllmaschine realisiert. Für alle Reifungsversuche wurde das Substrat mit 1 % Extrakt aufgespeist. Die Hefemenge für die Reifungsversuche wurde auf 1 Mio. Zellen/ml eingestellt. Um eine identische Hefequalität sicher zu stellen, wurde zuvor ein Lebend-Tot-Nachweis mittels Methylenblau-Methode durchgeführt.

### **3.2.7 Durchführung der KZE-Versuche**

Für die KZE-Versuche im Labormaßstab wurden Rollrand-Flaschen mit 2 ml Bier, das 1 Mio. Hefezellen/ml beinhaltet und frisch aus der Brauerei ohne KZE-Einwirkung bezogen wurde, befüllt. Die Flaschen wurden sofort nach dem Befüllvorgang verschlossen und im Anschluss in ein Wasserbad bei 70 °C gestellt. Hier verweilten sie für 9 min 10 s (150 PE) sowie für 14 min 40 s (300 PE). Die Verdoppelung der Pasteureinheiten entspricht deshalb nicht einer Verdopplung der Heißhaltezeit, da die Zeit berücksichtigt werden muss, die bis zum Erreichen der Kerntemperatur von 70°C benötigt wird. Nach beendeter Wärmebehandlung wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, um eine weitere Hitzeeinwirkung und somit eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Nach Abkühlung der Proben wurden die Flaschen vorsichtig geöffnet und mit dem internen Standard versetzt. Die Proben wurden im Anschluss direkt in den Rollrandflaschen analysiert.

Für die Versuche im Großmaßstab wurden die Bierproben aus den in der jeweiligen Brauerei vorhandenen Probenahme-Hähnen direkt nach der KZE im Gegendruck in NRW-Flaschen abgefüllt. Somit wurde ein Austrag an Aromakomponenten durch Schaumbildung verhindert. Die Flaschen wurden umgehend nach dem Befüll-Vorgang mittels Kronenkorken verschlossen und wie in 3.2.2 beschrieben analysiert. Für den Transport wurden die Proben dunkel und in Kühlboxen gelagert, um keine Verfälschung der Ergebnisse zu verursachen.

### **3.2.8 Lagerbedingungen für Geschmacksstabilitätsversuche**

Die für diese Versuchsreihe verwendeten Biere wurden von zwei mittelständischen deutschen Brauereien zur Verfügung gestellt. Der Unterschied zwischen den beiden Bieren lag im Herstellungsverfahren, da ein Bier mittels traditioneller Flaschengärung, das andere mittels Tankgärung hergestellt wurde. Somit ergaben sich auch deutliche Unterschiede bezüglich der Hefezellzahlen in der abgefüllten Flasche. Beide Biere wurden am selben Tag in den Brauereien abgefüllt und direkt im Anschluss am Forschungszentrum bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Die Biere wurden hierbei für 12 Wochen bei 4°C, 10°C, 20°C, 30°C und 40°C aufbewahrt und alle 2 Wochen analysiert.

### 3.2.9 Weitere Analysen

Neben den beschriebenen Analysen wurde eine Reihe an Untersuchungen im akkreditierten Labor des Forschungszentrums durch das Laborpersonal durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind diese aufgeführt und können den jeweiligen MEBAK-Richtlinien entnommen werden.

Tabelle 21: Sonstige am Forschungszentrum durchgeführte Analysen  
(Jacob, 2012; Miedaner, 2002; Pfenninger, 1996)

Probenart	Analysen	Richtlinie
Würze, Jungbier, Bier	Extrakt, Stammwürze	MEBAK II 2.10.6.3
Würze, Jungbier, Bier	pH-Wert	MEBAK II 2.14
Würze, Jungbier, Bier	Zuckerspektrum	MEBAK III 3.2.1
Würze, Jungbier, Bier	Freier Aminostickstoff (FAN)	MEBAK III 3.3
Würze, Jungbier, Bier	Extrakt (s/w), Alkohol / Vergärungsgrad	MEBAK II 2.10.6.3
Jungbier	Diacetyl gesamt	MEBAK III 1.2.1
Jungbier	2,3-Pentandion	MEBAK III 1.2.1
Jungbier, Bier	Fettsäuren	MEBAK Würze, Bier, Biermischgetränke 2.21.4
Bier	Schaumkennzahl	MEBAK Würze, Bier, Biermischgetränke 2.18.4

### 3.2.10 Statistische Methoden

#### ➤ Arithmetischer Mittelwert

Der Mittelwert wird in der Mathematik dazu verwendet, den Durchschnitt einer Wertereihe zu erfassen. Mathematisch stellt sich die Berechnung dieser Messgröße wie folgt dar:

**Formel 10:** 
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Der Mittelwert ergibt sich demnach aus der Summe der Einzelversuche ( $x_i$ ), wobei  $n$  die Anzahl an Versuchen beschreibt (Papula, 2001).

➤ **Standardabweichung**

Die um 1860 von Francis Galton entwickelte Standardabweichung  $s_{\bar{x}}$  ist ein Maß für die Streuung um den Mittelwert. Sie ist mathematisch definiert als:

**Formel 11:** 
$$s_{\bar{x}} = \sqrt{s_{\bar{x}}^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

➤ **Konfidenzintervall**

Das Konfidenzintervall  $a$  bzw. der Vertrauensbereich ist ein aus den Stichprobenwerten berechnetes Intervall, welches den wahren, aber unbekanntem Parameter mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit (der Vertrauenswahrscheinlichkeit) angibt. Wird als Wahrscheinlichkeit beispielsweise 95 % vorgeschrieben, so heißt dies, dass bei häufiger berechtigter Anwendung des Intervalls die berechneten Konfidenzintervalle in etwa 95 % der Fälle zutreffen und nur 5 % nicht erfasst werden (Sachs, 2009). Für die Bestimmung der Konfidenzintervalle diente die Student t-Verteilung, die sich wie folgt berechnet (Gosset, 1908):

**Formel 12:** 
$$a = \frac{t_m \cdot s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}}$$

$s_{\bar{x}}$ : Standardabweichung

$t_m$ : t-Wert

$\sqrt{n}$ : Anzahl der Messwerte

Für alle in dieser Arbeit verwendeten Vertrauensbereiche wurde eine Wahrscheinlichkeit von  $P = 95\%$  festgelegt.

➤ **Pearson-Korrelation**

Die Pearson-Korrelation dient dazu, statistische Zusammenhänge zwischen zwei Messgrößen bzw. Messreihen herzustellen. Sie ist wie folgt definiert (Köhler, 2007):

**Formel 13:** 
$$r = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2\sum(y-\bar{y})^2}}$$

Hierbei sind: x = Messwert des Merkmals A

y = Messwert des Merkmals B

## **4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION**

### ***4.1 Charakterisierung verschiedener Weizenbier-Hefestämme hinsichtlich der Aromastoffsynthese unter standardisierten Bedingungen***

#### ***4.1.1 Definition der standardisierten Bedingungen***

Das Aromaprofil eines Weizenbieres ist wie unter Punkt 2.3 bereits beschrieben von einer Reihe von Faktoren abhängig. Demnach variiert der Gehalt an Estern, höheren Alkoholen und anderen Gärungsnebenprodukten, die von der Hefe gebildet werden, von Brauerei zu Brauerei, selbst wenn der identische Hefestamm verwendet wird. Dennoch besitzt jeder Hefestamm ein eigenes Genom und somit unterschiedliche Fähigkeiten zur Aromastoffsynthese. Der Hefestamm spielt dabei für die Aromastoffbildung die Hauptrolle. Je nach verwendeter Hefe kommt es zu unterschiedlich starker Bildung von Estern und somit auch zu anderen Aromakompositionen, die die Sensorik beeinflussen (Verstrepen, 2003a). Zwar existieren bereits Technologien zur Vorhersage von Gärungsprozessen, allerdings ist das Esterbildungsverhalten noch nicht abschätzbar (Hoche, 2011). Um das zu erwartende Aromaprofil eines Weizenbieres einschätzen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit die wichtigsten Weizenbier-Hefestämme unter standardisierten Bedingungen auf ihr Gärverhalten sowie ihre Aromastoffbildung getestet. Für die Gewährleistung dieser Bedingungen müssen Würze-Zusammensetzung sowie Hefephysiologie und die technologischen Gärbedingungen konstant sein.

Um eine konstante Würze-Zusammensetzung bereitzustellen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann auf einen Würze-Extrakt oder ein Würze-Granulat zurückgegriffen werden. Diese Varianten haben den Vorteil einer exakten, konstanten Zusammensetzung. Allerdings musste in Vorversuchen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die mit Hilfe dieser Grundstoffe produzierten Würzen einen deutlich negativen Einfluss auf die Sensorik sowie auf die TBZ im Falle des getesteten Malzextrakts aufweisen. Die Vergleichbarkeit zu normalen Weizenbier-Würzen war somit nicht gegeben. Da ein Schwerpunkt dieser Arbeit jedoch auf der Sensorik lag, wurden diese Varianten als ungeeignet eingestuft. Darüber hinaus ergibt sich bei Malzextrakten die Problematik der Haltbarkeit. Werden größere Mengen eines Extraktes für eine Versuchsreihe bezogen, kommt es bei Entnahme einer Teilmenge

aus dem Gebinde stets zu Kontakt mit Sauerstoff, im schlimmsten Fall mit Wasser. Dies führt zu Oxidationen und somit zu Veränderungen in der Zusammensetzung. Da diese Produkte für die Untersuchungen in dieser Arbeit nicht geeignet waren und synthetisch hergestellte Würzen einen zu großen Kostenaufwand bedeuteten, wurde mit einer mittelständischen Brauerei vereinbart, für den Zeitraum dieser Versuchsreihe für die Würzproduktion Malz einer einzigen Charge zu verwenden. Durch die standardisierte Technik und die automatisierte Produktion einer größeren Brauerei ist bei gleicher Malzqualität die Würze-Zusammensetzung sehr konstant, was auch die Untersuchungen der Stammwürze, des FAN-Gehalts sowie der Zucker-Zusammensetzung in diesen Versuchen zeigten (siehe Abbildung 93 im Anhang). Die Würze-Zusammensetzung konnte nach den Analysen im Rahmen der Fehlertoleranzen der Analysegeräte als konstant betrachtet werden.

Neben der Würze-Zusammensetzung spielt die Hefephysiologie eine Hauptrolle. Um einen konstanten Zustand der Hefe beim Anstellen zu gewährleisten, musste die Hefe-Herführung ebenfalls stets gleich vonstattengehen. Die Hefe wurde daher vom Hefezentrum Weihenstephan bezogen und nach dem Schema in Tabelle 35 (siehe Anhang) bis zum Zeitpunkt des Anstellens propagiert. Jeder getestete Hefestamm wurde demnach gleich behandelt. Die Gärungen selbst wurden im 30 l-Maßstab in stets denselben ZKTs am Forschungszentrum durchgeführt, um auch Abweichungen durch die Tanks ausschließen zu können. Diese wurden praxisnah in einem Höhen-Durchmesser Verhältnis von 1 : 2,5 konstruiert und sind vollautomatisch steuerbar. Die Gärtemperatur wurde isotherm auf 20°C eingestellt.

### **4.1.2 Allgemeine Gärungsparameter**

Einen sehr wichtigen Parameter in der Brauereipraxis stellt der Extraktabbau dar. Dieser entscheidet darüber, wie schnell die Hauptgärung beendet werden kann und der Tank für eine Neubelegung zur Verfügung steht. Somit gilt der Extraktabbau auch als Orientierungspunkt zur Feststellung und Charakterisierung der Hefevitalität und der Schlauchreife des Jungbieres (Annemüller, 2009). Dieser Wert wird aus der Differenz des scheinbaren Extraktes zu einem bestimmten Zeitpunkt der Gärung und dem maximal möglichen Extraktabbau durch die Hefe (scheinbarer Endvergärungsgrad) ermittelt. Des Weiteren gelten der pH-Verlauf und die Hefezellen in Schwebelösung als

Standard-Untersuchungsparameter (siehe Anhang Abbildungen 94 und 95). Für eine bessere Übersicht wurden die Extraktverläufe in Prozent angegeben, wobei 100 % dem Extraktgehalt zu Gärbeginn entsprechen. Alle Versuche wurden dreifach durchgeführt.

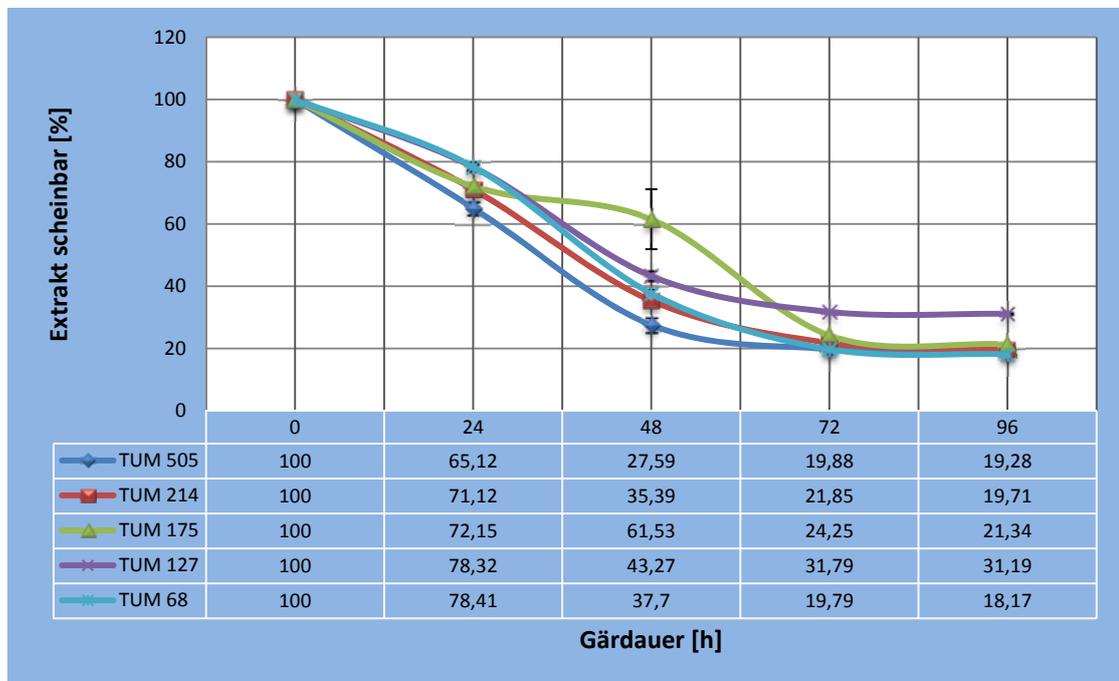


Abbildung 17: Extraktabbau der verschiedenen Hefestämme im Verlauf der Hauptgärung

Wie aus Abbildung 17 zu entnehmen ist, wurde der Endvergärungsgrad von den Hefestämmen TUM 505, TUM 214 und TUM 68 spätestens nach 96 h erreicht. Geringfügig über dem erreichbaren Endvergärungsgrad lag die Gärung mit Hefestamm TUM 175. Der Hefestamm TUM 127 dagegen baute nach 72 h trotz guter Hefevitalität und identischen Bedingungen keinen Extrakt mehr ab. Dieser verminderte Extraktabbau ließ sich auch im nachfolgend dargestellten Zuckerspektrum erkennen (Abbildung 18).

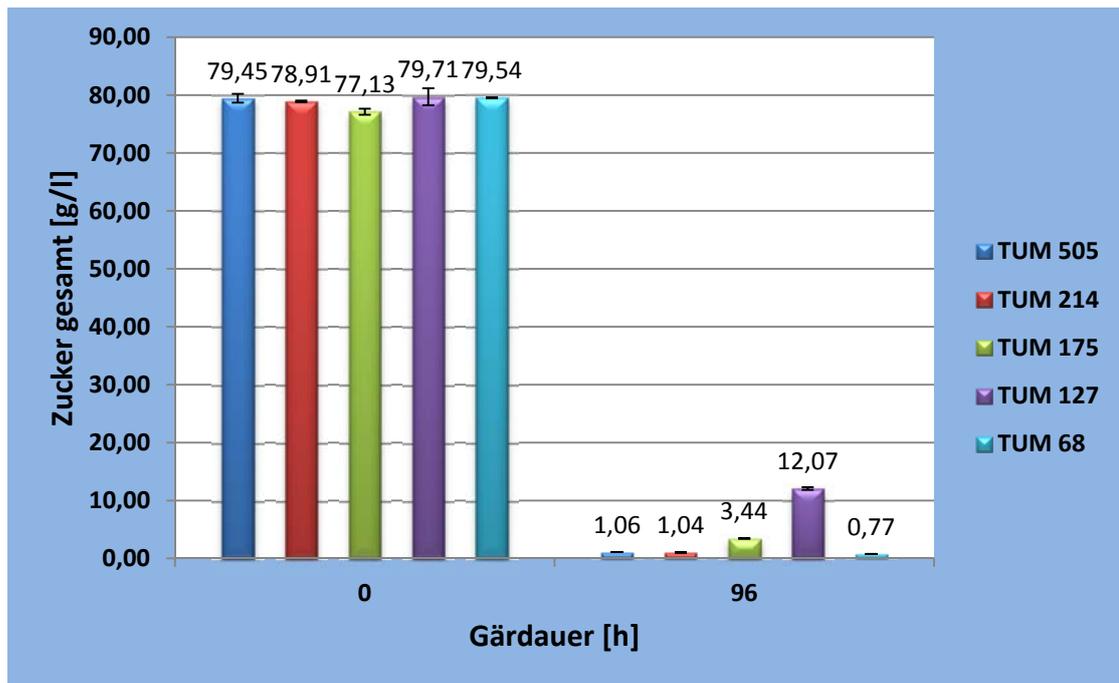


Abbildung 18: Zuckerspektrum vor und nach den Gärungen

Während die Hefestämme TUM 68, TUM 214 und TUM 505 nahezu alle Anteile an Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose und Maltotriose verwerten konnten, verblieben bei der Gärung mit TUM 175 noch 3,2 g/l Maltotriose im Jungbier. Der Hefe TUM 127 war es dagegen generell kaum möglich, Maltotriose zu verwerten (vgl. Abbildung 19). Der Gehalt an diesem Zucker lag vor der Gärung nahezu genauso hoch wie nach einer Gärdauer von 96 h. Auch *Donhauser* konnte bei Versuchsgärungen einen niedrigen Vergärungsgrad bei Verwendung von TUM 127 feststellen. Allerdings wurden hier keine Zuckeranalysen durchgeführt, so dass nicht erkannt wurde, dass Maltotriose von diesem Hefestamm kaum verwertet werden kann (Donhauser, 1991).

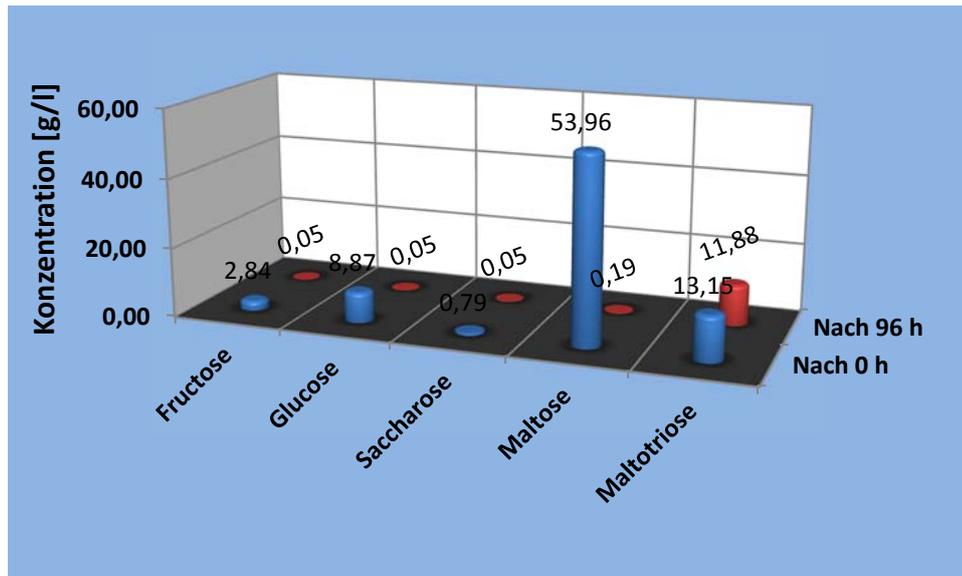


Abbildung 19: Zuckerspektrum vor und nach der Gärung des Jungbieres mit TUM 127

Der Hefestamm TUM 127 verwertete durchschnittlich lediglich 1,27 g/l Maltotriose. (detaillierte Ergebnisse siehe Anhang Tabelle 36). Es konnte somit festgestellt werden, dass TUM 127 über eine „Maltotrioselücke“ verfügt und nach der Propagation nicht sofort in der Lage ist, den Endvergärungsgrad zu erreichen wie die anderen untersuchten Stämme.

Auf Basis dieser Versuchsreihe wurden die Ergebnisse in weiteren identischen Gärversuchen wiederholt und verifiziert. Darüber hinaus wurde getestet, ob der Hefestamm diese Eigenschaft beibehält oder bei mehrmaliger Führung die Fähigkeit gewinnt, Maltotriose zu verwerten. Wie Tabelle 22 zeigt, änderte sich das Verhalten der Hefe bis zu dreimaliger Führung kaum. Der prozentuale Abbau der Maltotriose variierte im Mittel zwischen 7,80 % und 12,36 %. In der vierten Führung konnte jedoch in allen drei Gärungen ein deutlich erhöhter Abbau beobachtet werden. Die Hefe verwertete mit durchschnittlich 26,84 % signifikant mehr Maltotriose als zuvor. Demnach scheint es so, als ob sich der Hefestamm TUM 127 mit der Zeit an die Gärbedingungen adaptiert und besser in der Lage ist, Maltotriose abzubauen. Bestätigung fand diese Erkenntnis auch in Aussagen von Brauereien, die diesen Hefestamm in der Praxis nutzen.

Tabelle 22: Zuckerspektrum vor und nach der Gärung mit TUM 127

<b>1.Führung</b>	<b>Gärende Tank 1</b>	<b>Gärende Tank 2</b>	<b>Gärende Tank 3</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Abbau Maltotriose [g/l]	0,99	1,38	1,38	1,25	0,23
Abbau Maltotriose [%]	7,10	9,90	9,90	8,97	1,62
<b>2.Führung</b>	<b>Gärende Tank 1</b>	<b>Gärende Tank 2</b>	<b>Gärende Tank 3</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Abbau Maltotriose [g/l]	1,93	1,49	1,80	1,74	0,23
Abbau Maltotriose [%]	13,71	10,58	12,78	12,36	1,61
<b>3.Führung</b>	<b>Gärende Tank 1</b>	<b>Gärende Tank 2</b>	<b>Gärende Tank 3</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Abbau Maltotriose [g/l]	0,91	0,46	1,87	1,08	0,72
Abbau Maltotriose [%]	6,58	3,32	13,51	7,80	5,20
<b>4.Führung</b>	<b>Gärende Tank 1</b>	<b>Gärende Tank 2</b>	<b>Gärende Tank 3</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Abbau Maltotriose [g/l]	3,91	3,17	3,95	3,68	0,44
Abbau Maltotriose [%]	28,54	23,14	28,83	26,84	3,21

### **4.1.3 Bildungsverlauf der wichtigsten Aromakomponenten**

Hauptziele dieser Versuchsreihe waren Darstellung und Charakterisierung der unterschiedlichen Hefestämme in Bezug auf die gebildeten Aromakomponenten sowie das daraus resultierende Aromaprofil der Biere unter standardisierten Bedingungen. Hierfür wurden u.a. die drei Leitkomponenten für bananig-fruchtige aber auch gewürznelken-artige Weizenbiertypen Ethylacetat, Isoamylacetat und 4-Vinylguajakol detektiert. Als Vertreter der höheren Alkohole werden im Folgenden die Amylalkohole 2- und 3-Methylbutanol dargestellt, da sie mengenmäßig den größten Anteil an den höheren Alkoholen ausmachen. Des Weiteren ist 3-Methylbutanol (Isoamylalkohol) essentiell als Edukt für die Produktion von Isoamylacetat. In den meisten Untersuchungen, die bislang mit obergärigen Hefestämmen durchgeführt wurden, spielte lediglich die erreichte Endkonzentration an Estern und anderen Aromastoffen eine Rolle (Donhauser, 1991; Herrmann, 2005b). Da es unter anderem Ziel dieser Arbeit war, einen besseren Einblick in die Aromastoffsynthese zu erlangen und im späteren Verlauf die Genexpressionsmessungen der einzelnen Hefestämmen zu diesen Versuchsreihen diskutiert werden, ist es essentiell, ein repräsentatives Bild über die Bildung wichtiger Aromastoffe während des gesamten Gärungsprozesses zu bekommen. Um dies zu erreichen, wurden alle 24 h Proben zur Identifikation der Aromakomponenten entnommen.

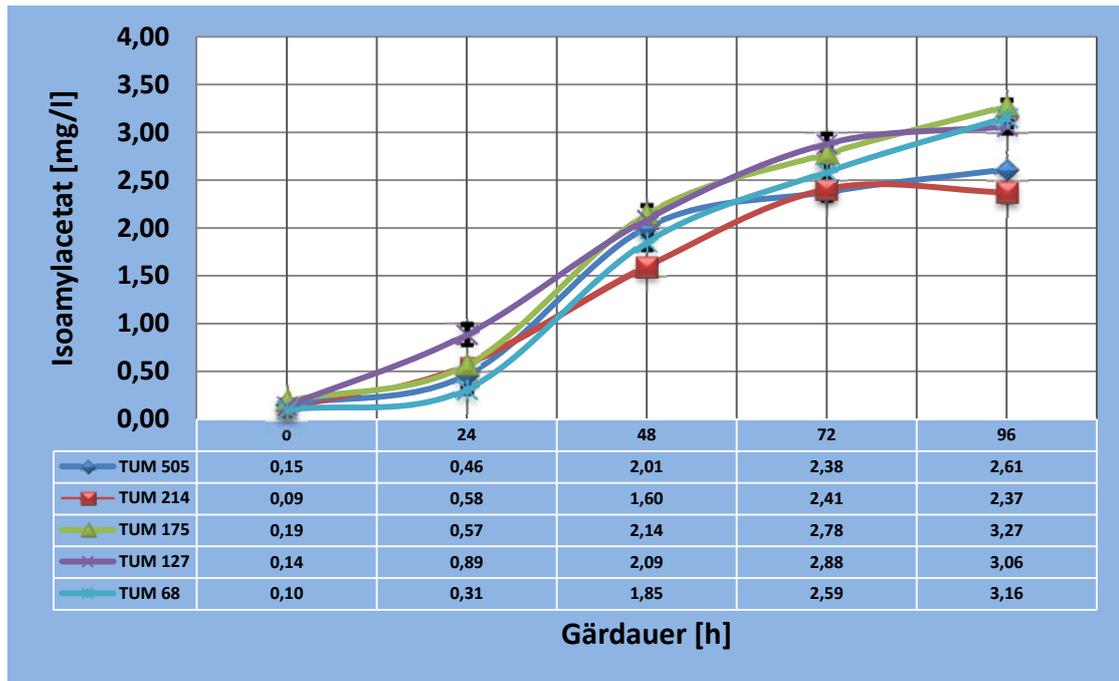


Abbildung 20: Bildungsverläufe von Isoamylacetat während der Hauptgärung

Anhand von Abbildung 20 ist gut zu erkennen, dass die Bildung von Isoamylacetat bei allen Hefestämmen erst nach 24 h exponentiell anstieg. Begründet ist diese Tatsache im Bildungsweg dieser Aromakomponente. Bevor es zur Bildung von Isoamylacetat kommen kann, muss zunächst der Enzymbildungsapparat gestartet und die Enzymaktivität gesteigert werden. Darüber hinaus fehlen zu Beginn der Gärung sowohl das Ausgangssubstrat Acetyl-CoA, das für die Hefevermehrung und somit für den Energiehaushalt der Hefezelle benötigt wird, als auch Isoamylalkohol, der zunächst von der Hefe gebildet werden muss. Es scheint, als wäre der Hefestamm TUM 127 am schnellsten in der Lage, die entsprechenden Enzyme und im Folgenden Isoamylacetat zu bilden, da hier der Kurvenverlauf nach 24 h bereits auf einem deutlich höheren Niveau lag als bei den anderen Stämmen. Die höchste Bildungsrate an Isoamylacetat war bei allen Hefestämmen zwischen 24 h und 48 h zu erkennen. Bis zum Erreichen des Endvergärungsgrades stieg der Gehalt jedoch weiter an, wobei es hier z.T. bereits zur Stagnation kam (siehe TUM 214). Das Maximum an Isoamylacetat wurde in diesen Untersuchungen von TUM 175 am Ende der Hauptgärung erreicht, während TUM 505 mit lediglich 2,61 mg/l die geringste Bildungsrate aufwies. Auch zeigte sich, dass die nicht verwertete Maltotriose für TUM 127 keine große Rolle für die Isoamylacetat-Bildung spielte, da durchschnittlich 3,06 mg/l gebildet wurden. Dieser Hefestamm war demnach durchaus

in der Lage, eine fruchtige, bananige Note zu produzieren, wenngleich ihm weniger verwertbare Zucker zur Verfügung stehen.

Nach diesen Untersuchungen ist festzuhalten, dass für die Bildung von Isoamylacetat unter den gegebenen Bedingungen die Zeit zwischen 24 h und 72 h nach Anstellbeginn entscheidend war. Des Weiteren boten die Untersuchungen den schlüssigen Erklärungsansatz, warum sehr rasche Gärungen (48 – 60 h) in der Brauereipraxis oftmals zu wenig fruchtigen und aromaschwachen Bieren führen. Die Bildung der Essigsäureester benötigt eine gewisse Anlaufphase und steigt in der Regel bis zum Erreichen des Endvergärungsgrads an. Beträgt die Gärdauer jedoch nur 2,5 Tage, ist die Zeit für die Ester-Bildung zu knapp um aromatische, estrige Biere zu produzieren.



Abbildung 21: Bildungsverläufe von Ethylacetat während der Hauptgärung

Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Ethylacetat-Bildung (vgl. Abbildung 21). Auch hier begann die exponentielle Phase der Produktion erst nach 24 h. Die Gründe sind, wie bei der Synthese von Isoamylacetat, in der Enzyymbildung und den fehlenden Ausgangssubstraten zu finden. Es war ebenfalls nach 24 h ein sprunghafter Anstieg in der Konzentration an Ethylacetat zu erkennen, der nach 48 h wieder abflachte, aber dennoch bis zum Erreichen des Endvergärungsgrades anstieg. Der Kurvenverlauf war demnach dem der Isoamylacetat-Bildung sehr ähnlich. Da beide Ester für ihre

Synthese die gleichen Alkohol-Acetyl-Transferasen sowie Acetyl-CoA als Edukt benötigen, ist diese Ähnlichkeit im Bildungsverlauf nur die logische Konsequenz. Auch *Saerens et al.* konnten einen ähnlichen Verlauf dieser beiden Essigsäureester während einer Gärung bei Ale- und Lagerbier-Hefestämmen beobachten (Saerens et al., 2008b).

Die Kurvenverläufe zeigten bei allen Versuchsgärungen unabhängig vom verwendeten Hefestamm eine ähnliche Entwicklung, sodass auch die Endkonzentrationen an Ethylacetat auf einem ähnlichen Niveau lagen. Die höchste Konzentration an Ethylacetat konnte TUM 68 mit 30,16 mg/l produzieren, während durch TUM 214 mit 27,22 mg/l die geringste Menge entstand. TUM 214 bildete übereinstimmend mit Abbildung 20 im Vergleich zu den anderen Hefen in der Summe am wenigsten Essigsäureester und war somit für die Produktion von fruchtig-bananigen Weizenbieren weniger gut geeignet. Auch TUM 505 lag in Bezug auf die Essigsäureester -Bildung hinter den anderen Hefestämmen.

Ein etwas anderer Verlauf war bei der Produktion von 4-Vinylguajakol zu erkennen. Wie auch bei der Essigsäureester-Synthese begann die exponentielle Phase der 4-Vinylguajakol-Bildung mit Ausnahme des Hefestamms TUM 68 erst nach einer kurzen Verzögerungsphase. Die Kurven des 4-Vinylguajakol-Gehaltes verliefen für die unterschiedlichen Hefestämme deutlich individueller (siehe Abbildung 22).

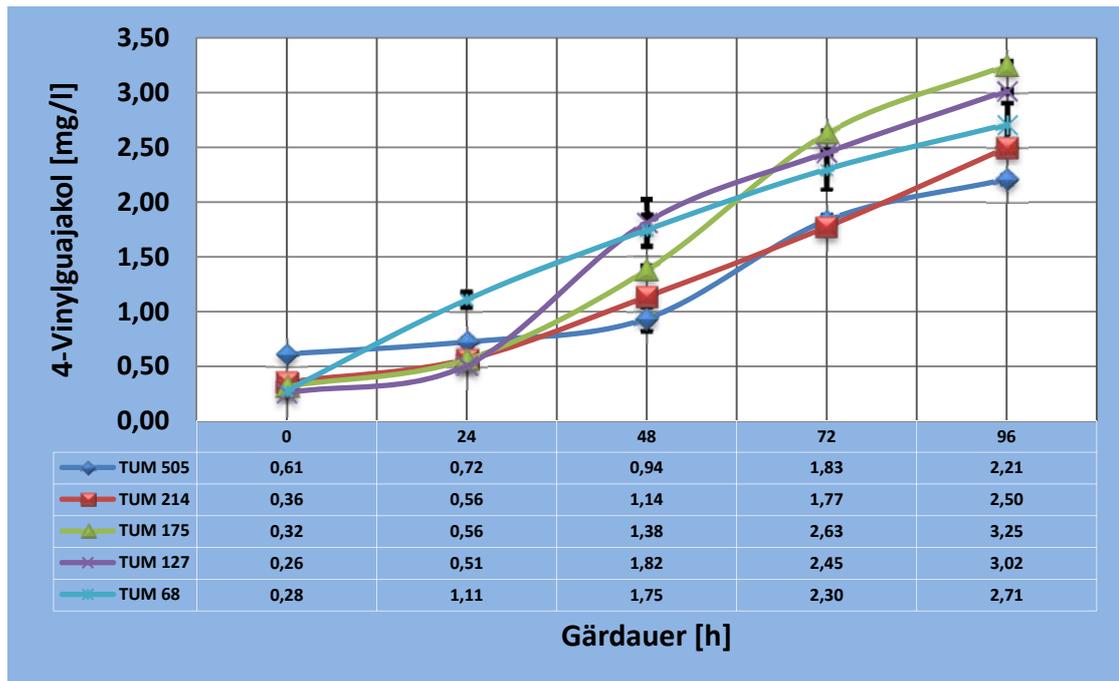


Abbildung 22: Bildungsverläufe von 4-Vinylguajakol während der Hauptgärung

Während der Verlauf bei TUM 505 trotz hohen Anfangsniveaus erst nach 48 h eine deutliche Steigerung erfuhr und es zu einem relativ niedrigen Maximalwert an 4-Vinylguajakol am Ende der Gärung kam (2,21 mg/l), stieg der Gehalt an 4-Vinylguajakol bei TUM 68 direkt nach Beginn der Hauptgärung stark an und zeigte einen deutlich flacheren Kurvenverlauf. Da das Ausgangssubstrat für die 4-Vinylguajakol-Synthese, die Ferulasäure, nicht erst von der Hefe gebildet werden muss, liegt diese bereits von Beginn an vor. Die 4-Vinylguajakol-Bildung ist demnach mehr von der Enzymmenge bzw. von der Enzymaktivität der Hefe abhängig. Diese Versuche zeigten, dass TUM 68 in dieser Versuchsreihe vermutlich von Beginn an über eine bessere Enzymausstattung verfügte als die übrigen Hefestämme. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Donhauser et al.* konnten in diesen Versuchen signifikante Unterschiede im 4-Vinylguajakol-Gehalt zwischen den verschiedenen Hefestämmen festgestellt werden (Donhauser, 1991). Die höchste Endkonzentration wurde mit dem Hefestamm TUM 175 erreicht, obwohl die Synthese in diesem Fall erst recht spät begann.

Wie zu vermuten, begann die Synthese der höheren Alkohole, wie am Beispiel der Amylalkohole zu sehen ist, früher als die Ester-Bildung. Alle Versuchsgärungen

zeigten bereits nach einer Gärzeit von 24 h einen deutlichen Anstieg im Amylalkoholgehalt.

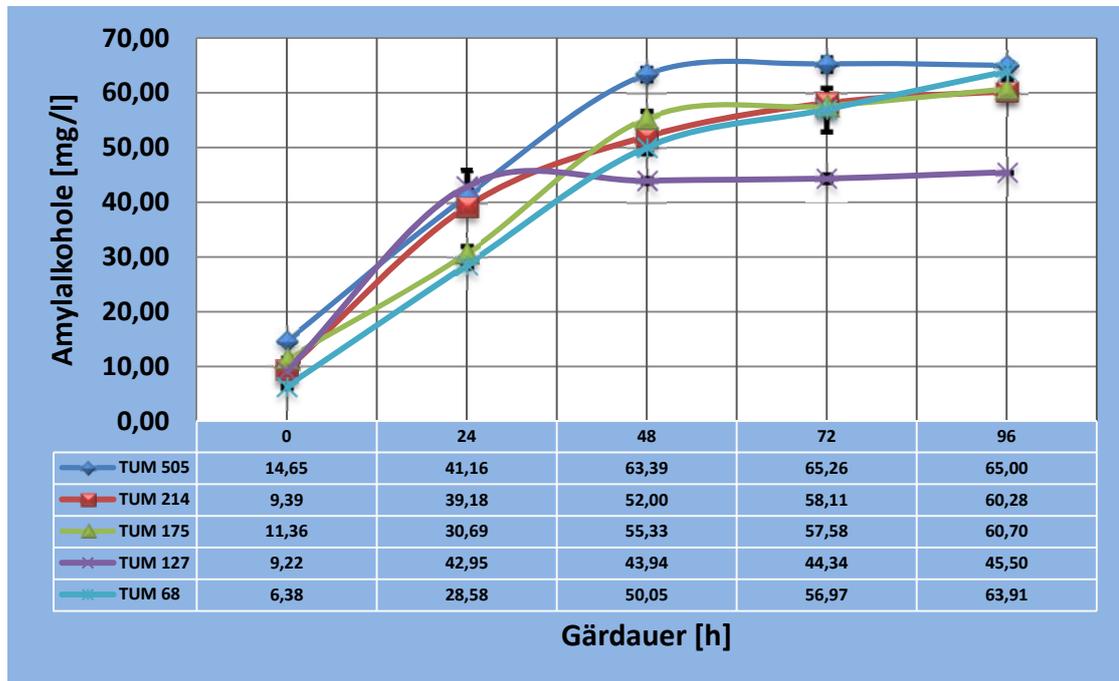


Abbildung 23: Bildungsverläufe der Amylalkohole während der Hauptgärung

Auch diese Ergebnisse stimmen mit *Saerens et al* überein (Saerens et al., 2008b). Die Untersuchungen zeigten eine deutlich raschere Bildungsrate an Amylalkohol im Vergleich zu den untersuchten Essigsäureestern.

Im Gegensatz zu den in Abbildung 20 und 21 dargestellten Essigsäureestern war das Maximum an Amylalkoholen bei den meisten Gärungen nach 48 h erreicht; im Falle von TUM 127 sogar bereits nach 24 h. Nach Erreichen des Maximums stagnierten alle Kurvenverläufe. Diese Erkenntnis zeigte wiederum, weshalb sehr kurze Gärzeiten zu wenig fruchtigen, dafür jedoch sehr unharmonischen Weizenbieren führen. Ist die Gärung nach 48 bis 60 h bereits beendet, ist das Maximum der Fuselalkoholbildung bereits erreicht, während die Ester-Bildung noch nicht vollendet ist. Wird die Bildung der höheren Alkohole durch eine starke Hefevermehrung zusätzlich forciert, wird die Harmonie bzw. das von *Narziß* beschriebene Verhältnis zwischen Estern und höheren Alkoholen zunehmend schlechter (Narziß, 1979). Um dieses Verhältnis zugunsten der Ester zu verbessern, scheint sich besonders der Hefestamm TUM 127 zu eignen, da dieser übereinstimmend mit den Untersuchungen von *Donhauser* deutlich weniger Amylalkohole produzierte als die übrigen Stämme (Donhauser, 1991). Des Weiteren

ist aus Abbildung 23 zu erkennen, dass TUM 505 zwar die meisten Amylalkohole bildete, dies aber nicht mit der Bildung an Isoamylacetat korrelierte. Diese Ergebnisse widersprechen Untersuchungen, die eine Korrelation zwischen dem Gehalt an 3-Methylbutanol und der Endkonzentration an Isoamylacetat darstellen (Calderbank & Hammond, 1994; Younis, 2000). Vielmehr unterstützen diese Ergebnisse die These, dass die Enzymaktivität die entscheidende Größe für die Esterproduktion darstellt (Lilly et al., 2006a; Malcorps et al., 1991; Verstrepn, 2003d; Verstrepn, 2003c).

### 4.1.4 Aromaprofil des Hefestammes TUM 68

Nach der ausführlichen Beschreibung der wichtigsten Aromakomponenten in Punkt 4.1.3 erfolgt die Charakterisierung der einzelnen Hefestämme tabellarisch, um eine bessere Übersicht über die Ergebnisse zu gewährleisten.

Tabelle 23: Untersuchungsparameter zur Charakterisierung der verschiedenen Hefestämme

Untersuchungsparameter	TUM 68	TUM 127	TUM 175	TUM 214	TUM 505
Vergärungsgrad	83 %	71 %	80 %	81,42 %	81,65 %
$\Delta$ pH (pH-Abnahme)	1,0	0,73	0,76	0,98	0,97
Zellen in Schwebel: Maximum	39,67 Mio./ml	56,67 Mio./ml	41,33 Mio./ml	60 Mio./ml	39,33 Mio./ml
$\Delta$ FAN	131,1 mg/l	118,1 mg/l	126,7 mg/l	118,2 mg/l	139,5 mg/l
$\Delta$ Zucker	79,54 g/l $\rightarrow$ 0,77 g/l	79,71 g/l $\rightarrow$ 12,07 g/l	77,13 g/l $\rightarrow$ 3,44 g/l	78,91 g/l $\rightarrow$ 1,04 g/l	79,45 g/l $\rightarrow$ 1,06 g/l
Isoamylacetat-Gehalt nach 96 Stunden	3,16 mg/l	3,06 mg/l	3,27 mg/l	2,37 mg/l	2,61 mg/l
Ethylacetat-Gehalt nach 96 Stunden	30,16 mg/l	29,82 mg/l	28,93 mg/l	27,22 mg/l	28,38 mg/l
4-Vinylguajakol-Gehalt nach 96 Stunden	2,71 mg/l	3,02 mg/l	3,25 mg/l	2,50 mg/l	2,21 mg/l
Gehalt an Amylalkoholen nach 96 Stunden	63,91 mg/l	45,50 mg/l	60,70 mg/l	60,28 mg/l	65,00 mg/l
Diacetyl-Gehalt nach 96 Stunden	0,51 mg/l	0,43 mg/l	0,73 mg/l	0,80 mg/l	0,80 mg/l
Gesamtnote nach DLG- Verkostungsschema	4,45	4,40	4,20	4,43	4,33

Die chemisch-technischen Untersuchungen zeigten, dass der Vergärungsgrad mit 83 % innerhalb der von der MEBAK empfohlenen Norm liegt. Auch der pH-Sturz um 1,0 auf pH 4,34 war im Sollbereich und deutete auf eine gute und rasche Gärung hin. Die Zellvermehrung bzw. die höchste Konzentration an Hefezellen im Schwebelzustand

war im Vergleich zu anderen Hefen relativ gering, was jedoch die zügige Vergärung und den pH-Sturz nicht beeinflusst. Sensorisch zeichnete sich der Hefestamm TUM 68 in den Versuchsgärungen durch ein sehr angenehmes Aromabild aus wie die DLG-Bewertung von 4,45 deutlich zeigte. Der Gehalt an Isoamylacetat war im Vergleich zu den anderen Hefestämmen relativ hoch; ebenso der Gehalt an Ethylacetat. Der 4-VG-Gehalt lag dagegen in einem durchschnittlichen Bereich (Rangposition drei von fünf getesteten Stämmen), ebenso wie die Menge an gebildeten Amylalkoholen. Diese Komposition wurde vom Verkosterpanel des Forschungszentrums als sehr angenehm empfunden, was sich auch in der beschreibenden Verkostung widerspiegelte.

Farbe:	helles braun, naturtrüb
Schaum (visuell):	gut
Geruch:	rein, angenehm obergärig, angenehmes Nelkenaroma, Spur Banane
Geschmack:	rein, angenehm obergärig, angenehmes Nelkenaroma, Spur Banane, vollmundig, rezent, mild, im Abtrunk harmonisch

### **4.1.5 Aromaprofil des Hefestammes TUM 127**

Wie bereits in 4.1.2 erwähnt, resultierte aus der Nicht-Verwertung der Maltotriose ein relativ niedriger Vergärungsgrad nach der Hauptgärung von 71 %. Aus Abbildung 94 (Anhang) geht hervor, dass die Hefevermehrung mit einem Maximum von 56,67 Mio. Hefezellen pro ml sehr gut war, was auch auf eine gute Hefevitalität schließen lässt. Es ist demnach ausgeschlossen, dass dies einen Grund für den niedrigen Vergärungsgrad darstellte. Die mangelnde Verwertung der Maltotriose hatte wenig Einfluss auf die Bildung der Aromaleitkomponenten. Der Isoamylacetatgehalt lag in einem mittleren Bereich, während der Gehalt an Ethylacetat und 4-VG die jeweils zweithöchste Menge im Vergleich zu den anderen Hefestämmen darstellte. Vorteilhaft für das Aromaprofil war die geringe Bildung an höheren Alkoholen wie z.B. den Amylalkoholen. Trotz der relativ hohen Anzahl an TUM 127-Hefezellen nach 48 h und dem dementsprechend hohen Verbrauch durch die Zellsynthese, schien im Medium ausreichend Acetyl-CoA vorhanden zu sein, um Essigsäureester in größeren Mengen zu produzieren.

Vermutlich auf Grund der ausgewogenen Komposition von Estern und 4-Vinylguajakol, kombiniert mit einer geringen Menge an höheren Alkoholen wurden auch die Biere, die mit TUM 127 produziert wurden, sensorisch als sehr gut bewertet. Dieser Hefestamm eignet sich demnach sehr gut für die Produktion fruchtiger Weizenbiere.

Farbe:	helles bernstein, naturtrüb
Schaum (visuell):	sehr gut
Geruch:	rein, leicht obergärig, angenehm frisch-hefig, leichtes Nelkenaroma
Geschmack:	rein, leicht obergärig, angenehm frisch-hefig, leichtes Nelkenaroma, vollmundig, rezent, im Abtrunk harmonisch

### **4.1.6 Aromaprofil des Hefestammes TUM 175**

Die Analysen der Aromakomponenten zeigten, dass TUM 175 unter diesen Versuchsbedingungen sowohl die höchste Konzentration an Isoamylacetat als auch an 4-Vinylguajakol produzierte. Die Konzentrationen an Ethylacetat und Amylalkoholen lagen dagegen in einem mittleren Bereich. Erstaunlicherweise wurden die mit diesem Hefestamm produzierten Biere jedoch sensorisch im Vergleich zu den anderen Versuchsbieren weniger gut bewertet wie die DLG-Bewertung zeigte. Demnach ist ein analytisch hoher Wert an Essigsäureestern oder 4-Vinylguajakol zwar ein guter Indikator für fruchtig-bananige oder nelkenartige Biere, korreliert jedoch nicht immer mit der Sensorik.

Wie aus der beschreibenden Verkostung ersichtlich wird, waren für die Prüfer lediglich eine leicht fruchtige Note und auch nur ein leichtes Nelkenaroma wahrnehmbar. Trotz der höchsten Konzentrationen an diesen Leitkomponenten, sorgten diese nicht für ein ausgeprägtes Bananen- oder Nelkenaroma. Demnach schienen die Essigsäureester und das 4-Vinylguajakol von hefigen Aromakomponenten überdeckt worden zu sein, die im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch nicht analysiert wurden.

Farbe:	bernstein, naturtrüb
Schaum (visuell):	sehr gut
Geruch:	rein, leicht fruchtig-estrig, frisch-hefig, leichtes Nelkenaroma
Geschmack:	rein, leicht fruchtig-estrig, frisch-hefig, leichtes Nelkenaroma, vollmundig, rezent, im Abtrunk normal abklingend

### **4.1.7 Aromaprofil des Hefestammes TUM 214**

TUM 214 erreichte einen guten Vergärungsgrad von 81,42 %. Besonders auffällig war die hohe Vermehrungsrate nach 24 h auf über 60 Mio. Zellen pro ml im Vergleich zu den anderen Hefestämmen. Der Gehalt an Amylalkoholen lag ähnlich hoch wie bei den übrigen Bieren (mit Ausnahme der mit TUM 127 produzierten Biere). Eine Korrelation zwischen Hefevermehrung und Bildung höherer Alkohole war nicht zu erkennen. Analytisch zeigte sich darüber hinaus, dass TUM 214 im Vergleich wenig Isoamylacetat, Ethylacetat und 4-Vinylguajakol bildete. Sensorisch wurden die Biere bei der DLG-Prüfung jedoch sehr gut bewertet.

Bestätigung fand die gute DLG-Bewertung auch in der beschreibenden Verkostung. Die Biere wurden als angenehm hefe-blumig beschrieben, wohingegen wenig Nelken- oder Bananenaroma wahrnehmbar war. Dieser Hefestamm eignet sich nach diesen Versuchsreihen scheinbar sehr gut zur Produktion von hefigen Weizenbiertypen.

Farbe:	bernstein, naturtrüb
Schaum (visuell):	gut
Geruch:	rein, angenehm hefe-blumig, kaum Nelkenaroma, wenig estrig
Geschmack:	rein, angenehm hefe-blumig, kaum Nelkenaroma, wenig estrig, vollmundig, rezent, mild, im Abtrunk weich, harmonisch

### **4.1.8 Aromaprofil des Hefestammes TUM 505**

Auch die mit TUM 505 produzierten Biere hatten einen guten Vergärungsgrad sowie einen raschen pH-Sturz. Die analytischen Ergebnisse der Gärungsnebenprodukte zeigten, dass TUM 505 relativ wenig Isoamylacetat und sehr wenig 4-Vinylguajakol bildete. Im Gegensatz dazu konnte in diesen Bieren der höchste Gehalt an Amylalkoholen detektiert werden, was sensorisch jedoch nicht beanstandet wurde. Die

## 4 Ergebnisse und Diskussion

---

DLG-Bewertung lag mit einer Gesamtnote von 4,33 in einem guten, durchschnittlichen Bereich.

In der beschreibenden Verkostung wurde das Weizenaroma als positiv und deutlich fruchtig beschrieben. Allerdings konnte kein Bananenaroma detektiert werden, was auf andere Ethylester wie Ethylhexanoat oder andere Verbindungen schließen lässt, die in dieser Versuchsreihe nicht analysiert wurden.

Farbe:	bernstein, naturtrüb
Schaum (visuell):	gut
Geruch:	rein, leicht obergärig, deutlich fruchtig, kaum Nelkenaroma
Geschmack:	leicht obergärig, deutlich fruchtig, kaum Nelkenaroma, vollmundig, Bittere leicht betont, im Abtrunk harmonisch

## **4.2 Genexpressionsmessungen bei obergäriger Hefe während der Hauptgärung**

### **4.2.1 Etablierung einer Messmethode für obergärige Hefen zur Detektion der Genexpression mittels Real-Time PCR**

Ein interessantes Forschungsgebiet stellt die Enzyymbildung in der Hefezelle dar. Sie wird hauptsächlich indirekt mittels Genexpressionsmessungen ermittelt, um bessere Einblicke in das Innenleben von Hefezellen zu bekommen (Hutzler, 2008; Lilly et al., 2006a; Lilly, Bauer, Styger, Lambrechts, & Pretorius, 2006b; Malcorps et al., 1991; Mason & Dufour, 2000; Saerens et al., 2008b; Saerens et al., 2006; Shinohara et al., 2000; Verstrepen et al., 2004). In diesen Untersuchungen wurden jedoch vor allem untergärige Bier-Hefestämme, Wein-, Sake-, oder Ale-Hefestämme getestet (Fukuda, 1999; Lilly et al., 2006a; Saerens et al., 2008b; Shinohara et al., 2000; Stratford et al., 2007; Verstrepen, 2003d, 2004b; Yoshimoto, 1998). Ziele dieser Arbeit waren deshalb, weitere Einblicke in das Enzym-Bildungsverhalten von obergärigen Weizenbier-Hefestämmen zu bekommen, genetische Unterschiede zwischen einzelnen Hefestämmen aufzuzeigen und das Verhalten bei technologischen Veränderungen während der Hauptgärung zu analysieren.

Die Messung von Genexpressionen mittels Real-Time PCR stellt im Grunde keine quantitative Methode dar. Das Problem bei der Quantifizierung liegt darin begründet, dass es nicht möglich ist, Hefezellen oder andere Mikroorganismen exakt in ihrer Menge zu definieren. D.h. die Schwankungen sind trotz möglichst genauer Zellzahleinstellung zu groß, um eine quantitative Aussage treffen zu können. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dies mittels einer Vergleichsmessung zu realisieren (relative Quantifizierung). Dabei wird die Expressionsmessung eines Gens mit der Expression eines stetig konstanten Referenzgens verglichen.

Eine quantitative Aussage kann nach Berechnung mit folgender Formel getroffen werden (Normalisierung):

**Formel 14:**

$$ratio = \frac{(E_{Ref})^{c_{p_{sample}}}}{(E_{target})^{c_{p_{sample}}}} \div \frac{(E_{Ref})^{c_{p_{calibrator}}}}{(E_{target})^{c_{p_{calibrator}}}}$$

(Pfaffl, 2006c)

Dieser Quotient wird aus den PCR-Effizienzen ( $E$ ) des Referenzgens (Ref) und des zu messenden Gens (target) sowie den sogenannten  $c_p$ -Werten (crossing points) der beiden Gene ermittelt. Die PCR-Effizienz ist ein Korrekturfaktor, der der Tatsache Rechnung trägt, dass ein PCR-Zyklus nicht 100 % der vorhandenen DNA dupliziert, sondern ein gewisser Fehler mitinbegriffen ist. Die Ermittlung dieser Größe wird in Punkt 4.2.1.1 erläutert. Der  $c_p$ -Wert oder auch  $c_t$ -Wert (cycle threshold) entspricht der Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal erstmalig einen gewissen Schwellenwert oberhalb des Hintergrundsignals übersteigt. Je geringer der  $c_p$ -Wert, desto größer ist demnach die Anzahl an DNA-Matrizen in der Probe und desto früher wurde eine bestimmte Kopienzahl erreicht. Die Werte für „ $c_p$  calibrator“ entsprachen in dieser Arbeit stets dem Zeitpunkt 0, d. h. dem jeweiligen  $c_p$ -Wert direkt beim Anstellen, während die Werte für „ $c_p$  sample“ den  $c_p$ -Werten zum Probenahmezeitpunkt nach  $x$  Stunden Gärdauer des jeweiligen Gens entsprachen. Es wurden somit stets zwei unterschiedliche Zustände verglichen, die Menge an mRNA zum Zeitpunkt „0“ und die mRNA-Menge zum Zeitpunkt „ $x$ “.

In dieser Arbeit diente das Gen der 18S-ribosomalen RNA (Primer RDN18), die eine Untereinheit der 40S-Einheit eines Ribosoms ist und somit bei Eukaryonten in konstanter Menge in der Zelle vorkommt, als Referenzgen. Es ist eines der am häufigsten verwendeten Referenzgene und eignet sich sehr gut für eine quantitative Aussage, was zahlreiche Studien zuvor belegten (Goidin, Mamessier, Staquet, Schmitt, & Berthier-Vergnes, 2001; Saerens et al., 2008b; Schmittgen & Zakrajsek, 2000; Teste, Duquenne, Francois, & Parrou, 2009; Thellin et al., 1999). PCR-Studien an Hefen zeigten auch, dass die Stabilität von RDN 18 sehr hoch bzw. z.T. sogar am höchsten ist im Vergleich zu anderen Referenzgenen (Li, Skinner, & Bennett, 2012). Dennoch sollte die Eignung eines Referenzgens stets unter den spezifischen Versuchsbedingungen getestet werden, da selbst anerkannte Referenzgene bei differierenden Bedingungen unterschiedlich stabil sind und sich nicht immer eignen (Li et al., 2012; Teste et al., 2009). Als Maßstab für gute Stabilität eines Referenzgens unter Versuchsbedingungen gilt eine möglichst geringe Standardabweichung. Aus diesem Grund wurde während der Etablierung des Systems die Standardabweichung von vier identischen Gärungen mit dem Hefestamm TUM 68 zu sieben unabhängigen Probenahmezeitpunkten im Dreifachversuch ermittelt. Somit wurde sowohl der Gärbeginn als auch der gesamte Verlauf der Gärung bis zum Endvergärungsgrad überprüft, woraus sich ein Volumen von 84 Proben ergab.

Tabelle 24: Überprüfung des verwendeten Referenzgens an Hand der  $c_t$ -Werte

Versuchsgärungen mit TUM 68	Ergebnis
Mittelwert von 84 $c_t$ -Werten	11,10
Standardabweichung	0,472
Konfidenzintervall	0,035

Wie in Tabelle 24 zu sehen ist, lagen die Konfidenzintervalle (95 %-ige Wahrscheinlichkeit) innerhalb der einzelnen Untersuchungen in einem sehr engen Wertebereich. Das Referenzgen lag unter den gegebenen Versuchsbedingungen in einem stabilen Bereich, was die geringe Standardabweichung von 0,472 bestätigt. Diese Werte entsprachen normalen Abweichungen, was auch aus anderen Veröffentlichungen hervorgeht (Li et al., 2012). Das Referenzgen wurde somit auf Basis dieser Messergebnisse als geeignet eingestuft.

### 4.2.1.1 Ermittlung der PCR-Effizienz

Die Ermittlung der PCR-Effizienz ist notwendig, da während der PCR-Messung nicht 100 % aller DNA-Fragmente vervielfältigt werden. Für die Ermittlung der Effizienz gibt Pfaffl verschiedene Methoden vor. Die genaueste Methode, die jedoch sehr zeitaufwändig ist, ist die sogenannte Verdünnungs-Methode. Hierbei werden DNA-Abschnitte unterschiedlich verdünnt, mit Primern versetzt und die  $c_t$ -Werte ermittelt. Bei genauer Kenntnis der Verdünnungen ist es möglich, bei einer idealen Vervielfältigung der DNA-Abschnitte den  $c_t$ -Wert vorherzusagen, da es stets zu einer Verdopplung des Fluoreszenzsignals kommt (Pfaffl, 2006c).

**Formel 15:**  $x = y \cdot 2^z$

Die Anzahl der DNA-Moleküle ( $x$ ) nach einer gewissen Anzahl an Zyklen ( $z$ ) ist folglich abhängig von der Konzentration der DNA-Moleküle zu Beginn der Messung ( $y$ ) und lässt sich bei einer optimalen Amplifikation berechnen. Genauso ist es möglich, die Formel nach der Zyklenzahl umzustellen und somit die Vervielfältigungsmenge für jeden Zyklus vorherzusagen. Nach dieser Berechnung dauert es bei einer Probe, die um den Faktor 10 im Vergleich zur Ausgangsprobe verdünnt wurde, 3,3 Zyklen länger bis der  $c_t$ -Wert erreicht wird. Eine 1:100-Verdünnung benötigt im Vergleich 6,6 Zyklen

## 4 Ergebnisse und Diskussion

---

länger. Mittels dieses Wissens ist es möglich, eine Eichgerade zu erstellen ohne die genaue Anfangskonzentration an DNA-Molekülen zu kennen.

Die PCR-Effizienz muss für jedes Gen einzeln bestimmt werden. Die Effizienz (E) ergibt sich aus der Steigung der einzelnen  $c_t$ -Messpunkte pro Verdünnungsschritt (vgl. Abbildungen 24 und 25).

**Formel 16:** 
$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}} - 1 \quad (\text{Pfaffl, 2006b})$$

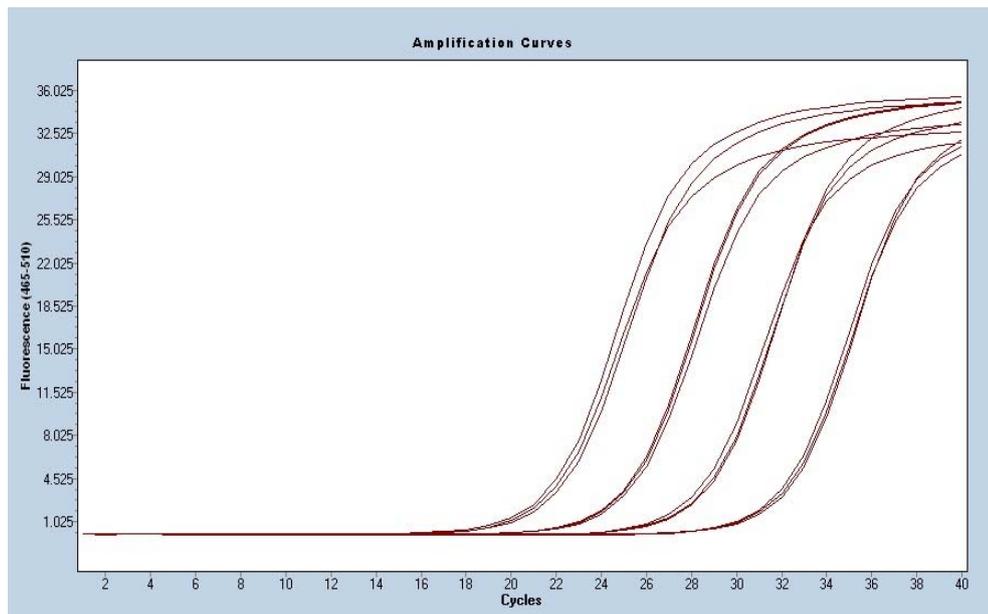


Abbildung 24: Effizienzberechnung am Beispiel ATF1

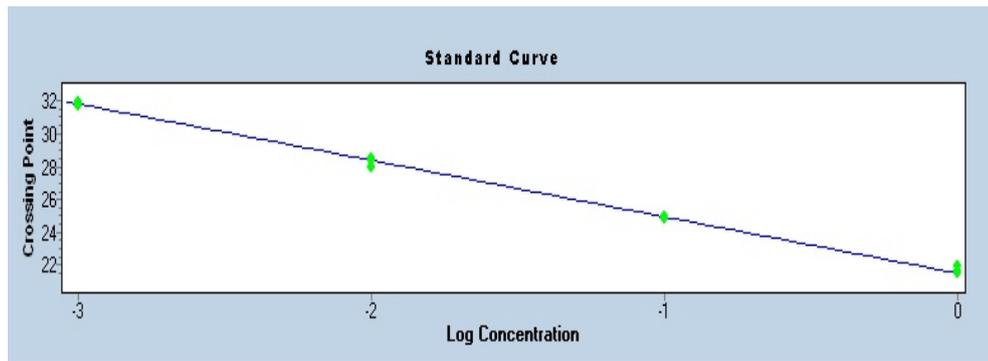


Abbildung 25: Logarithmische Auftragung der Messreihe ATF1

Für die in dieser Arbeit verwendeten Primer ergaben sich folgende PCR-Effizienz-Werte:

Tabelle 25: PCR-Effizienz der verwendeten Primer

Gen	Effizienz
ATF1	96,40 %
ATF2	92,50 %
IAH1	98,20 %
BAT1	88,60 %
PAD1	100,00 %
RDN18	96,90 %

Als gute Effizienzen werden Werte zwischen 80 % und 100 % bezeichnet (Taylor, 2011). Effizienzen deutlich unterhalb dieser Vorgaben sollten daher nicht zur Anwendung kommen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer waren demnach als gut bzw. sehr gut einzustufen. Lediglich die Primer für das Gen BAT 1 lagen in einem etwas niedrigeren Prozent-Bereich als die übrigen Effizienzen. Allerdings waren auch diese für die Messung der Genexpression durchaus geeignet.

### 4.2.1.2 Überprüfung der RNA-Qualität

Ein weiterer wichtiger Faktor, welcher Berücksichtigung bei der Messung mit einer Real-Time PCR finden sollte, ist die Reinheit der isolierten RNA. Eine Möglichkeit, die Qualität der gewonnen RNA zu überprüfen ist die Betrachtung der Absorption bei 260 nm (A260) und 280 nm (A280) mittels Nanodrop (Pfaffl, 2006a; Taylor, 2011). Das Verhältnis A260/A280 sollte laut Pfaffl oder Becker et al. für DNA bei mindestens 1,8

und für RNA bei mindestens 2,0 liegen (Becker, Hammerle-Fickinger, Riedmaier, & Pfaffl, 2010; Pfaffl, 2006a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNA-Qualität jeder einzelnen Messung stets überwacht. Exemplarisch sind im Anhang RNA-Proben des Referenzgens RDN18 bei verschiedenen Hefestämmen aus einer Versuchsreihe dargestellt (siehe Tabelle 38 im Anhang). Hierbei zeigte sich, dass keine der Proben ein Verhältnis unter 2,0 aufweist. Die detektierten Werte lagen konstant in Bereichen zwischen 2,09 und 2,13. Die isolierten RNA-Abschnitte konnten daher als sehr gut und rein bezeichnet werden und waren für die Messung mittels Real-Time PCR geeignet.

### ***4.2.1.3 Überprüfung der PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse***

Nachdem die Qualität der isolierten RNA gewährleistet war, wurde im letzten Schritt die Länge der PCR-Produkte überprüft. Bei PCR-Reaktionen ist es möglich, dass es zu Fehlpaarungen mit den verwendeten Primern kommt und diese oftmals sehr kurzen Bruchstücke im weiteren Verlauf ebenfalls amplifiziert werden. Da sich auch in diese Bruchstücke der Fluoreszenz-Farbstoff einlagern kann, kann es in Folge dessen zu einer fehlerhaften Messung durch ein zu hohes Fluoreszenz-Signal kommen. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Fragmentlängen zu kontrollieren. Hierzu wird üblicherweise die sogenannte Schmelzkurvenanalyse herangezogen. Nach beendeter PCR-Messung wird die Temperatur in der PCR soweit erhöht, bis das Fluoreszenz-Signal schlagartig sinkt. Durch die Temperaturerhöhung werden die Doppelstränge mit dem darin befindlichen Fluoreszenzfarbstoff (hier SybrGreen) thermisch aufgeschlossen. Der Farbstoff wird aus den DNA-Fragmenten herausgelöst und das Fluoreszenz-Signal sinkt. Mit Hilfe der ermittelten Temperatur (bei Abfall des Fluoreszenzsignals) und mittels eines speziellen Berechnungsprogramms (Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator) kann die Länge der DNA-Sequenzen bestimmt werden. Die empfohlene Länge des PCR-Produktes liegt zwischen 100 und 200 Basenpaaren, in jedem Fall jedoch unter 300 (Druml, 2014).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

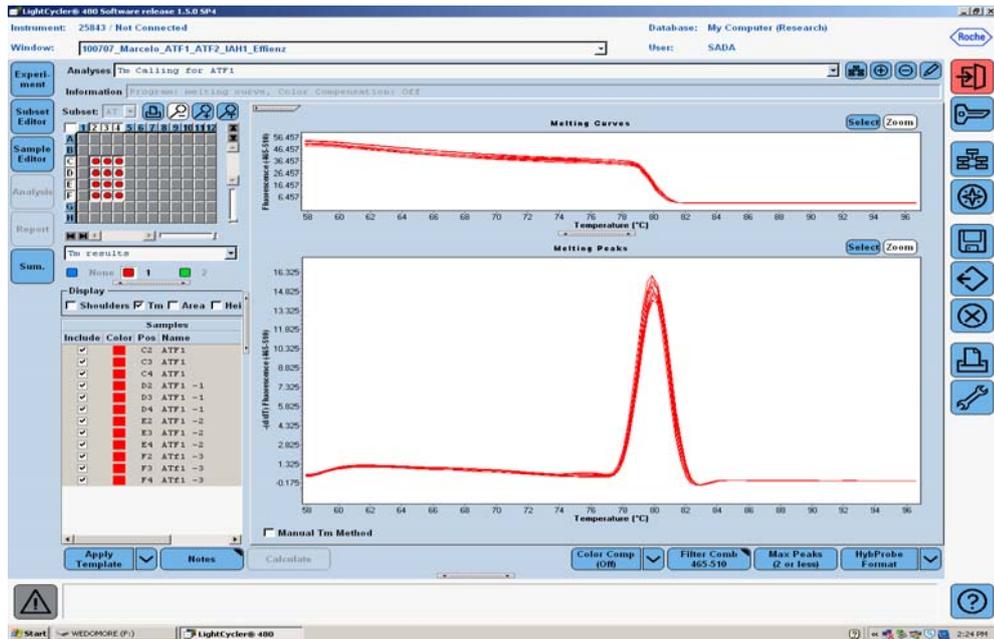


Abbildung 26: Schmelzkurven von ATF1

Die Überprüfung der einzelnen PCR-Produkte ergab nach Berechnung folgende Basenlängen der einzelnen PCR-Produkte:

Tabelle 26: Basenlänge der PCR-Produkte für verschiedene Primer

PCR-Produkt	Basenlänge [bp]
RDN18	237
ATF1	198
ATF2	115
IAH1	122
BAT1	150
PAD1	160

Demzufolge lagen alle in dieser Arbeit verwendeten Gene in dem geforderten Bereich. Lediglich RDN18 lag etwas höher als die übrigen PCR-Produkte, was die Messungen jedoch nicht beeinflusst. Darüber hinaus war der wichtigste Parameter, der diesbezüglich zu überprüfen ist, die Effizienz der Primer. Diese gibt Auskunft darüber, ob die Verdopplungsvorgänge während der PCR in ausreichendem Maß vonstattengehen, oder ob die Elongations-Dauer angepasst werden muss, da die Basenlänge zu groß ist, um in der vorgegeben Zeit die Verdopplung durchzuführen. Da die ermittelte Effizienz beim PCR-Produkt RDN18 mit 96,9 % in einem sehr guten

Bereich lagen, war davon auszugehen, dass es hier zu keinerlei Schwierigkeiten kommt.

### **4.2.2 Einfluss des Hefestammes auf die Enzyymbildung im Verlauf einer Gärung**

#### **4.2.2.1 Bildung von Essigsäureestern**

Als Leitkomponenten für das bananig-fruchtige Aroma in Weizenbieren werden die beiden Essigsäureester Isoamylacetat und Ethylacetat genannt. Von besonderem Interesse sind die Faktoren, die die Bildung dieser Komponenten beeinflussen. Neben technologischen Einflussfaktoren spielt die Wahl des Hefestamms eine entscheidende Rolle für das spätere Aromaprofil eines Bieres. Für die Bildung von Isoamylacetat und Ethylacetat werden Alkohol-Acetyl-Transferasen (AATase) benötigt, die die Synthese katalysieren. Im obergärigen Bereich sind hierfür die beiden Enzyme AATase 1 und AATase 2 verantwortlich, welche in den Genen ATF1 und ATF2 lokalisiert sind (Fujii, 1997; Malcorps & Dufour, 1992; Verstrepen, 2003d; Yoshimoto, 1998). Als bedeutender für die Synthese von Essigsäureestern gilt laut Literatur jedoch die AATase 1 (Lilly et al., 2006a; Verstrepen, 2003d). Untersuchungen diesbezüglich wurden jedoch bislang nur für untergärige Bierhefestämme sowie obergärige Alehefen durchgeführt – nicht jedoch für Weizenbier-Stämme.

Im Folgenden sind die Ergebnisse einer Studie dargestellt, bei der unter identischen Versuchsbedingungen fünf Weizenbier-Hefestämme hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht wurden. Die Ergebnisse sind stets mit den Expressionen des Referenzgens verglichen und mittels Formel 14 normalisiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und der mengenmäßigen Diskrepanz zwischen Ethylacetat und Isoamylacetat im Bier (ca. Faktor 10), wurden im Folgenden die Genexpressionen von ATF1 und ATF2 lediglich gegen Isoamylacetat aufgetragen. Die Kurven der beiden Essigsäureester verliefen darüber hinaus nahezu identisch, da die gleichen Enzyme für deren Bildung verantwortlich sind und können Punkt 4.1 entnommen werden. Ziel dieser Untersuchung war es vor allem, den Verlauf der Genexpression über den Zeitraum der Hauptgärung darzustellen. Die Relevanz von Genen für die Aromastoffsynthese wurde in den meisten wissenschaftlichen Studien durch gezielte Gendeletion, d.h. Inaktivierung bestimmter Genabschnitte, oder mittels Mutanten bestimmt (Lilly et al.,

2006a; Saerens et al., 2006; Verstrepen, 2003d, 2004b). In weiteren Untersuchungen wurde zumeist lediglich das Maximum einer Expression im Verhältnis zur Endkonzentration des resultierenden Aromastoffes bestimmt (Saerens et al., 2008b). Es ist jedoch zu vermuten, dass nicht nur das Maximum der Expression, sondern auch der Zeitpunkt sowie die Summe der Expressionen über den gesamten Gärverlauf eine entscheidende Rolle spielen, da ein Expressionsmaximum gegen Ende der Gärung vermutlich nur noch wenig zur Aromastoffsynthese beiträgt (Substratmangel). Alle im Folgenden dargestellten Genexpressionen wurden zusätzlich zur Erstellung der Aromaprofile aus Punkt 4.1 gemessen. Dementsprechend sind alle Messanalysen (FAN, Zucker, Vergärungsgrade, Gärungsnebenprodukte etc.) Tabelle 23 zu entnehmen. Alle Ergebnisse der Genexpressionsmessungen (inklusive Ergebnisse vor der Normalisierung mit Konfidenzintervallen) sind in den Tabellen 39 bis 42 im Anhang zu finden.

### **Expression von ATF 1 und Verlauf der Isoamylacetat-Bildung**

Obwohl alle Hefestämme auf identische Weise propagiert wurden, zeigten sich bereits nach 12 h Unterschiede im Expressionsverhalten. Im Gegensatz zu TUM 68, TUM 127, TUM 214 und TUM 505 war bei Hefestamm TUM 175 bereits eine erhöhte Expression und somit eine verstärkte Enzymbildung erkennbar (vgl. Abbildungen 27 – 31). Nach 24 h war eine ausgeprägte Steigung im Expressionsverhalten bei TUM 68 zu erkennen (Skalierung ist im Vergleich zu den übrigen Expressionsverläufen erweitert worden). Im Anschluss an diese Erhöhung, stieg auch der Gehalt an Isoamylacetat deutlich an. Die Expression und somit das Enzymbildungsvermögen stieg bei TUM 68 bis 48 h stark an und fiel gegen Ende der Hauptgärung rapide. Dies ließ vermuten, dass scheinbar keine Enzyme mehr benötigt wurden (siehe Abbildung 27).

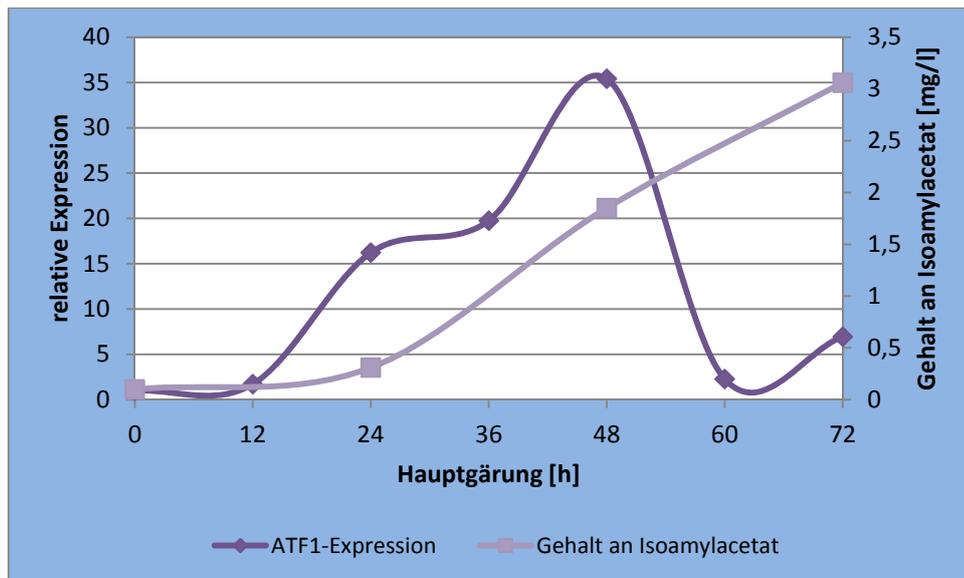


Abbildung 27: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68

Ein unerwartetes Bild zeigte sich bei der Expressionsmessung von Hefestamm TUM 127. Obwohl nahezu keine Expression des ATF1-Gens in den ersten 48 h messbar war, stieg der Gehalt an Isoamylacetat trotzdem zu Beginn stark an. Es scheint, dass eine ausreichend große Enzymmenge an AATase 1 in diesem Hefestamm bereits während der Propagation gebildet worden ist und somit schon zu Beginn der Gärung zur Verfügung stand. Erst nach 60 h stieg das Expressionslevel nochmals steil an und erreichte das Maximum. Zu diesem Zeitpunkt schien die Hefe neue Enzyme zu benötigen, was sich jedoch nicht in einer steigenden Isoamylacetat-Bildung äußerte, da zu diesem Zeitpunkt der Gärung Acetyl-CoA bereits verbraucht war (vgl. Abbildung 28).

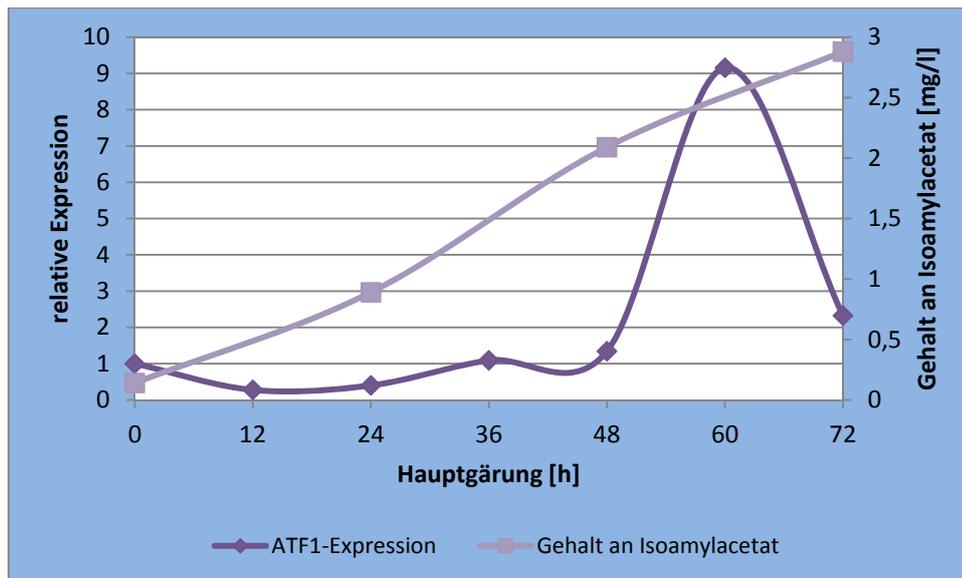


Abbildung 28: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127

Die Ermittlung der Expressionsmaxima zeigte, dass das höchste Maximum von TUM 68 gefolgt von TUM 127, TUM 175, TUM 214 und TUM 505 erreicht wurde (vgl. Abbildungen 27, 28, 29, 30 und 31). Die Reihenfolge der höchsten Konzentrationen an Isoamylacetat nach beendeter Hauptgärung zeigte jedoch, dass TUM 175 die höchste Produktion aufwies gefolgt von TUM 68, TUM 127, TUM 214 und TUM 505. Es ist somit erkennbar, dass tendenziell ein hohes Maximum der ATF1-Expression auch zu höheren Gehalten an Isoamylacetat führte, allerdings erklärte diese Tatsache beispielsweise nicht den Verlauf der Isoamylacetat-Bildung bei Hefestamm TUM 127.

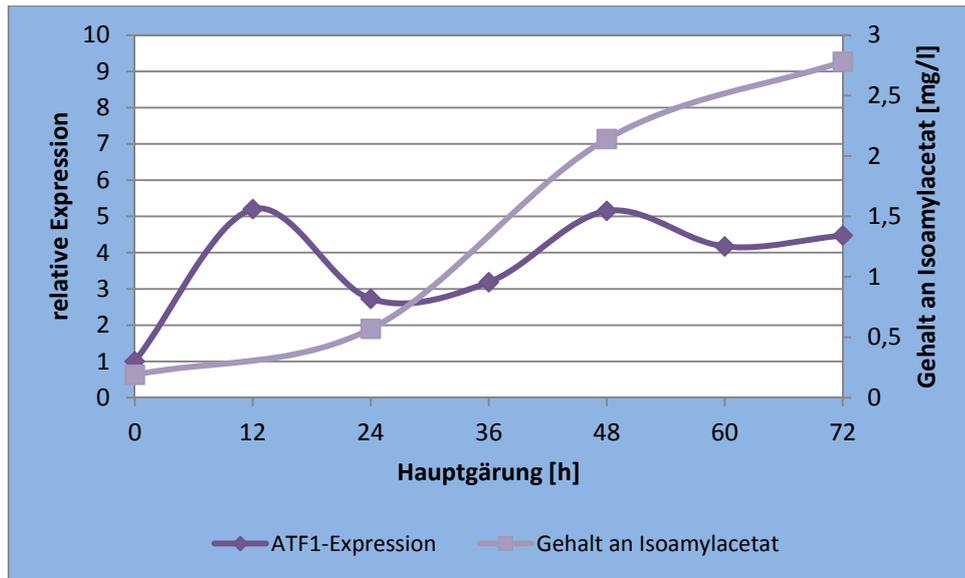


Abbildung 29: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175

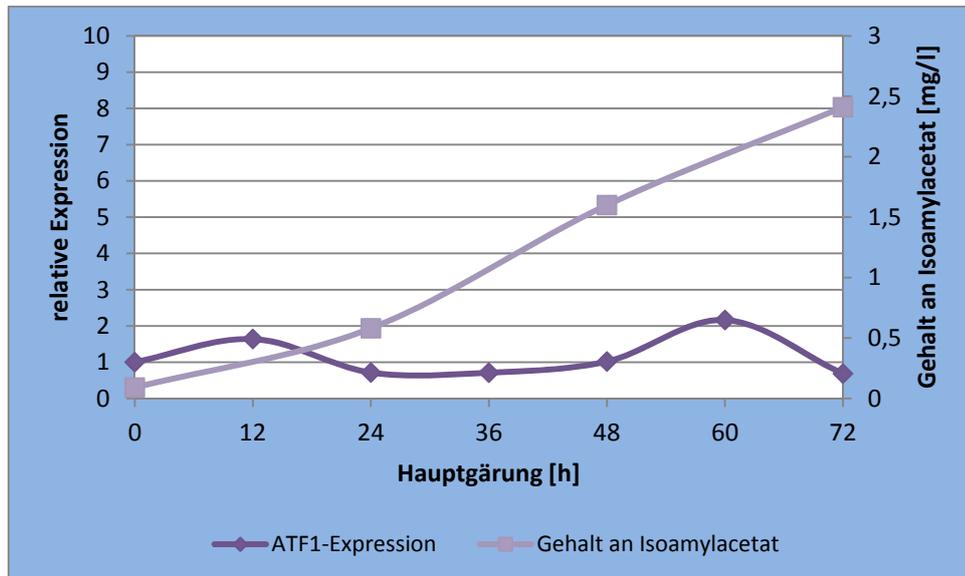


Abbildung 30: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214

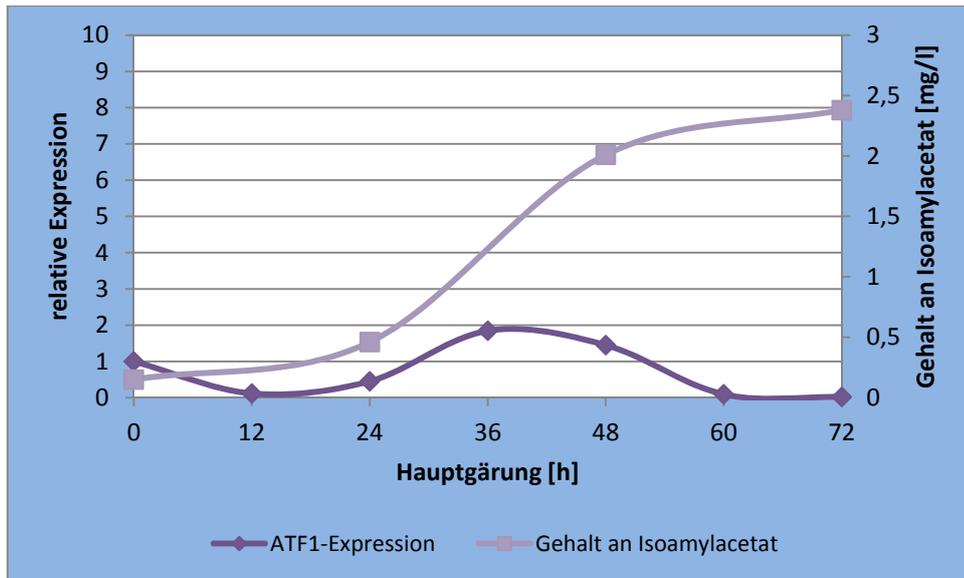


Abbildung 31: ATF1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505

Ein in diesen Darstellungen nicht berücksichtigter Faktor stellt der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 der Gärung (Anstellzeitpunkt) der einzelnen ATF1-Expressionen dar. Da der Ausgangswert bei TUM 68 im Vergleich zu den übrigen Hefestämmen am niedrigsten lag (normalisierter Wert aus Formel 14), wurden zur Überprüfung der Ergebnisse alle Expressionen der übrigen Hefestämme mit dem Differenzfaktor der Ausgangsexpression von ATF1 des jeweiligen Hefestamms zu TUM 68 faktorisiert. Hierbei ergab sich folgendes Bild:

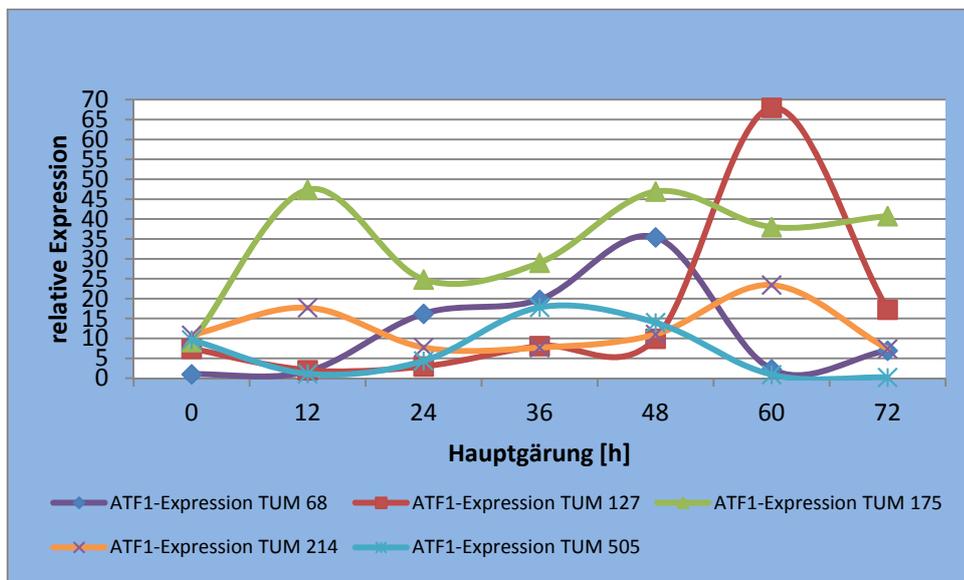


Abbildung 32: Faktorisierte Darstellung der einzelnen ATF1-Expressionsverläufe

Da die Einzeldaten lediglich faktorisiert wurden, sind die Kurvenverläufe die gleichen. Auch in dieser Darstellung zeigte sich, dass TUM 214 und 505 das niedrigste Expressionsniveau aufwiesen. Deutlicher wird jedoch, dass TUM 175 dieses Gen während der Gärung am stärksten exprimierte, was wiederum sehr gut mit der höchsten Endkonzentration an Isoamylacetat korrelierte. TUM 68 besaß auch in dieser Darstellungsweise recht hohe Expressionsraten.

### **Expression von ATF 2 und Verlauf der Isoamylacetat-Bildung**

Die Ergebnisse der ATF2-Expressionsmessungen bestätigten zum größten Teil die in der Literatur angegebene Relevanz von ATF2 zu ATF1 bezüglich der Aromastoffsynthese. Sowohl bei den Untersuchungen der Hefestämme TUM 175 und TUM 214 als auch bei TUM 505 schien ATF2 keine große Rolle zu spielen, da das Gen ATF2 kaum exprimiert wurde (vgl. Abbildungen 33, 34 und 35).

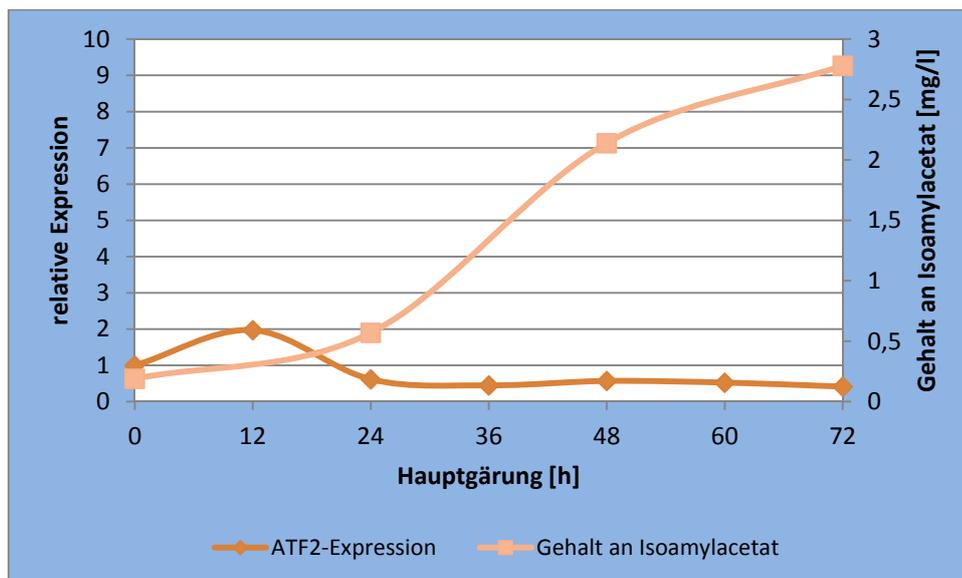


Abbildung 33: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175

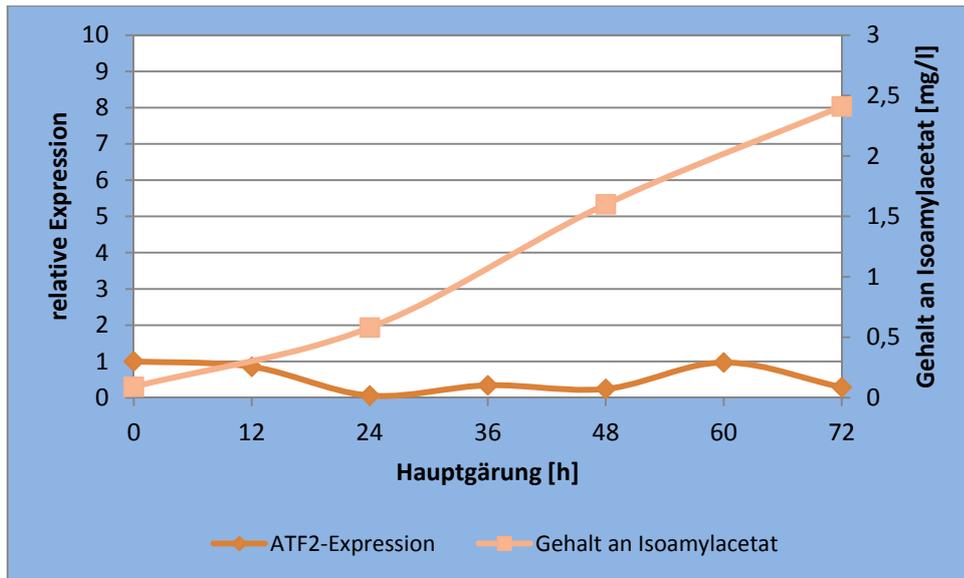


Abbildung 34: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214

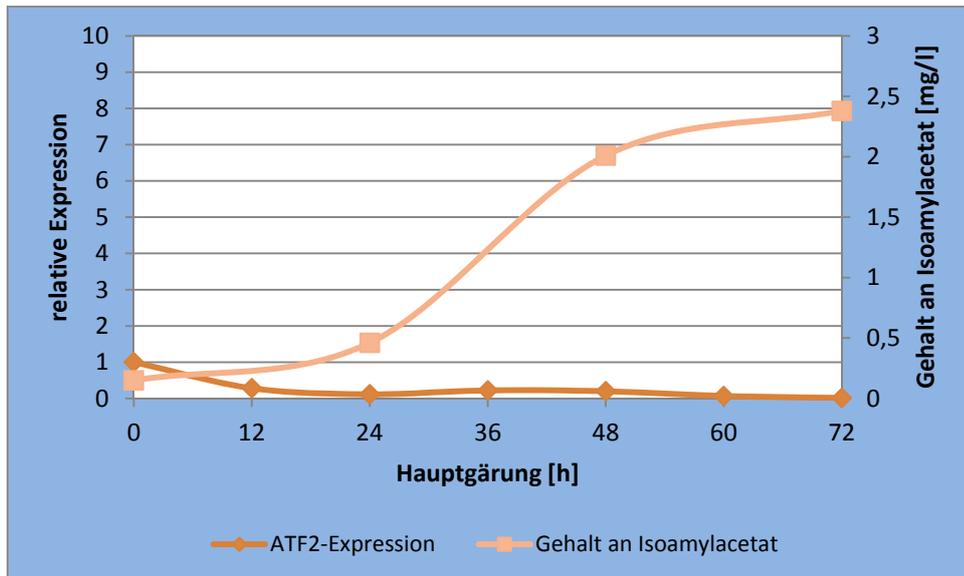


Abbildung 35: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505

Lediglich TUM 68 und TUM 127 exprimierten dieses Gen signifikant. Auffällig waren auch die ähnlichen Kurvenverläufe bei TUM 127 und TUM 68 im Vergleich zu den Expressionsverläufen von ATF1. TUM 68 exprimierte das Gen ATF2 ebenfalls nach 24 h und erreichte das Maximum im Gegensatz zur ATF1-Expression etwas früher nach 36 h. Der Kurvenverlauf der Expression bei TUM 127 war nahezu identisch zur Expression von ATF1 (siehe Abbildungen 27 und 28).

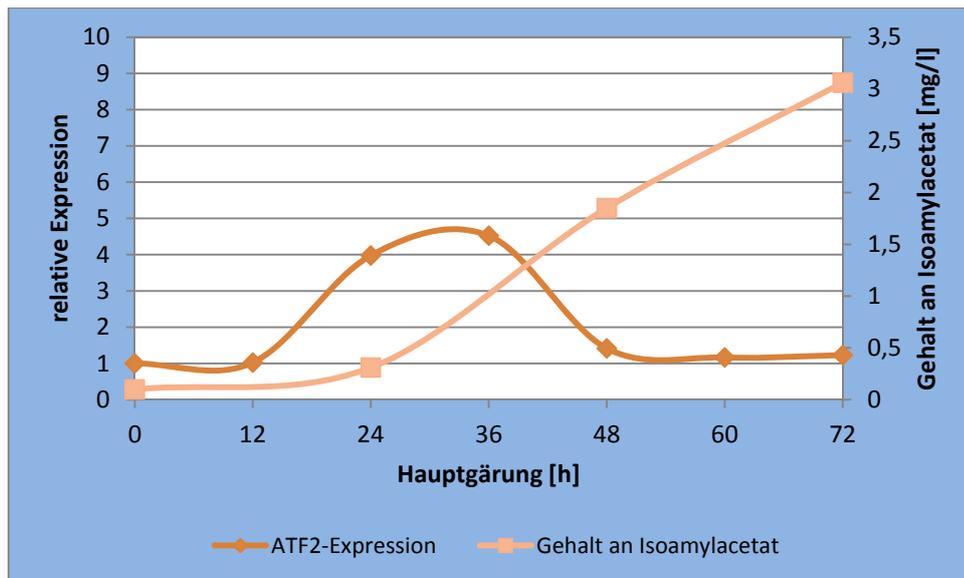


Abbildung 36: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68

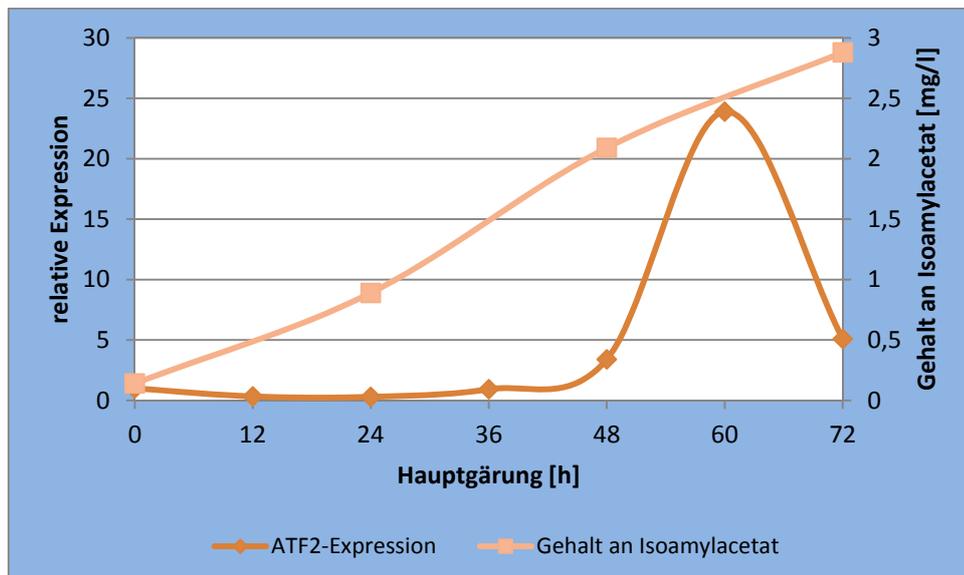


Abbildung 37: ATF2-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127

Auch in diesem Fall besaß TUM 68 den niedrigsten Ausgangswert, sodass wie bei ATF1 auch hier eine Faktorisierung erfolgte, um eine weitere Darstellungsweise zu ermöglichen.

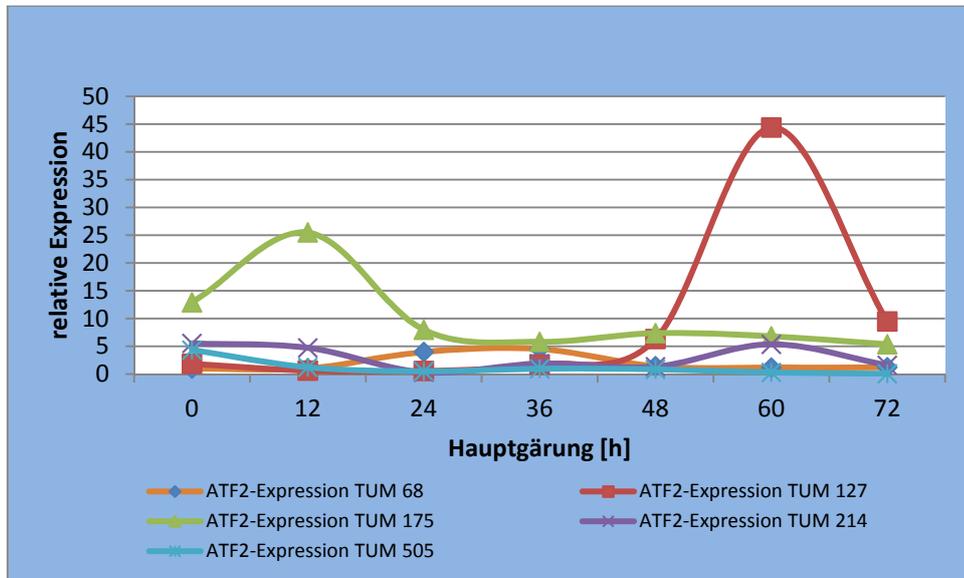


Abbildung 38: Faktorisierte Darstellung der einzelnen ATF2-Expressionen

Die Darstellung der faktorisierten Expressionswerte zeigte ein sehr ähnliches Bild wie die übrigen Grafiken. Einzig das Ausgangsniveau der ATF2-Expression von TUM 175 ließ darauf schließen, dass diese Hefe das ATF2-Gen bereits vor den anderen Hefen exprimierte. Die Darstellungsweise in faktorisierter Form änderte bei vier der getesteten Hefestämme nichts an den Aussagen zum Expressionsverhalten. Diese Darstellungsweise schien lediglich einen besseren Erklärungsansatz zum Verhältnis zwischen Expressionsverhalten und Konzentration von Isoamylacetat bei TUM 175 zu liefern.

Aus den Darstellungen der Expressionskurven von ATF1 und ATF2 ließ sich demnach schließen, dass die unterschiedlichen Hefestämme ein stark variierendes Verhalten bezüglich ihrer Enzyymbildung an den Tag legten. Während vor allem der Hefestamm TUM 175 bereits zu Beginn der Gärung sowohl das Gen ATF1 als auch das Gen ATF2 relativ stark exprimierte, benötigten andere Hefestämme scheinbar erst zu einem späteren Zeitpunkt Enzyme für die Essigsäureester-Bildung. Die größte Syntheserate an Isoamylacetat zu Beginn der Gärung konnte der Hefestamm TUM 127 verzeichnen, der jedoch kaum Expressionen der Gene ATF1 oder ATF2 zeigte. Daraus ist zu schlussfolgern, dass dieser Hefestamm bereits während der Propagationsphase die Enzyymbildung forciert bzw. über eine hohe enzym-Aktivitätsrate verfügte.

#### 4.2.2.2 Abbau von Essigsäureestern

Isoamylacetat und Ethylacetat werden nicht nur aufgebaut, sondern es findet parallel zur Synthese bereits ein Abbau dieser Ester statt. *Fukada* fand 1998 heraus, dass eine Gendeletion des Gens IAH1 zu einem Anstieg an Ethylacetat und Isoamylacetat führten, was zeigte, dass das in IAH1 kodierte Enzym für die Hydrolyse dieser Ester zuständig ist (Fukuda, 1998).

Auch die Expressionsmessungen von IAH1 zeigten sehr große Unterschiede zwischen den einzelnen Hefestämmen. Bei den Stämmen TUM 68, TUM 175 und TUM 214 war eine deutliche Expression des Gens IAH1 erkennbar (vgl. Abbildungen 39, 40, 41). Sowohl TUM 68 als auch TUM 175 zeigten ein Expressionsmaximum nach 36 h, während TUM 214 erst nach 60 h versuchte, vermehrt Enzyme zur Hydrolyse zu synthetisieren. Die Tatsache, dass diese Expressionsmaxima zu einem späteren Zeitpunkt der Hauptgärung auftraten erscheint logisch, da zu früheren Zeitpunkten kaum Ester vorhanden sind. Es schien, als ob die unterschiedlichen Hefestämme bei verschieden hohen Gehalten an Isoamylacetat versuchten, Enzyme zur Hydrolyse zu produzieren.

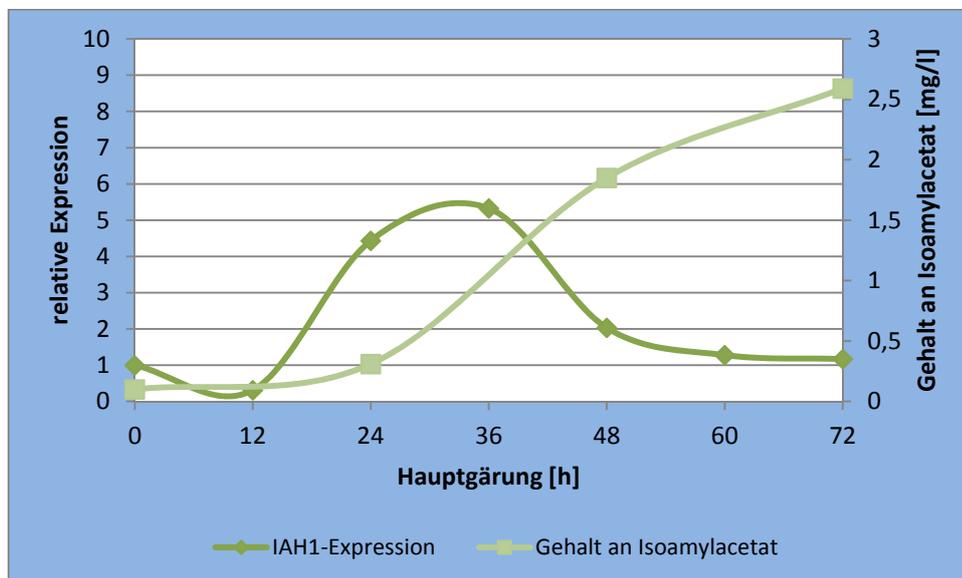


Abbildung 39: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68

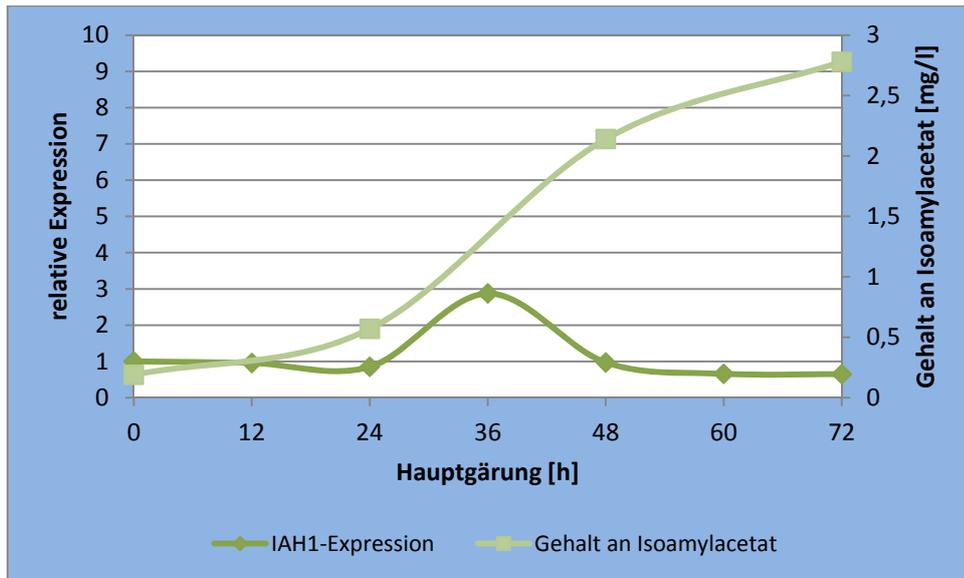


Abbildung 40: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175

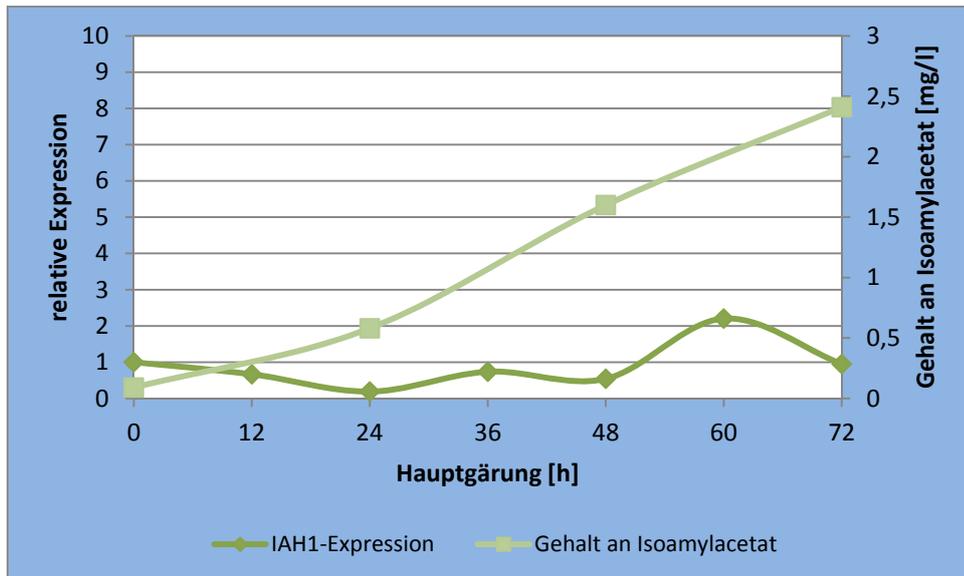


Abbildung 41: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214

So zeigte sich ein Expressionsmaximum des IAH1-Gens bei TUM 175 bereits bei einer Isoamylacetat-Konzentration von ca. 1,3 mg/l, während es durch die Hefe TUM 68 erst bei einer Konzentration von ca. 1,7 mg/l verstärkt exprimiert wurde. Das Expressionsmaximum von TUM 214 wurde sogar erst bei einer Konzentration von ca. 2 mg/l erreicht. Im Vergleich zu den Expressionsraten der ATF1-Gene fielen die von IAH1 deutlich geringer aus. Die höchste Expressionsrate an IAH1 wies TUM 68 auf, was einen Erklärungsansatz dafür lieferte, dass der Gehalt an Isoamylacetat am Ende der Hauptgärung etwas niedriger lag als bei TUM 175, der geringere Expressionen an ATF1 und ATF2 zeigte. TUM 68 schien demnach mehr

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Isoamylacetat zu hydrolysieren als die übrigen Stämme, wengleich die Expressionen allgemein nicht sehr hoch ausfielen.

Die Stämme TUM 127 und TUM 505 exprimierten im Gegensatz dazu kaum das IAH1-Gen, wie in den Abbildungen 42 und 43 zu sehen ist.

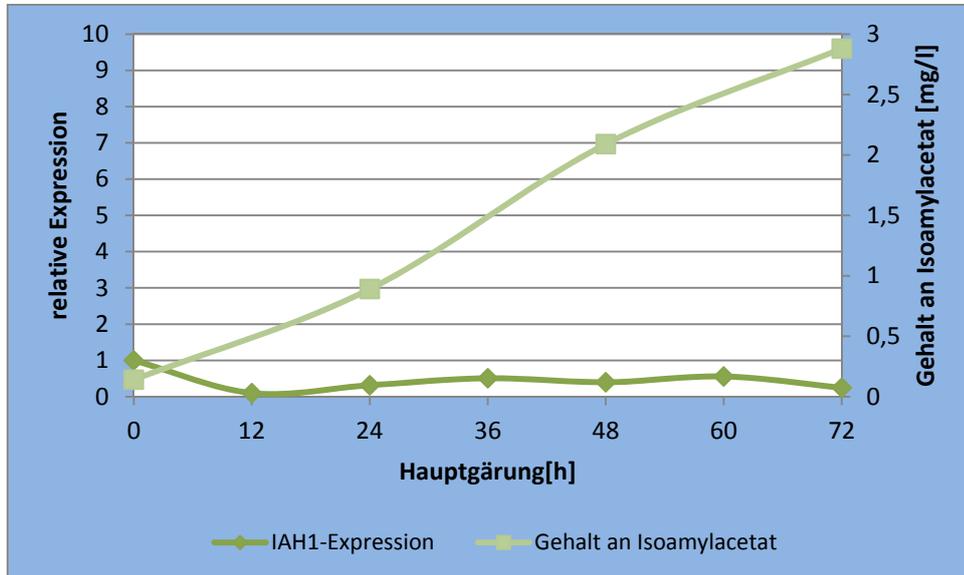


Abbildung 42: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127

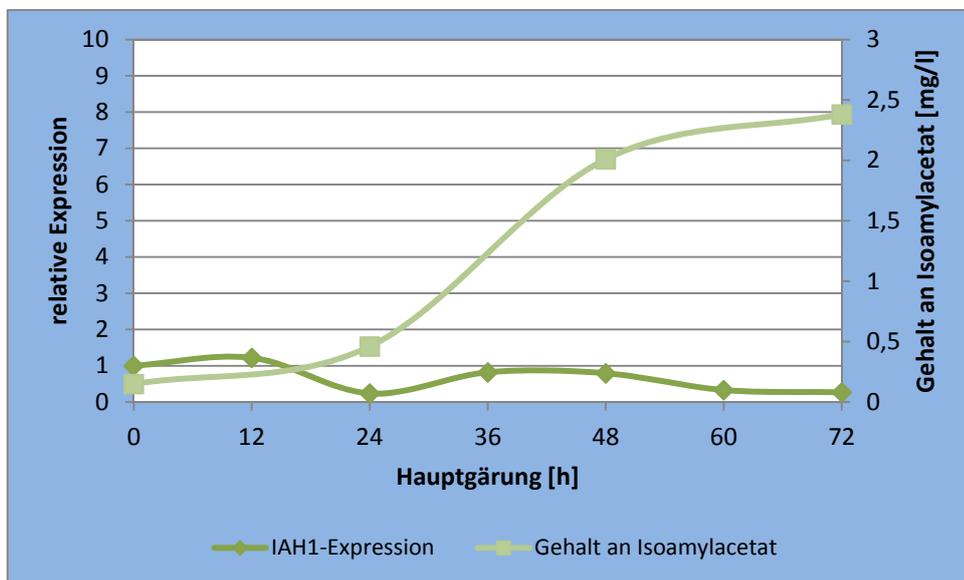


Abbildung 43: IAH1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505

Die faktorisierte Darstellung zeigt Abbildung 44 (wiederum auf TUM 68 bezogen).

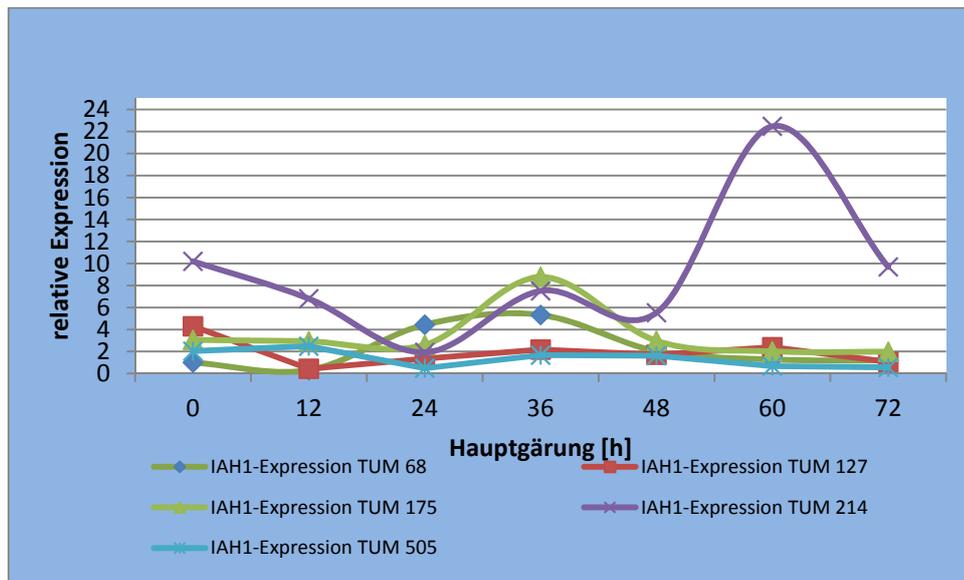


Abbildung 44: Faktorisierte Darstellung der einzelnen IAH1-Expressionsverläufe

Nach der Faktorisierung lagen die Expressionslevel von IAH1 bei TUM 68 und TUM 175 auf ähnlichem Niveau. Unverändert blieb die geringe bis nicht erkennbare Expression dieses Gens bei TUM 127 und TUM 505. Der einzige große Unterschied war in der Expression von TUM 214 zu erkennen, dessen Niveau im Vergleich deutlich anstieg. Diese Tatsache könnte in Zusammenhang mit den niedrigen Expressionen von ATF1 und ATF2 die niedrige Konzentration an Isoamylacetat nach beendeter Hauptgärung noch besser erklären.

### 4.2.2.3 Bildung von höheren Alkoholen

Die Bildung höherer Alkohole in der Hefezelle wird vor allem über das Gen BAT1 gesteuert (Lilly, 2004; Saerens et al., 2008b). Saerens et al. konnten zeigen, dass die Maximum-Expression des BAT1-Gens mit der Konzentration von höheren Alkoholen in Lager- und Ale-Hefestämmen korreliert, nicht jedoch die Expressionen der oftmals ebenfalls genannten Gene BAT2 oder BAP2 (Saerens et al., 2008b).

Die dargestellten Summen an höheren Alkoholen ergaben sich aus den Einzelmessungen von n-Propanol, Isobutanol und den Amylalkoholen 2- und 3-Methylbutanol. Die Darstellungen aus Abbildung 45 bis 49 zeigten einige Parallelen zu den Expressionen von ATF1 und ATF2. So fiel auf, dass die Expression von BAT1 bei

Hefestamm TUM 127 wiederum sehr niedrig war, die Bildung der höheren Alkohole jedoch nach 24 h bereits nahezu das Maximum erreicht hatte. Dies ließ wiederum auf eine hohe Enzymausstattung vor Beginn der Gärung schließen (vgl. Abbildung 45). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei TUM 505 (siehe Abbildung 46).

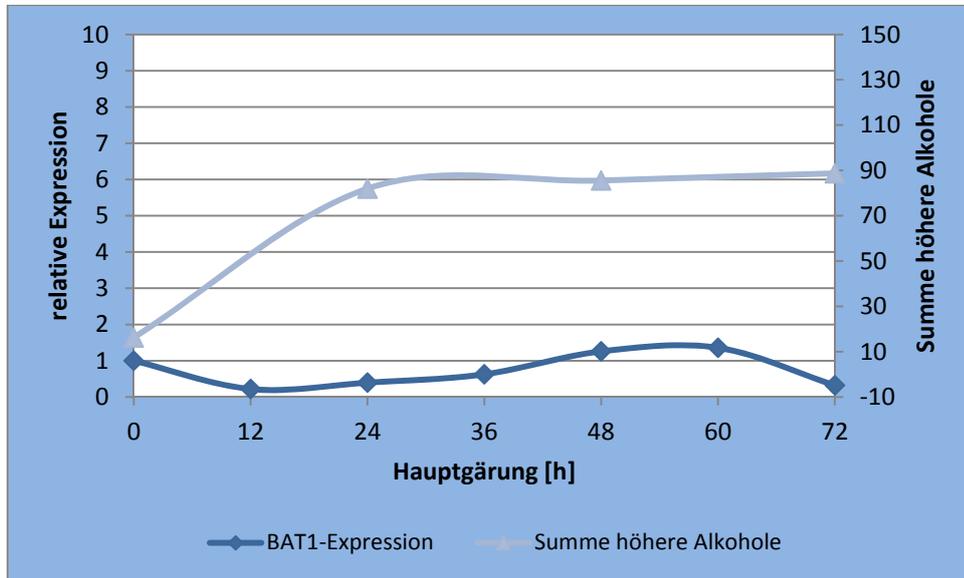


Abbildung 45: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127

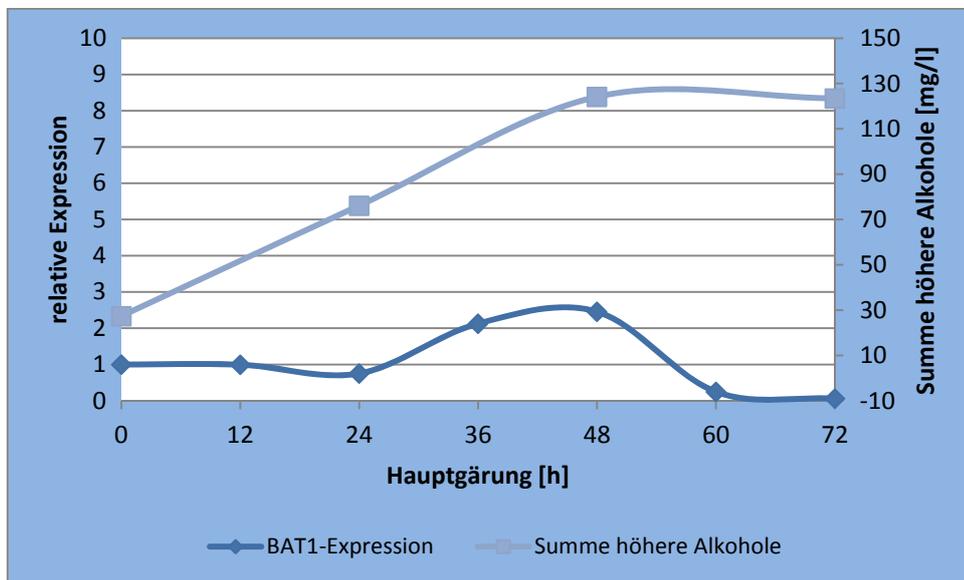


Abbildung 46: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505

Im Gegensatz hierzu exprimierte TUM 175 wiederum zu Beginn der Gärung stark (Maximum nach 12 h).

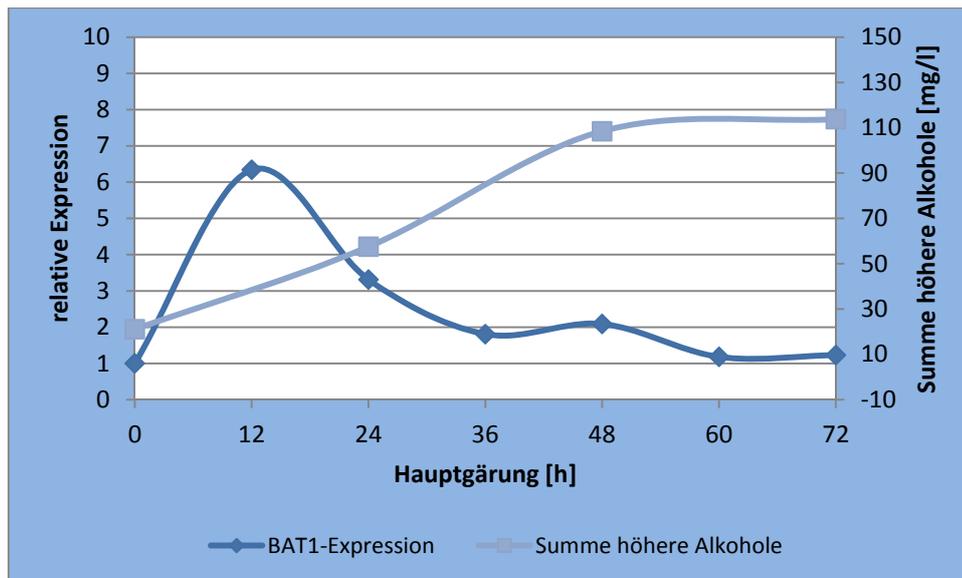


Abbildung 47: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175

Ein Expressionsmaximum zu Beginn der Gärung wäre auf Grund der frühen Bildungsrate an höheren Alkoholen bei allen Hefestämmen zu erwarten gewesen. Jedoch war lediglich bei TUM 68 nach 24 h Gärdauer ein solches Verhalten zu beobachten. Dieser Hefestamm exprimierte im Vergleich zu den übrigen Untersuchungsstämmen das Gen BAT1 überdurchschnittlich hoch. Diese Tatsache korrelierte jedoch nicht mit der Bildungsrate an höheren Alkoholen und ist demnach nicht in Einklang mit den Untersuchungen an Lager- und Ale-Hefestämmen von *Saerens et al.* zu bringen, die Korrelationen zwischen den Expressionsmaxima des BAT1-Gens und der Bildungsrate an höheren Alkoholen beschrieben (Saerens et al., 2008b) (siehe Abbildung 48).

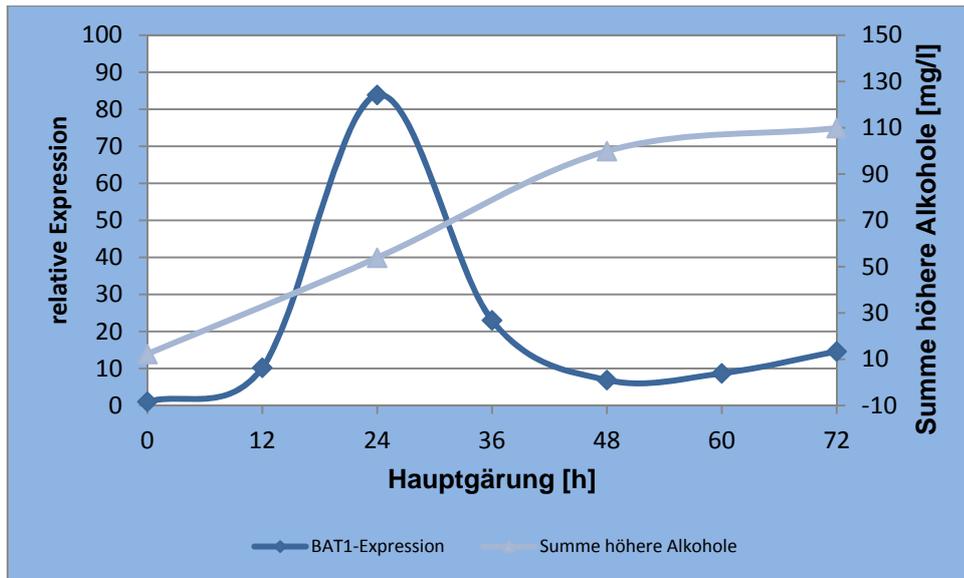


Abbildung 48: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68

Die höchste Expression des Gens BAT1 wurde durch den Hefestamm TUM 68 erreicht, der aber nicht mehr höhere Alkohole bildete als der Hefestamm TUM 214 (s. Abbildung 49).

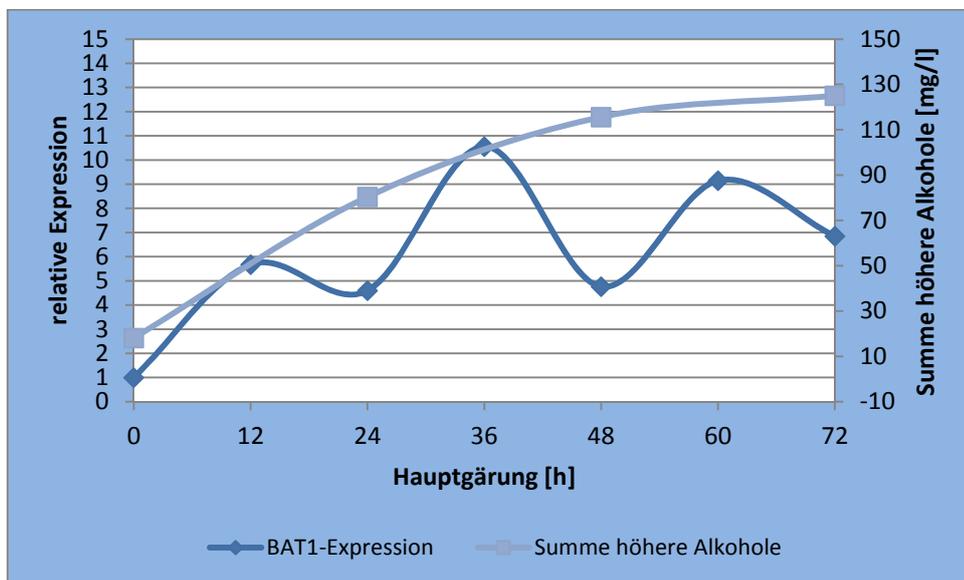


Abbildung 49: BAT1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214

Auf Basis dieser Ergebnisse schien es demnach auch auf den Zeitpunkt der Expression bzw. auf die Grundausstattung an Enzymen nach der Propagation anzukommen. Ziel einer Hefepropagation ist es, eine gute Vermehrung von Zellen in einem guten physiologischen Zustand zu erreichen. Wie von *Kruger et al.* oder *Taylor et al.* beschrieben, fördert eine starke Zellvermehrung auf Grund von

Sauerstoffeinflüssen oder dem Vorhandensein von Fettsäuren die Bildung von höheren Alkoholen. Es ist demnach davon auszugehen, dass die Hefen bereits in dieser starken Vermehrungsphase eine Enzyymbildung forcierten, die in einer verstärkten Bildung an höheren Alkoholen resultierten (Kruger et al., 1992; Taylor, 1979).

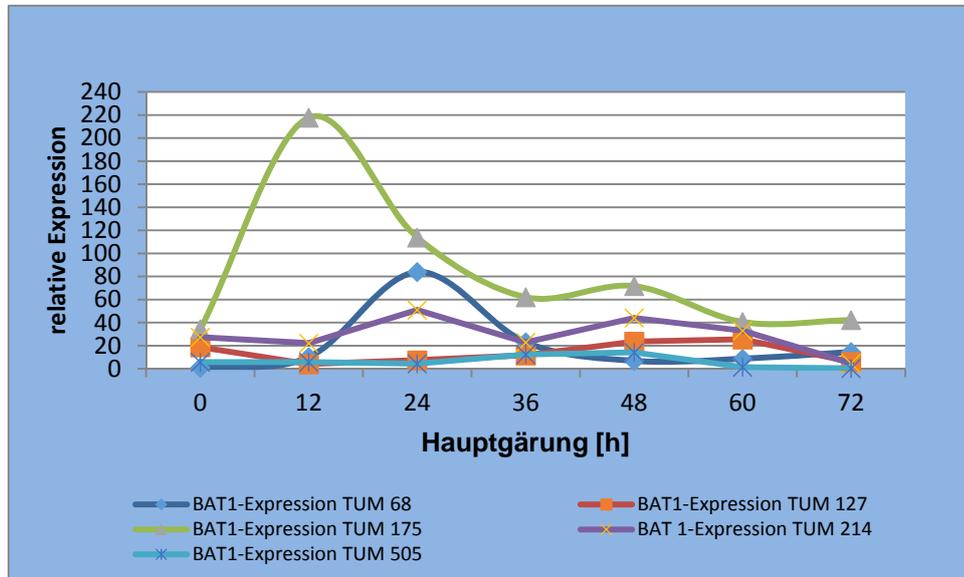


Abbildung 50: Faktorisierte Darstellung der einzelnen BAT1-Expressionen

Die faktorisierte Darstellungsweise zeigte ebenfalls die geringe Expression von BAT1 bei den Hefestämmen TUM 127 und TUM 505. Auf Grund des hohen Anfangsniveaus von TUM 175 und dem damit im Vergleich zu TUM 68 hohen Multiplikationsfaktor war eine übermäßig hohe Expression des BAT1-Gens zu erkennen, die jedoch nicht mit der Bildungsrate an höheren Alkoholen korrelierte. Die Expressionen von TUM 68 und TUM 214 lagen dagegen in einem ähnlichen Bereich.

### 4.2.2.4 Bildung phenolischer Komponenten

Das PAD1-Gen wird mit der Decarboxylierung von Zimtsäure, p-Cumarsäure und Ferulasäure zu Styrolen, 4-Vinylphenol und 4-Vinylguajakol in Verbindung gebracht (Stratford et al., 2007). Vor allem 4-Vinylguajakol spielt eine wesentliche Rolle im Aromaprofil eines Weizenbieres. Der Gehalt an 4-Vinylphenol ist meist als zu gering zu betrachten, da der Geschmacksschwellenwert dieser Komponente nicht erreicht

## 4 Ergebnisse und Diskussion

wird. Die Detektion des Gens PAD1 in Verbindung mit dem gebildeten 4-Vinylguajakol ergab folgende Ergebnisse (Abbildungen 51 – 55):

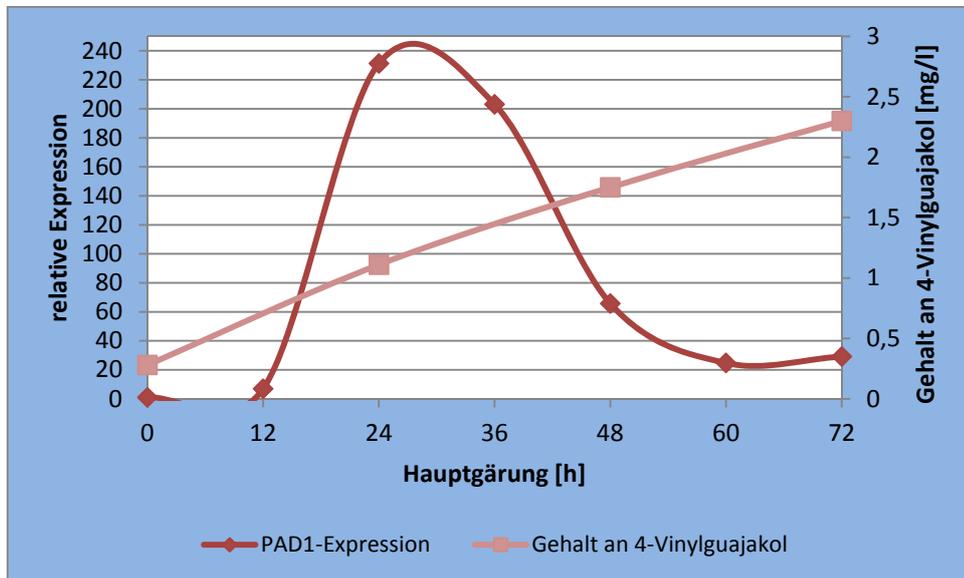


Abbildung 51: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 68

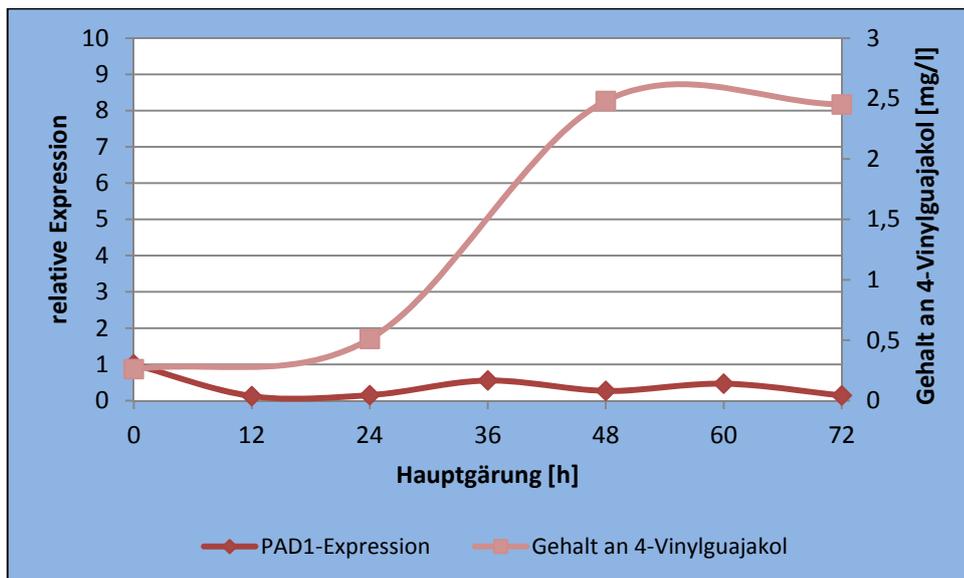


Abbildung 52: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 127

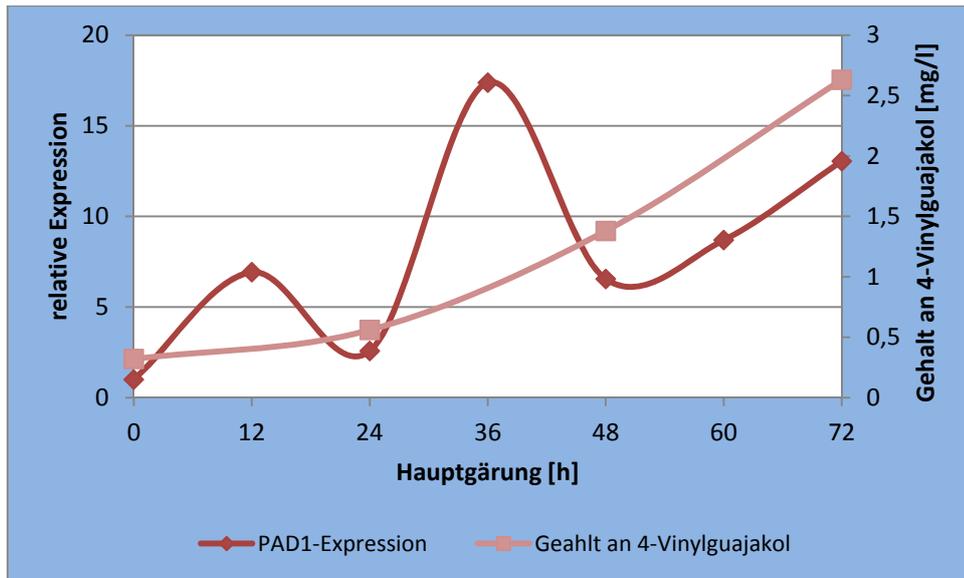


Abbildung 53: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 175

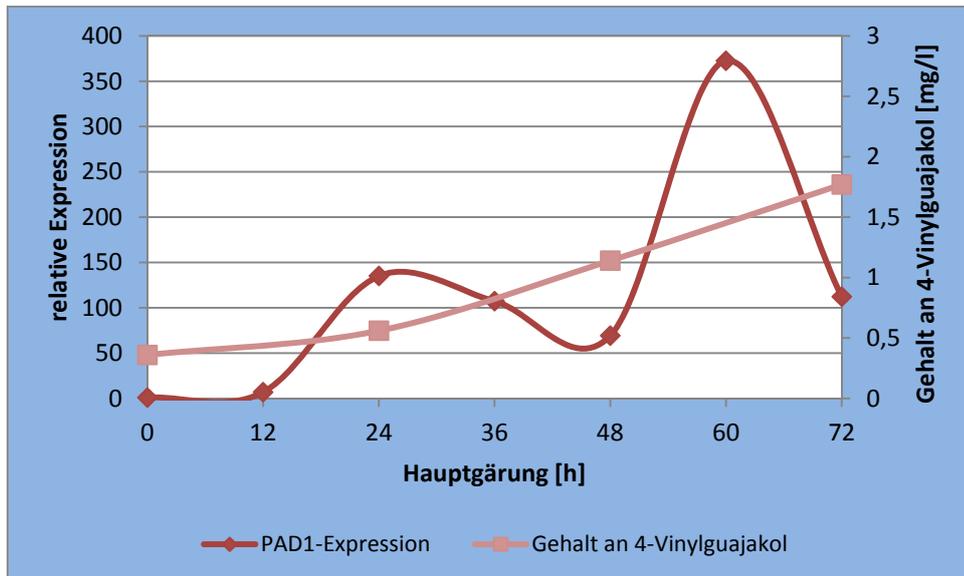


Abbildung 54: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 214

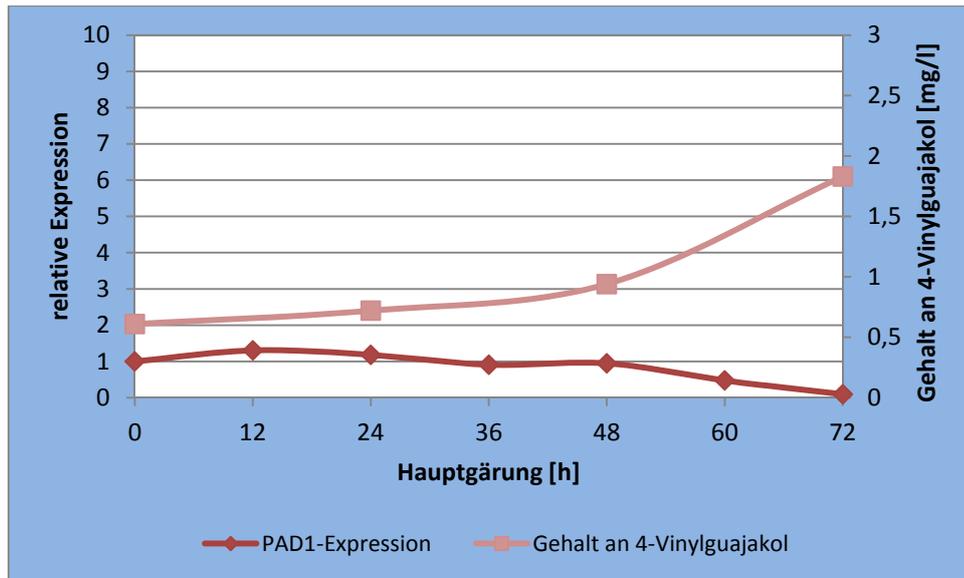


Abbildung 55: PAD1-Expressionen im Verlauf einer Gärung mit TUM 505

In diesen Abbildungen sind z.T. sehr starke Expressionsraten im Vergleich zu ihren Ausgangswerten vor der Gärung zu erkennen. Vor allem TUM 214 wies starke Expressionen des PAD1-Gens auf. Diese hohen Expressionen korrelierten jedoch nicht mit dem niedrigen Endgehalt an 4-Vinylguajakol nach beendeter Hauptgärung (2,50 mg/l). Die höchste Konzentration an 4-Vinylguajakol wiesen die Weizenbiere auf, die mit TUM 175 produziert wurden. Dieser Hefestamm zeigte jedoch ein sehr viel geringeres Expressionsmaximum an PAD1 als TUM 68 oder TUM 214 (Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch die faktorisierte Darstellung). Demnach scheint ein anderes Enzym für die Bildung entscheidender zu sein. Hierfür könnte das Gen FDC1 (Ferulasäure-Decarboxylase-Gen) verantwortlich sein, das im Rahmen dieser Studien jedoch nicht untersucht wurde. Dieses FDC1-Gen liegt nach *Mukai et al.* auf Chromosom 4 bei *Saccharomyces cerevisiae* direkt neben dem PAD1-Gen (Mukai, Masaki, Fujii, Kawamukai, & Iefuji, 2010). *Mukai et al.* vermuteten darüber hinaus, dass beide Gene PAD1 und FDC1 im Bildungsweg des Ubiquinon in *Escherichia coli* mitwirken (Mukai et al., 2010). Auch *Schwarz et al.* berichteten bereits über die Umsetzung von Ferulasäure und p-Cumarsäure durch die gleichen Enzyme PAD1 und FDC1 (Schwarz, Boitz, & Methner, 2012). Aus den dargestellten Ergebnissen war eine Korrelation zwischen der Expression des PAD1-Gens und der Bildung von 4-Vinylguajakol nur schwer auszumachen. Im Rahmen dieser Untersuchungen war es auf Grund des hohen zeitlichen Einsatzes nicht möglich, diese Versuchsreihen mit FDC1 und allen weiteren dargestellten Parametern zu wiederholen.

### **4.2.2.5 Korrelationen zwischen Expressionsmaxima und dem Maximum an gebildeter Aromakomponente**

In der Literatur sowie in zahlreichen Publikationen wurden oftmals lediglich die Expressionsmaxima ( $Genexpression = \frac{(E_{Ref})^{c_{p_{sample}}}}{(E_{target})^{c_{p_{sample}}}}$ ) im Verlauf einer Gärung angegeben, da diese mit den Maxima an gebildeten Aromastoffen korrelieren sollten. Saerens *et al.* konnten mittels Pearson-Korrelation beispielsweise sehr gute Korrelationen bei Lagebier- und Ale-Hefen zwischen der Bildung von höheren Alkoholen und Essigsäureestern und den jeweiligen Genexpressionen von BAT1, ATF1 und ATF2 finden (Saerens *et al.*, 2008b). Auf Basis der Untersuchungen von fünf unterschiedlichen Weizenbier-Hefestämmen wurde auch diese Sachlage untersucht. Hierbei wurde ebenfalls mit Hilfe der Pearson-Korrelation versucht, Abhängigkeiten der Genexpressionen mit den gebildeten Aromakomponenten zu finden. Da zu vermuten war, dass nicht nur das Expressionsmaximum ( $Genexpression = \frac{(E_{Ref})^{c_{p_{sample}}}}{(E_{target})^{c_{p_{sample}}}}$ ), sondern auch das allgemeine Expressionsniveau (Summe der Genexpressionsraten) sowie der Expressionszeitpunkt eine Rolle spielt, wurden die jeweiligen Genexpressionswerte addiert und ebenfalls mittels Pearson-Korrelation den maximal gebildeten Aromakonzentrationen gegenüber gestellt. Darüber hinaus wurde die Summe der normalisierten und faktorisierten Expressionsraten (Siehe Punkt 4.2.2.1-4.2.2.3) im Vergleich zu den gebildeten Aromakomponenten ebenfalls hinsichtlich möglicher Korrelationen untersucht. Insgesamt wurden fünf verschiedene Korrelationsfaktoren gebildet:

**Korrelationsfaktor 1:** Genexpressionsmaximum zu maximaler Stoffkonzentration

**Korrelationsfaktor 2:** Normalisierte Genexpressionsmaximum (Formel 14) zu maximaler Stoffkonzentration

**Korrelationsfaktor 3:** Summe der Genexpressionen zu maximaler Stoffkonzentration

**Korrelationsfaktor 4:** Summe der normalisierten Genexpressionen zu maximaler Stoffkonzentration

**Korrelationsfaktor 5:** Summe der normalisierten und faktorisierten Genexpressionen zu maximaler Stoffkonzentration

Als „bedeutsame“ Korrelation wird ein Faktor ab 0,3 definiert. Korrelationen werden ab einem Wert von 0,5 als „gut“ bezeichnet und ab 0,7 als „sehr gut“. *Saerens et al.* betrachteten eine Korrelation zwischen 0,5 und 1 als eine signifikante positive Korrelation zwischen zwei Variablen (*Saerens et al.*, 2008b).

Tabelle 27: Darstellung unterschiedlicher Korrelationsfaktoren

Pearson-Korrelation	Korrelationsfaktor 1	Korrelationsfaktor 2	Korrelationsfaktor 3	Korrelationsfaktor 4	Korrelationsfaktor 5
ATF1 zu Maximum an Isoamylacetat	0,75	0,52	0,68	0,59	0,68
ATF1 zu Maximum an Ethylacetat	0,70	0,73	0,17	0,69	0,19
ATF2 zu Maximum an Isoamylacetat	0,59	0,34	0,59	0,44	0,63
ATF2 zu Maximum an Ethylacetat	0,21	0,55	0,09	0,67	0,37
IAH1 zu Maximum an Isoamylacetat	-0,51	0,43	-0,52	0,41	-0,58
IAH1 zu Maximum an Ethylacetat	-0,71	0,41	-0,70	0,42	-0,75
BAT1 zu Maximum an höheren Alkoholen	0,26	0,34	0,24	0,38	0,30
PAD1 zu Maximum an 4-Vinylguajakol	-0,24	-0,31	-0,29	-0,29	-0,29

Wie in Tabelle 27 zu sehen ist, ergaben sich bei allen gute oder sehr gute Korrelationen zwischen der ATF1-Expression und der gebildeten Menge an Isoamylacetat. Wie von *Saerens et al.* beschrieben, gab es auch in dieser Studie sehr gute Korrelationen zwischen dem Expressionsmaximum an ATF1 und der gebildeten Menge an Isoamylacetat (*Saerens et al.*, 2008b). Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei der Korrelation zu Ethylacetat. Mit Ausnahme der Korrelationsfaktoren 3 und 5 ergaben sich gute bis sehr gute Korrelationen. Die besten Korrelationen zwischen ATF2 und der gebildeten Menge an Essigsäureestern wiesen die Berechnungen der normalisierten und faktorisierten Form auf (Korrelationsfaktor 5). Ebenfalls ein guter Zusammenhang war bei Korrelationsfaktor 4 (ATF2 und der gebildeten Menge an Ethylacetat) zu erkennen. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zu den übrigen Korrelationen. Ebenfalls gute bis sehr gute Korrelationen waren zwischen der Expression von IAH1 und den Essigsäureestern zu sehen. Hierbei handelte es sich auf Grund des Abbaus jedoch um negative Korrelationen. Auch in diesem Fall lieferte die normalisierte und faktorisierte Form die besten Ergebnisse. Weniger

aussagekräftig waren die Korrelationen zwischen der Expression von BAT1 und der gebildeten Menge an höheren Alkoholen. Hierbei konnten lediglich „bedeutsame“ Korrelationen festgestellt werden. Kein Zusammenhang wurde zwischen der Expression des PAD1-Gens und der produzierten Menge an 4-Vinylguajakol erkennbar. In diesem Fall wurden sogar negative Korrelationen festgestellt.

Bei Betrachtung von Tabelle 27 fällt auf, dass sich für unterschiedliche Aromakomponenten und verschiedene Genexpressionen auch unterschiedliche Korrelationsfaktoren ergeben können, die mehr oder weniger gut geeignet sind. Durchwegs gute Korrelationen fanden sich bei der Verwendung des Expressionsmaximums zur Berechnung. Allerdings konnten, mit Ausnahme der Korrelation zwischen der ATF1-Expression und der produzierten Menge an Ethylacetat, auch mit der normalisierten und faktorisierten Form sehr gute und z.T. bessere Korrelationen gefunden werden. Diese Form der Korrelationsbildung kann demnach eine Alternative zur bisher verwendeten Form sein.

### ***4.2.3 Einfluss von Druck auf die Enzymbildung im Verlauf einer Gärung***

Auch der Einfluss des Drucks während einer Gärung war Gegenstand der Untersuchungen (Messwerte im Anhang Tabelle 42). Vor allem bei der Produktion von Weizenbieren in großen ZKTs herrscht z.T. ein recht hoher statischer Druck auf der Hefe. Um den Druckeinfluss, der in einem höheren ZKT herrscht, zu simulieren, wurde 1 bar Überdruck auf die Gärtanks gegeben. Dies entspricht einem statischen Druck von 10 m Flüssigkeitssäule und somit ungefähr dem mittleren Druck, dem die Hefe in einem 20 m hohen ZKT ausgesetzt ist. Diese Versuchsreihe wurde mit dem Hefestamm TUM 68 durchgeführt.

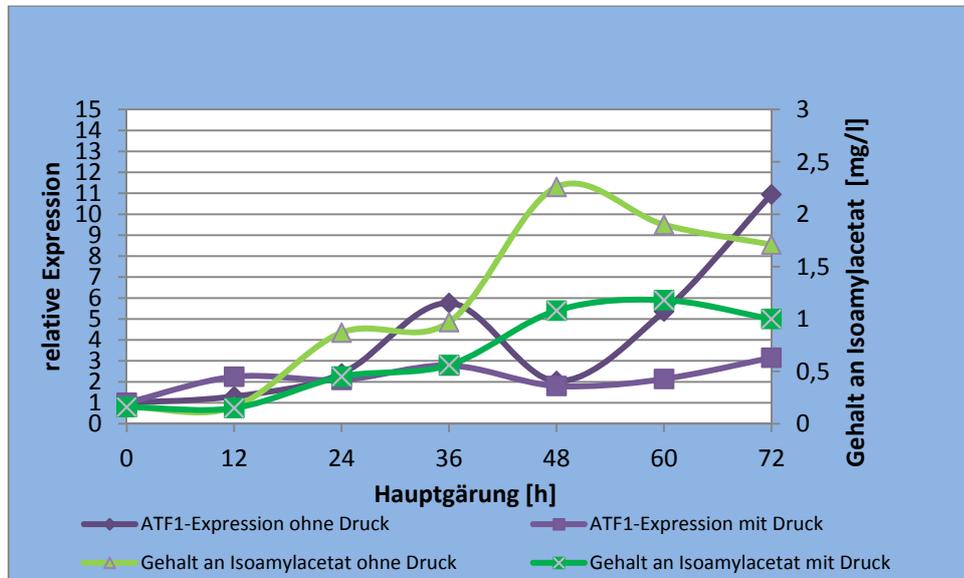


Abbildung 56: ATF1-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung

Abbildung 56 zeigt, dass das ATF1-Gen unter Druck kaum exprimiert wurde, was auch in einem niedrigen Gehalt an Isoamylacetat resultierte. Auch die faktorisierte Darstellung bestätigte diese Ergebnisse (siehe Anhang Abbildung 105). Des Weiteren ist zu sehen, dass die Expressionsrate des ATF1-Gens in der Referenzgärung ohne Druck vom Verlauf der unter 4.2.2 dargestellten Gärungen mit TUM 68 abwich. Begründet liegt diese Tatsache vermutlich in der relativ geringen Anzahl an Probenahmezeitpunkte und der geringfügig variierenden Würze-Zusammensetzung. Auch handelt es sich bei Hefe um einen lebenden Organismus, der bedingt durch technologische Parameter wie die Propagation nicht stets gleich reagiert. Dies zeigte jedoch, dass schon kleine Veränderungen während der Gärung einen Einfluss auf die Genexpressionsmessungen zu haben scheinen. Dennoch gab der direkte Vergleich zwischen den 0 bar und 1 bar $\bar{U}$ -Gärungen unter sonst gleichen Bedingungen Aufschluss über das Enzymbildungsverhalten dieses Hefestammes unter Druck-Bedingungen.

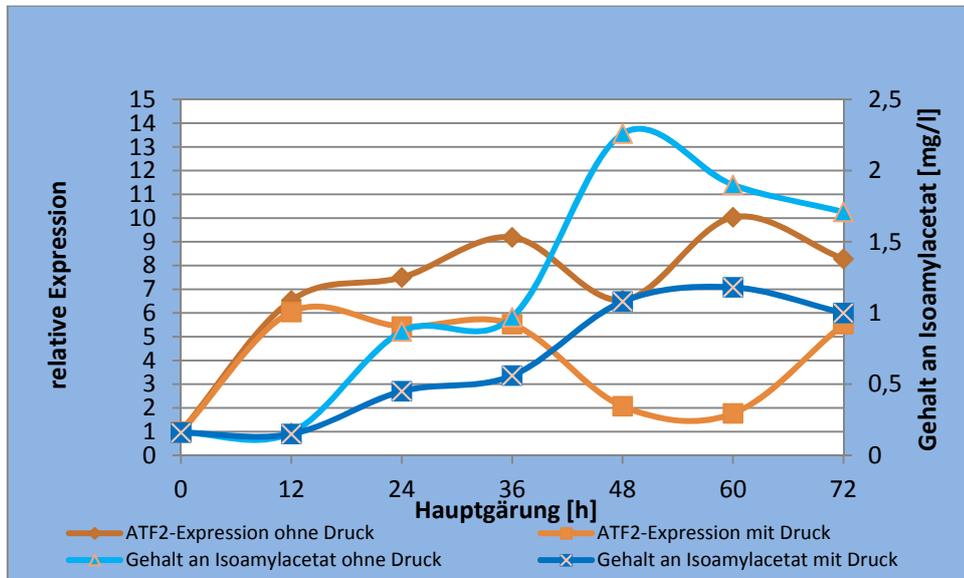


Abbildung 57: ATF2-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung

Der Verlauf der ATF2-Expressionsraten zeigte bis 48 h nach dem Anstellen der Würze einen sehr ähnlichen Verlauf bei beiden Versuchsbedingungen (vgl. Abbildung 57), wengleich das Niveau der Druckgärung deutlich unter dem der Referenzgärung lag. Nach 48 h blieb der Wert der relativen Expression von ATF2 bei der Druckgärung zunächst niedrig, bevor er gegen Gärende wieder anstieg. Das Niveau der Referenzgärung blieb dagegen bis zum Ende der Gärung erhöht. Demnach waren deutliche Unterschiede im ATF2-Expressionsverhalten unter Druck-Verhältnissen zu erkennen. Auch bei der Expression dieses Gens schien der statische Druck bzw. der CO<sub>2</sub>-Partialdruck einen negativen Einfluss auf das Enzym-Bildungsverhalten auszuüben (siehe auch faktorisierte Darstellung in Abbildung 106 im Anhang).

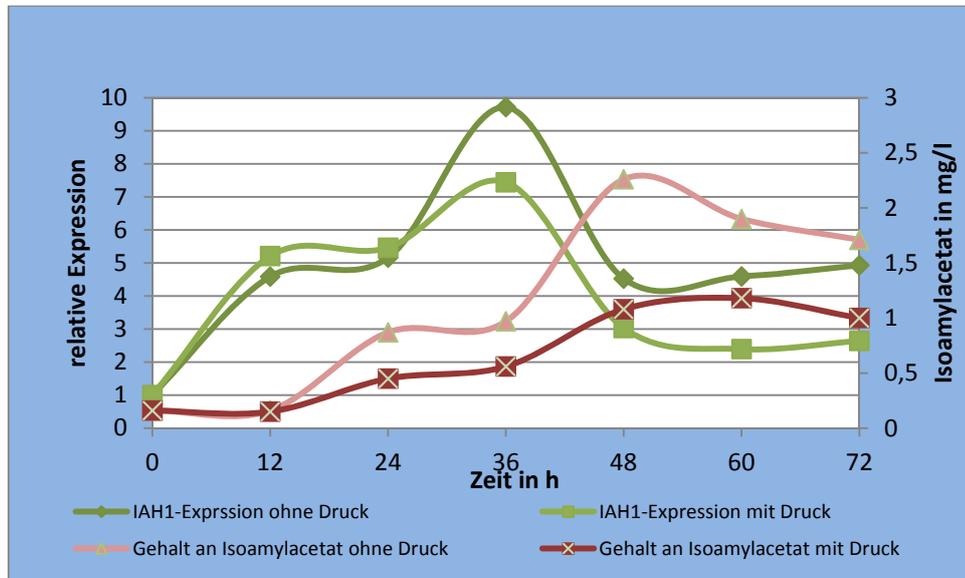


Abbildung 58: IAH1-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung

Das IAH1-Gen wurde unter Druck ähnlich exprimiert wie unter Referenzbedingungen (vgl. Abbildung 58). Lediglich das Niveau der Expressionswerte lag etwas unter dem der Referenz. Die Ergebnisse der faktorisierten Daten wiesen jedoch einen größeren Unterschied auf, bei dem deutlich wird, dass auch die Hydrolyse der Ester unter Druck gehemmt wurde (siehe Anhang Abbildung 107).

Ein unerwartetes Bild zeigte sich in dieser Versuchsreihe bei den höheren Alkoholen. Unter Druck wurden nach beendeter Gärung minimal mehr höhere Alkohole detektiert als bei der atmosphärischen Gärung. Bei Betrachtung des Bildungsverlaufs fiel auf, dass die Maxima in beiden Fällen bereits nach 48 h erreicht wurden und im Anschluss der Gehalt der Alkohole wieder fiel. Dieser Abbau schien unter Druck etwas langsamer vorstatten zu gehen. Auch in diesem Fall konnte bei den faktorisierten Daten ein wesentlich deutlicherer Unterschied in der Expression dieses Gens festgestellt werden. Wie auch bei allen anderen Genexpressionen wurde die Expression des Gens BAT1 unter Druckbedingungen deutlich unterdrückt (siehe Anhang Abbildung 108).

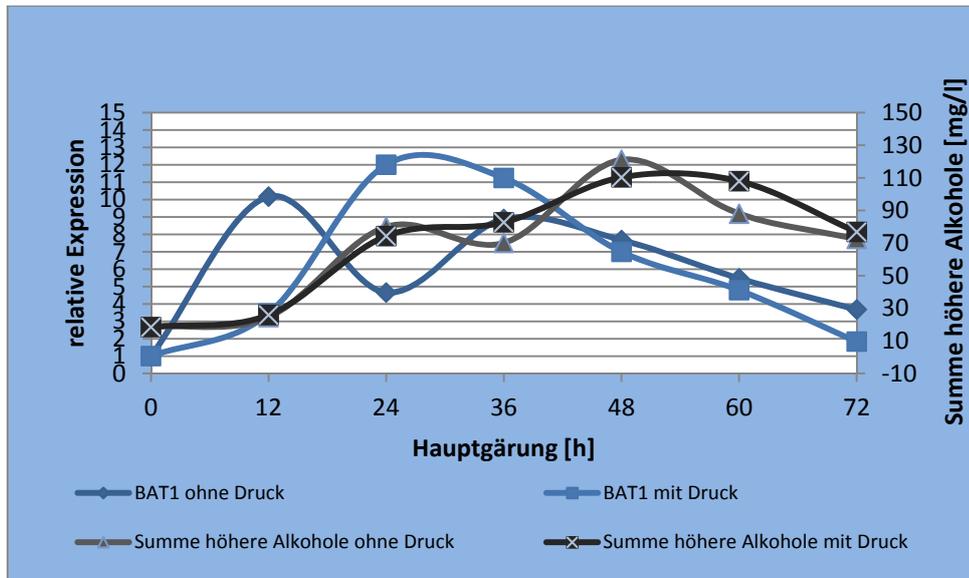


Abbildung 59: BAT1-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu zahlreichen Veröffentlichungen, die von einer Verminderung des Baustoffwechsels der Hefe unter Druck sprechen und somit von einer Verringerung der höheren Alkohole ausgehen (Arcay-Ledezma & Slaughter, 1984; Kruger, 1998; Landaud et al., 2001). Im Gegensatz zu diesen Veröffentlichungen handelt es sich bei TUM 68 jedoch um einen obergärigen Weizenbier-Hefestamm, dessen Verhalten bislang noch nicht untersucht wurde. Eventuell ist es möglich, dass die Bildung von höheren Alkoholen bei Drücken bis zu 1 barÜ in diesem Fall nur geringfügig beeinflusst wurde.

Das PAD1-Gen wurde hingegen unter Druck deutlich stärker exprimiert als unter Standard-Bedingungen, was jedoch zu keiner Erhöhung des 4-Vinylguajakol-Gehalts führte. Im Gegenteil – die Bildung verlief langsam und resultierte in einem sehr geringen Gehalt an 4-VG (vgl. Abbildung 60). Dies ließ wiederum vermuten, dass es noch andere Gene geben muss, die für die Bildung von relevanten Enzymen für die 4-Vinylguajakol-Bildung verantwortlich sind.

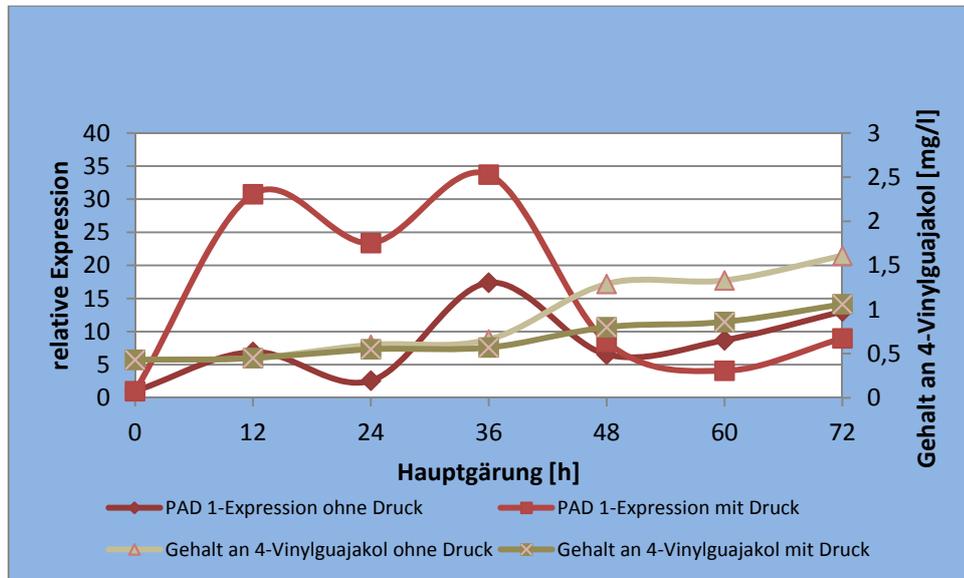


Abbildung 60: PAD1-Expressionen bei druckloser sowie bei Überdruck-Gärung

Wie zu erwarten war, konnte der Hefestamm TUM 68 unter Überdruck-Bedingungen nur wenig Isoamylacetat bilden. Sowohl die Expressionrate des Gens ATF1 als auch die des Gens ATF2 wurden unter Druck-Bedingungen im Vergleich zur Referenzgärung vermindert. Das für die Hydrolyse der Essigsäureester verantwortliche Gen zeigte ebenfalls eine Veränderung im Expressionsverlauf. Im Vergleich zur Referenzgärung wurde auch das IAH1 Gen weniger häufig exprimiert, was sich vor allem in den faktorisierten Darstellungen zeigte (siehe Abbildung 107). Somit ist davon auszugehen, dass die Hydrolyse bei Überdruckbedingungen in einem geringeren Ausmaß vorstättenging. Erstaunlicherweise wurden bei diesen Versuchsgärungen ähnlich viele höhere Alkohole unter Druck-Bedingungen gebildet wie unter atmosphärischen Gegebenheiten. Auch in diesem Fall wurde das BAT1-Gen weniger stark exprimiert. Keine Korrelation konnte dagegen wiederum zwischen der PAD1-Expression und der gebildeten Menge an 4-VG beobachtet werden. Trotz starker Expression unter Druck-Bedingungen lag der Gehalt an 4-VG auf einem sehr niedrigen Niveau.

### 4.3 Verluste an ausgewählten Aromakomponenten durch Ausgasung

Für die Produktion eines esterreichen oder phenolischen Weizenbieres ist es sehr wichtig, die gärungstechnologischen Parameter zu kennen, durch deren Berücksichtigung das gewünschte Aromabild produziert werden kann. Ein weiterer

wichtiger Aspekt, den es während der Produktion zu beachten gilt, sind die Verluste an Aromakomponenten. Diese sollten nach Möglichkeit so gering wie möglich gehalten werden. Eine potentielle Verlustquelle stellt die Ausgasung während der Hauptgärung dar.

Ester sind bekannter Weise flüchtige Komponenten. Während der Gärung wird aus zwei Gramm vergorenem Extrakt ca. ein Gramm CO<sub>2</sub> gebildet. Dies entspricht einem Volumen von ca. 500 ml pro Gramm verbrauchtem Extrakt. In Gärbottichen bzw. zylindrokonischen Gärtanks von bis zu 500 hl Volumen wird demnach ein sehr großes Volumen an CO<sub>2</sub> gebildet, das aus dem Jungbier entweicht. Je nach Geometrie und Konvektionsströmungen im Tank kommt es zu sehr intensiven Umwälzungen des Gärmediums. Diese als „kochend“ bezeichnete Form der Gärung fördert eine intensive Durchmischung des Jungbieres im Tank. Gase und somit auch CO<sub>2</sub> können oftmals als Träger fungieren, um bestimmte Substanzen aus einem flüssigen Medium zu entfernen. Neue Ansätze zur Entalkoholisierung nutzen diesen Effekt bereits. Beim sogenannten Desorptionsverfahren wird Inertgas oder auch Gärungs-CO<sub>2</sub> durch das Bier geleitet. Durch den Konzentrationsunterschied im Alkoholgehalt zwischen Gas- und Flüssigphase kommt es zur Entalkoholisierung. CO<sub>2</sub> nimmt Ethanol aus der Flüssigkeit auf und gibt ihn an die Umgebungsluft ab (Hertel, 2013). Diese Tatsache und auch der Geruch nach fruchtigen Aromen während der Hauptgärung lassen vermuten, dass flüchtige Substanzen in Abhängigkeit von der Gärintensität in größeren Mengen aus dem Bier entweichen. Diese Verluste wurden jedoch bislang nicht untersucht, obwohl es durch technologische Maßnahmen eventuell möglich wäre, sie zu minimieren und wichtige Leitkomponenten besser im Bier zurückzuhalten. Im Folgenden sollen potentielle Verluste der wichtigsten Aromasubstanzen im Verlauf einer Weizenbier-Fermentation dargestellt werden.

### **4.3.1 Simulierung einer offenen Gärung und die damit verbundene Ausgasung mittels CO<sub>2</sub> im Versuchsmedium Wasser**

Im ersten Schritt wurde ein klassisches Verfahren der Weizenbier-Produktion untersucht. Wie vor allem im süddeutschen Raum zu finden, wird das Weizenbier häufig in offenen Gärbottichen produziert. Da zu Beginn des Gärprozesses noch kaum Ester oder andere Aromasubstanzen vorliegen, ist es sehr schwierig, diesen dynamischen Prozess von Aromabildung, -abbau und –ausgasung darzustellen. Auf Grund dessen wurde im 1,5 l-Maßstab eine offene Gärung in einem Becherglas simuliert. Ziel dieser Untersuchungen war es, möglichst einfach die Verluste an den Leitkomponenten Isoamylacetat, Ethylacetat und 4-Vinylguajakol zu ermitteln. Hierfür wurden die Reinsubstanzen in weizenbier-typischen Mengen nach ausreichender Homogenisierung mit dem Gärmedium in den simulierten Gärbottich gegeben und mittels einer Fritte mit definierter Porengröße und definiertem Durchfluss entgast. Es wurde hierfür exakt die Menge an CO<sub>2</sub> durch das Medium befördert, die bei der Produktion von 1,5 l Jungbier mit 12°P produziert worden wäre (300 ml CO<sub>2</sub>/min für eine Dauer von 2 h). Durch die Differenzmessung der Aromakomponenten vor und nach dem Begasen mit CO<sub>2</sub> kann die Menge an Aromastoffen bestimmt werden, die aus dem Wasser verdrängt wurde. Diese Versuchsreihen wurden unter Variation der Gärtemperatur, des pH-Wertes und des Alkoholgehaltes durchgeführt.

Als Medium wurde Wasser statt Würze gewählt, um stets gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Würze beinhaltet zwar keine Ester wie Isoamylacetat und Ethylacetat, allerdings ist bereits eine gewisse Menge an 4-Vinylguajakol (chargenabhängig) in der Würze enthalten. Darüber hinaus ist es schwierig, konstante Verhältnisse mit Würze zu simulieren, da während einer Gärung der Zuckeranteil im Jungbier stetig abnimmt und der Alkoholgehalt bei gleichzeitiger pH-Absenkung zunimmt. In Vorversuchen wurde jedoch der Einfluss der Zuckermoleküle in Würze im Vergleich zu Wasser getestet, da diese den Hauptunterschied zwischen den Medien ausmachen. Hierbei kam es zu keinen signifikanten Unterschieden in den Aromaverlusten unter sonst identischen Bedingungen (Schneiderbanger et al., 2011). Auch *Nahon et al.* sowie *Scheuren* bestätigten den geringen Einfluss von Zuckern auf dieses Verhalten (Nahon, Koren, Roozen, & Posthumus, 1998; Scheuren, 2008).

Als typische Werte wurden dem Medium folgende Konzentrationen an Aromakomponenten zugegeben, die bei jedem Versuch kontrolliert wurden:

40 mg/l Ethylacetat  
5 mg/l Isoamylacetat  
4 mg/l 4-Vinylguajakol

Auf Grund der Dampfdrücke der verschiedenen Leitkomponenten ist zu vermuten, dass Ethylacetat am leichtesten aus dem Medium zu entfernen ist (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Dampfdrücke von Ethylacetat, Isoamylacetat und 4-Vinylguajakol bei 20°C

(Werte von Dortmund Data Bank Software & Separation Technology)

Aromastoff	Dampfdruck bei 20°C
Ethylacetat	97,92 hPa
Isoamylacetat	5,47 hPa
4-Vinylguajakol	0,0076 hPa

Da die Flüchtigkeit einer Substanz jedoch auch von anderen Kriterien wie dem Medium und den Umgebungsparametern abhängig ist, ist eine einfache Prognose auf Grund der Dampfdrücke nicht zu stellen.

### **4.3.1.1 Einfluss von Temperatur auf das Ausgasungsverhalten**

Zunächst erfolgte die Variation der Gärtemperatur. Diese wurde mit Hilfe eines Wasserbades auf 10°C, 15°C, 20°C und 25°C eingestellt und mittels Thermostat konstant gehalten.

Wie Abbildung 61 zeigt, waren bei Isoamylacetat und Ethylacetat mit steigenden Temperaturen höhere Verluste nach der simulierten Gärung zu erkennen. Diese Tatsache erklärt sich durch die steigenden Dampfdrücke der Substanzen bei Temperaturerhöhungen. Auch könnte die Affinität zu CO<sub>2</sub> bei höheren Temperaturen steigen. 4-Vinylguajakol dagegen zeigte keine erhöhte Ausgasung mit steigenden Gärtemperaturen.

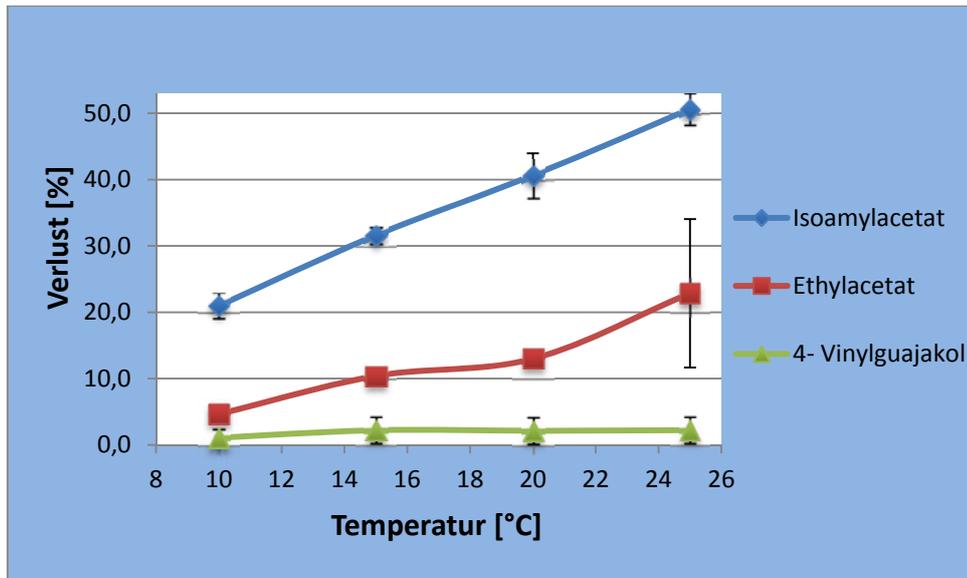


Abbildung 61: Aromaverluste durch Ausgasung unter Variation der Temperatur

Grund hierfür war das allgemein sehr niedrige Niveau der prozentualen Abnahme. Die Verluste an 4-Vinylguajakol betragen selbst bei Temperaturen von 25°C lediglich 2,2 %. Diese Ergebnisse korrelierten sehr gut mit dem niedrigen Dampfdruck von 4-Vinylguajakol. Die Verluste an Ethylacetat dagegen wuchsen mit steigender Temperatur deutlich an. Während nach beendeter simulierter Gärung mit einer Gärtemperatur von 10°C lediglich 4,7 % Ethylacetat verloren gingen, stiegen die Verluste kontinuierlich bis zu einem Maximum bei 25°C von 22,9 % deutlich an. Am flüchtigsten ist der Ester Isoamylacetat. Eine simulierte Gärung von 25°C führte zu einem Verlust von ca. 50 % des Bananenesters. Isoamylacetat war demnach leichter aus der Versuchsflüssigkeit zu verdrängen als die beiden anderen Komponenten. Ein Erklärungsansatz dafür, dass Isoamylacetat trotz niedrigerem Dampfdruck leichter aus dem Medium zu entfernen ist als Ethylacetat, könnte in der Hydrophobizität der Komponenten zu finden sein. Beide Ester sind unpolare Substanzen, d.h. sie sind hydrophob und somit nicht gut in Wasser oder anderen polaren Medien zu lösen. Die Hydrophobizität spielt auch bei Stofftrennprozessen eine große Rolle, wie beispielsweise bei der Schaumfraktionierung (Chen & Parlar, 2013). Die Hydrophobizität wird durch den sogenannten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (LogPow) ausgedrückt. Isoamylacetat hat einen LogPow-Wert von 2,0, während der LogPow für Ethylacetat 0,7 ist (Pubchem, 2010). Diese Werte sagen aus, dass Isoamylacetat hydrophober ist als Ethylacetat und somit

wasserunlöslicher. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass Isoamylacetat leichter aus der Versuchsflüssigkeit zu entfernen war.

Die Gärtemperatur war auf Basis dieser Ergebnisse entscheidend für die Aromaverluste der Essigsäureester durch Ausgasung, vor allem für Isoamylacetat. Für die Produktion eines Weizenbieres mit besonderem Nelkenaroma ist dieser Parameter von keiner Bedeutung, da 4-Vinylguajakol auch bei Gärtemperaturen von 25°C noch nahezu unverändert im Medium enthalten ist.

### 4.3.1.2 Einfluss des pH-Wertes auf das Ausgasungsverhalten

Neben der Temperatur wurde auch der pH-Wert variiert. Da die Gärung von Weizenbieren bei Würze-pH-Werten von ca. 5,4 - 5,6 startet und im weiteren Verlauf auf bis zu ca. pH 4,2 absinkt, könnte sich auch das Ausgasungsverhalten der Aromakomponenten mit dem pH-Wert ändern. Daher wurden die pH-Werte bei isothermer Versuchsdurchführung von 20°C verändert.

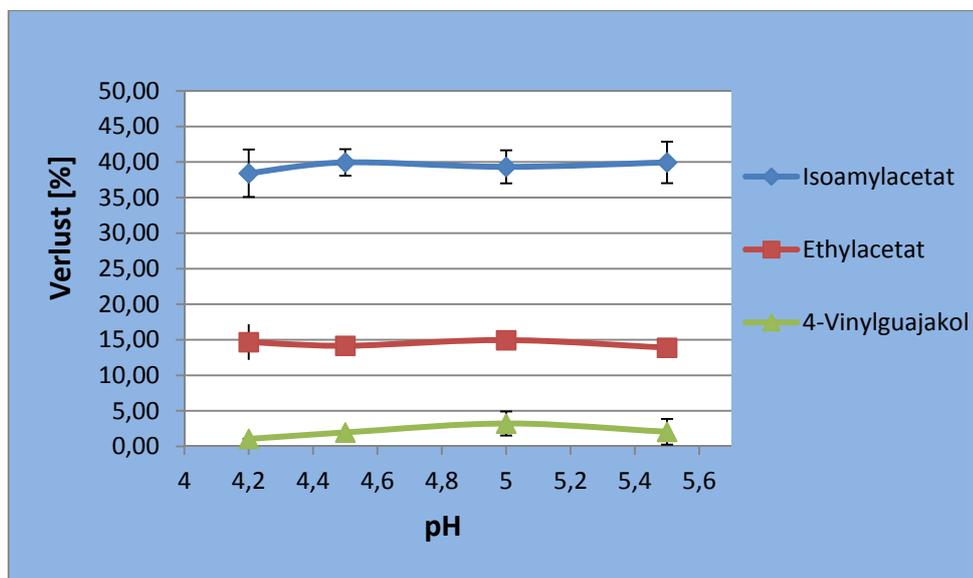


Abbildung 62: Aromaverluste durch Ausgasung unter Variation des pH-Wertes

Wie in Abbildung 62 zu sehen ist, war Isoamylacetat deutlich flüchtiger als Ethylacetat. 4-Vinylguajakol blieb sehr stabil im Medium. Der pH-Wert hatte in den untersuchten Bereichen jedoch keinen Einfluss auf das Ausgasungsverhalten der Aromakomponenten.

#### 4.3.1.3 Einfluss des Alkoholgehaltes auf das Ausgasungsverhalten

Auch der Alkoholgehalt steigt im Verlauf einer Gärung von 0 %Vol. auf ca. 5 %Vol. an. Da ein steigender Ethanolgehalt die Untersuchungsflüssigkeit oder auch das Jungbier etwas unpolarer werden lässt, könnte auch dieser Einfluss auf die Verluste an Aromasubstanzen durch CO<sub>2</sub> haben. Wie auch bei der Variation des pH-Wertes wurde die Versuchstemperatur konstant auf 20°C gehalten.

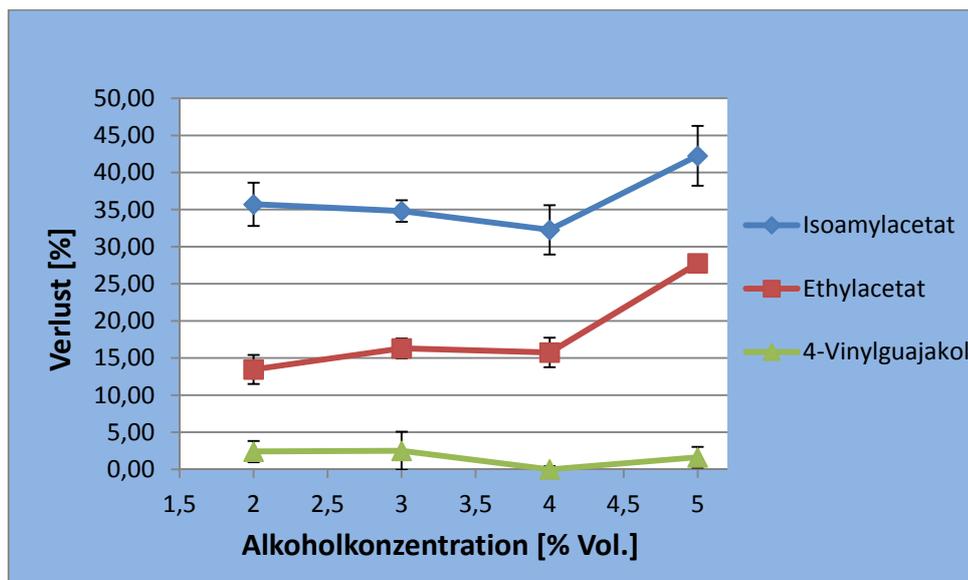


Abbildung 63: Aromaverluste durch Ausgasung unter Variation des Ethanolgehaltes

Aus Abbildung 63 wird ersichtlich, dass die Verluste der verschiedenen Aromakomponenten sehr gut mit den zugehörigen Werten aus Abbildung 62 korrelierten. Der Alkoholgehalt spielte in einem Bereich von 2 bis 4 %Vol. bei keiner der untersuchten Komponenten eine Rolle. Es konnte in diesem Bereich keine Korrelation zwischen dem Alkoholgehalt und dem Aromaverlust gefunden werden. Lediglich ab einem Alkoholgehalt von 5 %Vol. war bei den Estern Isoamylacetat und Ethylacetat ein Anstieg des Aromaaustrags zu erkennen. Der Verlust an 4-Vinylguajakol war wie bei allen anderen Versuchen zu gering, um eine Aussage treffen zu können. Es schien demnach, dass gegen Ende der Gärung, wenn der Alkoholgehalt auf 5 %Vol. ansteigt, der Aromaverlust der Essigsäure-Ester höher wurde. Der Grund für dieses Verhalten ist vermutlich in den Polaritäten dieser Stoffe zu suchen. Sowohl Ethylacetat als auch Isoamylacetat sind unpolare Verbindungen, wohingegen Wasser bzw. Bier als Lösungsmittel sehr polare Fluide sind. Unpolare Verbindungen lassen

sich nicht besonders gut in Wasser lösen. Ethanol ist zwar ebenfalls ein polares Lösungsmittel, ist jedoch etwas unpolarer als Wasser. Es ist daher zu vermuten, dass Ethanol ein besseres Trägermittel ist als Wasser. Durch die Ausgasung mittels CO<sub>2</sub> werden somit Ethanolmoleküle, die mit Aromakomponenten gesättigt sind, aus dem Wasser entfernt. Es kann daher zu einer vermehrten Austreibung dieser Komponenten kommen.

In einer Reihe von Tests konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf einer simulierten alkoholischen Gärung zu einem beträchtlichen Verlust an wichtigen Aromakomponenten kommt. Unabhängig von der Variation der Parameter war der Verlust des Bananenesters Isoamylacetat durchwegs am höchsten. Die Abnahme dieser wichtigen Weizenbier-Komponente schwankte zwischen 22 % bis hin zu über 50 %. Ethylacetat verhielt sich in allen Versuchsreihen ähnlich wie Isoamylacetat, jedoch waren die Verluste stets geringer. 4-Vinylguajakol dagegen wurde unter den getesteten Bedingungen fast nicht durch CO<sub>2</sub> aus der Versuchslösung ausgetrieben. Den größten Einfluss auf das Ausgasungsverhalten hatte der Parameter Temperatur. Je höher die simulierte Gärtemperatur war, desto größer waren die Verluste. Hinsichtlich der Ausgasungsverluste ist es sicher nicht ratsam, eine zu hohe Gärtemperatur zu wählen. Zwar werden bei höheren Gärtemperaturen mehr Essigsäureester gebildet, allerdings steigen auch die Verluste. Die Variation der pH-Werte, die ebenfalls denen aus einer Gärung nachempfunden worden waren, zeigte keine Korrelation zu den Aromaverlusten. Steigende Alkoholgehalte zeigten bis 4 %Vol. ebenfalls keine Korrelation. Ab einem Alkoholgehalt von 5 %Vol. schienen dagegen die Verluste der Essigsäureester zu steigen.

### ***4.3.2 Ermittlung der relativen Flüchtigkeiten ausgewählter Gärungsnebenprodukte in Abhängigkeit von der Temperatur***

Nach der Durchführung der simulierten offenen Gärung sollten den einzelnen Aromakomponenten auch Zahlenwerte für ihre Flüchtigkeit zugeordnet werden können. Die Ermittlung einer relativen Flüchtigkeit dient dazu, eine Aussage über die Flüchtigkeit einer Stoffkomponente aus einem definierten Medium unter einer bestimmten Temperatureinwirkung treffen zu können. Es gibt verschiedene Verfahren, um diese zu ermitteln. Wie bereits in 2.5 diskutiert, liefert die sogenannte Rayleigh-

Destillation eine einfache und gute Möglichkeit zur Detektion der relativen Flüchtigkeit eines Zwei- oder Mehrstoffgemisches. Für diesen Versuch wurde Inertgas durch eine Fritte in eine Gaswaschflasche gefördert, welches daraufhin das fluide Stoffgemisch durchströmte. Dies simuliert einen Siedevorgang, da die Gasblasen die Grenzschicht zwischen Fluid und Gasphase durchtrennen. Vor und nach dem Durchströmen des Gases wurde sowohl das Gewicht als auch die Konzentration auf Basis folgender Formel ermittelt (Hertel, 2006):

**Formel 17:** 
$$K_i^\infty = 1 + \frac{\ln \frac{x_{ie}}{x_{i0}}}{\ln \frac{m_e}{m_0}}$$

Mit  $x_{i0}$  und  $x_{ie}$  wurden die Stoffkonzentrationen vor und nach der Durchströmung des Fluides mit Inertgas bezeichnet. Durch  $m_0$  und  $m_e$  wurde jeweils die Masse vor und nach der Versuchsdurchführung beschrieben. Wie bereits erwähnt, ist diese Art der Bestimmung der relativen Flüchtigkeit nur dann möglich, wenn sich die Aromasubstanz in unendlicher Verdünnung im Medium befindet (somit ist der Verteilungsfaktor in unendlicher Verdünnung  $K_i^\infty$  mit guter Näherung gleich der relativen Flüchtigkeit). Diese Voraussetzung ist für die Konzentrationen an Aromakomponenten, die während der Gärung vorliegen, gegeben.

Die Versuche wurden in einer sehr schlanken Gaswaschflasche durchgeführt, bei der der Flaschendurchmesser dem der Fritte nahe kommt. Somit war die homogene Durchmischung des Mediums mit Gas gewährleistet. Die Gaswaschflasche verfügte über einen schmalen Ausgang an der oberen Seite des Deckels, wodurch das ungewollte Austreten der Versuchsflüssigkeit durch herausspritzende Tropfen vermieden wurde. Zur Vermeidung der Kondensatbildung am Flaschendeckel und damit der Verfälschung der Ergebnisse wurde eine Rotlichtlampe montiert. Als Versuchsmedium wurde auf Grund der bereits diskutierten Vorteile erneut Wasser gewählt, in welches die unterschiedlichen Aromakomponenten in definierter Konzentration gegeben wurden. Der vortemperierten Versuchsflüssigkeit wurden jeweils 10 mg/l der zu untersuchenden Aromakomponente zugegeben und für 60 min bei einem Durchfluss von 100 ml  $N_2$ /min begast. Die Ausnahme bildete der Versuchsaufbau mit 4-Vinylguajakol; hier wurde die Stickstoffmenge wegen der sehr geringen Verlusten an diesem Aromastoff auf einen Durchfluss von 300 ml/min und eine Begasungszeit von 120 min erhöht. Stickstoff wurde als Inertgas gewählt, da sich

bei Vorversuchen mit CO<sub>2</sub> gezeigt hatte, dass der zu ermittelnde Gewichtsverlust kaum wahrnehmbar war. CO<sub>2</sub> wurde vermutlich in Form von Kohlensäure gebunden und führte somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse.

Die Ermittlung der relativen Flüchtigkeiten der für das Weizenbier-Aroma wichtigsten Substanzen bestätigte die Ergebnisse der simulierten offenen Gärung. 4-Vinylguajakol war schwer flüchtig und verblieb nahezu vollständig im Versuchsmedium (vgl. Abbildung 64).

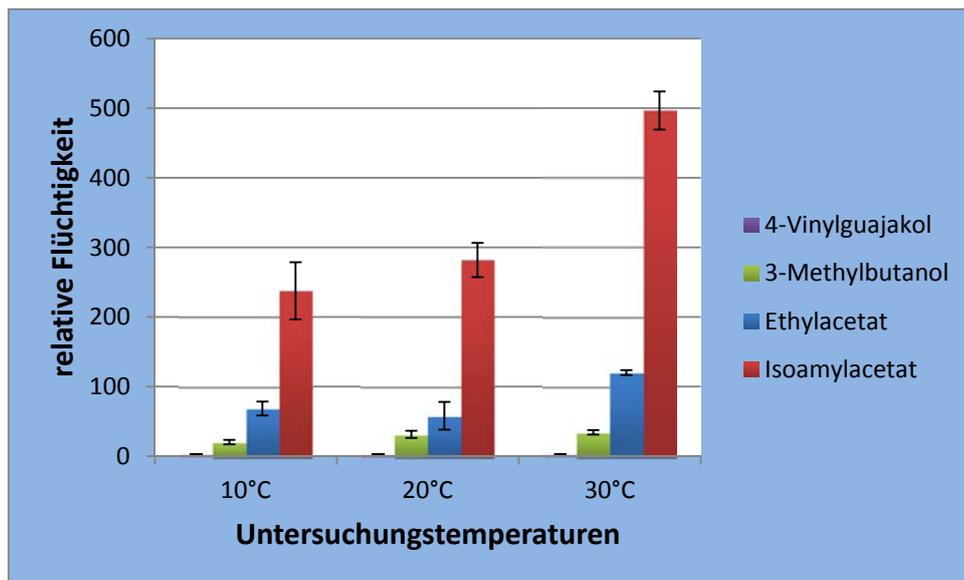


Abbildung 64: Ermittlung der relativen Flüchtigkeit ausgewählter Aromakomponenten

Auch die relative Flüchtigkeit von 3-Methylbutanol, das hier als Repräsentant für die höheren Alkohole diente, war im Vergleich zu den Essigsäureestern eher gering. Ethylacetat und Isoamylacetat verfügten über größere relative Flüchtigkeiten, wobei Isoamylacetat wiederum deutlich flüchtiger war.

In Abbildung 64 ist eine eindeutige Korrelation zwischen der relativen Flüchtigkeit und der Untersuchungstemperatur erkennbar. Die Temperaturprofile wurden im Vorfeld der Untersuchungen so bestimmt, dass mögliche Temperaturbereiche einer Gärung nachgestellt wurden; der Versuchsansatz mit 30°C wurde bewusst hoch gewählt, um Unterschiede in der Flüchtigkeit besser sichtbar zu machen. Die Ergebnisse zeigten somit erneut, dass eine höhere Gärtemperatur zu einem deutlich höheren Verlust an Essigsäureestern führte, und bestätigten die Ergebnisse aus 4.3.1.

Da die relative Flüchtigkeit in unendlicher Verdünnung der absoluten Flüchtigkeit sehr nahe kommen sollte, wurde neben den experimentell ermittelten Werten der relativen

Flüchtigkeit auch die absolute Flüchtigkeit mit Hilfe der Antoine-Gleichung berechnet. Die Daten der benötigten Aktivitätskoeffizienten sowie die Dampfdrücke der Aromakomponenten wurden von der Dortmund Data Bank Software & Separation Technology bezogen.

**Formel 18:** 
$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \gamma_i * P_i^S * P$$

Der Verteilungsfaktor  $K_i$  ist aus dem Produkt aus Aktivitätskoeffizient  $\gamma_i$ , dem Dampfdruck der zu untersuchenden Komponente  $P_i^S$  und dem Umgebungsdruck  $P$  zu ermitteln.

Wie Tabelle 29 zu entnehmen ist, lagen die experimentell ermittelten Werte der relativen Flüchtigkeiten deutlich über den berechneten Werten. Demnach gab es eine Diskrepanz zwischen den beiden Ermittlungswegen. Hierbei ist zu erwähnen, dass eine Berechnungsmethode nicht über die Genauigkeit von experimentellen Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen verfügt. Übereinstimmend ist jedoch die Rangordnung der Flüchtigkeiten. Demnach hat auch nach der berechneten Variante Isoamylacetat die höchste Flüchtigkeit, gefolgt von Ethylacetat, 3-Methylbutanol und 4-Vinylguajakol (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Übersicht über die Messergebnisse zur Bestimmung der relativen Flüchtigkeiten

<b>Ethylacetat</b>			
Mittelwerte	10°C	20°C	30°C
$\Delta x$ [mg/l]	0,3	0,86	1,3
$\Delta L$ [g]	0,25	0,46	0,46
Relative Flüchtigkeit	68,51	58,11	120,07
Absolute Flüchtigkeit	3,64	6,59	11,27
<b>Isoamylacetat</b>			
Mittelwerte	10°C	20°C	30°C
$\Delta x$ [mg/l]	1,1	2,2	3,7
$\Delta L$ [g]	0,24	0,4	0,48
Relative Flüchtigkeit	237,7	281,84	496,68
Absolute Flüchtigkeit	5,43	11,13	21,11
<b>3-Methylbutanol</b>			
Mittelwerte	10°C	20°C	30°C
$\Delta x$ [mg/l]	0,1	0,33	0,4
$\Delta L$ [g]	0,28	0,4	0,48
Relative Flüchtigkeit	20,33	31,42	34,31
Absolute Flüchtigkeit	0,13	0,34	0,76
<b>4-Vinylguajakol</b>			
Mittelwerte	10°C	20°C	30°C
$\Delta x$ [mg/l]	0,1	0,1	0,2
$\Delta L$ [g]	3,7	4,83	6,39
Relative Flüchtigkeit	2,76	2,36	2,69
Absolute Flüchtigkeit	$1,28 \cdot 10^{-3}$	$4,44 \cdot 10^{-3}$	$13,9 \cdot 10^{-3}$

Für die Weizenbier-Gärung bedeuten die Ergebnisse, dass die wichtigen Essigsäureester am leichtesten aus dem Jungbier entweichen, gefolgt von den höheren Alkoholen und 4-Vinylguajakol, wobei Isoamylacetat deutlich früher und prozentual in größeren Mengen entweicht. Je nach gewünschtem Geschmacksprofil des Bieres gilt es, diese Erkenntnisse zu berücksichtigen.

### 4.3.3 Verluste wichtiger Aromakomponenten während des Trinkvorgangs

Nachdem gezeigt werden konnte, dass vor allem Essigsäureester sehr flüchtige Substanzen sind, sollte sich auch mit der Zeit die Sensorik im Glas ändern. Von Verkostungen ist bekannt, dass sich vor allem das orthonasal wahrnehmbare Aroma einer ausgeprägten Hopfenblume bei Pils-Bieren nach einer gewissen Zeit verflüchtigt. Gleiches gilt für das bananige Aroma bei Weizenbieren. Um diese Verluste messbar zu machen, wurden drei Flaschen Weizenbier aus der gleichen Abfüllung in drei identische, handelsübliche Weizenbier-Gläser überführt. Direkt nach dem Befüllvorgang wurde eine Probe aus dem Glas zur Analyse entnommen. Die Biere wurden im Anschluss an die Probenahme 40 min stehen gelassen und erneut analysiert. Gleiches Verfahren wurde nach einer Stunde angewandt. Parallel dazu wurden Biere auf einen Horizontalschüttler gegeben, der die Biergläser definiert schwenkte.

Tabelle 30: Verluste an Aromakomponenten im Weizenglas

Verluste	Probe	Ethylacetat [mg/l]	Isobutanol [mg/l]	Isoamylacetat [mg/l]	Amylalkohole [mg/l]	4-Vinylguajakol [mg/l]	4-Vinylphenol [mg/l]
nach 40 min	Mittelwert	3,03	-0,67	0,50	1,53	0,03	0,00
nach 60 min	Mittelwert	5,92	0,10	0,67	1,81	-0,25	-0,14
60 min geschwenkt	Mittelwert	13,20	-0,50	1,19	1,86	-0,03	-0,04
Verluste	Probe	Ethylacetat [mg/l]	Isobutanol [mg/l]	Isoamylacetat [mg/l]	Amylalkohole [mg/l]	4-Vinylguajakol [mg/l]	4-Vinylphenol [mg/l]
nach 40 min im Glas	Mittelwert	6,14	-2,42	17,19	3,06	0,82	0,20
nach 60 min im Glas	Mittelwert	12,01	0,36	23,07	3,61	-7,67	-8,27
60 min geschwenkt	Mittelwert	26,75	-1,81	41,06	3,72	-0,82	-2,17

Aus Tabelle 30 wird ersichtlich, dass auch aus dem Weizenbierglas nach einer gewissen Zeit die Essigsäureester verloren gingen. Auch hier bestätigte sich, dass Isoamylacetat die flüchtigste Komponente ist. Höhere Alkohole und 4-Vinylguajakol entwichen bei längerer Standzeit kaum aus dem Glas. Das Aromaprofil eines fruchtig-bananigen Weizenbieres änderte sich demnach mit der Zeit und stärker unter Bewegungseinfluss. Das Bieraroma divergierte zu Gunsten des nelkenartigen Aromaeindrucks.

### **4.4 Einfluss der Reifung auf die Aromabildung im Weizenbier**

#### **4.4.1 Einfluss des Hefestammes**

Wie in 4.1 bereits dargestellt, kann die Wahl des Hefestammes für die Hauptgärung einen großen Einfluss auf das Aromabild des Weizenbieres haben. Nach der Hauptgärung erfolgt bei der Weizenbierherstellung die Reifungsphase. Es gibt unterschiedliche Varianten, um das Aroma abzurunden und unerwünschte Jungbukettstoffe wie z.B. Diacetyl abzubauen. Zum einen kann Weizenbier mit Restextrakt in den Lagertank geschlaucht werden, zum anderen kann es endvergoren werden, wobei der Hefe für die Reifung neue Nährstoffe in Form von Würze oder Kräusen zur Verfügung gestellt werden müssen (Aufspeisen). Die Reifung durch Aufspeisen kann sowohl in Tanks als auch in der Flasche erfolgen. Diese unterschiedlichen Reifungsvarianten ändern ebenfalls das Aromaprofil eines Weizenbieres (Narziß, 2005). Die Form der Extraktzugabe, ob mit oder ohne Speisegabe, spielt nach *Back* und nach *Herrmann* keine entscheidende Rolle. Allerdings scheint es von Bedeutung zu sein, ob die Nachgärung in der Flasche oder im Lagertank stattfindet. Biere, die mit Flaschenreifung hergestellt wurden, sind laut *Back* sensorisch wie auch analytisch besser zu beurteilen (Back, 1998, 2005). Auch *Herrmann* konnte zeigen, dass der Gehalt an Estern nach einer Flaschengärung etwas höher liegt als der von tankgereiften Bieren (Herrmann, 2005b).

Da bislang nicht bekannt ist, welchen Einfluss die Wahl des Hefestammes auf die Reifung von Weizenbieren hat, war es zum einen Ziel der folgenden Untersuchungen, den Einfluss verschiedener Hefestämme auf das Aromaprofil nach der Reifung zu testen, zum anderen, die Auswirkungen unterschiedlicher Speisetzungen auf die Bildung wichtiger Aromakomponenten zu untersuchen. Hierfür wurde Kristallweizenbier in Tanks geschlaucht und bei 20°C für 6 Tage gereift. Im Anschluss fand eine Kaltreifephase von 14 Tagen bei 10°C statt. Die Verwendung von Kristallweizenbier bietet den Vorteil, dass eine definierte Menge Hefe von 1 Mio. Zellen/ml zugegeben werden kann und eine Extraktzugabe von genau 1°P für standardisierte Bedingungen sorgt. Um die Reifung in einem ZKT von ca. 12 m Höhe zu simulieren, wurde die Nachgärung mit einem Überdruck von 0,6 bar durchgeführt. Insgesamt kamen in diesen Versuchsreihen drei unterschiedliche, identisch

propagierte Hefestämme zum Einsatz: TUM 68, TUM 127 und TUM 505.

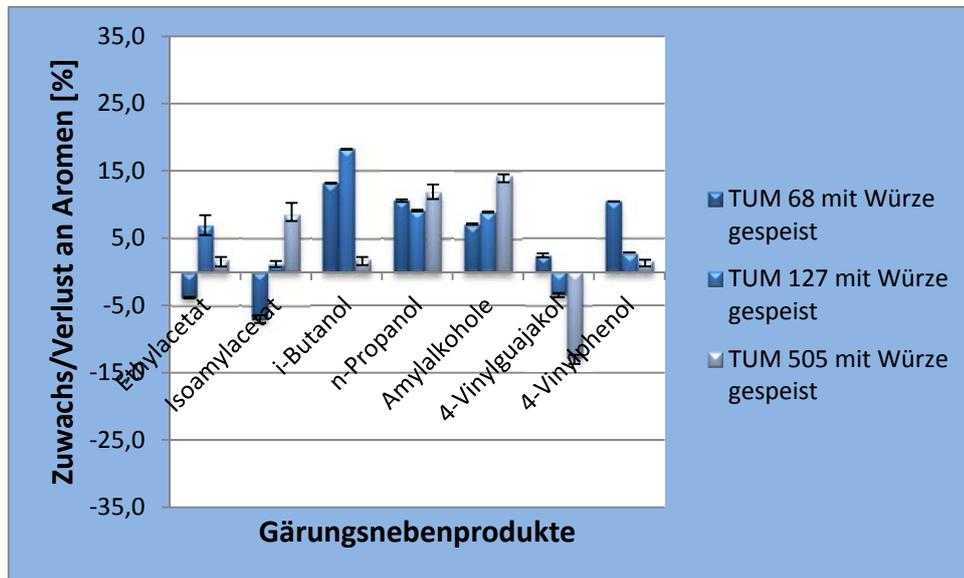


Abbildung 65: Aromadifferenzen vor und nach einer Tankreifung mit drei unterschiedlichen Hefestämmen in Prozent

Abbildung 65 zeigt, dass die drei Hefestämme unter identischen Bedingungen nach der Reifungsphase unterschiedliche Aromastoffe bildeten. Übereinstimmend war eine Erhöhung der höheren Alkohole und des 4-Vinylphenols zu beobachten. Die Konzentrationen der Weizenbier-Leitkomponenten verhielten sich dagegen je nach Hefestamm anders. Während der Gehalt an Ethylacetat bei TUM 68 nach der Reifung zurückging, stieg er bei TUM 127 und TUM 505 leicht an. Die gleiche Entwicklung war bei Isoamylacetat zu beobachten. Die Zu- bzw. Abnahmen der Ester betrug jedoch kaum mehr als 5 %, was auf das Aroma keinen großen Einfluss hatte. Erstaunlicherweise sank der Gehalt an 4-Vinylguajakol trotz erneuter Zugabe von Ferulasäure (durch die Zugabe von Würze) bei der Reifung mit TUM 127 und TUM 505, während er durch die Verwendung von TUM 68 leicht anstieg. Es scheint demnach, dass die Verdünnung durch die Zugabe von Würze größer war als die Neubildung an 4-VG durch die Hefestämme TUM 505 und TUM 127.

An Hand dieser Untersuchungen lässt sich erkennen, dass die Hefestämme z.T. unterschiedliche Verhaltensweisen während der Reifung an den Tag legen. Vor allem der relativ niedrige Gehalt an 4-VG nach der Flaschenreifung mit TUM 505 war überraschend. Ein konträres Bild zeigte sich bei der Bildung der Essigsäureester

Isoamylacetat und Ethylacetat nach der Reifungsphase. Sowohl TUM 505 als auch TUM 127 konnten den Gehalt an diesen Estern im Bier nach der Reifung etwas steigern, während im Versuchsansatz mit TUM 68 weniger dieser Aromakomponenten enthalten waren. Die Untersuchungsergebnisse der mit Hefestamm TUM 68 gereiften Biere bestätigten somit die Untersuchungen von *Back*, nach denen eine Reifung in zylindrokönischen Lagertanks zu keiner Verbesserung des Bieraromas führt (*Back*, 1998). Nach diesen Untersuchungen ist eine allgemeingültige Aussage über Aroma-Auf- und -Abbau nicht möglich, da die Hefestämme unter identischen Bedingungen unterschiedliches Verhalten an den Tag legten. Hefestammübergreifend konnte jedoch festgestellt werden, dass sich das Aromaprofil in Bezug auf die Leitkomponenten Isoamylacetat, Ethylacetat und 4-Vinylguajakol nicht mehr entscheidend änderte. Die größten Differenzen zum „Jungbier“ lagen bei ca. 10 % (entspricht ca. 0,3 mg/l 4-Vinylguajakol, siehe Anhang Tabelle 47). Die Entscheidung über den Weizenbier-Charakter fällt demnach bereits während der Hauptgärung, sodass ein ausgeprägtes Bananenaroma allein durch die Reifung nicht mehr entstehen kann.

### **4.4.2 Einfluss der Speisegabe**

Gemäß dem deutschen Reinheitsgebot ist es in Bayern nur möglich, Speise in Form von Würze oder Kräusen für die Reifung zu verwenden. Außerhalb dieser Regionen und im Ausland können auch andere Nährstoffquellen zum Einsatz kommen. Bereits 1972 konnte *Engan* zeigen, dass eine erhöhte Menge an Glucose zu einer erhöhten Bildungsrate an Isoamylacetat, Ethylestern und höheren Alkoholen führt (*Engan*, 1972). Auch *Stewart* bestätigte diese Ergebnisse im Jahr 1999 (*Stewart*, 1999). Da es aus wirtschaftlichen Gründen wenig Sinn macht, die Hauptgärung mit Glucose durchzuführen, ist es interessant, den Gehalt an Estern durch Verwendung von Zucker in der Reifungsphase zu forcieren. Es ist somit denkbar, ein ausgeprägteres Bananenaroma durch die Zugabe von Glucose bei der Reifung zu erreichen. Aus diesem Grund wurden unter den gleichen Bedingungen wie in 4.4.1 beschrieben, Reifungen mit Würze, Glucose und reiner Maltose durchgeführt. Als Hefestamm für diese Versuchsreihe wurde wiederum TUM 68 verwendet.

Die Ergebnisse zeigten, dass im Vergleich zur herkömmlichen Würzegabe deutliche Anstiege nahezu aller Gärungsnebenprodukte durch die Verwendung von Zucker zu erzielen waren. Lediglich der Gehalt an 4-VG blieb, wie zu erwarten war, auf gleichem Niveau. Allerdings war die Menge an 4-VG durch die Zuckerzugabe nicht deutlich geringer als durch die Zugabe von Würze. Es scheint demnach so, als wäre die Hefe erneut nicht in der Lage gewesen, während der Reifungsphase die zugeführte Ferulasäure zu verwerten. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in weiteren Versuchen mit Trockenhefestämmen bei Flaschengärungen (siehe Anhang Abbildung 110).

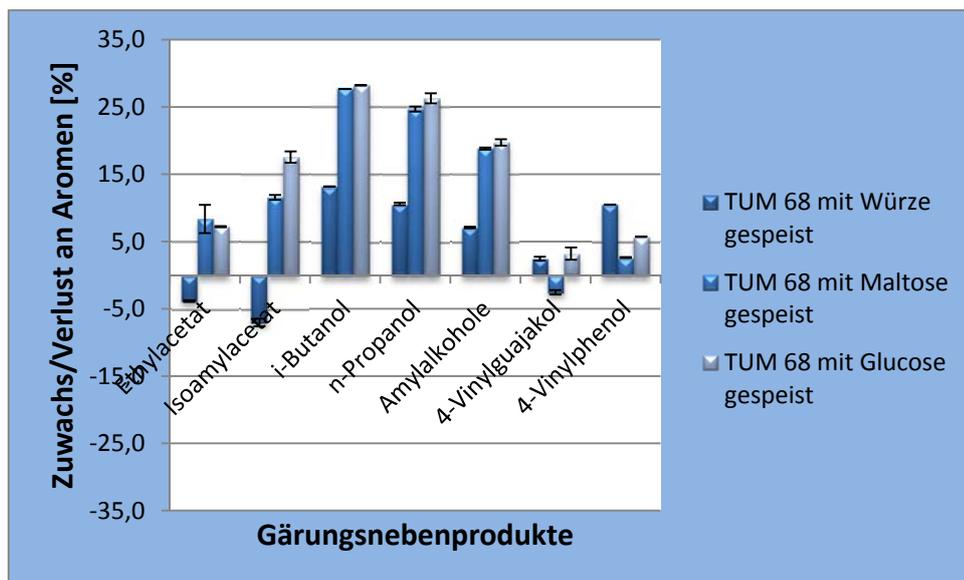


Abbildung 66: Aromadifferenzen vor und nach einer Tankreifung mit Würze, Glucose und Maltose als Speise-Zugabe

In Abbildung 66 ist darüber hinaus zu erkennen, dass die Konzentrationen an höheren Alkoholen durch die Zugabe sowohl von Glucose, aber auch von Maltose um ca. 10 % anstiegen, was die Ergebnisse von *Engan* bestätigte. Es war ebenfalls eine Erhöhung der Gehalte an Ethylacetat und Isoamylacetat durch die Zugabe von Glucose erkennbar. Diese stiegen im Vergleich zum Jungbier um bis zu 17 % an. Einen ähnlichen Effekt zeigte auch die Zugabe von reiner Maltose, wenngleich weniger Isoamylacetat durch die Zugabe dieses Zuckers gebildet wurde. Dies bestätigte ebenfalls die Untersuchungen von *Stewart*, der eine höhere Bildungsrate an Essigsäureestern durch höhere Konzentrationen an Glucose und Fructose im Vergleich zu Maltose erkennen konnte (*Stewart*, 1999). Über die Gründe für die Steigerung dieser Gärungsnebenprodukte kann nur gemutmaßt werden. Die genauen

Zusammenhänge und Gründe für die unterschiedliche Bildung an Estern bei verschiedenen Zuckerspektren sind, wie bereits erwähnt, bislang noch unklar. Möglich ist, dass durch Glucose im Vergleich zu Maltose größere Mengen an Acetyl-CoA gebildet werden, welche wiederum verestert werden können (Shindo, 1992). Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass eine vermehrte Bildung an Fuselalkoholen die Ester-Bildung ebenfalls forcieren könnte. Darüber hinaus besteht laut *Verstrepen* auch die Möglichkeit, dass die Expression der Gene ATF1 und ATF2 durch Glucose verstärkt wird (Verstrepen, 2003a).

### 4.4.3 Einfluss von Tank- oder Flaschengärung

Neben dem Einfluss des Hefestammes und der Speiseart wurde auch der Unterschied zwischen Tank- und Flaschengärung (eigentlich Reifung) untersucht. Hierbei wurden parallel zu den in 4.4.1 beschriebenen Untersuchungen Flaschengärungen mit dem identischen Jungbier und den gleichen Hefen durchgeführt. Die Temperaturprofile waren ebenfalls identisch mit denen der Tankgärungen. Die Resultate der Flaschengärung im Vergleich zu Abbildung 65 zeigten folgende Ergebnisse (Abbildung 67):

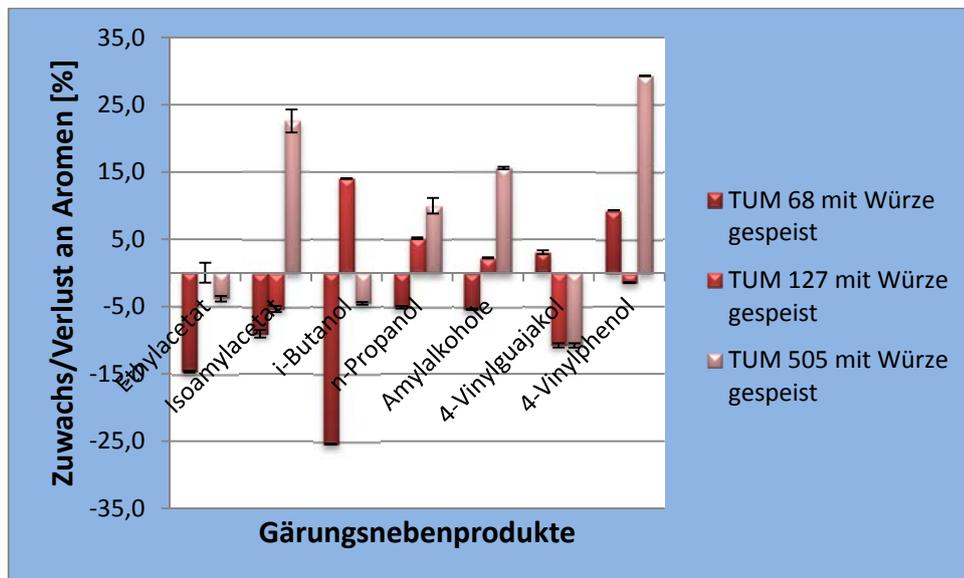


Abbildung 67: Aromadifferenzen vor und nach einer Flaschenreifung mit drei unterschiedlichen Hefestämmen in Prozent

Im Vergleich zu den Tankgärungen zeigten sich bei den drei Hefestämmen folgende Unterschiede:

### **TUM68**

Tabelle 31: Vergleich der Konzentrationen an Gärungsnebenprodukten nach Tank- und Flaschenreifung mit TUM 68

Gärungsnebenprodukt	Konzentration nach Tankgärung [mg/l]	Konzentration nach Flaschengärung [mg/l]	Vergleich zur Tankgärung [mg/l]
Ethylacetat	33,9	30,12	-3,78
Isoamylacetat	1,9	1,81	-0,09
i-Butanol	26,1	17,2	-8,9
n-Propanol	16,1	13,78	-2,4
Amylalkohole	47,7	42,16	5,54
4-Vinylguajakol	2,7	2,68	-0,02
4-Vinylphenol	1,5	1,53	+0,03

Bei Betrachtung von Tabelle 31 fällt auf, dass die Konzentrationen an höheren Alkoholen und Estern nach der Flaschenreifung mit TUM 68 etwas niedriger waren als die Vergleichswerte nach der Tankreifung. Lediglich die Gehalte an 4-Vinylguajakol und 4-Vinylphenol waren identisch. Demnach brachte die Flaschengärung unter den Bedingungen dieser Arbeit nicht mehr Aromakomponenten wie Isoamylacetat oder Ethylacetat in das Bier. Im Vergleich zum Jungbier waren sogar geringfügig weniger Ester vorhanden (siehe Anhang Tabelle 47).

**TUM127:**

Tabelle 32: Vergleich der Konzentrationen an Gärungsnebenprodukten nach Tank- und Flaschenreifung mit TUM 127

Gärungsnebenprodukt	Konzentration nach Tankgärung [mg/l]	Konzentration nach Flaschengärung [mg/l]	Vergleich zur Tankgärung [mg/l]
Ethylacetat	37,7	35,31	-2,39
Isoamylacetat	2,1	1,94	-0,16
i-Butanol	27,3	26,3	-1,0
n-Propanol	15,8	15,27	-0,53
Amylalkohole	48,5	45,55	-2,95
4-Vinylguajakol	2,5	2,22	-0,28
4-Vinylphenol	1,4	1,38	-0,02

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Verwendung von TUM 127 nach der Reifung in der Flasche. Auch hier waren tendenziell weniger Essigsäureester und höhere Alkohole nach der Flaschengärung vorhanden als nach der Tankgärung. Es ist allerdings zu erwähnen dass die Unterschiede, wie Tabelle 32 zu entnehmen ist, sehr gering waren.

**TUM 505:**

Tabelle 33: Vergleich der Konzentrationen an Gärungsnebenprodukten nach Tank- und Flaschenreifung mit TUM 505

Gärungsnebenprodukt	Konzentration nach Tankgärung [mg/l]	Konzentration nach Flaschengärung [mg/l]	Vergleich zur Tankgärung [mg/l]
Ethylacetat	35,9	33,94	-1,96
Isoamylacetat	2,2	2,51	+0,31
i-Butanol	23,5	22,02	1,03
n-Propanol	16,2	15,97	0,23
Amylalkohole	50,9	51,51	+0,61
4-Vinylguajakol	2,30	2,32	+0,02
4-Vinylphenol	1,4	1,81	0,41

Andere Ergebnisse lieferte die Reifung mit TUM 505. Auch hier lagen die Niveaus von Ethylacetat, i-Butanol und n-Propanol niedriger, allerdings waren vor allem die Gehalte an Isoamylacetat und 4-Vinylphenol höher. Auch die Konzentration an Amylalkoholen

lag geringfügig über den Vergleichswerten der Tankreifungen. Bei Betrachtung der Konzentrationen fiel auf, dass die Unterschiede jedoch zumeist gering waren (vgl. Tabelle 33).

Die Unterschiede zwischen Tank- und Flaschenreifungen waren allgemein bei allen betrachteten Hefestämmen nicht sehr groß. Die Ergebnisse von *Back* und *Herrmann* konnten jedoch nicht bestätigt werden (Back, 2005; Herrmann, 2005b). In den dargestellten Untersuchungen waren zumeist nach der Flaschenreifung geringfügig niedrigere Konzentrationen an Essigsäureestern und höheren Alkoholen zu erkennen als bei den Vergleichsgärungen im Tank. Der Gehalt an 4-VG war abhängig vom Hefestamm höher oder niedriger gelegen als der Vergleichswert aus der Tankreifung. Wie die Ergebnisse jedoch auch zeigten, schien die Aromastoffbildung während der Reifung ebenfalls hefestamm-abhängig zu sein, da z.B. der Gehalt an Isoamylacetat unter Verwendung des Hefestammes TUM 505 im Gegensatz zu den anderen Ergebnissen nach der Flaschenreifung höher lag. Gründe, weshalb in einer Flasche unter ähnlichen Druckverhältnissen und CO<sub>2</sub>-Partialdrücken unter sonst identischen Bedingungen mehr Aromakomponenten gebildet werden, sind aus momentaner Sicht der wissenschaftlichen Erkenntnisse nur schwer zu formulieren.

Auch die sensorischen Bewertungen nach DLG-Schema zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Tank- und Flaschenreifung, wie Tabelle 34 zeigt.

Tabelle 34: Verkostungsergebnisse von tank- und flaschengereiften Weizenbieren

Hefestamm	DLG-Gesamtnote- Flasche	DLG-Gesamtnote- Tank
TUM 68	4,38	4,43
TUM 127	4,48	4,40
TUM 505	4,48	4,38

Demnach gibt es keine eindeutigen Unterschiede zwischen Tank- und Flaschenreifung hinsichtlich des Aromaprofils eines Weizenbieres. Während die mit TUM 127 und TUM 505 flaschengereiften Biere besser abschnitten als ihre Pendanten aus der Tankreifung, zeigten die Verkostungsergebnisse unter Verwendung von TUM 68 ein konträres Bild. In diesem Fall schnitt das tankgereifte Bier sensorisch besser ab. Auf Basis dieser Untersuchungen ist zu vermuten, dass der verwendete Hefestamm während der Reifung mehr Einfluss auf das Aromabild des Weizenbieres hat als die Wahl des Reifungsgefäßes.

## **4.5 Einfluss eines Kurzzeiterhitzers auf das Bieraroma**

### **4.5.1 Einfluss auf das Aromaprofil des Bieres**

In vielen Brauereien wird die Kurzzeiterhitzung (KZE) zur Verbesserung der mikrobiologischen oder der Trübungsstabilität im Weizenbier eingesetzt. Durch die Vergrößerung von feinen Eiweißpartikeln entsteht im Weizenbier eine stabilere und für dieses Produkt erstrebenswerte Dauertrübung. Die Einflüsse dieser thermischen Behandlung auf wichtige Aromakomponenten bzw. auf die sensorische Stabilität von Weizenbier sind bislang jedoch weitestgehend unbekannt. In einer Studie in Zusammenarbeit mit verschiedenen Brauereien wurden diese Einflüsse untersucht. Hierfür wurden Biere zunächst im Labormaßstab und im Anschluss in mehreren Brauereien mit unterschiedlichen Pasteureinheiten (PE) behandelt. Eine Pasteureinheit ist definiert als eine Heißhaltezeit von einer Minute bei 60°C und errechnet sich für CO<sub>2</sub>-haltige Getränke wie Bier wie folgt:

**Formel 19:** 
$$PE = \text{Zeit} \times 1,393^{(\text{Temperatur im Erhitzer} - 60^\circ\text{C})}$$

(Back, 1999)

Im Fokus der Untersuchungen standen die beiden Essigsäureester Isoamylacetat und Ethylacetat sowie 4-VG und die Entwicklung von wärmebedingten Alterungsindikatoren. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung im Labormaßstab war es auf Grund einer defekten HPLC-Anlage nicht möglich, den Gehalt an 4-Vinylguajakol zu bestimmen. Dieser wurde jedoch im Großmaßstab bestimmt.

Über den Einfluss einer KZE auf die Aromakomponenten im Weizenbier ist bisher wenig bekannt. Neben *Herrmann*, der im Rahmen seiner Dissertation herausfand, dass der Einsatz einer KZE zu einer Verringerung des Abbaus positiver Aromastoffe und zu einer geringeren Ausprägung der Autolyseerscheinungen im Weizenbier führt, haben sich bisher wenige mit diesem Thema auseinandergesetzt (*Herrmann*, 2005b). Es ist jedoch von untergärigen Bieren bekannt, dass die Temperatur in Verbindung mit der Heißhaltezeit über eine mögliche Produktschädigung entscheidet. So gelten lange Hitzebehandlungen bei niedrigeren Temperaturen als produktschädlicher als kurze Einwirkzeiten bei hohen Temperaturen (*Lustig*, 1994; *Wackerbauer & Zufall*, 1997).

Ziel dieser Studie war es, einen möglichen Abbau an Leitkomponenten sowie einen Anstieg der Wärmeindikatoren zu detektieren. In Kleinversuchen wurden Bierproben in Rollrand-GC-Flaschen in einem Wasserbad erhitzt und somit der Einfluss einer KZE simuliert. In den Scale-up-Versuchen wurden jeweils drei gleiche Chargen eines Weizenbiertyps untersucht (mit einer Hefezellzahl von 1 Mio. Zellen/ml), die mit 150 Pasteureinheiten (PE) und 300 PE mittels KZE behandelt und mit einem Referenzbier verglichen wurden (identisches Bier vor der KZE). Die Verdopplung der PE wurde durch Halbierung der Durchflussgeschwindigkeit bei gleichbleibender Temperatur erreicht. Alle Biere wurden sensorisch von geschulten Verkostern bewertet. Im Folgenden werden exemplarisch die wichtigsten Erkenntnisse aus diesen Versuchsreihen dargestellt (weitere Ergebnisse siehe Anhang Tabelle 48-50). In den nachfolgenden Grafiken sind die Konzentrationen an Aromakomponenten in Prozent angegeben, bezogen auf den Gehalt der jeweiligen Komponente im Referenzbier (100 %).

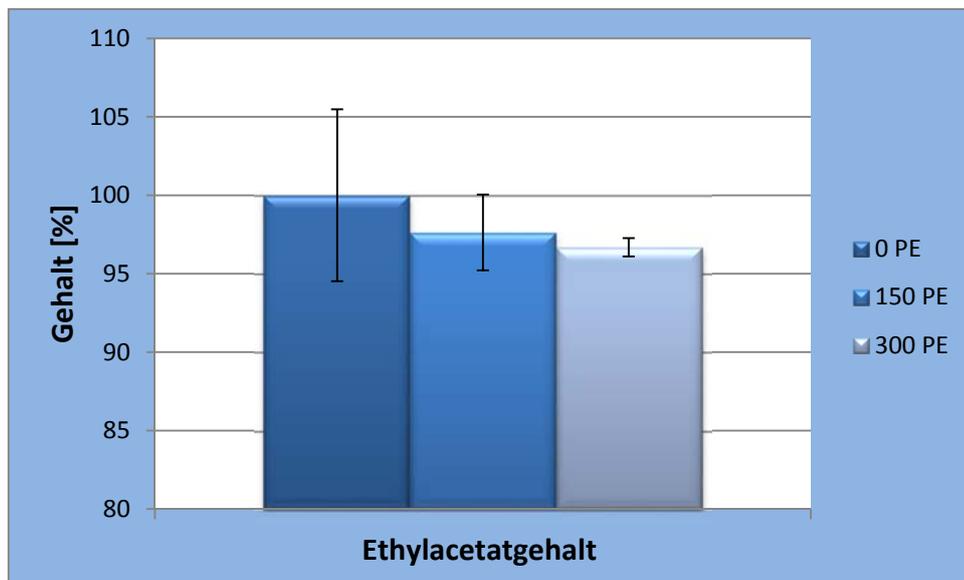


Abbildung 68: Einfluss einer KZE auf den Ethylacetatgehalt im Kleinmaßstab

Wie in Abbildung 68 zu erkennen ist, nahm der Gehalt an Ethylacetat mit steigenden PE leicht ab. Der Unterschied zwischen der Referenzprobe und den hitzebehandelten Proben war hierbei jedoch nicht signifikant. Der Gehalt an Ethylacetat nahm bei den pasteurisierten Proben lediglich um maximal 3 - 4% ab. Des Weiteren war kein signifikanter Unterschied zwischen einer Hitzebehandlung mit 150 PE oder 300 PE im Hinblick auf die Ethylacetat-Konzentration erkennbar.

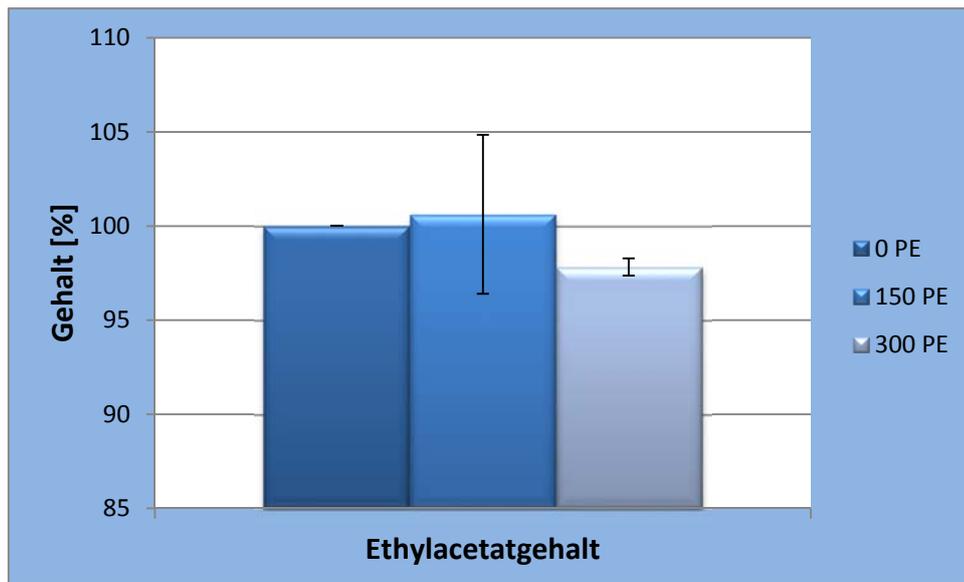


Abbildung 69: Einfluss einer KZE auf den Ethylacetatgehalt im Scale-up-Versuch im frischen Bier

Da Laborversuche oftmals nicht exakt die Praxisbedingungen widerspiegeln, wurden die Versuche an KZE-Anlagen unter realistischen Bedingungen wiederholt. Da aus der Literatur bekannt ist, dass sich der Einfluss einer Hitzebehandlung auf das Bier vor allem während der Alterung zeigt, wurden die Proben sowohl im frischen wie auch im forciert gealterten Zustand untersucht. Wie bereits bei den Versuchen im Kleinmaßstab sank der Gehalt an Ethylacetat im Großmaßstab bei einer Hitzebehandlung mit 300 PE nur leicht (um 3 %) ab (vgl. Abbildung 69). Es war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen behandelten Bieren erkennbar. Die Hitzebehandlung im Großmaßstab hatte demnach, auf den Gehalt an Ethylacetat im frischen Untersuchungsbier bezogen, keinen signifikant negativen Einfluss.

In Abbildung 70 ist zu sehen, dass der Gehalt an Ethylacetat in den unbehandelten, gealterten Proben im Vergleich zum frischen Pendant um ca. 4 % gesunken war. Die Proben nach der KZE zeigten wiederum einen minimalen Abfall im Ethylacetatgehalt, der marginal ausfiel. Das Gesamtniveau des Ethylacetatgehalts blieb trotz künstlicher Alterung und Hitzeeinfluss sehr hoch, ohne dass ein negativer Einfluss durch die KZE erkennbar wurde.

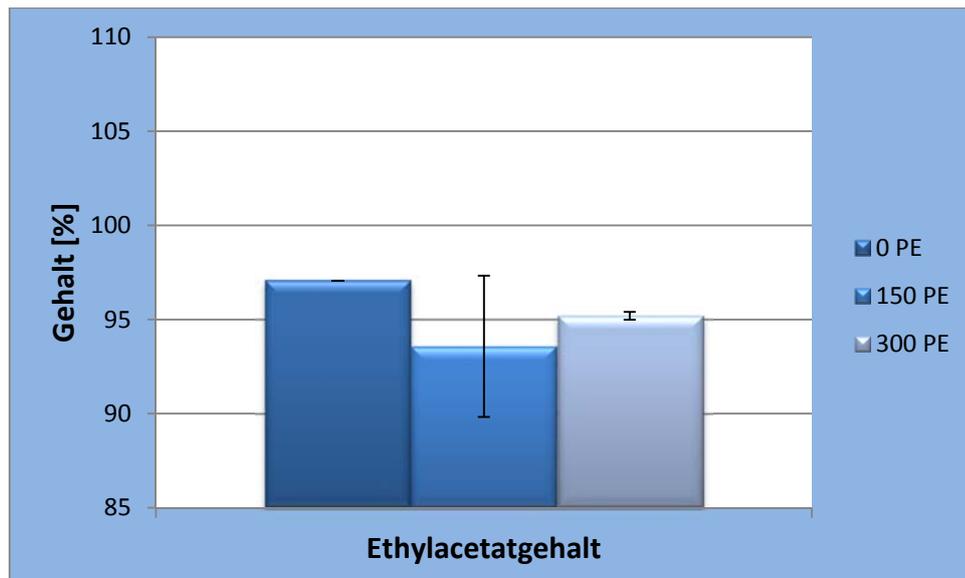


Abbildung 70: Einfluss einer KZE auf den Ethylacetatgehalt im Scale-up-Versuch im forciert gealterten Bier

Im Kleinmaßstab war ein Einfluss der Hitzebehandlung auf den Gehalt von Isoamylacetat sichtbar. Das Gesamtniveau sank durch die Wärmeeinwirkung um ca. 13 – 15 % im Vergleich zur Referenzprobe. Ein signifikanter Unterschied zwischen einer Behandlung mit 150 PE und 300 PE war hierbei jedoch nicht zu erkennen (siehe Abbildung 71).

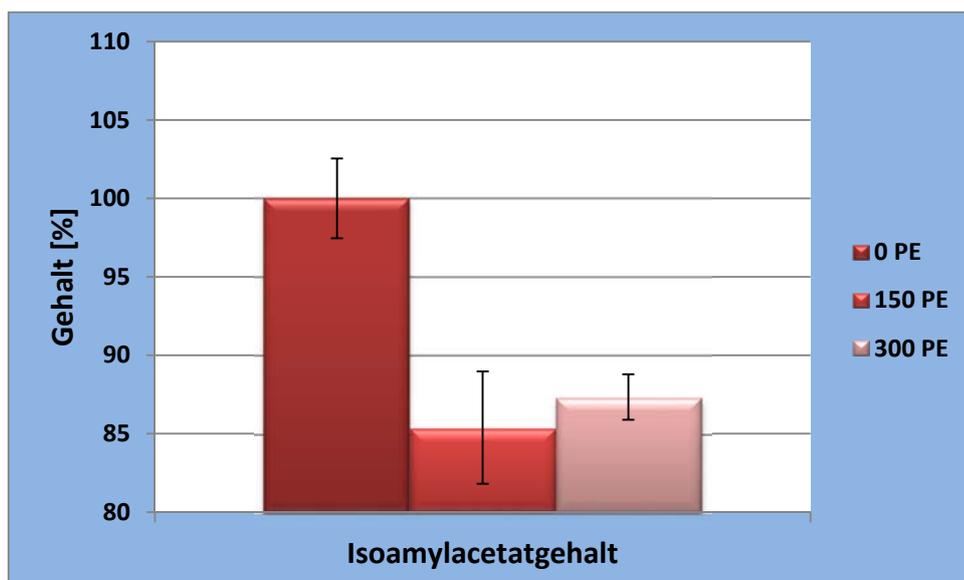


Abbildung 71: Einfluss einer KZE auf den Isoamylacetatgehalt im Kleinmaßstab

Das Ergebnis aus dem Kleinmaßstab ließ sich in der Praxis nicht bestätigen. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Referenzproben und den Bieren nach der KZE erkennbar. In diesem Fall war sogar ein leichter Anstieg an Isoamylacetat zu verzeichnen, wie in Abbildung 72 zu sehen ist.

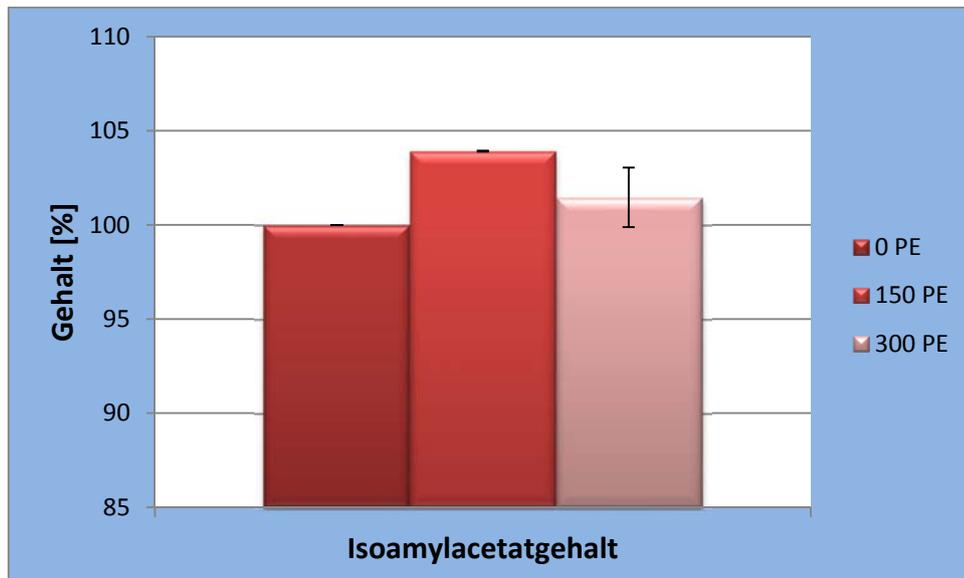


Abbildung 72: Einfluss einer KZE auf den Isoamylacetatgehalt im Scale-up-Versuch im frischen Bier

Ein Erklärungsansatz für diese Diskrepanz zwischen Laborversuch und großtechnischem Versuchsaufbau könnte in der relativ hohen Flüchtigkeit dieses Esters liegen. Da im Labormaßstab lediglich mit 2 ml Bier gearbeitet wurde, um die Zeit bis zum Erreichen der Kerntemperatur im Medium möglichst gering zu halten, ist ein geringfügiger Verlust an Aromakomponenten beim Pipettieren des kohlenstoffhaltigen Mediums nicht ausgeschlossen. Dieser schlug sich prozentual bei Isoamylacetat stärker nieder als bei Ethylacetat, da in den Untersuchungsbieren der Gehalt an Isoamylacetat bei ca. 3 mg/l und der Gehalt an Ethylacetat bei ca. 35 mg/l lag. Bei einem Verlust von 0,1 mg/l Isoamylacetat durch den Pipettiervorgang entspricht dies einem prozentualen Verlust von ca. 3 %, während es bei Ethylacetat lediglich 0,35 % sind. Des Weiteren besitzt Isoamylacetat eine höhere relative Flüchtigkeit als Ethylacetat. Auch der Analysenfehler bei der Messung mittels Gaschromatographen muss hierbei berücksichtigt werden.

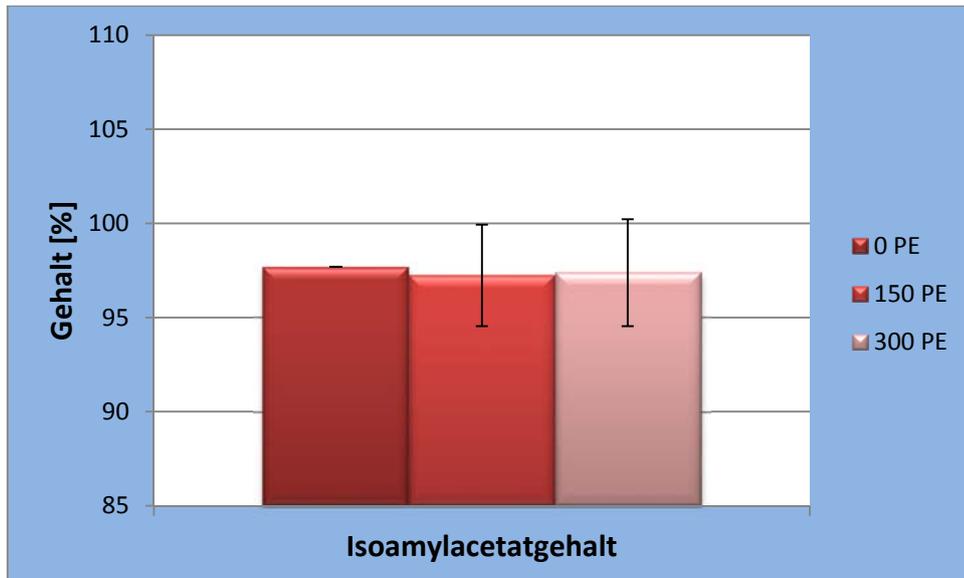


Abbildung 73: Einfluss einer KZE auf den Isoamylacetatgehalt im Scale-up-Versuch im gealterten Bier

Ebenso wie der Gehalt des Essigsäureesters Ethylacetat sank der Isoamylacetatgehalt im forciert gealterten Zustand lediglich um ca. 2 – 3 %. Ein negativer Einfluss durch die KZE war auch hier nicht erkennbar. Die Konzentrationen an Isoamylacetat waren nach einer forcierten Alterung in allen drei Untersuchungsbieren nahezu identisch hoch (vgl. Abbildung 73).

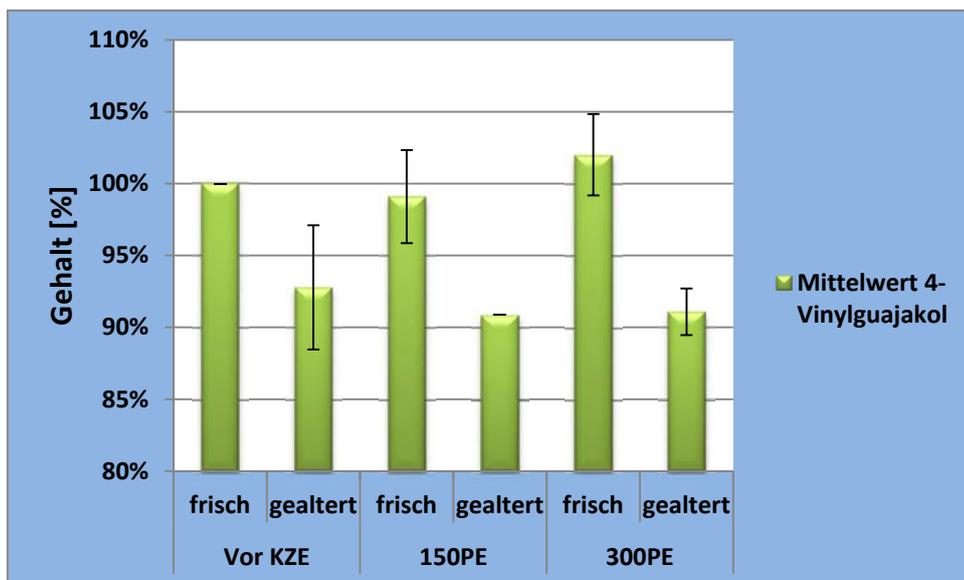


Abbildung 74: Einfluss einer KZE auf den 4-Vinylguajakol-Gehalt im Scale-up-Versuch im frischen und im gealterten Bier

Wie Abbildung 74 deutlich zeigt, war der Gehalt an 4-Vinylguajakol sehr stabil und durch den Einfluss der KZE nahezu unbeeinflusst. Auch die forcierte Alterung ließ den Gehalt an 4-Vinylguajakol nur geringfügig sinken. In diesem Fall war ebenfalls eine höhere Abbaurrate durch die forcierte Alterung zu erkennen als durch den Einfluss der KZE.

Diese Studie zeigte, dass die Menge an wertgebenden Aromakomponenten im Weizenbier durch die Hitzeeinwirkung einer KZE kaum beeinflusst wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Gehalt an Ethylacetat sowohl im Labormaßstab wie auch im Praxisversuch durch den Einfluss der KZE nicht signifikant sank. Auch der Isoamylacetat-Gehalt blieb trotz KZE-Einfluss im Großmaßstab konstant. Lediglich im Labormaßstab konnte ein Rückgang dieser Leitkomponente verzeichnet werden, der aber vermutlich auf die geringen Versuchsmengen und die hohe Flüchtigkeit dieses Aromastoffs zurückzuführen war. Auch der Gehalt an 4-VG und an Amylalkoholen (siehe Anhang Tabellen 48-50) blieb durch die KZE unbeeinflusst. In keinem der durchgeführten Versuche konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Einwirkung von 150 PE und 300 PE gezeigt werden. Der Effekt, den *Herrmann* beschrieb, dass es zu einem geringeren Abbau positiver Aromastoffe durch eine Kurzzeiterhitzung kommt, konnte bei den untersuchten Komponenten nicht nachvollzogen werden (Herrmann, 2005b). Es zeigte sich, dass der Gehalt an Essigsäureestern und 4-VG nach einer KZE-Behandlung auf dem gleichen oder etwas niedrigeren Niveau lag als der der jeweiligen Nullprobe. Es konnte jedoch auch kein gegenteiliger Effekt zu den Erkenntnissen von *Herrmann* festgestellt werden, da es auch zu keinem signifikanten Mehr-Abbau dieser wichtigen Aromasubstanzen durch die KZE kam.

### **4.5.2 Einfluss auf die sensorische Stabilität des Bieres**

Weitere wichtige Aspekte in Verbindung mit dem Einsatz einer KZE in der Brauerei stellen die thermische Belastung des Bieres und die damit verbundene sensorische Stabilität dar. Um nähere Einblicke zu bekommen, wurden die Untersuchungsbiere nach der KZE-Behandlung auf Alterungsindikatoren hin analysiert (Ergebnisse siehe Anhang Tabelle 51). Die wichtigste Rolle bei diesen Untersuchungen spielen die Wärmeindikatoren 2-Furfural und  $\gamma$ -Nonalacton (entsprechen der Summe an

Wärmeindikatoren). Da die Bildung wichtiger Wärmeindikatoren vermutlich Zeit benötigt, wurden die Proben wiederum forciert gealtert. Auf Grund des geringen Volumens der Laborversuche war es nur möglich, die abgefüllten Flaschen aus den Brauereiversuchen zu testen.

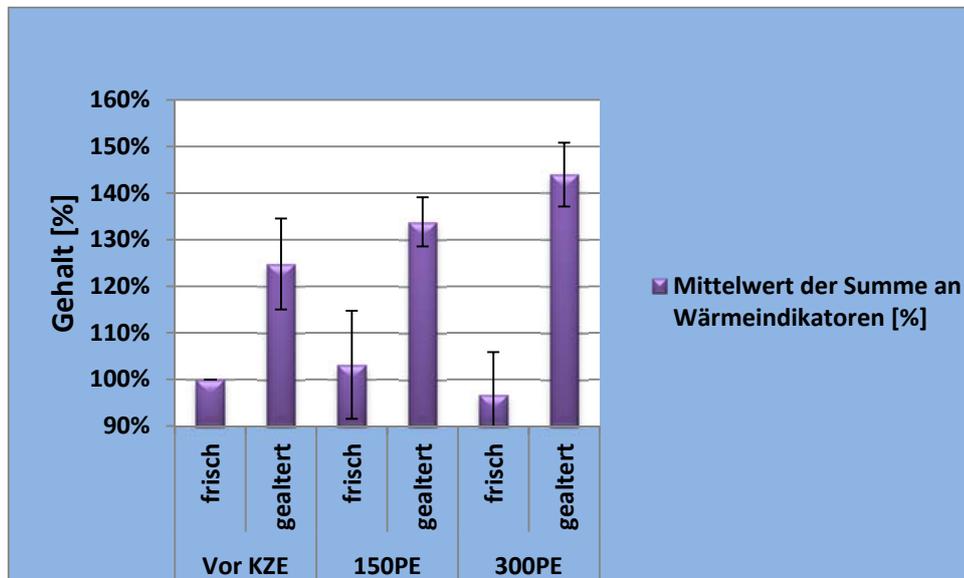


Abbildung 75: Einfluss einer KZE auf die Wärmeindikatoren im Scale-up-Versuch

Abbildung 75 zeigt, dass sich die Summe der Wärmeindikatoren direkt nach der Abfüllung des Bieres zwischen den verschiedenen thermischen Behandlungsweisen nicht signifikant unterschied. Es war deutlich erkennbar, dass es erst nach der forcierten Alterung zu einem deutlichen Anstieg dieser Komponenten kam. Der Gehalt an Wärmeindikatoren stieg nach dieser Art der Alterung linear zur Zahl der Pasteureinheiten an. Allerdings zeigte diese Studie auch, dass die Differenz der Wärmeindikatoren zwischen der frischen und der forciert gealterten Probe jeweils größer war als die Differenz zwischen den mit unterschiedlich hohen PE behandelten Bieren. Dennoch war ein linearer Zusammenhang zwischen den Hitzebehandlungen im gealterten Zustand erkennbar.

Alle Biere wurden auch von geschulten DLG-Verkostern sensorisch beurteilt. Wie Abbildung 76 zu entnehmen ist, schnitten die Biere im frischen Zustand, unabhängig von ihrer thermischen Behandlung, relativ ähnlich ab. Die Weizenbiere ohne Hitzebehandlung sowie die Biere, die mit 150 PE behandelt wurden, wurden mit einer Gesamtnote von 4,3 bewertet. Die Weizenbiere, die 300 PE ausgesetzt waren, wurden

etwas schlechter mit einer Durchschnittsnote von 4,2 bewertet. Das gleiche Bild zeigte sich bei der Verkostung der forciert gealterten Biere. Die Biere „vor KZE“ und „150 PE“ wurden mit einer identischen Gesamtnote von 4,0 bewertet, während bei den Bieren „300 PE“ bereits eine leichte Alterungsnote erkennbar war. Aus diesem Grund lag die Bewertung mit einer Note von 3,8 etwas niedriger.

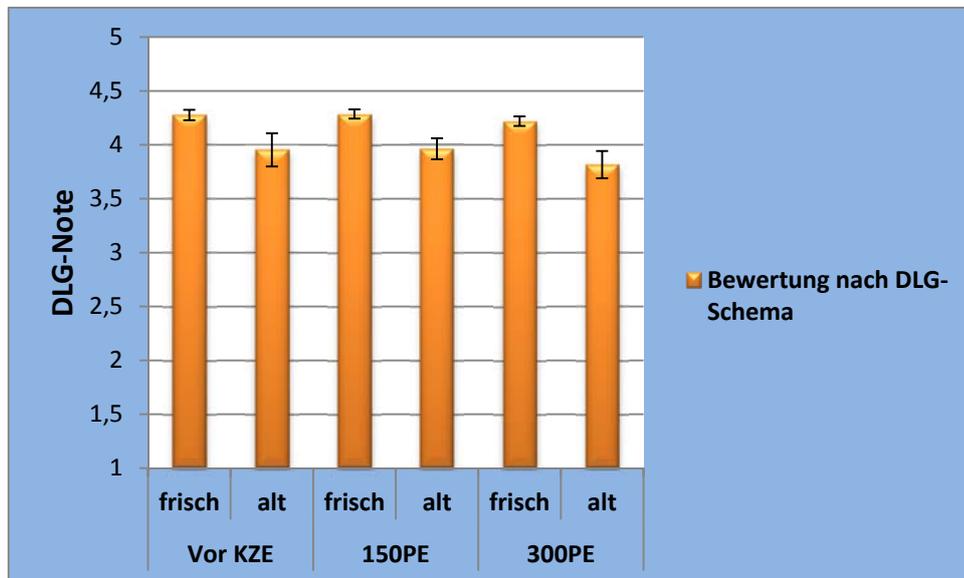


Abbildung 76: Verkostungsergebnisse der abgefüllten Biere nach DLG-Schema

Die gleichen Beobachtungen machte *Lustig* im untergärigen Bereich. Auch er konnte sensorisch keinen Einfluss einer Kurzzeiterhitzung im frischen Zustand der Biere ausmachen. Erst nach einer forcierten Alterung waren geringfügige Unterschiede erkennbar (*Lustig*, 1994).

Hieraus lässt sich schließen, dass es sensorisch keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und pasteurisierten Weizenbieren bis 150 PE gibt. Bei einer Hitzebehandlung mit 300 PE lässt sich im forciert gealterten Zustand sensorisch eine Alterungsnote erkennen, die mit der Summe der detektierten Wärmeindikatoren korreliert.

### **4.6 Einfluss der Lagerungsbedingungen auf das Aromaprofil sowie die sensorische Stabilität von Weizenbier**

Einen Teilaspekt dieser Arbeit stellen die Bildungswege und -verläufe der wichtigsten Leitkomponenten dar, während ein anderer Teil davon handelt, diese Aromastoffe möglichst lange im Weizenbier zu behalten. Neben Verlusten durch Ausgasung oder

technologische Einflüsse wie Kurzzeiterhitzung spielen auch die Lagerungsbedingungen eine entscheidende Rolle. Im Zuge der Globalisierung werden Brauereien immer häufiger mit dem Problem konfrontiert, dass ihr Produkt in Containern bis nach Asien oder Südamerika transportiert wird. Auf diesem Weg sind die Biere z.T. recht hohen Temperaturbelastungen von über 40°C ausgesetzt (Pankoke, 2013). In wie weit bzw. wie schnell die sensorischen Eigenschaften von Weizenbieren hierbei beeinträchtigt werden, ist weitestgehend ungeklärt.

*Herrmann* untersuchte in diesem Zusammenhang vor allem kurz- und mittelkettige Fettsäuren und fand in seiner Dissertation heraus, dass 3-Methylbuttersäure eine hohe Korrelation in Weizenbieren mit der sensorisch wahrnehmbaren Alterung aufwies (Herrmann, 2005b). Während einer sieben-monatigen natürlichen Lagerung (vermutlich bei Raumtemperatur) zeigte sich zusätzlich ein Abbau von wichtigen Aromakomponenten wie Isoamylacetat oder 4-Vinylguajakol. Auch beschrieb *Herrmann* die Relevanz der Hefevitalität und den Einfluss des Sauerstoffs auf die Geschmacksstabilität eines Weizenbieres. Allerdings wurden in diesen Studien keine unterschiedlichen Lagerungstemperaturen (die auch interkontinentale Transporte berücksichtigen) untersucht.

In dieser Arbeit sollten deshalb unterschiedliche Temperaturprofile über einen längeren Zeitraum hinsichtlich ihres Einflusses auf die sensorische Stabilität, die Entwicklung der Schaumkennzahlen und den Abbau der beiden Essigsäureester Isoamylacetat und Ethylacetat untersucht werden. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Weizenbiere bei 4°C, 10°C, 20°C, 30°C und 40°C über einen Zeitraum von 12 Wochen gelagert und in regelmäßigen Abständen untersucht. Auf Grund der Dreifachbestimmung jeder Probe und der daraus resultierenden fehlenden Lagerkapazität in den Bebrütungsschränken war es nicht möglich, weitere Untersuchungen hinsichtlich des 4-Vinylguajakol (HPLC-Methode) oder weiterer Aromastoffe über einen längeren Zeitraum zu betrachten. Diese Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur über ein Jahr hinweg mit den gleichen Bieren einer anderen Charge durchgeführt. Bei Untersuchungsbier A handelt es sich um ein helles Weizenbier mit traditioneller Flaschenreife (Hefezellzahl 20 Mio. Zellen/ml), Bier B wurde mittels Tankreifungsverfahren hergestellt (Hefezellzahl 4 Mio. Zellen/ml).

Der Einfluss unterschiedlicher Lagerungstemperaturen hatte einen deutlichen Effekt auf die Schaumstabilität der Weizenbiere, die einen wesentlichen Qualitätsparameter darstellt und auch einen Hinweis auf vermehrte Hefeautolyse und somit eine verstärkte

Alterung gibt. Bier A begann mit sehr hohen Schaumkennzahlen, die bei einer Lagertemperatur von 4°C auch nach 42 Tagen noch nahezu unverändert waren. Erst nach 56 Tagen war ein Abfall zu erkennen. Einen ähnlichen Verlauf nahmen auch die Kurven von 10°C und 20°C. Eine Lagertemperatur von 30°C oder 40°C führte zu einem sofortigen starken Abfall der Schaumkennzahlen, der parallel verlief. Bedingt durch die hohe Hefezellzahlen in der Flasche kam es bei diesen hohen Lagertemperaturen vermutlich zu einer raschen und intensiven Hefeautolyse, bei der u.a. Fettsäuren freigesetzt werden, die die Schaumqualität deutlich negativ beeinflussen (vgl. Abbildung 77).

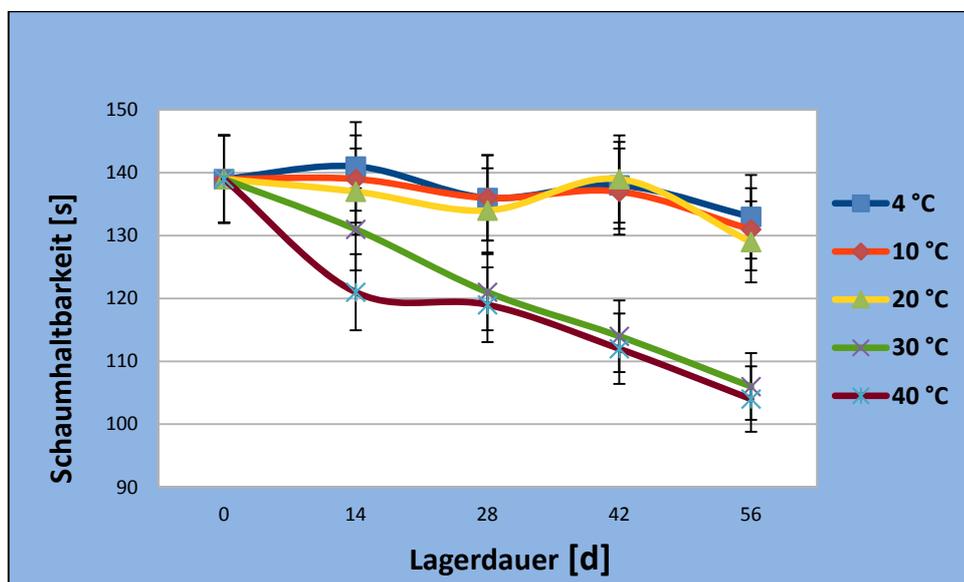


Abbildung 77: Verlauf der Schaumkennzahlen bei Weizenbier A

Die unterschiedlichen Lagertemperaturen korrelierten auch bei Bier B sehr gut mit den Schaumkennzahlen, wenngleich die Schaumhaltbarkeit bei einer Lagerung von 40°C besser abschnitt als die bei 30°C. Dennoch war auch hier zu sehen, dass es eine deutliche Differenz zwischen einer Lagertemperatur von 30°C und  $\leq 20^\circ\text{C}$  bezüglich der Schaumhaltbarkeit gab. Zwischen den Bieren, die bei 4°C und 10°C gelagert wurden, gab es kaum einen erkennbaren Unterschied. Eine Lagerung bei 20°C verringerte die Schaumhaltbarkeit um etwa 5 - 8 Punkte, allerdings wurden die Schaumkennzahlen bei einer Lagerung von 30°C deutlich schlechter (vgl. Abbildung 78).

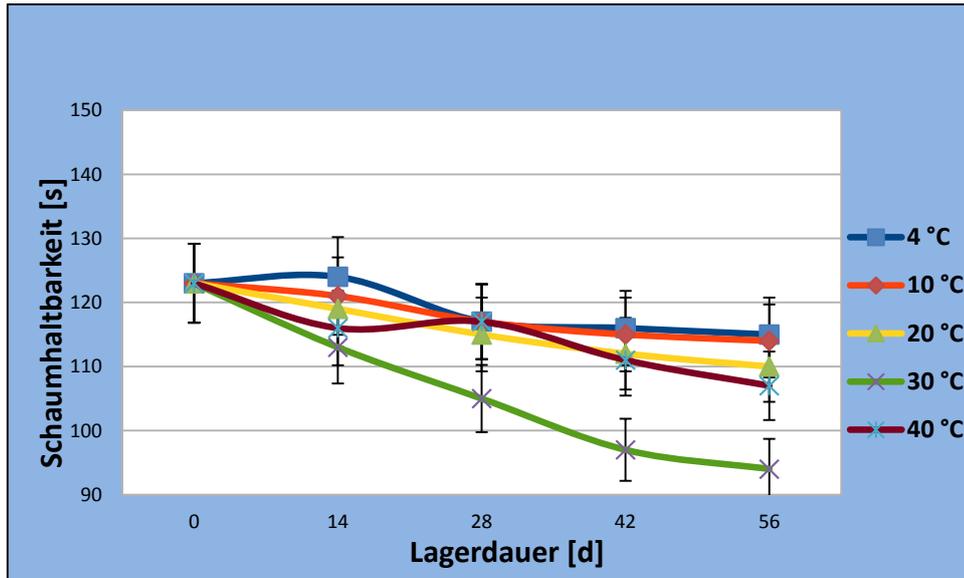


Abbildung 78: Verlauf der Schaumkennzahlen bei Weizenbier B

Die Abbildungen 79 und 80 zeigen den Verlauf von Ethylacetat während einer 84-tägigen Lagerung.

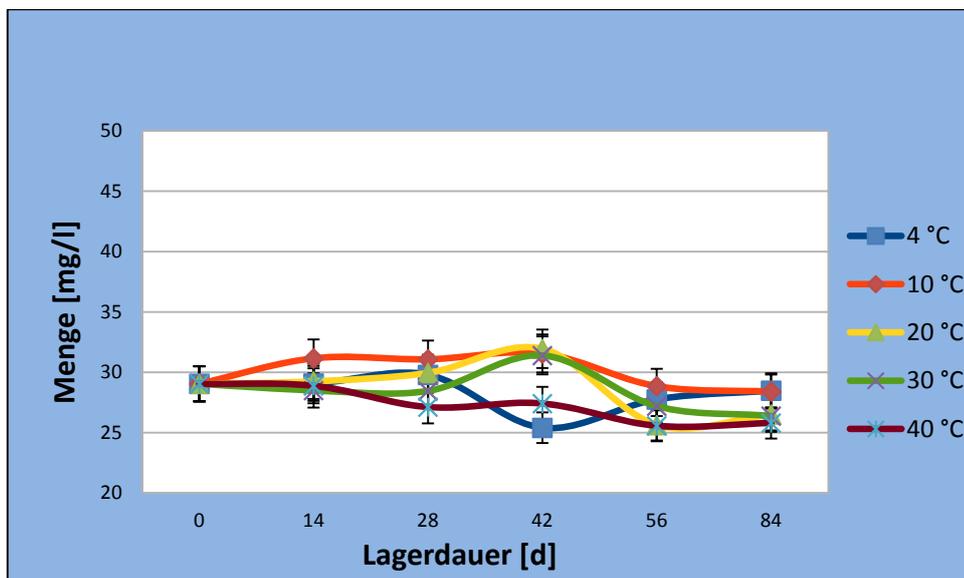


Abbildung 79: Verlauf der Ethylacetat-Konzentrationen bei Weizenbier A

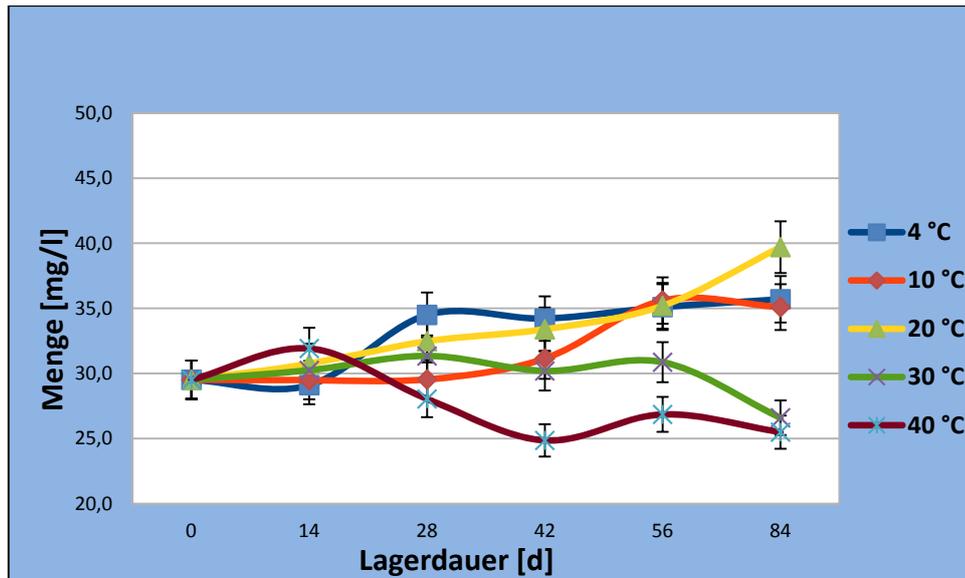


Abbildung 80: Verlauf der Ethylacetat-Konzentrationen bei Weizenbier B

Wie diesen Abbildungen zu entnehmen ist, kam es während der Lagerung weder bei dem flaschengereiften noch bei dem tankgereiften Bier zu einer deutlichen Abnahme der Ethylacetatkonzentration. Bier A verzeichnete nach 84 Tagen bei Lagerungstemperaturen von 20°C, 30°C und 40°C ungefähr den gleichen geringen Abbau, während der Gehalt an Ethylacetat bei Lagertemperaturen von 4°C und 10°C nahezu identisch blieb. Bier B enthielt nach 84 Tagen bei Lagertemperaturen von 4°C, 10°C und 20°C sogar etwas mehr Ethylacetat als zu Beginn. Nur Lagertemperaturen von 30°C und 40°C verringerten diesen Gehalt geringfügig.

Ein anderes Bild zeigte sich beim Essigsäureester Isoamylacetat. Hier war eine temperaturabhängige Reduzierung dieser Aromakomponente erkennbar. Auch schien die Hefezellzahl in der abgefüllten Flasche einen Einfluss zu haben. Bier A verzeichnete auch bei Lagertemperaturen von 4°C einen deutlichen Abfall im Isoamylacetat-Gehalt (vgl. Abbildung 81), während diese Temperatur bei Bier B noch zu keiner deutlichen Reduzierung führte (vgl. Abbildung 82). In beiden Fällen war jedoch deutlich zu erkennen, dass eine Lagertemperatur von 40°C zu einem sehr hohen Verlust an Isoamylacetat führte.

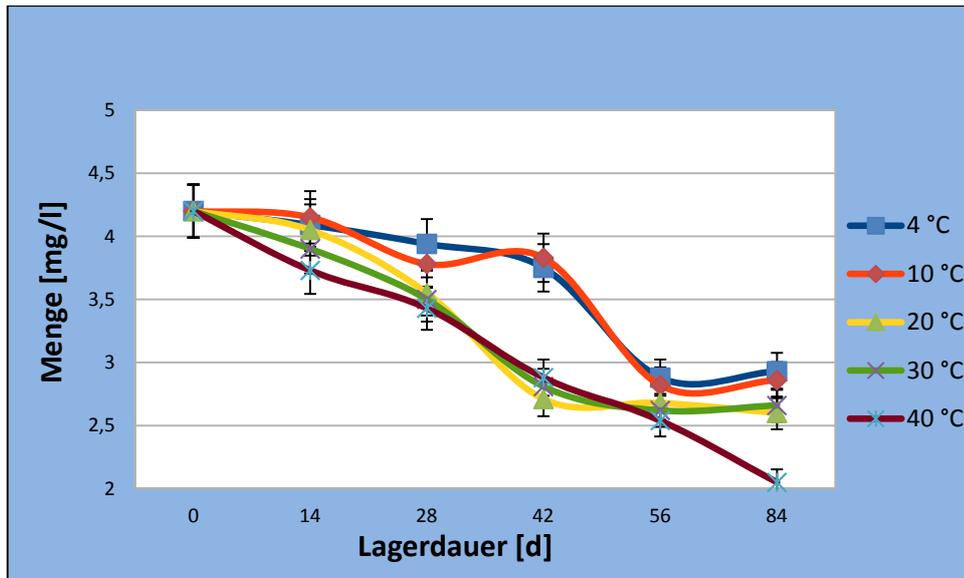


Abbildung 81: Verlauf der Isoamylacetat-Konzentrationen bei Weizenbier A

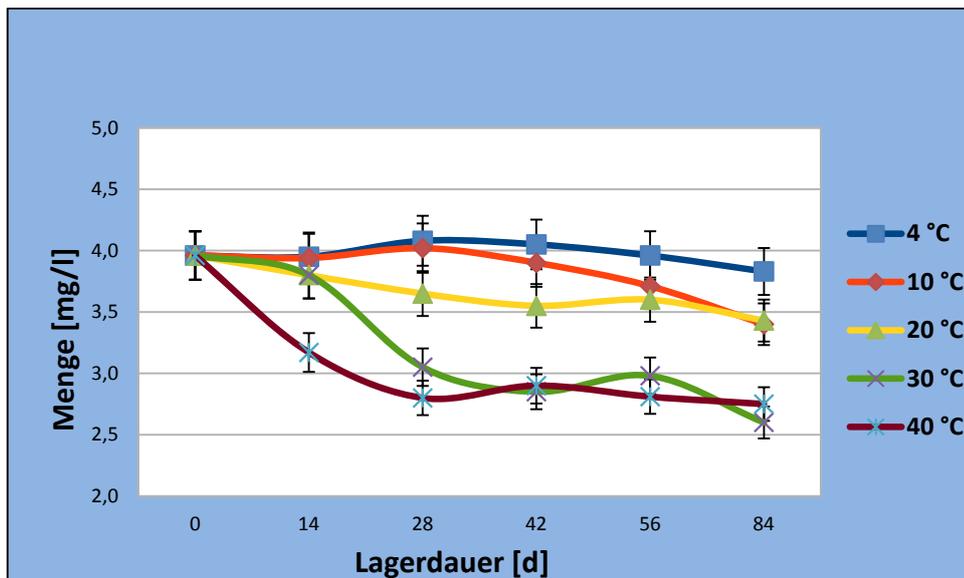


Abbildung 82: Verlauf der Isoamylacetat-Konzentrationen bei Weizenbier B

Auch *Vanderhaegen et al.* konnten bei der Lagerung von obergärigen Pale-Ale-Bieren eine Korrelation zwischen der Lagerungstemperatur und dem Absinken des Isoamylacetat-Gehaltes feststellen (Vanderhaegen et al., 2003). Es scheint, als käme es zu einer chemischen Reduktion von Isoamylacetat, die durch höhere Temperaturen schneller abläuft.

Wie die Abbildungen 83 und 84 zeigen, erhöhte sich die Summe der Wärmeindikatoren bei Lagertemperaturen unabhängig von der Hefezellzahl in der Flasche bis 30°C nur geringfügig. Dagegen führten Temperaturen von 40°C zu einer extremen Erhöhung der Wärmeindikatoren. Demzufolge kam es zu einer wesentlich höheren Bildungsrate

## 4 Ergebnisse und Diskussion

von  $\gamma$ -Nonalacton und 2-Furfural bei Temperaturen von 40°C als bei Temperaturen von 30°C und darunter (siehe Tabelle 52 und 53 im Anhang).

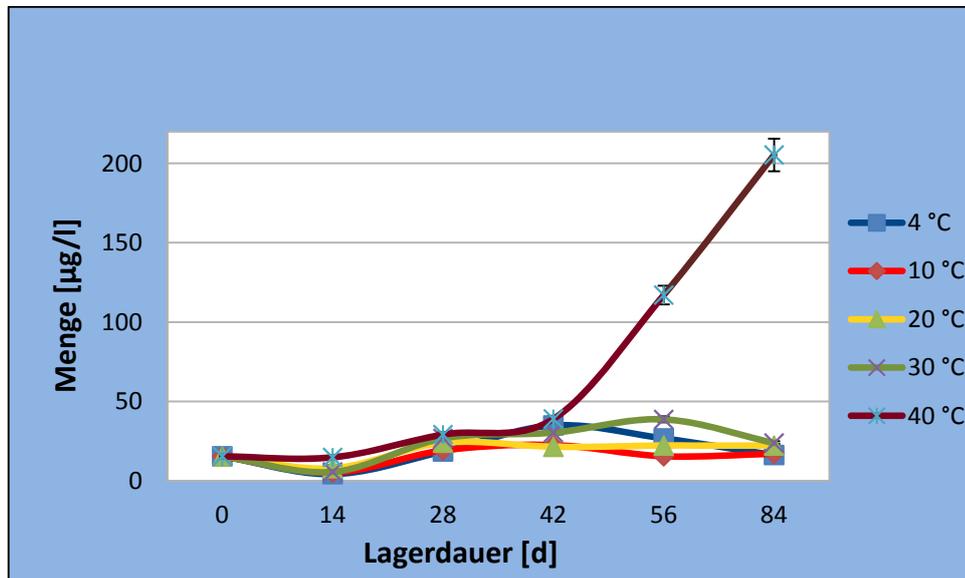


Abbildung 83: Verlauf der Wärmeindikatoren bei Weizenbier A

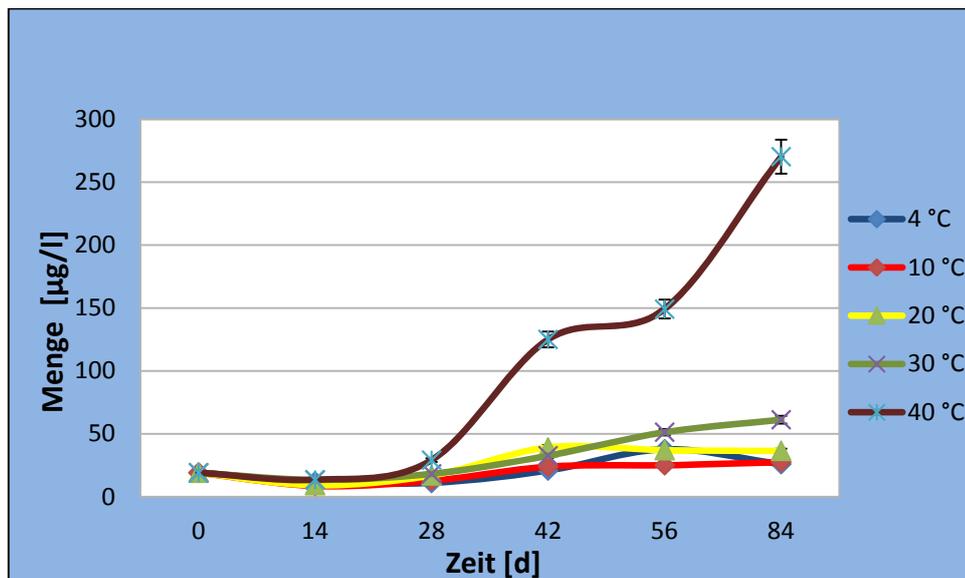


Abbildung 84: Verlauf der Wärmeindikatoren bei Weizenbier B

Auch die Verkostungsergebnisse bestätigen die Ergebnisse der Wärmeindikatoren (vgl. Abbildungen 86 und 87).

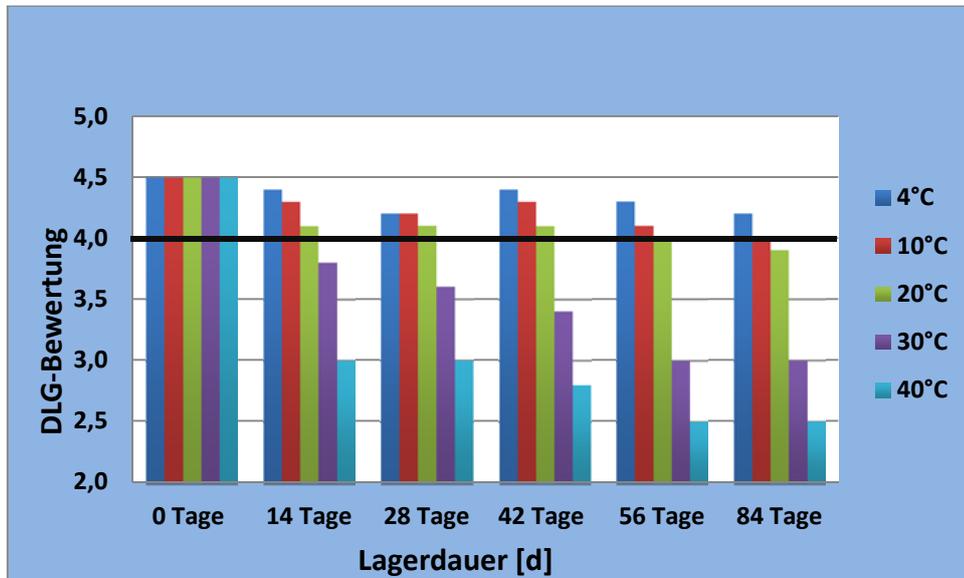


Abbildung 85: Verkostungsergebnisse von Bier A über 84 Tage Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen

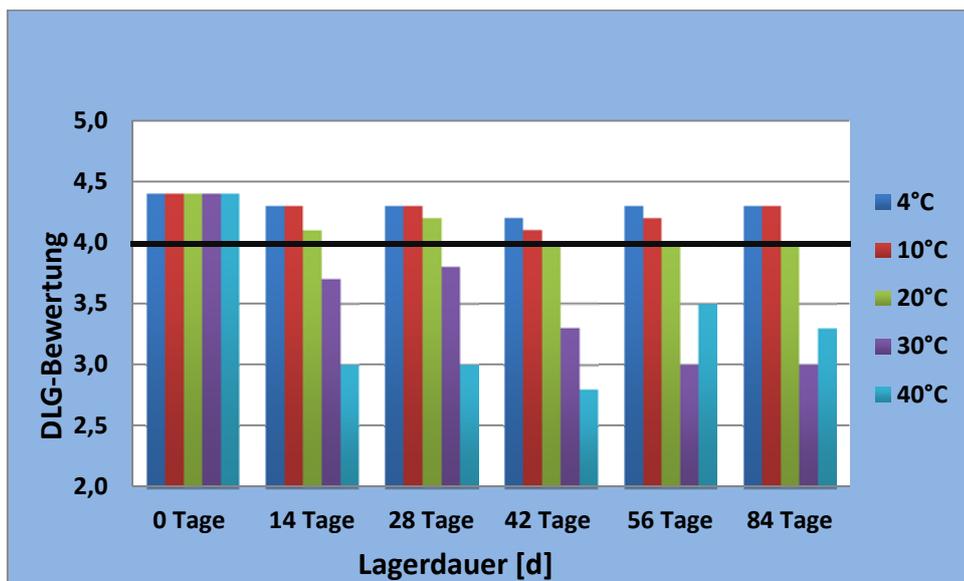


Abbildung 86: Verkostungsergebnisse von Bier B über 84 Tage Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen

Bereits nach 14 Tagen Lagerzeit bei 40°C wiesen sowohl Bier A als auch Bier B eine deutliche Alterungsnote auf. Für eine bessere Übersicht wurde eine schwarze Linie als Grenzwert eingeführt. Bei einer Bewertung von 4,0 oder darüber war keine Alterungsnote erkennbar. Somit ist deutlich zu sehen, dass Bier A bei einer Lagerung bis 20°C erst nach 84 Tagen eine leichte Alterungsnote aufwies – bei Bier B war sogar bis zum Ende dieser Versuchsreihe keine Alterungsnote erkennbar. In beiden Versuchen war jedoch sensorisch eine deutliche Diskrepanz zwischen Lagerbedingung

bis 20°C und ab 30°C zu erkennen. Alle Biere, die einer Temperatur von 30°C oder 40°C ausgesetzt waren, unabhängig von der Hefezellzahl im jeweiligen Bier, ließen bereits nach 14 Tagen Lagerzeit eine deutliche Alterungsnote erkennen.

Neben dieser temperaturabhängigen Versuchsreihe wurden beide Biere, allerdings aus einer anderen Charge, über den Zeitraum eines knappen Jahres bei isothermen Temperaturverhältnissen von 20°C gelagert und in regelmäßigen Abständen bezüglich des Gärungsnebenprodukt-Gehalts sowie auf Alterungsindikatoren hin untersucht (Analysenwerte siehe Anhang Tabelle 54-57).

Der Gehalt an Ethylacetat blieb beim flaschengereiften Bier A über den gesamten Untersuchungszeitraum hin konstant, wie Abbildung 87 zu entnehmen ist. Auch die Konzentration an Amylalkoholen stagnierte bzw. stieg sogar leicht an.

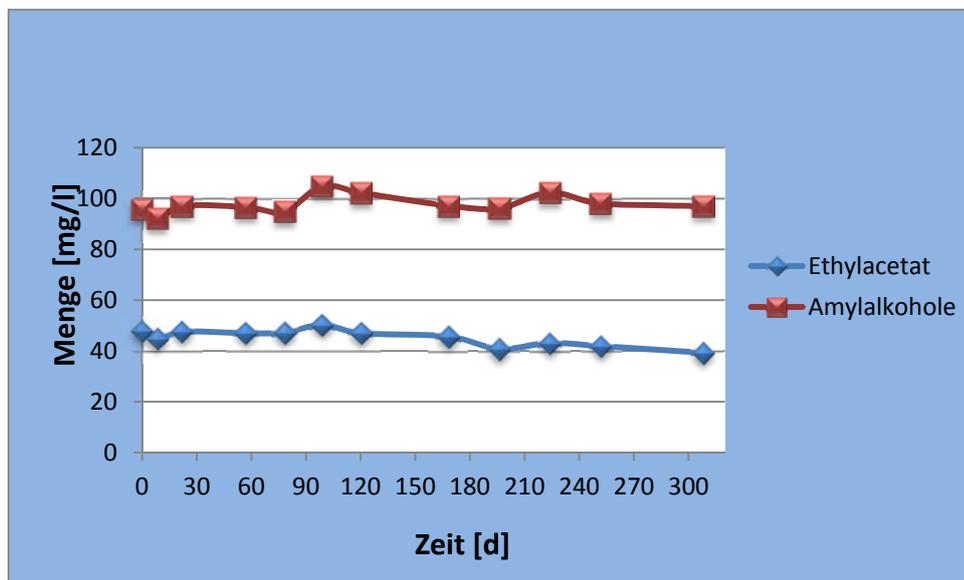


Abbildung 87: Bier A: Verlauf von Ethylacetat und Amylalkoholen während der Alterung

Diese Ergebnisse bestätigen, wie bereits bei den Versuchen zuvor gezeigt werden konnte, dass der Gehalt des Essigsäureesters Ethylacetat während der Lagerung bzw. Alterung nicht sinkt, sondern das Niveau bestehen bleibt oder sogar leicht ansteigen kann. Diese Ergebnisse unterschieden sich geringfügig von den Erkenntnissen von *Vanderhaegen et al.* bei Pale-Ale-Bieren. Sie konnten nach einer sechs-monatigen Lagerung bei 20°C einen leichten Rückgang feststellen (Vanderhaegen et al., 2003). Ein nahezu identischer Verlauf der Konzentrationen an Ethylacetat und Amylalkoholen zeigte sich bei Bier B. Auch hier blieb das Ethylacetat nach 308 Tagen auf einem fast identischen Niveau. Wie auch bei Bier A war ein leichter Anstieg im Amylalkohol-

Gehalt während der Lagerung zu beobachten, während die Konzentration von Ethylacetat über den Verlauf eines Jahres quasi stagnierte (vgl. Abbildung 88).

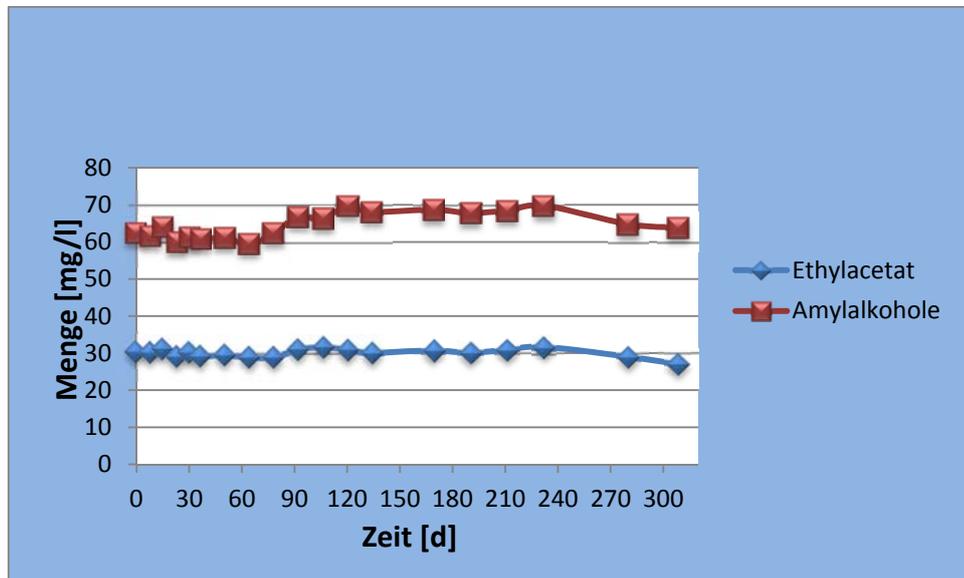


Abbildung 88: Bier B: Verlauf von Ethylacetat und Amylalkoholen während der Alterung

Wie bereits in den vorangegangenen Studien zeigte sich auch nach einer längeren Lagerdauer von Bier A bei 20°C eine deutliche Reduzierung des Isoamylacetat-Gehaltes um fast 50 %. Auch die Menge an 4-Vinylguajakol wurde, wie *Herrmann* beschrieb, während der Alterung deutlich reduziert (*Herrmann*, 2005b) (siehe Abbildung 89). Die Aromausprägung des Weizenbieres wurde während der Alterung demnach geringer, wie es auch *Back* beschrieb, was sich somit auch analytisch nachweisen lässt (*Back*, 2005).

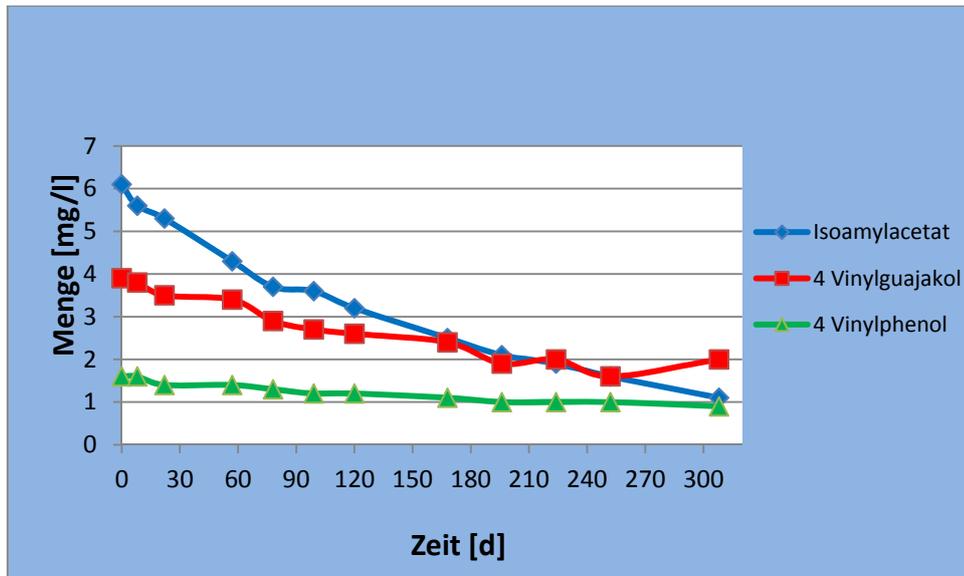


Abbildung 89: Bier A: Verlauf von Isoamylacetat, 4-Vinylguajakol und 4-Vinylphenol während der Alterung

Auch Bier B wies nach Erreichen des MHDs einen deutlich niedrigeren Gehalt an Isoamylacetat und 4-Vinylguajakol auf. Es zeigte sich eine Reduzierung von 4-Vinylguajakol von über 50 % und nach 308 Tagen waren lediglich ca. 60 % des ursprünglichen Isoamylacetatgehaltes vorhanden, wie in nachfolgender Abbildung zu sehen ist.

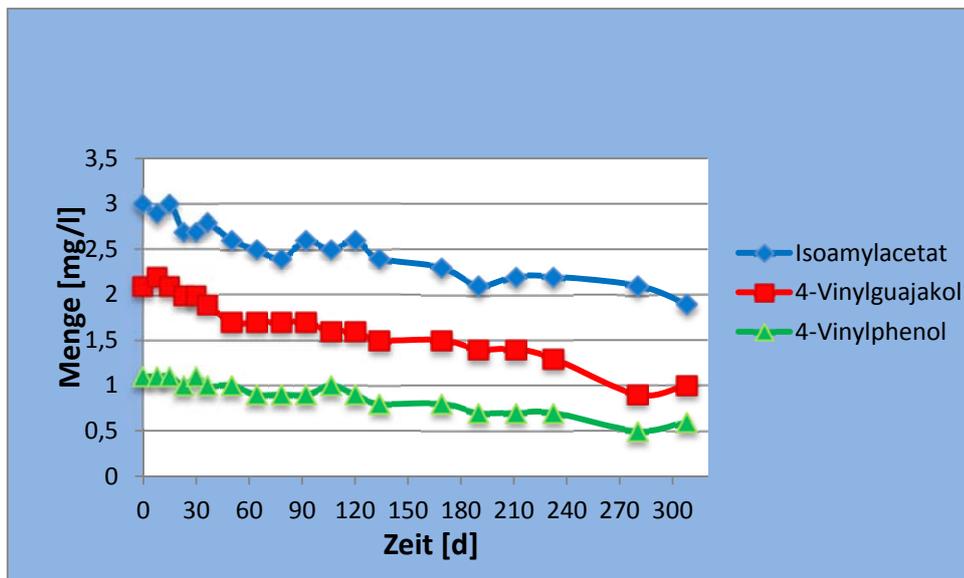


Abbildung 90: Bier B: Verlauf von Isoamylacetat, 4-Vinylguajakol und 4-Vinylphenol während der Alterung

Parallel zum Aroma-Abbau werden ungewünschte Komponenten aufgebaut. Als Indikatorsubstanzen gelten die unter Punkt 2.6.1 beschriebenen Substanzen nach *Einhorn* und *Lustig* (*Eichhorn, 1987; Lustig, 1994*). Die Summe der Sauerstoffindikatoren veränderte sich bei Bier A über den getesteten Zeitraum kaum, während der Wärmeeinfluss die spezifischen Indikatoren um ca. 50  $\mu\text{g/l}$  ansteigen ließ. Die größte Steigerung erfuhr die Summe der allgemeinen Alterungsindikatoren um ca. 150  $\mu\text{g/l}$  (vgl. Abbildung 91).

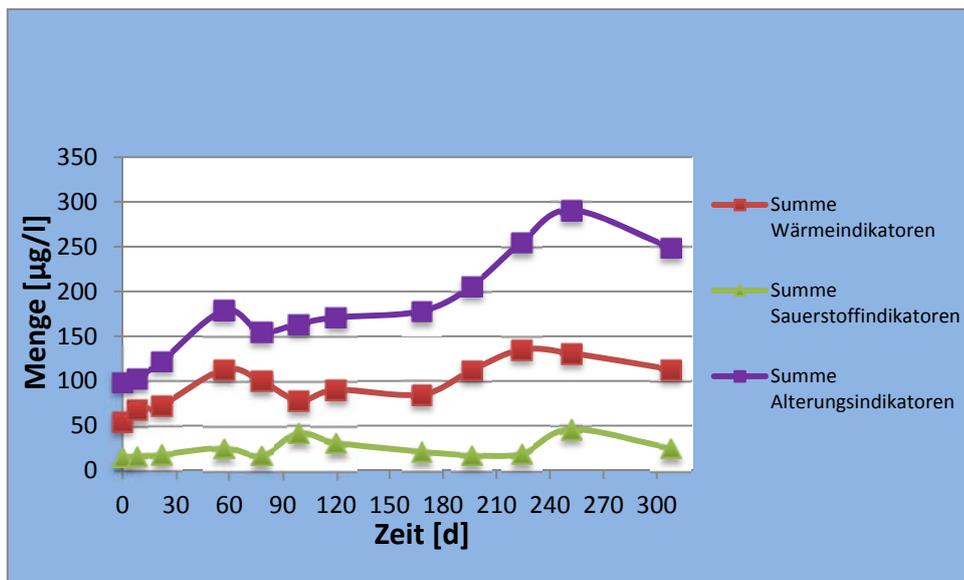


Abbildung 91: Bier A: Zeitlicher Verlauf der Alterungsindikatoren

Bei Bier B zeigte die Konzentration an Sauerstoffindikatoren keine merkliche Veränderung im Verlauf der Alterung. Der Gehalt an Wärmeindikatoren ähnelte ebenfalls dem von Bier A (siehe Abbildung 92). Auch bei Bier B kam es nach 308 Tagen zu einem Anstieg um ca. 70  $\mu\text{g/l}$ . Es war ebenfalls eine Steigerung der allgemeinen Alterungsindikatoren um ca. 120  $\mu\text{g/l}$  erkennbar.

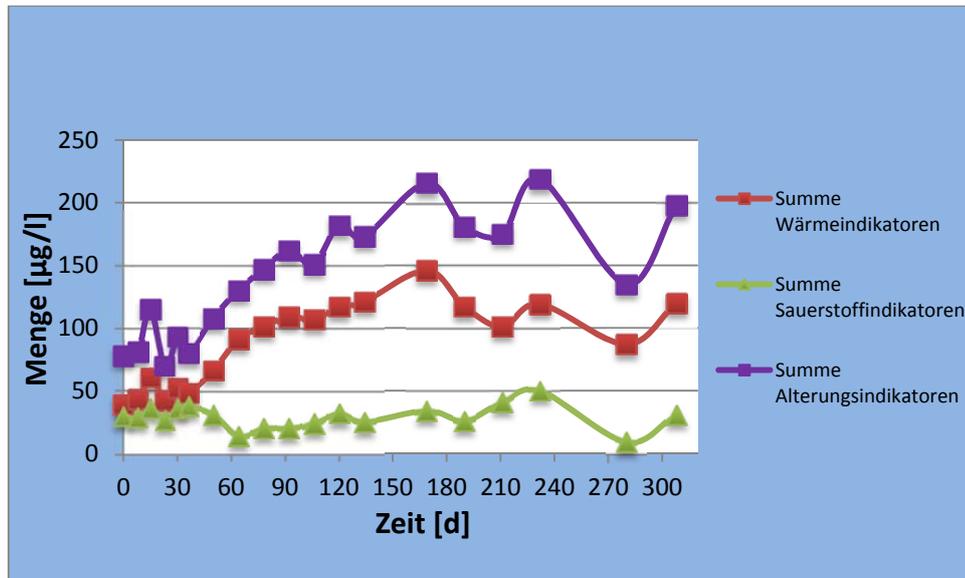


Abbildung 92: Bier B: Zeitlicher Verlauf der Alterungsindikatoren

Auch wenn es schwierig ist, zwei Biere aus unterschiedlichen Chargen zu vergleichen, so zeigten diese Versuchsreihen dennoch, dass Lagertemperaturen von 40°C über einen Zeitraum von 84 Tagen deutlich schädlicher für das Produkt sind, als längere Lagerzeiträume (über 300 Tage) bei 20 °C. Auf Basis dieser Untersuchungen ist die Lagertemperatur für die Geschmacksstabilität von Weizenbieren, unabhängig von ihrer Produktionsweise (Tank- oder Flaschenreifung), entscheidend. Temperaturen bis 20°C erhöhten die Wärmeindikatoren moderat, was auch in den Verkostungen bestätigt werden konnte. Allerdings wurden wichtige Aromastoffe wie Isoamylacetat und 4-Vinylguajakol kontinuierlich über einen Zeitraum von 308 Tagen abgebaut. Somit verlor das Weizenbier seine charakteristischen sensorischen Eigenschaften zunehmend und das Bier wirkte etwas leerer. Temperaturen von 30°C oder 40°C schädigten das Produkt dagegen unverhältnismäßig stark. Wie die Verkostungsergebnisse zeigten, ist eine deutliche Schädigung des Produktes bereits nach 14 Tagen Lagerzeit sensorisch festzustellen. Auch wird z.B. Isoamylacetat bei hohen Temperaturen deutlich schneller reduziert.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, einen besseren Einblick in die Aromastoffsynthese sowie den Abbau bzw. Austrag dieser Substanzen in Weizenbieren zu erhalten. Im Verlauf der Arbeit wurden speziell die Leitkomponenten der verschiedenen Aromatypen von Weizenbieren Isoamylacetat, Ethylacetat und 4-Vinylguajakol hinsichtlich ihres Verhaltens während der Gärung, Reifung und Lagerung untersucht.

Die Komposition eines Weizenbieres wird neben technologischen Parametern und der Würze-Zusammensetzung maßgeblich durch den Hefestamm beeinflusst. Daher wurden die industriell am häufigsten verwendeten Weizenbierhefestämme TUM 68, TUM 127, TUM 175, TUM 214 und TUM 505 unter standardisierten Bedingungen getestet. Neben chemisch-technischen Untersuchungen standen vor allem die Aromastoffsynthese während der Gärung und die Sensorik im Vordergrund. Es zeigte sich unter anderem, dass der Hefestamm TUM 127 nicht in der Lage ist, Maltotriose sofort zu verwerten. Vermutlich sind Carrier-Systeme, die für den Transport von Maltotriose in die Hefezelle zuständig sind, gehemmt oder inaktiviert. Mittels Genexpressionsmessungen konnte darüber hinaus erstmals ein Einblick in das Enzymbildungssystem in Weizenbier-Hefen gewährt werden. Es wurde erfolgreich ein System etabliert, das zuverlässige Aussagen über die Bildung von Enzymen, die für die Aromastoffsynthese zuständig sind, treffen kann. Des Weiteren wurden erstmals kinetische Studien während der Hauptgärung hinsichtlich des Enzymbildungsverhaltens bei Weizenbierhefestämmen durchgeführt. Hierbei zeigten sich z.T. große Differenzen in den Genexpressionsraten unter sonst identischen Propagations- sowie Gärbedingungen. So konnte beispielsweise der Hefestamm TUM 127 bereits zu Gärbeginn hohe Konzentrationen an Isoamylacetat bilden, die Expressionsraten der für die Bildung verantwortlichen Gene ATF1 und ATF2 waren jedoch relativ niedrig. Daher wird vermutet, dass dieser Hefestamm bereits während der Propagation eine größere Menge an den entsprechenden Enzymen bilden kann. Allgemein ist anzumerken, dass einerseits der Zusammenhang zwischen dem Genom einer Hefezelle, den zu einem definierten Zeitpunkt aktivierten Genen (Transkriptom) und der Gesamtheit an Proteinen, die ebenfalls zu einem definierten Zeitpunkt vorliegen (Proteom), sehr komplex ist, andererseits die Enzymmenge bzw. die Enzymaktivität mittels Genexpressionsmessungen nicht erfasst werden (Wellhoener, 2006). Die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigten jedoch den Haupteinfluss des Gens

ATF1 auf die Bildung von Isoamylacetat sowie Ethylacetat, während das Gen ATF2 weniger stark exprimiert wurde. Des Weiteren konnten Korrelationen zwischen der Expression des BAT1-Gens und der Bildung von höheren Alkoholen gefunden werden, wenngleich diese Korrelationen niedriger ausfielen als bei ATF1, ATF2 und IAH1. Lediglich die Untersuchung des PAD1-Gens, welches laut Literaturangaben die Bildung von 4-Vinylguajakol steuert, erbrachte keine Korrelation. Vermutlich spielt das im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchte Gen FDC1 eine größere Rolle bei der Bildung des sogenannten Nelkenaromas. Einen eindeutig negativen Einfluss auf die Expression der Gene ATF1 und ATF2 hatte eine Druckgärung im Vergleich zur drucklosen Fermentation, was in einem niedrigeren Gehalt an korrespondierenden Essigsäureestern resultierte. Auch die Hydrolyse dieser Ester wurde unter Druck reduziert, was anhand des Gens IAH1 beobachtet werden konnte.

Neben der Aromastoffsynthese war die Darstellung von Aromaverlusten während der Hauptgärung durch CO<sub>2</sub> ein Themenschwerpunkt. Um diese Verluste nachzuvollziehen, wurde zunächst ein Versuchsaufbau verwendet, der eine klassische offene Gärung in der Weizenbier-Produktion simulieren sollte. Durch die Zugabe von diversen Aromakomponenten zu Wasser und der definierten Ausgasung mittels CO<sub>2</sub>, sollten die Verluste an Aromastoffen während der Hauptgärung nachempfunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Leitkomponente Isoamylacetat die flüchtigste der getesteten Substanzen ist, gefolgt von Ethylacetat. 4-Vinylguajakol war dagegen nur sehr schwer flüchtig und verblieb nach dem Ausgasungsvorgang nahezu vollständig in der Untersuchungsflüssigkeit. Des Weiteren konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Gärtemperatur und den Aromaverlusten definiert werden. Im Gegensatz zur Temperatur spielte der pH-Wert keine Rolle für die Ausgasungsvorgänge während einer simulierten Gärung. Auch Alkoholkonzentrationen bis zu 4 %vol. hatten keinen Einfluss.

Diese Versuchsergebnisse fanden Bestätigung in der Definition der relativen Flüchtigkeiten der wichtigsten Aromakomponenten. Die Ermittlung von relativen Flüchtigkeiten diente dazu, eine Aussage über die Flüchtigkeit einer Stoffkomponente aus einem definierten Medium unter einer bestimmten Temperatureinwirkung treffen zu können. In dieser Arbeit wurden die Flüchtigkeiten von Isoamylacetat, Ethylacetat, 3-Methylbutanol und 4-Vinylguajakol mittels *Rayleigh*-Destillation bestimmt.

Im Anschluss an die Aromasynthese während der Hauptgärung folgt die geschmackliche Abrundung von Weizenbieren in der Reifungsphase. Neben dem

Abbau von unerwünschten Jungbukettstoffen wie z.B. Diacetyl ändern sich auch die Konzentrationen an erwünschten Aromakomponenten. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten kaum Unterschiede zwischen Flaschen- und Tankreifungsverfahren. Auch durch die Wahl des Hefestamms konnte keine sensorisch relevante gesteigerte Bildung an Aromaleitkomponenten durch die Reifung erreicht werden. Die größten Veränderungen der Aromastoffkonzentrationen konnte während der Reifung durch die Variation der Speisegabe erzielt werden. Durch die Zugabe von Glucose, waren deutliche Steigerungsraten von Isoamylacetat um bis zu 17 % im Vergleich zum Jungbier sichtbar. Auf Basis dieser Untersuchungen ist die Verwendung von Glucose die einzige Möglichkeit, den Gehalt an Isoamylacetat während der Reifungsphase signifikant zu steigern.

Eine vielfach genutzte Technologie zur Verbesserung der Trübungsstabilität bei der Weizenbier-Produktion ist die Behandlung der Biere vor der Flaschenfüllung mittels Kurzzeiterhitzung. Diese Technologie wurde in Bezug auf den Einfluss auf Aromakomponenten und die sensorische Stabilität der Weizenbiere getestet. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Verringerungen an Essigsäureestern oder 4-Vinylguajakol durch die Behandlung der Biere mit 150 oder 300 PE. Die zu beobachtenden Konzentrationsunterschiede waren zwischen den frischen Bieren und den Pendants nach einer forcierten Alterung größer als die zwischen den unterschiedlichen Hitzebehandlungen.

Der negative Einfluss von Temperaturen zwischen 30°C und 40°C bei längerer Kontaktzeit auf die sensorische Stabilität von Weizenbieren konnte in Lagerversuchen gezeigt werden, wobei Lagerbedingungen bis 20°C lediglich einen moderaten Abbau von Isoamylacetat und 4-Vinylguajakol nach sich zogen. Höhere Temperaturen führten zu deutlich höheren Abbauraten. Untersuchungen über 308 Tage bei 20°C zeigten, dass die Konzentrationen an diesen beiden Leitkomponenten um bis zu 50 % abnehmen können, während der Gehalt an Ethylacetat relativ konstant bleibt.

## 6 AUSBLICK

Weizenbiere erfreuen sich derzeit größter Beliebtheit. Um das Aroma des Weizenbieres an die Kundenwünsche anpassen zu können, ist es wichtig genauere Kenntnisse über die Aromastoffsynthese dieses Biertyps zu gewinnen. Die vorliegende Arbeit soll einen Überblick über Bildungswege sowie mögliche Verlustquellen der wichtigsten Aromastoffe geben. Mit Hilfe der Genexpressionsmessung konnten erste Einblicke in das Enzym-Bildungsverhalten von Weizenbier-Hefen gewährt werden. Da offensichtlich wurde, dass jede Hefe diesbezüglich ein anderes Verhalten an den Tag legt, war es schwierig, eine allgemeingültige Aussage zu treffen, wann Hefen ihre Enzyme für die Aromastoffsynthese zu bilden versuchen. Um bessere und genauere Aussagen treffen zu können, muss weitere Forschung folgen. Es konnten aber gute bis sehr gute Korrelationen zwischen den Genexpressionsraten der jeweiligen Gene und den korrespondierenden Aromastoffen gefunden werden. Mit Hilfe dieser Technik und weiterer Erfahrung sollte es möglich sein, technologische Umstellungen, die die Hefe betreffen, auch mittels der Genexpressionsmessung sichtbar zu machen (siehe Gärversuche unter Druck). Es eröffnet sich somit ein direkter Blick in die Hefezelle, der auch Rückschlüsse auf das zu erwartende Aromaprofil eines Weizenbieres zulässt.

Ebenso hilfreich für die Brauerei-Praxis sind die Erkenntnisse zu den relativen Flüchtigkeiten der einzelnen Aromakomponenten, die in die technologische Handhabung miteinbezogen werden sollten. Oftmals wird in Brauereien der „Fehler“ begangen, die Gärtemperatur zu erhöhen, um den Estergehalt zu forcieren. Wie die Versuche der Hefecharakterisierungen zeigten, beginnt die Bildung der Essigsäureester meist erst nach 24 h und steigt im Verlauf kontinuierlich an bis zur Stagnation am Ende der Hauptgärung. Es ist demnach zu vermuten, dass die Bildung durch höhere Gärtemperaturen etwas früher einsetzt, die Gärung dann aber nach zwei bis maximal drei Tagen beendet ist, was den Bildungszeitraum dieser wichtigen Ester limitiert. Darüber hinaus haben die Versuche zur Bestimmung der relativen Flüchtigkeit sowie die Simulation einer offenen Gärung gezeigt, dass Isoamylacetat gefolgt von Ethylacetat die höchsten Flüchtigkeiten haben und aus dem Jungbier somit am schnellsten entweichen. Da höhere Alkohole und vor allem 4-Vinylguajakol deutlich schwerer aus dem Medium zu verdrängen sind, entstehen bei hohen Gärtemperaturen sensorisch leerere bzw. phenolische Biere. In folgenden Arbeiten, die dieses Thema

betreffen, sollte der reale Ausgasungsverlust an Aromakomponenten durch die Gärung in Brauereien ermittelt werden und technologische Veränderungen wie z.B. Rückleiten der CO<sub>2</sub> in das Gärmedium getestet werden. Auch wäre es denkbar Methoden zu entwickeln, um die gewünschten Aromakomponenten aus der CO<sub>2</sub> zurückzugewinnen.

Neben Erkenntnissen über die wichtigsten Weizenbierhefestämme sowie technologische Einflussfaktoren wie der Einsatz einer Kurzzeiterhitzung zeigte diese Arbeit auch, dass die Lagerungsbedingungen für das Aromaspektrum eines Weizenbieres äußerst wichtig sind. Vor allem lange Transportwege bei hohen Temperaturen (30 - 40°C) sind extrem schädlich für die Sensorik eines Weizenbieres, was sich auch analytisch nachweisen lässt. Um eine annähernd gleiche Bierqualität auch in entfernten Ländern zu garantieren, müssten moderate Temperaturen auf den Transportwegen gewährleistet sein. Da es jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch sehr kostenintensiv ist, Bier in klimatisierten Containern zu transportieren, ist es sinnvoll, das Weizenbier am besten in der jeweiligen Region zu konsumieren, wo es produziert wurde – zumindest, wenn man ein frisches, fruchtiges und weizenbier-typisches Aroma präferiert.

## 7. ANHANG

### 7.1 Tabellen

Tabelle 35: Herführungs-Bedingungen für die verwendeten Hefestämme

Tag	Aufgabe	Bemerkung
1	Kegs dämpfen; 10 l Weizenbierwürze mit Hefestamm beimpfen; belüften	Weizenbierwürze auf 20°C temperieren und mit synthetischer Luft 20 min. definiert bei 0,5 barÜ belüften
2	belüften	20 min. 0,5 barÜ synthetischer Luft
3	5 l frische Würze zugeben und belüften	Würze temperieren, Messzylinder desinfizieren (Desinfektionsbad); 20 min. 0,5 barÜ synth. Luft
4	belüften	20 min. 0,5 barÜ synth. Luft
5	Würze abziehen und 10 l frische Würze zugeben und anschließend belüften	Alle verwendeten Materialien zum Abziehen des Substrates desinfizieren und 20 min. mit 0,5 barÜ belüften
6	Hefe nochmals belüften	20 min. mit 0,5 barÜ belüften
7	Kegs in 10°C Kammer stellen	

Tabelle 36: Zuckerspektrum vor und nach der Gärung mit TUM 127

TUM 127 [ANFANG]					
Zucker	ZKG 1.1	ZKG 1.2	ZKG 1.3	Nach 0 h	Standardabweichung
Fructose	2,97	2,98	2,56	2,84	0,240
Glucose	9,39	8,65	8,56	8,87	0,455
Saccharose	1,64	0,3	0,42	0,79	0,741
Maltose	54,2	54,08	53,61	53,96	0,312
Maltotriose	13,1	13,11	13,25	13,15	0,084
TUM 127 [ENDE]					
Zucker	ZKG 1.1	ZKG 1.2	ZKG 1.3	Nach 96 h	Standardabweichung
Fructose	0,05	0,05	0,05	0,05	8,5E-18
Glucose	0,05	0,05	0,05	0,05	8,5E-18
Saccharose	0,05	0,05	0,05	0,05	8,5E-18
Maltose	0,19	0,18	0,19	0,19	5,8E-03
Maltotriose	11,65	11,9	12,1	11,88	2,3E-01

Tabelle 37: Überprüfung des Referenzgens RDN18 - ct-Werte

Überprüfung des Referenzgens RDN18 mit TUM 68			
10,489	10,489	10,489	10,489
11,245	11,245	11,245	11,245
11,213	11,213	11,213	11,213
11,216	11,216	11,216	11,216
11,293	11,293	11,293	11,293
11,353	11,353	11,353	11,353
11,593	11,593	11,593	11,593
11,309	11,309	11,309	11,309
11,146	11,146	11,146	11,146
11,567	11,567	11,567	11,567
10,319	10,319	10,319	10,319
10,897	10,897	10,897	10,897
10,839	10,839	10,839	10,839
10,831	10,831	10,831	10,831
10,747	10,747	10,747	10,747
10,599	10,599	10,599	10,599
10,898	10,898	10,898	10,898
10,995	10,995	10,995	10,995
11,295	11,295	11,295	11,295
11,254	11,254	11,254	11,254
11,054	11,054	11,054	11,054
Mittelwert		11,10	
Standardabweichung		0,472	
Konfidenzintervall		0,035	

Tabelle 38: Überprüfung der RNA-Reinheit

Verhältnis	Gen	TUM 68	TUM 127	TUM 175	TUM 214	TUM 505
260/280	RDN	2,1	2,06	2,1	2,06	2,07
260/280	RDN	2,1	2,14	2,14	2,1	2,13
260/280	RDN	2,02	2,12	2,13	2,14	2,14
260/280	RDN	2,05	2,11	2,13	2,7	2,12
260/280	RDN	2,11	2,13	2,13	2,11	2,13
260/280	RDN	2,1	2,13	2,13	1,76	2,1
260/280	RDN	2,09	2,13	2,13	2,01	2,08
260/280	RDN	2,11	2,13	2,11	2,11	2,09
260/280	RDN	2,06	2,06	2,1	2,07	2,05
260/280	RDN	2,12	2,14	2,14	2,11	2,1
260/280	RDN	2,06	2,13	2,13	2,14	2,12
260/280	RDN	2,12	2,12	2,14	2,11	2,14
260/280	RDN	2,09	2,13	2,13	2,13	2,12
260/280	RDN	2,12	2,13	2,13	2,12	2,09
260/280	RDN	2,14	2,11	2,13	2,11	2,1
260/280	RDN	2,06	2,13	2,11	2,09	2,1
Mittelwert		2,09	2,12	2,13	2,12	2,11

Tabelle 39: Genexpressionsdaten inklusive aller Konfidenzintervalle vor Normalisierung mit Formel 14

<b>ATF1</b>	<b>0 h</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>	<b>36 h</b>	<b>48 h</b>	<b>60 h</b>	<b>72 h</b>
Mittelwert TUM 68	0.0014134	0.0024221	0.0229242	0.0279166	0.0500809	0.0032189	0.0098300
Konfidenzintervall	0.0000171	0.0000940	0.0018808	0.0021845	0.0101085	0.0006082	0.0033498
Mittelwert TUM 127	0.0104926	0.0024742	0.0032738	0.0110590	0.0119737	0.0733297	0.0202580
Konfidenzintervall	0.0061075	0.0006297	0.0001635	0.0103585	0.0033092	0.0051107	0.0031632
Mittelwert TUM 175	0.0128754	0.0554706	0.0299191	0.0341228	0.0527234	0.0441538	0.0448927
Konfidenzintervall	0.0065498	0.0029843	0.0072153	0.0019445	0.0049903	0.0013482	0.0087990
Mittelwert TUM 214	0.0153033	0.0249168	0.0109311	0.0109133	0.0155235	0.0328603	0.0104096
Konfidenzintervall	0.0008975	0.0078608	0.0011430	0.0019496	0.0014058	0.0065528	0.0041018
Mittelwert TUM 505	0.0136339	0.0013923	0.0059040	0.0234891	0.0183781	0.0011898	0.0002591
Konfidenzintervall	0.0041263	0.0006840	0.0014963	0.0031419	0.0045012	0.0002473	0.0000979
<b>ATF2</b>	<b>0 h</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>	<b>36 h</b>	<b>48 h</b>	<b>60 h</b>	<b>72 h</b>
Mittelwert TUM 68	0.002782	0.000353	0.000432	0.001800	0.004094	0.029025	0.006082
Konfidenzintervall	0.000070	0.000231	0.000124	0.000109	0.000744	0.000003	0.000358
Mittelwert TUM 127	0.001074	0.000108	0.000337	0.000542	0.000426	0.000595	0.000264
Konfidenzintervall	0.031424	0.001831	0.001761	0.013802	0.010226	0.042823	0.010008
Mittelwert TUM 175	0.019366	0.037950	0.011878	0.008647	0.011004	0.010145	0.008009
Konfidenzintervall	0.000459	0.000344	0.000592	0.000484	0.000280	0.000207	0.000927
Mittelwert TUM 214	0.008294	0.007095	0.000491	0.002842	0.002004	0.008006	0.002378
Konfidenzintervall	0.003017	0.020212	0.002838	0.006701	0.002103	0.008644	0.000871
Mittelwert TUM 505	0.006500	0.001760	0.000707	0.001387	0.001282	0.000422	0.000089
Konfidenzintervall	0.012030	0.001330	0.000888	0.002755	0.005338	0.000049	0.000176
<b>IAH1</b>	<b>0 h</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>	<b>36 h</b>	<b>48 h</b>	<b>60 h</b>	<b>72 h</b>
Mittelwert TUM 68	0.0024979	0.0009948	0.0145700	0.0185157	0.0064076	0.0042446	0.0035693
Konfidenzintervall	0.0042369	0.0000371	0.0009325	0.0056912	0.0009069	0.0003284	0.0011870
Mittelwert TUM 127	0.0107361	0.0010784	0.0033731	0.0054150	0.0042610	0.0059519	0.0026409
Konfidenzintervall	0.0009524	0.0005713	0.0003265	0.0002905	0.0003122	0.0001851	0.0001213
Mittelwert TUM 175	0.0076281	0.0072688	0.0065097	0.0218942	0.0074068	0.0050184	0.0049887
Konfidenzintervall	0.0005625	0.0004209	0.0007256	0.0005923	0.0003426	0.0002539	0.0011354
Mittelwert TUM 214	0.0254812	0.0170227	0.0048199	0.0187809	0.0137993	0.0561308	0.0242128
Konfidenzintervall	0.0002327	0.0056214	0.0014488	0.0020145	0.0014665	0.0033184	0.0010431
Mittelwert TUM 505	0.0050770	0.0061722	0.0012113	0.0041757	0.0040623	0.0016841	0.0013728
Konfidenzintervall	0.0001369	0.0013898	0.0003175	0.0009965	0.0038023	0.0002859	0.0002463
<b>BAT1</b>	<b>0 h</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>	<b>36 h</b>	<b>48 h</b>	<b>60 h</b>	<b>72 h</b>
Mittelwert TUM 68	0.00295788	0.02971592	0.24464811	0.06700562	0.01866631	0.02363331	0.04061933
Konfidenzintervall	0.0005008	0.00138889	0.01189926	0.00124098	0.03458843	0.00758657	0.02198128
Mittelwert TUM 127	0.05555481	0.01224907	0.0217561	0.03473814	0.06996265	0.07249102	0.01778446
Konfidenzintervall	0.00417619	0.00209676	0.00413412	0.0015662	0.00778225	0.00868852	0.00052023
Mittelwert TUM 175	0.10157861	0.64438837	0.33617679	0.18371443	0.21156837	0.12230296	0.12466131
Konfidenzintervall	0.003314	0.03949079	0.06866075	0.004218	0.02312821	0.01226916	0.02036372
Mittelwert TUM 214	0.01426701	0.07676419	0.05611227	0.14346418	0.06284459	0.15318027	0.09108214
Konfidenzintervall	0.01614435	0.08686526	0.06349584	0.16234202	0.07111404	0.17333661	0.10306725
Mittelwert TUM 505	0.01713485	0.01710711	0.01288324	0.03661314	0.04213717	0.00417751	0.00105292
Konfidenzintervall	0.00067358	0.00376844	0.00137873	0.00873308	0.00868592	0.00028951	0.00024842
<b>PAD1</b>	<b>0 h</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>	<b>36 h</b>	<b>48 h</b>	<b>60 h</b>	<b>72 h</b>
Mittelwert TUM 68	6.5229E-05	0.00030013	0.01255023	0.00924494	0.00327204	0.00108802	0.00149716
Konfidenzintervall	5.7593E-05	0.00018439	0.00933702	0.00071114	0.00084897	0.00013915	0.00068726
Mittelwert TUM 127	0.00685033	0.00085799	0.00103219	0.00379108	0.00183657	0.00319332	0.00097988
Konfidenzintervall	0.00047237	8.9283E-05	5.8792E-05	6.1148E-05	0.00013227	0.00013367	5.0353E-05
Mittelwert TUM 175	6.5229E-05	0.00030013	0.00011034	0.00088533	0.0003203	0.00038664	0.0006072
Konfidenzintervall	5.7593E-05	0.00018439	4.0631E-05	0.00029102	7.0049E-05	3.7384E-05	6.4974E-05
Mittelwert TUM 214	6.5229E-05	0.00030013	0.00632094	0.00483468	0.00314756	0.01673758	0.00560929
Konfidenzintervall	5.7593E-05	0.00018439	0.00079102	0.00126371	0.000117	0.00055478	0.00194214
Mittelwert TUM 505	0.00083946	0.00109309	0.00098841	0.00075917	0.00079838	0.00039774	7.8457E-05
Konfidenzintervall	6.8849E-05	5.4804E-05	3.2923E-05	0.00020437	0.00014612	8.1058E-05	7.6714E-06

Tabelle 40: Übersicht über Genexpressionsmessungen der einzelnen Hefestämme – Teil 1

TUM 68	Quotient	Mittelwert	TUM 127	Quotient	Mittelwert	TUM 175	Quotient	Mittelwert
ATF1 0h	1,00	1,00	ATF1 0h	1,00	1,00	ATF1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00			1,00	
	1,00			1,00			1,00	
ATF1 12h	1,76	1,71	ATF1 12h	0,42	0,28	ATF1 12h	8,62	5,20
	1,67			0,21			3,81	
	1,71			0,20			3,17	
ATF1 24h	15,39	16,22	ATF1 24h	0,69	0,40	ATF1 24h	4,22	2,73
	17,62			0,30			2,43	
	15,66			0,20			1,53	
ATF1 36h	19,96	19,75	ATF1 36h	0,90	1,09	ATF1 36h	5,24	3,19
	18,26			1,89			2,35	
	21,04			0,48			1,97	
ATF1 48h	41,42	35,41	ATF1 48h	1,94	1,34	ATF1 48h	9,24	5,15
	29,35			1,32			3,27	
	35,44			0,77			2,95	
ATF1 60h	2,26	2,28	ATF1 60h	16,59	9,16	ATF1 60h	7,05	4,17
	1,90			6,39			2,80	
	2,68			4,50			2,67	
ATF1 72h	8,45	6,94	ATF1 72h	3,66	2,32	ATF1 72h	8,35	4,48
	7,75			1,82			2,39	
	4,63			1,48			2,68	
ATF2 0h	1,00	1,00	ATF2 0h	1,00	1,00	ATF2 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00			1,00	
	1,00			1,00			1,00	
ATF2 12h	1,27	1,03	ATF2 12h	0,35	0,33	ATF2 12h	1,86	1,97
	0,81			0,04			2,27	
	1,00			0,60			1,78	
ATF2 24h	3,53	3,98	ATF2 24h	0,40	0,30	ATF2 24h	0,62	0,62
	4,02			0,10			0,72	
	4,38			0,40			0,51	
ATF2 36h	4,06	4,52	ATF2 36h	0,90	0,93	ATF2 36h	0,41	0,45
	4,54			0,52			0,50	
	4,97			1,36			0,44	
ATF2 48h	2,36	1,42	ATF2 48h	4,28	3,40	ATF2 48h	0,54	0,57
	0,89			0,64			0,63	
	1,00			5,26			0,55	
ATF2 60h	1,08	1,16	ATF2 60h	39,98	23,91	ATF2 60h	0,52	0,53
	1,13			5,12			0,57	
	1,28			26,62			0,49	
ATF2 72h	1,37	1,23	ATF2 72h	7,17	5,10	ATF2 72h	0,35	0,42
	1,51			0,97			0,45	
	0,80			7,15			0,44	
IAH1 0h	1,00	1,00	IAH1 0h	1,00	1,00	IAH1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00			1,00	
	1,00			1,00			1,00	
IAH1 12h	0,50	0,31	IAH1 12h	0,08	0,10	IAH1 12h	0,98	0,96
	0,21			0,14			1,05	
	0,23			0,07			0,84	
IAH1 24h	6,42	4,43	IAH1 24h	0,28	0,32	IAH1 24h	0,93	0,85
	3,24			0,32			0,80	
	3,64			0,35			0,83	
IAH1 36h	6,27	5,33	IAH1 36h	0,47	0,51	IAH1 36h	2,87	2,88
	4,13			0,48			3,01	
	5,58			0,57			2,74	
IAH1 48h	3,34	2,03	IAH1 48h	0,40	0,40	IAH1 48h	0,99	0,97
	1,34			0,39			0,98	
	1,42			0,40			0,94	
IAH1 60h	1,80	1,28	IAH1 60h	0,53	0,56	IAH1 60h	0,69	0,66
	0,98			0,52			0,66	
	1,06			0,61			0,63	
IAH1 72h	2,09	1,17	IAH1 72h	0,24	0,25	IAH1 72h	0,59	0,65
	0,57			0,24			0,61	
	0,85			0,26			0,75	
BAT1 0h	1,00	1,00	BAT1 0h	1,00	1,00	BAT1 0h	1,00	1,00

## 7 Anhang

	1,00			1,00			1,00	
	1,00			1,00			1,00	
BAT1 12h	9,84	10,17	BAT1 12h	0,23	0,22	BAT1 12h	6,13	6,34
	11,65			0,23			6,44	
	9,03			0,19			6,45	
BAT1 24h	88,52	83,87	BAT1 24h	0,29	0,40	BAT1 24h	3,89	3,31
	92,73			0,44			3,41	
	70,34			0,45			2,64	
BAT1 36h	22,69	22,99	BAT1 36h	0,61	0,63	BAT1 36h	1,85	1,81
	26,55			0,64			1,80	
	19,72			0,64			1,78	
BAT1 48h	8,90	6,88	BAT1 48h	1,29	1,26	BAT1 48h	2,38	2,09
	11,41			1,30			1,88	
	0,33			1,18			2,01	
BAT1 60h	8,89	8,69	BAT1 60h	1,31	1,36	BAT1 60h	1,29	1,18
	12,07			1,24			1,10	
	5,10			1,51			1,16	
BAT1 72h	15,47	14,58	BAT1 72h	0,29	0,32	BAT1 72h	1,47	1,23
	22,60			0,33			1,10	
	5,67			0,34			1,12	
PAD1 0h	1,00	1,00	PAD1 0h	1,00	1,00	PAD1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00			1,00	
	1,00			1,00			1,00	
PAD1 12h	1,47	6,92	PAD1 12h	0,14	0,13	PAD1 12h	1,47	6,92
	10,70			0,11			10,70	
	8,60			0,13			8,60	
PAD1 24h	174,21	231,31	PAD1 24h	0,15	0,15	PAD1 24h	0,96	2,58
	113,11			0,14			1,57	
	406,60			0,17			5,20	
PAD1 36h	74,90	203,16	PAD1 36h	0,56	0,55	PAD1 36h	9,53	17,38
	217,88			0,52			17,76	
	316,71			0,59			24,86	
PAD1 48h	32,61	65,78	PAD1 48h	0,29	0,27	PAD1 48h	3,10	6,55
	72,53			0,23			7,09	
	92,19			0,29			9,46	
PAD1 60h	7,88	24,75	PAD1 60h	0,49	0,47	PAD1 60h	3,23	8,69
	26,78			0,43			7,70	
	39,61			0,48			15,14	
PAD1 72h	13,72	29,16	PAD1 72h	0,14	0,14	PAD1 72h	5,22	13,05
	43,77			0,14			14,08	
	29,99			0,15			19,85	

Tabelle 41: Übersicht über Genexpressionsmessungen der einzelnen Hefestämme – Teil 2

TUM 214	Quotient	Mittelwert	TUM 505	Quotient	Mittelwert
ATF1 0h	1,00	1,00	ATF1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
ATF1 12h	2,20	1,64	ATF1 12h	0,21	0,12
	1,26			0,09	
	1,45			0,05	
ATF1 24h	0,68	0,71	ATF1 24h	0,60	0,45
	0,74			0,31	
	0,72			0,45	
ATF1 36h	0,71	0,71	ATF1 36h	2,62	1,85
	0,79			1,67	
	0,63			1,25	
ATF1 48h	1,08	1,02	ATF1 48h	2,14	1,45
	0,87			0,91	
	1,11			1,30	
ATF1 60h	2,26	2,16	ATF1 60h	0,12	0,09
	1,64			0,09	
	2,59			0,06	
ATF1 72h	0,96	0,68	ATF1 72h	0,04	0,02
	0,58			0,01	
	0,50			0,01	
ATF2 0h	1,00	1,00	ATF2 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
ATF2 12h	1,14	0,85	ATF2 12h	0,38	0,28
	0,67			0,22	
	0,75			0,24	
ATF2 24h	0,10	0,06	ATF2 24h	0,16	0,11
	0,03			0,08	
	0,04			0,10	
ATF2 36h	0,43	0,34	ATF2 36h	0,28	0,22
	0,26			0,14	
	0,33			0,24	
ATF2 48h	0,21	0,24	ATF2 48h	0,17	0,20
	0,26			0,13	
	0,26			0,29	
ATF2 60h	0,87	0,97	ATF2 60h	0,08	0,07
	0,89			0,06	
	1,15			0,06	
ATF2 72h	0,28	0,29	ATF2 72h	0,02	0,01
	0,27			0,01	
	0,31			0,01	
IAH1 0h	1,00	1,00	IAH1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
IAH1 12h	0,88	0,67	IAH1 12h	1,53	1,22
	0,55			1,07	
	0,57			1,05	
IAH1 24h	0,24	0,19	IAH1 24h	0,30	0,24
	0,17			0,24	
	0,15			0,18	
IAH1 36h	0,74	0,74	IAH1 36h	0,65	0,82
	0,80			0,96	
	0,67			0,85	
IAH1 48h	0,48	0,54	IAH1 48h	0,16	0,79
	0,59			0,75	
	0,56			1,47	
IAH1 60h	2,13	2,20	IAH1 60h	0,34	0,33
	2,13			0,28	
	2,35			0,38	

## 7 Anhang

IAH1 72h	0,95	0,95	IAH1 72h	0,28	0,27
	0,99			0,22	
	0,92			0,31	
BAT1 0h	1,00	1,00	BAT1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
BAT1 12h	7,49	5,67	BAT1 12h	1,17	0,99
	4,75			0,94	
	4,79			0,87	
BAT1 24h	8,67	4,60	BAT1 24h	0,70	0,75
	2,34			0,84	
	2,78			0,72	
BAT1 36h	13,37	10,56	BAT1 36h	2,54	2,13
	7,15			2,01	
	11,16			1,83	
BAT1 48h	6,94	4,76	BAT1 48h	2,44	2,46
	3,54			2,89	
	3,80			2,04	
BAT1 60h	9,53	9,15	BAT1 60h	0,24	0,25
	8,74			0,24	
	9,17			0,27	
BAT1 72h	9,74	6,85	BAT1 72h	0,07	0,06
	5,44			0,06	
	5,37			0,05	
PAD1 0h	1,00	1,00	PAD1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
PAD1 12h	1,47	6,92	PAD1 12h	1,25	1,30
	10,70			1,36	
	8,60			1,31	
PAD1 24h	57,92	135,06	PAD1 24h	1,11	1,18
	130,86			1,17	
	216,39			1,27	
PAD1 36h	34,27	107,33	PAD1 36h	0,77	0,91
	134,96			1,18	
	152,77			0,78	
PAD1 48h	26,53	69,22	PAD1 48h	1,03	0,95
	68,54			0,96	
	112,58			0,85	
PAD1 60h	138,77	372,54	PAD1 60h	0,44	0,48
	356,47			0,39	
	622,40			0,59	
PAD1 72h	51,33	112,17	PAD1 72h	0,09	0,09
	151,15			0,09	
	134,02			0,09	

Tabelle 42: Übersicht über Genexpressionsmessungen unter Druckverhältnissen

Drucklos	Quotient	Mittelwert	1bar Überdruck	Quotient	Mittelwert
ATF1 0h	1,00	1,00	ATF1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
ATF1 12h	16,71	23,37	ATF1 12h	1,48	2,24
	44,86			1,92	
	8,54			3,33	
ATF1 24h	3,41	7,88	ATF1 24h	1,45	2,09
	16,72			2,83	
	3,52			1,99	
ATF1 36h	7,05	8,82	ATF1 36h	4,22	2,78
	13,68			2,30	
	5,71			1,82	
ATF1 48h	3,05	4,07	ATF1 48h	1,55	1,80
	5,39			1,29	
	3,76			2,56	
ATF1 60h	5,05	5,27	ATF1 60h	1,10	2,14
	7,62			1,28	
	3,15			4,04	
ATF1 72h	15,88	18,26	ATF1 72h	2,42	3,15
	24,95			2,14	
	13,95			4,89	
ATF2 0h	1,00	1,00	ATF2 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
ATF2 12h	8,28	6,53	ATF2 12h	8,60	6,04
	7,01			4,97	
	4,30			4,55	
ATF2 24h	7,48	7,50	ATF2 24h	5,11	5,43
	7,82			9,09	
	7,19			2,09	
ATF2 36h	12,56	9,19	ATF2 36h	10,06	5,53
	7,39			4,40	
	7,62			2,12	
ATF2 48h	7,68	6,53	ATF2 48h	2,78	2,07
	10,98			1,95	
	0,95			1,48	
ATF2 60h	15,70	10,03	ATF2 60h	2,49	1,77
	9,87			2,02	
	4,53			0,78	
ATF2 72h	10,66	8,28	ATF2 72h	7,17	3,36
	7,25			1,48	
	6,94			1,42	
IAH1 0h	1,00	1,00	IAH1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
IAH1 12h	3,21	4,59	IAH1 12h	4,36	5,21
	3,85			3,56	
	6,71			7,71	
IAH1 24h	4,59	5,16	IAH1 24h	3,27	5,46
	5,75			7,72	
	5,14			5,40	
IAH1 36h	10,42	9,72	IAH1 36h	6,26	7,44
	6,41			10,57	
	12,32			5,51	
IAH1 48h	4,59	4,53	IAH1 48h	2,71	3,03
	3,51			2,48	
	5,48			3,91	
IAH1 60h	3,79	4,59	IAH1 60h	1,73	2,39
	5,14			1,50	
	4,85			3,94	
IAH1 72h	4,06	4,93	IAH1 72h	2,73	2,64

## 7 Anhang

	4,94			2,24	
	5,78			2,96	
BAT1 0h	1,00	1,00	BAT1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
BAT1 12h	9,84	10,17	BAT1 12h	2,70	3,45
	11,65			3,96	
	9,03			3,70	
BAT1 24h	5,28	4,65	BAT1 24h	6,31	12,00
	4,90			17,17	
	3,78			12,53	
BAT1 36h	9,34	8,88	BAT1 36h	7,25	11,24
	9,63			17,87	
	7,68			8,60	
BAT1 48h	10,02	7,67	BAT1 48h	6,33	7,00
	5,92			7,89	
	7,08			6,77	
BAT1 60h	6,11	5,47	BAT1 60h	5,31	4,79
	5,46			5,09	
	4,85			3,98	
BAT1 72h	4,33	3,68	BAT1 72h	1,60	1,83
	3,80			1,92	
	2,90			1,98	
PAD1 0h	1,00	1,00	PAD1 0h	1,00	1,00
	1,00			1,00	
	1,00			1,00	
PAD1 12h	1,47	6,92	PAD1 12h	28,50	30,75
	10,70			21,19	
	8,60			42,56	
PAD1 24h	0,96	2,58	PAD1 24h	13,05	23,38
	1,57			19,64	
	5,20			37,45	
PAD1 36h	9,53	17,38	PAD1 36h	17,98	33,72
	17,76			22,64	
	24,86			60,54	
PAD1 48h	3,10	6,55	PAD1 48h	8,77	8,45
	7,09			9,25	
	9,46			7,31	
PAD1 60h	3,23	8,69	PAD1 60h	3,15	4,09
	7,70			3,09	
	15,14			6,03	
PAD1 72h	5,22	13,05	PAD1 72h	7,25	8,97
	14,08			6,48	
	19,85			13,19	

Tabelle 43: Prozentuale Verluste an Aromakomponenten in Abhängigkeit der Temperatur während einer simulierten Gärung

Temperatur	Verlust an Isoamylacetat [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
10 °C	22,90	19,19	21,00	<b>21,03</b>	<b>1,86</b>	<b>0,72</b>
15 °C	33,05	31,37	30,75	<b>31,72</b>	<b>1,19</b>	<b>0,46</b>
20 °C	39,78	37,81	44,27	<b>40,62</b>	<b>3,31</b>	<b>1,29</b>
25 °C	49	53,4	49,86	<b>50,75</b>	<b>2,33</b>	<b>0,91</b>
Temperatur	Verlust an Ethylacetat [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
10 °C	3,32	4,86	5,80	<b>4,66</b>	<b>1,25</b>	<b>0,49</b>
15 °C	11,20	10,31	9,72	<b>10,41</b>	<b>0,75</b>	<b>0,29</b>
20 °C	13,77	12,48	12,77	<b>13,01</b>	<b>0,68</b>	<b>0,26</b>
25 °C	17,07	36,50	17,18	<b>23,58</b>	<b>11,19</b>	<b>4,36</b>
Temperatur	Verlust an 4-Vinylguajakol [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
10 °C	0,00	2,26	2,26	<b>1,51</b>	<b>1,30</b>	<b>0,51</b>
15 °C	0,00	3,33	3,33	<b>2,22</b>	<b>1,92</b>	<b>0,75</b>
20 °C	0,00	3,33	3,33	<b>2,22</b>	<b>1,92</b>	<b>0,75</b>
25 °C	0,00	3,33	3,33	<b>2,22</b>	<b>1,92</b>	<b>0,75</b>

Tabelle 44: Prozentuale Verluste an Aromakomponenten in Abhängigkeit des pH-Wertes während einer simulierten Gärung

pH	Verlust an Isoamylacetat [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
4,2	42,20	36,92	36,05	<b>38,39</b>	<b>3,33</b>	<b>1,30</b>
4,5	41,90	37,30	39,10	<b>39,43</b>	<b>2,32</b>	<b>0,90</b>
5	37,47	40,07	42,11	<b>39,88</b>	<b>2,33</b>	<b>0,91</b>
5,5	42,94	40,29	37,10	<b>40,11</b>	<b>2,92</b>	<b>1,14</b>
pH	Verlust an Ethylacetat [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
4,2	17,60	13,42	13,13	<b>14,72</b>	<b>2,50</b>	<b>0,97</b>
4,5	16,22	14,13	14,52	<b>14,96</b>	<b>1,11</b>	<b>0,43</b>
5	14,56	14,05	13,84	<b>14,15</b>	<b>0,37</b>	<b>0,14</b>
5,5	14,55	14,44	12,76	<b>13,92</b>	<b>1,00</b>	<b>0,39</b>
pH	Verlust an 4-Vinylguajakol [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
4,2	0,97	0,94	0,97	<b>0,65</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>
4,5	3,22	3,22	3,22	<b>3,22</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
5	0,00	2,94	2,94	<b>2,20</b>	<b>1,70</b>	<b>0,66</b>
5,5	4,06	0,94	0,91	<b>1,56</b>	<b>1,81</b>	<b>0,70</b>

Tabelle 45: Prozentuale Verluste an Aromakomponenten in Abhängigkeit des Ethanolgehaltes während einer simulierten Gärung

Alkohol	Verlust an Isoamylacetat [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
2 Vol.%	35,46	33,01	38,8	<b>38,39</b>	<b>2,91</b>	<b>1,13</b>
3 Vol.%	34,14	33,96	36,56	<b>39,43</b>	<b>1,45</b>	<b>0,57</b>
4 Vol.%	28,60	33,18	35,08	<b>39,88</b>	<b>3,33</b>	<b>1,30</b>
5 Vol.%	47,16	39,70	40,81	<b>40,11</b>	<b>4,03</b>	<b>1,57</b>
Alkohol	Verlust an Ethylacetat [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
2 Vol.%	13,46	11,45	15,36	<b>14,72</b>	<b>1,96</b>	<b>0,76</b>
3 Vol.%	14,89	16,52	17,52	<b>14,96</b>	<b>1,33</b>	<b>0,52</b>
4 Vol.%	14,27	18,02	15,01	<b>14,15</b>	<b>1,99</b>	<b>0,77</b>
5 Vol.%	27,23	27,09	28,94	<b>13,92</b>	<b>1,03</b>	<b>0,40</b>
Alkohol	Verlust an 4-Vinylguajakol [%]			Mittelwert	StabW	Konfidenz
2 Vol.%	1,67	4,14	1,67	<b>0,65</b>	<b>1,43</b>	<b>0,56</b>
3 Vol.%	0,00	5,13	2,50	<b>2,15</b>	<b>2,57</b>	<b>1,00</b>
4 Vol.%	0,75	0,75	0,00	<b>2,20</b>	<b>0,43</b>	<b>0,17</b>
5 Vol.%	0,00	2,43	2,43	<b>1,56</b>	<b>1,40</b>	<b>0,55</b>

Tabelle 46: Simulierte Aromaverluste bei unterschiedlicher Behandlungsweise

Bezeichnung	Probe	Ethylacetat [mg/l]	1-Propanol [mg/l]	Isobutanol [mg/l]	Isoamylacetat [mg/l]	Amylalkohole [mg/l]	4-Vinylguajakol [mg/l]	4-Vinylphenol [mg/l]
Weizenbier frisch eingeschenkt	1	51,00	17,86	28,25	2,89	52,15	3,19	1,65
Weizenbier frisch eingeschenkt	2	49,20	17,86	27,27	2,93	49,40	3,19	1,66
Weizenbier frisch eingeschenkt	3	47,79	17,36	27,00	2,85	48,81	3,40	1,77
Weizenbier frisch eingeschenkt	Mittelwert	49,33	17,69	27,51	2,89	50,12	3,26	1,69
nach 40 min	1	45,51	17,02	27,56	2,32	47,55	3,08	1,60
nach 40 min	2	47,92	17,88	28,48	2,55	49,17	3,31	1,74
nach 40 min	3	45,47	17,60	28,48	2,31	49,04	3,31	1,73
nach 40 min	Mittelwert	46,30	17,50	28,17	2,39	48,59	3,23	1,69
nach 60 min	1	41,45	16,14	26,54	2,12	46,88	4,03	2,14
nach 60 min	2	42,50	16,76	27,62	2,05	48,28	3,58	1,86
nach 60 min	3	46,27	17,64	28,06	2,50	49,77	2,92	1,50
nach 60 min	Mittelwert	43,41	16,85	27,41	2,22	48,31	3,51	1,83
60 min geschwenkt	1	37,88	17,16	28,23	1,77	49,04	3,25	1,71
60 min geschwenkt	2	34,52	16,43	27,41	1,54	47,22	3,30	1,74
60 min geschwenkt	3	36,00	17,48	28,37	1,80	48,51	3,31	1,74
60 min geschwenkt	Mittelwert	36,13	17,02	28,00	1,70	48,26	3,29	1,73

Tabelle 47: Überblick über die Ergebnisse der Reifungsversuche

TUM 68 mit Maltose als Speisegabe									
Gärungsnebenprodukte [mg/l]	Jungbier	Tank 1.2	Tank 1.3.	Tank 1.4.	Ø ZKT's				
Acetaldehyd	3,13	5,7	16,48	11,25	11,1				
Ethylacetat	35,30	39,33	37,76	37,64	38,2				
Isoamylacetat	2,05	2,29	2,26	2,31	2,3				
i-Butanol	23,07	30,41	29,5	28,47	29,5				
n-Propanol	14,52	18,25	18,42	17,64	18,1				
Amylalkohole	44,56	53,92	52,36	52,54	52,9				
4-Vinylguajakol	2,6	2,54	2,72	2,34	2,5				
4-Vinylphenol	1,4	1,44	1,51	1,36	1,4				
TUM 68 mit Glucose als Speisegabe									
Gärungsnebenprodukte [mg/l]	Jungbier	Tank 1.2	Tank 1.3.	Tank 1.4.	Ø ZKT's				
Acetaldehyd	3,13	8,61	8,25	8,52	8,5				
Ethylacetat	35,30	38,88	39,3	35,34	37,8				
Isoamylacetat	2,05	2,49	2,37	2,37	2,4				
i-Butanol	23,07	31,63	29,29	27,81	29,6				
n-Propanol	14,52	19,72	17,76	17,53	18,3				
Amylalkohole	44,56	55,72	53,29	51,02	53,3				
4-Vinylguajakol	2,6	2,72	2,76	2,57	2,7				
4-Vinylphenol	1,4	1,5	1,51	1,43	1,5				
TUM 68 mit Würze als Speisegabe									
Gärungsnebenprodukte [mg/l]	Jungbier	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Flaschen	Tank 1.2	Tank 1.3.	Tank 1.4.	Ø ZKT's
Acetaldehyd	3,13	2,56	2,25	2,19	2,33	3,18	3,83	3,7	3,6
Ethylacetat	35,30	30,62	28,63	31,12	30,12	32,41	35,32	34,08	33,9
Isoamylacetat	1,99	1,85	1,86	1,73	1,81	1,79	1,85	1,91	1,9
i-Butanol	23,07	17,75	16,8	17,16	17,2	25,56	26,49	26,26	26,1
n-Propanol	14,52	13	14,89	13,46	13,78	15,78	16,06	16,33	16,1
Amylalkohole	44,56	43,98	40,88	41,62	42,16	46,99	48,52	47,65	47,7
4-Vinylguajakol	2,6	2,66	2,78	2,6	2,68	2,67	2,63	2,69	2,7
4-Vinylphenol	1,4	1,52	1,51	1,55	1,53	1,54	1,54	1,56	1,5
TUM 127 mit Würze als Speisegabe									
Gärungsnebenprodukte [mg/l]	Jungbier	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Flaschen	Tank 1.2	Tank 1.3.	Tank 1.4.	Ø ZKT's
Acetaldehyd	3,13	2,79	2,81	2,62	2,74	7,42	14,97	12,11	11,5
Ethylacetat	35,30	36,35	34,52	35,06	35,31	36,73	37,46	39,04	37,7
Isoamylacetat	2,05	1,92	1,89	2,01	1,94	2,23	1,98	2,01	2,1
i-Butanol	23,07	26,98	26,65	25,34	26,3	27,16	27,01	27,63	27,3
n-Propanol	14,52	15,22	15,58	15,01	15,27	15,59	15,97	15,96	15,8
Amylalkohole	44,56	45,01	46,09	45,56	45,55	47,79	48,33	49,4	48,5
4-Vinylguajakol	2,6	2,39	2,23	2,35	2,32	2,57	2,42	2,54	2,5
4-Vinylphenol	1,4	1,35	1,42	1,38	1,38	1,46	1,4	1,46	1,4
TUM 505 mit Würze als Speisegabe									
Gärungsnebenprodukte [mg/l]	Jungbier	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Flaschen	Tank 1.2	Tank 1.3.	Tank 1.4.	Ø ZKT's
Acetaldehyd	3,13	3,99	2,59	3,56	3,38	40,71	42,22	-	41,5
Ethylacetat	35,30	34,96	32,88	33,97	33,94	32,83	39,01	-	35,9
Isoamylacetat	2,05	2,49	2,47	2,55	2,51	1,86	2,59	-	2,2
i-Butanol	23,07	21,86	23,01	21,09	22,02	25,64	21,41	-	23,5
n-Propanol	14,52	15,92	15,71	16,51	15,97	16,58	15,89	-	16,2
Amylalkohole	44,56	51,95	51,06	51,53	51,51	50,32	51,54	-	50,9
4-Vinylguajakol	2,6	2,12	2,21	2,63	2,32	2,29	2,25	-	2,3
4-Vinylphenol	1,4	1,76	1,79	1,89	1,81	1,29	1,56	-	1,4

Tabelle 48: Übersicht über KZE-Versuche im Labormaßstab

<b>Nullprobe</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	34,51	33,62	36,9	35,01	1,70	1,92
Isoamylacetat	3,12	3	3,12	3,08	0,07	0,08
Amylalkohole	55,96	52,77	56,58	55,10	2,04	2,31
<b>150 PE</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	33,67	33,86	35,02	34,18	0,73	0,83
Isoamylacetat	2,54	2,66	2,7	2,63	0,08	0,09
Amylalkohole	54,48	55,15	55,87	55,17	0,70	0,79
<b>300 PE</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	33,67	34,02	33,87	33,85	0,18	0,20
Isoamylacetat	2,7	2,7	2,67	2,69	0,02	0,02
Amylalkohole	55,25	54,93	56,29	55,49	0,71	0,80

Tabelle 49: Übersicht über die KZE- Versuche im Brauereimaßstab - frischer Zustand

<b>Nullprobe</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	27,2	48,5	38,09	37,92	10,62	12,02
Isoamylacetat	2,4	6,1	4,86	4,45	1,85	2,09
Amylalkohole	50,7	90,1	75,17	72,01	19,88	22,50
4-Vinylguajakol	2,8	3,0	1,90	2,59	0,60	0,68
<b>150 PE</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	28,97	48,67	38,71	38,78	9,85	11,15
Isoamylacetat	2,50	6,30	5,04	4,61	1,94	2,19
Amylalkohole	55,68	91,37	75,44	74,16	17,88	20,24
4-Vinylguajakol	2,75	2,69	2,11	2,52	0,35	0,40
<b>300 PE</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	28,16	44,98	39,51	37,55	8,58	9,71
Isoamylacetat	2,51	6,01	5,04	4,52	1,81	2,04
Amylalkohole	55,16	86,87	78,99	73,67	16,51	18,68
4-Vinylguajakol	2,79	2,80	2,18	2,59	0,35	0,40

Tabelle 50: Übersicht über die KZE-Versuche im Brauereimaßstab - forciert gealterter Zustand

<b>Nullprobe</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	32,63	44,16	39,30	38,69	5,79	6,55
Isoamylacetat	3,13	5,65	4,96	4,58	1,30	1,48
Amylalkohole	54,86	85,72	77,65	72,74	16,00	18,11
4-Vinylguajakol	2,54	2,61	2,05	2,40	0,31	0,35
<b>150 PE</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	32,62	42,97	37,86	37,82	5,17	5,85
Isoamylacetat	3,16	5,65	4,92	4,58	1,28	1,45
Amylalkohole	55,69	83,56	75,61	71,62	14,36	16,24
4-Vinylguajakol	2,58	2,29	1,99	2,29	0,30	0,33
<b>300 PE</b>						
Stoffkomponente	Wert 1 [mg/l]	Wert 2 [mg/l]	Wert 3 [mg/l]	Mittelwert [mg/l]	Standardabw.	Konfidenz
Ethylacetat	30,97	46,38	36,26	37,87	7,83	8,86
Isoamylacetat	3,05	6,16	4,52	4,58	1,55	1,76
Amylalkohole	53,06	89,13	73,55	71,91	18,09	20,47
4-Vinylguajakol	2,55	2,45	2,08	2,36	0,25	0,28

Tabelle 51: Überblick über die Ergebnisse der Alterungsindikatoren bei den KZE-Versuchen

Alterungsindikatoren [ $\mu\text{g/l}$ ]						
Mittelwerte aus Charge 1						
	Vor KZE		150PE		300PE	
Komponente:	frisch	alt	frisch	alt	frisch	alt
3-Methyl-Butanal	4,73	6,27	11,27	6,00	5,17	6,27
2-Methyl-Butanal	5,20	5,83	7,34	5,90	6,00	6,57
2-Furfural	6,27	19,07	11,67	17,90	6,80	19,00
2-Acetylfuran	2,70	2,50	7,27	3,67	3,37	3,90
5-Methylfurfural	3,00	2,33	7,60	3,27	3,37	3,53
Benzaldehyd	0,67	0,77	2,77	0,87	0,87	0,83
2-Propinylfurfural	0,50	0,30	0,03	0,50	0,37	0,27
2-Phenyl-Ehtanal	5,47	7,63	30,47	8,77	5,07	10,23
Bernsteinsäure-Diethylether	2,03	1,20	4,87	1,60	2,07	1,63
Nicotinsäure-Ethyl-Ester	0,13	6,03	11,77	6,97	0,70	9,70
Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester	1,43	1,60	2,40	1,53	3,67	0,03
$\gamma$ -Nonalacton	54,00	48,60	65,00	61,77	59,93	79,40
Mittelwerte aus Charge 2						
	Vor KZE		150PE		300PE	
Komponente:	frisch	alt	frisch	alt	frisch	alt
3-Methyl-Butanal	4,30	4,77	4,13	4,97	4,60	5,47
2-Methyl-Butanal	32,17	17,73	22,77	21,27	18,70	27,23
2-Furfural	14,55	21,53	9,23	22,93	8,53	21,65
2-Acetylfuran	3,47	2,97	2,77	3,17	2,73	3,67
5-Methylfurfural	4,10	3,23	3,47	3,13	3,57	3,43
Benzaldehyd	0,87	0,57	0,60	0,53	0,80	0,93
2-Propinylfurfural	0,20	0,70	0,47	0,57	0,47	0,07
2-Phenyl-Ehtanal	5,43	4,53	3,73	4,83	4,37	6,67
Bernsteinsäure-Diethylether	2,30	1,47	1,80	1,57	1,63	1,80
Nicotonsäure-Ethyl-Ester	0,63	4,70	-0,07	5,67	-0,37	8,87
Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester	0,50	1,63	-0,17	2,03	1,40	0,37
$\gamma$ -Nonalacton	78,47	79,35	55,70	89,75	56,53	98,27
Mittelwerte aus Charge 3						
	Vor KZE		150PE		300PE	
Komponente:	frisch	alt	frisch	alt	frisch	alt
3-Methyl-Butanal	5,20	6,03	5,07	5,70	5,37	6,20
2-Methyl-Butanal	13,30	12,17	14,23	13,47	20,97	13,27
2-Furfural	8,10	23,07	10,53	24,33	11,60	25,75
2-Acetylfuran	3,60	3,73	3,73	3,73	3,70	3,80
5-Methylfurfural	3,03	3,17	3,43	3,23	3,57	2,97
Benzaldehyd	0,87	1,03	0,83	0,73	0,83	1,03
2-Propinylfufural	0,43	0,57	0,60	0,60	0,13	0,50
2-Phenyl-Ehtanal	3,60	6,33	3,20	4,83	4,90	6,23
Bernsteinsäure-Diethylether	1,53	1,97	1,70	1,97	1,83	1,50
Nicotonsäure-Ethyl-Ester	0,50	6,60	0,97	5,80	1,07	5,27
Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester	2,50	1,77	2,97	2,37	1,97	2,70
$\gamma$ -Nonalacton	56,47	76,13	62,03	71,30	59,25	64,47

Tabelle 52: Analysenwerte der Lagerungsversuche von Bier A

Temperatur	Parameter	0 Tage	14 Tage	28 Tage	42 Tage	56 Tage	84 Tage
4°C	Ethylacetat	29,05	29,08	29,8	25,41	27,76	28,49
	Isoamylacetat	4,2	4,09	3,94	3,75	2,88	2,93
	SKZ	139	141	136	138	133	fehlt
	Wärmeindikatoren	15,38	4,14	18,38	34,82	26,64	16,17
	γ-Nonalacton	15,20	4,14	18,38	28,72	21,49	15,40
	2-Furfural	0,18	0,00	0,00	6,10	5,15	0,77
10 °C	Ethylacetat	29,05	31,16	31,08	31,56	28,85	28,4
	Isoamylacetat	4,20	4,15	3,78	3,83	2,82	2,86
	SKZ	139	139	136	137	131	fehlt
	Wärmeindikatoren	15,38	5,09	19,08	22,48	15,41	17,00
	γ-Nonalacton	15,20	4,63	17,81	22,48	14,75	16,41
	2-Furfural	0,18	0,45	1,27	0,00	0,67	0,59
20°C	Ethylacetat	29,05	29,25	29,95	31,95	25,63	26,51
	Isoamylacetat	4,20	4,05	3,55	2,71	2,68	2,60
	SKZ	139	137	134	139	129	fehlt
	Wärmeindikatoren	15,38	7,85	23,95	21,37	22,10	22,14
	γ-Nonalacton	15,20	7,13	22,22	21,37	19,49	21,45
	2-Furfural	0,18	0,72	1,73	0,00	2,62	0,60
30°C	Ethylacetat	29,05	28,5	28,46	31,4	27,2	26,38
	Isoamylacetat	4,2	3,9	3,5	2,81	2,62	2,66
	SKZ	139	131	121	114	106	fehlt
	Wärmeindikatoren	15,38	5,54	26,65	30,28	38,65	23,76
	γ-Nonalacton	15,20	5,14	25,63	30,12	34,75	23,29
	2-Furfural	0,18	0,39	1,01	0,15	3,90	0,84
40°C	Ethylacetat	29,05	28,88	27,12	27,42	25,57	25,8
	Isoamylacetat	4,2	3,73	3,43	2,88	2,54	2,05
	SKZ	139	121	119	112	104	fehlt
	Wärmeindikatoren	15,38	14,72	29,09	38,93	117,00	205,29
	γ-Nonalacton	15,20	13,53	26,99	23,51	32,07	31,14
	2-Furfural	0,18	1,18	2,10	15,42	84,39	174,15

Tabelle 53: Analysenwerte der Lagerungsversuche von Bier B

Temperatur	Parameter	0 Tage	14 Tage	28 Tage	42 Tage	56 Tage	84 Tage
4°C	Ethylacetat	29,52	29,10	34,50	34,22	35,10	35,70
	Isoamylacetat	3,96	3,95	4,08	4,05	3,96	3,83
	SKZ	123,00	124,00	117,00	116,00	115,00	fehlt
	Wärmeindikatoren	19,20	12,11	21,24	20,87	37,77	25,97
	γ-Nonalacton	19,04	11,42	20,51	20,69	34,55	25,48
10°C	2-Furfural	0,16	0,69	0,73	0,18	3,23	0,48
	Ethylacetat	29,52	29,49	29,55	31,15	35,60	35,10
	Isoamylacetat	3,96	3,94	4,02	3,90	3,71	3,40
	SKZ	123,00	121,00	117,00	115,00	114,00	fehlt
	Wärmeindikatoren	19,20	8,65	22,77	23,94	25,08	27,48
20°C	γ-Nonalacton	19,04	8,10	22,43	23,80	25,08	27,18
	2-Furfural	0,16	0,55	0,34	0,14	0,00	0,31
	Ethylacetat	29,52	30,75	32,48	33,40	35,20	35,70
	Isoamylacetat	3,96	3,80	3,65	3,55	3,60	3,43
	SKZ	123,00	119,00	115,00	112,00	110,00	fehlt
30°C	Wärmeindikatoren	19,20	9,19	30,02	39,23	37,06	36,46
	γ-Nonalacton	19,04	8,70	27,89	37,10	33,63	36,29
	2-Furfural	0,16	0,49	2,13	2,13	3,43	0,17
	Ethylacetat	29,52	30,25	31,35	30,20	30,87	26,60
	Isoamylacetat	3,96	3,80	3,05	2,85	2,98	2,60
40°C	SKZ	123,00	113,00	105,00	97,00	94,00	fehlt
	Wärmeindikatoren	19,20	13,48	31,77	32,68	51,29	61,25
	γ-Nonalacton	19,04	12,98	29,56	32,35	37,05	52,05
	2-Furfural	0,16	0,50	2,21	0,33	14,24	9,21
	Ethylacetat	29,52	31,92	28,05	24,86	26,86	25,50
40°C	Isoamylacetat	3,96	3,17	2,80	2,90	2,81	2,75
	SKZ	123,00	116,00	117,00	111,00	107,00	fehlt
	Wärmeindikatoren	19,20	13,59	40,07	125,00	149,18	270,18
	γ-Nonalacton	19,04	12,68	20,31	42,27	47,93	52,18
	2-Furfural	0,16	0,91	19,76	82,74	101,25	218,00

Tabelle 54: Analysenwerte der Gärungsnebenprodukte der Langzeit-Stabilitätsversuche von Bier A bei 20°C

Lagerzeit [Tage]	Ethylacetat [mg/l]	Isoamylacetat [mg/l]	Amylalkohole [mg/l]	4-Vinylguajakol [mg/l]	4-Vinylphenol [mg/l]
0	47,7	6,1	95,6	3,9	1,6
8	44,8	5,6	92,2	3,8	1,6
22	47,6	5,3	97,2	3,5	1,4
57	47	4,3	96,6	3,4	1,4
78	47,2	3,7	94,9	2,9	1,3
99	50,3	3,6	105	2,7	1,2
120	47	3,2	102,3	2,6	1,2
168	45,7	2,5	97,2	2,4	1,1
196	40,8	2,1	96,2	1,9	1
224	43,1	1,9	102,4	2	1
252	41,9	1,6	98,1	1,6	1
308	39,3	1,1	97	2	0,9

Tabelle 55: Analysenwerte der Alterungsindikatoren der Langzeit-Stabilitätsversuche von Bier A bei 20°C

Lagerzeit [Tage]	Summe Wärmeindikatoren [ $\mu\text{g/l}$ ]	Summe Sauerstoffindikatoren [ $\mu\text{g/l}$ ]	Summe Alterungsindikatoren [ $\mu\text{g/l}$ ]
0	55	15	99
8	68	16	103
22	73	18	122
57	113	25	179
78	100	17	155
99	78	42	164
120	90	31	171
168	85	21	178
196	112	17	206
224	135	19	255
252	131	46	291
308	113	25	249

Tabelle 56: Analysenwerte der Gärungsnebenprodukte der Langzeit-Stabilitätsversuche von Bier B bei 20°C

Lagerzeit [Tage]	Ethylacetat [mg/l]	Isoamylacetat [mg/l]	Amylalkohole [mg/l]	4-Vinylguajakol [mg/l]	4-Vinylphenol [mg/l]
0	30,4	3	62,5	2,1	1,1
8	30,3	2,9	61,7	2,2	1,1
15	31,2	3	64,1	2,1	1,1
23	29,2	2,7	60,1	2	1
30	30,3	2,7	61,4	2	1,1
36	29,3	2,8	60,9	1,9	1
50	29,6	2,6	61,3	1,7	1
64	29	2,5	59,7	1,7	0,9
78	29	2,4	62,4	1,7	0,9
92	31	2,6	66,9	1,7	0,9
106	31,6	2,5	66,5	1,6	1
120	30,9	2,6	69,8	1,6	0,9
134	30,1	2,4	68,1	1,5	0,8
169	30,7	2,3	68,7	1,5	0,8
190	30,1	2,1	67,8	1,4	0,7
211	30,9	2,2	68,5	1,4	0,7
232	31,7	2,2	69,8	1,3	0,7
280	29	2,1	64,8	0,9	0,5
308	27,1	1,9	63,9	1	0,6

Tabelle 57: Analysenwerte der Alterungsindikatoren der Langzeit-Stabilitätsversuche von Bier B bei 20°C

Lagerzeit [Tage]	Summe Wärmeindikatoren [ $\mu\text{g/l}$ ]	Summe Sauerstoffindikatoren [ $\mu\text{g/l}$ ]	Summe Alterungsindikatoren [ $\mu\text{g/l}$ ]
0	39	30	78
8	43	29	81
15	60	36	115
23	42	27	70
30	52	36	93
36	48	38	80
50	66	31	108
64	91	14	130
78	101	20	147
92	109	20	162
106	107	24	151
120	117	32	182
134	121	25	173
169	146	34	216
190	117	26	181
211	101	41	175
232	119	50	219
280	87	9	135
308	120	31	198

## 7.2 Abbildungen

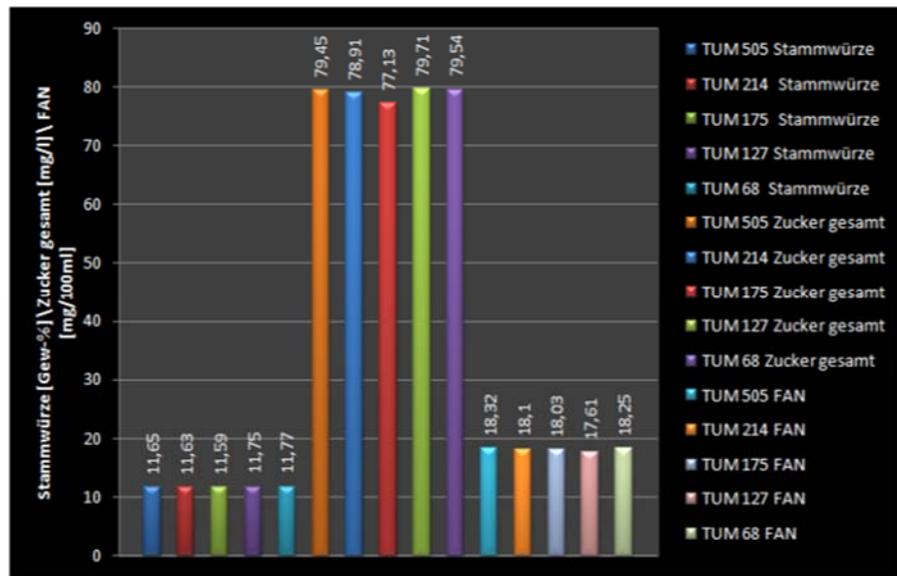


Abbildung 93: Würze-Zusammensetzungen für die Erstellung der Aromaprofile von Weizenbier-Hefestämmen

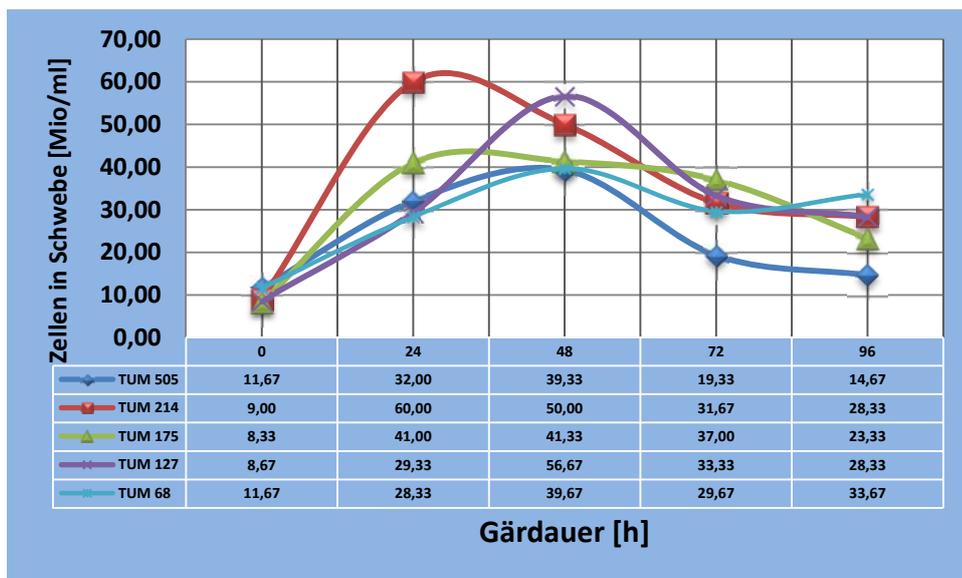


Abbildung 94: Hefezellen in Schwebel während der Hauptgärung zur Charakterisierung der Aromaprofile unterschiedlicher Hefestämme

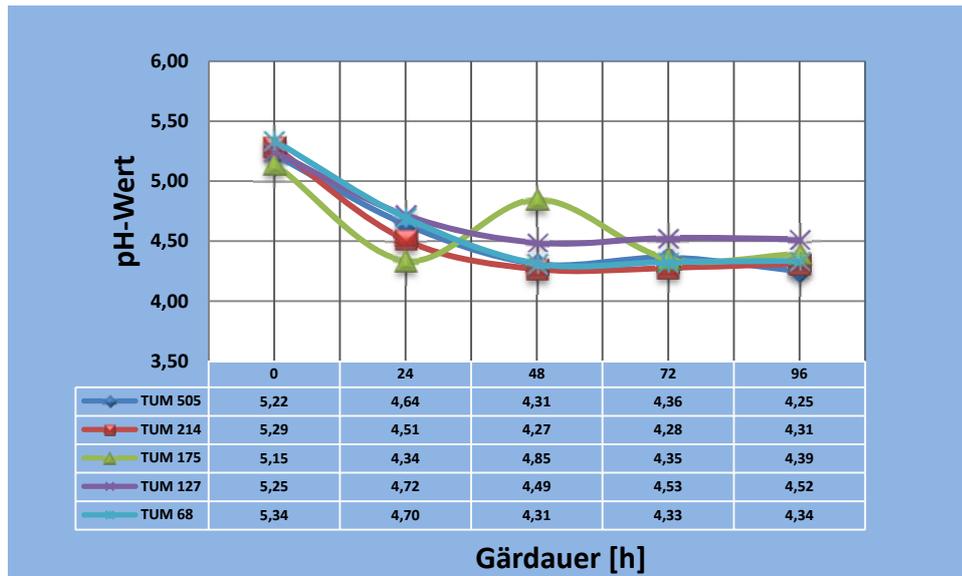


Abbildung 95: pH-Verlauf während der Hauptgärung zur Charakterisierung der Aromaprofile unterschiedlicher Hefestämme

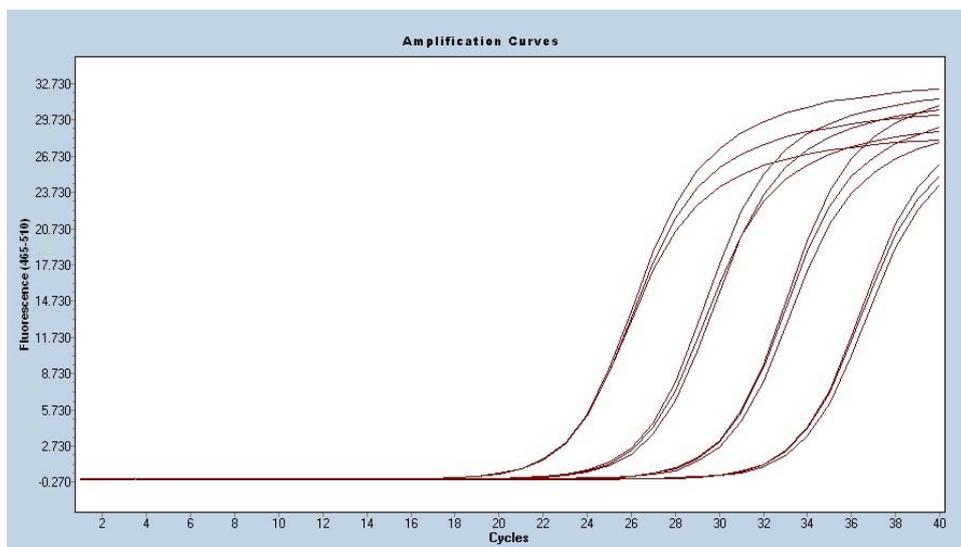


Abbildung 96: Effizienzbestimmung von ATF2

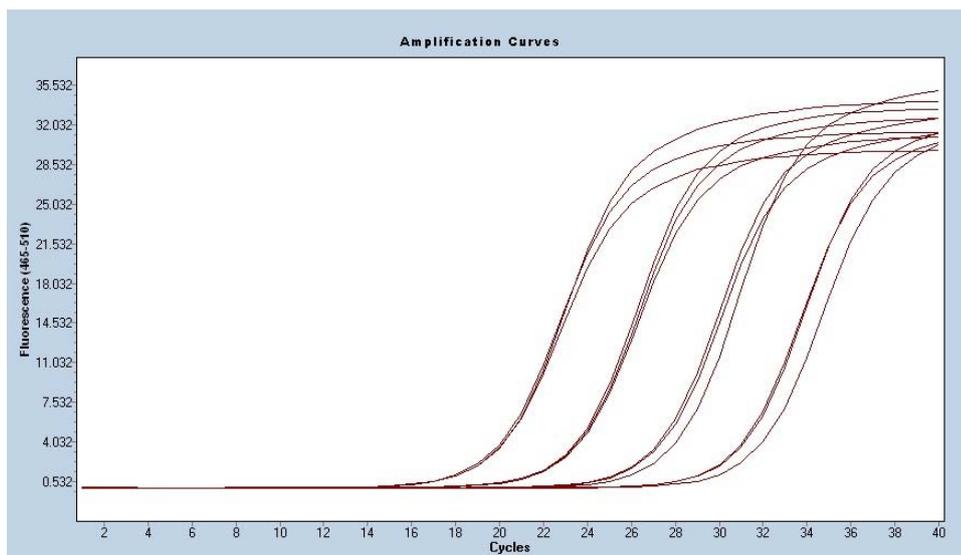


Abbildung 97: Effizienzbestimmung von BAT1

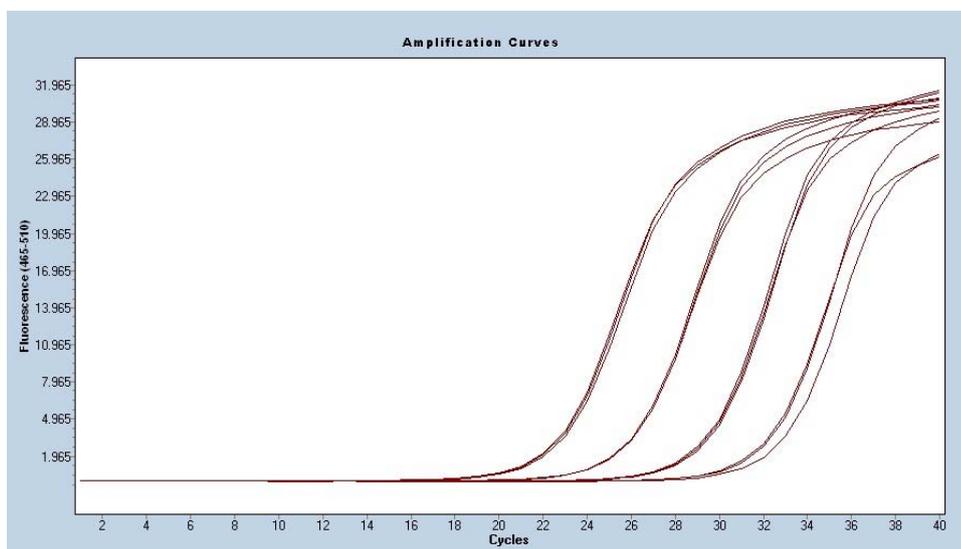


Abbildung 98: Effizienzbestimmung von IAHI

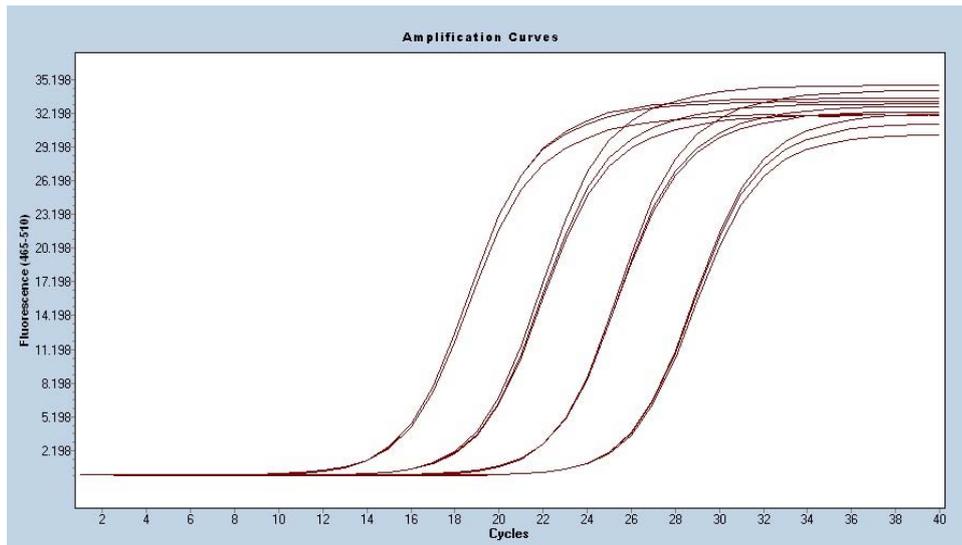


Abbildung 99: Effizienzbestimmung von RDN 18

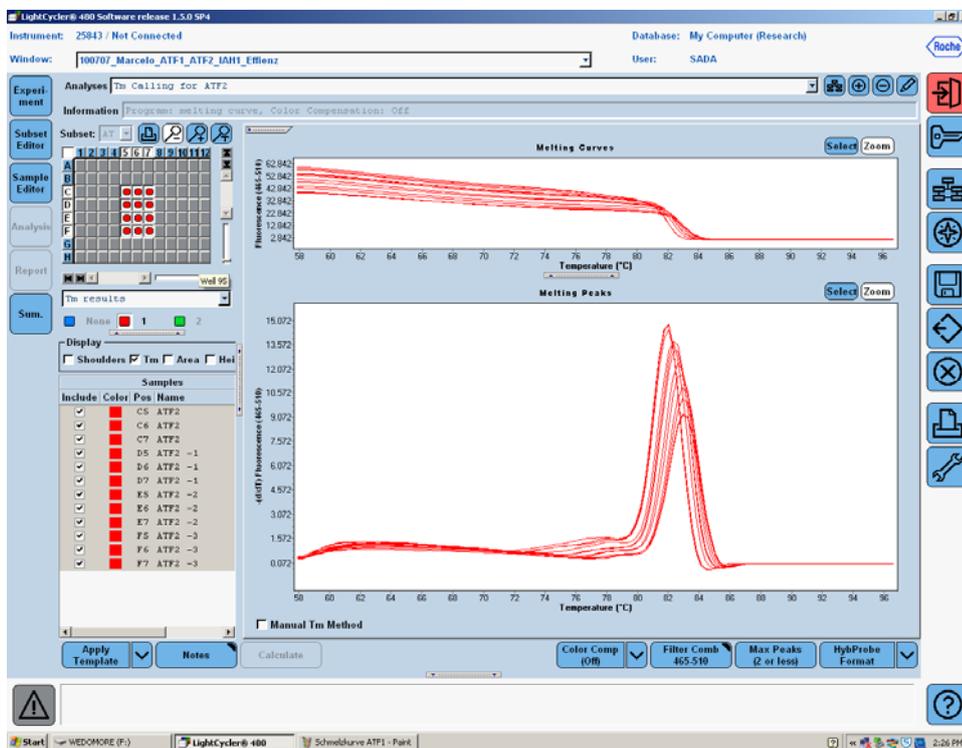


Abbildung 100: Schmelzkurven von ATF2

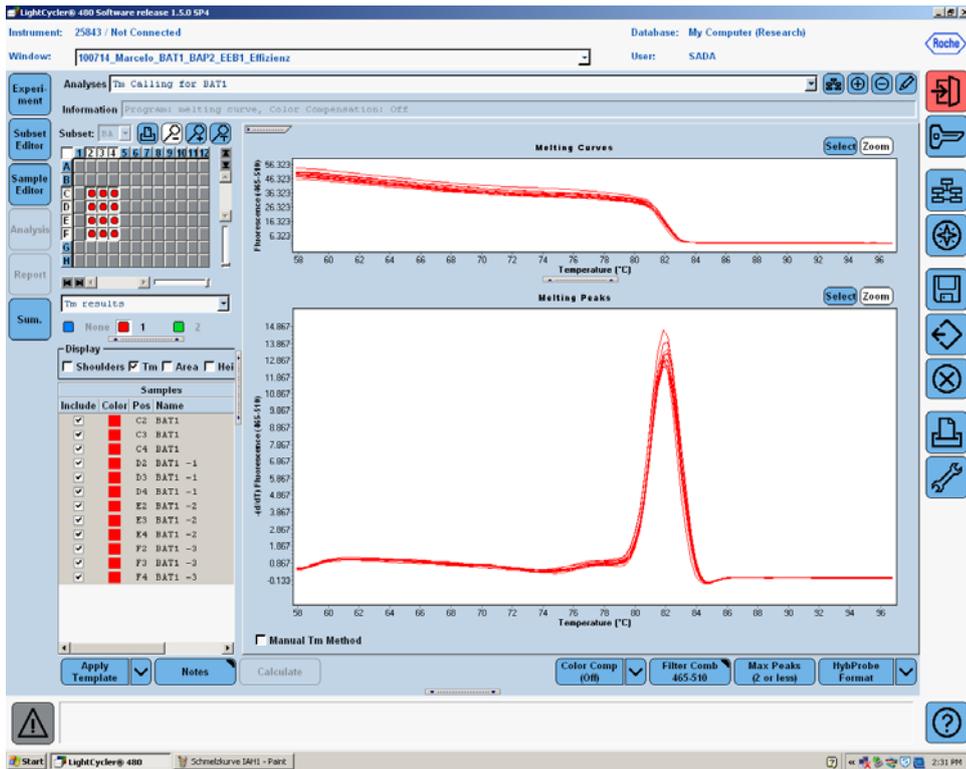


Abbildung 101: Schmelzkurven von BAT1

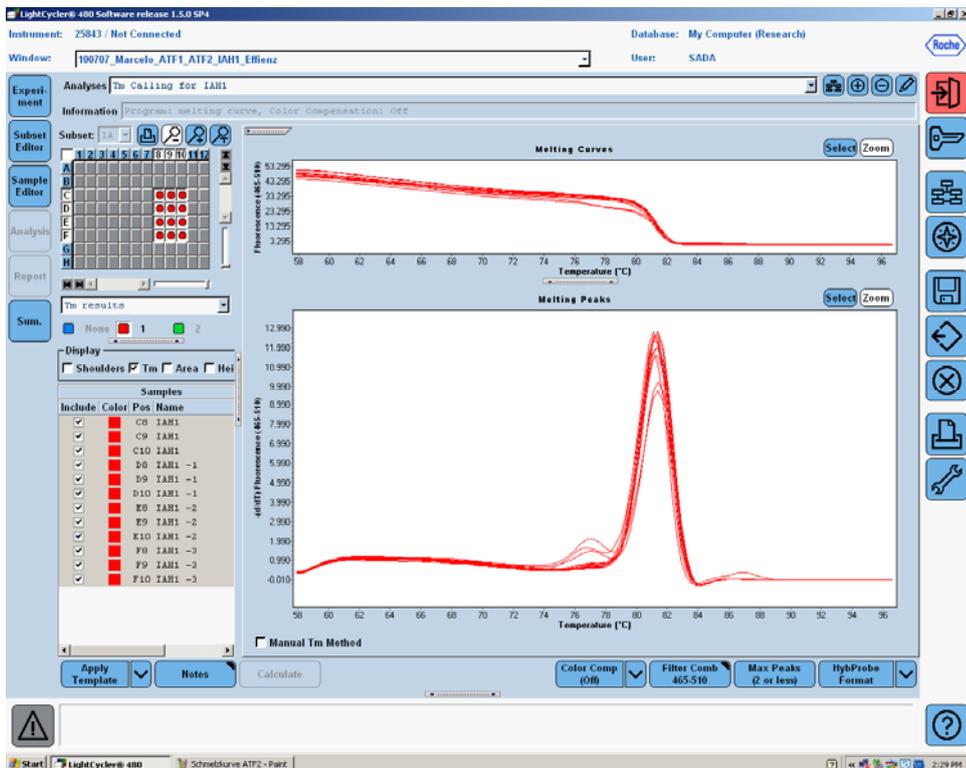


Abbildung 102: Schmelzkurven von IAH1

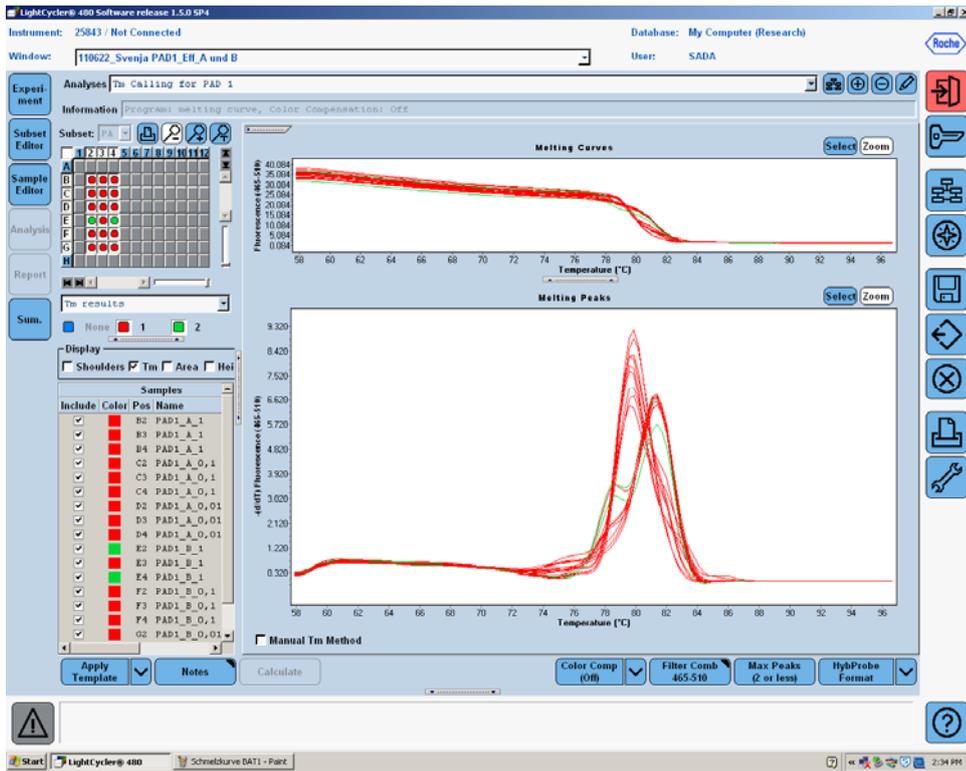


Abbildung 103: Schmelzkurven von PADI1

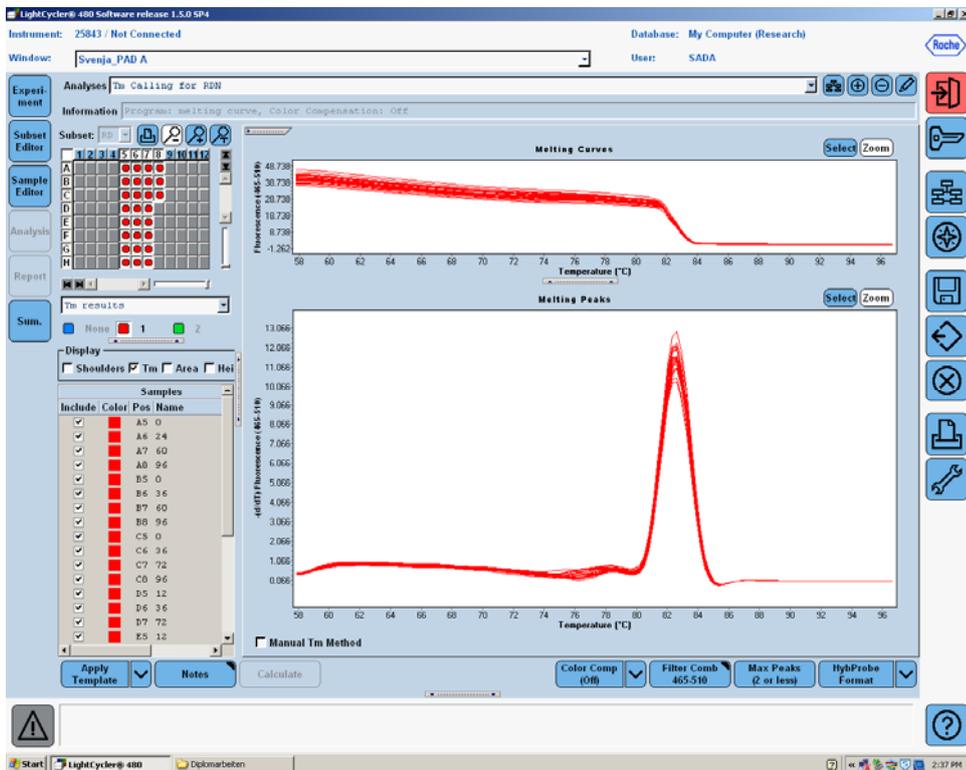


Abbildung 104: Schmelzkurven von RDN18

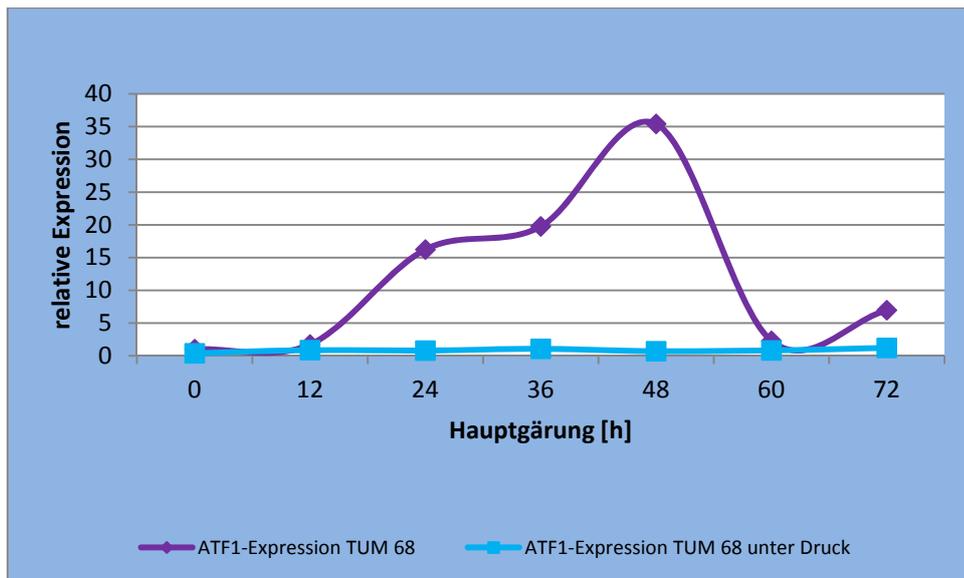


Abbildung 105: Faktorisierte Darstellung der ATF1-Expressionen bei TUM 68 unter Druck

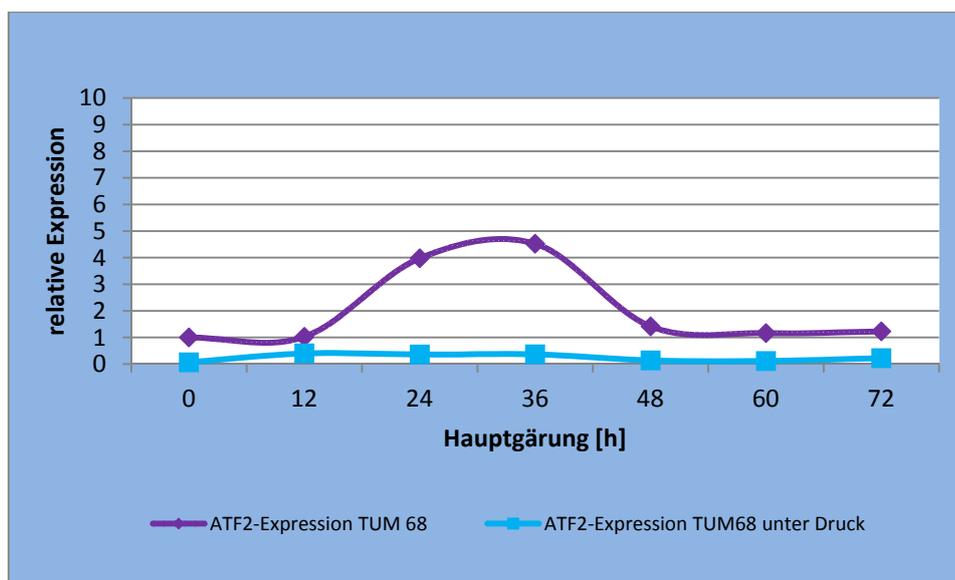


Abbildung 106: Faktorisierte Darstellung der ATF2-Expressionen bei TUM 68 unter Druck

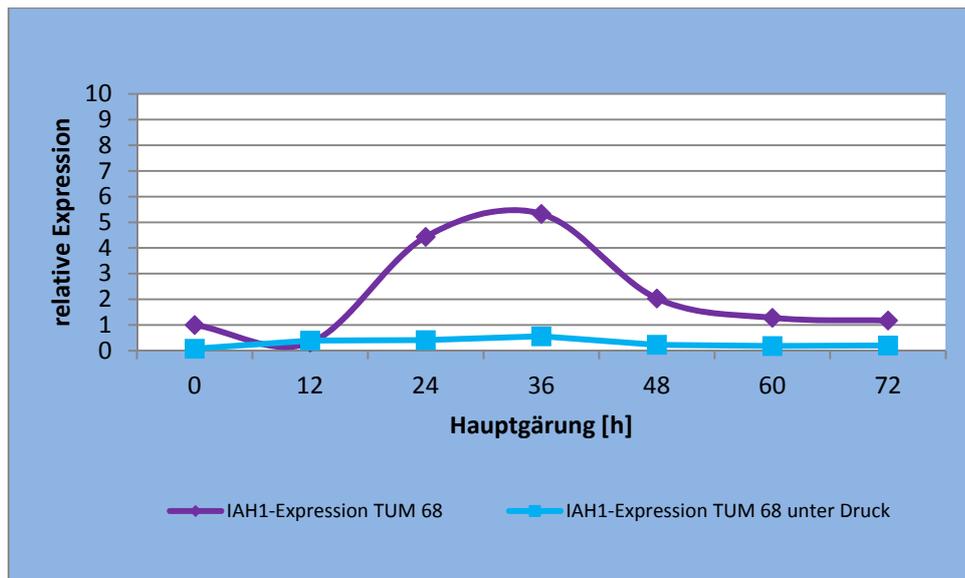


Abbildung 107: Faktorisierte Darstellung der IAH1-Expressionen bei TUM 68 unter Druck

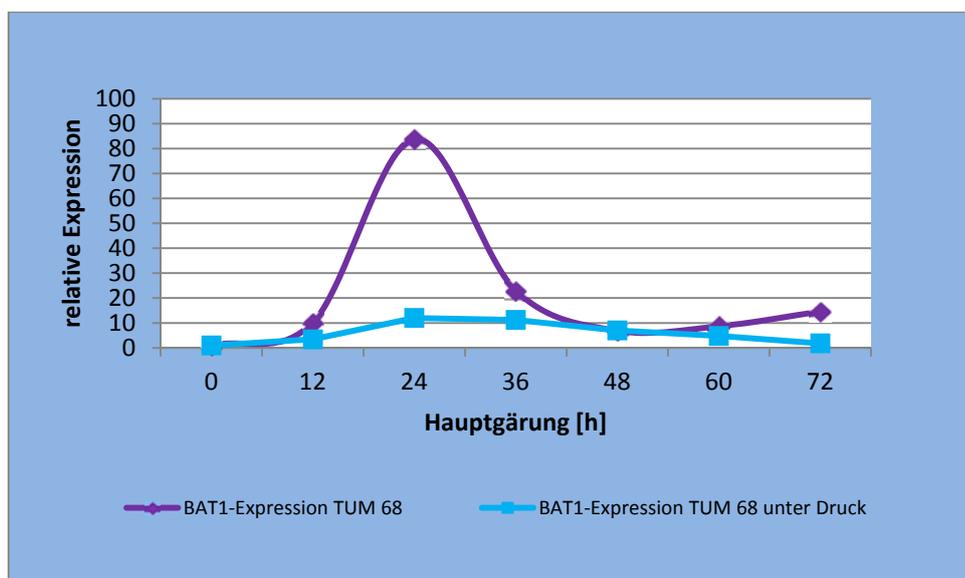


Abbildung 108: Faktorisierte Darstellung der BAT1-Expressionen bei TUM 68 unter Druck

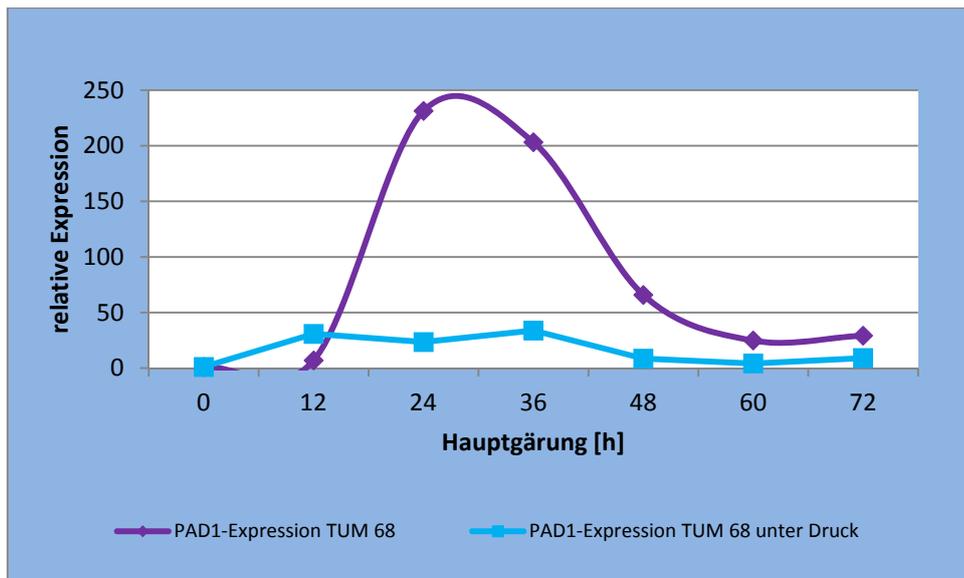


Abbildung 109: Faktorisierte Darstellung der PAD1-Expressionen bei TUM 68 unter Druck

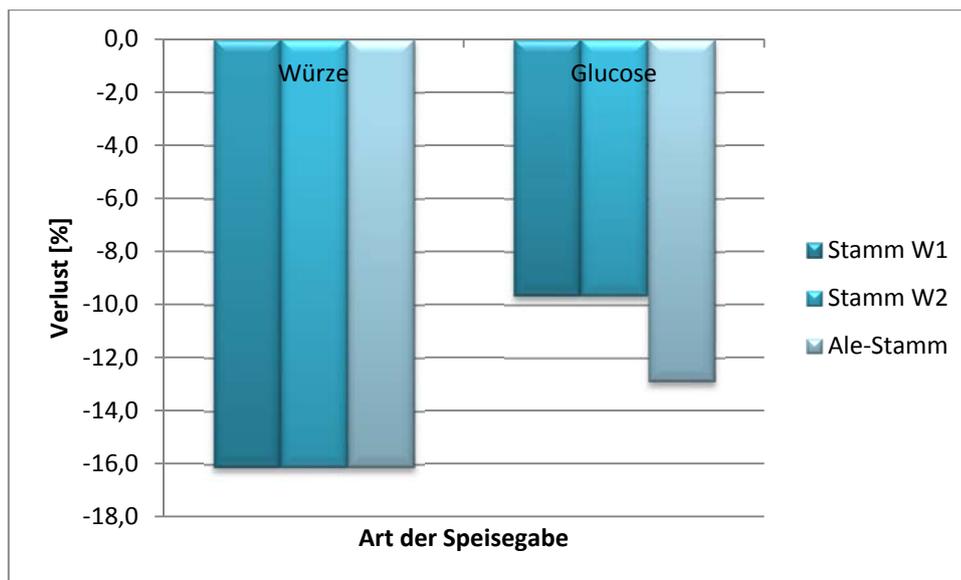


Abbildung 110: Verlust an 4-Vinylguajacol nach einer Flaschengärung mit unterschiedlichen Trockenhefen

## 8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Aebi, H. (Ed.). 1965. *Einführung in die praktische Biochemie*. Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt a.M.
- Alessi, P., Fermeglia, M., Kikic, I. 1991. Significance of dilute regions. *Fluid Phase Equilibria*, 70: 239-250.
- Altug, C., Mengulluoglu, U., Kurt, E., Kaya, S., & Dinckaya, E. 2011. A Novel Biosensor Based on Glucose Oxidase for Activity Determination of alpha - Amylase. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*, 39(5): 298-303.
- Andersen, M. L., & Skibsted, L. H. 1998. Electron spin resonance spin trapping identification of radicals formed during aerobic forced aging of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4): 1272-1275.
- Anderson, R. G., Kirsop, B.H. 1974. The control of volatile ester synthesis during the fermentation of wort of high specific gravity. *Journal of the Institute of Brewing*, 80: 48-55.
- Annemüller, G., Manger, H.-J. 2009. *Gärung und Reifung des Bieres, Grundlagen, Technologie, Anlagentechnik*. Berlin: Verlag der VLB Berlin.
- Arcay-Ledezma, G. J., & Slaughter, J. C. 1984. The Response of *Saccharomyces Cerevisiae* to Fermentation under Carbon-Dioxide Pressure. *Journal of the Institute of Brewing*, 90(2): 81-84.
- Back, W. (Ed.). 1999. *Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie Teil II*. Nürnberg: Fachverlag Hans-Carl
- Back, W. 2005. *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg, Hans Carl Verlag.
- Back, W. 2008. *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg, Hans Carl Verlag.
- Back, W., Diener, C., Sacher, B. 1998. Hefeweizenbier-Geschmacksvarianten und Technologie. *Brauwelt*, 28/29: 1279-1284.
- Bamforth, C. W., & Parsons, R. 1985. New procedures to improve the flavor stability of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 43(4): 197-202.
- Bärwald, G. 1974. Geschmacksstabilität des Bieres. *Brauwelt*, 10: 159-162.
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., & Pfaffl, M. W. 2010. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50(4): 237-243.

- Becker, T., Krottenthaler, M. 2011. Vorlesungsskript, Ausgewählte Kapitel der Malz- und Würzebereitung. TU München/ Weihnstephan.
- Bernstein, L., & Laufer, L. 1976. Further studies on Furfural: The Influence of Raw Materials, Processing Conditions, and Pasteurization Temperatures. *American Society of Brewing Chemists*, 35: 21-24.
- Boulton, C., Quain, D. 2001. *Brewing Yeast & Fermentation*. London: Blackwell Science Ltd.
- Brauerbund, D. 2011. Bier Sorten- Ranking Zusammenstellung für das Jahr 2010.
- Braune, A., Eidtmann, A. 2003. *First experiences using realtime PCR as a rapid detection method for brewery process control at Beck & Co*. Paper presented at the 29th EBC Congr., Dublin.
- Brenner, M. W., Khan, A.A. 1976. Furfural and Beer Color as Indices of Beer Flavor Deterioration. *American Society of Brewing Chemists*, 34: 14-19.
- Buddecke, E. (Ed.). 1970. *Grundriss der Biochemie*. Berlin: Walter de Gruyter & CO.
- Calderbank, J., & Hammond, J. R. M. 1994. Influence of higher Alcohol Availability on Ester Formation by Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52(3): 137-137.
- Chen, Y.-C., & Parlar, H. 2013. Enrichment behavior of immunoglobulin by foam fractionation using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 107: 102-108.
- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., & Delvaux, F. R. 2004. Ferulic acid release and 4-vinylguaiaicol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3): 602-608.
- Cui, Y., Wang, A., Zhang, Z., Speers, R.A. 2015. Enhancing the levels of 4-vinylguaiaicol and 4-vinylphenol in pilot-scale top-fermented wheat beers by response surface methodology. *Journal of the Institute of Brewing & Distilling*, 121: 129-136.
- Declerck, C. G., Francois, N., Ritter, C., Govaerts, B., Collin, S. 2005. Influence of pH and aging on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. *Food Quality and Preference*, 16: 157-162.
- Defour, J. P. 1994. Paper presented at the 6th Jean De Clerck Chair, Leuven.

- Dohnal, V., & Horakova, I. 1991. A new variant of the Rayleigh Distillation method for the Determination of limiting Activity-Coefficients. *Fluid Phase Equilibria*, 68: 173-185.
- Donhauser, S. 1995. Charakterisierung von Hefearten und -stämmen; Bedeutung für die Herstellung ober- und untergäriger Biertypen. *Brauwelt*, 50: 2644-2650.
- Donhauser, S., Wagner, D., Springer, R. 1991. Obergärige Hefestämme und Bierqualität. *Der Weihenstephaner*, 3: 131-138.
- Dorak, M. T. 2007. *Real-time PCR*. Abingdon: Taylor & Francis.
- Drost, B. W., Van Den Berg, R., Freijee, J. F. M., Van Der Velde, E. G., & Hollemans, M. 1990. Flavor Stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 48(4): 124-132.
- Druml, B., Cichna-Markl, M. 2014. High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*, 158: 245-254.
- Eichhorn, P. 1987. *Untersuchungen zur Geschmacksstabilität des Bieres*. TU München/Weihenstephan, Freising.
- Engan, S. 1970. Wort Composition and Beer Flavour.1. Influence of some Amino Acids on Formation of higher Aliphatic Alcohols and Esters. *Journal of the Institute of Brewing*, 76(3): 254-&.
- Engan, S. 1972. Wort Composition and Beer Flavor.2. Influence of different Carbohydrates on Formation of some Flavor Components during Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 78(2): 169-&.
- Engan, S. 1974. Esters in beer. *Brewers Digest*: 40-48.
- Englmann, J. 2010. Weihenstephan, persönliche Mitteilung.
- Fernandez- Espinar, M., T., Martorell, P., De Llanos, R., Querol, A. (Ed.). 2006. *A. Querol and G.H. Fleet, Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer- Verlag.
- Fickert, B., Schieberle, P. 1998. Identification of the key odorants in barley malt using GC/MS techniques and odour dilution analyses. *Food Nahrung*, 42 371-375.
- Fincher, G. B. 1976. Ferulic acid in barley cell walls: A fluorescence study. *Journal of the Institute of Brewing*, 82: 347-349.
- Foster, R. T., Samp, E.J., Patino, H. 2001. Multivariate Modeling of Sensory and Chemical Data to Understand Staling in Light Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59: 201-210.
- Fujii, T., Koayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., Tamai, Y. 1997. Effect of Aeration and Unsaturated Fatty Acids an Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Alcohol Acetyltransferase Gene. *Appl. Environ. Microbiology*, 63: 910-915.

- Fujiwara, D., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Harashima, S., Tamai, Y. 1999. Molecular mechanisms of the multiple regulation of the *Saccharomyces Cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast*, 15: 1183-1197.
- Fujiwara, D., Yoshimoto, H., Sone, H., Harashima, S., Tamai, Y. 1998. Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces Cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene ATF1 and D-9 fatty acid desaturase gene OLE1 by unsaturated fatty acids. *Yeast*, 14: 711-721.
- Fukuda, K., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., Kimura, A. 1999. Purification and characterization of isoamyl acetate- hydrolyzing esterase encoded by the IAH1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* from a recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 596-600.
- Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., Kimura, K. 1998. Balance of Activities of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in *Sacharomyces cerevisiae* is important for Production of Isoamyl Acetate. *Appl. Environ. Microbiology*, 64: 4076-4078.
- Gastl, M. I. 2006. *Technologische Einflussnahme auf den Lipidabbau im Sinne einer Verbesserung der Geschmacksstabilität im Bier*. TU München, Freising.
- Gmehling, J., Onken, U. 1977. *Vapor- Liquid Equilibrium Data Collection*.
- Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M. J., Schmitt, D., & Berthier-Vergnes, O. 2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal. Biochem.*, 295(1): 17-21.
- Gosset, W. S. 1908. The propable error of a mean. *Biometrika*, 6: 1-25.
- Grisher, D. 1999. The Determination of Activity Coefficients at Infinite Dilution with the Help of the Dilutor Technique (Inert Gas Stripping). *Chemical Engineering & Technology*, 22: 827-831.
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, J.A., Pronk, J.T., Dickinson, J.R. 2008. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *American Society for Microbiology*, 74: 2259-2266.
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, J.A., Pronk, J.T., Dickinson, J.R. 2009. A Review on Fusel Alcohol Formation by Yeast. *Brewing Science*, 62: 147-154.

- Herrmann, M. 2005a. *Entstehung und Beeinflussung qualitätsbestimmender Aromastoffe bei der Herstellung von Weißbier*. TU München, Weihenstephan.
- Herrmann, M. 2005b. *Entstehung und Beeinflussung qualitätsbestimmender Aromastoffe bei der Herstellung von Weißbier*. TU München, Weihenstephan.
- Herrmann, M., Klotzbuecher, B., Wurzbacher, M., Hanke, S., Kattein, U., Back, W., Becker, T., & Krottenthaler, M. 2010. A New Validation of Relevant Substances for the Evaluation of Beer Aging Depending on the Employed Boiling System. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1): 41-48.
- Hertel, K., Dillenburger, M. 2013. Innovation Entalkoholisierung. *Brauwelt*, 37: 1169-1171.
- Hertel, M. 2006. *Das Ausdampfungsverhalten von Aromastoffen während der Würzekochung*. TU München, Weihenstephan.
- Hertel, M. O., Scheuren, H., Sommer, K., & Glas, K. 2007. Limiting separation factors and limiting activity coefficients for hexanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, and dimethylsulfide in water at (98.1 to 99.0) degrees C. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 52(1): 148-150.
- Hoche, S. H., W.B., Becker, T. 2011. Time-of-flight prediction for fermentation process monitoring. *Engineering in Life Sciences*, 4: 417-428.
- Hoffmann-Ostenhof, O. (Ed.). 1954. *Enzymologie- eine Darstellung für Chemiker, Biologen und Mediziner*. Wien: Springer Verlag.
- Hotchko, R. A. 2014. *The Potential Role of Aliphatic gamma-dodecalactone and delta-Lactons in Beer Fruit Aroma*. Oregon, USA.
- Hutzler, M. 2009. *Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen*. TU München, Freising, Weihenstephan.
- Hutzler, M. S., E., Stettner, G. 2008. Ein Werkzeug in der Brauereimikrobiologie- Real-Time-PCR in der Praxis. *Brauindustrie*, 4: 52-55.
- Jacob, F. (Ed.). 2012. *Würze, Bier, Biermischgetränke*. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK.
- Jacob, F. (Ed.). 2013. *MEBAK - Sensorik*. Freising-Weihenstephan: MEBAK.
- Joergensen, A., Hansen, A. (Ed.). 1956. *Mikroorganismen der Gärungsindustrie*. (Vol. 7). Nürnberg: Hans Carl verlag Nürnberg.

- Jones, R. P., Greenfield, P.F. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 4: 210-223.
- Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Ramarathnam, N., Kawakishi, S., & Kamada, K. 1988. Detection of free Radicals in Beer Oxidation. *Journal of Food Science*, 53(3): 885-888.
- Karmakar, B., Vohra, R. M., Nandanwar, H., Sharma, P., Gupta, K. G., & Sobti, R. C. 2000. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal of Biotechnology*, 80(3): 195-202.
- Kelch, K., Hohmann, C. 2012. Privatbrauereien und Brauereigruppen legen 2011 zu. *Brauwelt*, 11: 296-297.
- Knatchbull, F. B., & Slaughter, J. C. 1987. The Effect of low CO<sub>2</sub> Pressures on the Absorption of Amino-Acids and Production of Flavor-Active Volatiles by yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 93(5): 420-424.
- Koch, J. 1986. *Handbuch der Lebensmitteltechnologie*. Stuttgart: Ulmer Verlag.
- Köhler, W., Schachtel, G., Voleske, P. 2007. *Biostatistik*. Berlin: Springer Verlag GmbH.
- Kopjar, M., Andriot, I., Saint-Eve, A., Souchon, I., & Guichard, E. 2010. Retention of aroma compounds: an interlaboratory study on the effect of the composition of food matrices on thermodynamic parameters in comparison with water. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(8): 1285-1292.
- Kruger, L. 1998. Yeast metabolism and its effect on flavour: Part 2. *Brewers' Guardian*: 27-30.
- Kruger, L., Pickerell, A. T. W., & Axcell, B. 1992. The Sensitivity of different brewing Yeast Strains to Carbon-Dioxide inhibition-Fermentation and Production of Flavor-Active Volatile Compounds. *Journal of the Institute of Brewing*, 98(2): 133-138.
- Landaud, S., Latrille, E., & Corrieu, G. 2001. Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(2): 107-117.
- Langos, D., Granvogel, M., Schieberle, P. 2013. Characterization of the Key Aroma Compounds in Two Bavarian Wheat Beers by Means of the Sensomics Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 11303-11311.
- Laws, D. R., Peppard, T.L. 1982. The stability of flavour constituents in alcoholic beverages. *Food Chemistry*, 9: 131-146.
- Lebok, U., Weber, F.C. 2013. Weißbiere- in Deutschland erfolgreich trotz Tradition. *Brauwelt*, 12-13: 358-360.

- Lermusieau, G., Noel, S., Liégeois, C., Collin, S. 1999. Nonoxidative Mechanism for Development of trans-2-Nonenal in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57: 29-33.
- Li, M., Yang, Z., Yang, M., Shan, L., & Dong, J. 2009. Determination of Furfural in Beer by High-Performance Liquid Chromatography with Solid-Phase Extraction. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(3): 226-231.
- Li, Q. Q., Skinner, J., & Bennett, J. E. 2012. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in *Candida glabrata* following azole treatment. *Bmc Mol. Biol.*, 13.
- Lilly, M. 2004. *The development of yeast for the optimal production of flavour-active esters and higher alcohols in wine and distillates*. Stellenbosch University, Stellenbosch.
- Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D., & Pretorius, I. S. 2006a. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23(9): 641-659.
- Lilly, M., Bauer, F. F., Styger, G., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. 2006b. The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *Fems Yeast Research*, 6(5): 726-743.
- Lustig, S. 1994. *Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Lagerung von Flaschenbier und deren technologische Beeinflussung beim Brauprozess*. TU München, Weihenstephan.
- Madigan, D., McMurrough, I., & Smyth, M. R. 1994. Rapid-Determination of 4-Vinyl Guaiacol and Ferula Acid in Beers and Worts by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52(4): 152-155.
- Madigan, D., Perez, A., & Clements, M. 1998. Furanic aldehyde analysis by HPLC as a method to determine heat-induced flavor damage to beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56(4): 146-151.
- Maillard, M. N., Soum, M. H., Boivin, P., & Berset, C. 1996. Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 29(3): 238-244.
- Malcorps, P., Cheval, J. M., Jamil, S., & Dufour, J. P. 1991. A new Model for the Regulation of Ester Synthesis by Alcohol Acetyltransferase in *Saccharomyces Cerevisiae* during Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49(2): 47-53.

- Malcorps, P., & Dufour, J. P. 1992. Short-Chain And Medium-Chain Aliphatic-Ester Synthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 210(3): 1015-1022.
- Mason, A. B., & Dufour, J. P. 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16(14): 1287-1298.
- McMurrough, I., Madigan, D., Donnelly, D., Hurley, J., Doyle, A. M., Hennigan, G., McNulty, N., & Smyth, M. R. 1996. Control of ferulic acid and 4-vinyl guaiacol in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 102(5): 327-332.
- Meilgaard, M. C. 1975a. Flavor Chemistry of Beer Part I: Flavor Interaction between Principal Volatiles. *MBAA Technical Quarterly* 12: 107-117.
- Meilgaard, M. C. 1975b. Flavor Chemistry of Beer Part II: Flavor and Threshold of 239 Aroma Volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, 12: 151-168.
- Meilgaard, M. C. 2001. Effects on Flavour of Innovations in Brewery Equipment and Processing: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 107: 271-286.
- Miedaner, H. (Ed.). 2002. *Band II*. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK.
- Mikyska, A., Krofta, K., Haskova, D., Culik, J., & Cejka, P. 2011. The Influence of Hopping on Formation of Carbonyl Compounds During Storage of Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(1): 47-54.
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., & Iefuji, H. 2010. PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 109(6): 564-569.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24: 17-27.
- Nahon, D. F., Koren, P., Roozen, J. P., & Posthumus, M. A. 1998. Flavor release from mixtures of sodium cyclamate, sucrose, and an orange aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12): 4963-4968.
- Nakatani, K., Fukui, N., Nagami, K., & Nishigaki, M. 1991. Kinetic Analysis of Ester Formation during Beer Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49(4): 152-157.
- Narziß, L. 1995. Über den Biergeschmack und seine Beeinflussung durch Rohstoffe und technologische Faktoren. *Brauwelt*, 45: 2286-2301.

- Narziß, L. (Ed.). 2005. *Abriss der Bierbrauerei*. (Vol. 7.Auflage).
- Narziß, L., Miedaner, H., Lustig, S. 1979. Vor- und Nachteile der Gärung in Großbehältern. *Brauwelt*, 33: 1165-1170.
- Narziß, L., Miedaner, H., Lustig, S. 1999. Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Alterung des Bieres. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 9/10: 164-175.
- Narziß, L., Miedaner, H., Nitzsche, F. 1990. Ein Beitrag zur Bildung von 4-Vinyl-Guajakol bei der Herstellung von bayerischem Weizenbier. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 3: 96-99.
- Nordström, K. 1963. Formation of Ethyl Acetate in Fermentation with Brewer's Yeast. *J. Inst. Brew.*, 69: 142-153.
- Nordström, K. 1964. Formation of Esters from Alcohols by Brewer's Yeast. *J. Inst. Brew.*, 70: 328-336.
- Nykänen, L., Nykänen, I., Suomalainen, H. 1977. Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium. *Journal of the Institute of Brewing*, 83: 32-34.
- Pankoke, I. 2013. Monitoring physiologischer Transportbedingungen in der Getränke Logistik. *Brauwelt*, 27-28: 800-802.
- Papula, L. 2001. *Mathematik für Ingenieure und Naturwissenschaftler. Ein Lehr- und Arbeitsbuch für das Grundstudium*. Wiesbaden: Vieweg.
- Peddie, H. A. B. 1990. Ester Formation in Brewery Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 96(5): 327-331.
- Pfaffl, M. W. 2006a. Paper presented at the TATAA biocenter qPCR course.
- Pfaffl, M. W. 2006b. *qPCR Core Module*. Paper presented at the Schedule for TATAA Biocenter qPCR course, Freising.
- Pfaffl, M. W. 2006c. Relative quantification: 63-82. Real-time PCR: International University Line.
- Pfenninger, H. (Ed.). 1996. *Band III*. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK.
- Procopio, S. 2014. *Einfluss signifikanter Aminosäuren auf die Bildung von höheren Alkoholen und Estern im Bier*. Paper presented at the Technologisches Seminar, Weihenstephan.
- Procopio, S., Qian, F., & Becker, T. 2011. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology*, 233(5): 721-729.
- Pubchem. 2010. compound summary.
- Quain, D. E. 1988. Studies on Yeast Physiology-Impact on Fermentation Performance and Product Quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 94(5): 315-323.

- Sacher, B. 1997. *Über den Einfluss von Sorte, Umwelt, agronomischen Maßnahmen und Mälzungstechnologie auf die wertbestimmenden Eigenschaften von Winterweizenmalzen*. TU München, Freising.
- Sachs, L., Hedderich, J. 2009. *Angewandte Statistik. Methodensammlung mit R*. Berlin: Springer Verlag.
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. 2008a. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2): 454-461.
- Saerens, S. M. G., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. 2008b. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80(6): 1039-1051.
- Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Voet, A. R. D., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., & Thevelein, J. M. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Biol. Chem.*, 281(7): 4446-4456.
- Saiki, R. K., Gelfand, D.H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 293: 487-491.
- Saison, D., De Schutter, D. P., Overlaet-Michiels, W., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. 2009a. Effect of Fermentation Conditions on Staling Indicators in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 67(4): 222-228.
- Saison, D., De Schutter, D. P., Uyttenhove, B., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. 2009b. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry*, 114(4): 1206-1215.
- Scheuren, H., Sommer, K., Hertel, M. 2008. Grundlagen der Ausdampfung von Aromastoffen in der Bierbereitung Teil 1. *Brauwelt*, 50: 1537-1540.
- Scheuren, H., Voigt, J., Sommer, K. 2011. Schaum im thermodynamischen Trennprozess der würzekochung. *Der Weihenstephaner*, 1: 28-31.
- Schieberle, P., & Komarek, D. 2003. Changes in key aroma compounds during natural beer aging. In K. R. Cadwallader, & H. Weenen (Eds.), *Freshness and Shelf Life of Foods*, Vol. 836: 70-79. Washington: Amer Chemical Soc.

- Schmittgen, T. D., & Zakrajsek, B. A. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 46(1-2): 69-81.
- Schneiderbanger, H., Hutzler, M., Mueller-Auffermann, K., Cotterchio, D., Friess, A., & Jacob, F. 2011. Volatilization of Aroma Compounds Relevant for Wheat Beer in Water Under Conditions Simulating Alcoholic Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 69(4): 187-190.
- Schönberger, C. 2004. *Bedeutung nicht-flüchtiger Geschmacksstoffe in Bier*. TU München, Weihenstephan.
- Schönenberg, S. 2010. *Der physiologische Zustand und der Sauerstoffbedarf von Bierhefen unter brautechnologischen Bedingungen*. TU München, Weihenstephan, Freising.
- Schwarz, K. J., Boitz, L. I., & Methner, F.-J. 2012. Enzymatic formation of styrene during wheat beer fermentation is dependent on pitching rate and cinnamic acid content. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(3): 280-284.
- Sendra, J. M., Todo, V., Pinaga, F., Izquierdo, L., & Carbonell, J. V. 1994. Evaluation of the Effects of Yeast-Strain and Fermentation Conditions on the Volatile Concentration Profiles of Pilot-Plant Lager Beers. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 47(10): 316-321.
- Seyffert, W., Balling, R. 2003. *Lehrbuch der Genetik*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verlag.
- Shen, H. Y., De Schrijver, S., Moonjai, N., Verstrepen, K. J., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. 2004. Effects of CO<sub>2</sub> on the formation of flavour volatiles during fermentation with immobilised brewer's yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64(5): 636-643.
- Shindo, S., Murakami, J., Koshino, S. 1992. Control of Acetate Ester Formation During Alcohol Fermentation with Immobilized Yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73: 370-374.
- Shinohara, T., Kubodera, S., & Yanagida, F. 2000. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *J Biosci Bioeng*, 90(1): 90-97.
- Smit, A., Otero, R. R. C., Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S., & Van Rensburg, P. 2003. Enhancing volatile phenol concentrations in wine by expressing various phenolic acid decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17): 4909-4915.
- Steiner, E., Auer, A., Becker, T., & Gastl, M. 2012. Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt

- and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4): 803-813.
- Stewart, G., Lyness, A., Younis, O. 1999. The control of Ester Synthesis during Wort Fermentation. *Technical Quarterly*, 36: 61-66.
- Storgards, E., Haikara, A., Juvonen, R. (Ed.). 2006. *C.W. Bamforth Brewing Camebridge: Brewing Woodhead*
- Stratford, M., Plumridge, A., & Archer, D. B. 2007. Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associated with the PAD1 gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20): 6534-6542.
- Suezawa, Y., & Suzuki, M. 2007. Bioconversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and 4-ethylguaiacol and of 4-vinylguaiacol to 4-ethylguaiacol by halotolerant yeasts belonging to the genus *Candida*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71(4): 1058-1062.
- Svoboda, Z., Mikulikova, R., Belakova, S., Benesova, K., Marova, I., & Nesvadba, Z. 2011. Optimization of Modern Analytical SPME and SPDE Methods for Determination of Trans-2-nonenal in Barley, Malt and Beer. *Chromatographia*, 73: S157-S161.
- Taylor, G. T., Thurston, P.A., Kirsop, B.H. 1979. Influence of lipids derived from malt spent grains on yeast metabolism and fermentation. *J. Inst. Brew.*, 85: 219-227.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., Nguyen, M. 2011. A Practical Approach to RT-qPCR - Publishing Data That Conform to the MIQE Guidelines. *Bio-Rad Laboratories, Inc.*
- Techakriengkrai, I., Paterson, A., & Taidi, B. 2006. Relationship of sensory staleness in two lagers to headspace concentrations of trans-2-nonenal and three staling aldehydes. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(1): 36-40.
- Teste, M. A., Duquenne, M., Francois, J. M., & Parrou, J. L. 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bmc Mol. Biol.*, 10.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., & Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 75(2-3): 291-295.
- Thiele, F. 2006. *Einfluss der Hefevitalität und der Gärparameter auf die Stoffwechselprodukte der Hefe und auf die Geschmacksstabilität*. TU München, Weihenstephan.

- Thurston, P. A., Quain, D.E., Tubb, R.S. 1981. Lipid Metabolism and the Regulation of Volatile Ester Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, 88: 90-94.
- Uchida, M., & Ono, M. 1996. Improvement for oxidative flavor stability of beer - Role of OH-radical in beer oxidation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54(4): 198-204.
- Vanbeneden, N. 2008. Decrease of 4- Vinylguaiacol during Beer Aging and Formation of Apocynol and Vanillin in Beer. *Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11983-11988.
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. 2007. Variability in the release of free and bound hydroxycinnamic acids from diverse malted barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars during wort production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26): 11002-11010.
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. 2008. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107(1): 221-230.
- Vanbeneden, N., Van Roey, T., Willems, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. 2008. Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chemistry*, 111(1): 83-91.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. 2003. Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23): 6782-6790.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Daenen, L., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. 2004. Furfuryl ethyl ether: Important aging flavor and a new marker for the storage conditions of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6): 1661-1668.
- Verbelen, P. J., Saerens, S. M. G., Van Mulders, S. E., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. 2009. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82(6): 1143-1156.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Delvaux, F. R. 2004a. Esters in beer- part 3: Why do yeast cells produce fruity flavours: the physiological role of acetate ester synthesis. *Cerevisia*, 29.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Delvaux, F.R. 2003a. Esters in beer- part 2: Controlling ester levels during beer fermentation: a biochemical approach. *Cerevisia*, 28 (4): 22-33.

- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Delvaux, F.R. 2003b. Esters in beer-part 1: The fermentation process:more than ethanol formation. *Cerevisia*, 28 (3): 41-49.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R. 2003c. Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96: 110-118.
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vercaemmen, J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. 2004. The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles. *Yeast*, 21(4): 367-376.
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S.D.M., Vanderhaegen, B.M.P., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Devlaux, F.R. 2003d. Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters. *Appl. Environ. Microbiology*, 69: 5228-5237.
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S.D.M., Vercaemmen, J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Devaux, R. 2004b. The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles, *Wiley Inter Science*, Vol. 21: 367-377.
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. (Ed.). 2002. *Lehrbuch der Biochemie*. (Vol. 2). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH &Co.KGaA.
- Vollbrecht, D., & Radler, F. 1973. Formation of Higher Alcohols by Amino-Acid Auxotrophic Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*.1.Conversion of Amino- Acids to Higher Alcohols. *Archiv Fur Mikrobiologie*, 94(4): 351-358.
- Wackerbauer, K., Krämer, P., Siepert, J. 1982. Phenolische Aromastoffe in Bier. *Brauwelt*, 15: 618-626.
- Wackerbauer, K., & Zufall, C. 1997. The impact of flash pasteurization on beer quality. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 50(11-12): 196-201.
- Wellhoener, U. 2006. *Beurteilung des physiologischen Zustands von Brauereihefe mittels Aktivitätsmessungen von Schlüsselenzymen bei der Propagation und Gärung*. Unpublished Dissertation, TU München, Freising.
- Wold, K., Blenken, A., Hage, T. 2005. *Practical experiences on the use of taqman real-time PCR as a microbiological routine quality control method for fermenters at Ringnes brewery*. Paper presented at the 30th EBC Congr., Prague.

- Wurzbacher, M. 2011. *Untersuchungen zum Einfluss antioxidativer Substanzen auf die Geschmacksstabilität des Bieres*. Technische Universität München, Freising.
- Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Ito, C., Sone, H., Kaneko, Y., Tamai, Y. 1998. Characterization of the ATF1 and Lg-ATF1 Genes encoding Alcohol Acetyltransferases in the Bottom Fermenting Yeast *Saccharomyces pastorianus*. *J. Ferment. Bioeng.*, 86: 15-20.
- Younes, A., Lukyanenko, Y. O., Lyashkov, A. E., Lakatta, E. G., & Sollott, S. J. 2011. A bioluminescence method for direct measurement of phosphodiesterase activity. *Analytical Biochemistry*, 417(1): 36-40.
- Younis, O. S., Stewart, G.G. (Ed.). 2000. *The effect of wort maltose content on volatile production and fermentation performance in brewing yeast*. (Vol. 1). Oxford: Blackwell Science.
- Yu, J., Huang, S., Dong, J., Fan, W., Huang, S., Liu, J., Chang, Z., Tian, Y., Hao, J., & Hu, S. 2014. The influence of LOX-less barley malt on the flavour stability of wort and beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(2): 93-98.
- Zufall, C., Kunerth, S., Tietje, N., Wackerbauer, K. 2000. Beeinflussung der Hefevitalität durch physikalischen Druck. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 3/4: 44-49.
- Zufall, C., & Tyrell, T. 2008. The influence of heavy metal ions on beer flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(2): 134-142.