

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I

**Einfluss der Hefevitalität und der Gärparameter auf die  
Stoffwechselprodukte der Hefe und auf die Geschmacksstabilität**

**Frithjof Thiele**

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

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Horst-Christian Langowski

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dr.-Ing habil. Werner Back  
2. Prof. Dr.-Ing. Tomas Kurz, Technische Universität Berlin

Die Dissertation wurde am 07. September 2006 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23. Oktober 2006 angenommen.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2002 bis Juni 2006 am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I der Technischen Universität München, Weihenstephan, unter der Leitung meines Doktorvaters Prof. Dr. Werner Back. Ihm möchte ich an dieser Stelle Dank sagen für die Überlassung des interessanten Themas und seiner vielen wertvollen Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beitrugen. Bei ihm möchte ich mich im Besonderen auch für sein Vertrauen bedanken, das er mir bei der Bearbeitung von Projekten mit der Industrie entgegengebracht hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Ludwig Narziß für sein Interesse und viele wichtige Anregungen und Diskussionen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Kollegen Mark Schneeberger und Dr. Markus Herrmann für fachliche Diskussionen, tatkräftige Unterstützung und freundschaftlichen Beistand bedanken, ohne diese meine Arbeit in der Form nicht möglich gewesen wäre.

Auch allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität. So wurde der große analytische Aufwand dieser Arbeit erst möglich durch die Übernahme von Analysen, unter anderem durch Michaela Marschmann, Doreen Bestehorn, Johanna Biechele und Monika Braasch und die Unterstützung der zuständigen Laborleiter. Viele der Kollegen des Lehrstuhls waren in der einen oder anderen Weise am Gelingen meiner Arbeit beteiligt. Da eine Nennung aller Personen in diesem Rahmen nicht möglich ist, möchte ich stellvertretend Stefan Hanke, Dr. Christina Schönberger, Martina Schütz, Dr. Ralf Mezger und Kornel Vetterlein erwähnen, und mich für Ihre Unterstützung bedanken.

Meinen Diplomanden, insbesondere jedoch Luis Vanegas, möchte ich für ihr Engagement und ihr Interesse Dank aussprechen.

Der Binding Brauerei AG und der Karlsberg Brauerei GmbH sei für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre Versuchsbereitschaft und ihre Unterstützung gedankt, auch wenn einige Versuchsreihen keinen Eingang in diese Arbeit gefunden haben.

Der VLB Berlin e. V., Doemens e. V. und Dr. Chris Powell danke ich sehr für die Überlassung von Hefestämmen.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mir diesen Weg ermöglicht hat und mich dabei immer unterstützt hat. Auch meine Freunde haben einen großen Beitrag

## Danksagung

---

geleistet, indem sie für mich da waren und mir damit immer wieder die Kraft gaben auch Schwierigkeiten überwinden zu können.

Schlussendlich möchte ich der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e. V. meinen Dank für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit aussprechen.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Einleitung und Aufgabenstellung .....	1
2 Grundlagen.....	3
2.1 Hefevitalität .....	3
2.1.1 Methoden zur Bestimmung der Hefevitalität .....	3
2.1.1.1 Intrazellulärer pH-Wert (ICP; SICP).....	7
2.1.1.2 Acidification Power Test .....	9
2.1.1.3 Valtitration.....	10
2.1.1.4 Diacetylreduktion.....	10
2.1.1.5 Messung der CO <sub>2</sub> -Bildung.....	11
2.1.1.6 Hefevitalitätstest auf Basis von Benzoquinon und Tetrazoliumsalz..	12
2.1.2 Einfluss der Hefevitalität auf Gärung und Bierqualität.....	13
2.2 Stoffwechselprodukte bei der Hefegärung .....	16
2.2.1 Bildung höherer Alkohole.....	16
2.2.2 Esterbildung .....	24
2.2.3 Bildung von Schwefeldioxid .....	33
2.3 Einflussfaktoren auf die Geschmacksstabilität von Bier .....	37
2.3.1 Entstehung alterungsrelevanter Aromakomponenten .....	38
2.3.2 Antioxidative Wirkung von Bierinhaltsstoffen .....	48
2.3.3 Maskierende Effekte von Bierinhaltsstoffen .....	50
2.3.4 Technologische Möglichkeiten zur Beeinflussung der Geschmackstabilität.....	51
3 Material und Methoden.....	53
3.1 Statistische Versuchsplanung und Auswertung .....	53
3.1.1 Statistische Versuchsplanung mittels der Software Design Expert .....	54
3.1.1.1 Faktorielle Versuchsplanung mit 2 Stufen .....	54
3.1.1.2 Response Surface Methodology .....	57

3.1.2	Auswertung der statistisch geplanten Versuche mittels der Software Design Expert .....	59
3.1.2.1	Auswertung der Faktorielle Versuchsplanung mit 2 Stufen .....	60
3.1.2.2	Auswertung der Response Surface Methodology .....	65
3.2	Routineanalysen .....	68
3.2.1	Chemisch-Technische Analysen.....	68
3.2.1.1	Würzeanalysen.....	68
3.2.1.2	Bieranalysen.....	68
3.2.2	Zellzahl und Hefeviabilität .....	70
3.2.3	Gaschromatographische Analysen .....	70
3.2.4	Elektronenspinresonanz-Spektrometrie (ESR) .....	71
3.3	Sensorische Analysen.....	72
3.3.1	Alterungsverkostung nach EICHHORN .....	72
3.4	Forcierte Alterung.....	73
3.5	Hefevitalitätsmessungen .....	73
3.5.1	Intrazellulärer pH-Wert (ICP).....	73
3.5.2	Intrazellulärer pH-Wert mittels modifizierter Methode (SICP).....	74
3.5.3	Acidification Power Test.....	74
3.5.4	Vitaltitration .....	75
3.5.5	Diacetylreduktion .....	75
3.5.6	Messung der CO <sub>2</sub> -Bildung .....	76
3.5.7	Hefevitalitätstest auf Basis von Benzoquinon und Tetrazoliumsalz .....	76
3.6	Durchführung der Gärversuche.....	76
3.6.1	Vergleich von Hefevitalitätsmethoden.....	77
3.6.1.1	Gezielte Schwächung der Hefe durch Stress .....	77
3.6.1.2	Hefestämme und Herführung .....	79
3.6.2	Vergleich von Hefestämmen unter Variation von Gärparametern.....	79
3.6.2.1	Hefestämme und Hefeherführung .....	81
3.6.3	Gärversuche unter Variation von Gärparametern und Hefevitalität.....	83
3.6.3.1	Versuchsplanung und Vorbereitung .....	83
3.6.3.2	Hefestamm und Hefebehandlung.....	85
3.6.3.3	Versuchsdurchführung .....	85
3.6.4	Gärungen im Produktionsmaßstab .....	86

4	Ergebnisse und Diskussion .....	88
4.1	Vergleich der Vitalitätsmethoden .....	88
4.1.1	Reproduzierbarkeit der Vitalitätsmethoden .....	88
4.1.2	Versuche zum Vergleich von Vitalitätsmethoden mit unterschiedlich gestressten Hefen.....	89
4.2	Stoffwechselprodukte der Hefe bei Variation der Gärbedingungen und der Hefevitalität .....	92
4.2.1	Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Gärzeit .....	92
4.2.2	Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Bildung höherer Alkohole .....	99
4.2.2.1	2-Methylbutanol.....	99
4.2.2.2	3-Methylbutanol.....	105
4.2.2.3	2-Phenylethanol .....	112
4.2.2.4	Gesamtdiskussion höhere Alkohole .....	117
4.2.3	Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Esterbildung	118
4.2.3.1	Ethylacetat.....	119
4.2.3.2	Isoamylacetat .....	125
4.2.3.3	Summe Ethylester .....	131
4.2.3.4	Gesamtdiskussion Ester.....	134
4.2.4	Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Bildung von Schwefeldioxid.....	137
4.3	Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Geschmacksstabilität .....	144
4.3.1	Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die analytische und sensorische Geschmacksstabilität.....	144
4.3.2	Betrachtung verschiedener Einflussfaktoren der Geschmacksstabilität unter Variation der Gärparameter und der Hefevitalität .....	158
4.3.3	Gesamtdiskussion Geschmacksstabilität.....	164
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	168
	Anhang.....	170
	Literaturverzeichnis .....	195

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha	CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
AAT	Enzyme der Alkohol- Acetyltransferase-Gruppe	CoA	Coenzym A
Abb.	Abbildung	CoASH	freies Coenzym A
ADH	Alkohol-Dehydrogenase	Cu	Kupfer
ADP	Adenosindiphosphat	DA	Diacetat
AEC	Adenylate Energy Charge	dest.	destilliert
AH	Anhang	DPPH	1,1-Diphenyl-2- Picrylhydracyl
AMP	Adenosinmonophosphat	DMTS	Dimethyltrisulfid
ANOVA	Varianzanalyse	E	<i>trans</i> (Konfigurationsisomerie)
APT	Acidification Power Test	EBC	European Brewery Convention
ARP	antiradikalisches Potential	ECD	Electron-Capture- Detector
ARV	antiradikalisches Verhalten	ESR	Elektronenspinresonanz Spektroskopie
ATF	Transkriptions- faktorfamilie	FAN	Freier Aminostickstoff
ATP	Adenosintriphosphat	Fe	Eisen
$\beta$	beta	FID	Flammenionisations- detektor
bzw.	beziehungsweise	$\gamma$	gamma
°C	Grad Celsius	GAP	Glucose-Acidification- Power
C	Kohlenstoff	GC	Gaschromatograph
ca.	zirka	GG-	Gewichts/Gewichts-
Ca	Calcium	GIPE	Glucose-Induced-Proton- Efflux
cAMP	Zyklisches Adenosin- monophosphat	h	Stunde
CCD	Central Composite Design	H	Wasserstoff
CF-DA	Carboxyfluorescein Diacetat	HA	höhere Alkohole
Cl	Chlor		

## Abkürzungsverzeichnis

---

ICP	Messung des intrazellulären pH-Wertes	ppb	parts per billion
		ppm	parts per million
KI	Konfidenzintervall	PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
L	Linksdrehende optische Aktivität	r	Korrelationskoeffizient
		r <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
LOX	Lipoxygenaseenzym	Ras	Proto-Onkogen
MAL	Maltase		verschiedener
max.	maximal		Signaltransduktionswege
MB	Methylenblau	ROS	reaktive
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission		Sauerstoffspezies
		RSM	Response-Surface- Methodology
min.	Minute	S	Schwefel
Mio.	Millionen	S-ICP	Modifizierte Messung des intrazellulären pH-Wertes
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinucleotid	Sp.	Spuren
NaOH	Natriumhydroxid	Tab.	Tabelle
n.a.	nicht auswertbar	Temp.	Temperatur
n.n.	nicht nachweisbar	U	Umdrehungen
O	Sauerstoff	UG	Untergärig
OG	Obergärig	usw.	und so weiter
P	Wahrscheinlichkeitsmaß	VDK	vicinale Diketone
°P	Grad Plato	vgl.	vergleiche
p.A.	zur Analyse	Vk	Variationskoeffizient
PBN	N-tert-butyl- $\alpha$ - phenylnitron	WAP	Water-Acidification-Power
		YMI	Yeast Metabolic Index
PDC	Pyruvat-Decarboxylase	z. B.	zum Beispiel
PDH	Pyruvat- Dehydroxygenase		
PKA	Protein Kinase A		



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Postulierte Reaktionsmechanismen für die Reduktion von Tetrazoliumsalz unter Anwesenheit von Hefezellen und Mediatoren. (A) Duroquinon, (B) Menaquinon[268] .....	12
Abb. 2.2: SO <sub>2</sub> -Bildung während der Gärung [153].....	33
Abb. 2.3: Aminosäuren und ihre Folgeprodukte aus dem Streckerabbau [18] .....	40
Abb. 2.4: Metallkatalysierte Radikalentstehung in Bier [18, 153].....	42
Abb. 2.5: Überblick über die derzeitig bekannten enzymatisch-oxidativen Stoffwechselfvorgänge von Linolensäure zu Carbonylverbindungen [281] .....	45
Abb. 3.1: Darstellung einer faktoriellen Versuchsplanung mit 2 Stufen .....	55
Abb. 3.2 a+b: Einfluss der Faktoren Gärtemperatur und Hefegabe auf verschiedene Zielgrößen ohne Wechselwirkungen (a) und mit Wechselwirkungen (b).....	55
Abb. 3.3: Darstellung einer Response Surface Oberfläche .....	57
Abb. 3.4: Darstellung der Versuche bei einer RSM Planung mit zwei Faktoren .....	58
Abb. 3.5: Varianzanalyse eines faktoriellen Versuchsmodells mit 2 Stufen .....	61
Abb. 3.6 a+b: Darstellung von Normal-Plots (Test auf Normalverteilung von Residuen eines Modells) [142] .....	62
Abb. 3.7 a+b: Auftragung der Residuen gegen die geschätzten Werte [142].....	63
Abb. 3.8 a+b: Auftragung der Residuen gegen die Reihenfolge der Durchführung [142] .....	64
Abb. 3.9 a+b: Auftragung der Modellwerte gegen die tatsächlichen Werte [142] .....	64
Abb. 3.10: Schematischer Ablauf der Modellbildung und Evaluation von RSM-Modellen [48].....	66
Abb. 3.11: Varianzanalyse eines reduzierten quadratischen RSM-Modells .....	67
Abb. 4.1: r-Werte für lineare Zusammenhänge zwischen Gärzeit und Vitalitätsmethoden.....	90
Abb. 4.2 a+b: 2-Methylbutanolwerte in Abhängigkeit des Extraktes bei 9 °C (a) und 15 °C (b) bei verschiedenen Hefestämmen.....	101
Abb. 4.3: Einfluss von Extrakt und Gärtemperatur auf die Bildung von 2-Methylbutanol (20 l Maßstab) .....	102
Abb. 4.4 a+b: Einfluss von Temperatur/Hefegabe (a) und Temperatur/Belüftung auf die Bildung von 2-Methylbutanol im 20-l-Maßstab .....	103

Abb. 4.5 a+b: Einfluss von Temperatur, Hefegabe und Belüftung auf die Bildung von 2-Methylbutanol in Brauerei A.....	104
Abb. 4.6 a+b: 3-Methylbutanolwerte in Abhängigkeit des Extraktes mit 7 Mio. Zellen/ml (a) und 23 Mio. Zellen/ml (b) bei verschiedenen Hefestämmen.....	107
Abb. 4.7: Einfluss von Extrakt und Gärtemperatur auf die Bildung von 3-Methylbutanol (20-l-Maßstab).....	109
Abb. 4.8: Einfluss von Gärtemperatur und Hefegabe auf die Bildung von 3-Methylbutanol (20-l-Maßstab) .....	109
Abb. 4.9: Einfluss von Gärtemperatur und Vitalität auf die Bildung von 3-Methylbutanol (20-l-Maßstab).....	110
Abb. 4.10: Einfluss von Temperatur und Belüftung auf die Bildung von 3-Methylbutanol in Brauerei A .....	111
Abb. 4.11: Einfluss der Temperatur und Belüftung auf die Bildung von 2-Phenylethanol (20-l-Maßstab).....	113
Abb. 4.12: Einfluss von Extrakt und Hefegabe auf die Bildung von 2-Phenylethanol (20-l-Maßstab).....	113
Abb. 4.13 a+b: 2-Phenylethanol Werte in Abhängigkeit des Extraktes (a) und der Hefegabe (b) bei unterschiedlichen Temperaturen (20-l-Maßstab).....	114
Abb. 4.14: Einfluss von Temperatur und Vitalität auf die Bildung von 2-Phenylethanol (20-l-Maßstab).....	115
Abb. 4.15: Einfluss von Temperatur und Belüftung auf die Bildung von 2-Phenylethanol in Brauerei A.....	116
Abb. 4.16 a+b: Ethylacetatwerte in Abhängigkeit des Extraktes bei 9 °C (a) und 15 °C (b) für verschiedene Hefestämme .....	121
Abb. 4.17 a+b: Einfluss von Extrakt/Temperatur (a) und Extrakt/Hefegabe auf die Bildung von Ethylacetat im 20-l-Maßstab .....	123
Abb. 4.18: Einfluss von Temperatur/Belüftung (a) und Temperatur/Hefevitalität auf die Bildung von Ethylacetat im 20-l-Maßstab .....	123
Abb. 4.19: Einfluss von Temperatur und Belüftung auf die Bildung von Ethylacetat in Brauerei A .....	124
Abb. 4.20: Isoamylacetatwerte in Abhängigkeit des Extraktes für verschiedene Hefestämme.....	126

Abb. 4.21: Isoamylacetatwerte in Abhängigkeit der Temperatur für verschiedene Hefestämme.....	127
Abb. 4.22: Einfluss von Extrakt und Gärtemperatur auf die Bildung von Isoamylacetat (20-I-Maßstab).....	128
Abb. 4.23: Einfluss von Gärtemperatur und Vitalität auf die Bildung von Isoamylacetat (20-I-Maßstab).....	129
Abb. 4.24: Einfluss von Temperatur und Belüftung auf die Bildung von Isoamylacetat in Brauerei A .....	130
Abb. 4.25 a+b: Einfluss von Extrakt/Temperatur (a) und Extrakt/Belüftung auf die Bildung von Ethylestern im 20-I-Maßstab .....	132
Abb. 4.26 a+b: Einfluss von Temperatur/Hefegabe (a) und Temperatur/Vitalität (b) auf die Bildung von Ethylestern im 20-I-Maßstab .....	132
Abb. 4.27: Einfluss von Hefegabe und Belüftung auf die Ethylesterbildung in Brauerei A.....	133
Abb. 4.28: SO <sub>2</sub> -Werte in Abhängigkeit des Extraktes für verschiedene Hefestämme .....	138
Abb. 4.29: SO <sub>2</sub> -Werte in Abhängigkeit der Hefegabe für verschiedene Hefestämme .....	139
Abb. 4.30: Einfluss von Extrakt und Belüftung auf die Bildung von SO <sub>2</sub> (20-I-Maßstab) .....	140
Abb. 4.31 a+b: Einfluss von Belüftung/Hefegabe (a) und Belüftung/Vitalität auf die Bildung von SO <sub>2</sub> im 20-I-Maßstab .....	141
Abb. 4.32 a+b: Einfluss von Temperatur und Hefegabe bei unterschiedlichen Belüftungen auf die Bildung von SO <sub>2</sub> in Brauerei A.....	142
Abb. 4.33: Einfluss von Extrakt und Hefegabe auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab).....	148
Abb. 4.34: Einfluss von Extrakt und Hefegabe auf die Alterungsnote (20-I-Maßstab) .....	148
Abb. 4.35: Einfluss von Extrakt und Hefegabe auf die Alterungsakzeptanz (20-I-Maßstab).....	149
Abb. 4.36: Einfluss von Hefegabe und Belüftung auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab) .....	150

Abb. 4.37: Einfluss von Hefegabe und Belüftung auf die Alterungsnote (20-I-Maßstab).....	150
Abb. 4.38: Einfluss von Hefegabe und Belüftung auf die Alterungsakzeptanz (20-I-Maßstab).....	150
Abb. 4.39: Einfluss von Hefegabe und Temperatur auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab).....	151
Abb. 4.40: Einfluss von Hefegabe und Temperatur auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab).....	151
Abb. 4.41: Einfluss von Hefegabe und Temperatur auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab).....	152
Abb. 4.42: Einfluss von Hefegabe und Vitalität auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab).....	152
Abb. 4.43: Einfluss von Hefegabe und Vitalität auf die Alterungsakzeptanz (20-I-Maßstab).....	153
Abb. 4.44 a+b: Einfluss von Temperatur, Hefegabe und Belüftung auf das Delta der Alterungsindikatoren in Brauerei A.....	155
Abb. 4.45 a+b: Einfluss von Temperatur, Hefegabe und Belüftung auf die Alterungsnote in Brauerei A.....	156
Abb. 4.46 a+b: Einfluss von Temperatur, Hefegabe und Belüftung auf die Alterungsakzeptanz in Brauerei A.....	156

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Einteilung von Vitalitätsmethoden in Anlehnung an HEGGART et al. [114].....	3
Tab. 2.2: Alterungscarbonyle aus dem Abbau langkettiger ungesättigter Fettsäuren [18].....	46
Tab. 3.1: Alterungsskala nach EICHHORN.....	73
Tab. 3.2: Verwendete Stressarten zur Erzeugung unterschiedlicher Hefezustände..	77
Tab. 3.3: Gärbedingungen für den Vergleich der Vitalitätsmethoden .....	78
Tab. 3.4: Verwendete Hefestämme für den Vergleich von Hefevitalitätsmethoden...	79
Tab. 3.5: Versuchsplan für den Vergleich von Hefestämmen.....	80
Tab. 3.6: Würzedaten für den Vergleich von Hefestämmen.....	81
Tab. 3.7: Verwendete Hefestämme für den Vergleich von Hefestämmen .....	82
Tab. 3.8: Versuchsplan für die Variation von Gärparametern und Hefevitalität.....	84
Tab. 3.9: Würzedaten für die Variation von Gärparametern und Hefevitalität .....	84
Tab. 3.10: Untersuchte Merkmale der Variation von Gärparametern und Hefevitalität .....	86
Tab. 3.11 Versuchsplan großtechnische Versuche Brauerei A .....	86
Tab. 3.12: Untersuchte Merkmale der Versuche im Produktionsmaßstab .....	87
Tab. 4.1: Statistische Parameter zur Reproduzierbarkeit mit 5 Wiederholungen .....	89
Tab. 4.2 Statistische Parameter zur Beurteilung der Gärzeitmodelle der verschiedenen Hefestämme.....	93
Tab. 4.3: Gärzeiten von Doppelbestimmungen im großtechnischen Maßstab .....	94
Tab. 4.4: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die Gärzeit der Hefestämme ....	95
Tab. 4.5: Statistische Kennzahlen für das Gärzeitmodell für Versuche im 20 l Maßstab .....	96
Tab. 4.6: Statistische Kennzahlen für das Gärzeitmodell der Versuche in Brauerei A .....	97
Tab. 4.7: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Gärzeit) .....	98
Tab. 4.8: Statistische Parameter zur Beurteilung der 2-Methylbutanol-Modelle der verschiedenen Hefestämme.....	100
Tab. 4.9: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die 2-Methylbutanolbildung der Hefestämme.....	100

Tab. 4.10: Statistische Kennzahlen des 2-Methylbutanol-Modells für Versuche im 20 l Maßstab .....	101
Tab. 4.11: Statistische Kennzahlen für das 2Methylbutanol-Modell der Versuche in Brauerei A .....	103
Tab. 4.12: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (2-Methylbutanol) .....	105
Tab. 4.13: Statistische Parameter zur Beurteilung der 3-Methylbutanol-Modelle der verschiedenen Hefestämme.....	105
Tab. 4.14: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die 3-Methylbutanolbildung der Hefestämme .....	106
Tab. 4.15: Statistische Kennzahlen des 3-Methylbutanol-Modells für Versuche im 20-l-Maßstab .....	108
Tab. 4.16: Statistische Kennzahlen für das 3-Methylbutanol-Modell der Versuche in Brauerei A .....	110
Tab. 4.17: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (3-Methylbutanol) .....	111
Tab. 4.18 Statistische Kennzahlen des 2-Phenylethanol-Modells für Versuche im 20-l-Maßstab .....	112
Tab. 4.19: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das 2-Phenylethanol-Modell der Versuche in Brauerei A .....	115
Tab. 4.20: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (2-Phenylethanol).....	116
Tab. 4.21 Statistische Kennzahlen zur Beurteilung der Ethylacetat-Modelle der verschiedenen Hefestämme.....	119
Tab. 4.22: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die Ethylacetatbildung der Hefestämme.....	120
Tab. 4.23: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Ethylacetat-Modells für Versuche im 20-l-Maßstab .....	122
Tab. 4.24: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Ethylacetat-Modell der Versuche in Brauerei A .....	124
Tab. 4.25: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Ethylacetat).....	125

Tab. 4.26: Statistische Kennzahlen zur Beurteilung der Isoamylacetat-Modelle der verschiedenen Hefestämme.....	125
Tab. 4.27: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die Isoamylacetatbildung der Hefestämme.....	126
Tab. 4.28: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Isoamylacetat-Modells für Versuche im 20-I-Maßstab .....	128
Tab. 4.29: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Isoamylacetat-Modell der Versuche in Brauerei A .....	129
Tab. 4.30: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Isoamylacetat).....	130
Tab. 4.31: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Modells der Summe der Ethylester für Versuche im 20-I-Maßstab .....	131
Tab. 4.32 Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Ethylester-Modell der Versuche in Brauerei A .....	133
Tab. 4.33: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Summe Ethylester) .....	134
Tab. 4.34: Statistische Kennzahlen zur Beurteilung der SO <sub>2</sub> -Modelle der verschiedenen Hefestämme.....	137
Tab. 4.35: F-Werte und p-Werte der Modellterme für SO <sub>2</sub> -Bildung der Hefestämme .....	138
Tab. 4.36: Statistische Kennzahlen und F-Werte des SO <sub>2</sub> -Modells für Versuche im 20-I-Maßstab .....	140
Tab. 4.37: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das SO <sub>2</sub> -Modell der Versuche in Brauerei A .....	142
Tab. 4.38: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (SO <sub>2</sub> ) .....	143
Tab. 4.39: Liste der Alterungsindikatoren.....	144
Tab. 4.40: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Modells für Delta der Alterungsindikatoren der Versuche im 20-I-Maßstab .....	146
Tab. 4.41: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Alterungsnoten-Modells für Versuche im 20-I-Maßstab .....	146
Tab. 4.42: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Alterungsakzeptanz-Modells für Versuche im 20-I-Maßstab .....	147

Tab. 4.43: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Modells für Delta der Alterungsindikatoren der Versuche in Brauerei A.....	154
Tab. 4.44: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Modell der Alterungsnote der Versuche in Brauerei A .....	154
Tab. 4.45: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Modell der Alterungsverkostung der Versuche in Brauerei A.....	154
Tab. 4.46: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Delta-Summe Alterungsindikatoren) .....	157
Tab. 4.47: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Alterungsnote).....	157
Tab. 4.48: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Alterungsakzeptanz) .....	157
Tab. 4.49: Komponenten der Summe der Ester (Bieraromastoffanalytik) .....	160
Tab. 4.50: Einflussgrößen der Bieralterung bei Variation der Stammwürze .....	160
Tab. 4.51: Einflussgrößen der Bieralterung bei Variation der Gärtemperatur.....	161
Tab. 4.52: Einflussgrößen der Bieralterung bei niedriger Hefegabe und Variation der Belüftung .....	162
Tab. 4.53: Einflussgrößen der Bieralterung bei hoher Hefegabe und Variation der Belüftung .....	162



### 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Im Prozess der Bierbereitung stellt die Gärung einen entscheidenden Schritt dar. Das Aroma des Bieres wird maßgeblich durch die entstehenden Stoffwechselprodukte der Hefe geprägt und damit wird in diesem Schritt eines der wichtigsten Kaufkriterien des Konsumenten definiert. Um Kunden binden zu können und damit den ökonomischen Erfolg zu sichern, ist es für eine Brauerei wichtig, eine gleich bleibend gute Qualität zu produzieren.

Die Gärleistung und die Bildung von aromaaktiven Stoffwechselprodukten der Hefe werden stark von den Anstell- und Gärbedingungen beeinflusst. Um in diesem Zusammenhang die Forderung nach einer gleich bleibenden Produktqualität zu erfüllen, ist es wichtig, die Anstell- und Gärbedingungen konstant zu halten. Gleichbleibende Gärzeiten spielen ebenfalls für die Planbarkeit der Prozesse innerhalb der Brauerei eine wichtige Rolle. Neben den gewählten Gärbedingungen hängt die Gärleistung auch vom physiologischen Zustand der Hefe ab. Der physiologische Zustand der Hefe wird durch den Anteil toter Zellen (Viabilität) und dem Zustand der lebenden Zellen (Vitalität) charakterisiert. Die Bestimmung der Hefevitalität ist insofern schwierig, als es kein allgemein anerkanntes Kriterium gibt, das den physiologischen Zustand der lebenden Zellen charakterisiert. Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit, eine Methode zur zuverlässigen Bestimmung der Hefevitalität zu finden. Diese Methode soll die Basis für Untersuchungen zu Auswirkungen der Hefevitalität auf die Bierqualität darstellen. Dass der Zustand einer Hefepopulation Auswirkungen auf die Geschwindigkeit des Extraktabbau hat, ist allgemein bekannt und durch Untersuchungen belegt [11, 21, 42, 81, 93, 94, 162, 174, 176, 258, 300]. Vielfach wurde ebenfalls angenommen, dass der physiologische Zustand Auswirkungen auf die Bierqualität und insbesondere das Bieraroma hat [11, 21, 93, 94, 106, 114, 128, 149, 174, 177, 233, 251, 278]. Dieser Zusammenhang wurde bisher kaum untersucht. Daher stellte die Untersuchung dieses Aspektes das Hauptziel der vorliegenden Arbeit dar. Da die Anstell- und Gärungsbedingungen die Gärleistung und die Bierqualität ebenfalls beeinflussen und es anzunehmen ist, dass es zwischen den Einflussfaktoren zu Wechselwirkungen kommt, wurde die Variation wichtiger Gärungsparameter ebenfalls in die Untersuchung miteinbezogen.

Zu den Auswirkungen der Gärungsparameter auf die Stoffwechselprodukte der Hefe wurden in den letzten vier Jahrzehnten viele Untersuchungen durchgeführt, jedoch ergaben diese zum Teil sehr widersprüchliche Aussagen. Um an dieser Stelle weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit umfangreiche Versuchsreihen mit Variationen der Gärparameter durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Bierqualität ist die Geschmacksstabilität des abgefüllten Bieres. Vom Zeitpunkt der Abfüllung an verändert sich das Bieraroma zum Teil sehr deutlich. Da der Handel immer längere Mindesthaltbarkeiten fordert und diese aufgrund der Marktmacht auch durchsetzen kann, müssen die Brauereien mit den zur Verfügung stehenden technologischen Mitteln versuchen, die Veränderung des Aromas so gering wie möglich zu halten. Andernfalls besteht die Gefahr, dass Biere einer Marke mit unterschiedlichen Aromaeindrücken im Handel erhältlich sind, was zu einer ablehnenden Haltung des Konsumenten führen kann. Im Bereich der Geschmacksstabilität wurden in den letzten 30 Jahren viele Erkenntnisse über Mechanismen und Ursachen der Veränderungen gewonnen und auch Möglichkeiten zur technologischen Beeinflussbarkeit aufgezeigt. Jedoch stellt dieses Gebiet weiterhin eine Herausforderung für die Brauwirtschaft dar. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde untersucht, inwieweit die Hefevitalität und die Gärparameter Auswirkungen auf die Geschmacksstabilität haben, da es zu diesen Aspekten kaum Erkenntnisse gibt.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Hefevitalität

Im deutschen Sprachgebrauch wird Hefevitalität im Allgemeinen im Sinne des Lebend-Tot-Nachweises verwendet. Da aber Vitalität (lateinisch vita = Leben) allgemein die Lebenskraft bzw. Energiepotenzial eines Organismus bezeichnet [1], wird mit diesem Begriff ebenfalls der physiologische Zustand von lebenden Zellen verstanden. Um Missverständnisse zu vermeiden, sollte das aus dem Englischen stammende Begriffspaar Viabilität und Vitalität verwendet werden. Dabei bedeutet Viabilität die Lebensfähigkeit (Lebend-Tot-Nachweis) und Vitalität ist ein Maß für den physiologischen Zustand der lebenden Zellen.

#### 2.1.1 Methoden zur Bestimmung der Hefevitalität

Die Definition der Vitalität als „Maß für den physiologischen Zustand der lebenden Zellen“ umschreibt zwar korrekt die Bedeutung des Begriff, aber es stellt sich die Frage mit welchen Indikatoren sich der physiologische Zustand von Zellen beschreiben lässt.

**Tab. 2.1: Einteilung von Vitalitätsmethoden in Anlehnung an HEGGART et al. [114]**

	Methode basiert auf:	Beispiele
Vitalitätsmessungen	Metabolische Aktivität	Vitalfärbung
		Mikrokalometrie
		Reduktion der vicinalen Diketone (VDK)
		Proteaseaktivität der Hefe
		Magnesium Ion Release Test (MRT)
		Spezifische Sauerstoffaufnahme ( $Q_{O_2}$ )
		Acidification Power Test
		Intrazellulärer pH-Wert (ICP)
	Messung zellulärer Komponenten	Adenosin Triphosphat (ATP)
		Adenylate Energy Charge (AEC)
		NADH (Fluorometrie)
		Glykogen und Trehalose
		Sterole und ungesättigte Fettsäuren
	Glykolytische Flussrate oder Gärcapazität	Glykolytische Flussrate
		CO <sub>2</sub> -Messung
Kurze Gärtests		

Da es dazu keine eindeutige Antwort gibt, haben Forscher unterschiedlichste Ansätze zur Messung der Vitalität gewählt. Einen guten Überblick zu diesem Thema bieten die

Reviews von LENTINI [149] und von HEGGART et al. [114]. Aus letzterem stammt die Tabelle 2.1 in der die Methoden in drei Gruppen unterteilt wurden. Verschiedentlich wurde auch eine Einteilung in nur 2 Gruppen „Messung von Hefeinhaltsstoffen“ und „Messung von Hefeaktivitäten“ vorgenommen [11].

AXCELL und O'CONNER-COX [11] bezweifelten die Möglichkeit, durch die Messung eines Hefeinhaltsstoffes bzw. einer Hefeaktivität auf den komplexen physiologischen Zustand der Hefezellen zu schließen. Aus diesem Grund versuchten diese Autoren die Definition von Hefevitalität enger zu fassen und damit stärker den Bezug zur Anwendung in der Brauereitechnologie herzustellen. Da die Hefe im Bereich der Brauerei verschiedensten Stresssituationen (hohe Ethanolgehalte, hohe Drücke, Nährstoffentzug etc.) ausgesetzt ist, wurde die Definition „the ability to endure stress and still perform“ vorgeschlagen. Das bedeutet, dass Vitalität die Fähigkeit der Hefe widerspiegelt, Stress auszuhalten und trotzdem ihre erwünschten Stoffwechselvorgänge ausführen zu können. Mit erwünschten Vorgängen waren speziell die notwendigen Stoffwechselaktivitäten für die alkoholische Gärung in der Brauerei gemeint sowie ein notwendiges Maß an Vermehrung und eine zügige Gärung mit der erwünschten Qualität des resultierenden Bieres. Die Autoren entwickelten auf der Basis der oben genannten Überlegungen ein alternatives Konzept zur Bestimmung der Hefevitalität. Dieses Konzept beruhte auf der Ermittlung einer Absterbekurve einer Hefeprobe unter Stressbedingungen. Für die Stressbedingungen wurden die Hefeproben mit verschiedenen Konzentrationen von Ethanol versetzt und die Zunahme an toten Zellen über die Zeit bei einer hohen Temperatur (38 °C) verfolgt. Auch wenn das Konzept sehr viel versprechend ist und in der Untersuchung deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Hefeproben gefunden wurden, so waren dennoch keine Eindeutigen Zusammenhänge mit dem Gärverhalten der Hefeproben zu finden. [11]

Ein neuer Ansatz zur Bestimmung des physiologischen Zustandes der Hefe ist die Messung der Aktivität von Schlüsselenzymen [296, 297]. Beispielsweise werden dabei die Aktivitäten der Maltase (MAL), Pyruvat-Decarboxylase (PDC), Pyruvat-Dehydroxygenase (PDH) oder Alkohol-Dehydrogenase (ADH) charakterisiert. Die Höhe der Aktivität dieser Enzyme steht in Zusammenhang mit der Gäraktivität der Hefe. Interessant ist, dass sich mit dieser Methode Auswirkungen verschiedener Kultivierungs- und Anstellbedingungen auf die Enzymaktivitäten während einer

Propagation bzw. einer Gärung darstellen lassen und damit Optimierungen von Prozessen ermöglicht werden können. Die Entwicklung dieser Methode erfolgte jedoch zeitgleich mit den vorliegenden Untersuchungen und wurde daher nicht berücksichtigt.

Die in Tabelle 2.1 genannten Vitalitätstests auf Basis der Messungen von ATP, der „Adenylate Energy Charge“ (Berechnung aus ATP, ADP und AMP) und von NADH werden im Review von HEGGART et al. [114] als nicht empfehlenswert eingestuft, da Probleme bei der Messung auftreten.

Die Messung von Sterolen und ungesättigten Fettsäuren eignet sich ebenfalls nicht zur Bestimmung der Hefevitalität im Sinne einer Vorhersage der Gärleistung. Zwar spielen Sterole und ungesättigte Fettsäuren eine entscheidende Rolle für den Erhalt von Struktur und Funktion von Membranen, insbesondere der Plasma-Membran, daher steht der Sterolgehalt auch in engem Zusammenhang mit der Gäraktivität [226]. Jedoch kann aus dem Gehalt von Sterolen in einer Hefecharge vor der Hefegabe nicht notwendigerweise auf die Gärleistung geschlossen werden, da bei ausreichender Zufuhr von Sauerstoff zu Beginn der Gärung die notwendigen Mengen an Fettsäuren und Sterolen in kurzer Zeit synthetisiert werden. Aus diesem Grund können auch Hefechargen mit geringen Sterolgehalten vergleichbare Gärleistung erbringen wie Hefen mit hohen Sterolgehalten (z. B. aerob hergeführte Hefen) [43].

Weitere Vitalitätstests auf Basis von Hefeinhaltsstoffen stellen die Messungen von Glykogen und Trehalose dar. Beide Substanzen werden als Reservekohlenhydrate bezeichnet [39]. Das Disaccharid Trehalose dient mehr als Schutzsubstanz gegenüber Stresseinflüssen, als dass es einen Reservestoff für die Energiegewinnung darstellt [4, 39, 53, 157, 158, 206]. Aus diesem Grund konnten auch keine direkten Zusammenhänge zwischen dem Gehalt an Trehalose und der Gäraktivität gefunden werden [38].

Das Polysaccharid Glykogen dient der Hefezelle als Reservestoff und wird insbesondere während der frühen Phase der Gärung benötigt. In den ersten Stunden der Gärung, in denen bereits Sauerstoff aufgenommen und die notwendigen Sterole gebildet werden, nimmt die Hefe noch keine nennenswerten Mengen an externen Kohlenhydraten (Glucose, Maltose etc.) auf. In diesem Zeitraum wird Glykogen zu großen Teilen abgebaut. [227]

In einer Arbeit wurde ein stöchiometrischer Zusammenhang zwischen dem Abbau von Glykogen und dem Aufbau von Sterolen dargestellt [228]. Daraus wird geschlossen, dass Glykogen für eine ausreichende Vermehrung und damit auch für einen akzeptablen Gärverlauf notwendig ist.

Aufgrund dieser Beziehung zwischen Glykogen und der Gäraktivität wurden viele Arbeiten auf dem Gebiet durchgeführt. Dabei wurde bei einer Reihe von Arbeiten der erwartete Zusammenhang zwischen hohen Glykogengehalten und guten Gärleistungen gefunden [165, 166, 186]. Dabei konnte die dargestellte enge Verknüpfung zwischen Glykogenabbau und der Bildung von Lipiden nicht immer bestätigt werden [186]. In anderen Arbeiten konnte keine Verbindung zwischen absolutem Glykogengehalt und Gärleistung gefunden werden [54, 238]. Dabei handelt es sich um Arbeiten, die im großtechnischen Maßstab durchgeführt wurden. Aus diesen Gründen vermuten CANTRELL et al. [54], dass Hefestämme, die nur im Labor verwendet werden, tatsächlich große Mengen an Glykogen benötigen. Stämme, die in der Bierproduktion an niedrige Glykogengehalte gewöhnt sind, erreichen auch mit geringeren Mengen an Glykogen vergleichbare Gärleistungen. QUAIN [226] hielt jedoch dagegen, dass es im Produktionsmaßstab schneller zu Probenahmefehlern durch Sauerstoffeintrag kommt und daher die gemessenen Glykogenwerte erheblich niedriger liegen. Eine Studie von O'CONNOR-COX et al. [206] kam ebenfalls zu dem Schluss, dass der Absolutgehalt an Glykogen kein ausreichender Hinweis auf die Gärleistung ist, dass aber die Differenz zwischen Ausgangsgehalt und Gehalt von Glykogen nach der aeroben Phase der Gärung einen guten Indikator für die Hefequalität darstellt.

Von den Vitalitätstests, die auf Hefeaktivitäten basieren, wurden ebenfalls einige von HEGGART et al. [114] als nicht relevant erachtet. So können mit Färbemethoden jeweils nur einzelne sehr spezielle Hefeinhaltsstoffe oder Stoffwechselprodukte bestimmt werden, die keine Aussage über den Gesamtzustand der Zellen zulassen. Die Verwendung von Mikrokalorimetern oder die Bestimmung der spezifischen Sauerstoffaufnahme erfordert spezielle und sehr teure Messgeräte. Kurze Gärtest benötigen für zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse mindestens 24 h und sind damit nicht für die schnelle Vorhersage der Gärleistung geeignet. Erhöhte Proteaseaktivitäten lassen bereits auf Autolysevorgänge schließen und sind damit

nicht in der Lage, gute Hefen von etwas schlechteren Hefen zu unterscheiden. Lediglich sehr schlechte Chargen können identifiziert werden, was nicht Sinn eines Vitalitätstest ist. [114]

Der in Tab. 2.1 aufgeführte Magnesium-Release-Test basiert auf der Feststellung, dass Hefezellen, die in Würze suspendiert werden, zunächst das Spurenelement Magnesium abgeben, dieses innerhalb kurzer Zeit jedoch wieder aufnehmen [175].

Des Weiteren wurde festgestellt, dass die abgegebenen Mengen an Magnesium in Zusammenhang mit Merkmalen der Gärleistung wie Vermehrung, Alkoholproduktion und Diacetylabbau stehen. Je mehr Magnesium die Hefen abgeben, desto besser sind die Gärleistungen. Und Hefen, die nach dem Einbringen in Würze sogar Magnesium aufnehmen, zeigten sehr schlechte Gärleistungen. Mit diesem Vitalitätstest wurde ein Zusammenhang mit den Gärleistungen in einer umfangreichen Studie in der Produktion einer Brauerei gefunden. [177]

Da diese Methode erfolgreich für die Beurteilung der Hefequalität einer ganzen Braugruppe verwendet wurde, erschien dieser Test als besonders geeignet [174]. Die Beurteilung der Hefe durch diesen Test wurde in der Braugruppe nach einiger Zeit wieder aufgegeben, da die Ergebnisse eine mangelhafte Reproduzierbarkeit aufwiesen (persönliche Mitteilung von BARRY AXCELL). Dieses war insbesondere der Fall, wenn unterschiedliche Personen den Test durchführten.

Die bisher beschriebenen Vitalitätstests wurden aus den genannten Gründen nicht für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. Aus der Tabelle 2.1 wurden für die Untersuchungen die Methoden „Reduktion von vicinalen Diketonen“, „Acidification Power Test“, „Messung des intrazellulären pH-Wertes“ (in zwei Varianten) und die „Messung von gebildetem CO<sub>2</sub>“ verwendet. Zusätzlich dazu wurden noch zwei Tests in die Versuchsreihe aufgenommen, die in den Reviews noch nicht erwähnt wurden. Einmal handelt es sich dabei um die so genannte „Vitaltitration“ und die „Messung von gebildetem Formazan aus Tetrazoliumsalz“. Die verwendeten Methoden werden in den folgenden Abschnitten im Detail erläutert.

### **2.1.1.1 Intrazellulärer pH-Wert (ICP; SICP)**

Der intrazelluläre pH-Werte und die ihn regulierenden H<sup>+</sup>-Protonen Pumpen spielen für die Hefephysiologie wichtige Rollen. Beispielsweise steht die Vermehrung in direktem Zusammenhang mit der Aktivität der Plasma-Membran-ATPase und damit

auch mit dem intrazellulären pH-Wert [222, 248]. Außerdem ist der transmembrane  $H^+$ -Gradient, der durch die Aktivität der Plasma-Membran-ATPase erzeugt wird, die treibende Kraft für die Aufnahme von Nährstoffen [59, 73, 245, 247]. Im weiteren reguliert der intrazelluläre pH-Wert Schlüsselenzyme der Glycolyse und Glyconeogenese durch die Regulierung des c-AMP [164, 204, 225, 259]. Das c-AMP spielt eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener Enzyme, wie der Fructose-1,6-bisphosphatase [164, 185] und der 6-phosphofructo-2-kinase [86, 309, 310].

Es existieren verschiedene Methoden zur Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes. Dazu gehören Methoden auf Basis der Verteilung von schwachen Säuren [115, 235], die  $^{31}P$ -Nuclear Magnetic Resonance" Messung [55, 66, 101, 229, 237] und die Verwendung von pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen [44, 51, 214].

IMAI et al. [125] entwickelten zunächst eine Methode zur allgemeinen Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes auf Basis des pH-sensitiven Farbstoffes 5(6)-Carboxyfluorescein bzw. dessen veresterte Form 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat.

Um aus der Messung des intrazellulären pH-Wertes eine Messung des physiologischen Zustandes zu machen, verwendeten IMAI et al. [124] einen niedrigen externen pH-Wert bei der Messung. Damit muss die Hefezelle  $H^+$ -Ionen gegen einen starken Gradienten aus der Zelle ausschleusen um intrazellulär einen hohen pH-Wert aufrechterhalten zu können. Durch diese Veränderung des externen pH-Wertes ergibt sich aus der intrazellulären pH-Wert Messung ein Stresstest und diese steht damit im Einklang mit der von AXCELL et al. formulierten Definition der Hefevitalität als „the ability to endure stress and still perform“ [11].

Wie die theoretische Betrachtung dargestellt hat, ist der intrazelluläre pH-Wert für viele Stoffwechselforgänge von großer Bedeutung. Dass diese Methode auch zuverlässig und sensibel Aussagen über den Zustand von Hefechargen machen kann, die in direktem Zusammenhang mit der Gäraktivität und der Qualität des fertigen Bieres stehen, zeigen mehrere Studien [21, 119, 124, 126]. Eine Bestätigung, dass Vitalitätsbestimmung im Brauereibereich über den intrazellulären pH-Wert möglich ist, zeigten Untersuchungen die mit der  $^{31}P$ -NMR Methode durchgeführt wurden [93, 94]. Diese Methode setzt jedoch spezialisierte und teure Analysengeräte voraus und ist damit für eine Routineanalytik in der Brauerei nicht geeignet. Auch die ICP-Methode von IMAI et al. benötigt mit einem Fluoreszenzspektrometer ein spezielles Analysengerät. Der Vorteil gegenüber der  $^{31}P$ -NMR Messung ist aber, dass



das Gerät nicht so teuer ist wie ein NMR-Gerät und das Fluoreszenzspektrometer im Brauereibereich für weitere Anwendungen verwendet werden kann. Ein weiteres Problem der ICP-Methode ist mit 3,5 bis 4 h die Dauer der Durchführung. Mit diesem Arbeitsaufwand ist eine Etablierung als Routineanalytik nicht zu erwarten.

Um die Methode im Bereich Zeit- und Arbeitsintensität attraktiver zu machen, wurde am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I eine zeitlich verkürzte Variante der Methode entwickelt (S-ICP). Der Zeitaufwand für diese Variante beträgt ca. 45 min. und sie zeigt eine sehr gute Korrelation mit der originalen Methode. [260]

### **2.1.1.2 Acidification Power Test**

Der Acidification Power Test (APT) beruht, wie die ICP-Messung auf der Fähigkeit der Hefe, Protonen ( $H^+$ -Ionen) aus der Zelle ausschleusen zu können [81, 208, 250]. Damit basiert der Test ebenfalls auf der Aktivität der Plasma-Membran-ATPase und ihrer wichtigen Bedeutung für die Nährstoffaufnahme (Abschnitt 2.1.1.1). Im Gegensatz zur ICP-Messung wird dabei nicht der intrazelluläre pH-Wert gemessen, sondern die Absenkung des pH-Wertes des umgebenden Mediums durch die Protonenabgabe der Hefe. Da das äußere Medium keine puffernde Wirkung zeigen darf, wird die gereinigte Hefe in destilliertem Wasser untersucht. Werden Nährstoffe in die Zelle eingeschleust, muss der Protonenausstoß erhöht werden um den notwendigen Protonengradienten für die Nährstoffaufnahme zu erreichen. Im Rahmen des Acidification Power Testes wird dieses genutzt, in dem die pH-Wertänderung in Wasser/Hefesuspension nach Zugabe einer Glucoselösung verfolgt wird [81, 208, 250].

Die APT-Messung wurde von OPEKAROVA und SIGLER [208] entwickelt. Im Laufe der Zeit wurden für den Test mehrfach Modifikationen vorgeschlagen und verwendet [128, 135, 212, 250]. Die neueste Variante wurde von SIDDIQUE und SMART [250] vorgestellt. Diese Variante wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, da diese in einer Reihe aktueller Untersuchungen verwendet wurde [250, 277, 278]. Um eine bessere Reproduzierbarkeit der Methode zu erreichen, wurden im Gegensatz zu den bisherigen Tests zwei Parameter gemessen. Der „Water Acidification Power“-Wert (WAP) wurde als die Änderung des pH-Wertes definiert, die Hefezellen verursachen, die in destilliertem Wasser für 20 Minuten suspendiert wurden. Da die Ausschleusung von Protonen hierbei nur durch die intrazellulären Energiereserven, also über Glykogen erfolgt, soll der WAP-Wert damit eine Aussage über die

intrazelluläre Glykogenkonzentration darstellen. Der „Glucose Acidification Power“-Wert (GAP) wurde als die Änderung des pH-Wertes definiert, die Hefezellen über 10 min in destilliertem Wasser und weitere 10 min nach der Zugabe einer Glucoselösung verursachen. Die pH-Änderung, die damit nur durch die Glucosezugabe entsteht, wurde „Glucose Induced Proton Efflux“ (GIPE) genannt und wurde durch die Subtraktion des WAP-Wertes vom GAP-Wert berechnet.

Der APT korrelierte wiederholt bei Untersuchungen mit der Gäraktivität von Hefeproben, wobei der Zusammenhang am besten war, wenn die Hefeproben unter sehr ungünstigen Bedingungen gelagert wurden [42, 81, 162]. Das insbesondere zwischen schlechteren Hefechargen, aber nicht zwischen besseren Hefechargen unterschieden werden konnte, wird unter anderem damit begründet, dass der pH-Wert eine logarithmische Größe ist und damit der Acidification Power Wert maximal einen Wert von 2,8 erreichen kann [128]. Aus diesem Grund wurden zwei Varianten vorgeschlagen, die dieses Problem vermeiden sollten [128, 212]. Jedoch fanden beide Varianten in der Literatur keine Resonanz. Neben den genannten Problemen der Methode kommen Schwierigkeiten hinzu, die durch eine ungenaue pH-Messung bzw. eine ungenaue Kalibrierung des pH-Meters entstehen [135], ebenso wurde von Stammspezifiken bei den Resultaten berichtet [250].

### **2.1.1.3 Vitaltitration**

Die Vitaltitration kann als eine Variante des APT angesehen werden. Bei dieser Methode wird die pH-Abnahme in einem Medium verfolgt, die durch die Hefezellen verursacht wird. Im Unterschied zum APT wird jedoch die Hefe in einer NaCl-Lösung suspendiert und zunächst mit 0,1 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 10,0 gebracht und dann die Zeit gestoppt, die die Hefe benötigt, um einen pH-Wert von 6,3 zu erreichen. Aus dem benötigten Volumen an NaOH-Lösung und der gestoppten Zeit wird ein „Yeast Metabolic Index“ berechnet [233].

### **2.1.1.4 Diacetylreduktion**

Diacetyl (2,3-Butandion) ist ein sehr aromaintensives Stoffwechselprodukt der Hefe [39, 190]. In den meisten Fällen ist das Aroma von Diacetyl unerwünscht. Der Stoff wird zusammen mit 2,3-Pentandion in der Regel als Indikatorsubstanz des Reifungsprozesses des Bieres betrachtet, da beide Stoffe zunächst gebildet werden

und im weiteren Verlauf wieder abgebaut werden. Ist der Abbau unter die Geschmacksschwelle erfolgt, ist die Reifung abgeschlossen [18, 39, 190].

Beide Stoffe zusammen werden auch als vicinale Diketone (VDK) bezeichnet und werden während der Synthese der Aminosäuren Valin und Isoleucin als Nebenprodukte gebildet. Bei einer übermäßigen intrazellulären Konzentration von  $\alpha$ -Acetohydroxysäuren ( $\alpha$ -Acetolactat und Acetohydroxybutyrat) werden diese während der Hauptgärung in die Würze ausgeschieden. Im Folgenden werden  $\alpha$ -Acetolactat und Acetohydroxybutyrat durch eine nicht-enzymatische oxidative Decarboxylierung außerhalb der Zelle in Diacetyl (2,3-Butandion) und in 2,3-Pentadion umgewandelt. Im weiteren Verlauf werden die vicinalen Diketone durch die Hefe wieder aufgenommen und abgebaut. Diacetyl wird zu Acetoin und weiter zu 2,3-Butandiol abgebaut, 2,3-Pentadion wird zu 2,3-Pentandiol umgewandelt [40, 41].

Da in der Betriebspraxis, insbesondere in der großtechnischen Produktion, nicht der Extraktabbau sondern der Diacetylverlauf die Gärbehälterstandzeiten limitiert, wird für diese Methode die Fähigkeit der Hefe auf die Reduktion von Diacetyl überprüft. Die Methode von BOULTON und QUAIN [40, 41] beruht auf der Verfolgung der Abnahme einer zugesetzten Diacetylmenge in einer Hefe/Puffersuspension.

### 2.1.1.5 Messung der CO<sub>2</sub>-Bildung

Kohlendioxid ist ein direktes Produkt der alkoholischen Gärung der Hefe. Die Bildung von CO<sub>2</sub> wird unter standardisierten Bedingungen als gängige Methode zur Beurteilung des Gärvermögens für Mikroorganismen verwendet (z. B. Warburg-Manometer). Die Bildung von CO<sub>2</sub> wird indirekt über den Druckanstieg innerhalb einer festgelegten Zeitspanne in einem geschlossenen Gefäß ermittelt. Diese Methode hat eine sehr gute Reproduzierbarkeit und scheint direkt mit der Gäraktivität zu korrelieren. Jedoch wird bei der Methode nicht berücksichtigt, dass die Vermehrung im Bereich der Brauereigärung eine entscheidende Rolle spielt. [114]

MÜCK und NARZIß [184] stellten ein Instrument vor, mit dem in relativ kurzer Zeit ein Test auf die CO<sub>2</sub>-Bildung automatisiert durchgeführt werden kann. Dieses Gerät war jedoch teuer und wurde nie in einer nennenswerten Stückzahl produziert.

Da die Druckmessung ein einfaches Verfahren ist, wurde für die vorliegende Arbeit ein simpler Ansatz gewählt, um eine Methode im Test zu verwenden, die ohne großen Aufwand in jeder Brauerei durchzuführen ist. Dazu wird abzentrifugierte Hefe in Würze gegeben und diese Suspension in einer handelsüblichen Bierflasche

(verschlossen mit Kronkorken) auf einem Magnetrührer über eine bestimmte Zeit gerührt. Die Verwendung von abzentrifugierter Hefe wurde gewählt, damit eine gleiche Menge an Biomasse für den Test zur Verfügung steht. Vergleichbare Zellzahlen einzustellen wäre erheblich aufwendiger. Der Druckanstieg wird über ein handelsübliches Flaschenmanometer verfolgt. Auch wenn es im Allgemeinen bei der Messung der CO<sub>2</sub>-Bildung für notwendig erachtet wird, dass die Temperatur genauestens geregelt wird [149], so wurde im vorliegenden Fall auf eine Temperierung verzichtet, um bewusst einen einfachen Aufbau zu verwenden.

### 2.1.1.6 Hefevitalitätstest auf Basis von Benzoquinon und Tetrazoliumsalz

Diese Methode wurde im Jahr 2003 von TSUKATANI et al. veröffentlicht [268]. Sie beruht auf der Fähigkeit der Hefe Quinone über Enzymsysteme zu Semiquinonradikalen umzusetzen. Eine Umsetzung mit Sauerstoff führt zurück zum Ausgangsquinon. Dabei werden Superoxid-Anion-Radikale gebildet, die wiederum Tetrazoliumsalze zu Formazan umsetzen können [268]. Diese Reaktion für zwei Klassen von Quinonen (Naphthoquinone und Benzoquinone) ist in Abb. 2.1 dargestellt.

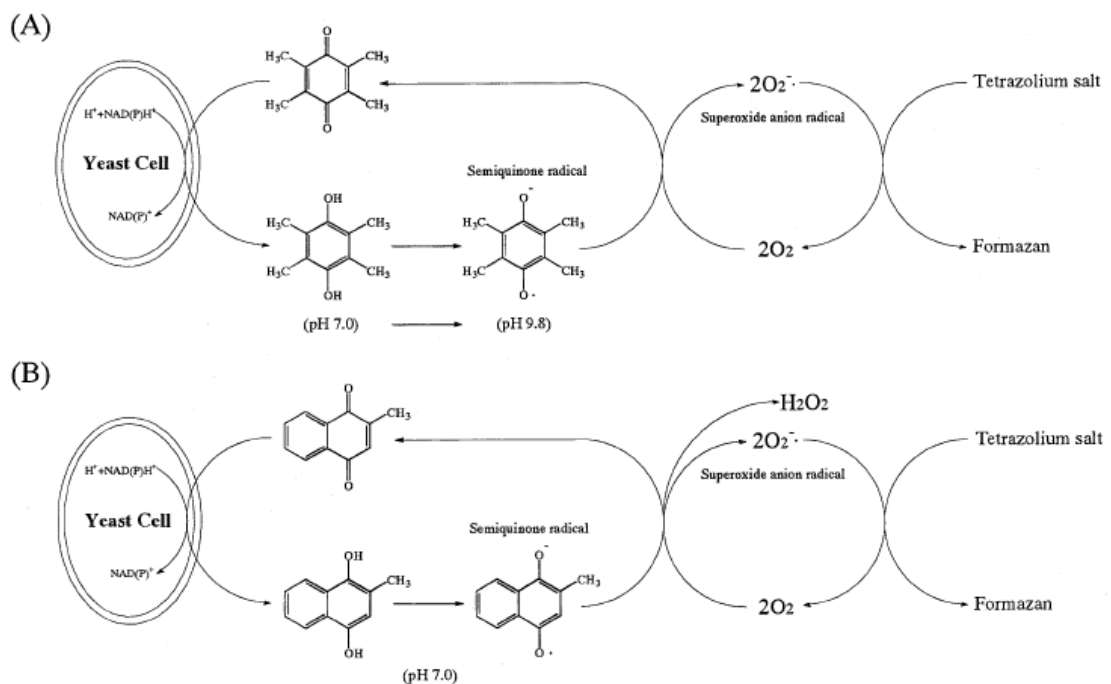


Abb. 2.1: Postulierte Reaktionsmechanismen für die Reduktion von Tetrazoliumsalz unter Anwesenheit von Hefezellen und Mediatoren. (A) Duroquinon, (B) Menaquinon[268]

Quinone sind Lipidmoleküle, die in allen Spezies von atmungs- und photosynthetisch aktiven Mikroorganismen vorkommen. Sie werden nicht nur als chemotaxonomische Marker in der Klassifizierung von Mikroorganismen verwendet, sondern auch zur Beurteilung von mikrobiellen Populationen in Bezug zu Menge, Qualität und Aktivität [117].

Quinone werden in zwei Hauptklassen eingeteilt, in Naphthoquinone und Benzoquinone. In einer umfangreichen Versuchsreihe untersuchten TSUKATANI et al. [268] verschiedene Derivate der Quinone unter verschiedenen Bedingungen um die günstigste Kombination mit einem bestimmten Tetrazoliumsalz für den Test zu finden. Das Quinon 2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-Benzoquinon eignete sich danach in einer alkalischen Lösung am besten zur Bestimmung der Hefevitalität.

Dieser Test wurde in der vorliegenden Untersuchung verwendet, da er in sehr kurzer Zeit durchzuführen ist und einen, in der bisherigen Brauliteratur, noch nicht verwendeten Ansatz darstellt.

### **2.1.2 Einfluss der Hefevitalität auf Gärung und Bierqualität**

Neben der Problematik der Messung von Hefevitalität ist die Frage entscheidend, welche Auswirkungen die Hefevitalität auf die Bierbereitung und die Bierqualität hat. Die Zielsetzung bei den meisten Vitalitätsmethoden ist es, die Gärleistung von Hefechargen vorhersagen zu können. Aus diesem Grund wurden bei vielen Untersuchungen zur Messung der Vitalität unterschiedliche Hefezustände realisiert, in dem Hefechargen bestimmten Stressarten ausgesetzt wurden. Beispielsweise wurden Hefen für bestimmte Zeiten unter ungünstigen Bedingungen gelagert. Die resultierenden Hefen wurden daraufhin mit den Vitalitätsmethoden untersucht. In einer Reihe von Untersuchungen bildete dieser Schritt schon den Endpunkt der Untersuchung, da es allgemein akzeptiert ist, dass Hefe unter Stressbedingungen an Gäraktivität verliert [119, 126, 128, 150, 250, 277]. In anderen Untersuchungen wurden mit den resultierenden Hefen Gärungen durchgeführt, um die tatsächlichen Auswirkungen auf die Gäraktivität zu ermitteln [11, 21, 42, 81, 93, 94, 106, 162, 174, 177, 233, 258, 300]. Im Bereich der Gärleistungen zeigt sich übereinstimmend, dass mit zunehmendem Hefestress (Nährstoffentzug, Temperatur, osmotischen Verhältnissen, oxidative Verhältnisse, Ethanol etc.) und der dadurch abnehmenden Hefevitalität die Gärleistung schwächer wurde. Hier muss eingeschränkt werden, dass durch moderaten Stress die Stressempfindlichkeit von Hefen deutlich verringert

werden kann, dieses aber keine Auswirkung auf die Gärleistung hat [179]. In vielen Fällen wurde, neben der Auswirkungen auf die Gärleistung, auch von einem Einfluss der Hefevitalität auf die Qualität der fertigen Biere gesprochen [11, 21, 93, 94, 106, 114, 128, 149, 174, 177, 233, 251, 278]. Einige Autoren stellten diesen Zusammenhang dar, belegten ihn aber weder durch Literaturstellen, noch durch Ergebnisse in eigenen Untersuchungen [94, 114, 128, 251, 278]. Andere Autoren belegten den Einfluss auf die Bierqualität durch Literaturstellen, wobei in den meisten Fällen [11, 149, 177, 233] eine Veröffentlichung von QUAIN [226] zitiert wird. Das Thema des Reviews von QUAIN war zwar die Hefephysiologie und deren Auswirkungen auf Gärleistung und Bierqualität, jedoch wird der Einfluss des physiologischen Zustandes der Hefe auf die Bierqualität (dargestellt durch Einfluss auf Bieraromastoffe) nur indirekt aufgezeigt. Dabei stellte QUAIN dar, dass die Vermehrung der Hefe unter anderem vom vorhandenen Glykogengehalt der Zellen abhängt. Dass diese Argumentation umstritten ist, stellt QUAIN selber in der Arbeit dar und ist in der vorliegenden Arbeit bereits im Abschnitt 2.1.1 diskutiert worden. Den Zusammenhang zur Bierqualität stellt QUAIN dadurch her, dass sowohl die Esterbildung als auch die Bildung höherer Alkohole stark mit der Vermehrung zusammenhängen. Es werden aber keine Untersuchungen dargestellt, bei denen Hefen eines schlechteren Zustandes ein anderes Aromaprofil erreichten. Damit sind direkte Auswirkungen der Hefevitalität auf die Qualität des fertigen Bieres nicht geklärt.

Eine dritte Gruppe von Veröffentlichungen zeigte Auswirkungen der Vitalität auf verschiedene Aspekte der Qualität fertiger Biere [21, 93, 106, 177]. In allen vier Arbeiten von BACK et al. [21], FUKUI et al. [93], MOCHABA et al. [177] und GUIDO et al. [106] wurde der Diacetylabbau als Qualitätskriterium betrachtet. Bei drei der Arbeiten ist eine Tendenz zu finden, dass der Diacetylabbau schneller und weitreichender bei zunehmender Hefevitalität erfolgt [21, 93, 177]. GUIDO et al. [106] stellten keine nennenswerten Unterschiede fest.

Die Untersuchung von GUIDO et al. [106] stellt mit der Arbeit von BACK et al. [21] die Untersuchungen dar, die am weitestgehenden die Auswirkungen der Hefevitalität auf die Bierqualität und speziell auf die Geschmacksstabilität untersucht hat und damit sind diese Untersuchungen von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit. Jedoch muss bei GUIDO et al. bezweifelt werden, dass die eingesetzten Hefechargen tatsächlich in den unterschiedlichen Zuständen waren, mit denen die Autoren

argumentieren und damit müssen die Schlussfolgerungen der Autoren in Zweifel gezogen werden. Dass die Hefezustände bei GUIDO et al. nicht korrekt waren, kann anhand einiger Ergebnisse belegt werden. So wiesen die Gärungen nahezu keine Unterschiede in den Gärzeiten auf, obwohl sich die Forscher, die sich mit Hefevitalität beschäftigten darin einig sind, dass die Hefevitalität deutliche Auswirkungen auf die Gäraktivität hat [11, 21, 42, 81, 93, 94, 162, 174, 176, 258, 300]. Ebenso wies die Hefecharge, die als schlechter eingestuft wurde, höhere Vermehrungsraten auf und bildete weniger SO<sub>2</sub>. Auch in diesen beiden Punkten zeigt die Literatur eindeutig, dass Hefen in schlechterem Zustand eine geringere Vermehrungsrate aufweisen [165, 166, 186, 226, 227, 228, 238, 254, 292] und mehr SO<sub>2</sub> bilden [19, 190, 276]. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse werden die aus dieser Veröffentlichung hervorgegangenen Daten nicht weiter diskutiert.

BACK et al., FUKUI et al. und MOCHABA et al. untersuchten im Weiteren die Aktivität der schaumnegativen proteolytischen Enzyme, die durch die Hefe in das fertige Bier gelangt sind. Übereinstimmend wurde festgestellt, dass mit der Verschlechterung des Hefezustandes die Proteaseaktivität zunimmt [21, 93, 177]. Jedoch handelte es sich dabei nicht bei allen Untersuchungen um einen signifikanten Zusammenhang, eine Tendenz war immer vorhanden. In den Arbeiten von BACK et al. [21] und FUKUI et al. [93] wurden die resultierenden Biere im frischen Zustand verkostet und bewertet, wobei es sich nicht um eine Unterschiedsprüfung handelte, sondern nur um eine Verkostung auf Fehlgerüchen [21, 93]. Hier fanden FUKUI et al., dass Biere die mit besserer Hefe hergestellt wurden, auch in der Verkostung tendenziell besser abschnitten [93]. BACK et al. fanden keinen Einfluss der Hefequalität auf die allgemeine Beurteilung der frischen Biere [21]. BACK et al. [21] hatten sich weitergehend mit den Auswirkungen von verschiedenen Hefevitalitäten auf die Bierqualität beschäftigt, und versuchten die Geschmacksstabilität der Biere zu erfassen. Dazu wurden analytische Indikatoren für den Alterungsgeruch in frischem und in gealtertem Bier untersucht und eine Alterungsverkostung durchgeführt. Analytisch waren keine nennenswerten Einflüsse auf die Alterung festzustellen. Sensorisch wurden Unterschiede festgestellt, die darauf hindeuteten, dass sich ein schlechterer Hefezustand auch negativ auf die Geschmacksstabilität auswirkte.

### 2.2 Stoffwechselprodukte bei der Hefegärung

Eine Vielzahl von Stoffen tragen zum Bieraroma bei. Viele dieser Stoffe gelangen schon durch die Rohstoffe in das Bier, jedoch wird das Bieraroma am signifikantesten durch die Entstehung von aromaaktiven Substanzen während der Gärung beeinflusst [39]. MEILGAARD [169] unterteilt Stoffe in Klassen nach ihrem Einfluss auf das Bieraroma. In der Gruppe mit dem größten Aromabeitrag sieht er Ethanol, Hopfenbitterstoffe und CO<sub>2</sub>. Aromastoffe der 2. Gruppe haben ebenfalls einen großen Einfluss auf das Aroma von Bier. Unterschiede zwischen einzelnen Bieren werden mit Änderungen der Konzentrationen von Stoffen dieser Gruppe begründet. Dabei werden die flüchtigen Aromastoffe dieser Gruppe ebenfalls nach ihrem Einfluss auf das Aroma geordnet:

- Bananenester (z. B. Isoamyl-Acetat)
- Apfelester (z. B. Ethyl-Hexanoat)
- Fuselalkohole (z. B. Isoamylalkohol)
- Organische Säuren (Aliphatische Säuren mit Kettenlängen C-6 bis C-10)
- Ethylacetat
- Buttersäure und Isovaleriansäure
- Phenyllessigsäure

Aufgrund ihrer Wichtigkeit für das Bieraroma werden die höheren Alkohole und Ester im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher betrachtet.

#### 2.2.1 Bildung höherer Alkohole

Im Bier wurden mehr als 40 höhere Alkohole identifiziert [39]. Bei den vier mengenmäßig bedeutsamsten Stoffen handelt es sich um [160, 231, 275, 315]:

- n-Propanol (alkoholisches Aroma)
- iso-Butanol = 2-Methyl-1-Propanol (alkoholisches Aroma)
- 2-Methylbutanol = D-Amylalkohol (süßliches Aroma)
- 3-Methylbutanol = Isoamylalkohol (malzartiges Aroma)

Davon liegen alle im Bier mit Ausnahme von n-Propanol im Bereich ihrer Geschmacksschwellen vor und sind daher von besonderer Bedeutung für das Aroma. Bei untergärigen Lagerbieren ist der mengenmäßig am stärksten vertretene höhere Alkohol in der Regel das 3-Methylbutanol mit durchschnittlich 36 mg/l (26-123 mg/l),



gefolgt von 2-Methylbutanol mit durchschnittlich 11 mg/l (7-34 mg/l). Die Alkohole n-Propanol und iso-Butanol sind sehr ähnlich in ihren Konzentrationen mit durchschnittlich 9 mg/l (4-17 mg/l) bzw. 8 mg/l (4-57 mg/l) [160, 231].

### **Bildungswege von höheren Alkoholen**

Die Bildung von höheren Alkoholen erfolgt über zwei Stoffwechselwege. Zum einen über eine *de novo* Synthese aus Kohlehydraten über Pyruvat. Diese anabole Route folgt zunächst dem Stoffwechselweg der Synthese von Aminosäuren. Dabei werden  $\alpha$ -Ketosäuren gebildet, die wiederum auch Vorläufersubstanzen für die Bildung höherer Alkohole sind. Die  $\alpha$ -Ketosäuren werden zu Aldehyden decarboxyliert, welche dann zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert werden [12, 39, 190, 195, 226, 231, 243, 275, 314].

Der zweite Weg ist der katabolische Stoffwechselweg oder auch Ehrlich-Mechanismus, bei dem Aminosäuren zu  $\alpha$ -Ketosäuren transaminiert werden. Der weitere Weg gleicht dem anabolen Stoffwechselweg [12, 39, 190, 195, 226, 231, 243, 275, 314].

Zum relativen Beitrag jedes dieser Stoffwechselwege zur gesamten Menge an höheren Alkoholen sind unterschiedliche Meinungen zu finden. CHEN [57] berichtete, dass mit zunehmender Kettenlänge der Alkohole verstärkt der katabolische Stoffwechselweg vorliegt, während VAN GEHLUWE et al. [275] argumentierten, dass im Allgemeinen der anabole Weg nur bei Mangel an Aminosäuren verwendet wird. ÄYRÄPÄÄ [12] sah ebenfalls eine Abhängigkeit beider Stoffwechselwege vom Stickstoffgehalt und dessen Zusammensetzung mit einem Überwiegen des anabolen Stoffwechsels bei niedrigen Gehalten und einem Überwiegen des Ehrlich-Mechanismus bei hohen Gehalten. SCHULDHESS und ETLINGER [243] stellten aus ihren Ergebnissen fest, dass beide Stoffwechselwege den gleichen Anteil an der Bildung von höheren Alkoholen haben und sich der Anteil der Stoffwechselwege im Verlauf der Gärung ändert, während NARZIß [190] den anabolen Weg als Hauptentstehungsweg ansah.

Die Bildung der höheren Alkohole wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, die im Folgenden dargestellt werden.

### **Hefestamm**

Dass unterschiedliche Hefestämme sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, höhere Alkohole zu bilden, ist allgemein nachgewiesen [14, 39, 68, 77, 80, 160, 190, 195, 256, 275, 314, 315]. Grundsätzlich wird angenommen, dass obergärige Hefen mehr höhere Alkohole bilden als untergärige Hefen [145, 190]. Dabei ist jedoch zu beachten, dass in der Regel untergärige und obergärige Biere bei sehr unterschiedlichen Gärtemperaturen hergestellt werden. ÄYRÄPÄÄ [14] fand eine erhöhte Bildung von höheren Alkoholen von obergärigen Hefen, in erster Linie jedoch bei niedrigen Stickstoffgehalten. Unterschiede bei hohen Stickstoffgehalten waren nicht feststellbar. Eine Untersuchung von SZLAVKO [256] bestätigte ebenfalls, dass Ale- und Lagerhefen unterschiedliche Mengen an höheren Alkoholen produzierten. In einer ähnlichen Untersuchung von YOUNIS und STEWART [314], bei der mehrere Ale- und Lagerstämme in künstlichen Medien mit variierenden Gehalten von Glucose, Fruktose und Maltose vergoren wurden, zeigten sich zum Teil größere Differenzen innerhalb der verschiedenen Lager- bzw. Alehefestämme als zwischen einzelnen Lager- und Alehefestämme. Dabei wird angenommen, dass Alehefestämme obergärig sind, wie es im Allgemeinen dargestellt wird [39]. Jedoch finden sich in der Literatur auch Hinweise auf untergärige Alehefestämme. Beispielsweise unterteilten VAN GHELUWE et al. [275] Alehefen in untergärige und obergärige Stämme. Hier wurde festgestellt, dass Lagerhefestämme in der Bildung von höheren Alkoholen stark variieren, während untergärige Alehefen ein deutlich geringeres Bildungsvermögen im Gegensatz zu obergärigen Alehefen aufwiesen.

### **Würzezusammensetzung**

Die Würzezusammensetzung spielt eine entscheidende Rolle für die Bildung von höheren Alkoholen. Hierbei kommt dem Gehalt an  $\alpha$ -Aminostickstoff bzw. genauer der Aminosäureausstattung eine zentrale Bedeutung zu [39, 145, 160, 190, 256, 275, 315]. Dieser Zusammenhang ist aufgrund der Bildungswege der höheren Alkohole klar. MÄNDL et al. [160] konnten über statistische Auswertungen von Versuchen zeigen, dass die aufgenommenen Aminosäuren in einen Zusammenhang mit der Bildung der höheren Alkohole stehen. Veränderungen in der Stickstoffzusammensetzung der Würze zeigten in den verschiedenen Untersuchungen sehr unterschiedliche Resultate.

Sehr umfassend hatte ÄYRÄPÄÄ [12, 13, 14, 15] das Thema behandelt und fand mit zunehmendem Stickstoffgehalt des Mediums zunächst einen starken Anstieg der höheren Alkohole mit einer anschließenden starken Abnahme. Bei weiterer Zunahme der Stickstoffgehalte wurde ein nahezu gleich bleibender Gehalt festgestellt. ENARI et al. [77] fanden nur einen geringen Anstieg der höheren Alkohole bei Vergärung einer Würze mit einem sehr hohen Gehalt an Aminosäuren gegenüber einer Würze mit geringem Aminosäurenanteil. Eine Zugabe von bestimmten Aminosäuren verursachte bei Untersuchungen von VAN GHELUWE et al. [275], wie aus dem Ehrlich Mechanismus zu erwarten war, eine Erhöhung der korrespondierenden höheren Alkohole. Dieses spricht damit für einen großen Anteil eines katabolischen Stoffwechselwegs. Bei einer Stickstofflimitierung fanden SZLAVKO [256] sowie DREWS und RIEMANN [68] eine Steigerung der Amylalkohole .

Bei High Gravity Würzen (20 °P) fanden YOUNIS und STEWART [315] durch die Verwendung von 30 % hochmaltosehaltigem Sirup eine geringere Bildung von höheren Alkoholen (inklusive der Amylalkohole) gegenüber einer Allmalzwürze. Hier ist zu beachten, dass nicht nur der Anteil an  $\alpha$ -Aminostickstoff gesenkt wurde, sondern auch das Zuckerspektrum verändert wurde.

YOUNIS und STEWART [314] hatten in einer vorangegangenen Arbeit bereits festgestellt, dass Maltose als Kohlenhydratquelle gegen über Glucose und Fruktose zu einer geringeren Bildung von höheren Alkoholen führte. SZLAVKO [256] fand bei einem Lagerhefestamm ebenfalls ein Ansteigen der Amylalkohole bei steigender Glucosezugabe, jedoch eine Verringerung der Amylalkohole bei einem Alehefestamm. Bei einem steigenden Saccharosegehalt fanden VAN GHELUWE et al. [275] eine Abnahme bei n-Propanol aber eine starke Zunahme von 3-Methylbutanol. Da es durch die Mischung von Würze und Saccharoselösung jedoch ebenfalls zu einer Veränderung bei den Stickstoffverhältnissen kam, muss dieses bei der Interpretation beachtet werden. Erklärungen, warum verschiedene Zuckerquellen sich auf die Bildung der höheren Alkohole auswirken wurden von den Autoren nicht gegeben.

Neben dem Zuckerspektrum ist die Stammwürze ein weiterer Einflussfaktor auf die Bildung höherer Alkohole. Übereinstimmend wurde von einem Anstieg der höheren Alkohole berichtet [62, 314, 315]. Mögliche Gründe dafür sind größere Mengen an

Substrat, welches für enzymatische Reaktionen zur Verfügung steht. Ebenfalls wird die Gärzeit deutlich verlängert und damit ist auch mehr Reaktionszeit für die Bildung von höheren Alkoholen gegeben.

Im Bereich der Würzezusammensetzung wurde noch über Einflüsse durch den pH-Wert und durch Metall-Ionen bzw. Spurenelementen auf die höheren Alkohole berichtet. Das Einstellen des Würze pH-Wertes mit Lauge bzw. verschiedenen Säuren wirkte sich in steigenden Gehalten von höheren Alkoholen (HA) aus. Das Minimum der Bildung von höheren Alkoholen lag etwa bei einem Start-pH-Wert von 4,0 [275]. Das Ansteigen der höheren Alkohole im saueren Bereich wurde dadurch erklärt, dass bei der Verwendung von organischen Säuren diese als Kohlenstoffquellen dienen und dann ebenfalls als  $\alpha$ -Ketosäuren für die Bildung von höheren Alkoholen zur Verfügung stehen.

Bei den Untersuchungen von MÄNDL et al. [160] zeigten Metall-Ionen wie Kalium, Natrium, Kupfer, Eisen, Magnesium und Mangan Zusammenhänge mit der Bildung der höheren Alkohole. Die Einflüsse werden durch die aktivierenden oder hemmenden Einflüsse der Metalle auf die Stoffwechselwege begründet.

### **Gärtemperatur**

Im Allgemeinen wurde davon berichtet, dass die Gehalte von höheren Alkoholen mit zunehmender Gärtemperatur steigen [145, 190]. Bei Betrachtung der einzelnen Veröffentlichungen zu diesem Thema muss jedoch festgestellt werden, dass die Ergebnisse sehr unterschiedlich sind und ebenfalls mit steigender Temperatur von fallenden Gehalten berichtet wurde. Zum einen sind die Gründe darin zu suchen, dass unterschiedliche höhere Alkohole betrachtet wurden und außerdem kamen unterschiedliche Hefestämme und Temperaturspannen bei den Untersuchungen zum Einsatz. ENARI et al. [77] berichteten von stark steigenden Gehalten der Summe höherer Alkohole bei einer Temperaturerhöhung von 10 auf 15 °C. MÄNDL et al. [160] fanden bei einem Anstieg von 7,5 auf 10 °C keinen Anstieg, jedoch bei einem weiteren Anstieg der Temperatur auf 12,5 ergab sich ein deutlicher Anstieg der höheren Alkohole. Ähnliche Ergebnisse fanden DREWS und RIEMANN [68], wobei in dieser Untersuchung eine weitere Erhöhung auf 20 °C kaum weitere Steigerungen erbrachte. Im Gegensatz dazu fanden MIEDANER et al. [172] kaum eine Erhöhung zwischen 12 und 16 °C aber eine starke Erhöhung bei 20 °C. ÄYRÄPÄÄ [15]

untersuchte den Bereich zwischen 10 und 30 °C und fand ein Maximum bei 20 °C. ENGAN et al. [80] fanden einen Anstieg bei einer Temperaturerhöhung von 8 °C auf 10 °C, jedoch die Tendenz zur Abnahme der Gehalte an höheren Alkoholen bei einem weiteren Anstieg der Temperatur auf 12 °C. Engan gibt im Weiteren einen Überblick über Untersuchungen verschiedenster Autoren und stellt fest, dass die meisten zwar von einem Anstieg mit der Temperatur berichten, dass jedoch einige Autoren gleich bleibende Werte oder schwankende Werte für einzelne Stoffe und Temperaturbereiche fanden. BOULTON und QUAIN [39] argumentierten, dass die Temperatur keinen steigernden Effekt auf die höheren Alkohole haben sollte, da zwar die Geschwindigkeit der Stoffumsätze beschleunigt wird, jedoch sollte die Gesamtausbeute nicht betroffen sein. Sie vermuteten, dass eventuell höhere Temperaturen auf die Durchlässigkeit der Zellmembranen wirken und damit zu einem verbesserten Ausschleusen der Alkohole führen.

### **Hefegabe**

Der Einfluss der Hefegabe wird als gering bewertet. Die meisten Autoren fanden keine merklichen Auswirkungen der Hefegabe auf die Bildung der höheren Alkohole [68, 160, 288] oder eine reduzierte Bildung mit zunehmender Hefegabe [14, 74, 163]. Andere Autoren fanden eine Erhöhung der gebildeten HA bei zunehmender Hefegabe, dabei führten in der Regel erst extreme Hefegaben (4 bis 5fache Menge) zu stark erhöhten Werten [26, 275]. Eine einfache Regel für die Bildung von höheren Alkoholen besagt, dass alles was die Hefevermehrung positiv beeinflusst, auch die Bildung der höheren Alkohole positiv beeinflusst [39]. Eine erhöhte Bildung von höheren Alkoholen durch hohe Hefegaben widerspricht dieser Regel jedoch, da erhöhte Hefegaben durch starke Nährstoff- und Sauerstoffkonkurrenz zu verringerten Hefevermehrungen führen, wobei die genannte Regel viele der auftretenden Effekte nicht erklären kann.

### **Belüftung**

Da die Belüftung einen entscheidenden Einfluss auf die Vermehrung hat, kann angenommen werden, dass stärkere Belüftungen zu einer verstärkten Bildung von höheren Alkoholen führen. Dieses wurde von vielen Autoren bestätigt, jedoch gilt dieses hauptsächlich bei Vergleichen zwischen unbelüfteter Würze bzw. nahezu

unbelüfteter Würze und hohen Belüftungsraten [68, 77, 160, 275]. Wurden nur moderate Belüftungsänderungen vorgenommen, zeigen die meisten Untersuchungen nur geringe Unterschiede in der Bildung von HA [26, 68, 160, 275]. MAULE [163] fand bei Untersuchungen von gerührten Gärungen deutlich weniger höhere Alkohole bei belüfteten Würzen als bei unbelüfteten Würzen. Aufgrund der Tatsache, dass in der Brauindustrie in der Regel immer Würzebelüftungen vorgenommen werden und diese sich nur die Intensität unterscheidet, kann von keinem großen Einfluss der Würzebelüftung gesprochen werden.

### **CO<sub>2</sub>-Druck**

Das Aufbringen von CO<sub>2</sub>-Druck auf das gärende Medium wird dazu genutzt, die Entstehung von Gärnebenprodukten zu bremsen [145, 190]. Die Auswirkungen auf die höheren Alkohole wurden übereinstimmend mit einem Rückgang bei steigendem Gegendruck beschrieben [68, 143, 144, 172, 231, 232]. Jedoch war dieser Effekt bei den meisten Autoren nur gering [144, 172, 231]. Zum Teil war durch die Aufbringung eines Gegendruckes nur bei sehr hohen Temperaturen eine nennenswerte Verringerung zu verzeichnen. Lediglich DREWS und RIEMANN [68] sowie KUMADA et al. [144] fanden eine deutliche Verringerung von höheren Alkoholen durch das Aufbringen von Druck bis zu 2 bar. Dass jedoch der CO<sub>2</sub>-Gehalt des gärenden Mediums eine große Rolle spielt, zeigten KRUGER et al. [143]. Bei Gärungen wurde durch Zugabe von "yeast food" auf Protein Basis der Gehalt an gelöstem CO<sub>2</sub> deutlich verringert und damit bei verschiedenen Hefestämmen die erreichten Konzentrationen an höheren Alkoholen deutlich reduziert. Jedoch muss beachtet werden, dass auch die zusätzlich eingebrachten Stickstoffsubstanzen einen Einfluss auf die Bildung von HA hatte.

### **Behältergeometrie und Konvektion**

Die Behältergeometrie und das Volumen der Gärgefäße haben einen großen Einfluss auf die Bildung von höheren Alkoholen [190, 275]. Unterschiedliche Verhältnisse von Behälterhöhe zu Behälterdurchmesser resultieren in unterschiedlicher Konvektion und CO<sub>2</sub>-Anreicherung im Gärmedium. Bei Untersuchungen von unterschiedlichen Behältern im Pilotmaßstab ergaben Gefäße mit hohem Würzestand eine geringere Bildung von höheren Alkoholen [275]. Bei einem Vergleich von Laborgärungen mit

Produktionsgärungen zeigten die Laborgärungen niedrigere Werte der höheren Alkohole [80]. Eine stärkere Konvektion kann auch durch aktives Rühren verursacht werden. Hier zeigten Untersuchungen, dass bei gerührten Gärungen mehr höhere Alkohole gebildet wurden [68, 163].

### **Hefeführungen**

Die Anzahl der Führungen, die mit einer Hefecharge durchgeführt wird, scheint die Bildung von höheren Alkoholen ebenfalls zu beeinflussen. BARKER et al. [26] berichteten bei 12 Führungen von einer Tendenz zu geringeren Gehalten mit zunehmender Führungsdauer. WACKERBAUER [288] fand bei Verwendung geringerer Hefegaben die gleiche Tendenz, für höhere Hefegaben jedoch sehr schwankende Werte. NARZIß et al. [195] berichteten von gleich bleibenden Werten und insbesondere gleich bleibenden Unterschieden beim Vergleich unterschiedlicher Hefestämme. ZUFALL et al. [316] bestätigten gleich bleibende Gehalte bei drucklosen Gärungen, fanden aber einen Rückgang der Werte über Führungen, die als Druckgärung durchgeführt wurden.

Die dargestellten Faktoren beeinflussen die Bildung der höheren Alkohole unterschiedlich stark. Den größten Einfluss haben dabei der Hefestamm, Stammwürze und die Würzezusammensetzung. Bei der Würzezusammensetzung ist der entscheidende Faktor die Stickstoffmenge und Zusammensetzung, aber das Zuckerspektrum zeigt ebenfalls einen deutlichen Einfluss.

Für die Gärtemperatur sind die Aussagen der Untersuchungen sehr gegensätzlich und in vielen Fällen sind es auch im untergärigen Bereich erst Temperaturen von 20 °C und mehr, die starke Veränderungen bei der Bildung der höheren Alkohole hervorrufen. Ebenso scheint auch erst eine stark erhöhte Hefegabe zu deutlichen erhöhten Werten der höheren Alkohole zu führen.

Die Ursachen für die zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse der vielen Veröffentlichungen sind unter anderem auf die Verwendung unterschiedlicher Hefestämme in Kombination mit unterschiedlichen Gärmedien (synthetisches Medium oder Würze) zu suchen. Diese Differenzen in den Voraussetzungen, kombiniert mit der Variation anderer Parameter, machen die Vergleichbarkeit von Ergebnissen sehr schwierig.

Des Weiteren ist auch anzunehmen, dass es zwischen den Einflussfaktoren auch Interaktionen gibt, die die Bildung der höheren Alkohole beeinflussen. Um diese erfassen zu können, müssen statistische Ansätze verwendet werden [160, 246].

### 2.2.2 Esterbildung

Da ihre Schwellenwerte sehr niedrig liegen, stellt die Gruppe der Ester die wahrscheinlich bedeutendste Stoffgruppe für das Bieraroma dar.

Im Bier wurden bislang über 90 verschiedene Ester identifiziert [253]. Die für das Bieraroma bedeutendsten Ester sind [284]:

- Ethylacetat (lösungsmittelartiges Aroma)
- Isoamylacetat (bananenartiges Aroma)
- Isobutylacetat (ananasartiges Aroma)
- Phenylethylacetat (rosenartiges Aroma)
- Ethylcaproat = Ethylhexanoat (apfelartiges Aroma)
- Ethylcaprylat = Ethyloctanoat (apfelartiges Aroma)

Phenylethylacetat kommt im Bier nur weit unterhalb seiner Geschmacksschwelle vor, während die anderen genannten Ester im Bereich ihrer Geschmacksschwelle vorkommen [78, 169, 284]. Es ist jedoch bekannt, dass verschiedene Ester synergistische Effekte aufweisen können und damit auch unterhalb ihrer Geschmacksschwelle aromarelevant sein können [168]. Der Gesamtestergehalt in untergärigen Vollbieren liegt im Bereich von 15-30 mg/l [97], mitunter bis 60 mg/l. Den größten Anteil daran hat Ethylacetat mit durchschnittlich 18,4 mg/l (8-32 mg/l) und Isoamylacetat mit durchschnittlich 1,72 mg/l (0,3-3,8 mg/l) [284]. Dieser Ester gilt als besonders wichtig, da er häufig oberhalb seines Schwellenwertes vorkommt. Alle anderen Ester kommen in Konzentrationen vor, die deutlich unter 1 mg/l liegen.

### Esterbildung

Die Esterbildung erfolgt zum größten Teil während der Hauptgärung, wobei die Bildungsrate zu nimmt, wenn die Hefevermehrung nachlässt [26, 78, 194, 226, 264].



Grundsätzlich werden zwei Wege der Bildung von Estern unterschieden. Ester können als chemische Kondensationsreaktion von organischen Säuren und Alkoholen entstehen. Jedoch ist diese Reaktion zu langsam, um die vorkommenden Mengen an Estern im Bier zu erklären [39, 78, 194, 213].

Der zweite Weg der Esterbildung wird über Enzymsysteme katalysiert. Dabei werden die Ester in der Hefezelle aus Alkohol und verschiedenen Formen des Acyl-Coenzym A (CoA) synthetisiert. Die am meisten vorkommende Form des Acyl-CoA ist das Acetyl-CoA. Dieses wird entweder über eine oxidative Decarboxylierung von Pyruvat oder durch direkte Aktivierung von Acetat mit ATP gebildet [161].

Ist Acetyl-CoA der Reaktionspartner der Esterbildung, so entsteht ein Acetatester. Andere Formen des Acyl-CoA werden meistens im Rahmen des Fettsäurestoffwechsels aus Acylresten von organischen Säuren und freiem Coenzym A (CoASH), unter Beteiligung der Acyl-CoA Synthetase, gebildet. Sind diese an der Esterbildung beteiligt, so entstehen Fettsäureester. Hauptsächlich werden in der Gärung dabei kurzkettige C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-Fettsäure-Ethylester gebildet [161]. Diese Bildungswege wurden zuerst von NORDSTRÖM beschrieben [201, 202].

Es sind verschiedene Enzyme an der Bildung von Estern beteiligt. Die meisten davon gehören zu der Alkohol-Acetyltransferase-Gruppe (AAT). Die Bildung von Estern ist energieabhängig und muss der Zelle damit einem bestimmten Zweck dienen. Es ist bis heute noch unklar, welche metabolische Aufgabe die Esterbildung hat [39, 161].

Neben der beschriebenen enzymatischen Esterbildung wird berichtet, dass Esterasen (esterabbauende Enzyme) Einfluss auf die absoluten Gehalt an Estern haben [92, 255]. Isolierte Esterasen sind nicht nur in der Lage Ester abzubauen, sondern können Ethylacetat aus Ethanol und Acetat bilden und könnten damit auch einen Beitrag zur Esterbildung leisten [39, 240].

Es gibt drei Hypothesen, mit denen die empirisch festgestellten Verläufe der Esterbildung erklärt werden. Wie bereits erläutert, werden Ester aus Acyl-CoA und einem Alkohol gebildet. Damit haben die Konzentrationen dieser beiden Substrate Auswirkungen auf die Bildung von Estern. Mit Acetyl-CoA als limitierender Faktor lassen sich viele der Zusammenhänge der Esterbildung erklären [39, 72, 190, 202, 226, 264, 284]. Vereinfacht wird argumentiert, dass eine Steigerung der Acetyl-CoA Konzentration eine Steigerung der Estergehalte bedingt. Für das Hefewachstum wird

jedoch ebenfalls Acetyl-CoA für die Fettsäuresynthese benötigt. Somit verursachen alle Faktoren, die das Hefewachstum fördern, eine Limitierung des Acetyl-CoA und damit auch der Esterbildung. Diese Hypothese kann einige Fälle nicht erklären, wie beispielsweise erhöhte Glucosegehalte, Zugabe von Stickstoffsubstanzen oder die Reduzierung des CO<sub>2</sub>-Drucks. Diese Faktoren erhöhen die Hefevermehrung, aber auch die Esterbildung. Abgesehen davon wurde festgestellt, dass sich das Gesamtniveau des Acetyl-CoA im Verlaufe einer Gärung kaum ändert [284].

Andere Arbeiten sehen in der Konzentration der für die Estersynthese zur Verfügung stehenden höheren Alkohole den limitierenden Faktor. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass erhöhte Gehalte von 3-Methylbutanol (direkt zugegeben oder durch Zugabe der korrespondierenden Aminosäuren entstanden) in Würzen verschiedener Stammwürze erhöhte Werte des korrespondierenden Esters „Isoamylacetat“ verursachen [52, 313]. Dieses wird unterstützt durch Untersuchungen mit Hefenmutanten, die bestimmte höhere Alkohole in höheren Konzentrationen bildeten. Bei Gärungen mit diesen Hefestämmen konnten ebenfalls erhöhte Werte der korrespondierenden Ester festgestellt werden [148, 312]. Jedoch kann auch diese Hypothese nicht alle Zusammenhänge bei der Esterbildung erklären. Beispielsweise führen höhere Belüftungsraten tendenziell zu erhöhten Gehalten an höheren Alkoholen, jedoch zu niedrigeren Gehalten an Estern [284].

Eine dritte Hypothese geht davon aus, dass den Enzymen der Alkohol-Acetyltransferase-Gruppe (AAT) die zentrale Rolle bei der Bildung von Estern zukommt. Diese Hypothese wurde von MALCORPS et al. [159] konkretisiert. Durch dieses Modell lässt sich die Esterbildung weitgehend erklären [89, 90, 156, 159, 161, 283, 284, 286, 287]. Beispielsweise wurde festgestellt, dass die Transkription der Gene, die für die AATs codieren (ATF1+ATF2) durch Sauerstoff und ungesättigte Fettsäuren gehemmt wurden [89, 91, 284]. Außerdem wurde bei Gärungen mit Hefen, bei denen die ATF-Gene überexprimiert werden, ein entsprechend höherer Gehalt an Estern festgestellt [284, 286]. Dass jedoch im Brauereikontext neben der Regulierung der AAT-Enzyme auch Substratlimitierungen Einfluss auf die Esterbildung haben können, wird nicht bezweifelt [284, 286].

### **Hefestamm**

Wie schon bei den höheren Alkoholen zeigten viele Untersuchungen, dass Hefestämme unter gleichen Bedingungen deutlich unterschiedliche Konzentrationen an Estern bilden können [68, 78, 80, 96, 143, 159, 194, 209, 213, 221, 230, 240, 289, 314, 315]. Hauptsächlich wurden in den Untersuchungen die beiden mengenmäßig am bedeutsamsten Ester „Ethylacetat“ und „Isoamylacetat“ untersucht [68, 78, 80, 96, 143, 159, 194, 209, 213, 221, 230, 240, 289, 314, 315]. Das Verhalten der Ethylester wurde dagegen kaum untersucht. NARZIß et al. [194] fanden für die Ethylester geringere Unterschiede als bei den Acetatestern.

Dass sich obergärige und untergärige Biere in ihren Konzentrationen von Estern unterscheiden, erklärt NARZIß [190] sowohl mit einem unterschiedlichen Bildungsvermögen der Hefestämme als auch durch die Anwendung höherer Gärtemperaturen und den daraus resultierenden stärkeren Stoffwechsel der Hefe. Untersuchungen von NYKÄNEN und NYKÄNEN [205] bestätigten dieses.

RAMOS-JEUNEHOMME [230] konnte nachweisen, dass sich das Bildungsvermögen von Hefestämmen deutlich unterschied und mit der Aktivität der AAT-Enzyme während der Hauptgärung korrelierte.

### **Würzezusammensetzung**

Der Stickstoffgehalt der Würze beeinflusst die Esterbildung. Dieser Einfluss besteht über die Bildung von höheren Alkoholen, die als Substrat für die Esterbildung notwendig sind [52, 148, 313]. Der Stickstoff in der Würze beeinflusst jedoch auch über die genetische Ebene die Esterbildung. Die AAT-Enzymsysteme werden durch die Gene ATF1+ATF2 codiert. Die Transkription der Gene wird durch verschiedene Mechanismen der Zelle reguliert. Vereinfacht dargestellt, werden diese beiden Gene bzw. deren Exprimierung unter anderem durch eine Protein-Kinase (Sch9p) reguliert. Diese Kinase reagiert auf Veränderung von Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquellen [91, 284, 286].

Über die genetische Regulation ist ebenfalls zu erklären, warum hohe Glucose- und Saccharose-Anteile in der Würze zu hohen Esterbildungen führen und zunehmende Gehalte von Maltose eine Verringerung der Esterbildung erbringen [283, 285, 286, 313, 314, 315]. Zum einen wird die oben genannte Kinase von Änderungen im Kohlenstoffangebot (insbesondere durch Glucose) beeinflusst und kann damit die

Esterbildung beeinflussen. Ein anderer Regulationsmechanismus der ATF-Gene ist eine Signalkaskade bei Anwesenheit von Kohlenstoff, der sogenannte Ras/cAMP/PKA Pathway [283, 285, 286]. Diese Signalkaskade reagiert auf die Anwesenheit von Glucose und reguliert eine große Anzahl von Genen, die in den allgemeinen Stoffwechsel, die Vermehrung und die Stressresistenz involviert sind [234]. Es wurde deutlich gezeigt, dass die ATF Gene nur vollständig exprimiert wurden, wenn Glucose anwesend war [283, 285, 286].

Bei einer Erhöhung der Stammwürze wurde übereinstimmend berichtet, dass es zu steigenden Estergehalten kommt [39, 72, 78, 145, 190, 209, 213, 221, 253, 289, 315]. In der Regel wurde von überproportionalen Steigerungen der Estergehalte berichtet.

HERRMANN [116] gibt für die gesteigerten Estergehalte bei höheren Stammwürzen folgende Gründe an:

- es stehen bei hohen Würzekonzentrationen wesentlich mehr Substrate für die enzymatischen Reaktionen zur Verfügung,
- mit zunehmendem Stammwürzegehalt verlängert sich bei ansonsten gleichen Bedingungen die Gärdauer,
- durch hohe Zuckerkonzentrationen wird die Hefevermehrung und damit der Baustoffwechsel der Hefe gebremst, es steht mehr Acetyl-CoA für die Estersynthese zur Verfügung.

Fettsäuren als Würzebestandteile haben ebenfalls Einfluss auf die Esterbildung. Übereinstimmend wurde berichtet, dass mit steigenden Konzentrationen von ungesättigte Fettsäuren in der Würze die Estergehalte sinken [7, 72, 78, 181, 182, 183, 190, 209, 265, 284]. Gesättigte Fettsäuren und Sterole wurden in der Regel hingegen mit einer Erhöhung der Esterbildung in Verbindung gebracht [16, 72]. ANDERSON [7] stellte hingegen bei Zugabe von Ergosterol, dem mengenmäßig bedeutsamsten Sterol, eine deutliche Abnahme der Esterbildung fest.

Es wurden verschiedene Gründe für die unterdrückende Wirkung von ungesättigten Fettsäuren auf die Esterbildung genannt. Zum einen wurde argumentiert, dass ungesättigte Fettsäuren die Bildung von Triacylglyceriden und Phospholipiden anregt. Dafür wird Acetyl-CoA benötigt, welches nicht für die Estersynthese zur Verfügung

steht [7, 264]. Als weitere Erklärung wurde eine Inhibierung der Exprimierung der AAT-Gene durch die ungesättigten Fettsäuren genannt [72, 89, 161, 284].

### **Gärtemperatur**

Übereinstimmend berichteten Autoren von einem Anstieg der Estergehalte mit zunehmender Gärtemperatur [26, 39, 52, 68, 72, 78, 80, 96, 144, 172, 187, 203, 213, 221, 226, 246, 284, 289]. Dabei wurden für die einzelnen Ester sehr unterschiedliche Verläufe über die Temperaturbereiche angegeben. So fanden ENGAN und AUBERT [80] für Ethylacetat und Isoamylacetat einen Anstieg bei einer Temperaturerhöhung von 8 °C über 10 °C auf 12 °C, wobei die Temperaturänderung von 10 °C auf 12 °C einen deutlicheren Anstieg brachte. MIEDANER et al. [172] fanden für Ethylacetat über einen Bereich von 8,5 °C bis 16 °C kaum eine Erhöhung, bei einem weiteren Anstieg der Temperatur auf 20 °C jedoch einen erhöhten Gehalt an Ethylacetat. Bestätigt wurde diese nur geringfügige Veränderung des Ethylacetats über einen Bereich von 9 bis 18 °C von KUMADA et al. [144]. NORSTEDT et al. [203] hingegen fanden für Ethylacetat einen deutlichen Anstieg zwischen 10 und 20 °C, wobei der stärkste Anstieg zwischen 10 und 15 °C lag.

Ähnlich unterschiedliche Resultate wurden auch für Isoamylacetat ermittelt. Einige Autoren fanden ein Maximum der Konzentration bei ca. 14 °C [68, 203], während MIEDANER et al. [172] einen Anstieg von 8,5 bis 12 °C, ein Plateau zwischen 12 und 16 °C und einen deutlichen Anstieg bei einer Temperatur von 20 °C fanden. Für die Ethylester wurde von einem geringen Einfluss der Temperatur berichtet [80, 203].

Es wurden unterschiedliche Gründe für den Einfluss der Gärtemperatur auf die Esterbildung genannt. Beispielsweise wurde argumentiert, dass bei höheren Temperaturen vermehrt höhere Alkohole gebildet werden und damit mehr Substrat für die Esterbildung vorliegt [72, 284]. Im Weiteren wurde argumentiert, dass die Enzymaktivität der AATs durch die Temperatur beeinflusst wird [72, 213, 284] bzw. die Durchlässigkeit der Membran durch die steigende Temperatur erhöht wird und damit mehr Ester an das Medium abgegeben werden können [39, 213].

### **Hefegabe**

Ein gängiges Erklärungsmodell für die Esterbildung stellt die Hefevermehrung in den Vordergrund. Alles, was die Vermehrung steigert, verringert die Esterbildung [39,

190]. Damit ist mit zunehmender Hefegabe zu erwarten, dass die Estergehalte zunehmen, da aufgrund der Konkurrenz um Nährstoffe und Sauerstoff die Vermehrung verringert wird. Bei Untersuchungen wurde dieses für Ethylacetat bzw. die Summe der Ester (die durch Ethylacetat dominiert sind) von einer Reihe von Autoren bestätigt [26, 97, 203, 221]. Andere Autoren berichteten jedoch von gleich bleibenden oder sogar fallenden Werten für Ethylacetat [163, 289]. Für Isoamylacetat wurden überwiegend fallende Gehalte mit zunehmender Hefegabe gefunden [74, 163, 203, 289]. Bei den Ethylestern fanden WACKERBAUER et al. [289] erhöhte Werte bei geringerer Hefegabe während NORSTEDT et al. [203] lediglich tendenziell steigende Werten mit zunehmender Hefegabe feststellten.

BOULTON und QUAIN [39] erklärten eine Abnahme von Estern bei höheren Hefegaben durch eine Erschöpfung des Acetyl-CoA-Pools durch das schnelle Aufbrauchen von Stickstoffkomponenten und Sauerstoff am Anfang der Gärung.

### **Belüftung**

Die Belüftung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Vermehrung der Hefe und damit auch auf die Esterbildung.

Die meisten Autoren berichteten von sinkenden Estergehalten mit steigender Belüftung [7, 78, 97, 145, 163, 181, 190, 203, 209, 213, 221, 284]. Extreme Unterschiede wurden jedoch nur erreicht, wenn komplett unbelüftete Würzen mit belüfteten Würzen verglichen wurden [163, 181, 203] oder wenn Sauerstoff während der gesamten Gärung in das gärende Medium gelangen konnte [209]. NORSTEDT et al. [203] fanden bei Variationen des gelösten Sauerstoffes von 5 bis 30 mg/l lediglich einen sehr geringen Einfluss auf die Esterbildung, wobei tendenziell bei höheren Sauerstoffgehalten niedrigere Estergehalte gemessen wurden. BARKER et al. [26] fanden im Bereich von 7,6 bis 20 mg/l steigende Werte von Isoamylacetat mit steigenden Sauerstoffgehalten und gleich bleibende Werte an Ethylacetat. CALDERBANK [52] berichtete von ein Maximum des Isoamylacetates bei 5,4 mg/l O<sub>2</sub> bei Variationen zwischen 0,75 und 18 mg/l und zeigte, dass bei diesem Wert auch die höchste Aktivität der AAT-Enzyme vorhanden war. Dass es ein Belüftungsoptimum für die Bildung von Isoamylacetat gibt, bestätigen DREWS und RIEMANN [68], die bei einer Sauerstoffsättigung von 60 % die höchsten Werte fanden.

PIENDL et al. [221] und GEIGER [97] fanden bei einem Staubhefestamm den geringsten Wert für die Summe der Ester bei 9,1 mg/l O<sub>2</sub>, während eine intensivere bzw. weniger intensive Belüftung zu höheren Estergehalten führte.

Dass Sauerstoff die genetische Expression der AAT Enzyme unterdrücken kann, wurde von mehreren Autoren berichtet [72, 89, 284, 286]. Im Rahmen einer in der Brauerei üblichen Batch-Gärung hängt daher das Ausmaß der Beeinflussung vom Zeitpunkt und der Länge der Würzebelüftung ab [72].

Versuche anhand der Draufflasstechnik demonstrierten die wichtige Rolle des Zeitpunktes der Würzebelüftung. WACKERBAUER et al. [289] sowie DREWS und RIEMANN [68] fanden erhöhte Werte an Isoamylacetat mit verschiedenen Drauflassvarianten mit belüfteter Würze. MALCORPS et al. [159] konnten darstellen, dass die Aktivitätsphase der AAT-Enzyme durch Drauflassen mit unbelüfteter Würze verlängert wird. SCHÖNDORFER et al. [242] fanden jedoch mit sehr unterschiedlichen Drauflassschemata zum Teil eine Erhöhung der Acetatester, zum Teil allerdings auch geringere Werte.

### **CO<sub>2</sub>-Druck**

Es ist bekannt, dass durch das Aufbringen eines Überdruckes im Verlaufe einer Gärung die Bildung von Gärungsnebenprodukten reduziert werden kann [68, 72, 143, 144, 172, 190, 203, 231, 232, 264, 284, 289, 316]. Aus diesem Grund wird es bei Warmgärverfahren und beim High-Gravity-Brauen eingesetzt, um eine übermäßige Bildung von Gärungsnebenprodukten zu unterbinden.

Dass insbesondere die Acetatester reduziert werden, zeigten übereinstimmend viele Untersuchungen [68, 72, 143, 144, 172, 190, 203, 231, 232, 264, 284, 289, 316]. NORSTEDT et al. [203] fanden für Ethylester jedoch zum Teil erhöhte Werte.

Neben der Reduzierung der Bildung von Gärungsnebenprodukten wird durch den Druck auch die Vermehrung deutlich eingeschränkt. Begründet wurden diese Phänomene zum einen mit einer eingeschränkten Membranpermeabilität durch die erhöhten Anteile an gelöstem Kohlendioxid und einer damit einhergehenden reduzierten Stoffwechselaktivität [316]. Eine andere Erklärung war, dass es durch den erhöhten CO<sub>2</sub>-Gehalt im Medium zu einer Feedbackinhibierung der enzymatischen Decarboxylierung von Pyruvat (Acetyl-CoA Precursor) kommt [72].

Da ein erhöhter Gegendruck direkt die Hefevermehrung verringert und damit auch den Gärverlauf negativ beeinflusst, wird der Druck in der Regel erst nach einiger Zeit (z. B. 24 h [316] oder bei Vergärungsgrad von 60 % [172]) aufgebaut. Da sich die Esterbildung erst gegen Ende der Vermehrungsphase verstärkt, kann durch die genannten Verfahrensweisen die Esterbildung reduziert werden ohne den Gärverlauf negativ zu beeinflussen [68, 172, 289, 316].

### **Behältergeometrie und Konvektion**

Durch die Form und die Größe von Gärbehältern wird die Konvektion während der Gärung maßgeblich beeinflusst. Damit geht auch eine Beeinflussung der Vermehrung und eine Änderung der Esterbildung einher. Für eine Konvektion mittels Rühren wurde von unterschiedlichen Auswirkungen auf die Esterbildung berichtet. ANDERSON und KIRSOP [7] fanden beispielsweise bei einem Vergleich von Gärröhren und gerührten Gärungen für verschiedene Hefestämme bei normalen Stammwürzen eine Senkung der Estergehalte bei den gerührten Gärungen, bei High-Gravity-Würzen kam es jedoch zu einem Anstieg der Ester durch Rühren. Einige Autoren fanden ebenfalls reduzierte Gehalte an Estern [163, 209]. DUFOUR et al. [72] wiesen darauf hin, dass diese Untersuchungen im Labormaßstab durchgeführt wurden, wodurch die verringerten Gehalte durch Sauerstoff im Kopfraum verursacht worden sein könnten, der durch das Rühren in das Medium gelangte. Diesen Effekt zeigte PALMER [209] deutlich anhand von Rührgärungen, wobei der Kopfraum mit Luft bzw. mit Stickstoff überschichtet wurde. Er stellte fest, dass die Gärungen mit Stickstoff im Kopfraum deutlich höhere Esterwerte aufwiesen, als die mit Luft.

Hohe zylindrokonische Tanks verursachen durch den erhöhten statischen Druck eine Anreicherung von CO<sub>2</sub> im gärenden Medium und damit eine Reduzierung der Esterbildung [72, 284].

### **Hefeführungen**

Die Anzahl der Führungen beeinflusst ebenfalls die Bildung von Estern. BARKER et al. [26] berichteten bei 12 Führungen zunächst von einem deutlichen Abfall nach 2 Führungen mit einer anschließenden Tendenz zu geringeren Gehalten mit zunehmender Führungsdauer. NARZIß et al. [194] fanden keine einheitliche Tendenz. ZUFALL et al. [316] berichteten dagegen auch von abfallenden Gehalten bei druckloser



Gärung, fanden aber kaum einen Rückgang der Werte über Führungen, die als Druckgärung ausgeführt wurden.

Die dargestellten Faktoren beeinflussen die Bildung der Ester unterschiedlich stark. Den größten Einfluss haben dabei der Hefestamm, Stammwürze und die Gärtemperatur.

Wie bereits bei den höheren Alkoholen beschrieben gibt es auch bei den Estern zum Teil widersprüchliche Aussagen zu den Auswirkungen der einzelnen Parameter. Die Ursachen dafür sind vergleichbar mit denen bei höheren Alkoholen (Abschnitt 2.2.1).

### 2.2.3 Bildung von Schwefeldioxid

Schwefeldioxid (Sulfit) als Stoffwechselprodukt der Hefe kann durch seine reduzierenden Eigenschaften und seine Fähigkeit, mit Carbonylen Komplexe zu bilden, Einfluss auf die Geschmacksstabilität des Bieres haben [153, 200]. Die Beteiligung des Schwefeldioxids an der Geschmacksstabilität wird zu einem späteren Zeitpunkt genauer erläutert. In diesem Abschnitt werden die Bildung und die technologische Beeinflussbarkeit erläutert.

Die Schwefeldioxidbildung durch die Brauereihefe findet vornehmlich während der Hauptgärung statt [123, 197, 198, 200]. Während der Nachgärung und Lagerung dagegen ist die Konzentration an  $\text{SO}_2$  eher rückläufig [200].

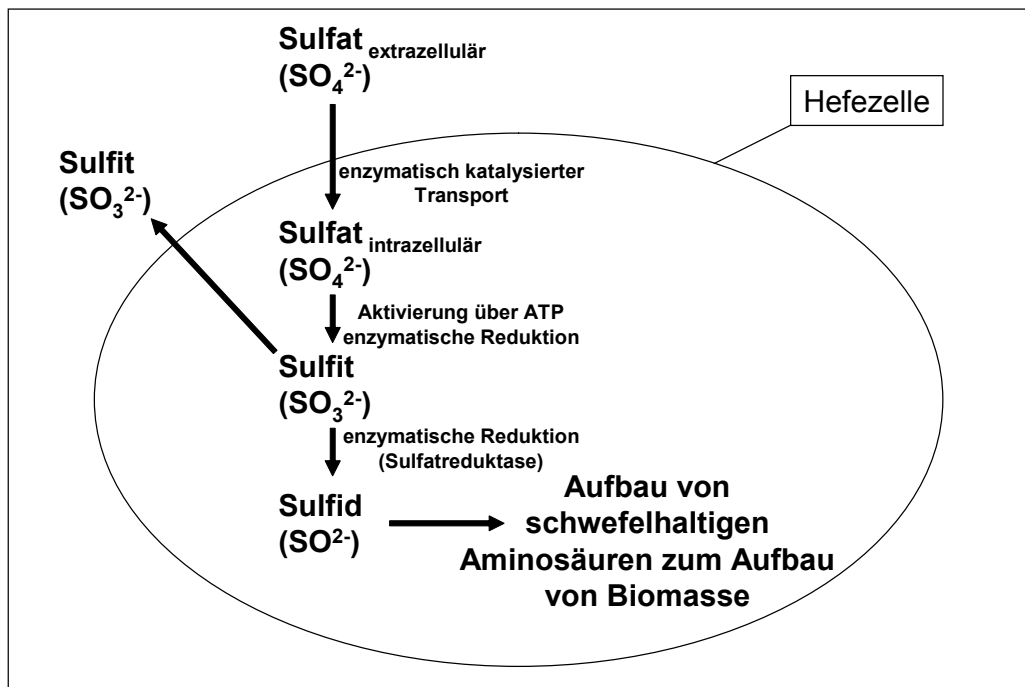


Abb. 2.2:  $\text{SO}_2$ -Bildung während der Gärung [153]

Schwefeldioxid wird als Zwischenprodukt der Synthese schwefelhaltiger Aminosäuren gebildet. Sind für den Stoffwechsel nicht ausreichend organische Schwefelquellen in der Würze vorhanden bzw. die eigenen Vorräte der Zelle zu einem gewissen Maße verbraucht, so wird anorganisches Sulfat von der Würze aufgenommen, intrazellulär aktiviert und zu Sulfit reduziert [122, 153, 261]. Während der exponentiellen Phase und dem damit verbundenen hohen Zellwachstum kommt es zur sofortigen Weiterverwertung des gebildeten Sulfits, während im Verlauf der stationären Phase der Bedarf an Aminosäuren zurückgeht. Da aufgrund von ausreichend zur Verfügung stehender Energie weiterhin Sulfat assimiliert wird, kommt es zur Anhäufung von intrazellulärem Sulfit. Die Sulfatassimilation wird im Folgenden entweder durch den entstehenden Sulfitüberschuss gehemmt oder kommt gegen Ende der Gärung durch Mangel an Energiezufuhr zum Erliegen [70].

Sulfit stellt allerdings ein Zellgift dar, weshalb dieses, vermutlich über aktive Transportsysteme, durch die Zellwand befördert und an das Jungbier abgegeben wird [211]. Des Weiteren kann es an Acetaldehyd gebunden werden, wodurch die Wirkung als Zellgift verloren geht. Diese Komplexe werden ins extrazelluläre Milieu transportiert [107, 261].

Die Umwandlung von Sulfat zu Sulfit wird in der Literatur als einziger Weg zur SO<sub>2</sub>-Bildung beschrieben [8, 122].

Die Beeinflussung der Bildung von Schwefeldioxid kann technologisch hauptsächlich über Einflussfaktoren auf die Hefephysiologie erfolgen [70]. Der Sulfatgehalt der Würze hat keine weitere Bedeutung für die Bildung, genau wie ein eventuell vorhandener SO<sub>2</sub>-Gehalt in der Würze, da dieser beim Würzekochen vollständig ausgetrieben wird [197, 198].

### **Hefestamm**

Den wohl größten Einfluss auf die SO<sub>2</sub>-Bildung wird dem Hefestamm zugesprochen [18, 153, 190]. Er ist durch die genetisch festgelegten unterschiedlichen Enzymsysteme und -aktivitäten sowie Regelmechanismen zur Sulfatassimilation und Aminosäuresynthese bedingt [8, 46, 153].

### **Würzezusammensetzung**

Der Einfluss der SO<sub>2</sub>-Bildung bezüglich der Zusammensetzung der Anstellwürze wird maßgeblich durch folgende Aspekte beeinflusst:

- Lipidgehalt
- Aminosäurezusammensetzung
- pH-Wert
- Stammwürze

Wird die Hefe nur mangelhaft durch Lipide der Würze versorgt und wird der Hefe bei Mangel an Sauerstoff nicht die Fähigkeit gegeben, die fehlenden Mengen an Fettsäuren und Sterolen zu bilden, so wird das Hefewachstum eingeschränkt und somit die SO<sub>2</sub>-Abgabe gefördert [70].

Da Sulfit ein Zwischenprodukt der Synthese schwefelhaltiger Aminosäuren ist, kann durch einen hohen Methionin-Gehalt der Würze die Sulfatassimilation herausgezögert bzw. abgeschwächt werden. Die SO<sub>2</sub>-Bildung wird dementsprechend vermindert. Die Aminosäuren Threonin, Serin und teilweise auch Isoleucin fördern dagegen die SO<sub>2</sub>-Bildung, da diese Aminosäuren aus demselben Kohlenstoffgrundgerüst aufgebaut sind wie Methionin. Daher kommt es durch ihre Anwesenheit zu einer Endprodukthemmung. Ist die Sulfatassimilation bereits für die Synthese von Methionin aktiviert, führt dieses zur Anhäufung von Sulfit [107].

Ein geringer pH-Wert der Würze hat einen negativen Einfluss auf die SO<sub>2</sub>-Bildung. Ausschlaggebend sind in diesem Zusammenhang der pH-Wert der Anstellwürze sowie der pH-Abfall im Verlauf der Gärung [46, 200].

Es ist bekannt, dass mit steigender Stammwürze auch mehr Sulfit im Bier zu finden ist [197, 198, 200]. Ein Erklärungsansatz besteht darin, dass durch den hohen Zuckergehalt der Würze und den damit verbundenen osmotischen Verhältnisse die Alkohol-Dehydrogenase gehemmt wird. Es kommt zum Anstieg der Acetaldehydkonzentration innerhalb der Zelle und einem daraus resultierenden gesteigerten Transport der Sulfit-Acetaldehyd-Komplexe durch die Zellwand in das extrazelluläre Milieu [107].

### **Hefegabe**

Der Einfluss der Anstellmenge auf den SO<sub>2</sub>-Gehalt wurde in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Es wurde von steigenden SO<sub>2</sub>-Werten bei steigenden Hefegaben [197, 198], sowie von sinkenden SO<sub>2</sub>-Werten bei steigenden Hefegabe [200] berichtet. Ebenfalls wurde davon berichtet, dass die SO<sub>2</sub>-Bildung unabhängig von der Hefegabe ist [46]. Neuere Veröffentlichungen zeigten jedoch, dass sinkende Hefegaben zu steigenden SO<sub>2</sub>-Werten führen [18, 308].

### **Würzebelüftung**

Übereinstimmend wurde dagegen der Einfluss der Würzebelüftung beschrieben. Der Sauerstoff ist absolut notwendig für die Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Sterolen, die wiederum Voraussetzung für die Hefevermehrung sind. Dementsprechend kommt der Würzebelüftung auch eine bedeutende Rolle bei der Beeinflussung der SO<sub>2</sub>-Konzentration zu. Mit steigender Würzebelüftung nimmt die SO<sub>2</sub>-Bildung ab [18, 46, 87, 190, 197, 198, 200, 308].

### **Gärtemperatur**

Auch von einer Temperaturabhängigkeit der SO<sub>2</sub>-Bildung wurde berichtet. Untersuchungen zeigten bei untergärigen Hefen ein Optimum bei ca. 16 °C und eine verminderte SO<sub>2</sub>-Konzentration bei Temperaturen über 20 °C. Dieses könnte auf eine sinkende Stabilität des Sulfit-Acetaldehyd-Komplexes zurückzuführen sein [46, 200].

### **Draufflasstechnik**

Bezüglich der Draufflasstechnologie ist zwischen belüfteten und unbelüfteten Suden zu unterscheiden. Wird ein zweiter belüfteter Sud auf einen bereits angestellten Sud draufgelassen, so kann dies mit einer Zweitbelüftung verglichen werden. Die SO<sub>2</sub>-Bildung wird vermindert. Allerdings ist dieser Effekt sehr stark vom Zeitpunkt des Drauflassens abhängig. So sank die Menge an gebildeten SO<sub>2</sub> in Abhängigkeit des Drauflasszeitpunktes bis zu einem Minimum nach 4 bis 6 h ab und stieg im Folgenden wieder an [18, 87, 271]. War der draufgelassene Sud allerdings nicht belüftet, so wurde die SO<sub>2</sub>-Bildung nicht beeinflusst [82].

### **Hefevitalität**

Ein besseres Wachstum der Hefe und eine damit verbundene verminderte Produktion an SO<sub>2</sub> steht in engem Zusammenhang mit der Vitalität der Hefe [190, 276]. Aufgrund

der problematischen Bestimmung der Hefevitalität gab es kaum direkten Untersuchungen zum Zusammenhang Hefezustand und SO<sub>2</sub>-Bildung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Hefen die ungünstig gelagert wurden, zu höheren SO<sub>2</sub>-Konzentrationen führten [220].

Reinzuchthefen, die durch ihre aerobe Herführung insbesondere mit ungesättigten Fettsäuren und Sterolen optimal ausgestattet sind, bildeten in der Regel nur geringe Mengen an SO<sub>2</sub> [19].

### **Druckgärung**

Eine Verwendung von Druck scheint keinen Einfluss auf die SO<sub>2</sub>-Bildung zu haben [220].

## **2.3 Einflussfaktoren auf die Geschmacksstabilität von Bier**

Der Geschmack und das Aroma eines Bieres entwickeln sich im Verlaufe der Bierbereitung und werden dabei maßgeblich von den Rohstoffen, der Würzebereitung und insbesondere der Gärung beeinflusst. Der erreichte Aromaeindruck des fertigen Bieres ist jedoch auch im abgefüllten Zustand ständigen Veränderungen unterlegen, und diese Veränderungen werden im allgemeinen als negativ beurteilt [18, 64, 105, 136, 153, 190, 239, 280, 281, 293]. Bei den Veränderungen, die im fertigen Bier stattfinden, handelt es sich sowohl um Neubildung, als auch um Abbaureaktionen von aromaaktiven Stoffen. Folgende Veränderungen prägen den Verlauf der Bialterung [18, 171, 190]:

- Verlust an Vollmundigkeit
- Zunahme einer nachhängenden und adstringierenden Bittere
- Veränderung des Aromaprofils
  - Verlust des Hopfencharakters (z. B. Hopfenblume bei Pilsbieren)
  - Verminderung des Esteraromas
  - Verminderung der phenolischen Note bei Weizenbieren
  - Verlust des Malzaromas bei dunklen Bieren
  - Ausbildung eines Alterungsgeschmackes

Wie aus dieser Aufstellung zu entnehmen ist, kommt es im Verlaufe der Lagerung von Bier zu einer Bildung von alterungsrelevanten Aromakomponenten, deren Entstehung vor allem durch Oxidationsreaktionen verursacht wird. Daher sind

Bierinhaltsstoffe, die Oxidationen verzögern oder verhindern können, im Rahmen der Geschmacksstabilität von großer Bedeutung. Die ebenfalls in der Aufstellung aufgeführten Verluste an Estern, phenolischen Aromakomponenten und des Hopfencharakters sind zum einen am Verlust der Vollmundigkeit beteiligt. Dieser Verlust an aromapositiven Substanzen führt zum anderen auch dazu, dass die negativen alterungsrelevanten Aromakomponenten schneller und deutlicher wahrnehmbar sind (Verlust des maskierenden Effektes). Diese drei Faktoren, Bildung alterungsrelevanter Aromakomponenten, antioxidative Wirkung von Bierinhaltsstoffen und maskierende Effekte von Bierinhaltsstoffen werden im Folgenden im Rahmen eines Überblicks näher erläutert.

### **2.3.1 Entstehung alterungsrelevanter Aromakomponenten**

Für die Entstehung der alterungsrelevanten Aromakomponenten werden verschiedene Reaktionsmechanismen verantwortlich gemacht [153]:

- Caramelisierung, Maillardreaktion und Streckerabbau
- Oxidation höherer Alkohole
- Oxidation von Isohumulonen
- Lipidabbau
- Reaktionen von Aldehyden
- Sonstige Reaktionsmechanismen zur Bildung von Alterungskomponenten

Aus diesen Reaktionen entstehen Produkte verschiedenster Substanzklassen. Eine große Bedeutung für den Alterungseindruck wird dabei bestimmten Carbonylen zugewiesen, aber auch verschiedenste Ester, Alkohole und Furanverbindungen werden mit dem Alterungsaroma in Verbindung gebracht. In wie weit diese Komponenten direkt am Alterungsaroma beteiligt sind, ist nicht eindeutig geklärt. THUM et al. [263] zeigten anhand Geschmacksschwellen von vier Carbonylen in Wasser, dass diese Substanzen bereits im frischen Bier eine Rolle spielen müssten. Wurden die Geschmacksschwellen in Bier zugrunde gelegt, dürften diese Substanzen auch in stark gealterten Bieren keine Rolle spielen. THUM et al. zeigten anhand von Dreiecksverkostungen weiter auf, dass eine erkennbare Veränderung des Aromaeindruckes eines Bieres (Wahrnehmungsschwelle  $\neq$  Geschmacksschwelle) zwischen den Geschmacksschwellen in Wasser und in Bier lag.

Da der Beitrag der einzelnen Substanzen nicht eindeutig nachgewiesen werden kann, werden Komponenten als alterungsrelevant eingestuft, wenn ihre Konzentrationen über die Lagerung des Bieres parallel zum sensorisch wahrnehmbaren Alterungseindruck quantitativ ansteigen [3, 45, 75, 103, 104, 153, 154, 171, 192, 193, 236, 241, 249, 274, 279, 280, 282, 295, 299, 306, 307]. Auch wenn die so isolierten Substanzen wahrscheinlich einen Beitrag zum Alterungsaroma leisten, sind sie in erster Linie als Indikatoren zu sehen. Wirkliche Leitkomponenten konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Das aus dem Lipidabbau stammende (E)-2-Nonenal, welches ein cardboardähnliches Aroma (Pappkarton) aufweist, wurde aufgrund seines sehr niedrigen Geschmacksschwellenwertes als eine solche Leitkomponente angesehen [103, 236, 295]. Andere Arbeiten zeigten jedoch, dass diese Komponente im Verlaufe der Alterung keinen konstanten Anstieg verzeichnet, sondern schwankende Werte aufweist. Dieses zeigt, dass (E)-2-Nonenal neben einer Bildung im Verlauf der Bieralterung auch einem Abbau unterliegt und damit nicht als Leitkomponente dienen kann bzw. nicht die Hauptkomponente des Alterungsaromas darstellen kann [75, 84, 153, 196, 274, 279].

Im Folgenden werde verschiedenen Reaktionen dargestellt, die zu alterungsrelevanten Aromakomponenten führen.

### **Maillardreaktion und Streckerabbau**

Nichtenzymatische Bräunungsreaktionen von reduzierenden Zuckern und Aminoverbindungen werden unter Maillardreaktionen zusammengefasst [22, 30, 267]. Aus diesen Reaktionen verschiedenster Zucker (Mono-, Di- und Oligosaccharide) und Aminoverbindungen (Aminosäuren und Peptide) entstehen eine Vielzahl von Verbindungen und Intermediärprodukten. Die prinzipiellen Mechanismen dieser Reaktionen sind in der diesbezüglichen Literatur dargestellt [22, 30, 153, 267]. Es entstehen dabei relevante Komponenten wie Furfurale (2-Furfural, 5-Hydroxy-2-Methyl-Furfural), Furane (2-Acetyl-Furan), Furanone (Furaneol), Pyran-, Dicarbonyl- und Cyclopentanon-Derivate. Aus weiteren Reaktionen dieser Substanzen mit Amino- oder Carbonylverbindungen entstehen verschiedenste heterocyclische Verbindungen bzw. Reduktone oder Melanoidine [22, 30, 153]. Melanoidine sind höhermolekulare Verbindungen, die die Fähigkeit besitzen, sowohl als Wasserstoffdonator, als auch

als Wasserstoffakzeptor zu fungieren und damit können diese Verbindungen sowohl an Oxidations- als auch an Reduktionsvorgängen beteiligt sein [109, 110].

Im Rahmen der Maillardreaktion spielt der sogenannte Streckerabbau für die Bildung des Alterungsaromas eine besondere Rolle. Hierbei reagieren Dicarbonylverbindungen aus der Maillardreaktion [22, 30, 153] mit Aminosäuren zu Aldehyden, die zum Teil sehr niedrige Geruchs- und Geschmacksschwellenwerte besitzen [18, 153]. Die im Rahmen des Würzekochens aus den beteiligten Aminosäuren entstandenen Aldehyde werden während der Gärung durch die Hefe zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert (Abb. 2.3).

<b>Aminosäure</b>	<b>Aldehyd</b>	<b>Alkohol</b>
Valin	2-Methylpropanal	2-Methylpropanol
Isoleucin	2-Methylbutanal	2-Methylbutanol
Leucin	3-Methylbutanal	3-Methylbutanol
Phenylalanin	2-Phenylethanal	2-Phenylethanol

**Abb. 2.3: Aminosäuren und ihre Folgeprodukte aus dem Streckerabbau [18]**

Dass die Streckeraldehyde während der Lagerung abgefüllter Biere zunehmen können, ist bekannt und konnte auch in Modellversuchen, insbesondere bei erhöhten Sauerstoffwerten, nachgewiesen werden [31, 263]. Maillardreaktionen laufen jedoch bei Temperaturen unter 80 °C nicht mehr in größerem Umfang ab [31], daher wird dieses Phänomen über die Oxidation von Polyphenolen (durch den zusätzlichen Sauerstoff) bzw. durch Photooxidation von Riboflavin erklärt, wobei Dicarbonylverbindungen entstehen können. Dadurch liegen mehr Reaktionspartner für den Streckerabbau vor [33, 34].

### **Oxidation höherer Alkohole**

Höhere Alkohole werden von der Hefe im Verlauf der Gärung gebildet (Abschnitt 2.2.1). Ebenfalls werden Carbonyle, die im Rahmen der Würzebereitung entstehen, durch die Hefe zu Alkoholen reduziert. Umgekehrt ist es jedoch auch möglich, dass Alkohole zu den korrespondierenden Carbonylen oxidiert werden. Für diese Reaktionen werden in erster Linie Melanoidine verantwortlich gemacht. HASHIMOTO [109] zeigte, dass in Bier, aus dem Melanoidine durch Aktivkohle entfernt wurden,



deutlich weniger Aldehyde über eine forcierte Alterung entstehen als im Original Bier und einem melanoidinfreiem Bier, dem wieder Melanoidine zugesetzt wurden. Ebenso konnten in Modelllösungen so gut wie keine Aldehyde ohne Melanoidine gebildet werden. Sauerstoff erhöhte die Bildung von Carbonylen bei Anwesenheit von höheren Alkoholen und Melanoidinen. Ohne Melanoidine wurden auch durch Sauerstoff keine nennenswerten Mengen an Carbonylen gebildet. Daraus wurde geschlossen, dass der Sauerstoff nicht direkt die Oxidation auslöst, sondern dass die Melanoidine in eine reaktivere Form überführt wurden.

Durch die Würzezusammensetzung und die Vorgänge beim Würzekochen kann die oxidierende Wirkung der Melanoidine für Alkohole beeinflusst werden [110].

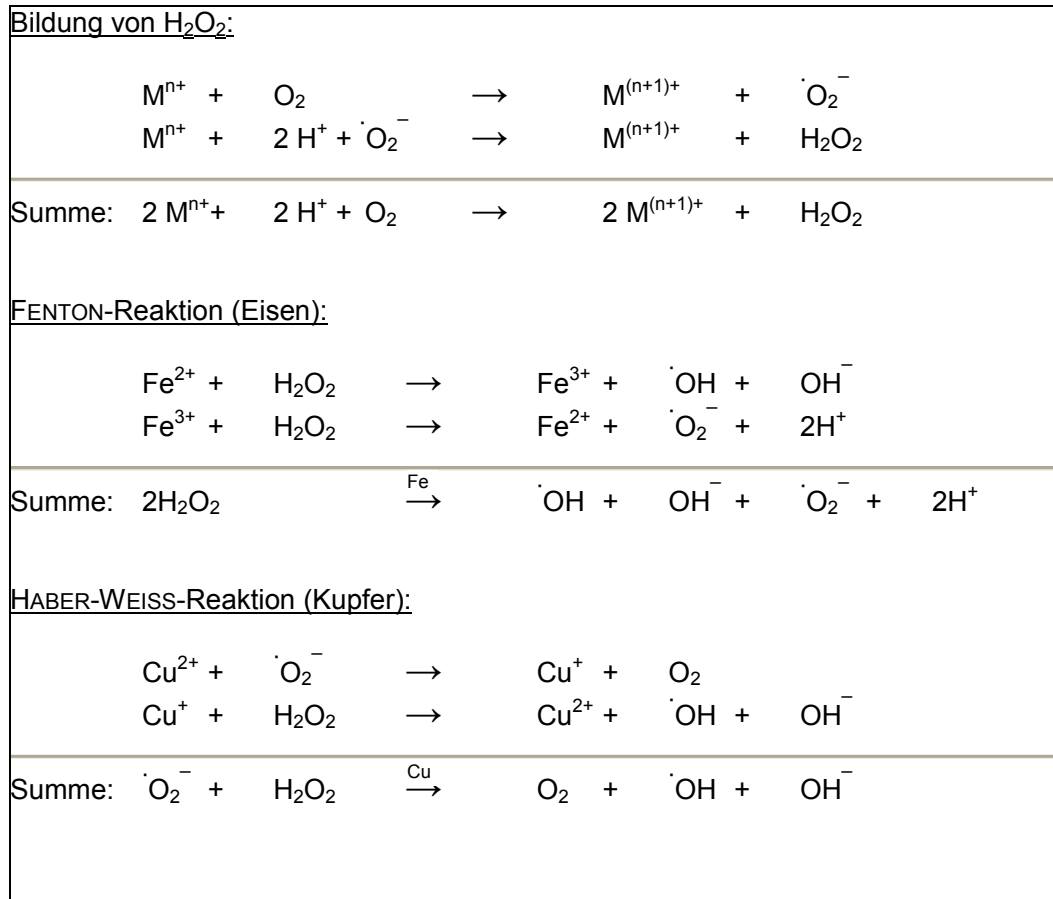
Niedermolekulare Polyphenole können die Oxidation höherer Alkohole verzögern, da sie als Protonendonatoren wirken und damit reaktive Carbonylverbindungen in Hydroxyverbindungen umwandeln können [113].

HASHIMOTO [109] konnte einen negativen Einfluss von Melanoidinen auf die Geschmacksstabilität darstellen. Jedoch zeigten viele Arbeiten, dass insbesondere in dunklen Spezialmalzen ein hohes antioxidatives Verhalten von dieser Substanzklasse ausgeht und diese einen positiven Beitrag zu Geschmacksstabilität erbringt [47, 60].

Dass Sauerstoff auch in direkterer Form an der Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden beteiligt sein kann, zeigen andere Arbeiten [24, 127]. Hierbei spielen Metall-Ionen (insbesondere  $\text{Cu}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen) in Gegenwart reduzierender Substanzen eine wichtige Rolle. Gestartet wird die Umwandlung eines Alkohols in sein korrespondierendes Aldehyd durch die Reaktion mit einem Hydroxylradikal. Dieses Radikal entsteht durch Reaktionen von Metall-Ionen und Sauerstoff (Abb. 2.4). Nicht nur bei der Oxidation von Alkoholen spielen Metall-Ionen eine wichtige Rolle als Katalysatoren, sondern sie unterstützen über verschiedene Wege die Entstehung von Alterungskomponenten [18, 24, 32, 127, 132, 153, 281]. Sauerstoff ist als wichtiger Verursacher der Alterung von Bier bekannt, jedoch ist Sauerstoff im Grundzustand (Triplett- $\text{O}_2$ ) nicht sehr reaktiv. Durch die Beteiligung von Metall-Ionen kann dieser Triplett- $\text{O}_2$  zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) umgewandelt werden.

Metall-Ionen wie Eisen- und Kupfer-Ionen können aus Sauerstoff im Grundzustand ( $\text{O}_2$ ) ein Elektron entfernen und damit den Sauerstoff in ein Superoxid-Anion ( $\text{O}_2^-$ ) umwandeln. Dieses ist in der Lage, die weitaus reaktiveren Peroxyd- ( $\text{HOO}^\cdot$ ) und

Hydroxyradikale ( $\text{HO}\cdot$ ) zu bilden (siehe Abb. 2.4) [24, 127, 281]. Die Konzentration an freien Radikalen im Verlauf der Lagerung von Bier steigt mit steigender Eisen/Kupfer Konzentration, erhöhter Sauerstoffkonzentration und erhöhten Lagertemperaturen an [130, 131, 281].



**Abb. 2.4: Metallkatalysierte Radikalentstehung in Bier [18, 153]**

Die Radikalbildung beginnt jedoch nicht direkt mit der Abfüllung von Bier, sondern erst nach einer bestimmten Zeit. Es wird angenommen, dass diese Zeitspanne von der endogenen antioxidativen Aktivität des Bieres abhängt, die für jedes Bier anders ist. Sie wird mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) als so genannte "Lag-Time" bestimmt und kann damit als objektives Bewertungskriterium genutzt werden [18, 83, 85, 87, 88, 190, 257, 269, 271, 272, 273].

### Oxidation von Isohumulonen

Iso-Alpha-säuren werden in Anwesenheit von ROS schnell abgebaut [131]. Dabei zeigen sich die *trans*-Isomere deutlich anfälliger als die *cis*-Isomere [65]. In

Versuchen mit Modellsystemen wurden aus Iso-Alpha-Säuren Carbonylkomponenten verschiedenster Kettenlänge gebildet, wie beispielsweise C<sub>3</sub> bis C<sub>7</sub>-2-Alkanone, C<sub>2</sub> bis C<sub>10</sub>-Alkanale, C<sub>4</sub> bis C<sub>7</sub>-2-Alkenale und C<sub>6</sub> bis C<sub>7</sub>-2,4-Alkediene [112, 281]. WILLIAMS und WAGNER [307] fanden verschiedene Säuren, die durch den Abbau von Seitenketten der Alpha- und Beta-Säuren entstanden wie z. B. 2-Methyl-Propionsäure und 2-Methyl-Buttersäure. Diese Säuren können wiederum Vorläufer bestimmter Ester darstellen (z. B. 2-Methyl-Buttersäure => Ethyl-2-Methyl-Butyrat; 3-Methyl-Buttersäure => Ethyl-3-Methyl-Butyrat), die ebenfalls als Alterungskomponenten gelten.

Dass Hopfenkomponenten am Alterungsaroma in Bier beteiligt sind, zeigten Untersuchungen mit ungehopften Bieren, die deutlich weniger Alterungsaroma im Laufe der Lagerung entwickelten als die gehopften Kontrollversuche [112].

Interessant sind Untersuchungen von HUYVAERE et al. [121] die zeigten, dass Iso-Alpha-Säuren Elektronen an geeignete Akzeptoren abgeben und dass es sich dabei nicht notwendigerweise um reaktive Sauerstoffspezies handeln muss. Das bedeutet, dass diese Art oxidativer Abbau auch ohne molekularen Sauerstoff stattfinden kann.

### **Lipidabbau**

Der Lipidabbau und besonders die Oxidation von Fettsäuren mit den daraus resultierenden Einflüssen auf die Bieralterung erfuhr sehr viel Beachtung. Dieses liegt unter anderem darin begründet, dass (E)-2-Nonenal mit seiner niedrigen Geschmacksschwelle lange Zeit als Leitkomponente des Alterungsgeschmacks galt. Die Entstehung des (E)-2-Nonenal und anderer gesättigter und ungesättigter Aldehyde wurde der Lipidoxidation zugeschrieben [63, 69, 266, 281]. Hauptsächlich Substrate für die Oxidation stellen die ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) und Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) dar, die aus dem vermälzten Getreide stammen. Diese Fettsäuren werden durch die Aktivität von Lipasen in Gerste und Malz aus Triglyceriden abgespalten [29, 153, 188, 189, 281]. Die Hydrolyse der Triglyceride erfolgt hauptsächlich während des Maischens. Die Aktivität der Lipase aus dem Malz bleibt über einen großen Teil des Maischprozesses erhalten [244, 281]. Im weiteren Prozess der Würzebereitung sind die so frei gewordenen Fettsäuren und ebenfalls die durch den Hopfen eingebrachten Fettsäuren verschiedenen Reaktionen ausgesetzt. Nicht hydrolysierte Lipide, aber auch ein Teil der freien Fettsäuren

verbleiben in den Trebern bzw. im Heißtrub [9, 10, 153]. Die Hefe nimmt in der Vermehrungsphase insbesondere ungesättigte Fettsäuren auf, da diese wichtige Funktionen in der Zellmembran ausüben.

Für die Ausbildung des Alterungsaromas ist entscheidend, inwieweit Fettsäuren und gebildete Zwischenprodukte in das fertige Bier gelangen. Carbonyle, die bereits als Endprodukte des Lipidabbaus in die Anstellwürze gelangen, scheinen keinen großen Einfluss auf die Alterung zu haben, da sie von der Hefe zu Alkoholen reduziert werden [18, 61, 147, 217]. Im Rahmen der Bieralterung können diese jedoch wieder oxidiert werden (siehe oben).

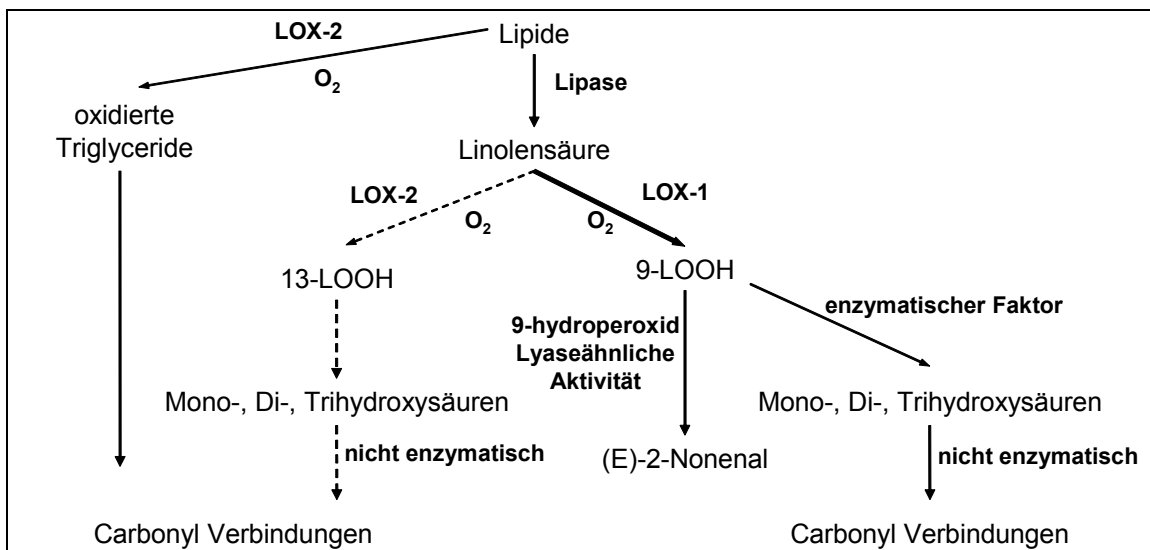
Der Abbau der ungesättigten Fettsäuren kann enzymatisch, aut- und photooxidativ erfolgen.

Für den enzymatischen Abbau von ungesättigten Fettsäuren sind zwei Lipoxygenaseenzyme (LOX-1 und LOX-2) aus der Gerste verantwortlich [28, 153, 281]. LOX-1 ist bereits in der Rohgerste vorhanden, während LOX-2 erst während der Keimung gebildet wird [67, 153, 266, 281, 311]. Diese Enzyme sind in der Lage, aus ungesättigten Fettsäuren, die ein *cis,cis*-1,4-Pentadien-System besitzen (z. B. Linol- und Linolensäure) zu ihren Hydroperoxisäuren abzubauen. Dabei entsteht beispielsweise aus Linolensäure durch das Einwirken von LOX-1 die 9-Hydroperoxy-Octadeca-(E,Z)-10,12-diensäure (9-LOOH) und durch LOX-2 13-Hydroperoxy-(Z,E)-9,11-Octadiensäure (13-LOOH) [67, 95, 120, 153, 281]. Beide Enzyme sind temperaturempfindlich, wobei LOX-1 weniger empfindlich ist. Durch das Abdarren wird die LOX-Aktivität entscheidend verringert und die verbleibende Aktivität geht hauptsächlich von LOX-1 aus [28, 137, 153, 281, 311]. Die Temperatur- und pH-Optima der LOX-Enzyme liegen zwischen 35 bis 55 °C (komplette Inaktivierung im Maischprozess bei 65 °C) und bei pH 6,5. Daher kann im Bereich des Maischens durch hohe Einmischtemperaturen und niedrige pH-Werte (z. B. durch biologische Säuerung) die LOX-Aktivität deutlich eingeschränkt werden [18, 137, 138, 281].

Die gebildeten Hydroperoxifettsäuren werden im Weiteren sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch abgebaut [139, 281]. Beim Maischen steigen die Gehalte von Mono-, Di- und Trihydroxyfettsäuren an, die wahrscheinlich durch enzymatischen Abbau von Hydroperoxifettsäuren entstehen [141, 281]. Für die 9-LOOH Hydroperoxisäure, die durch LOX-1 Aktivität entsteht, wurde ein zusätzliches Enzym isoliert, welches den Abbau zu den Mono-, Di- und Trihydroxyfettsäuren katalysiert

[146, 281]. Die entstandenen Hydroxysäuren können dann nicht-enzymatisch zu verschiedensten Carbonylkomponenten abgebaut werden [266, 281], wobei nicht unerhebliche Mengen bis in fertige Bier transferiert werden [140, 281].

Die LOX-Enzyme sind nicht nur in der Lage freie, ungesättigte Fettsäuren abzubauen, sondern können auch Linol- und Linolensäure, die in Triglyceriden gebunden sind, oxidieren [95, 118, 281]. Dieses bestätigt der Nachweis von veresterten Hydroxyfettsäuren in Triglyceriden und Phospholipiden und deren Anstieg im Laufe der Lagerung von Gerste und Malz [281, 290, 291]. Diese oxidierten Lipide werden ebenfalls als mögliche Vorläufersubstanzen für Carbonylverbindungen angesehen. In Abb. 2.5 sind die möglichen enzymatischen Abbauvorgänge am Beispiel der Linolensäure dargestellt.



**Abb. 2.5: Überblick über die derzeit bekanntesten enzymatisch-oxidativen Stoffwechselfvorgänge von Linolensäure zu Carbonylverbindungen [281]**

Die LOX-Enzyme werden oberhalb von 65 °C inaktiviert, somit findet eine weitere enzymatische Oxidation von ungesättigten Fettsäuren nach dem Maischen nicht mehr statt. Carbonylverbindungen, die noch im Sudhaus aus dem enzymatischen Abbau der Fettsäuren resultieren, spielen durch die Reduktionskraft der Hefe für die Alterung von Bier direkt keine Rolle. Es wird daher angenommen, dass die Bedeutung des enzymatischen Abbaus von Fettsäuren für die Alterung eher aus reaktiven Zwischenprodukten des Abbaus resultiert, die im fertigen Bier zu Carbonylverbindungen umgewandelt werden [153, 281].

Durch autoxidative Abbaureaktionen nehmen die Konzentrationen von ungesättigten Fettsäuren während der Bieralterung ab. Die Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren wird mit dem Herauslösen eines H-Atoms aus dem Molekül durch ein freies Radikal gestartet. Dabei kann es sich um die bereits beschriebenen reaktiven Peroxyd- ( $\text{HOO}\cdot$ ) und Hydroxyradikale ( $\text{HO}\cdot$ ) handeln. Bei der Linolensäure entstehen dabei über Radikalbildung und deren Stabilisierung hauptsächlich die Hydroperoxide 9-LOOH und 13-LOOH. Zu einem sehr geringen Prozentsatz entstehen auch andere Hydroperoxidsäuren (8-, 10-, 12- und 14-LOOH). Die Mechanismen dazu sind in der geeigneten Literatur zu entnehmen [30, 153, 281]. Für den weiteren Abbau bis zu Carbonylverbindungen werden unterschiedliche Bildungswege verantwortlich gemacht [30, 153, 207, 266, 281]. Beispiele für Carbonylverbindungen, die aus dem Abbau verschiedener Fettsäuren entstehen sind in der Tabelle 2.2 dargestellt.

Tab. 2.2: Alterungscarbonyle aus dem Abbau langkettiger ungesättigter Fettsäuren [18]

Ölsäure ( $\text{C}_{18:1}$ )	Linolsäure ( $\text{C}_{18:2}$ )	Linolensäure ( $\text{C}_{18:3}$ )
Heptanal	Pentanal	(E,Z)-2,4-Heptadienal
(E)-2-Nonenal	Hexanal	(E,E)-2,4-Heptadienal
Octanal	(E)-2-Octenal	(Z)-3-Hexenal
Decanal	(E)-2-Nonenal	
(E)-2-Decenal	(E,Z)-2,4-Decadienal	
	(E,E)-2,4-Decadienal	

### Reaktionen von Aldehyden

Unter katalytischer Wirkung von Prolin können gesättigte Carbonyle im Rahmen einer Aldolkondensation zu 2-Alkenalen reagieren [113, 178]. In Modellversuchen konnten dabei beispielsweise aus zwei Acetaldehydmolekülen (E)-2-Butenal und aus Acetaldehyd und Heptanal (E)-2-Nonenal gewonnen werden.

Zyklische Acetale (z. B. 2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolan) werden durch eine Kondensationsreaktion zwischen 2,3-Butandiol (bis zu 280 mg/l in Bier) und einem Aldehyd (z. B. Acetaldehyd) gebildet [218, 281]. Im fertigen Bier bildet sich schnell ein Gleichgewicht zwischen 2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolan, Acetaldehyd und 2,3-Butandiol aus, sodass 2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolan mit der bekanntermaßen steigenden Konzentration von Acetaldehyd im Verlaufe der Alterung ebenfalls ansteigt [279, 281].

Ungesättigte Carbonyle können vergleichbar mit Fettsäuren einer Autoxidation unterliegen. Beispielsweise konnten aus (E)-2-Nonenal in Modellversuchen Pentanal, Hexanal, Heptanal, Octanal und weitere Carbonyle gebildet werden [113, 153].

### **Sonstige Reaktionsmechanismen zur Bildung von Alterungskomponenten**

Das Keton (E)- $\beta$ -Damascenon als Abbauprodukt von Carotinoiden wird ebenfalls als Komponente für die Bieralterung angesehen [58, 98, 281]. Es wird angenommen, dass (E)- $\beta$ -Damascenon aus Neoxanthin, welches in den Rohstoffen vorhanden ist, gebildet wird [58, 281]. Ein deutlicher Anstieg von (E)- $\beta$ -Damascenon während der Alterung von Bier wurde festgestellt, wenn dem Bier eine  $\beta$ -Glucosidase zugegeben wurde [281]. Die nicht-enzymatische Freisetzung von (E)- $\beta$ -Damascenon im Bier wird durch tiefe pH-Werte begünstigt [98, 281].

Schwefelkomponenten wie zum Beispiel Dimethyltrisulfid (DMTS) steigen ebenfalls im Verlauf der Lagerung von Bier an und können dabei über die Geschmacksschwelle steigen [99, 100, 281, 305]. Es werden verschiedene Bildungswege für DMTS angenommen. Laut PEPPARD [216] wird DMTS aus dem Vorläufer S-Methyl-L-cystein(-S-oxid) gebildet, welches aus dem Hopfen stammt. Weitere Vorläufer des DMTS könnten 3-Methylthiopropionaldehyd bzw. dessen reduzierte Form 3-Methylthiopropylalcohol sein [99, 100, 281].

Einige Ester nehmen in ihrer Konzentration während der Bierlagerung ebenfalls zu (z. B. 2-Methyl-Buttersäure-Ethylester, 3-Methyl-Buttersäure-Ethylester, Nicotinsäure-Ethylester) [35, 98, 153, 154, 171, 281, 306]. Die Bildung erfolgt über eine Kondensationsreaktion von Ethanol mit organischen Säuren im Bier [281, 307].

Gamma-Nonalacton wird als wichtige Alterungskomponente angesehen und ist ein Vertreter der Lactone oder zyklischen Ester [76, 98]. Die Bildung verläuft über Oxo-Carbonsäuren (für Gamma-Nonalacton über 4-Oxo-Nonansäure), die Intermediärverbindungen der C<sub>18</sub>-Fettsäuren darstellen [153].

Ein weiterer Stoff, der in der jüngsten Vergangenheit als Komponente des Alterungsaromas identifiziert wurde, ist der Furfurylethylether. Diese Verbindung wird durch eine säurekatalysierte Kondensationsreaktion aus Furfurylalkohol und Ethanol gebildet. Furfurylalkohol ist ein Produkt der Maillardreaktion und damit wird diese Verbindung beim Darren und beim Würzekochen gebildet. Es wird auch vermutet,

dass die Reduktion von Furfural durch die Hefe während der Gärung zur Erhöhung der Konzentration beiträgt. [279, 280, 281, 282]

### 2.3.2 Antioxidative Wirkung von Bierinhaltsstoffen

Unter antioxidativer Wirkung wird eine Verzögerung oder Verhinderung von Oxidationsvorgängen verstanden. Damit eine Substanz als Antioxidans bezeichnet wird, muss diese in einer deutlich geringeren Konzentration vorliegen als die Substanz, die vor der Oxidation geschützt wird. [18, 108]

Zu den typischen Reaktionsmechanismen von Antioxidantien gehören [18]:

- direktes Abfangen des Sauerstoffs
- Chelatbildung: Binden von Metall-Ionen (z. B.  $\text{Fe}^{2+}$ )
- Verhinderung von Kettenreaktionen durch Abfangen des Starterradikals
- Unterbinden von Radikalkettenreaktionen durch Abfangen eines Intermediärradikals

Im Rahmen der Bierbereitung kommen Antioxidantien zum einen direkt aus den Rohstoffen oder werden durch Reaktionen im Produktionsprozess gebildet. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass Malz den Hauptteil der reduzierenden Substanzen einbringt und dabei phenolische Substanzen das größte Potential haben [37, 47, 137]. Phenolische Substanzen werden je nach ihrem Polymerisationsgrad in Monophenole (z. B. Phenolsäuren, Phenolamine), monomere Polyphenole (z. B. Catechine, Anthocyanogene) und höher polymerisierte Polyphenole (z. B. hydrolysierbare Polyphenole) eingeteilt [153, 168]. Monomere Polyphenole und höher polymerisierte Polyphenole sind aus Flavan-Molekülen aufgebaut [153]. Im Bier stammen etwa 70-80 % der Polyphenole aus dem Malz und 20-30 % aus dem Hopfen [281]. Niedermolekulare Polyphenole gelten als starke Antioxidantien, mit wachsendem Molekulargewicht wird die reduzierende Wirkung schwächer [49, 281]. Polyphenole können mit freien Radikalen unter Bildung von Phenoxyradikalen reagieren, die relativ stabil sind, da das freie Radikal über den aromatischen Ring delokalisiert ist. Einige Polyphenole haben antioxidative Wirkung, da sie in der Lage sind, Chelate mit Metall-Ionen zu bilden [18, 281]. Einige Polyphenole können auch als Prooxidantien wirken, da sie Elektronen an Metall-Ionen abgeben können [281].



Inwieweit nun Polyphenole eine relevante Wirkung als Antioxidantien haben ist umstritten. Bei ESR-Untersuchungen wurde kein signifikanter Effekt von Polyphenolen auf die Radikalbildung festgestellt [6, 281], wobei vermutet wird, dass dieses nur für extrem reaktive Hydroxylradikale gilt, andere Radikale jedoch schon von Polyphenolen abgefangen werden können [281].

Bei Tests des Reduktionsvermögens von Bier (z. B. mittels DPPH Methode) zeigte sich, dass die Polyphenole mit bis zu 60 % an dem Reduktionsvermögen beteiligt sind [133, 167, 281]. Jedoch hatte ein Verlust an Polyphenolen durch eine PVPP-Behandlung zwar eine Verringerung des Reduktionsvermögens zur Folge, jedoch wurde keine erhöhte Anfälligkeit für Oxidation festgestellt [167, 173, 281]. Dieses wurde damit erklärt, dass Polyphenole in erster Linie im Sudhaus antioxidativ wirken und dadurch in diesen Prozessschritten wichtig für die Geschmacksstabilität sind [18, 152, 173, 281]. WALTERS et al. [293, 294] fanden, dass (+)-Catechin und Ferulasäure nur bei sehr hohen Sauerstoffwerten im Bier die entstehenden Konzentrationen von Alterungscarbonylen reduzieren konnten, jedoch nicht bei niedrigen Sauerstoffwerten. Dass Hopfen einen stärkeren Einfluss auf das Reduktionsvermögen hat als angenommen, zeigten Untersuchungen mit 2,2'-Azobis(2-aminopropan) Dihydrochlorid, bei dem Hopfen ein 30-mal höheres Reduktionsvermögen zeigt als Malz [151, 152].

Neben den durch die Rohstoffe eingebrachten Antioxidantien werden weitere durch verschiedene Schritte des Mälzungs- und Brauprozesses gebildet [36]. Dazu gehören Reduktone und Melanoidine. Reduktone besitzen eine Endiol-Gruppe, die oxidiert werden kann, wodurch ein Carbonyl entsteht [47, 281].

Zu der Wirkung von Melanoidinen als Antioxidantien gibt es nur wenige Arbeiten [302, 303, 304]. Daraus ist schwierig zu entnehmen, welche Strukturen der Melanoidine antioxidative Wirkungen aufweisen können [281]. Dass Melanoidine zur Oxidation von Alkoholen beitragen und damit der Geschmackstabilität abträglich sein können, ist bereits diskutiert worden.

Schwefeldioxid (Sulfit,  $\text{SO}_2$ ) ist eines der stärksten Antioxidantien in Bier, dessen Bildung während der Gärung im Abschnitt 1.2.3 beschrieben wurde. Dass  $\text{SO}_2$  die Radikalentstehung verhindern kann, zeigten Untersuchungen, die mittels ESR durchgeführt wurden [5]. Dabei reagierte  $\text{SO}_2$  mit organischen und anorganischen Peroxiden, bei der keine Radikale gebildet werden [5, 18, 270, 281]. Als objektives

Kriterium für die Radikalenstehung in Bier wird die „Lag-Time-Messung“ verwendet und diese wird maßgeblich durch den SO<sub>2</sub>-Gehalt beeinflusst.

### 2.3.3 Maskierende Effekte von Bierinhaltsstoffen

Sulfit hat neben der beschriebenen starken antioxidativen Wirkung auch noch eine weitere Fähigkeit, die sich positiv auf die Geschmacksstabilität auswirkt. Es kann Komplexe mit Carbonylen bilden, die reversibel sind [18, 25, 70, 107, 134, 153, 200]. Diese Komplexe, die nicht aromaaktiv sind, können die Ausbildung eines Alterungsaromas maskieren, bis durch Oxidation des Sulfits zum Sulfat die Alterungscarbonyle aus den Komplexen herausgelöst werden. Die Affinität zur Bildung dieser Komplexe ist umso größer, je kürzer das Aldehyd ist [70]. Das bedeutet, dass zunächst die Sulfit-Carbonyl-Komplexe mit länger-kettigen Aldehyden aufgelöst werden. Außerdem nimmt die Acetaldehydkonzentration mit der Lagerung zu. Daher werden länger-kettige Carbonyle durch das entstandene Acetaldehyd aus den Komplexen verdrängt, wodurch es zu einer Freisetzung des Alterungsaromas kommt [25]. Es wurde angenommen, dass dieser Mechanismus für alle Aldehyde gilt und postuliert, dass (E)-2-Nonenal schnell aus diesen Komplexen herausgelöst wird [25]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass durch die im (E)-2-Nonenal enthaltene Doppelbindung die Verbindungen der Komplexe irreversibel werden, und damit wird das so gebundene (E)-2-Nonenal nicht freigesetzt [71].

Dass Carbonyle aus der Würze direkt mit Sulfit Komplexe bilden und diese damit nicht von der Hefe reduziert werden ist unwahrscheinlich, da die Carbonylreduktion im Verlauf der Gärung sehr schnell erfolgt, während die Bildung von SO<sub>2</sub> erst zum Ende der Gärung verstärkt ist. Aus diesem Grund ist auch ein verzögerter Diacetylabbau durch die Komplexbildung ebenfalls unwahrscheinlich [153].

Eine weitere Annahme ist, dass Sulfit, welches in Komplexe eingebunden ist, nicht antioxidativ wirkt. KANEDA et al. [134] konnten jedoch über Chemilumineszenz-Messungen zeigen, dass diese Komplexe Reaktionen von freien Radikalen unterbinden können. Ebenso zeigten viele Untersuchungen mittels ESR signifikante Zusammenhänge zwischen der Radikalbildung und dem Gesamt-SO<sub>2</sub>-Gehalt, was darauf schließen lässt, dass das in Komplexen gebundene SO<sub>2</sub> ebenfalls antioxidativ wirkt [18, 83, 85, 257, 271, 272]. Daneben fanden LUSTIG et al. [153] deutliche Zusammenhänge der Gesamt-SO<sub>2</sub>-Gehalte und der Alterungsverkostung.

Neben maskierenden Effekten, die auf Komplexbildung zurückzuführen sind, gibt es noch eine weitere Art der Maskierung, nämlich die Überdeckung mit anderen, stärkeren Aromen. Dass die Aromaeindrücke von der Matrix des Getränks, also der Summe der begleitenden Stoffe abhängen, zeigt sich darin, dass die Geschmacksschwellenwerte aller Aromastoffe in Wasser deutlich unter denen in Bier liegen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass insbesondere aromaintensive Komponenten wie Ester und Hopfenaromen in der Lage sind, andere Aromaeindrücke zu überdecken [18]. KALTNER [129] zeigte, dass mit zunehmender Dosage von Linalool, als dominierende Aromakomponente der Hopfenblume, die Alterungsaromen deutlich weniger wahrnehmbar sind.

Im Verlauf der Lagerung von Bier nimmt die Konzentration einiger Ester deutlich ab. Darunter sind auch die beiden konzentrationsstärksten Ester Ethylacetat und Isoamylacetat. Diese Veränderung hat damit einen entscheidenden Einfluss auf das Bieraroma. [153, 199, 252, 281]. Der Abbau der Ester ist dabei zum Teil chemischer und zum Teil enzymatischer Natur. Der enzymatische Abbau ist stark stammspezifisch, wobei obergärende Hefen höhere Aktivitäten als untergärende Hefen zeigen. Auch ist Isoamylacetat stärker betroffen als Ethylacetat. [199]

### **2.3.4 Technologische Möglichkeiten zur Beeinflussung der Geschmackstabilität**

Technologisch gibt es eine Reihe von Möglichkeiten, die Geschmacksstabilität zu beeinflussen. Die meisten Ansätze sind im Bereich der Malz- und Würzebereitung oder im Bereich der Filtration, Abfüllung und der Lagerung der abgefüllten Biere zu finden. Sehr umfangreiche Zusammenstellungen über die technologischen Einflussmöglichkeiten in diesen Bereichen wurden über Jahre durch den Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I veröffentlicht [18, 20, 83, 153, 155, 190, 191, 192, 193], aber auch andere Autoren haben sich dieses Themas angenommen [23, 281]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist jedoch von Interesse, inwieweit die Hefevitalität und die Gärparameter einen Einfluss auf die Geschmackstabilität haben. In diesen Bereichen wurden bisher nur sehr wenige Untersuchungen durchgeführt.

Lediglich zwei Veröffentlichungen beschäftigten sich mit dem Einfluss der Hefevitalität auf die Geschmacksstabilität [21, 106]. Diese Arbeiten wurden bereits im Abschnitt 1.1.2 näher erläutert. Die Ergebnisse einer dieser beiden Arbeiten [106] werden

jedoch bezweifelt und daher hier nicht diskutiert (siehe Abschnitt 2.1.2). In der Arbeit von BACK et al. [21] wurde analytisch kein deutlicher Unterschied zwischen Bieren festgestellt, die mit unterschiedlich vitalen Hefen hergestellt wurden. Sensorisch wurde das Bier, das mit der besten Hefe hergestellt wurde, als am wenigsten gealtert empfunden.

Der Zusammenhang der Geschmacksstabilität mit dem SO<sub>2</sub>-Gehalt ist bereits ausführlich behandelt worden. Die SO<sub>2</sub>-Bildung kann technologisch sehr gut gesteuert werden (siehe Abschnitt 2.2.3).

Eine schnelle und zügige Gärung führt zu einem tiefen pH-Abfall und niedrigen Aminosäuregehalten im fertigen Bier. Hohe Aminosäuregehalte im Bier stellen mehr Substrat für den Streckerabbau dar und sind daher zu vermeiden. Aus dem selben Grund muss auch eine Autolyse der Hefe verhindert werden [153]. Negative Einflüsse der Belüftung auf die Bildung von Alterungskomponenten fand LUSTIG [153] nur bei der Verwendung von reinem Sauerstoff zur Belüftung, die gleiche Tendenz wurde bei der Alterungsverkostung festgestellt. In derselben Untersuchung wurde auch der Einfluss einer Zweitbelüftung untersucht, und dabei wurden keine deutlichen Einflüsse festgestellt, außer bei einer Belüftung nach 24 h, die sich positiv auswirkte.

Der Einfluss der Hefegabe auf die Geschmackstabilität wurde als gering beurteilt. Bei Variation der Gärtemperatur von 8 auf 20 °C in 4 °C Intervallen wurde zunächst ein Anstieg der Alterungskomponenten bis 16 °C und einer Abnahme darüber hinaus festgestellt. Sensorisch war eine deutliche Verschlechterung der Gärungen mit steigender Temperatur zu verzeichnen, jedoch war das allgemeine Geschmacksprofil durch den Temperaturanstieg derart verändert, dass ein Vergleich schwer fiel. Ein Einfluss von leichtem Gegendruck bei der Gärung wurde nicht festgestellt. [153]

Um die bereits genannten maskierenden Effekte zu nutzen, schlug HASHIMOTO [111] Maßnahmen vor, den Gehalt an Estern zu erhöhen. Jedoch kann dieses bei einer bestehenden Biermarke nur begrenzt durchgeführt werden, da sich damit das Aromaprofil deutlich verändern würde.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Statistische Versuchsplanung und Auswertung

Der Ausdruck „Statistische Versuchsplanung“ bezieht sich darauf, dass Experimente vor der Durchführung so geplant werden, dass durch die Versuche geeignete Daten entstehen, die mit statistischen Methoden ausgewertet werden können und damit zuverlässige und objektive Schlussfolgerungen daraus gezogen werden können. Wenn die Daten möglichen Versuchsfehlern (Durchführungsfehler, Fehler durch unterschiedliche Rohstoffe etc.) unterliegen, ist die statistische Methodik die einzige objektive Verfahrensweise [180].

Je nach dem, welche Problemstellung behandelt werden sollen, eignen sich unterschiedlichste Versuchsansätze für die Durchführung. Werden, wie im vorliegenden Fall, die Effekte von zwei oder mehr Faktoren untersucht, so eignen sich dafür besonders faktorielle Versuchspläne. Mit faktoriellen Versuchsplänen ist gemeint, dass in einer Versuchsreihe alle möglichen Kombinationen der Faktoren (im Rahmen einer Gärung z. B. Gärtemperatur, Hefegabe und Belüftung) und der zu untersuchenden Stufen (für die Gärtemperatur z. B. 8, 12 und 16 °C) als Versuche durchgeführt werden. Mit einer solchen Versuchsplanung können die Einflüsse der einzelnen Faktoren und die Interaktionen mehrerer Faktoren durch die Verwendung von mathematischen Regressionsmodellen untersucht werden. Mit zunehmender Zahl der Faktoren und der untersuchten Stufen steigt die Zahl der notwendigen Versuche stark an. Daher ist für viele Anwendungen eine Verwendung solcher „vollfaktorieller“ Versuchspläne nicht durchführbar. Aus diesem Grund wurden auch Versuchspläne entwickelt, bei denen nur ein Teil der möglichen Versuchskombinationen durchgeführt wird. Durch Regressionsanalysen werden aus den gefundenen Daten ebenfalls Modelle gebildet, die den Einfluss der einzelnen Faktoren und deren Interaktionen darstellen. Ausgehend davon wurden Methoden entwickelt, bei denen mit Hilfe verschiedener mathematischer und statistischer Techniken Versuchspläne gebildet werden, die bei geringer Anzahl von Versuchen eine gute Modellbildung ermöglichen. Diese werden unter der Bezeichnung „Response Surface Methodology“ zusammengefasst.

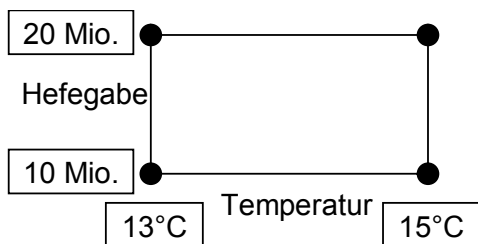
### 3.1.1 Statistische Versuchsplanung mittels der Software Design Expert

Es ist möglich, sowohl die statistische Versuchsplanung als auch die Auswertung der Resultate manuell durchzuführen. Dieses ist jedoch mit erheblichem Aufwand und der Beherrschung vieler mathematischer und statistischer Techniken verbunden. Es existieren für diese Anwendungen Computerprogramme, die dank der Fortschritte in der Computertechnologie sehr leistungsfähig und bedienungsfreundlich sind. Weiterhin sind Kenntnisse der mathematischen und statistischen Methoden notwendig, da beispielsweise die Güte der resultierenden Modelle durch statistische Kennzahlen ausgedrückt werden, deren Beurteilung ohne entsprechende Kenntnisse nicht möglich ist. Für die statistisch geplanten Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Software Design Expert der Firma Stat-Ease (Stat-Ease, Inc., 2021 E. Hennepin Avenue, Ste 480, Minneapolis, MN 55413-2726) in der Version 6.0.11 verwendet. Diese Software bietet die Möglichkeit, verschiedene faktorielle Versuchsplanungen sowie Response Surface Methodology Versuchsplanungen durchzuführen und die resultierenden Daten auszuwerten. Bereits bei der Planung der Experimente sind wichtige Punkte zu beachten, näheres dazu ist in der geeigneten Literatur dargestellt [142, 180].

#### 3.1.1.1 Faktorielle Versuchsplanung mit 2 Stufen

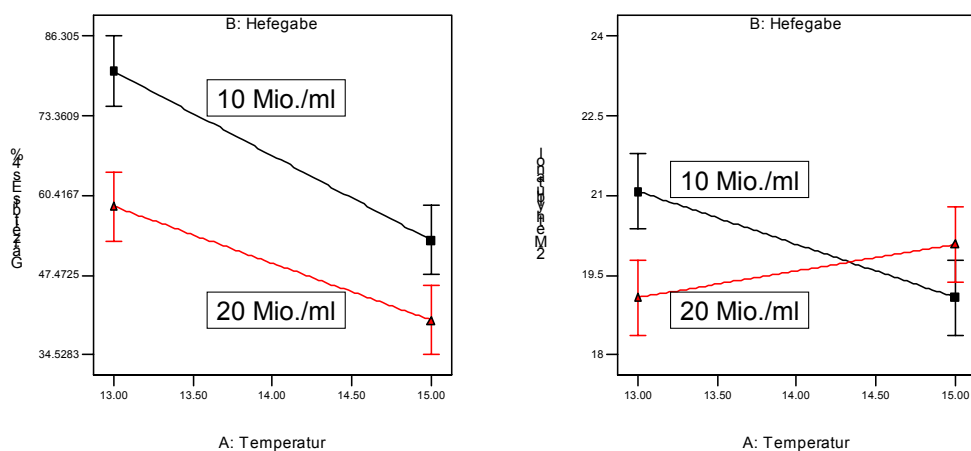
Die einfachste Variante einer faktoriellen Versuchsplanung stellt die Versuchsplanung mit zwei Stufen dar. Diese wird anhand eines einfachen Beispiels erläutert. Es sollen die Auswirkungen von Temperatur und Hefegabe auf die Gärung untersucht werden, und zwar auf den zwei Temperaturstufen 13 °C und 15 °C und mit Hefegaben von 10 und 20 Mio. Zellen/ml. Zur Veranschaulichung können diese Versuchsbedingungen als Eckpunkte eines Rechtecks dargestellt werden (Abb. 3.1).

Mit Hilfe der Versuchskombinationen an den Ecken des Rechteckes kann nun festgestellt werden, welche Auswirkungen die Einflussfaktoren haben. Dabei kann auch unterschieden werden, ob es Wechselwirkungen zwischen den Einflussfaktoren gibt oder nicht. Als Beispiele für diese beiden Extremzustände (keine Wechselwirkung bzw. starke Wechselwirkungen) dienen Ergebnisse, die im Rahmen der großtechnischen Versuche für Temperatur und Hefegabe mit den oben genannten Stufen erzielt worden sind.



**Abb. 3.1: Darstellung einer faktoriellen Versuchsplanung mit 2 Stufen**

Dabei stellt Abb. 3.2 a die Gärzeit bis zu einem  $E_s$  von 4 % dar, in der es nahezu keine Wechselwirkungen zwischen den Faktoren gibt. Mit zunehmender Temperatur ist die Extraktabnahme schneller. Die unterschiedliche Hefegabe bewirkt lediglich eine Parallelverschiebung des Zusammenhanges. Bei 2-Methylbutanol zeigt sich bei hoher Hefegabe ein Anstieg der Konzentration mit zunehmender Gärtemperatur, jedoch kommt es bei einer niedrigen Hefegabe dagegen zu einer Abnahme der Konzentration mit steigender Temperatur (Abb. 3.2 b). Dadurch wird deutlich, dass diese beiden Einflussfaktoren sich bei diesem höheren Alkohol gegenseitig beeinflussen.



**Abb. 3.2 a+b: Einfluss der Faktoren Gärtemperatur und Hefegabe auf verschiedene Zielgrößen ohne Wechselwirkungen (a) und mit Wechselwirkungen (b)**

Der große Vorteil von Versuchsplänen mit faktoriellem Aufbau über zwei Stufen ist, dass in der Regel wenige Versuche durchgeführt werden müssen. Dieses birgt allerdings den großen Nachteil, dass nicht bekannt ist, wie sich die Zusammenhänge zwischen den Stufen darstellen. So ist es beispielsweise bei verschiedenen Gärungsnebenprodukten bekannt, dass sie mit zunehmender Temperatur zunächst ansteigen, bei einem weiteren Anstieg der Temperatur aber wieder abnehmen.

Dieses kann bei ungünstiger Wahl der Stufen dazu führen, dass sich eine gleich bleibende Konzentration oder sogar eine abnehmende Konzentration eines Gärungsnebenproduktes darstellt, obwohl dieses nicht den realen Zusammenhängen entspricht. Hier müssten dann faktorielle Versuchsplanungen mit mehreren Stufen zum Einsatz kommen, die wiederum den Nachteil haben, dass diese mit zunehmender Faktorenanzahl schnell hohe Anzahlen an durchzuführenden Versuchen ergeben. Aus diesem Grund werden zur Darstellung von komplexen Zusammenhängen Teilfaktorielle- oder RSM-Versuchspläne verwendet.

Insbesondere faktorielle Versuchspläne mit zwei Stufen werden genutzt, Faktoren zu identifizieren, die einen signifikanten Einfluss auf zu untersuchenden Eigenschaften haben. Auch bei Untersuchungen mittels RSM-Methoden nimmt die Versuchsanzahl mit zunehmenden Einflussfaktoren deutlich zu. Vor allem wenn dabei auch Faktoren betrachtet werden, die keine Auswirkungen haben, werden unnötig viele Versuche durchgeführt. Daher sollten anhand von Vorversuchen nicht relevante Faktoren aus der Versuchsplanung eliminiert werden [180].

In der vorliegenden Arbeit wurde die faktorielle Versuchsplanungen mit 2-Stufen nicht zur Eliminierung nicht relevanter Faktoren verwendet. Die Versuche wurden direkt in der Produktion einer Brauerei (3000 hl) durchgeführt. Daher war es notwendig, die absolute Anzahl der Versuche zu minimieren.

Um die Problematik des unbekanntes Verlaufes zwischen den gewählten Stufen zu verringern, wurden so genannte Zentralpunkte verwendet. Hier werden nicht alle Faktorenkombinationen als Versuche durchgeführt, sondern nur eine Versuchskombination mit den Mittelwerten des Untersuchungsbereiches (für das obige Beispiel Gärtemperatur 14 °C und Hefegabe 15 Mio. Zellen/ml). Dieses hat den Vorteil, dass die Anzahl der Versuche nur geringfügig steigt. Um in diesen Versuchsreihen auch eine Bestimmung des Versuchsfehlers durchführen zu können, wurden die Zentralpunkte als Doppelbestimmung ausgeführt.

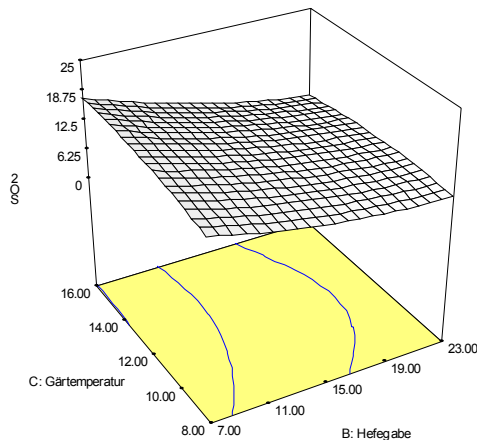
Da für die Auswertung und Darstellung von faktoriell geplanten Versuchen mit zwei Stufen die gefundenen Ergebnisse verwendet werden und ein linearer Verlauf zwischen den Punkten angenommen wird, ist die Auswertung durch Regressionsmodelle nicht notwendig. Die Auswertung erfolgte dennoch durch Modellbildungen, da damit die Zentralpunkte in die Analyse einfließen und über verschiedene statistische Parameter die Güte der Zusammenhänge beurteilt werden



können. Die der Versuchsplanung und der Analyse zugrunde liegende Theorie zu den Verfahren der Korrelations- und Regressionsanalysen sowie zu varianzanalytischen Verfahren ist in der notwendigen Ausführlichkeit in der einschlägigen Fach- und Lehliteratur beschrieben [180, 210, 298].

#### 3.1.1.2 Response Surface Methodology

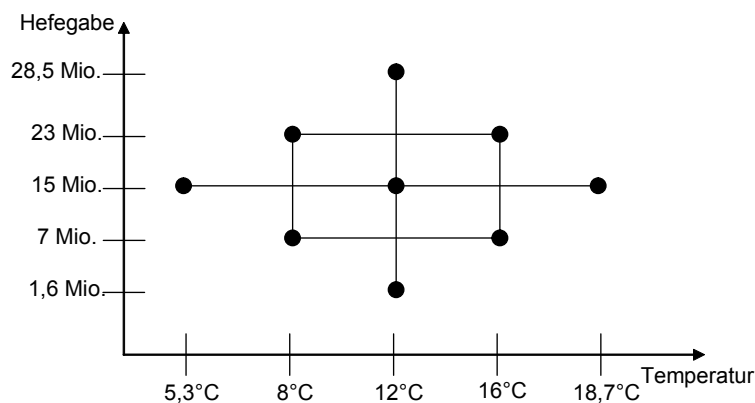
Bei der Response Surface Methodology (RSM) handelt es sich um eine Zusammenstellung von mathematischen und statistischen Techniken zum modellieren und analysieren von Problemen, bei denen eine Eigenschaft (Response) untersucht wird, die von einer Anzahl von Variablen beeinflusst wird [180]. Dieses wird in der Regel zum Optimieren von Prozessen genutzt [180], wobei dieses in Biowissenschaften [2, 102, 215] und ebenfalls in der brauereitechnischen Forschung schon erfolgreich genutzt wurde, um die komplexen Zusammenhänge der vielen Einflussfaktoren zu erforschen und darzustellen [48, 56]. Die Bezeichnung „Response Surface“ ergibt sich daraus, dass das mathematische Modell der Zielgröße (Response) eine Oberfläche (Surface) im dreidimensionalen Raum ergibt (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Darstellung einer Response Surface Oberfläche**

Es existieren verschiedene Strategien zum Erstellen von RSM Versuchsplänen. Neben Standard Versuchsplänen gibt es die Möglichkeit, spezielle Anpassungen durchzuführen. Jedoch sind die Standardversuchspläne an den mathematischen und statistischen Notwendigkeiten ausgerichtet und daher vorzuziehen. Die am meisten genutzte Variante der Standardversuchspläne sind die so genannten Central-Composite-Designs (CCD), die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet

wurden. Der Aufbau soll zunächst, aufgrund der Anschaulichkeit, anhand von zwei Einflussfaktoren erläutert werden. Wieder dienen Gärtemperatur und Hefegabe als Faktoren, wobei der zu untersuchende Bereich vergrößert werden soll. Von Interesse soll der Temperaturbereich 8 bis 16 °C und für die Hefegabe der Bereich 7 bis 23 Mio. Zellen/ml sein. Der CCD-Versuchsplan setzt sich dabei zunächst aus einem faktoriellen Versuchsplan mit zwei Stufen zusammen. Die Versuche können als Eckpunkte eines Rechtecks dargestellt werden. Dazu kommen nun noch Zentralpunkte. Im Weiteren werden so genannte Sternpunkte eingeführt, bei denen es sich um Extremwerte (Minimum und Maximum) für einen Faktor handelt, während der zweite Faktor bei einem Mittelwert gehalten wird. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 3.4 dargestellt.



**Abb. 3.4: Darstellung der Versuche bei einer RSM Planung mit zwei Faktoren**

Der Abstand der Sternpunkte vom Zentralpunkt ( $\alpha$ ) spielt für die Modellbildung eine wichtige Rolle. Im Idealfall wird dieser Wert so gewählt, dass der Versuchsplan „rotierbar“ ist. Damit ist jedoch nicht gemeint, dass alle Punkte auf einer Kugel liegen, sondern, dass die Varianz der durch das Modell vorhergesagten Zielgröße konstant in einem bestimmten Abstand zum Zentrum ist. Dieses beeinflusst die „Informationsdichte“ des Versuchsplanes. Die so konstruierten Versuchspläne ergeben sehr stabile Regressionsfunktionen, schon aus der Tatsache heraus, dass jeder Faktor über fünf Stufen variiert wird. [180, 298]

Von den CCD-Versuchsplänen gibt es noch verschiedene Variationen, die ungünstige Abweichungen der optimalen CCD-Pläne darstellen, aber bestimmte Zwecke verfolgen. Für einen dieser Versuchspläne wird bei vielen Einflussfaktoren statt einem

vollfaktoriellen Grundgerüst nur ein teilfaktorielles Gerüst verwendet (Small CCD-Designs) [180, 298]. Dadurch sind weniger Versuche durchzuführen.

Eine weitere Variante stellen die so genannten Face-Centered-Designs dar. Bei diesen liegen die Sternpunkte auf den Seitenflächen des imaginären Rechtecks, das die faktoriellen Versuchspunkte bildet. Damit werden die Faktoren nur über drei statt über fünf Stufen variiert. Dieses schwächt zwar die Regressionsfunktion insbesondere an den Rändern des Modells. Dadurch wird jedoch der experimentelle Aufwand geringer, da die Faktoren nicht über fünf Stufen variiert werden. [180, 298]

Beide Variationsmöglichkeiten wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

### **3.1.2 Auswertung der statistisch geplanten Versuche mittels der Software Design Expert**

Aus den statistisch geplanten Versuchen werden mit Hilfe von Regressionsanalysen mathematische Modelle gebildet. Je nach dem wie die Zusammenhänge der untersuchten Variablen sind, ergeben sich unterschiedliche Modelle. Beispielsweise können aufgrund der Versuchsplanung aus einer faktoriellen Versuchsplanung mit 2 Stufen nur lineare Modelle (bzw. lineare Modelle mit Interaktionen) gebildet werden. Haben die untersuchten Variablen aber gar keinen Zusammenhang, oder sind die Versuchsfehler zu groß, so können keine oder nur nicht-signifikante Modelle gebildet werden. RSM-Pläne sind in der Regel so angelegt, dass quadratische Modelle erreicht werden. Jedoch ist auch das nur möglich, wenn die Zusammenhänge entsprechend sind bzw. die Versuchsfehler klein genug sind. Wie die Modelle mathematisch erstellt werden, ist in der Fachliteratur dargestellt [180, 298]. Die Güte der Modelle, d. h. wie gut die Kurven durch die gemessenen Werte der einzelnen Versuchskombinationen gelegt werden können, wird durch eine Reihe von statistischen Kennzahlen dargestellt. Nur wenn diese festgelegte Kriterien erfüllen, stellt das Modell eine gute Näherung der Zusammenhänge dar. Auch wenn die Berechnungen der Modelle durch die Software erfolgen, so sind einige Entscheidungen im Laufe der Modellbildung durch den Bediener zu treffen. Im Detail ist dieser Prozess bei MONTGOMERY [180] beschrieben, eine schematische Vorgehensweise mit den wichtigsten Kennzahlen, die zu beachten sind, kann dem Handbuch der Softwarefirma entnommen werden [142]. Die Vorgehensweisen der vorliegenden Arbeit werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

### 3.1.2.1 Auswertung der Faktorielle Versuchsplanung mit 2 Stufen

Nicht alle Variablen, die in einer Untersuchung variiert werden, haben immer auch einen Einfluss auf die Zielgröße. Für die Genauigkeit des Modells ist es wichtig, dass nur wirklich die Einflussgrößen berücksichtigt werden, die tatsächlich einen Einfluss haben. Für faktorielle Modelle wird die Auswahl der relevanten Einflussgrößen über eine Grafik durchgeführt. In diesem so genannten Halb-Normal-Plot ist der Effekt, den die einzelnen Faktoren (und deren Interaktionen) auf die Zielgröße haben (berechnet über die Methode der kleinsten Quadrate), der kumulierten Wahrscheinlichkeit gegenübergestellt. Sind die Effekte der Einflussgrößen normalverteilt, liegen alle Werte auf einer Linie. Normalverteilt heißt, dass alle Einflüsse lediglich zufälliger Natur sind. Hat eine Einflussgröße einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße, so liegt der Wert nicht auf der Linie, die die Normalverteilung repräsentiert. Manuell werden in der Grafik nun die Faktoren markiert, die nicht auf dieser Linie liegen. Bei dieser Auswahl sollte das Prinzip der Hierarchie beachtet werden. Dieses Prinzip besagt, dass ein Modell mit einem signifikanten höheren Term (z. B. die Interaktion AB) auch alle niederen Terme enthalten muss (in dem Fall A und B), auch wenn diese selber nicht signifikant sind. Dieses Prinzip ist wichtig für das Modell, wobei es Statistiker gibt, die es nicht für entscheidend halten [180].

Im nächsten Schritt wird die Varianzanalyse (Analysis of Variance = ANOVA) für das Modell betrachtet, welches mit den gewählten Faktoren gebildet worden ist. In Abb. 3.5 ist der Hauptteil der ANOVA-Daten, die die Software für einen Zusammenhang ausgegeben hat, dargestellt. Jeder angegebene Wert besitzt eine Relevanz, jedoch werden im Folgenden nur die Werte betrachtet, die am wichtigsten für die Beurteilung des Modells sind. Für weitergehende Informationen wird auf die Fachliteratur verwiesen [180, 298].

Die Werte, die zunächst relevant sind, wurden unterstrichen. Das vorliegende Modell (Zeile „Model“ in der Spalte „Source“) soll signifikant sein, dieses wird über den F-Test ermittelt (p-Value). Dieser Wert gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Term (in diesem Fall das gesamte Modell) mit einem in der Spalte davor notierten F-Wert keinen signifikanten Effekt hat. Liegt der p-Wert unter 0,05, gilt der Term als signifikant. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Modell mit diesem F-Wert nicht signifikant ist, liegt unter 5 %. Im vorliegenden Fall liegt der p-Wert mit 0,0034 darunter, und damit ist das Modell signifikant. Der F-Wert gibt das Verhältnis der

Varianz des Modells zur Varianz der Residuen (sozusagen der Fehler) an. Anschaulich heißt dieses, dass bei nahezu gleich großen Varianzen (Wert geht gegen 1) der Fehler im Modell genauso groß wie der eigentliche Effekt des Modells ist. Damit ist das Modell nicht verwendbar. Die Bedeutung des F-Wertes und des p-Wertes sind ebenfalls auf die Terme übertragbar, die in das Modell eingehen (hier A, B, C und AC). Wie an den p-Werten zu erkennen ist, wurden durch die Auswahl im Halb-Normal-Plot alle nicht signifikanten Terme entfernt (hier AB und BC), wobei der Term AC über 0,05 liegt. Jedoch wird in der Regel bei der Auswahl der Terme, die in das Modell eingehen, ein p-Wert kleiner 0,10 zugrunde gelegt.

Gärzeit bis Es 4%					
ANOVA for selected factorial model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
<u>Model</u>	1495.58	4	373.90	18.33	<u>0.0034</u>
A-Temperatur	480.50	1	480.50	23.55	0.0047
B-Hefegabe	612.50	1	612.50	30.02	0.0028
C-Belüftung	144.50	1	144.50	7.08	0.0448
AC	112.50	1	112.50	5.51	0.0657
<u>Curvature</u>	34.67	2	17.33	0.85	<u>0.4812</u>
Residual	102.00	5	20.40		
<u>Lack of Fit</u>	57.50	3	19.17	0.86	<u>0.5767</u>
Pure Error	44.50	2	22.25		
Cor Total	1632.25	11			
Std. Dev.	4.52			R-Squared	0.9362
Mean	52.25			Adj R-Squared	0.8851
C.V. %	8.64			Pred R-Squared	0.6326
PRESS	586.89			<u>Adeq Precision</u>	<u>12.030</u>

**Abb. 3.5: Varianzanalyse eines faktoriellen Versuchsmodells mit 2 Stufen**

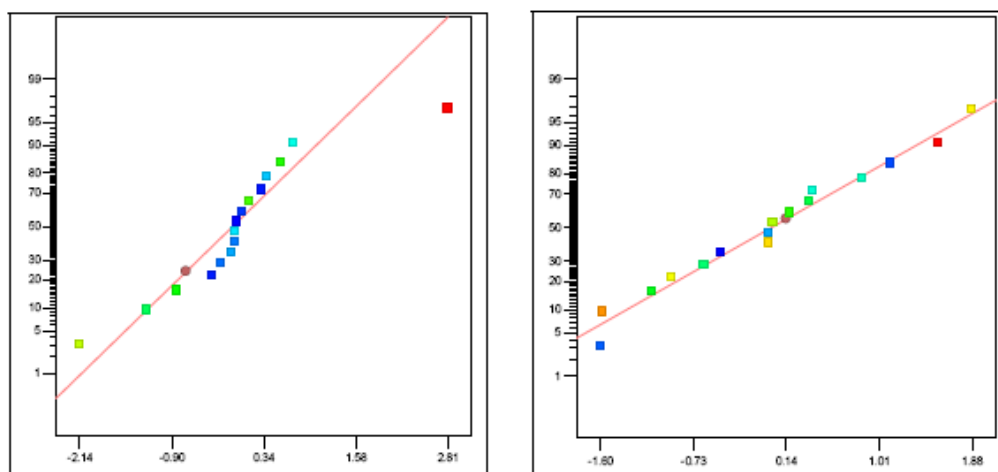
Für die faktoriellen Modelle sollten als nächstes die Parameter „Curvature“ und „Lack of Fit“ überprüft werden. Die Curvature (nur bei faktoriellen Modellen mit Zentralpunkten) vergleicht die durchschnittlichen Werte der faktoriellen Punkte mit den durchschnittlichen Werten der Zentralpunkte. Dadurch wird getestet, ob der Verlauf zwischen den faktoriellen Stufen tatsächlich linear ist, oder nicht. Für die Curvature sollte der p-Wert nicht-signifikant sein, da sonst kein linearer Zusammenhang vorliegt. Für das obige Beispiel liegt ein linearer Verlauf vor (p-Wert = 0,4812).

Die Kennzahl „Lack of Fit“ beschreibt die Streuung der erzielten Daten um das gebildete Modell. Unterscheidet sich die Streuung der Versuchspunkte um das Modell deutlich von der Streuung der Mehrfachbestimmungen, so wird dieser Wert signifikant

und damit stimmen Modell und gefundene Werte nicht gut überein. Daher sollte der p-Wert für den Lack-of-Fit-Wert über 0,1 (nicht-signifikant) sein, was im obigen Beispiel erreicht wird.

Als weitere wichtige Kennzahl sollte die „Adeq Precision“ (Adäquate Genauigkeit) größer als 4 sein. Mit dieser Kennzahl wird das Verhältnis des Signals zum Rauschen dargestellt. Dabei werden die durchschnittlichen Modellwerte an den Versuchspunkten mit dem durchschnittlichen Modellfehler verglichen. Mit einem Wert von 12,03 liegt der Beispielswert über 4.

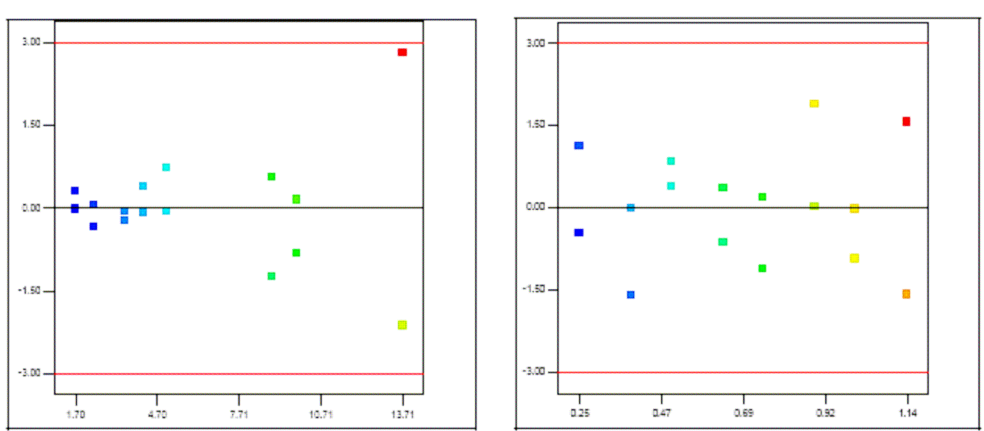
Mit diesen Kennzahlen ist die Güte eines Modells zunächst statistisch gekennzeichnet. Auch wenn das Modell nach diesen Vorgaben signifikant ist, müssen noch weitere Faktoren überprüft werden. Die Varianzanalyse geht davon aus, dass einige Voraussetzungen erfüllt sind, wie beispielsweise die Normalverteilung der Residuen, oder dass keine Ausreißer vorliegen. Dieses wird über eine Residuenanalyse untersucht. Residuen ( $r_i = y_i - \hat{y}_i$ ) sind die Abweichungen zwischen den gemessenen Werten ( $y_i$ ) und den an dieser Stelle durch das Regressionsmodell geschätzten Werten ( $\hat{y}_i$ ) [298]. Da die Residuen für jede Zielgröße oder jedes Experiment anders sein können, werden diese zum besseren Vergleich normiert. Dafür werden sie durch ihre Standardabweichung geteilt. Dieser Vorgang wird auch „studentisieren“ genannt und in den Grafiken im englischen als „studentized Residuals“ bezeichnet. Im Folgenden werden exemplarisch einige davon dargestellt.



**Abb. 3.6 a+b:** Darstellung von Normal-Plots (Test auf Normalverteilung von Residuen eines Modells) [142]

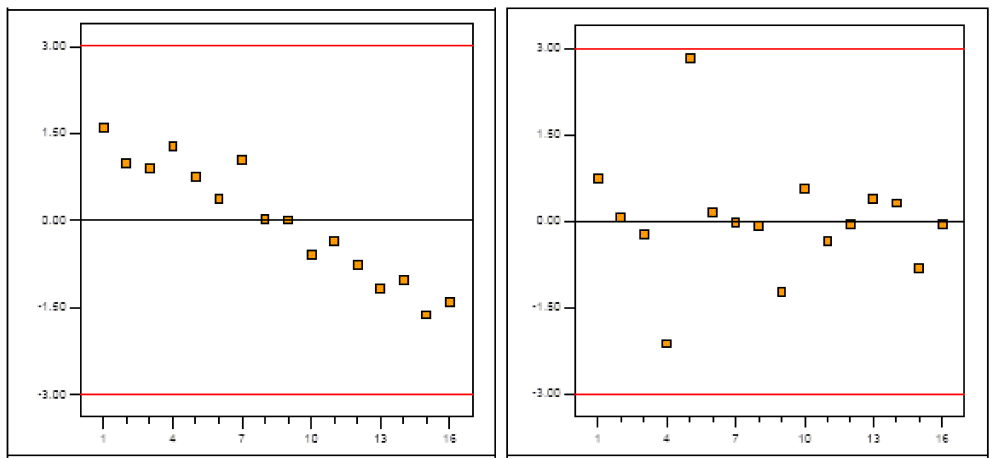
Die Residuen für das Modell müssen normalverteilt sein, da die Berechnungen der Varianzanalyse nur dann Gültigkeit haben. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgt mittels eines Normal-Plots. Dieser ist vergleichbar mit dem Halb-Normal-Plot, wobei die kumulierte Wahrscheinlichkeit (Abb. 3.6, y-Achse) anders aufgetragen wird. Diese wird den studentisierten Residuen gegenüber gestellt (Abb. 3.6, x-Achse). Dabei befinden sich die normalverteilten Residuen auf einer Linie. In Abb. 3.6a liegt eine starke S-förmige Verteilung vor und mehrer Punkte liegen deutlich von der Linie entfernt. Daher liegt hier keine Normalverteilung vor. Leichte S-förmige Verteilungen sind jedoch häufig und stellen kein Problem dar [180]. Abb.3.6b zeigt eine gute Normalverteilung der Residuen.

Abb. 3.7 (a+b) zeigt die Gegenüberstellung der studentisierten Residuen (y-Achse) zu den geschätzten Werten des Regressionsmodells (x-Achse). Hier ist es wichtig, dass die Residuen wahllos verteilt sind (Abb. 3.7b). Eine systematische Verteilung (Trichterförmig) wie in Abb. 3.7a zeigt an, dass die Abweichungen zwischen Modell und erzielten Werten mit steigenden Werten für den Zielwert ebenfalls ansteigen. Daher liegt ein systematischer Fehler vor und das Modell muss verworfen werden.



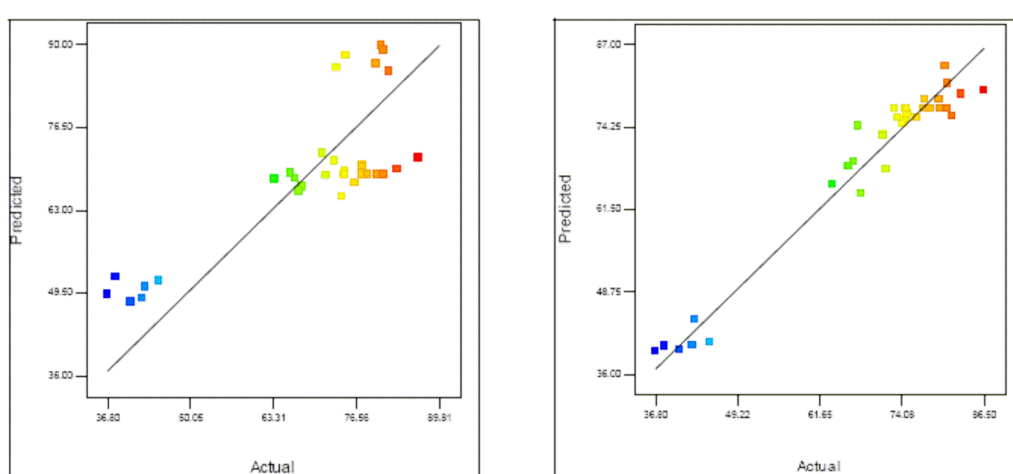
**Abb. 3.7 a+b: Auftragung der Residuen gegen die geschätzten Werte [142]**

Die Residuen sollten ebenfalls wahllos (Abb. 3.8, y-Achse) verteilt sein, wenn sie in der Reihenfolge der durchgeführten Versuche aufgetragen werden (Abb. 3.8b). Zeigen die Residuen mit dem Verlauf der durchgeführten Experimente einen Trend (Abb. 3.8a), so ist davon auszugehen, dass sich äußere Einflussfaktoren geändert haben (z. B. die Gärtemperatur in einer Pilotanlage ist unbekannter Weise von der Außentemperatur abhängig und im Zeitraum der Versuche ging diese immer mehr zurück). Damit muss das Modell ebenfalls verworfen werden.



**Abb. 3.8 a+b: Auftragung der Residuen gegen die Reihenfolge der Durchführung [142]**

Eine weitere hilfreiche Grafik, bei der nicht die Residuen betrachtet werden, ist die Darstellung der gemessenen Werte gegen die durch das Regressionsmodell geschätzten Werte. In dieser Darstellung sollten die Punkte wahllos entlang einer 45° Linie verteilt sein (Abb. 3.9b). Sind Gruppen von Punkten unter oder über der Linie zu finden (Abb. 3.9a), deutet dieses auf Bereiche hin, in denen Werte durch das Modell über bzw. unterschätzt werden.



**Abb. 3.9 a+b: Auftragung der Modellwerte gegen die tatsächlichen Werte [142]**

Im Weiteren werden andere Tests grafisch dargestellt. So werden mögliche Ausreißer mittels eines Ausreißer-T-Test identifiziert, die Residuen über die einzelnen Faktoren aufgetragen. Über die so genannte „Cook’s Distanz“ wird bestimmt, wie sehr sich die Modellkoeffizienten ändern, wenn einzelne Versuchsergebnisse ignoriert würden. Außerdem wird der „Leverage“, also der Hebel, bestimmt, den einzelne Versuchsergebnisse auf das Modell haben. Zudem wird ermittelt, inwieweit eine



Datentransformation (z. B. logarithmieren der Daten) ein besseres Regressionsmodell ergeben kann.

Für die Darstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden die wichtigen ANOVA Daten mit angegeben. Ebenso wird darauf hingewiesen, wenn sich aus der Residuenanalyse Besonderheiten ergeben.

Die in Abb. 3.5 dargestellten F-Werte für die Terme des Modells, beinhalten einen sehr interessanten Aspekt. Je größer diese sind, umso größer ist sozusagen der Effekt dieses Terms auf die Zielgröße gegenüber dem Fehler des Modells. Das heißt, umso relevanter sind sie. Anhand der F-Werte der einzelnen Terme kann nun eine Aussage getroffen werden, welcher Faktor in dieser Versuchskombination den größten Einfluss auf die Zielgröße hat. In dem Modell aus Abb. 3.5 hat der Faktor B (Hefegabe) den größten Effekt auf die Gärzeit gefolgt von Faktor A (Temperatur). Für den praxiserfahrenen Brauer klingt dieses zunächst unlogisch, da die Temperatur in der Regel den größten Effekt auf die Gärzeit hat. Aber hier ist zu beachten, dass die Hefegabe zwischen 10 und 20 Mio. Zellen/ml variiert wurde, die Temperatur nur zwischen 13 und 15 °C. Bei diesen Variationen der Faktoren ist es logisch, dass die Hefegabe einen größeren Effekt hat.

#### **3.1.2.2 Auswertung der Response Surface Methodology**

Die Auswertung von Versuchen, die mittels RSM geplant worden sind, verläuft im Allgemeinen wie die der faktoriell geplanten Versuche. Aufgrund der komplexeren Modelle gibt es jedoch einige abweichende Schritte. In Abb. 3.10 sind die Schritte der Modellbildung und Evaluierung schematisch dargestellt.

Bei den faktoriellen Modellen mit 2 Stufen wurden als erstes die relevanten Terme für die Modellbildung ausgewählt. Bei den RSM-Modellen muss als erster Schritt die Art des Modells gewählt werden, welches gebildet werden soll. RSM-Versuchspläne sind darauf ausgelegt, quadratische Modelle zu bilden, jedoch kann es sein, dass sich aus den Versuchsdaten keine passenden quadratischen Modelle bilden lassen. Daher werden in einer speziellen Bildschirmauswahl (Fit-Summary) alle möglichen Modelle mit ihren statistischen Daten dargestellt. Dabei wird einmal die Signifikanz der Modelle (p-Werte) über die Summe der Quadrate ermittelt. Außerdem wird noch der

„Lack-of-Fit“ für alle Modelle ausgegeben, sowie andere zusammenfassende statistische Werte.

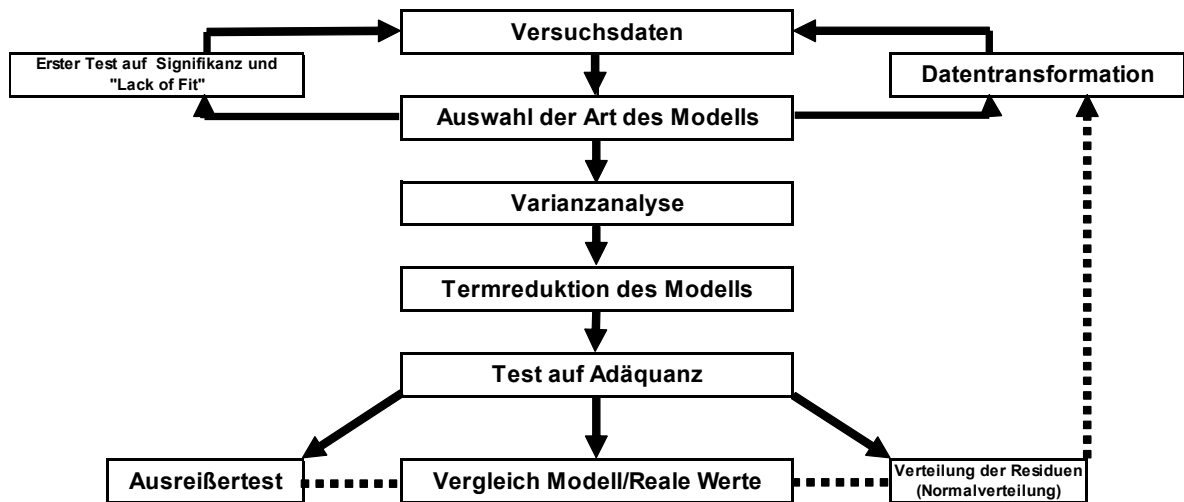


Abb. 3.10: Schematischer Ablauf der Modellbildung und Evaluation von RSM-Modellen [48]

Ausgewählt werden sollte dabei das Modell mit dem höchsten Polynom, das noch einen signifikanten p-Wert ( $<0,05$ ) aufweist und dazu einen möglichst nicht-signifikanten Lack-of-Fit besitzt. Daneben sollte das gewählte Modell hohe  $r^2$ -Werte (Adjusted R-Squared und Predicted R-Squared) besitzen. Die Software macht dazu Vorschläge, welches Modell bei den vorliegenden Werten am günstigsten ist.

Als nächstes wird die Varianzanalyse des gewählten Modells betrachtet. Sind viele nicht signifikante Terme vorhanden, sollte das Modell reduziert werden. Dieses kann im Programm manuell oder automatisch durchgeführt werden. Die Reihenfolge in der die nicht-signifikanten Terme entfernt werden, ist wichtig, da sich mit jeder Eliminierung das Modell ändert. Hierzu gibt es verschiedene Ansätze. Im vorliegenden Fall wurde immer eine automatische rückwärtsgerichtete Eliminierung gewählt, da diese Methode als die robusteste gilt, wobei als Grenze ein p-Wert von 0,1 gewählt wurde.

Den Daten der ANOVA für eine Beispielauswertung (Abb. 3.11) ist zu entnehmen, dass das Modell und alle verbleibenden Terme signifikant sind (p-Wert  $< 0,05$ ). Es liegt ein deutlich nicht-signifikanter Lack-of-Fit vor und die Adeq Precision liegt über dem Wert 4. Für RSM-Modelle haben die  $r^2$ -Werte (Bestimmtheitsmaß des Regressionsmodelles) eine wichtigere Bedeutung als bei den faktoriellen Modellen mit zwei Stufen. Die  $r^2$ -Werte sollten so nahe wie möglich an den Wert 1

herankommen, wobei es wichtiger ist, dass der Unterschied zwischen „Adj R-Squared“ und „Pred R-Squared“ nicht größer ist als 0,2. Die Werte für das unten gezeigte Modell zeigen, dass es sich um ein sehr gutes Modell handelt.

Gärzeit bis Es 4%

Transform: Base 10 log Constant: 0

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model  
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Square	DF	Mean Square	F-Value	Prob > F
Model	5.91	11	0.54	330.69	< 0.0001
A	1.46	1	1.46	901.65	< 0.0001
B	0.17	1	0.17	105.93	< 0.0001
C	2.47	1	2.47	1521.96	< 0.0001
D	0.047	1	0.047	28.77	< 0.0001
E	0.041	1	0.041	25.21	< 0.0001
B <sup>2</sup>	0.044	1	0.044	27.00	< 0.0001
C <sup>2</sup>	0.079	1	0.079	48.68	< 0.0001
AC	0.014	1	0.014	8.35	0.0071
AD	8.058E-003	1	8.058E-003	4.96	0.0336
BD	0.023	1	0.023	14.00	0.0008
DE	5.323E-003	1	5.323E-003	3.28	0.0802
Residual	0.049	30	1.624E-003		
Lack of Fit	0.036	22	1.644E-003	1.05	0.5045
Pure Error	0.013	8	1.567E-003		
Cor Total	5.96	41			

Std. Dev.	0.040	R-Squared	0.9918
Mean	1.98	Adj R-Squared	0.9888
C.V.	2.04	Pred R-Squared	0.9849
PRESS	0.090	Adeq Precision	68.302

**Abb. 3.11: Varianzanalyse eines reduzierten quadratischen RSM-Modells**

Die F-Werte lassen, ebenso wie bei den faktoriellen Modellen, einen Rückschluss auf den Einfluss der einzelnen Faktoren auf die Zielgröße zu. Für die dargestellte Gärzeit hat Faktor C (Gärtemperatur) den größten Einfluss vor A (Stammwürze) und B (Hefegabe), wobei die Höhe der Einflüsse deutlich unterschiedlich ist.

Die Residuenanalyse erfolgt nach den gleichen Kriterien, wie sie bereits für die faktorielle Modellbildung dargestellt wurde. Bei den RSM-Modellen spielt die Transformation der Daten eine sehr wichtige Rolle. Für diese Funktion gibt die Software über einen so genannten Box-Cox-Graphen eine entsprechende Empfehlung, welche Transformation zu wählen ist. Wird eine Transformation durchgeführt, beginnt der Modellbildungsprozess von vorne.

Die Software besitzt Funktionen zur graphischen Darstellung der resultierenden Modelle. Es können 3-dimensionale Graphen, Interaktionsgraphen und ähnliche Darstellungen gewählt werden. Aufgrund der Anschaulichkeit werden im Ergebnis teil

in erster Linie Graphen benutzt, die mit Microsoft Excel erstellt wurden. Zu Erstellung dieser Graphen wurde die in der ANOVA-Darstellung angegebene mathematische Gleichung für das Modell benutzt und in Excel übertragen.

### **3.2 Routineanalysen**

#### **3.2.1 Chemisch-Technische Analysen**

##### **3.2.1.1 Würzeanalysen**

Die Würzen wurden auf folgende Analysenmerkmale hin untersucht:

- Extraktgehalt
- pH-Wert
- freier Aminostickstoff

##### **Extrakt und pH**

Die Extraktgehalte wurden mit Messsystemen der Firma Anton Paar (Density Meter DMA 4500 bzw. Density Meter DMA 5000) und die pH-Werte mit handelsüblichen pH-Metern bestimmt.

##### **Freier Aminostickstoff**

Die Bestimmung des freien Aminostickstoff wurde gemäß den Vorschriften der MEBAK durchgeführt [170].

##### **3.2.1.2 Bieranalysen**

Die Biere wurden auf folgende Analysenmerkmale hin analysiert:

- Extraktgehalt
- Alkoholgehalt
- pH-Wert
- freier Aminostickstoff
- Schaum
- Schwefeldioxid
- Reduktionsvermögen

#### **Extrakt, Alkohol und pH**

Die Extraktgehalte und Alkohol wurden mit Messsystemen der Firma Anton Paar (Density Meter DMA 4500 bzw. Density Meter DMA 5000 + AlcoLyzer Beer) und die pH-Werte mit handelsüblichen pH-Metern bestimmt.

#### **Freier Aminostickstoff**

Die Bestimmung des freien Aminostickstoffs wurde gemäß den Vorschriften der MEBAK durchgeführt [170].

#### **Schaum**

Die Schaumbestimmung erfolgte mit zwei Systemen. Es kamen die Gerät Lg-Foamtester der Firma Lg-automatic (Frederiksvaerk, Dänemark) und ein NIBEM-Foam Stability Tester der Firma Haffmans B.V. (Venlo, Niederlande) zum Einsatz. Beide Geräte sind bei POTRECK [223] bzw. MEBAK [170] beschrieben.

#### **Schwefeldioxid**

Schwefeldioxid wurde mit einer Applikation auf einem Automatic Wet Chemistry Analyzer der Firma SKALAR durchgeführt. Bei der Methode wird durch Ansäuern und Temperierung der Probe auf 90 °C gebundenes SO<sub>2</sub> freigesetzt. Gasförmiges SO<sub>2</sub> wird dialysiert und in Formaldehydlösung aufgefangen. Hier reagiert das SO<sub>2</sub> mit para-Rosanilin zu einem roten Komplex, dessen Extinktion bei 560 nm bestimmt wird. In der Originalmethode wird das Ansäuern mit Schwefelsäure durchgeführt. Untersuchungen zeigten jedoch, dass dadurch deutlich höhere SO<sub>2</sub>-Werte gemessen werden als mit der Bezugsmethode (Destillation) nach MEBAK [87]. Daher wurde die Methode modifiziert, wobei die Ansäuerung durch ortho-Phosphorsäure erfolgt.

#### **Reduktionsvermögen**

Das Reduktionsvermögen wurde spektralphotometrisch nach MEBAK mittels Tannometer gemessen [170]. Dabei wird die Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-Indophenol über eine Minute verfolgt. Die Angabe erfolgt in Prozent, dabei werden Werte größer 60 % als sehr gut und Werte kleiner 45 % als schlecht beurteilt.

### 3.2.2 Zellzahl und Hefeviabilität

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Haemocytometers (Thomakammer) bestimmt und der Tot-Anteil der Hefepopulationen (Hefeviabilität) wurde durch Methylenblaufärbung ermittelt. Als Farbstofflösung kam eine citratgesäuerte Lösung nach BACK [17] zum Einsatz. Dabei wurde jedoch der Farbstoff im Verhältnis 1:10 (Hefesuspension:Farbstoff) eingesetzt und nicht im Verhältnis 1:2.

### 3.2.3 Gaschromatographische Analysen

Die Biere wurden auf folgende gaschromatographische Merkmale hin analysiert:

- Vicinale Diketone
- Höhere Alkohole und Ester
- Bieraromastoffe
- Alterungskomponenten

#### **Vicinale Diketone**

Die Bestimmung der vicinalen Diketone (Diacetyl und 2,3-Pentandion) erfolgte gemäß der Vorschrift nach MEBAK [219]. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Headspace-Methode, bei der durch eine vorhergehende Hitzebehandlung (65 °C; 1,5 h) alle Vorläufersubstanzen in die korrespondierenden vicinalen Diketone umgewandelt werden. Die Bestimmung erfolgt via GC-ECD.

#### **Höhere Alkohole und Ester**

Die Bestimmung der höheren Alkohole und Ester wurden gemäß einer Methode von THUM [262] bestimmt. Dabei handelt es sich um eine Headspace-Methode mit einer Bestimmung durch GC-FID. Die Methode wurde ausführlich von KALTNER [129] beschrieben.

#### **Bieraromastoffe**

Die Bieraromastoffe wurden gemäß einer hausinternen Vorschrift bestimmt, die mit einigen Modifikationen der Analyse der wasserdampfvlüchtigen Würze aromastoffe entspricht [153]. Die modifizierte Probenaufbereitung wird wie folgt durchgeführt:

- 100 ml Bier wird mit 1 ml interner Standardlösung und einer berechneten Menge Ethanol p.a. versetzt, sodass insgesamt 10 ml Ethanol in der Probe enthalten sind.
- Quantitatives Überführen der Probe unter Zugabe von Antischaumreagenz in das Destillationsglas und Überdestillieren von 100 ml Destillat in einem in Eis gekühlten Messkolben.
- Von diesen 100 ml werden nach kräftigem Durchmischen 80 ml mit 20,0 g NaCl und 1 g H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sowie mit 0,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (destilliert) versetzt und in einem Zentrifugenglas 30 Minuten geschüttelt.
- Anschliessend wird 15 Minuten bei 2700 U/min zentrifugiert.
- Von den getrennten Phasen wird die untere organische gewonnen und chromatographisch via GC-FID analysiert.

#### **Alterungskomponenten**

Die Bestimmung der Alterungskomponenten wurde ebenfalls gemäß einer hausinternen Vorschrift bestimmt [129]. Die Probenaufbereitung erfolgt dabei durch eine Wasserdampfdestillation mit anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Dichlormethan und einem anschließendem Einengen durch Stickstoffbegasung. Die chromatographische Bestimmung erfolgte via GC-FID.

Die Alterungskomponenten wurden im frischen und im forciert gealterten Bier bestimmt.

#### **3.2.4 Elektronenspinresonanz-Spektrometrie (ESR)**

Für die ESR-Spektrometrie wurde ein e-Scan Gerät der Firma Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland) verwendet. Die Biere wurden auf folgende Analysenmerkmale hin analysiert:

- Lag-Time
- Antiradikalisches Verhalten (ARV)
- Antiradikalisches Potential (ARP)

#### **Endogene antioxidative Aktivität (Lag-Time)**

Die Lag-Time Bestimmung erfolgte nach einer Methode von UCHIDA et al. [273]. Für die Messung wird der Probe (Bier) das Spin-Trap Reagenz N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN) zugegeben. Die Probe wird einem oxidativen Forciertest bei

60 °C unterzogen. Die sich bildenden Radikale reagieren mit dem PBN zu stabilen Addukten, welche in regelmäßigen Abständen am ESR gemessen werden. Die Zeit, bis die Radikalgenerierung stark ansteigt, wird als Lag-Time bezeichnet und mittels zweier Regressionsgraden ermittelt [87].

### **Antiradikalisches Verhalten (ARV)**

Neben der Bestimmung der Lag-Time ist die Menge an Hydroxylradikalen, die im Verlaufe des oxidativen Forciertests mit PBN entstehen eine wichtige Größe. Zur Untersuchung dieser Aktivität wird die Fläche unter der Lag-Time Kurve bis zu einer Zeit von 120 min. integriert. Je geringer die Fläche ist, desto weniger Radikale wurden gebildet und desto größer ist die antiradikalische Aktivität. Diese Fläche wird über die folgende Gleichung in ein Verhältnis zu einem Nullbier gesetzt, welches kein antiradikalisches Verhalten aufweist [88]:

$$\text{Antiradikalisches Verhalten [\%]} = \frac{\text{Fläche des Nullbiers} - \text{Fläche unter der Kurve}}{\text{Fläche des Nullbiers}} \times 100$$

### **Antiradikalisches Potential**

Für die Messung des antiradikalische Potentials wird die Reduktion des stabilen freien Radikals 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydracyl (DPPH) durch die Probe über eine Zeit von 10 min. mittels ESR verfolgt. Zur Beurteilung wird die Fläche oberhalb der entstehenden Kurve in ein Verhältnis zur Gesamtfläche nach folgender Formel gesetzt [88]:

$$\text{Antiradikalisches Potential [\%]} = \frac{\text{Gesamtfläche} - \text{Fläche unter der Kurve}}{\text{Gesamtfläche}} \times 100$$

## **3.3 Sensorische Analysen**

### **3.3.1 Alterungsverkostung nach EICHHORN**

Bei der Alterungsverkostung nach EICHHORN werden nur die Aromaeindrücke bewertet, die durch die Alterung von Bier entstehen. Andere Aromaeindrücke und insbesondere Eindrücke, die bei Bier als Fehlgerüche eingeordnet werden, gehen nicht in die Bewertung ein. Zu den Alterungseindrücken gehörten unter anderem Oxidationsgeschmack, beerenartiges Aroma, so genanntes Cardboard-Aroma und



eine sherryartige Note. Die Alterung wird in den Kategorien Geruch, Trunk und Bittere nach folgender Skala in Halbnotenschritten beurteilt [75]:

**Tab. 3.1: Alterungsskala nach EICHHORN**

Alterungsskala nach EICHHORN	
1 = frisch	3 = stark gealtert
2 = leicht gealtert	4 = extrem gealtert

Zusätzlich wird von den Prüfern noch die Akzeptanz des Bieres in Prozent beurteilt. Die Akzeptanz bezieht sich nur auf die Alterung. Deren Beurteilung erfolgt in 20 % Schritten. Eine Gesamtnote der Alterung ergibt sich aus den Noten der Einzelkriterien (Geruch, Trunk und Bittere), wobei Geruch und Trunk mit dem Faktor zwei in die Wertung eingehen. Die Verkostung erfolgte im frischen und im forciert gealterten Bier (Abschnitt 3.4). An den Verkostungen nahmen mindesten 6 geschulte Verkoster teil.

### 3.4 Forcierte Alterung

Um eine Alterung der Biere über etwa 3 Monate zu simulieren, wurden die Biere nach Lehrstuhlmethod 24 h geschüttelt und 4 Tage bei 40 °C im Dunkeln aufbewahrt.

### 3.5 Hefevitalitätsmessungen

#### 3.5.1 Intrazellulärer pH-Wert (ICP)

Die ICP-Methode wurde nach der Vorgehensweise von IMAI [21, 124] durchgeführt. Dazu werden 2 ml abzentrifugierte Hefe (3000 U/min., 3 min., 2 °C) zweimal mit 50 mM Citronensäure / 50 mM Natriumhydrogenphosphat-Puffer (pH 3,0 mit 110 mM NaCl, 5 mM KCl und 1 mM MgCl<sub>2</sub>) (=Puffer A) gewaschen. Nach jedem Waschen wird die Hefe abzentrifugiert. Nach dem Waschen wird die Hefe wieder mit kaltem Puffer A (0 °C) auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt und es werden 0,3 ml von einer 10 mM 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Lösung (CF-DA) in Dimethylsulfoxid hinzugefügt und sofort 1 min. lang kräftig geschüttelt. Die Mischung wird 30 min. auf Eis aufbewahrt. Nach 15 min. wird die Mischung noch einmal aufgemischt. Die mit CF-DA geladene Hefe wird dreimal mit kaltem Puffer A gewaschen. Nach dem Waschen wird die Hefe mit Puffer A auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt.

Von der Mischung werden 0,3 ml zu 8 ml kaltem Puffer A hinzugefügt (im Doppelansatz). Nach dem Zentrifugieren wird die sedimentierte Hefe mit kaltem Puffer A zweimal gewaschen und wieder mit 8 ml des Puffers vermischt.

Diese Mischung wird 90 min. lang auf Eis aufbewahrt (alle 30 min. wird die Hefesuspension geschüttelt). Nach erneutem Zentrifugieren wird die sedimentierte Hefe wieder mit 3,0 ml Puffer A (Raumtemperatur) vermischt. Die erhaltene Mischung wird in einem Fluoreszenzspektrometer bei einer Emissions-Wellenlänge von 518 nm und Anregungs-Wellenlängen von 441 nm und 488 nm gemessen.

#### **Bestimmung des Intrazellulären pH-Wertes**

Für die Kalibrierung werden Pufferlösungen mit 5(6)-Carboxyfluorescein auf unterschiedliche pH-Werte (im Bereich von pH 6,4 bis pH 4,8 in 0,2 pH-Schritten) eingestellt (Herstellung wie Puffer A). Die Lösungen werden mit denselben Einstellungen wie die Hefeproben fluoreszenzphotometrisch gemessen. Durch die logarithmische Auftragung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten als Funktion des pH-Wertes ergibt sich eine Kalibrierkurve, aus welcher der intrazelluläre pH-Wert abgelesen werden kann.

#### **3.5.2 Intrazellulärer pH-Wert mittels modifizierter Methode (SICP)**

Die Methode wurde auf Basis der Methode von IMAI entwickelt [260]. Daher werden ebenfalls 2 ml abzentrifugierte Hefe (3000 U/min., 3 min., 2 °C) 3-mal mit 8 ml kaltem Puffer A (siehe 3.4.1) gewaschen. Die abzentrifugierte Hefe wird mit kaltem Puffer A auf 3,5 ml aufgefüllt, mit 0,3 ml einer 10 mM CF-DA-Lösung versetzt und sofort 1 min. lang kräftig geschüttelt. Daraufhin werden jeweils 0,25 ml der Mischung in 8 ml Puffer A gegeben (Doppelansatz) und diese direkt bei 30 °C für 15 min. in einem Wasserbad inkubiert.

Anschließend wird die Suspension abzentrifugiert und noch 2-mal mit kaltem Puffer A gewaschen. Die abzentrifugierte Hefe daraufhin mit 3 ml Puffer A in Lösung gebracht und direkt gemessen. Die Messung, Kalibrierung und Auswertung erfolgt wie bei der ICP-Methode.

#### **3.5.3 Acidification Power Test**

Die Durchführung und Auswertung des Acidification Power Testes erfolgte nach einer Variante von SIDDIQUE und SMART [250]. Dafür werden 2,5 g abzentrifugierte Hefe

(3000 U/min.; 3 min.) in 7,5 g destilliertem Wasser suspendiert (Konzentration ca.  $1 \times 10^9$  Zellen/ml). Das destillierte Wasser für die APT-Untersuchungen wird auf einen pH-Wert von 6,3 eingestellt. Zu 19 ml destillierten Wasser wird 1 ml der konzentrierten Hefesuspension ( $1 \times 10^9$  Zellen/ml) zugegeben und 10 min mittels eines Magnetrührers gerührt. Alle 2 min wird der pH-Wert notiert. Direkt nach dem Notieren des  $AP_{10}$  (pH-Wert nach 10 min) werden 5 ml einer 20,2 %igen Glucoselösung zugegeben. Der pH-Wert wird für weitere 10 min verfolgt. Nach Ablauf dieser Zeit wird der End-pH-Wert notiert ( $AP_{G, 20}$ ). Die Glucose-Acidification-Power (GAP) wird durch Subtrahieren des  $AP_{G, 20}$  vom Anfangs-pH-Wert (pH-Wert = 6,3) berechnet.

In einem weiteren Versuch wird die Wasser-Acidification-Power (WAP) ermittelt. Dieses erfolgt genauso wie die GAP-Messung, jedoch wird die 20,2 %igen Glucose-Lösung durch 5 ml steriles, destilliertes Wasser (pH-Wert = 6,3) ersetzt. Der WAP-Wert wird durch Subtrahieren des  $AP_{W, 20}$  vom Anfangs-pH-Wert (pH-Wert = 6,3) berechnet.

Anschließend wurde der GIPE-Wert (Glucose-Induced-Proton-Efflux) durch Subtrahieren des WAP vom GAP berechnet.

#### 3.5.4 Vitaltitration

Für die Vitaltitration werden nach RODRIGUES et al. [233] ca. 7 g Hefe 4-mal mit kaltem dest. Wasser gewaschen. Von der zentrifugierten Hefe werden 2,5 g davon in 200 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung bei 27 °C suspendiert. Mit einem Magnetrührer wird die Hefe bei ca. 1500 U/min in Schwebelage gehalten. Mit einer 0,1M NaOH-Lösung wird die Suspension auf einen pH-Wert von  $10,03 \pm 0,01$  gebracht und die Menge NaOH-Lösung notiert. Ab dem Erreichen des pH-Werts 10,00 wird die Zeitnahme gestartet und der Verlauf notiert. Beim Erreichen eines pH-Wertes von 6,30 wird die Zeit gestoppt. Mit dem Volumen an NaOH und der benötigten Zeit wird die Hefevitalität als „Yeast Metabolic Index“ (mM zugegebener NaOH pro Minute) wie folgt berechnet:

$$YMI = \left[ (konz. NaOH / M) \times (vol. NaOH_{\text{verbraucht}} / L) \times 10^6 \right] / (Zeit \text{ bis Erreichen pH } 6,3 / \text{min})$$

#### 3.5.5 Diacetylreduktion

Für die Messung der Diacetylreduktion nach BOULTON [40] werden 2,5 g abzentrifugierte Hefe (3000 U/min.; 3 min.) mehrfach mit kaltem, dest. Wasser gewaschen. Die Hefe wird in 99 ml 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer, pH 4,0 suspendiert (ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml) und bei 20 °C in einem Wasserbad temperiert und mittels eines

Magnetrührers gerührt. Nach Zugabe von 1 ml frisch hergestellter Diacetylösung (100 ppm) wird die Mischung für 30 min. bei 20 °C unter konstantem Rühren inkubiert. Alle 10 min. werden Proben zur Diacetylbestimmung entnommen, dabei werden die Hefezellen durch sofortiges Zentrifugieren (5000 U/min., 2 min.) abgetrennt. Im Unterschied zur Originalvorschrift wurde der Diacetylgehalt im Überstand nicht photometrisch sondern nach einer 1:10 Verdünnung gaschromatographisch mit einem GC-ECD-System nach MEBAK bestimmt.

#### **3.5.6 Messung der CO<sub>2</sub>-Bildung**

Für die Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Bildung wird in eine 0,33 l (handelsüblich) Bierflasche 100 ml 12 % Würze eingefüllt und ein Magnetrührfisch zugegeben. Dazu werden 10 g abzentrifugierte Hefe (3000 U/min., 3 min.), die in 20 ml dest. Wasser gelöst wurde, gegeben und die Flasche direkt mit einem Kronkorken verschlossen. Nach Aufsatz eines handelsübliches Druckmanometer für Bierflaschen wird der Druckaufbau über 2 h unter Rühren mittels Magnetrührer (500 U/min.) verfolgt.

#### **3.5.7 Hefevitalitätstest auf Basis von Benzoquinon und Tetrazoliumsalz**

Für die Formazanbildung als Indikator der Hefevitalität werden nach TSUKATANI et al. [268] 0,4 ml einer Hefesuspension ( $1 \times 10^9$  Zellen/ml) in 1,6 ml eines 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) gegeben. Dazu werden 0,1 ml einer 5 mM Tetrazoliumsalz (WST-1)/Wasser-Lösung und 0,04 ml einer 12,5 mM 2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-Benzoquinon/Ethanol (puriss.) Lösung gegeben. Diese Lösung wird bei 25 °C für 10 min. inkubiert. Die Suspension wird danach über einen Membranfilter (0,45 µm) filtriert, um die Reaktion zu stoppen. Zu 1,5 ml der filtrierten Lösung werden 0,04 ml einer NaOH-Lösung (0,8 M) gegeben. Das resultierende Formazan wird bei 440 nm mit einem Spektralphotometer gemessen.

### **3.6 Durchführung der Gärversuche**

Für die vorliegende Arbeit wurden vier Versuchsreihen durchgeführt:

- Vergleich von Hefevitalitätsmethoden
- Vergleich von Hefestämmen unter Variation von Gärparametern
- Gärversuch unter Variation von Gärparametern und Hefevitalität
- Versuche im Produktionsmaßstab

### 3.6.1 Vergleich von Hefevitalitätsmethoden

Ziel der Untersuchung war es, Vitalitätsmethoden miteinander hinsichtlich ihrer Aussagekraft über die Gäraktivität unterschiedlicher Hefechargen zu vergleichen.

#### 3.6.1.1 Gezielte Schwächung der Hefe durch Stress

Zur Untersuchung der Vitalitätsmethoden auf ihre Aussagekraft hin ist es notwendig, Hefen mit unterschiedlichen physiologischen Zuständen zur Verfügung zu haben. Um hier vergleichbare Bedingungen zu erreichen, wurden in mehreren Forschungsarbeiten Hefen durch gezielte Stressbehandlungen in unterschiedliche Zustände versetzt [278, 301]. Da kaum ein vergleichbarer Stress erzeugt werden kann, wie er in einer Brauerei vorliegt, werden getrennt verschiedene Stressarten angewendet. Tabelle 3.2 stellt die verwendeten Stressarten der vorliegenden Untersuchungen dar.

**Tab. 3.2: Verwendete Stressarten zur Erzeugung unterschiedlicher Hefezustände**

Stressart	Stressauslöser	Dauer	Temperatur
Nährstoffentzug	Dest. Wasser	1 Tag	24 °C
Nährstoffentzug	Dest. Wasser	3 Tage	24 °C
Ethanol-Stress	10 GG-% Ethanol	1 Stunde	36 °C
Ethanol-Stress	10 GG-% Ethanol	2 Stunden	36 °C
Oxidativer-Stress	0,1 GG-% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 Stunde	24 °C
Oxidativer-Stress	1 GG-% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 Stunde	24 °C
Osmotischer-Stress	15 GG-% Sorbit	48 Stunden	24 °C
Osmotischer-Stress	20 GG-% Sorbit	48 Stunden	24 °C

#### Nährstoffentzug

Die Hefen werden mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser versetzt, bei 24 °C ein bzw. drei Tage geschüttelt und im Anschluss 3-mal mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Die Aufbewahrung bis zum Anstellen bzw. den Untersuchungen erfolgte gekühlt und unter Wasser.

#### Ethanolstress

Die Hefe wird mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser versetzt und mit Ethanol, auf eine Konzentration von 10 GG-% gebracht. Nach einer Inkubation von 1 bzw. 2 Stunden in einem Brutschrank bei 36°C, wird die Hefe im Anschluss 3-mal mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Die Aufbewahrung bis zum Anstellen bzw. den Untersuchungen erfolgte gekühlt und unter Wasser.

#### **Oxidativer Stress**

Die Hefe wird mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser versetzt, dem 0,1 % bzw. 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt sind und bei 24 °C 1 h geschüttelt. Im Anschluss werden die Hefen 3-mal mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Die Aufbewahrung bis zum Anstellen bzw. den Untersuchungen erfolgte gekühlt und unter Wasser.

#### **Osmotischer Stress**

Die Hefe wird mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser, dem 15 % bzw. 20 % Sorbit zugesetzt sind, versetzt und bei 24 °C 48 h geschüttelt. Im Anschluss wird sie 3-mal mit kaltem, sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Die Aufbewahrung bis zum Anstellen bzw. den Untersuchungen erfolgte gekühlt und unter Wasser.

Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Hefestämmen durchgeführt, da eine universelle Anwendbarkeit der Tests auf verschiedenste Hefestämme ein wichtiges Kriterium ist. Dabei wurden sowohl untergärige, als auch obergärige Hefestämme verwendet. Für jeden Hefestamm wurde zwei Chargen hergeführt. Mit einer Charge wurden parallel die Stressarten „Nährstoffentzug“ und „Ethanolstress“ durchgeführt, mit der zweiten Charge zu einem späteren Zeitpunkt die anderen beiden Stressarten. Die gestressten Hefen wurden mit den Vitalitätsmethoden untersucht und es wurde eine Gärung angestellt. Für die parallel verlaufenden Stressarten wurde eine unbehandelte Hefe als Vergleich untersucht.

Als maßgebliches Kriterium für die Vitalität wurde dabei die Gärzeit einer industriell hergestellten Würze (12 °P) ausgewählt.

Die Versuche wurden im 10 l Maßstab in Gärtanks des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei I durchgeführt. Die Ausstattung des Lehrstuhls wurde in anderen Arbeiten ausführlich beschrieben [50, 116]. Die Gärbedingungen sind der Tab. 3.3 zu entnehmen. Bei den untergärigen Hefen wurde eine hohe Gärtemperatur gewählt, um einen zügigen Gärverlauf zu gewährleisten, da die gestressten Hefen zum Teil erhebliche Gärverzögerungen aufwiesen. Die Hefegabe entsprach 15 g (OG-Hefe) bzw. 20 g (UG-Hefe) abzentrifugierter Hefe (3 min., 1660 × g) auf 10 l Würze.

**Tab. 3.3: Gärbedingungen für den Vergleich der Vitalitätsmethoden**

	Gärvolumen	Gärtemperatur	Hefegabe	Belüftung
obergärige Hefestämme	10 l	20 °C	15 g Hefe	gesättigt
untergärige Hefestämme	10 l	14 °C	20 g Hefe	gesättigt

### 3.6.1.2 Hefestämme und Herführung

In Tabelle 3.4 sind die Hefestämme dargestellt, die für diese Versuchsreihe verwendet wurden.

**Tab. 3.4: Verwendete Hefestämme für den Vergleich von Hefevitalitätsmethoden**

Nr.	Bezeichnung	Hefeart
1	W34/70	UG
2	Hebru	UG
3	W68	OG
4	W175	OG

Die Herführung der Hefen wurde von Gussplatten aus gestartet. Jeweils eine Kolonie wurde in 250 ml sterilem SSL Medium (Firma Döhler, Darmstadt) für 3 Tage bei 27 °C vermehrt. Anschließend wurde die Hefe/SSL Suspension in 2 l autoklavierte Würze (10 min. bei 121 °C) in einem Glaskolben übergeimpft. Die Würze/Hefe-Suspension wurde in einem nicht temperierten Wasserbad (ca. 22 °C) unter Rühren mit einem Magnetrührer (500 U/min.) bis ca. 100 Mio. Zellen/ml weitervermehrt. Dieses geschah ohne Zuführung von Luft.

Die weitere Herführung erfolgte in einem Bioreaktor (Modell BIOSTAT® UD 30 der Fa. Braun Biotech International, Melsungen) mit einem Bruttovolumen von 30 l. Das Gerät verfügt über Komponenten zur Regelung von Temperatur, Rührwerk, Begasung und Druck. Ausführlich ist der Bioreaktor von HERRMANN beschrieben [116]. Nach der Sterilisation (20 min., 121 °C) wurde der Reaktor mit 20 l Ausschlagwürze, und 2 l Hefesuspension aufgefüllt. Die Hefevermehrung wurde bei 15 °C (untergärig) bzw. 20 °C (obergärig), bei 70 U/min. und einer Belüftung von 5 l/h bei einem Überdruck von 0,1 bar durchgeführt. Die Zeit bis zum Erreichen von 100 bis 120 Mio. Zellen/ml schwankte zwischen 16 und 24 h.

Nach Beendigung der Hefeherführung wurde die Hefe in einen, mit Heißwasser (80 °C) behandeltem, Corneliusbehälter überführt und mit Hilfe einer Becherzentrifuge (500 ml Zentrifugenbecher, hitzebehandelt) abzentrifugiert (3 min., 1660 × g). Diese Hefe bildete die Ausgangshefe für die oben dargestellte Stressbehandlung.

### 3.6.2 Vergleich von Hefestämmen unter Variation von Gärparametern

Die Gärbedingungen haben entscheidenden Einfluss auf die Bildung von Stoffwechselprodukten. Es herrscht in vielen Fällen Uneinigkeit darüber, welche

### 3 MATERIAL UND METHODEN

---

Auswirkungen einzelne Veränderungen der Gärparameter haben. Gründe hierfür sind unter anderem der Einsatz unterschiedlicher Hefestämme, isolierte Betrachtung einzelner Parameterveränderungen (nur Temperatur, nur Hefegabe etc.) und deutlich unterschiedliche Ausgangsbedingungen (Gärgefäße, Volumina, Gärmedien etc.).

Um zu eindeutigeren Daten zu gelangen, wurden für die vorliegende Untersuchung eine Reihe gängiger Hefestämme untersucht, um stammspezifische Unterschiede erfassen zu können. Daneben wurde eine Response Surface Methodology Planung verwendet, da mit Hilfe dieser Technik neben den Hauptfaktoren auch die Interaktionen der Faktoren erfasst werden können (siehe Abschnitt 3.1). Um für eine gewisse Vergleichbarkeit im Bereich der Gärgefäße zu sorgen, wurden die von der EBC empfohlenen Gärsäulen (Höhe: 1,5 m; Ø: 5 cm; Volumen: 2 l) verwendet. Im Unterschied zu den original EBC-Gärsäulen sind die am Lehrstuhl genutzten Säulen nicht aus Glas sondern auf rostfreiem Stahl gefertigt und die Kühlung erfolgt nicht durch eine Mantelkühlung sondern die Säulen werden in speziell temperierten Kühlschränken gelagert.

**Tab. 3.5: Versuchsplan für den Vergleich von Hefestämmen**

Standardnr.	Stammwürze [%P]	Gärtemperatur [°C]	Hefegabe [Mio./ml]
1	8	9	7
2	16	9	7
3	8	15	7
4	16	15	7
5	8	9	23
6	16	9	23
7	8	15	23
8	16	15	23
9	8	12	15
10	16	12	15
11	12	9	15
12	12	15	15
13	12	12	7
14	12	12	23
15	12	12	15
16	12	12	15
17	12	12	15
18	12	12	15
19	12	12	15
K1	9	9	9
K2	9	15	18
K3	14	12	21

Als Gärparameter wurden Stammwürze (8 bis 16 %), Gärtemperatur (9 bis 15 °C) und die Hefegabe (7 bis 23 Mio. Zelle/ml) variiert. Auch die Würzebelüftung spielt eine



wichtige Rolle für die Gärung, jedoch ist diese im 2 l Maßstab nur mit großem Aufwand zu variieren und wurde daher nicht verändert.

Mit Hilfe des Versuchsplanungsprogramms Design Expert, Version 6.0.11 wurde das in Tab. 3.5 dargestellte Face Centered Central Composite Versuchsprogramm erstellt. Die Versuche K1 bis K3 sind Kontrollversuche die nicht durch die Software generiert wurden, sondern dabei handelt es sich um willkürlich gewählte Parameterkombinationen, mit deren Hilfe die fertigen Modelle mit tatsächlich erreichten Resultaten überprüft werden können. Als Gärmedium wurde eine großtechnisch hergestellte Würze mit 12 °P verwendet. Niedrigere Stammwürzen wurden durch Verdünnen mit Wasser, höhere Stammwürzen durch Zumischen eines Würzeextraktes der Firma Weyermann (Bavarian Pilsner, Unhoped; ca. 77 % Extrakt) erreicht. Daraus ergaben sich die in Tab. 3.6 dargestellten Würzedaten. Die angegebenen Intervalle stellen das Konfidenzintervall (95 %) dar.

**Tab. 3.6: Würzedaten für den Vergleich von Hefestämmen**

Extrakt <sub>soil</sub> [%]	Extrakt <sub>ist</sub> [%]	pH <sub>ist</sub> [pH-Einheiten]	FAN <sub>ist</sub> [mg/l]
8	8,05 ± 0,06	5,45 ± 0,22	157 ± 7,0
12	11,89 ± 0,06	4,98 ± 0,20	235 ± 1,5
16	15,94 ± 0,03	5,04 ± 0,10	373 ± 2,9
9	9,02 ± 0,04	5,34 ± 0,13	179 ± 1,5
14	14,05 ± 0,27	5,09 ± 0,12	268 ± 5,3

#### 3.6.2.1 Hefestämme und Hefeherführung

Die Versuche wurden aufgrund der umfangreichen Versuchspläne auf untergärrige Hefen beschränkt. Für eine hohe Relevanz, wurden die meistverwendeten Hefestämme in Deutschland ausgewählt. Diese wurden durch Befragung der Hefebank Weihenstephan, des Doemens Instituts und der Versuchs- und Lehrbrauerei Berlin (VLB-Berlin) ermittelt. Zusätzlich wurde noch eine Trockenhefe eines international tätigen Herstellers in die Untersuchung aufgenommen. Bei dem Hefestamm, aus dem diese Hefe gewonnen wurde, handelt es sich um den ebenfalls in den Versuchsreihen verwendeten Hefestamm 308 (Doemens). Zusammenfassend werden die Hefestämme in Tab. 3.7 dargestellt.

**Tab. 3.7: Verwendete Hefestämme für den Vergleich von Hefestämmen**

Nr.	Bezeichnung	Lieferant
1	W34/70	Hefebank Weihenstephan
2	Hebru	VLB-Berlin
3	Rh	VLB-Berlin
4	308	Doemens Institut
5	Trockenhefe	Trockenhefehersteller A

Die Herführung erfolgte analog zu der Vorgehensweise bei dem Vergleich von Hefevitalitätsmethoden. Es wurden jedoch von den Gussplatten aus 500 ml steriles SSL Medium (Firma Döhler, Darmstadt) beimpft und mit diesen anschließend 8 l Würze in einem entsprechenden Behälter beimpft. Die Würze/Hefe-Suspension wurde ebenfalls in einem nicht temperierten Wasserbad (ca. 22 °C) unter Rühren mit einem Magnetrührer (500 U/min.) bis ca. 100 Mio. Zellen/ml weitervermehrt. Dabei wurden geringe Mengen sterile Luft durch das Medium geleitet. Die Hefe wurde nach dem Herführen mit Hilfe einer Becherzentrifuge (500 ml Zentrifugenbecher, hitzebehandelt) abzentrifugiert (3 min, 1660×g) und in kaltem, sterilem, destilliertem Wasser resuspendiert. Von dieser Ausgangshefe wurde Vitalität (ICP), Viabilität und Zellzahl bestimmt. Anhand der Zellzahlen wurden die Hefegaben für die Gärungen berechnet. Die Vitalität der resultierenden Hefen war sehr hoch (AH Tab. 1).

Die Trockenhefe wurde vor der Verwendung gemäß der Vorschrift des Herstellers in abgekochtem Leitungswasser (25-30 °C) für ca. 30 min. rehydriert. Trotzdem betrug der Totanteil ca. 50 % (Bestimmung mit Methyleneblau und Berberine [224]) und daher wurde bei der Hefegabe der Totanteil durch doppelte Hefegabe kompensiert.

Folgende Zielgrößen wurden bei dieser Untersuchung im Verlauf der Gärung verfolgt:

- Extraktverlauf (Gärzeit)
- Diacetylverlauf
- pH-Verlauf

Folgende Zielgrößen wurden nach der Hauptgärung bestimmt:

- Schwefeldioxidgehalt
- Gehalt an höheren Alkoholen und Estern

Aufgrund des geringen Volumens war eine Weiterbehandlung bis zum fertigen Bier nicht möglich.

### 3.6.3 Gärversuche unter Variation von Gärparametern und Hefevitalität

Zielsetzung dieser Versuchsreihe war zunächst die Auswirkung der Variation von Gärparametern auf die Stoffwechselprodukte der Hefe zu untersuchen. Die Versuche wurden in einem größeren Maßstab durchgeführt (20 l), damit diese bis zu fertig abgefülltem Bier weitergeführt werden konnten. Außerdem wurde die Versuchsplanung um den Parameter Würzebelüftung erweitert.

Als wichtiger Aspekt für die vorliegende Arbeit wurde zusätzlich noch eine Variation der Hefevitalität in die Versuchsplanung aufgenommen.

#### 3.6.3.1 Versuchsplanung und Vorbereitung

Die Versuchsplanung erfolgte wiederum durch eine RSM-Planung, wobei ein Small Central Composite Versuchsplan gewählt wurde. Die Hefevitalität wurde dabei als Kategoriefaktor mit zwei Ausprägungen (hoch und niedrig) mit aufgenommen. Das bedeutet, dass alle Versuche sowohl mit Hefen hoher Hefevitalität als auch mit Hefen niedriger Hefevitalität durchgeführt wurden. In Tab. 3.8 ist der Versuchsplan für diese Versuchsreihe dargestellt, wobei die Versuche 1 bis 21 sowohl mit hoher, als auch niedriger Hefevitalität durchgeführt wurden. Die Versuche K1 bis K3 stellen wiederum Versuche mit willkürlichen Versuchskombinationen dar, mit denen die fertigen Modelle verglichen wurden. Die Kontrollversuche wurden nur mit Hefe hoher Vitalität durchgeführt.

Für die Gärversuche wurden die Gärssäulen im Technikum der Brauerei A in Anspruch genommen. Dabei handelt es sich um Glassäulen mit einer maximalen Füllmenge von 25 l. Die Säulen werden über eine Mantelkühlung mit Wasser temperiert, das mittels Glykol gekühlt wird. Die Temperaturmessung erfolgte über einen Thermofühler im unteren Bereich der Säule. Sechs Säulen standen für die Technikumsversuche zur Verfügung.

Die unterschiedlichen Stammwürzekonzentrationen wurden, wie bei dem Vergleich der Hefestämme, durch Verdünnen mit Wasser oder durch Zugabe von Würzeextrakt (Weyermann Bamberg, Bavarian Pilsner, Unhoped; ca. 77 %) einer industriell hergestellten Würze (12 °P) erreicht. Die resultierenden Würzedaten sind in Tab. 3.9 dargestellt. Die angegebenen Intervalle stellen die KI (95 %) dar. Diese sind bei den Stammwürzen 5,3 % und 18,7 % nicht angegeben, da nur 2 Würzen hergestellt wurden und eine Berechnung eines Konfidenzintervalls nicht möglich ist.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

**Tab. 3.8: Versuchsplan für die Variation von Gärparametern und Hefevitalität**

Standardnr.	Stammwürze [°P]	Hefegabe [Mio./ml]	Gärtemperatur [°C]	Belüftung [mg/l]
1	16	23	16	4
2	16	23	8	4
3	16	7	16	8
4	8	23	8	8
5	16	7	8	8
6	8	7	16	4
7	8	23	16	8
8	8	7	8	4
9	5,3	15	12	6
10	18,7	15	12	6
11	12	1,5	12	6
12	12	28,5	12	6
13	12	15	5,27	6
14	12	15	18,7	6
15	12	15	12	2,6
16	12	15	12	9,4
17	12	15	12	6
18	12	15	12	6
19	12	15	12	6
20	12	15	12	6
21	12	15	12	6
K1	12	15	9	6
K2	12,5	10	13	5
K3	12,5	20	15	6

Die Belüftung wurde, nach Einfüllen der Würze in die Gärsäulen, durch Einblasen von steriler Luft durchgeführt. Während des Belüftens erfolgte eine Sauerstoffmessung, um die exakten Sauerstoffwerte ermitteln zu können. Die Messung erfolgte mit InTap4004e-Geräten der Firma Mettler-Toledo GmbH (Giessen, Deutschland).

**Tab. 3.9: Würzedaten für die Variation von Gärparametern und Hefevitalität**

Extrakt-Soll [%]	Extrakt-Ist [%]	pH-Ist [pH-Einheiten]	FAN Ist-[mg/l]
8	7,84 ± 0,03	5,24 ± 0,10	125 ± 2,3
12	11,77 ± 0,03	5,19 ± 0,01	193 ± 5,9
16	15,75 ± 0,17	5,10 ± 0,06	302 ± 3,5
5,3	5,23	5,41	87
18,7	18,51	5,24	363

Die Hefegabe erfolgte erst im Anschluss daran von oben, damit die Sauerstoffmessung nicht beeinflusst wurde. Eine Verteilung der Hefe erfolgte durch einen kurzen CO<sub>2</sub>-Stoß. Die Feinverteilung der Hefe konnte durch die Gärgefäße aus Glas kontrolliert werden.

### 3.6.3.2 Hefestamm und Hefebehandlung

Damit ausreichend Hefe für diese Versuchsreihe zu Verfügung stand, wurde Erntehefe der Brauerei A (Hefestamm Hebru) verwendet. Es wurde Erntehefe der ersten Führung verwendet, die direkt aus dem Betrieb bezogen wurde. Von der Hefe wurde der ICP-Wert bestimmt und es kam nur Hefe zum Einsatz die einen ICP-Wert >6,2 aufwies. Für Hefechargen oberhalb dieses Wertes sind keine unterschiedlichen Gäreigenschaften bekannt. Da sechs Gärsäulen zur Verfügung standen, wurden bis zu sechs Gärungen gleichzeitig (=Versuchsreihe) mit einer Hefecharge angestellt. Da alle Versuche ebenfalls mit Hefe einer niedrigeren Hefevitalität durchgeführt werden sollten, wurde von der verwendeten Hefe ein Teil aufgehoben und bei 14 °C gelagert, bis diese einen ICP-Wert von 5,8 erreicht hatte (3 bis 4 Tage). Danach wurde die Hefe bei 0 °C gelagert (max. 2 Tage), bis die laufende Versuchsreihe geschlaucht wurde. Daraufhin wurden die gleichen Gärungen wie in der vorhergehenden Versuchsreihe durchgeführt, nur mit der schlechteren Hefe. Ein ICP-Wert von 5,8 gilt in der Literatur als Grenzwert für das Verwerfen von Hefechargen [21, 124]. Die Daten der Vitalitäten für jeden Versuch sind im Anhang AH Tab. 2 dargestellt.

### 3.6.3.3 Versuchsdurchführung

Im Verlauf der Gärungen wurden Extraktverlauf, Zellzahl und Lebend-Tot-Anteil verfolgt.

Das Schlauchen erfolgte bei einem  $E_s$  von 1 % über Endvergärungsgrad. Geschlaucht wurden die Biere in gereinigte und mit CO<sub>2</sub>-vorgespannte Kegs (30 l). Alle Biere wurden zwei Tage bei 14 °C einer Reifung unterzogen, und im Anschluss bei 0 °C für ca. 14 Tage gelagert. Danach wurden sie über einen Pilotkieselgurfilter der Brauerei A filtriert. Bei dem Filter handelte es sich um einen Kerzenfilter, der für die Versuche mit einer einmaligen Anschwemmung von 80 g feiner Gur (Größe ca. 5-25 µm; Permeabilität ca. 60-90 mDarcy) angeschwemmt wurde. Auf eine laufende Kieselgurdosage wurde verzichtet, um einen möglichen Sauerstoffeintrag zu vermeiden. Die Biere wurden dann mit Pilotfüllern auf Flaschen gefüllt, dabei wurden diese mehrfach vorevakuiert und mit CO<sub>2</sub>-vorgespannt.

Bei den fertigen Bieren wurden die in Tab. 3.10 dargestellten Zielgrößen untersucht.

**Tab. 3.10: Untersuchte Merkmale der Variation von Gärparametern und Hefevitalität**

Extrakt	Antiradikalisches Verhalten
Alkohol	Antiradikalisches Potential
pH	SO <sub>2</sub>
Diacetyl	Höhere Alkohole und Ester
Schaum	Bieraromastoffe
FAN	Alterungskomponenten
Reduktionsvermögen	Verkostung (frisch und forciert)
Lag-Time	Alterungsverkostung

#### 3.6.4 Gärungen im Produktionsmaßstab

Ziel der Versuche im Produktionsmaßstab war es, einige Ergebnisse der Versuche in den Pilotmaßstäben zu bestätigen. Da es sich um Versuche mit 3000 hl pro Tank handelte, mussten Einschränkungen bezüglich der Variationen in Kauf genommen werden. So war es nicht möglich, Versuche mit unterschiedlichen Hefevitalitäten durchzuführen. Variiert wurden bei diesen Versuchen die Parameter Gärtemperatur, Hefegabe und Belüftung. Die Variationen konnten nicht zu groß gewählt werden, da die Abweichungen im Aromaprofil nur gering ausfallen durften. Die Versuche wurden als faktorielle Versuchsplanung mit zwei Stufen und Zentralpunkten ausgelegt (siehe Abschnitt 3.1.1.1). Die Belüftung wurde dabei als Kategoriefaktor mit den Ausprägungen Belüftung eines Sud bzw. Belüftung beider Sude bei zwei Suden/Tank durchgeführt (Sudabstand 6 h). Tabelle 3.11 zeigt den Versuchsplan.

**Tab. 3.11 Versuchsplan großtechnische Versuche Brauerei A**

Standardnr.	Gärtemperatur [°C]	Hefegabe [Mio./ml]	Belüftung
1	13	10	1 Sud
2	15	10	1 Sud
3	13	20	1 Sud
4	15	20	1 Sud
5	13	10	2 Sude
6	15	10	2 Sude
7	13	20	2 Sude
8	15	20	2 Sude
9	14	15	1 Sud
10	14	15	2 Sude
11	14	15	1 Sud
12	14	15	2 Sude

In der Brauerei wurde ein Druckgärverfahren mit integrierter Reifung angewendet. Da ein Engpass im Bereich des Lagerkellers nicht erlaubte, die Biere unverschnitten bis zur Abfüllung zu bringen, wurden jeweils beim Schlauchen in den Lagerkeller (nach Abschluss von Gärung und Reifung) ein Keg (gereinigt und mit CO<sub>2</sub> vorgespannt)

### 3 MATERIAL UND METHODEN

---

befüllt und dieses für ca. 14 Tage bei 0 °C gelagert. Anschließend wurden die Biere an einem Pilotfilter filtriert (Abschnitt 3.6.3) und an einem Pilotfüller (mit mehrfachem Vorevakuieren und Vorspannen mit CO<sub>2</sub> der Flaschen) abgefüllt. Die fertigen Biere wurden jeweils auf die in Tab. 3.12 dargestellten Zielgrößen hin untersucht.

**Tab. 3.12: Untersuchte Merkmale der Versuche im Produktionsmaßstab**

Extrakt	Antiradikalisches Verhalten
Alkohol	Antiradikalisches Potential
pH	SO <sub>2</sub>
Diacetyl	Höhere Alkohole und Ester
Schaum	Bieraromastoffe
FAN	Alterungskomponenten
Reduktionsvermögen	Verkostung (frisch und forciert)
Lag-Time	Alterungsverkostung

# 4 Ergebnisse und Diskussion

## 4.1 Vergleich der Vitalitätsmethoden

Aus den in der Literatur dargestellten Ansätzen zur Messung der Vitalität wurden die folgenden Tests ausgewählt (siehe Abschnitt 2.1) und miteinander verglichen:

- Messung des Intrazellulären pH-Wertes (ICP)
- Modifizierte Messung des Intrazellulären pH-Wertes (S-ICP)
- Acidification Power Test (APT)
- Valtitration (VT)
- Diacetylreduktion
- Messung der CO<sub>2</sub>-Bildung
- Test auf Basis von Benzoquinon und Tetrazoliumsalz (Formazanbildung)

Für die Brauindustrie muss eine Vitalitätsmethode in der Lage sein, die Gäraktivität einer Hefe vorhersagen zu können und damit schnell die Tauglichkeit einer Hefecharge überprüfen zu können. Daneben muss ein geeigneter Test reproduzierbare Ergebnisse liefern und für alle Hefestämme gleich gut funktionieren. Aus diesem Grund wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Test untersucht.

### 4.1.1 Reproduzierbarkeit der Vitalitätsmethoden

Für die Reproduzierbarkeit wurden Hefechargen 5-mal mit den einzelnen Messmethoden analysiert und daraus die statistischen Parameter arithmetisches Mittel, Standardabweichung, V<sub>k</sub> und K<sub>I</sub> (95 %) ermittelt. Die Werte sind in Tab. 4.1 dargestellt. Die Daten, die der Reproduzierbarkeitsanalyse zugrunde liegen, sind im Anhang (AH Tab. 3) dargestellt. Eine größere Anzahl von Wiederholungen war aufgrund der zum Teil sehr langen Analysenzeiten nicht möglich.

Die Reproduzierbarkeiten der Methoden sind sehr unterschiedlich. Variationskoeffizienten (V<sub>k</sub>) um 10 % sind bereits als ungenügend einzustufen. Deutlich unter 10 % liegen lediglich die beiden ICP-Methoden, der Druckaufbau und der GAP-Wert des Acidification Power Tests. Die Methoden Diacetylreduktion, der GIPE-Wert des APT und die Valtitration sind mit V<sub>k</sub>'s über 10 % als unzuverlässig zu bezeichnen.



**Tab. 4.1: Statistische Parameter zur Reproduzierbarkeit mit 5 Wiederholungen**

Methoden	Messbereich	Mittelwerte der Reihe	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]	KI (95%)	Analysendauer [h]
ICP	5,2 bis 6,7 pH	6,42 pH	0,06	0,9	0,07	3,5
S-ICP	5,1 bis 6,8 pH	6,75 pH	0,058	0,8	0,07	0,5
APT						
WAP	-1 bis +3 pH	1,32 pH	0,099	7,5	0,12	0,5
GAP	-1 bis +3 pH	2,13 pH	0,099	4,6	0,12	0,5
GIPE	-1 bis +3 pH	0,81 pH	0,162	16,2	0,2	1
Diacetylreduktion	0 bis 1 ppm	0,6 ppm	0,1	16,6	0,12	0,75
Vitaltitration	0 bis 15 ml/min	9,31 ml/min	1,09	11,8	1,36	0,3 bis 1
Druckaufbau	0 bis 4 bar	3,27 bar	0,057	1,7	0,07	2
Formazanbildung	0 bis 3 I440/I600	1,37 I440/I600	0,122	8,9	0,15	0,25

Ein wichtiger Punkt für die Anwendung solcher Tests in der Praxis ist eine einfache Handhabung und eine möglichst kurze Analysendauer ohne großen Arbeitsaufwand. Für die Forschung gelten diese Vorgaben nur eingeschränkt, jedoch muss auch dort eine Abwägung zwischen Aufwand und Nutzen durchgeführt werden. Aus diesem Grund enthält die Tabelle auch die Analysendauer. Für eine weitere Beurteilung ist es jedoch notwendig, die Aussagefähigkeit über die Gärleistung mit zu betrachten.

### 4.1.2 Versuche zum Vergleich von Vitalitätsmethoden mit unterschiedlich gestressten Hefen

Auch wenn unter Hefevitalität der allgemeine physiologische Zustand lebender Zellen verstanden wird, ist im Bereich der Brauerei die Gärleistung das Hauptkriterium. Am Ende von Gärungen wird die Extraktabnahme nicht nur durch den Zustand der Hefe beeinflusst, sondern auch durch andere Faktoren. Beispielsweise kommt es durch unterschiedliche Flokkulation zu unterschiedlichen Zellzahlen in Schwebelösung, was die Extraktabnahme beeinflusst. Daher wurde für diese Untersuchung nicht die Zeit bis zum Endvergärungsgrad gewählt, sondern die Zeit bis zu einem Extrakt von  $E_s = 4\%$ . Um unterschiedliche Hefezustände darstellen zu können, wurden Hefechargen von vier unterschiedlichen Hefestämmen (2 UG, 2 OG) mit vier verschiedenen Stressarten in unterschiedlichen Ausprägungen beaufschlagt (siehe Abschnitt 3.6.1.1). Mit den resultierenden 10 Hefeproben pro Hefestamm in unterschiedlichen Zuständen wurden alle Vitalitätsanalysen durchgeführt und Gärungen im 10 l Maßstab angestellt. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse der einzelnen Vitalitätsmethoden den Gärzeiten bis  $E_s = 4\%$  gegenübergestellt. Von diesen Daten

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

wurde der Korrelationskoeffizient  $r$  für einen linearen Zusammenhang zwischen Vitalitätsanalysen und Gärzeiten bestimmt. Bei diesen Versuchen waren manche der Stressbedingungen so extrem, dass nicht mehr genügend lebende Zellen für eine Gärung vorhanden waren. Daher konnten nur acht Gärungen für die Berechnung von  $r$  berücksichtigt werden (im Fall W68 waren es neun). Für acht Wertepaare liegt der  $r$ -Wert für einen signifikanten Zusammenhang ( $P=0,95$ ) bei 0,71 und für einen hoch signifikanten Zusammenhang ( $P=0,99$ ) bei 0,83. In der Abb. 4.1 sind die Korrelationskoeffizienten für alle Methoden und alle Hefestämme dargestellt. Die Signifikanzniveaus sind als gestrichelte Linie ( $P=0,95$ ) und durchgezogene Linie ( $P=0,99$ ) markiert. Die Daten, die der Korrelationsanalyse zugrunde liegen, sind im Anhang (AH Tab. 4 a-f) dargestellt.

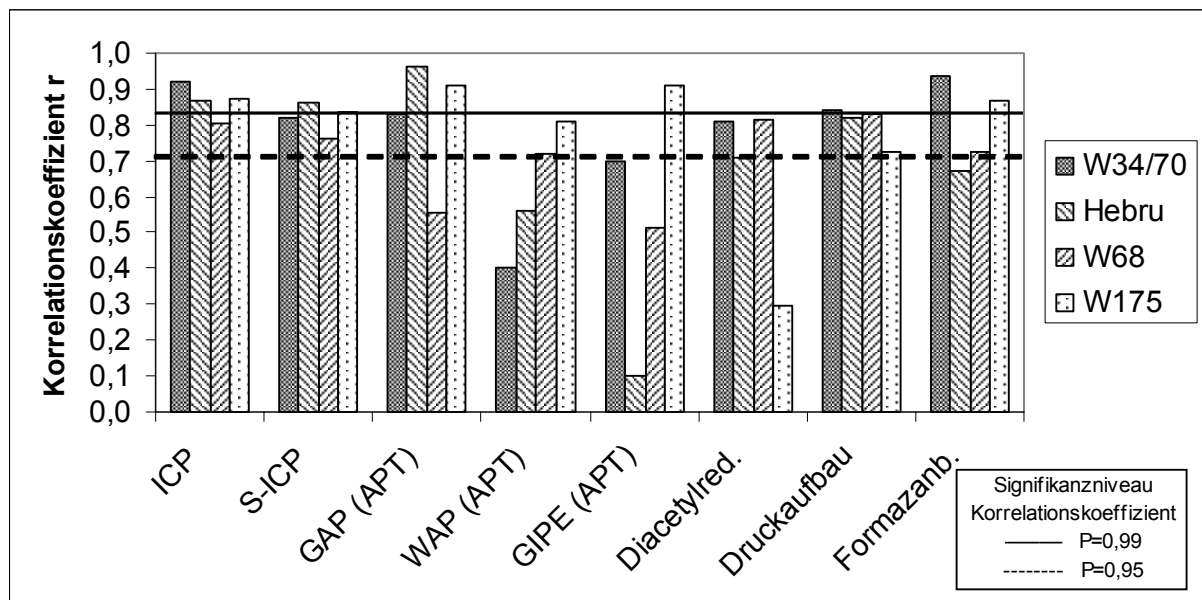


Abb. 4.1:  $r$ -Werte für lineare Zusammenhänge zwischen Gärzeit und Vitalitätsmethoden

Die Werte für die Valtitration erscheinen nicht in der Darstellung, da bei dieser Methode mit den meisten der gestressten Hefeprouben der Endwert von pH 6,3 nicht erreicht wurde und damit keine Ergebnisse vorlagen. Auch wenn die Methode bei in der Brauerei vorkommenden Hefen besser funktionieren sollte als bei künstlich gestressten Hefen, so kann diese Methode nicht empfohlen werden, da sie auch große Probleme bei der Reproduzierbarkeit aufweist.

Bei der Auswertung der Abb. 4.1 sollte noch bedacht werden, dass hier zwar ein linearer Zusammenhang zwischen der Hefevitalität und der Gärleistung angenommen wurde, ob dieser in der Form existiert, muss jedoch bezweifelt werden. Es ist

anzunehmen, dass für Hefen, die in einem guten Zustand sind, zwar noch Unterschiede in ihrem physiologischen Zustand gefunden werden können. Unwahrscheinlich ist dagegen, dass diese Hefen Steigerungen der Gäraktivität zeigen, da die Gäraktivität unter anderem durch Transportsysteme und Enzymaktivitäten limitiert ist und diese sich nicht unendlich steigern lassen. Ein annähernd linearer Zusammenhang sollte jedoch für einen funktionierenden Test feststellbar sein.

Sehr wichtig ist, dass ein Test unabhängig vom untersuchten Hefestamm ist, und hier zeigt sich, dass die WAP- und GIPE-Werte des APT schwankende Werte und zum Teil sehr schwache Korrelationen aufweisen. Damit eignen sich diese Analysen nicht für die Vitalitätsmessung. Interessant ist dieser Aspekt, da der ursprüngliche APT nur aus dem GAP-Wert bestand, jedoch zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit und der Aussagekraft von SIDDIQUE und SMART [250] um die Werte WAP und GIPE erweitert wurde. Die Formazanbildung zeigt deutliche Schwankungen jedoch auf einem hohen Niveau der Korrelation. Der GAP-Wert und die Diacetylreduktion zeigen gute Werte für drei Stämme, fallen aber bei einem Stamm deutlich mit der Korrelation ab. Da die Diacetylreduktion auch große Schwankungen bei der Reproduzierbarkeit zeigte, eignet sich auch diese Methode nicht für die Vitalitätsmessung. Kaum Schwankungen auf einem sehr hohen Niveau zeigen die beiden ICP-Methoden und die einfache Druckaufbaumethode. Damit stellen diese Methoden gute Indikatoren für die Gärleistung dar.

Werden diese drei Methoden und zusätzlich GAP-Wert und Formazanbildung als potentielle Methoden betrachtet und noch in Bezug zur Reproduzierbarkeit und zum Zeitaufwand gesehen, so muss zunächst die originale ICP-Methode aufgrund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes als praktikable Vitalitätsmethode abgelehnt werden. Die Druckaufbau-Methode benötigt zwar auch einen langen Zeitraum, aber der Arbeitsaufwand ist sehr gering, sodass mit einfachsten Mitteln eine verlässliche Aussage über die Gäraktivität zu bekommen ist. Den zeitlich geringsten Aufwand hat die Methode der Formazanbildung. Auch wenn zurzeit die Reproduzierbarkeit noch Probleme aufweist, und es Schwankungen zwischen den Hefestämmen gibt, so kann diese sehr neu Methode im Bereich der Handhabung deutlich verbessert werden. Im Zeitaufwand etwa gleichwertig sind der GAP-Wert und die S-ICP-Methode. Hier sprechen die guten Korrelationswerte und eine sehr gute Reproduzierbarkeit für die

S-ICP-Methode. Aus diesem Grund wurde sie als Basis für die weiteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Als Routinemethode für ein Brauereilabor eignet sich diese Methode nur bedingt, da sie arbeitsintensiv ist, und ein Fluoreszenzspektrometer vorhanden sein muss, was nicht zur üblichen Grundausstattung eines Brauereilabors gehört.

### **4.2 Stoffwechselprodukte der Hefe bei Variation der Gärbedingungen und der Hefevitalität**

#### **4.2.1 Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Gärzeit**

Die Gärzeit hat direkt keine Auswirkungen auf die Stoffwechselprodukte bzw. die Geschmacksstabilität und ist damit nicht Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit. Jedoch stellt sie eines der wichtigsten Kriterien dar, nach denen eine Gärung bewertet wird. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle darauf eingegangen, welche Faktoren Einfluss auf die Gärzeit haben. Die zugrunde liegenden Versuche wurden mittels statistischer Versuchsplanung geplant (Abschnitt 3.1.1) und sind in den Abschnitten 3.6.2, 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben. Die gesamten gewonnenen Daten für diese drei Versuchsreihen sind im Anhang (AH Tab. 5, 6 und 7) dargestellt. Aus diesen wurden mit Hilfe der Versuchsplanungssoftware mathematische Modelle der Zusammenhänge gebildet. Wie diese Modelle zu bewerten sind, wurde im Abschnitt 3.1.2 beschrieben, jedoch soll die Auswertung anhand der Gärzeitmodelle exemplarisch dargestellt werden, damit die Bedeutung der Kennzahlen noch einmal deutlich wird. In den folgenden Abschnitten über Stoffwechselprodukte und Geschmacksstabilität wird nicht mehr genauer auf die Kennzahlen eingegangen.

In der Tab. 4.2 sind die Kennzahlen der Gärzeitmodelle (Gärzeit bis  $E_s$  4 %) für den Vergleich der Hefestämme dargestellt.

Der Lack-of-Fit Wert gibt Auskunft über die Streuung der tatsächlich ermittelten Werte um das gebildete Modell und dieser sollte nicht signifikant sein ( $p > 0,05$ ) (Abschnitt 3.1.2). Diese Vorgabe wird von drei Modellen nicht erfüllt, und die zwei weiteren Werte liegen nur knapp darüber. Dieses zeigt, dass es bei allen Hefestämmen große Streuungen der Gärzeitwerte gibt. Neben der ungünstigen Streuung der Modelle weisen die weiteren statistischen Kennzahlen gute Werte auf. Für die  $r^2$ -Werte (R-Squared) gilt, dass diese möglichst nahe an 1 herankommen sollten, wobei es

wichtiger ist, dass der Werte für die Regression (Adj R-Squared) und der Wert für das Modell (Pred. R-Squared) sich nicht um mehr als 0,2 unterscheiden (Abschnitt 3.1.2).

**Tab. 4.2 Statistische Parameter zur Beurteilung der Gärzeitmodelle der verschiedenen Hefestämme**

	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4%				
	W34/70	308	Trockenhefe	Hebru	Rh
Gewählter Modelltyp	quadratisch	quadratisch	quadratisch	quadratisch	quadratisch
Lack of Fit [p-Wert]	0,16	0,03	0,01	0,10	0,03
Adj. R-Squared	1,00	1,00	0,96	0,99	0,99
Pred. R-Squared	0,99	0,99	0,88	0,97	0,98
Adeq. Precision	105,12	149,98	33,69	62,79	78,75
Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	12	9	-	-	-
<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>					
K1 [%]	2,3	6,4	1,5	10,8	8,4
K2 [%]	15,3	10,7	6,1	4,4	8,5
K3 [%]		9,3	9,0	2,2	2,8
Vk der Zentralpunkte [%]	2,3	1,1	2,5	3,2	2,1
Kontrollversuch in 95% Konfidenzintervall des Modells?	ja; nein	nein; nein; nein	ja; ja; ja	nein; ja; ja	ja; nein; ja

Für die Gärzeit liegen diese Werte in sehr guten Bereichen. Das Gleiche gilt für die Adeq. Precision (Verhältnis Signal zu Rauschen), deren Wert über 4 sein sollte (Abschnitt 2.1.2). In der Zeile „Eliminierte Ausreißer“ sind die Standardnummern der Versuche notiert, deren Werte bei der Modellbildung in der Residuenanalyse deutlich auffällig waren (z. B. Werte im Outlier-T-Test >3,5 und Cook's Distance >1). Diese wurden aus diesem Grund für die Modellbildung ignoriert.

Die Differenzwerte Modell/Kontrollversuche geben die prozentuale Abweichung des durch das Modell vorhergesagten Wertes zu dem praktisch ermittelten Wert der Kontrollversuche an. Dass hier zusätzliche Versuche durchgeführt wurden, dient einer weiteren Überprüfung der Modelle über die statistische Prüfung hinaus. Diese Werte müssen natürlich mit Vorsicht betrachtet werden, da neben den Fehlern die die Modelle beeinflussen (Durchführungsfehler, Analysenfehler und Modellbildungsfehler), auch die Kontrollversuche Fehlern unterliegen können (Durchführungsfehler und Analysenfehler).

Die Abweichungen müssen in Bezug zu den Fehlern des Versuchssystems betrachtet werden, daher ist der Variationskoeffizient (Vk) für die Zentralpunkte angegeben. Bei den Zentralpunkten handelt es sich um eine fünffache Wiederholung dieser Faktorenkombination.

Zusätzlich ist noch angegeben, ob die Messwerte der Kontrollversuche innerhalb des Konfidenzintervalls des Modells (Sicherheitsniveau 95 %) an der untersuchten Stelle liegen. Dieses wird durch die einfache Angabe „ja“ oder „nein“ dargestellt. Liegt ein Wert so, dass er je nach dem wie gerundet wird innerhalb oder außerhalb des Konfidenzintervalls liegt, so wird er mit einem kursiv gedrucktem „*nein*“ gekennzeichnet. Alle Konfidenzintervalle, die in den Abschnitten 4.2 und 4.3 verwendet worden sind, wurden durch die Versuchsplanungssoftware bestimmt. Dafür wurde für jeden Punkt, für den ein KI angegeben ist, der Modellwert mittels der Funktion „Point Prediction“ (Punktvorhersage) bestimmt. Bei der Berechnung des Modellwertes werden ebenfalls die Grenzen des KI (95 %) berechnet.

Einige der Kontrollergebnisse liegen im Bereich des  $V_k$  bzw. im KI, jedoch liegen auch einige außerhalb der Bereiche. Dieses bestätigt die bereits erkannte Streuung der Versuche. Jedoch sind deutliche Abweichungen bei den Gärzeiten in brauereitechnischen Gärungen kaum zu vermeiden. Dieses zeigt eine Betrachtung der Gärzeiten bis  $E_s$  4 % der Doppelbestimmungen, die im Rahmen der großtechnischen Versuche durchgeführt wurden (Tab. 4.3).

**Tab. 4.3: Gärzeiten von Doppelbestimmungen im großtechnischen Maßstab**

Bedingungen	Gärzeit bis $E_s$ 4% [h]		
	Versuch 1	Versuch 2	Abweichung vom Mittelwert [%]
Brauerei A (14°C; 15 Mio./ml; 1 Sud belüftet)	54	59	8,8
Brauerei A (14°C; 15 Mio./ml; 2 Sude belüftet)	48	40	18,2

Diese deutlichen Abweichungen traten auf, obwohl in dem Betrieb ein großer technischer Aufwand betrieben wird, um die Gärbedingungen gleich zu halten.

Die Gleichungen der Gärzeitmodelle für die einzelnen Hefestämme sind im Anhang aufgeführt (AH Tab. 8).

In welchem Maß die einzelnen, variierten Parameter Einfluss auf die Gärzeit haben, kann zunächst aus den F-Werten der Modellterme abgeschätzt werden. Die F-Werte stellen das Verhältnis der Varianzen des Modells zu den Varianzen der Residuen dar. Vereinfacht kann gesagt werden, dass der F-Wert das Verhältnis zwischen dem Effekt, den ein Faktor auf die Zielgröße hat, und dem Fehler des Modells angibt. Ist der Effekt so groß wie der Fehler, so ist der Wert 1. Nimmt der Effekt eines Faktor gegenüber dem Fehler des Modells zu, so nimmt der F-Wert zu. Da der Fehler des Modells für alle Faktoren gleich ist, kann mit der Höhe des F-Wertes der Einfluss der Faktoren verglichen werden. In Tab. 4.4 sind die F- und p-Werte für die Terme der

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Modellgleichungen der verschiedenen Hefestämme dargestellt. Dass die Gleichungen unterschiedlich viele Terme besitzen ist darauf zurückzuführen, dass nicht signifikante Terme ( $p$ -Wert  $>0,1$ ; siehe Abschnitt 3.1.2) aus den Modellen entfernt werden.

**Tab. 4.4: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die Gärzeit der Hefestämme**

Faktor	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4%									
	W34/70		308		Trockenhefe		Hebru		Rh	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Extrakt	4033,4	< 0,0001	8100,8	< 0,0001	195,8	< 0,0001	1440,5	< 0,0001	1822,1	< 0,0001
Temperatur	943,8	< 0,0001	1510,6	< 0,0001	77,7	< 0,0001	298,3	< 0,0001	363,2	< 0,0001
Hefegabe	714,7	< 0,0001	1547,6	< 0,0001	90,6	< 0,0001	171,8	< 0,0001	573,5	< 0,0001
Extrakt × Temperatur	104,0	< 0,0001	137,3	< 0,0001	18,6	0,0010	32,2	0,0002	39,7	< 0,0001
Extrakt × Hefegabe	65,3	< 0,0001	67,0	< 0,0001	4,1	0,0663	3,8	0,0802	55,2	< 0,0001
Temperatur × Hefegabe	40,4	0,0002	23,5	0,0013			5,8	0,0366	31,2	0,0002

Deutlich geht aus den Werten hervor, dass der Stammwürzegehalt für alle Hefestämme den größten Einfluss auf die Gärzeit hat. Dieses stellt keine Überraschung dar. Die dargestellten Verhältnisse gelten nur in Bezug auf die in diesem Versuch gewählten Variationen (Extrakt 8-16 %; Temperatur 9-15 °C; Hefegabe 7-23 Mio. Zellen/ml).

Bei der Trockenhefe ist der Extraktgehalt nicht so dominant wie bei den anderen Stämmen. Dieses kann darauf zurückzuführen sein, dass das Rehydrieren der Hefe den wichtigsten Faktor für die Gärung dieser Hefen darstellt und dabei Hefegabe und Temperatur eine große Rolle spielten. Interessant ist, dass sich der Einfluss der Hefegabe und der Temperatur bei den meisten Stämmen in etwa auf dem gleichen Niveau befinden. Bei den Stämmen 308, Rh und der Trockenhefe ist die Hefegabe sogar dominanter, wobei die Hefegabe auch mehr als verdreifacht wird, während die Temperatur nicht einmal verdoppelt wird. Bei dem Hefestamm Hebru ist der Einfluss der Temperatur deutlich stärker als der der Hefegabe. Das kann damit erklärt werden, dass dieser Hefestamm als sehr temperaturempfindlich gilt (langsame Gärung < 12 °C). Bei allen Hefestämmen wirken sich auch Interaktionen zwischen den Gärparametern auf die Gärzeiten aus, jedoch sind diese Effekte nicht sehr stark.

Wie sich die einzelnen Faktoren konkret auf die Gärzeit auswirken, wird nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf den Stoffwechselprodukten der Hefe liegt. Jedoch wird im Weiteren dargestellt, inwieweit die ähnlich aufgebaute Versuchsreihe im 20 l Maßstab und die Versuche im Bereich

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

der Produktion die bisherigen Ergebnisse bestätigen können. In der Tabelle 4.5 sind die statistischen Kennzahlen des Gärzeitmodells und die F-Werte für die Versuche im 20 l Maßstab dargestellt. Diese Versuche wurden mit dem Hefestamm Hebru durchgeführt.

**Tab. 4.5: Statistische Kennzahlen für das Gärzeitmodell für Versuche im 20 l Maßstab**

Gärzeit bis Es 4%				
Faktor	F-Wert	p-Wert		
Extrakt	901,6	< 0,0001	Gewählter Modelltyp	quadratisch
Hefegabe	105,9	< 0,0001	Lack of Fit [p-Wert]	0,50
Temperatur	1522,0	< 0,0001	Adj R-Squared	0,99
Belüftung	28,8	< 0,0001	Pred. R-Squared	0,98
Vitalität	25,2	< 0,0001	Adeq. Precision	68,30
Extrakt × Temperatur	8,3	0,0071	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-
Extrakt × Belüftung	5,0	0,0336	<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>	
Hefegabe × Belüftung	14,0	0,0008	K1 [%]	13,8
Belüftung × Vitalität	3,3	0,0802	K2 [%]	10,2
			K3 [%]	18,6
			Vk Zentralpunkte [%]	7,1
			<b>Kontrollvers. in Konfidenzintervall?</b> nein; nein; nein	

Modellgleichungen:

hohe Vitalität:  $\text{Log}_{10}(\text{Gärzeit}) = 2,460 + 0,138 \times \text{Extrakt} - 0,055 \times \text{Hefegabe} - 0,130 \times \text{Gärtemperatur} - 0,030 \times \text{Belüftung} + 0,001 \times \text{Hefegabe}^2 + 0,003 \times \text{Gärtemperatur}^2 - 0,002 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur} - 0,004 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} + 0,004 \times \text{Hefegabe} \times \text{Belüftung}$

niedrige Vitalität:  $\text{Log}_{10}(\text{Gärzeit}) = 2,438 + 0,138 \times \text{Extrakt} - 0,055 \times \text{Hefegabe} - 0,130 \times \text{Gärtemperatur} - 0,016 \times \text{Belüftung} + 0,001 \times \text{Hefegabe}^2 + 0,003 \times \text{Gärtemperatur}^2 - 0,002 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur} - 0,004 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} + 0,004 \times \text{Hefegabe} \times \text{Belüftung}$

Die Kennzahlen des Modells weisen zunächst auf ein sehr gutes Modell hin, da hier auch der Lack-of-Fit-Wert wie gewünscht deutlich nicht-signifikant ist. Jedoch weisen die Kontrollversuche auch hier Abweichungen auf, die oberhalb des Vk liegen, was bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden muss.

Dass zwei Modellgleichungen dargestellt sind, ist darauf zurückzuführen, dass die Vitalität als Kategoriefaktor verwendet wurde, und damit unabhängig voneinander die Zusammenhänge für Kategorie 1 (hohe Vitalität) und für Kategorie 2 (niedrige Vitalität) bestimmt wurden.

Bei dem Betrachten der F-Werte fällt auf, dass in dieser Versuchsreihe die Gärtemperatur einen stärkeren Einfluss hat als die Stammwürze. Diese deutlich unterschiedlichen Verhältnisse im Vergleich zu den Versuchen mit den Hefestämmen lassen sich zumindest teilweise erklären. Zum einen wurde der Temperaturbereich etwas erweitert, während Extrakt und Hefegabebereich gleich blieben (Extrakt 8-16 %; Temperatur 8-16 °C; Hefegabe 7-23 Mio. Zellen/ml). Zusätzlich kamen bei dieser



## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Versuchsreihe noch die Variationsparameter Belüftung und Vitalität dazu (Belüftung 4-8 mg/l; Vitalität hoch bzw. niedrig). Die geringfügige Änderung des Temperaturbereiches könnte bei dem Hefestamm Hebru bereits deutliche Auswirkungen haben, da dieser Hefestamm sehr temperaturempfindlich ist. Ein weiterer Grund dafür kann darin zu finden sein, dass der Gärmaßstab einen großen Einfluss auf die Gärzeiten hat. Dabei gilt, zumindest im vorliegenden Fall, je kleiner der Maßstab, umso länger die Gärzeiten (siehe Tab. 4.7 weiter unten). Dieses kann dazu führen, dass sich eine Gärzeitverlängerung, die durch höhere Stammwürzen verursacht wird, sich im 2 l Maßstab überproportional auswirkt.

Belüftung und Vitalität zeigen etwa gleich große Auswirkungen auf die Gärzeit. Sie sind schwächer als Extrakt, Temperatur und Hefegabe. Damit entspricht eine Schwächung der Hefe von ICP >6,2 auf 5,8 einer Variation der Belüftung von 8 auf 4 mg/l. Die Interaktionen der Faktoren haben geringen Einfluss auf die Gärzeit.

Die Tabelle 4.6 zeigen die Kennzahlen für die Versuche in der Brauerei A.

**Tab. 4.6: Statistische Kennzahlen für das Gärzeitmodell der Versuche in Brauerei A**

Faktor	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4%			
	F-Wert	p-Wert		
Temperatur	33,3	0,0022	Lack of Fit [p-Wert]	0,76
Hefegabe	42,4	0,0013	Curvature [p-Wert]	0,25
Belüftung	20,1	0,0065	Adj R-Squared	0,91
Temperatur × Hefegabe	2,8	0,1548	Pred. R-Squared	0,78
Temperatur × Belüftung	7,8	0,0384	Adeq. Precision	14,76
			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-

Modellgleichungen:

Belüftung 1 Sud: Gärzeit = 339,92 -18,25 × Temperatur -8,05 × Hefegabe +0,45 × Temperatur × Hefegabe

Belüftung 2 Sude: Gärzeit = 225,08 -10,75 × Temperatur -8,05 × Hefegabe +0,45 × Temperatur × Hefegabe

Die Kennzahlen zeigen ein gutes Modell, auch wenn dieses mit einer sehr geringen Anzahl an Versuchen erstellt wurde. Kontrollversuche wurden nicht durchgeführt, da es sich nicht um eine Modellbildung mittels RSM handelt, sondern um faktorielle Versuche. Die zusätzliche Kennzahl „Curvature“ gibt Auskunft darüber, ob es sich um einen linearen Zusammenhang handelt, oder ob der Verlauf zwischen den Punkten nicht-linear verläuft. Ein Curvature größer 0,1 spricht für einen linearen Verlauf.

Ein direkter Vergleich mit den F-Werten der Versuchsreihen in den Pilotmaßstäben ist nicht möglich, da die gewählten Bedingungen sehr unterschiedlich waren. Der

deutlich niedrigere Einfluss der Temperatur lässt sich durch die verringerte Variation begründen (Temp. 13-15 °C). Durch die Variationsbereiche lässt sich auch erklären, warum bei Brauerei A der Einfluss der Temperatur geringer war als der Einfluss der Hefegabe (Variation Hefegabe: 10-20 Mio. Zellen/ml). Durch die angewendete Draufasstechnik in Brauerei A, bei der entweder beide oder lediglich ein Sud eines zwei Sude fassenden Tanks belüftet wurde, ist zu erklären, warum ein deutlicher Effekt der Belüftung vorliegt.

Wenn Versuche im Pilotmaßstab durchgeführt werden, stellt sich immer die Frage, inwieweit die Ergebnisse sich auf größere Maßstäbe übertragen lassen. In der vorliegenden Arbeit wurden Gärversuche mit dem Hefestamm Hebru in 2 l, 20 l und 3000 hl Maßstab durchgeführt, deren Versuchsbedingungen sich überschneiden. Außerdem lassen sich Einzelergebnisse über Modellgleichungen berechnen. Daher wird die Übertragbarkeit anhand der Ergebnisse der acht Versuchskombinationen die tatsächlich in Brauerei A durchgeführt wurden (Zentralpunkte wurden nicht berücksichtigt) für jede der Zielgrößen im Laufe der Arbeit präsentiert. Tab. 4.7 zeigt die Ergebnisse für die Gärzeit.

**Tab. 4.7: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Gärzeit)**

Bedingungen/Belüftung	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4%			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	≈ 6 mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml	104 ± 6 h	101 ± 7 h	81 ± 8 h	63 ± 8 h
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml	77 ± 4 h	70 ± 5 h	59 ± 8 h	41 ± 8 h
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml	108 ± 10 h	76 ± 5 h	53 ± 8 h	51 ± 8 h
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml	77 ± 6 h	53 ± 4 h	40 ± 8 h	38 ± 8 h

Bei den Werten die mit „±“ angegeben sind, handelt es sich um die KI (95 %). Überlappen diese Intervalle zwischen den Maßstäben nicht mehr, so sind diese mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit unterschiedlich. Hier zeigt sich ein deutlicher Einfluss des Gärvolumens auf die Gärzeit. Dieser wird auf eine höhere Konvektion in größeren Tanks zurückzuführen sein, die durch erheblich größere Mengen an entstehendem CO<sub>2</sub> verursacht wird. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse ist nicht möglich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Gärzeiten sehr stark von dem Gärvolumen und der Geometrie der Gärgefäße abhängen. Der Extraktgehalt und die Gärtemperatur stellen die wichtigsten in der Praxis variierbaren Einflussfaktoren dar.

Auch durch die Hefegabe und die Wahl des Hefestammes kann die Gärzeit deutlich beeinflusst werden. Eine Änderung der Belüftung im Bereich von 4 bis 8 mg/l hat ebenfalls einen nennenswerten Einfluss auf die Gärzeit, auch wenn dieser nicht so groß ist wie die vorher genannten Faktoren. Die Verwendung einer Hefe mittlerer Vitalität (ICP-Wert 5,8) gegenüber einer sehr guten Hefe hat eine vergleichbare Auswirkung, wie genannte Variation der Belüftung und stellt damit einen relevanten Einflussfaktor dar.

### **4.2.2 Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Bildung höherer Alkohole**

Aufgrund der vorkommenden Konzentrationen und ihrer Geschmacksschwellenwerte im Bier gelten die Amylalkohole 2- und 3-Methylbutanol als die höheren Alkohole mit dem größten Einfluss auf das Aroma (Abschnitt 2.2.1). Daher werden diese beiden Alkohole im Weiteren genauer betrachtet. Aus der Analyse der höheren Alkohole und Ester sind zusätzlich noch die Daten für 1-Propanol und 2-Methylpropanol vorhanden. Aus der Bieraromastoffanalyse liegen für die Versuche im 20-l-Maßstab und für die großtechnischen Versuche noch die Daten für die Alkohole Hexanol-1, Heptanol-1, Octanol-1, Decanol-1 und 2-Phenylethanol vor. Im Bier liegt 2-Phenylethanol in der Regel deutlicher unter seiner Geschmacksschwelle als die Amylalkohole, jedoch näher an dieser als alle anderen höheren Alkohole. Daher wird dieser aromatische Alkohol im Abschnitt 4.2.2.3 dargestellt. Die der Modellbildung zugrunde liegenden Daten für alle Zielgrößen sind im Anhang (AH Tab. 5, 6 und 7) aufgeführt.

#### **4.2.2.1 2-Methylbutanol**

Für den Vergleich der Hefestämme ergaben sich für die Modelle die in Tab. 4.8 dargestellten statistischen Kennzahlen.

Es handelt sich demnach um sehr gute Modelle. In der Mehrheit der Kontrollversuche bewegen sich die Abweichungen von den Modellen im Bereich des  $V_k$  der Zentralpunkte oder darunter. Die grau markierten Werte stellen in diesem Zusammenhang Kontrollversuche dar, die im Verdacht stehen, Ausreißer zu sein. Bei diesen Kontrollversuchen weisen mehrere verschiedene Zielgrößen aus derselben Analyse (in diesem Fall höhere Alkohole und Ester) große Differenzen zu den Modellen auf. Der größte Teil der Kontrollversuche liegt im Konfidenzintervall (95 %)

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

des Modells. Ein kursiv gedrucktes „*nein*“ bedeutet, dass diese Werte, je nach dem wie gerundet wird, auch innerhalb des Konfidenzintervalls liegen.

Auch wenn nicht alle Werte exakt übereinstimmen, so stellen die Modelle doch eine gute Näherung der Zusammenhänge dar. Die Gleichungen der Modelle für die einzelnen Hefestämme sind im Anhang aufgeführt (AH Tab. 9).

**Tab. 4.8: Statistische Parameter zur Beurteilung der 2-Methylbutanol-Modelle der verschiedenen Hefestämme**

	2-Methylbutanol				
	W34/70	308	Trockenhefe	Hebru	Rh
Gewählter Modelltyp	quadratisch	quadratisch	quadratisch	linear	linear
Lack of Fit [p-Wert]	0,86	0,30	0,53	0,56	0,52
Adj. R-Squared	0,90	0,95	0,93	0,92	0,91
Pred. R-Squared	0,86	0,85	0,90	0,89	0,87
Adeq. Precision	20,44	25,12	24,30	27,01	26,33
Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-	-	9	-	-
<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>					
K1 [%]	15,8	15,8	3,6	4,3	102,2
K2 [%]	6,2	5,8	4,4	23,6	5,0
K3 [%]		1,6	3,5	0,9	0,4
Vk der Zentralpunkte [%]	6,5	2,9	4,4	5,8	4,3
Kontrollversuch im Konfidenzintervall des Modells?	nein; <i>nein</i>	nein; ja; ja	ja; ja; ja	ja; nein; ja	nein; ja; ja

In welchem Maß die einzelnen variierten Parameter Einfluss auf die Bildung von 2-Methylbutanol haben, kann zunächst aus den F-Werten der Modellterme abgeschätzt werden (Tab. 4.9).

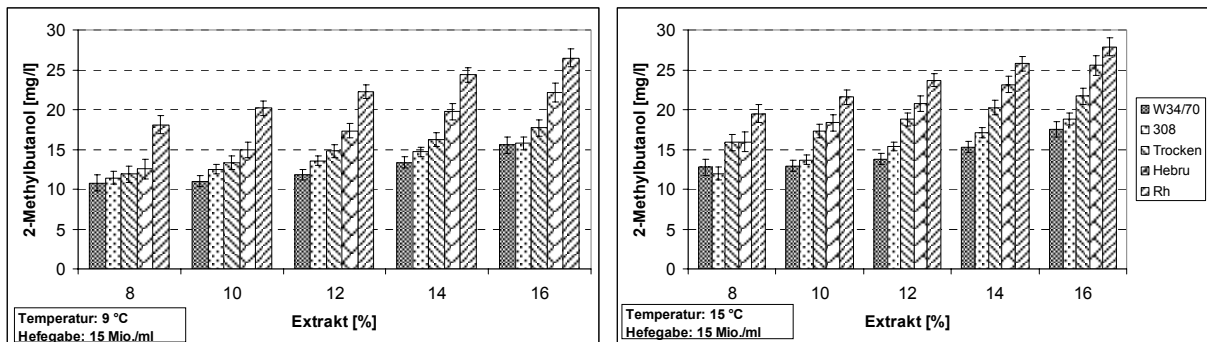
**Tab. 4.9: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die 2-Methylbutanolbildung der Hefestämme**

Faktor	2-Methylbutanol									
	W34/70		308		Trockenhefe		Hebru		Rh	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Extrakt	133,5	< 0.0001	262,9	< 0,0001	106,0	< 0.0001	180,5	< 0.0001	167,5	< 0.0001
Temperatur	22,6	0.0004	27,2	0,0003	56,2	< 0.0001	22,6	0.0003	4,7	0.0477
Hefegabe	3,4	0.0880	3,0	0,1102	14,1	0.0028	2,0	0.1820	16,0	0.0011
Extrakt ×Temperatur			10,5	0,0079						
Extrakt ×Hefegabe			3,8	0,0781	6,3	0.0272				
Temperatur ×Hefegabe			3,8	0,0781						

Deutlich geht aus den Werten hervor, dass der Stammwürzegehalt für alle Hefestämme den größten Einfluss auf die Bildung von 2-Methylbutanol hat. Mit Ausnahme des Stammes Rh ist bei allen Stämmen die Temperatur der zweitwichtigste Faktor, auch wenn der Einfluss deutlich geringer ist als der der Stammwürze. Lediglich bei der Trockenhefe ist der Temperatureffekt im Verhältnis

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

gesehen sehr stark. Dieses könnte auf Stoffwechselfvorgänge, die mit dem Rehydrieren der Hefe zusammenhängen, zurückzuführen sein. Die Hefegabe hat kaum einen Einfluss auf die Bildung von 2-Methylbutanol, mit Ausnahme von Rh und der Trockenhefe bewegen sich die Werte in Bereich der Signifikanzgrenze ( $p$ -Wert  $> 0,05$ ). Interaktionen der Faktoren sind kaum zu finden. Da der Extraktgehalt und die Temperatur die Faktoren mit dem größten Einfluss darstellen, sind in Abb. 4.2 (a+b) die 2-Methylbutanolwerte mit steigender Stammwürze bei 9 °C (a) und bei 15 °C (b) dargestellt.



**Abb. 4.2 a+b: 2-Methylbutanolwerte in Abhängigkeit des Extraktes bei 9 °C (a) und 15 °C (b) bei verschiedenen Hefestämmen**

Dem Hefestamm wird ein großer Einfluss auf die Bildung von Stoffwechselprodukten zugesprochen. Dieses kann für 2-Methylbutanol durch die Versuche bestätigt werden. Die Differenzen der untersuchten Hefestämme werden mit zunehmendem Extrakt stärker und dieses ist insbesondere bei höheren Temperaturen der Fall.

Die meisten Hefestämme zeigen einen sehr linearen Anstieg des 2-Methylbutanols mit steigendem Extrakt. Der Anstieg ist jedoch bei den Hefestämmen unterschiedlich.

Für die Versuchsreihe zur Variation der Gärungsparameter und der Hefevitalität im 20-l-Maßstab, sind die Kennzahlen des Modells und die F-Werte für 2-Methylbutanol in der Tabelle 4.10 dargestellt.

**Tab. 4.10: Statistische Kennzahlen des 2-Methylbutanol-Modells für Versuche im 20 l Maßstab**

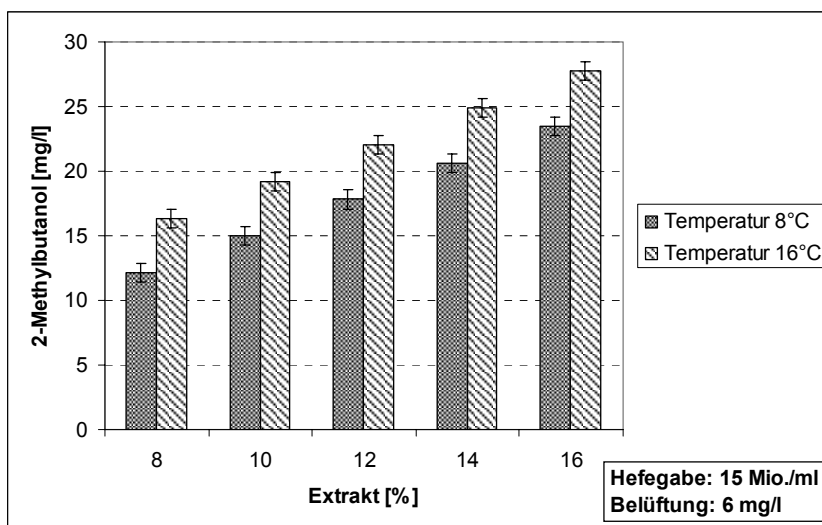
2-Methylbutanol						
Faktor	F-Wert	p-Wert	Diff. Modell/ Kontrollversuche			
Extrakt	676,9	< 0.0001	Gewählter Modelltyp	linear	K1 [%]	3,7
Hefegabe	33,2	< 0.0001	Lack of Fit [p-Wert]	0,33	K2 [%]	3,5
Temperatur	93,8	< 0.0001	Adj R-Squared	0,95	K3 [%]	4,2
Belüftung	9,4	0.0040	Pred. R-Squared	0,94	Vk Zentralpunkte [%]	6,8
			Adeq. Precision	48,96	Kontrollvers. in Konfidenzintervall?	
			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-	nein; nein; nein	

Modellgleichung: 2-Methylbutanol = 3,86 + 1,42 × Stammwürze + 0,16 × Hefegabe + 0,53 × Gärtemperatur - 0,34 × Belüftung

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Kennzahlen für die Güte des Modells zeigen alle sehr gute Werte und auch die Kontrollversuche liegen mit den Abweichungen unter dem V<sub>k</sub> der Zentralpunkte. Alle Kontrollversuche liegen gerade außerhalb der Grenze des 95 % Konfidenzintervalls. Die sehr geringen Abweichungen der Kontrollversuche deuten auf eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und realen Zusammenhängen hin. Die Betrachtung der F-Werte bestätigt die gefundenen Zusammenhänge des Vergleiches der Hefestämme. Den größten Einfluss auf das 2-Methylbutanol hat die Stammwürze, gefolgt durch die Temperatur. Die Hefegabe spielt ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle, auch wenn sie im signifikanten Bereich liegt. Der Belüftung dagegen kommt kaum eine Bedeutung zu und der Term „Hefevitalität“ war nicht-signifikant und wurde daher aus der Gleichung eliminiert. Signifikante Interaktionen zwischen den Parameter gibt es für 2-Methylbutanol in dieser Versuchsreihe nicht, was den Beobachtungen des Vergleiches der Hefestämme entspricht. Die Modellgleichung der Zusammenhänge ist ebenfalls in der Tab. 4.10 dargestellt.

Werden die beiden stärksten Einflussfaktoren gegeneinander aufgetragen, so ergibt sich das in Abb. 4.3 dargestellte Bild.

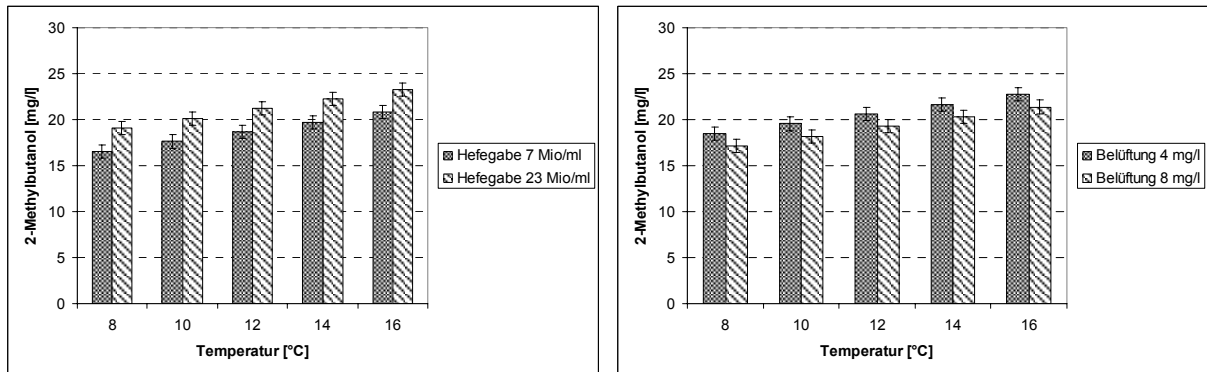


**Abb. 4.3: Einfluss von Extrakt und Gärtemperatur auf die Bildung von 2-Methylbutanol (20 l Maßstab)**

Wie schon aus dem Modell klar wird, sind die Zusammenhänge linearer Natur. Der Einfluss der Temperatur ist deutlich signifikant (die Fehlerbalken repräsentieren das KI 95 %) wobei die Stärke des Anstieges (Anstieg um ca. 20 %) in Bezug zur Verdoppelung der Temperatur gesehen werden muss.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da in der Regel in der Bierproduktion die Stammwürze ein nicht-veränderlicher Faktor ist, werden in Abb. 4.4 (a+b) die Faktoren Hefegabe (a) und Belüftung (b) der Temperatur bei 12 % Stammwürze gegenübergestellt.



**Abb. 4.4 a+b: Einfluss von Temperatur/Hefegabe (a) und Temperatur/Belüftung auf die Bildung von 2-Methylbutanol im 20-l-Maßstab**

Eine etwa 3-fache Hefegabe wirkt sich in leicht erhöhten Werten für 2-Methylbutanol aus. Das wird durch den Vergleich der Hefestämme bestätigt. Mit Ausnahme des Stammes 308, der eine leichte Abnahme bei erhöhter Hefegabe zeigt, ist bei allen Stämmen eine Zunahme zu verzeichnen. In der Regel ist diese gering, nur beim Stamm Rh deutlich (Berechnung anhand der Modellgleichungen AH Tab. 9 möglich). Eine Erhöhung der Belüftung führt zu einer geringfügigen Verringerung von 2-Methylbutanol. Die Veränderung liegt jedoch im Bereich der Signifikanzgrenze. Da die Belüftung bei dem Vergleich der Hefestämme nicht variiert wurde, sind hier keine Vergleichsdaten vorhanden.

Die Kennzahlen für das Modell der 2-Methylbutanolbildung für die Versuche im Produktionsmaßstab in der Brauerei A sind in Tab. 4.11 dargestellt.

**Tab. 4.11: Statistische Kennzahlen für das 2Methylbutanol-Modell der Versuche in Brauerei A**

Faktor	2-Methylbutanol			
	F-Wert	p-Wert		
Temperatur	3,0	0.1583	Lack of Fit [p-Wert]	0,75
Hefegabe	3,0	0.1583	Curvature [p-Wert]	0,00
Belüftung	60,5	0.0015	Adj R-Squared	0,92
Temperatur × Hefegabe	27,0	0.0065	Pred. R-Squared	0,89
Temperatur × Belüftung	12,0	0.0257	Adeq. Precison	18,25
Hefegabe × Belüftung	12,0	0.0257	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-

Modellgleichungen:

Belüftung 1 Sud: 2-Methylbutanol = +40,42 -1,50 × Temperatur -1,95 × Hefegabe +0,15 × Temperatur × Hefegabe

Belüftung 2 Sud: 2-Methylbutanol = +55,58 -2,50 × Temperatur -2,15 × Hefegabe +0,15 × Temperatur × Hefegabe

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Kennzahlen weisen das Modell als statistisch gut aus. Die Curvature ist in diesem Fall kleiner als 0,1 und daher verlaufen die Zusammenhänge zwischen den Punkten nicht linear. Daher sollten in den folgenden Diagrammen lediglich die Endpunkte betrachtet werden, da diese den tatsächlich gefundenen Werten entsprechen. Der wirkliche Verlauf zwischen den Punkten kann nur über aufwendigere faktorielle Versuche mit mehreren Stufen oder mittels RSM bestimmt werden. Die F-Werte des Modells zeigen, dass Temperatur und Hefegabe im Gegensatz zu den anderen Versuchsreihen keine Auswirkungen haben und keine signifikanten Terme darstellen ( $p$ -Wert  $>0,05$ ). Dass diese Terme nicht eliminiert wurden, liegt daran, dass sie aus Hierarchiegründen vorhanden sein müssen (Abschnitt 3.1.2). Ein nur geringer Effekt der Hefegabe war aus den vorhergehenden Versuchsreihen bekannt, die Temperatur hatte dort jedoch einen deutlichen Effekt. Der Unterschied ist jedoch in der geringen Variation der Temperatur im Produktionsmaßstab zu suchen ( $13\text{-}15^\circ\text{C}$ ).

Im den großtechnischen Versuchen hat nun die Belüftung die stärkste Auswirkung und ist damit ein Faktor, der zuvor kaum Einfluss auf 2-Methylbutanol hatte. Dieses kann jedoch darauf zurückgeführt werden, dass die verwendete Draufflasstechnik diesen Unterschied verursacht. Dass eine Zufuhr von Sauerstoff im Verlauf der Vermehrungsphase der Hefe zu Änderungen im Stoffwechsel führt und damit auch die Bildung höherer Alkohole beeinflusst, ist bekannt [68, 190, 242]. Die Gärungen bei denen nur der erste Sud belüftet wurde, sollten damit vergleichbar mit den vorangegangenen Versuchsreihen sein.

In Abb. 4.5 (a+b) sind die Zusammenhänge für Temperatur und Hefegabe einmal für die Belüftung eines Sudes (a) und für 2 Sude (b) dargestellt.

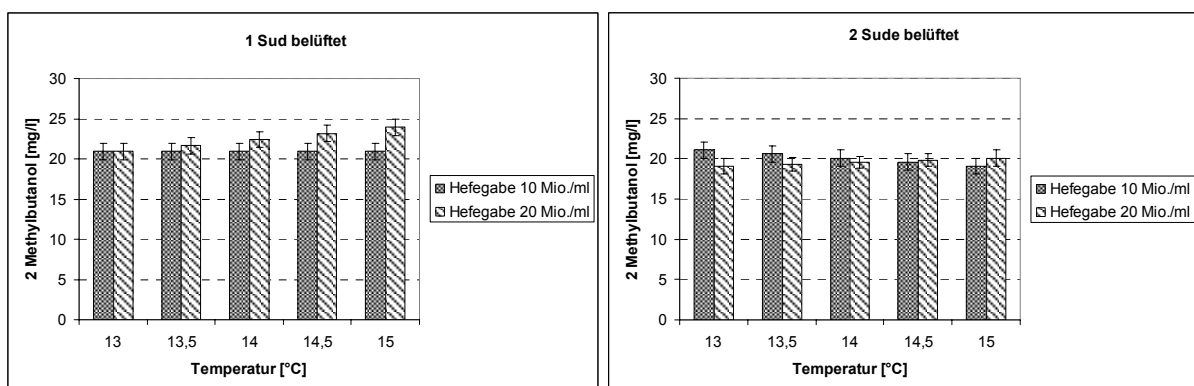


Abb. 4.5 a+b: Einfluss von Temperatur, Hefegabe und Belüftung auf die Bildung von 2-Methylbutanol in Brauerei A



## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Den Darstellungen ist zu entnehmen, dass bei den gewählten Variationen der Parameter die Konzentration von 2-Methylbutanol lediglich tendenziell verändert wird. Tab. 4.12 zeigt die Werte von 2 Methylbutanol für die Versuchskombinationen mit denen eine Übertragbarkeit zwischen den Versuchsmaßstäben getestet wird.

**Tab. 4.12: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (2-Methylbutanol)**

Bedingungen/Belüftung	2-Methylbutanol			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	≈ 6 mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml	20,1 ± 0,8 mg/l	20,7 ± 0,5 mg/l	20,9 ± 1,0 mg/l	21,1 ± 1,0 mg/l
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml	20,8 ± 0,8 mg/l	22,2 ± 0,5 mg/l	20,9 ± 1,0 mg/l	19,1 ± 1,0 mg/l
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml	21,3 ± 1,1 mg/l	21,7 ± 0,6 mg/l	20,9 ± 1,0 mg/l	19,1 ± 1,0 mg/l
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml	21,9 ± 1,1 mg/l	23,3 ± 0,6 mg/l	23,9 ± 1,0 mg/l	20,1 ± 1,0 mg/l

Für 2-Methylbutanol liegen die Werte nahe beieinander. Für die 3000 hl Gärungen mit zwei belüfteten Suden sind einige Werte bereits signifikant unterschiedlich, wobei zu erwarten war, dass die Versuche bei denen beide Sude/Tank belüftet wurden, andere Ergebnisse erbringen. Im Gegensatz zur Gärzeit ist für 2-Methylbutanol eine Übertragung von Ergebnissen zwischen den Maßstäben möglich.

### 4.2.2.2 3-Methylbutanol

Zu den Amylalkoholen, die einen wichtigen Einfluss auf das Bieraroma haben, gehört neben 2-Methylbutanol auch 3-Methylbutanol (Isoamylalkohol). Die statistischen Kennzahlen für die Modelle der Hefestämme sind in Tab. 4.13 dargestellt.

**Tab. 4.13: Statistische Parameter zur Beurteilung der 3-Methylbutanol-Modelle der verschiedenen Hefestämme**

	3-Methylbutanol				
	W34/70	308	Trockenhefe	Hebru	Rh
Gewählter Modelltyp	Linear	linear	quadratisch	linear	quadratisch
Lack of Fit [p-Wert]	0,96	0,01	0,03	0,41	0,09
Adj. R-Squared	0,90	0,89	0,92	0,92	0,97
Pred. R-Squared	0,87	0,83	0,81	0,89	0,92
Adeq. Precision	22,22	21,49	22,00	29,13	34,71
Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	8;10	-	-	-	7
<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>					
K1 [%]	21,4	4,6	4,8	4,1	84,1
K2 [%]	0,9	7,5	0,4	8,6	7,9
K3 [%]		3,9	0,4	3,2	1,0
Vk der Zentralpunkte [%]	4,9	1,4	1,3	4,4	1,3
Kontrollversuch in 95% Konfidenzintervall des Modells?	nein; ja	ja; nein; nein	ja; ja; ja	ja; nein; ja	nein; nein; ja

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Lack-of-Fit-Werte für den Stamm 308 und die Trockenhefe liegen leider im signifikanten Bereich und damit streuen die zugrunde liegenden Werte deutlich um das Modell. Auch für den Stamm Rh liegt dieser Wert nicht sehr hoch. Die weiteren Kennzahlen der Modelle weisen gute Werte auf. Die Abweichungen der Kontrollversuche zu den Modellen liegen mit Ausnahme von zwei Fällen deutlich unter 10 %, was auf gute Übereinstimmungen zwischen Modellen und den tatsächlichen Zusammenhängen hindeutet, auch wenn nicht alle Werte innerhalb der des Konfidenzintervalls liegen. Die zwei Werte, welche deutlich abweichen, sind den Kontrollversuchen zuzuordnen, die im Verdacht stehen Ausreißer darzustellen (grau unterlegte Werte, siehe Abschnitt 4.2.2.1).

Aus den F-Werten für diese Versuche, die in Tab. 4.14 dargestellt sind, geht hervor, dass, wie bei 2-Methylbutanol, die Stammwürze den dominantesten Einfluss darstellt. Im Gegensatz zu 2-Methylbutanol stellt in diesem Fall, mit Ausnahme von W34/70, die Hefegabe den zweitwichtigsten Faktor dar. Bei den Stämmen 308 und Hebru ist der Unterschied zwischen Temperatur und Hefegabe nur gering, bei Rh und Trockenhefe aber deutlich. Interaktionen der Faktoren spielen fast keine Rolle.

**Tab. 4.14: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die 3-Methylbutanolbildung der Hefestämme**

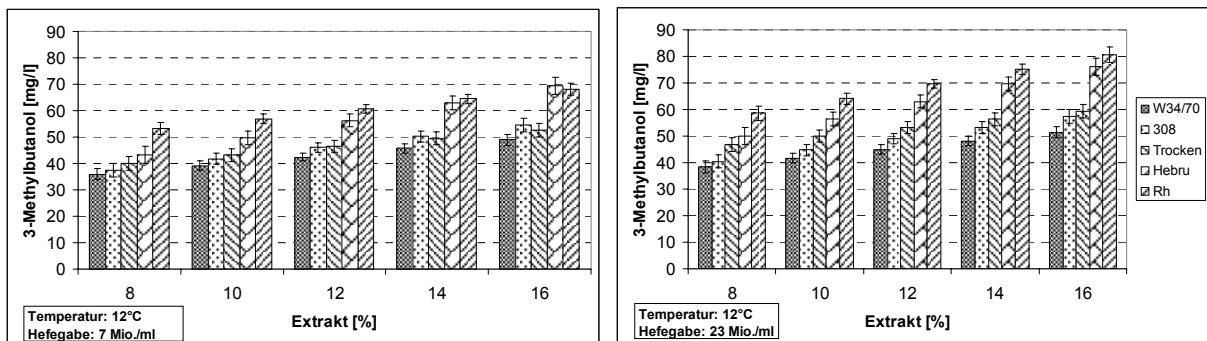
Faktor	3-Methylbutanol									
	W34/70		308		Trockenhefe		Hebru		Rh	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Extrakt	135,7	< 0,0001	137,5	< 0,0001	141,6	< 0,0001	197,5	< 0,0001	311,9	< 0,0001
Temperatur	26,4	0,0002	3,2	0,0931	0,0	0,8536	11,8	0,0037	15,7	0,0022
Hefegabe	6,0	0,0310	4,3	0,0562	41,2	< 0,0001	13,3	0,0024	73,2	< 0,0001
Extrakt ×Temperatur					3,6	0,0839				
Extrakt ×Hefegabe									8,9	0,0126
Temperatur ×Hefegabe					3,6	0,0839			8,2	0,0156

Die Gleichungen der Modelle sind im Anhang (AH Tab. 10) aufgeführt.

In der Abb. 4.6 (a+b) sind die Stämme unter Variation des Extraktes und bei einer Hefegabe von 7 Mio. Zellen/ml (a) und 23 Mio. Zellen/ml (b) aufgetragen um den Einfluss der dominantesten Faktoren darzustellen. Bei einer Hefegabe von 7 Mio. Zellen/ml können zwei Gruppen von Hefestämmen unterschieden werden. Eine Gruppe besteht aus W34/70, 308 und der Trockenhefe, bei denen die Werte etwa auf

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

einem Niveau liegen. Die andere Gruppe bilden Hebru und Rh, die insbesondere bei höheren Extraktgehalten auf einem deutlich höheren Niveau liegen.



**Abb. 4.6 a+b: 3-Methylbutanolwerte in Abhängigkeit des Extraktes mit 7 Mio. Zellen/ml (a) und 23 Mio. Zellen/ml (b) bei verschiedenen Hefestämmen**

Bei 23 Mio. Zellen/ml kommt es zu Abstufungen zwischen den Hefestämmen, wobei W34/70 den niedrigsten Wert markiert und die Werte sich über die Stämme 308, Trockenhefe, Hebru zum Stamm Rh, der den höchsten Wert bildet, steigern. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass die Konzentration von 3-Methylbutanol mit steigenden Extraktgehalten und mit steigender Hefegabe für alle Hefestämme ansteigt. Auch führt eine Temperaturerhöhung zu höheren Werten von 3-Methylbutanol, wobei die Differenzen gering sind. Lediglich die Trockenhefe zeigt mit ansteigenden Temperaturen zunächst eine ansteigende Tendenz, die jedoch oberhalb von 12 °C wieder leicht rückläufig wird (Berechnung anhand der Modellgleichungen AH Tab. 10 möglich).

Wird nun die dargestellte Gewichtung der Faktoren für die Versuchsreihe mit den Hefestämmen mit der Versuchsreihe im 20 l Maßstab verglichen, deren Kennzahlen in Tab. 4.15 dargestellt sind, so fällt auf, dass der Einfluss der Hefegabe deutlich kleiner ist und geringer ist als der Einfluss der Gärtemperatur. Da das Modell für den 20 l Maßstab sehr gute Werte aufweist und auch die Abweichungen der Kontrollversuche sehr gering sind, ist davon auszugehen, dass hier kein Fehler vorliegt und die Gewichtung der Einflussfaktoren unterschiedlich ist. In erster Linie verringert sich der Einfluss der Hefegabe. Wirkte sich eine Hefegabeänderung von 7 auf 23 Mio. Zellen/ml bei 12 % Extrakt im 2-l-Maßstab (Stamm Hebru) in einer Steigerung um knapp 7 mg/l aus, so sind dieses im 20-l-Maßstab nur noch etwa 3 mg/l.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tab. 4.15: Statistische Kennzahlen des 3-Methylbutanol-Modells für Versuche im 20-l-Maßstab**

3-Methylbutanol						
Faktor	F-Wert	p-Wert			Diff. Modell/ Kontrollversuche	
Extrakt	624,8	< 0,0001	Gewählter Modelltyp	quadratisch	K1 [%]	0,6
Hefegabe	5,3	0,0282	Lack of Fit [p-Wert]	0,75	K2 [%]	0,3
Temperatur	157,5	< 0,0001	Adj R-Squared	0,95	K3 [%]	3,8
Belüftung	0,4	0,5576	Pred. R-Squared	0,94	Vk Zentralpunkte [%]	6,6
Vitalität	2,8	0,0999	Adeq. Precision	37,22	Kontrollvers. in Konfidenzintervall?	
Extrakt × Temperatur	11,9	0,0016	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-	ja; ja; nein	
Extrakt × Belüftung	2,9	0,1003				

Modellgleichung hohe Vitalität: 3-Methylbutanol = 26,45 + 2,00 × Extrakt – 0,37 × Hefegabe – 0,11 × Gärtemperatur – 2,22 × Belüftung – 0,08 × Extrakt<sup>2</sup> + 0,02 × Hefegabe<sup>2</sup> + 0,13 × Extrakt × Gärtemperatur + 0,20 × Extrakt × Belüftung

Modellgleichung niedrige Vitalität: 3-Methylbutanol = 25,22 + 2,00 × Extrakt – 0,37 × Hefegabe – 0,11 × Gärtemperatur – 2,22 × Belüftung – 0,08 × Extrakt<sup>2</sup> + 0,02 × Hefegabe<sup>2</sup> + 0,13 × Extrakt × Gärtemperatur + 0,20 × Extrakt × Belüftung

Eine Temperaturerhöhung von 9 auf 15 °C bei sonst gleichen Bedingungen bewirkt bei 2 l Gärvolumen eine Steigerung von etwa 6 mg/l und bei 20 l von ca. 8 mg/l. Der Grund für die Veränderung ist vermutlich in der veränderten Behältergeometrie zu suchen. Ein weiterer möglicher Grund könnte die Würzezusammensetzung sein, aber dass eine etwas höhere FAN-Ausstattung der Würzen für den Vergleich der Hefestämme (235 mg/l gegenüber Versuchen im 20-l-Maßstab mit 193 mg/l) die Gewichtung der Faktoren derart in Richtung der Hefegabe verschiebt, ist unwahrscheinlich, zumal das Gesamtniveau an höheren Alkoholen durch mehr FAN steigen sollte. Wie aus Tab. 4.17 für die Übertragbarkeit der Versuchsmaßstäbe zu entnehmen ist, kann hier für 3-Methylbutanol nur von einer geringen Tendenz gesprochen werden. Dass bei 2-Methylbutanol keine Unterschiede feststellbar waren, spricht ebenfalls dafür, dass die Würzezusammensetzung hier nicht der ausschlaggebende Faktor ist.

In Abb. 4.7 ist der Zusammenhang der größten Einflussfaktoren auf die Bildung von 3-Methylbutanol (Extrakt und Temperatur) dargestellt. Deutlich ist der Anstieg des 3-Methylbutanols mit steigendem Extrakt zu erkennen, genauso wie der Einfluss der Gärtemperatur, der umso größer ist, je höher die Stammwürze. Die Gärtemperatur hat hier einen deutlichen Einfluss, wobei zu beachten ist, dass es sich um eine Verdopplung der Temperatur handelt.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

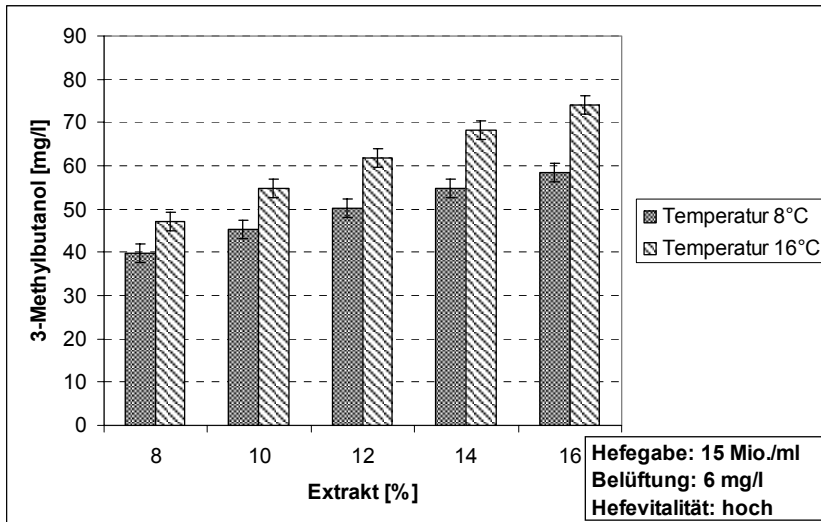


Abb. 4.7: Einfluss von Extrakt und Gärtemperatur auf die Bildung von 3-Methylbutanol (20-l-Maßstab)

Werden Einfluss von Hefegabe und Gärtemperatur gemeinsam dargestellt, ergibt sich das in Abb. 4.8 dargestellte Bild.

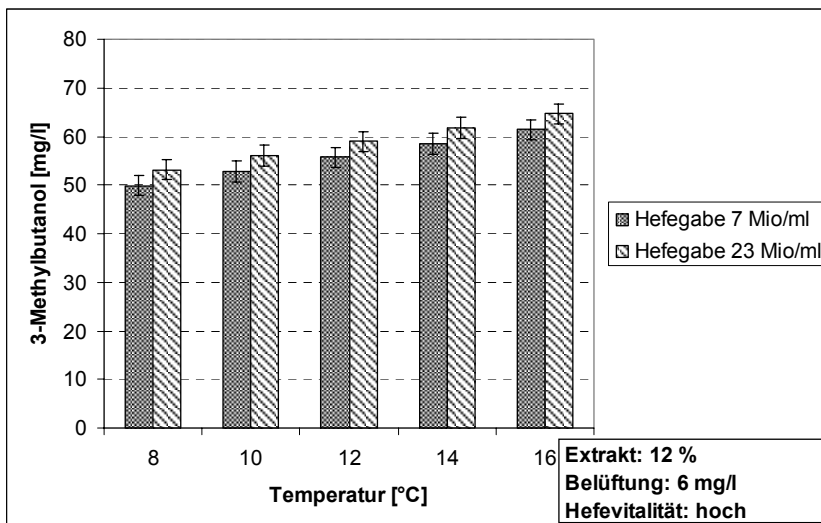
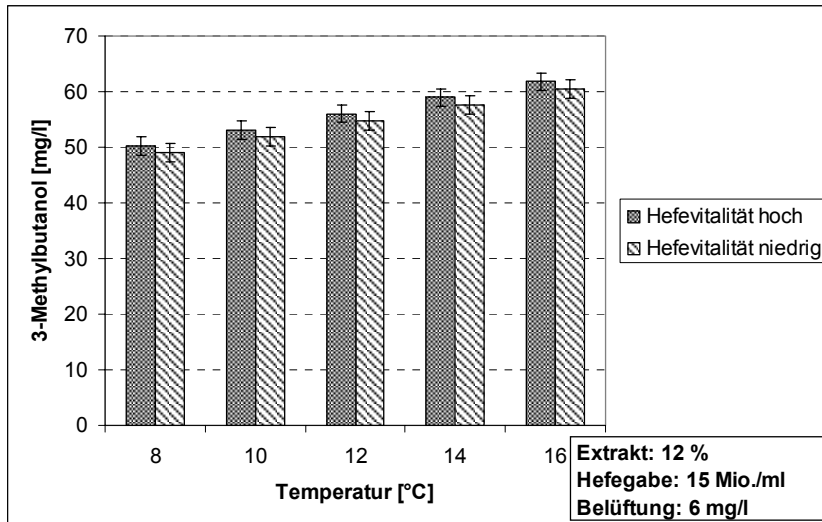


Abb. 4.8: Einfluss von Gärtemperatur und Hefegabe auf die Bildung von 3-Methylbutanol (20-l-Maßstab)

Zwar verursacht eine erhöhte Hefegabe auch in diesem Maßstab eine Erhöhung des 3-Methylbutanols, jedoch ist diese Erhöhung nicht signifikant.

Als wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit ist der Einfluss der Hefevitalität auf die Stoffwechselprodukte zu sehen. Für 3-Methylbutanol ist die Vitalität zwar als Term in der Modellgleichung vorhanden, aber wie Abb. 4.9 zeigt, sind die Auswirkungen nicht signifikant.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abb. 4.9: Einfluss von Gärtemperatur und Vitalität auf die Bildung von 3-Methylbutanol (20-l-Maßstab)**

Für die Versuche in Brauerei A ergeben sich die in Tab. 4.16 dargestellten Kennzahlen, die auf ein gutes Modell schließen lassen. Da die Curvature deutlich nicht-signifikant ist, ist davon auszugehen, dass die Werte sich linear verhalten.

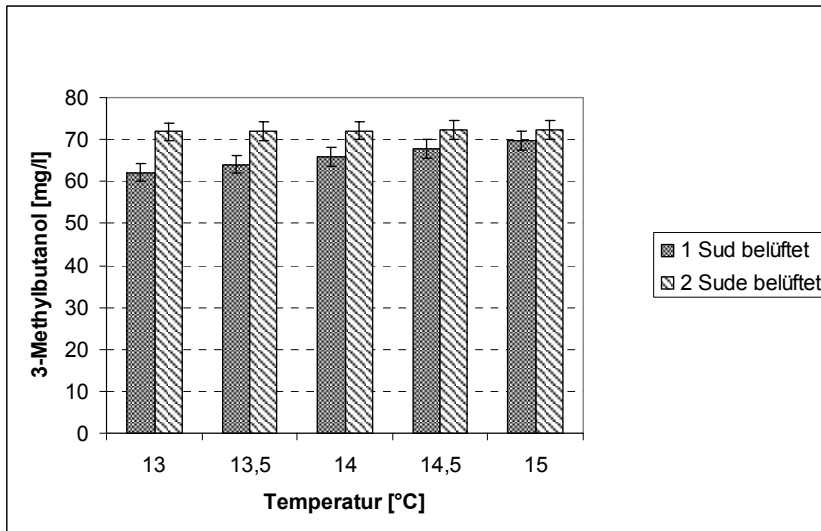
**Tab. 4.16: Statistische Kennzahlen für das 3-Methylbutanol-Modell der Versuche in Brauerei A**

3-Methylbutanol			
Faktor	F-Wert	p-Wert	
Temperatur	15,8	0,0053	Lack of Fit [p-Wert] 0,38
Belüftung	56,4	0,0001	Curvature [p-Wert] 0,42
Temperatur × Belüftung	12,1	0,0103	Adj R-Squared 0,89
			Pred. R-Squared 0,77
			Adeq. Precision 11,07
Modellgleichungen:			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.] -
Belüftung 1 Sud:	3-Methylbutanol = 13,417 + 3,75 × Temperatur		
Belüftung 2 Sude:	3-Methylbutanol = 68,583 + 0,25 × Temperatur		

Die Hefegabe ist als nicht signifikanter Term aus der Modellgleichung eliminiert worden, dieses unterstützt den im 20-l-Maßstab gefundenen Zusammenhang, dass die Hefegabe keinen nennenswerten Effekt auf die Bildung von 3-Methylbutanol hat. Der eher geringe Einfluss der Temperatur ist auf den kleinen Variationsbereich der Temperatur zurückzuführen, und der starke Einfluss der Belüftung beruht wiederum auf Draufflasstechnik mit einem Sudintervall von 6 h.

Da die Hefegabe in diesem Modell keine Rolle spielt, können in Abb. 4.10 die Zusammenhänge für Temperatur und Belüftung in einem Diagramm dargestellt werden.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abb. 4.10: Einfluss von Temperatur und Belüftung auf die Bildung von 3-Methylbutanol in Brauerei A**

Klar zu erkennen ist, dass beim Drauffassen eines belüfteten Sudes nach 6 h die Gärtemperatur keine nennenswerten Auswirkungen hat. Wird jedoch nur der erste Sud belüftet, so wird bei der geringen Temperatursteigerung von 2 °C die 3-Methylbutanolkonzentration um etwa 8 mg/l erhöht.

Werden die 3-Methylbutanol-Werte über die drei unterschiedlichen Gärungsmaßstäbe verglichen, so zeigt sich, dass die Abweichungen schon deutlicher werden als bei 2-Methylbutanol (Tab. 4.17). Die Versuche im Produktionsmaßstab, bei denen beide Sude/Tank belüftet wurden, sind aufgrund der Abweichungen nicht übertragbar, jedoch sind auch einige der anderen Versuche signifikant unterschiedlich. Eine Übertragung der Ergebnisse ist damit nur mit großer Vorsicht bei der Interpretation möglich.

**Tab. 4.17: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (3-Methylbutanol)**

Bedingungen/Belüftung	3-Methylbutanol			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	≈ 6 mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml	60,9 ± 2,0 mg/l	59,0 ± 1,6 mg/l	62,2 ± 2,2 mg/l	71,8 ± 2,2 mg/l
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml	65,1 ± 2,0 mg/l	61,1 ± 1,6 mg/l	62,2 ± 2,2 mg/l	71,8 ± 2,2 mg/l
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml	63,0 ± 2,8 mg/l	62,1 ± 1,7 mg/l	69,7 ± 2,2 mg/l	72,3 ± 2,2 mg/l
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml	67,2 ± 2,8 mg/l	64,1 ± 1,7 mg/l	69,6 ± 2,2 mg/l	72,3 ± 2,2 mg/l

**4.2.2.3 2-Phenylethanol**

2-Phenylethanol wird in der Analyse der Bieraromastoffe bestimmt. Aufgrund des großen Aufwands und des benötigten Probevolumens wurde diese Analyse für den Vergleich der Hefestämme nicht durchgeführt. Daher liegen nur Ergebnisse aus dem 20-l-Maßstab und aus den großtechnischen Versuchen vor. Die Daten des Modells aus dem 20-l-Maßstab sind in Tab. 4.18 dargestellt.

Auch wenn das Modell sehr gute Werte aufweist, so weichen die Kontrollversuche doch zum Teil deutlich von den Modellwerten ab. Dadurch muss in Zweifel gezogen, dass dieses Modell die tatsächlichen Zusammenhänge gut repräsentieren kann. Bei der Interpretation muss diese Abweichung auf alle Fälle berücksichtigt werden.

**Tab. 4.18 Statistische Kennzahlen des 2-Phenylethanol-Modells für Versuche im 20-l-Maßstab**

2-Phenylethanol				
Faktor	F-Wert	p-Wert		
Extrakt	18,3	0,0002	Gewählter Modelltyp	quadratisch
Hefegabe	4,7	0,0394	Lack of Fit [p-Wert]	0,85
Temperatur	1587,1	< 0,0001	Adj R-Squared	0,98
Belüftung	70,9	< 0,0001	Pred. R-Squared	0,97
Vitalität	13,2	0,0011	Adeq. Precision	49,50
Extrakt × Hefegabe	33,7	< 0,0001	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	39
Extrakt × Temperatur	7,8	0,0092	<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>	
Extrakt × Belüftung	12,8	0,0013	K1 [%]	26,4
Temperatur × Belüftung	11,6	0,0020	K2 [%]	14,1
			K3 [%]	15,6
			Vk Zentralpunkte [%]	7,1
			Kontrollvers. in Konfidenzintervall?	
			nein; nein; nein	

Modellgleichung hohe Vitalität: 2-Phenylethanol = 19545,23 - 1162,05 × Extrakt - 657,30 × Hefegabe + 1029,61 × Gärtemperatur - 2911,83 × Belüftung - 90,76 × Extrakt<sup>2</sup> - 13,36 × Hefegabe<sup>2</sup> + 97,40 × Extrakt × Hefegabe + 60,25 × Extrakt × Gärtemperatur + 239,91 × Extrakt × Belüftung + 146,87 × Gärtemperatur × Belüftung

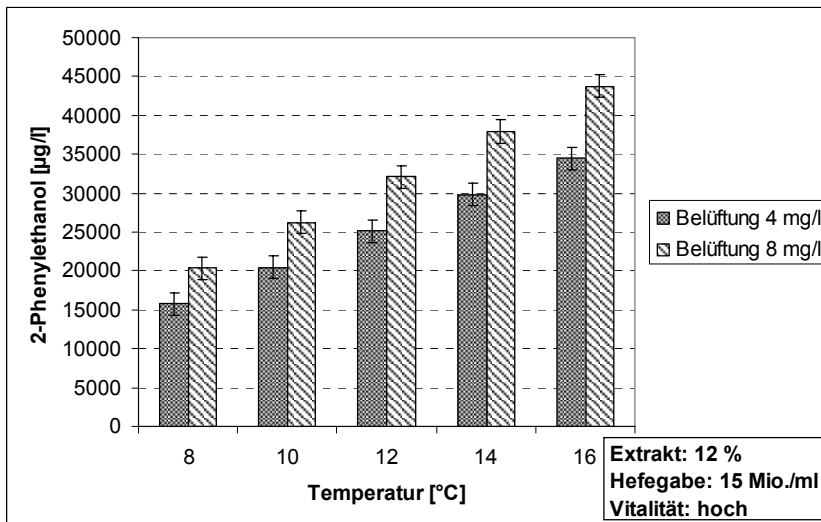
Modellgleichung niedrige Vitalität: 2-Phenylethanol = 17972,99 - 1162,05 × Extrakt - 657,30 × Hefegabe + 1029,61 × Gärtemperatur - 2911,83 × Belüftung - 90,76 × Extrakt<sup>2</sup> - 13,36 × Hefegabe<sup>2</sup> + 97,40 × Extrakt × Hefegabe + 60,25 × Extrakt × Gärtemperatur + 239,91 × Extrakt × Belüftung + 146,87 × Gärtemperatur × Belüftung

2-Phenylethanol wird empirisch als Indikator der Gärintensität verwendet. Damit sollte er von allen Faktoren beeinflusst werden, die die Gärgeschwindigkeit erhöhen, also Hefegabe, Belüftung und am deutlichsten durch die Gärtemperatur. Die F-Werte bestätigen, dass die Temperatur hier den stärksten Faktor darstellt. Der Einfluss der Stammwürze ist sehr gering, insbesondere verglichen mit dem Effekt, den dieser Faktor auf die Amylalkohole hat. Die Belüftung ist nach der Temperatur der stärkste Faktor. Diese Gewichtung bestätigt, dass 2-Phenylethanol als Indikator für die Gärintensität geeignet ist. Die Hefegabe an sich, die ebenfalls die Gärgeschwindigkeit



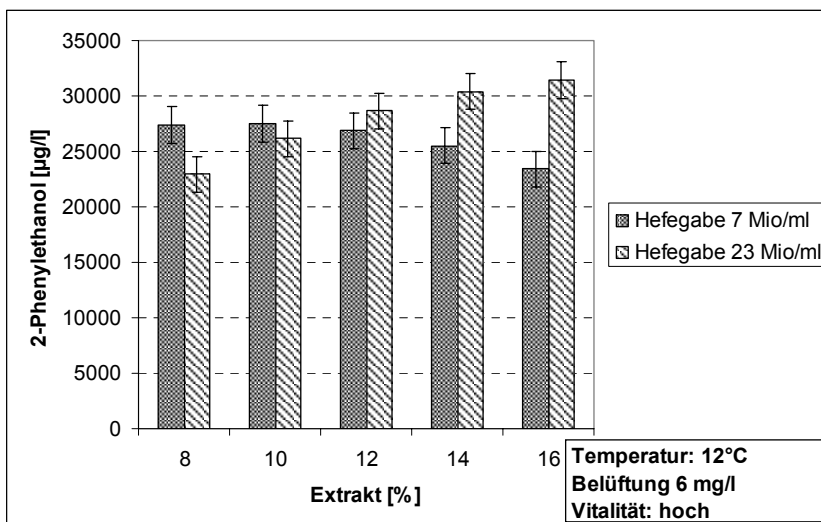
## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

beeinflusst, hat hier nahezu keinen Effekt. Jedoch stellt der Faktor, der an dritter Stelle für die Beeinflussung der Bildung von 2-Phenylethanol steht, eine Interaktion zwischen dem Extrakt und der Hefegabe dar. Daher hat auch die Hefegabe einen gewissen Einfluss auf die Bildung von 2-Phenylethanol.



**Abb. 4.11: Einfluss der Temperatur und Belüftung auf die Bildung von 2-Phenylethanol (20-l-Maßstab)**

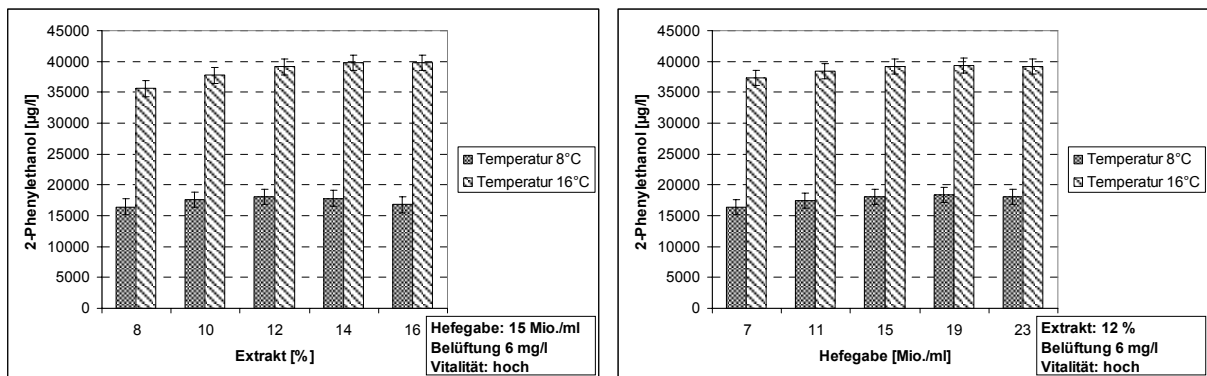
In Abb. 4.11 sind Temperatur und Belüftung als wichtigste Einflussfaktoren auf 2-Phenylethanol dargestellt. Der starke Einfluss der Temperatur verläuft linear, ebenso wie der Einfluss der Belüftung. Der Einfluss der Belüftung ist jedoch auch von der Temperatur abhängig und steigt mit steigender Temperatur.



**Abb. 4.12: Einfluss von Extrakt und Hefegabe auf die Bildung von 2-Phenylethanol (20-l-Maßstab)**

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auswirkungen auf den Gehalt an Phenylethanol hat auch die Interaktion zwischen Extrakt und Hefegabe. Interaktionen zeichnen sich durch gegenläufige Entwicklungen der Zielgröße unter dem Einfluss zweier oder mehrerer Faktoren aus, was sich für die genannte Interaktion anschaulich in Abb. 4.12 darstellen lässt. Bei einer niedrigen Hefegabe kommt es bei einer Steigerung der Stammwürze zu einer Abnahme des 2-Phenylethanol. Für hohe Hefegaben ist das Gegenteil der Fall. Für das Brauen bei gängigen Stammwürzen um 12 °P hat dieses jedoch keine Auswirkungen, da es in diesem Bereich keine signifikanten Unterschiede gibt. Auch wenn Extrakt und Hefegabe im Rahmen dieser Interaktion sich deutlich auf die Konzentration von 2-Phenylethanol auswirken, haben diese Faktoren einzeln gesehen keine großen Auswirkungen, beispielsweise wenn sie im Zusammenhang mit der Temperatur gesehen werden (Abb. 4.13 a+b).

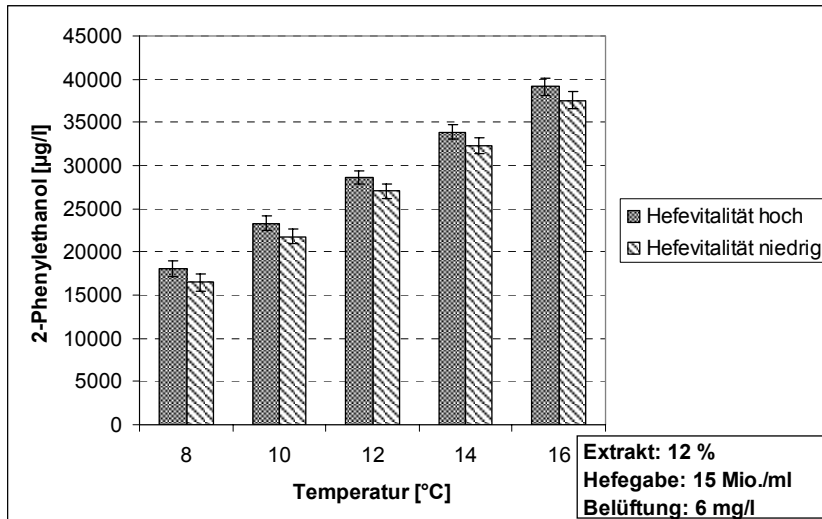


**Abb. 4.13 a+b: 2-Phenylethanol Werte in Abhängigkeit des Extraktes (a) und der Hefegabe (b) bei unterschiedlichen Temperaturen (20-I-Maßstab)**

Die Hefevitalität hat nur einen geringen Einfluss, der im Bereich der Signifikanzgrenze liegt (Abb. 4.14). Eine niedrige Hefevitalität führt jedoch in der Tendenz zu niedrigeren 2-Phenylethanol-Werten. Da eine niedrige Vitalität auch zu verringerten Gärgeschwindigkeiten führt (Abschnitt 4.2.1) unterstreicht dieser Zusammenhang die Bedeutung des 2-Phenylethanol als Indikator der Gärintensität.

Die dargestellten Interpretationen sind jedoch unter dem Vorbehalt zu betrachten, dass die Genauigkeit des Modells nicht bekannt ist, da die Kontrollversuchen nicht in guter Übereinstimmung mit dem Modell stehen.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abb. 4.14: Einfluss von Temperatur und Vitalität auf die Bildung von 2-Phenylethanol (20-I-Maßstab)**

In den Praxisversuchen der Brauerei A ergaben nur die Faktoren Temperatur und Belüftung signifikante Werte und gingen damit in das Modell ein, das sehr gute Werte aufweist (Tab. 4.19).

**Tab. 4.19: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das 2-Phenylethanol-Modell der Versuche in Brauerei A**

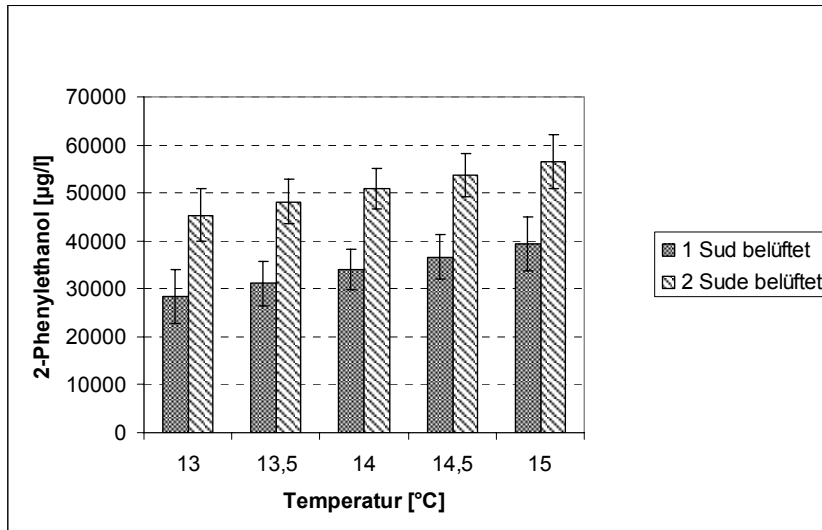
Faktor	F-Wert	2-Phenylethanol	
		p-Wert	
Temperatur	12,2	0,0081	Lack of Fit [p-Wert] 0,79
Belüftung	43,5	0,0002	Curvature [p-Wert] 0,71
			Adj R-Squared 0,84
			Pred. R-Squared 0,72
			Adeq. Precision 10,87
Modellgleichungen:			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.] -
Belüftung 1 Sud: Phenylethanol =	-43531 +5530,3 × Temperatur		
Belüftung 2 Sude: Phenylethanol =	-26492 +5530,3 × Temperatur		

Dass die Hefegabe nicht in die Modellgleichung mit eingegangen ist, zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Modell aus dem 20-I-Maßstab. Der Einfluss der Temperatur erscheint hier nun geringer, was auf die geringe Temperaturvariation zurückzuführen ist.

Dass der Temperatureinfluss absolut gesehen sogar größer ist als bei den Versuchen im 20-I-Maßstab, zeigt die Abb. 4.15 in der der Einfluss der Temperatur und der Belüftung dargestellt ist. Die Differenz zwischen 13 und 15 °C betrug in diesen Versuchen ca. 11000 µg/l während eine Temperatursteigerung im selben Bereich im 20-I-Maßstab lediglich eine Steigerung um etwa 5300 µg/l zufolge hatte. Dieser starke

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Einfluss der Temperatur kann auch darauf zurückzuführen sein, dass Gärungen im Großmaßstab auch deutlich schneller waren als vergleichbare Versuche im 20-l-Maßstab (siehe Tab. 4.7).



**Abb. 4.15: Einfluss von Temperatur und Belüftung auf die Bildung von 2-Phenylethanol in Brauerei A**

Der große Einfluss der Belüftung ist durch die Draufflasstechnik zu erklären. Interessant ist, dass die Belüftung des zweiten Sudes, die eine Steigerung des 2-Phenylethanol verursacht, auch eine Verkürzung der Gärzeit zur Folge hatte (Tab. 4.7). Auch dieses zeigt deutlich, dass sich 2-Phenylethanol sehr gut als Indikator der Gärungsintensität eignet.

Für die Übertragbarkeit zwischen den unterschiedlichen Gärgrößen zeigt die Tab. 4.20, dass aufgrund der großen Konfidenzintervalle eine Übertragbarkeit möglich ist (3000 hl Gärungen mit 2 belüfteten Sude werden nicht betrachtet).

**Tab. 4.20: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (2-Phenylethanol)**

Bedingungen/Belüftung	2-Phenylethanol			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	≈ 6 mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml		30207 ± 909 µg/l	28363 ± 5574 µg/l	45401 ± 5574 µg/l
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml		31997 ± 909 µg/l	28363 ± 5574 µg/l	45401 ± 5574 µg/l
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml		35559 ± 990 µg/l	39423 ± 5574 µg/l	56462 ± 5574 µg/l
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml		37349 ± 990 µg/l	39423 ± 5574 µg/l	56462 ± 5574 µg/l

### 4.2.2.4 Gesamtdiskussion höhere Alkohole

Es ist allgemein anerkannt, dass Hefestämme eine unterschiedliche Fähigkeit zur Bildung von höheren Alkoholen haben [14, 39, 68, 77, 80, 160, 190, 195, 256, 275, 314, 315]. Dies kann durch diese Arbeit bestätigt werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die verschiedenen Stämme bei der Bildung von höheren Alkoholen sehr unterschiedlich auf die Variation von Gärbedingungen reagieren. Dieses deckt sich mit den Angaben der Literatur [14, 77, 80, 97, 96, 160, 195, 256, 314, 315].

Ebenfalls zu den allgemein anerkannten Zusammenhängen gehört, dass bei höheren Stammwurzeln größere Konzentrationen an höheren Alkoholen gefunden werden [62, 314, 315]. Da in diesen Arbeiten, wie in den meisten Arbeiten, nur die Amylalkohole und Propanol analysiert wurden, kann dieses mit den vorliegenden Ergebnissen für die Amylalkohole bestätigt werden. Zu Veränderungen von 2-Phenylethanol mit dem Extraktgehalt wurden in der Literatur keine Angaben gefunden.

Für die Gärtemperatur wurde im Allgemeinen von einer Steigerung der höheren Alkohole mit steigender Temperatur berichtet [145, 190]. In einzelnen Veröffentlichungen wurden allerdings sehr unterschiedliche Aussagen getroffen. So fanden ENGAN und AUBERT [80] für die Amylalkohole für die Temperaturspanne von 8 bis 12 °C für zwei Hefestämme im Pilot- und Produktionsmaßstab zwar zum Teil vergleichbare Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit, aber auch Werte die bis 10 °C nur leicht anstiegen und dann wieder abnahmen. Die in dieser Arbeit gefundenen hauptsächlich linearen Zusammenhänge und die gefundenen Konzentrationsunterschiede sind vergleichbar mit den Erkenntnissen verschiedener Autoren [26, 68, 97, 96]. Der sehr dominante Einfluss der Temperatur auf die 2-Phenylethanolkonzentration wurde sowohl durch GEIGER [97, 96] als auch ENGAN und AUBERT [80] bestätigt.

Der Einfluss der Hefegabe wird in der Regel als gering bewertet. Die meisten Autoren fanden insbesondere für die Amylalkohole keine größeren Änderungen [68, 97, 96, 160, 288]. Dieses stimmt mit den hier gefundenen Werten überein. Der deutliche Einfluss der Hefegabe auf das 3-Methylbutanol im Vergleich der Hefestämme stellt eine Abweichung dar, die vermutlich durch die besonderen Verhältnisse bei den EBC-Gärsäulen verursacht wurde. Es gibt aber auch Untersuchungen, bei denen deutliche Anstiege mit steigender Hefegabe festgestellt wurden [26, 275]. Für 2-Phenylethanol fand GEIGER [97, 96] eine zum Teil deutliche Zunahme mit steigender Hefegabe was

im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erzielten Resultaten steht. Jedoch wurden auch zwei andere Hefestämme verwendet und für 2-Phenylethanol liegen in der vorliegenden Arbeit keine Werte für verschiedene Hefestämme vor.

Wurden Versuche mit belüfteter Würze mit unbelüfteten Versuchen verglichen, so fanden sich in der Literatur deutliche Zunahmen der Konzentrationen für die Amylalkohole [68, 97, 96, 160, 275]. Bei moderaten Variationen waren die Auswirkungen auf die Amylalkohole sehr gering [26, 68, 97, 96, 160, 275], was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten. DREWS und RIEMANN [68] führten auch Versuche mit Draufflasstechnik durch, bei denen im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit jedoch keine Auswirkungen gefunden wurden. Dieses könnte jedoch damit zusammenhängen, dass DREWS und RIEMANN nach 24h neue Würze draufgelassen hatten, wohingegen im vorliegenden Fall die Zeitspanne nur 6 h betrug.

GEIGER [97, 96] fand für 2-Phenylethanol bei einer Variation der Belüftung zwischen 8 bzw. 9 mg/l und ca. 17 mg/l für einen Hefestamm eine moderate Zunahme, für einen anderen Hefestamm jedoch sogar eine Abnahme des 2-Phenylethanol. Dieses steht in gewissem Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Der Einfluss der Hefevitalität auf die höheren Alkohole war in der Literatur nicht zu finden. Wie gezeigt werden konnte, hat die Vitalität im untersuchten Bereich (ICP 5,8 bzw. >6,2) keinen nennenswerten Einfluss auf die Amylalkohole. Auf 2-Phenylethanol war der Einfluss deutlicher, auch wenn dieser nicht groß war. Eine Hefe mit einer niedrigeren Hefevitalität führte zu verringerten 2-Phenylethanol-Werten, was auf eine Reduzierung der Gärintensität hinweist, welche auch eindeutig vorlag.

### **4.2.3 Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Esterbildung**

Ester beeinflussen das Bieraroma noch stärker als die höheren Alkohole, da die Geschmacksschwellenwerte von vielen Estern sehr niedrig liegen. Die konzentrationsstärksten Ester sind Ethylacetat und Isoamylacetat (3-Methyl-butylacetat), wobei dem Isoamylacetat der größere Einfluss auf das Bieraroma zugesprochen wird [169]. Beide Ester werden im folgenden Abschnitt behandelt. Aus der großen Anzahl der weiteren Ester, die im Rahmen der höheren Alkohole und Ester Analytik (Headspace-Methode) bzw. der Analytik der Bieraromastoffe (flüssig, -flüssig, -Extraktion) analysiert wurden, werden die Ethylester Buttersäure-, Hexansäure-, Octansäure- und Decansäure-Ethylester zu einem Summenparameter zusammengefasst und ausgewertet. Bei der Ethylestersynthese ist für die Ethylester

nicht Acetyl-CoA der Reaktionspartner eines Alkohols, wie bei den Acetatester, und damit kommen grundsätzlich andere Einflussfaktoren für die Bildung in Frage (Abschnitt 2.2.2).

#### 4.2.3.1 Ethylacetat

Die in der Tab. 4.21 dargestellten Kennzahlen der Ethylacetatmodelle für die verschiedenen Hefestämme zeigen zunächst statistisch akzeptable Werte, wobei die wichtigen Lack-of-Fit-Werte insgesamt in einem niedrigen Bereich liegen. Jedoch fällt nur das Modell für die Trockenhefe unter den unerwünschten Signifikanzwert von 0,05. Die Abweichungen der Kontrollversuche weisen jedoch extreme Abweichungen auf, die mit einer Ausnahme über 10 % liegen. Die meisten liegen sogar im Bereich von 20 bis über 50 %. Damit kann nicht davon ausgegangen werden, dass diese Modelle die tatsächlichen Zusammenhänge widerspiegeln können.

Teilweise ist diese Problematik in einer mangelhaften Reproduzierbarkeit zu suchen. Auch wenn zwei Hefestämme (308, Hebru) normale Variationskoeffizienten für die Zentralpunkte aufweisen, so erreichen die Werte der anderen Stämme nahezu 20 %, und damit ist eine aussagekräftige Modellbildung ohnehin nicht möglich. Teilweise kann diese Problematik der Reproduzierbarkeit auch durch die Analytik verursacht sein, denn die Ethylacetat-Analyse weist mit ca. 8 % den größten Variationskoeffizienten (n=10) für die Analyse der höheren Alkohole und Ester auf [116]. Somit kann es sein, dass sich die Fehler aus den Analysen zu den offensichtlich großen Fehlern der Gärung addieren.

**Tab. 4.21 Statistische Kennzahlen zur Beurteilung der Ethylacetat-Modelle der verschiedenen Hefestämme**

	Ethylacetat				
	W34/70	308	Trockenhefe	Hebru	Rh
Gewählter Modelltyp	linear	quadratisch	quadratisch	quadratisch	linear
Lack of Fit [p-Wert]	0,19	0,13	0,03	0,30	0,14
Adj. R-Squared	0,93	0,98	0,80	0,99	0,90
Pred. R-Squared	0,81	0,96	0,71	0,98	0,85
Adeq. Precision	24,47	37,10	13,76	59,31	21,72
Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	17	14	-	-	-
<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>					
K1 [%]	21,0	42,1	13,3	42,0	30,4
K2 [%]	2,1	37,3	35,0	42,7	13,2
K3 [%]		20,0	16,6	55,4	11,3
Vk der Zentralpunkte [%]	20,2	5,3	11,6	4,5	7,8
Kontrollversuch in 95% Konfidenzintervall des Modells?	<i>nein</i> ; ja	nein; nein; nein	ja; <i>nein</i> ; ja	nein; nein; nein	nein; ja; nein

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ein weiterer Grund für die Probleme bei der Modellbildung bzw. bei der Reproduzierbarkeit der Gärung kann in der sehr komplexen Regulierung der Esterbildung zu suchen sein, die in Abschnitt 2.2.2 dargestellt wurde. Die Bildung wird demnach sowohl durch die Verfügbarkeit von Substraten als auch durch die von äußeren Einflüssen verursachte genetische Regulierung beeinflusst. Daher kann es sein, dass in den kleinen Maßstäben nicht kontrollierbare Einflussfaktoren (z. B. Ungleichverteilung von Trub und damit von Fettsäuren in der verwendeten Würze) eine Rolle spielen und damit große Variationen verursachen.

Auch wenn die Modelle wahrscheinlich nicht den tatsächlichen Zusammenhängen entsprechen, werden die Ergebnisse dargestellt. In Tab. 4.22 sind die F-Werte und p-Werte für die Modelle der Hefestämme präsentiert. Die Modellgleichungen für die Hefestämme sind im Anhang (AH Tab. 11) dargestellt.

**Tab. 4.22: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die Ethylacetatbildung der Hefestämme**

Faktor	Ethylacetat									
	W34/70		308		Trockenhefe		Hebru		Rh	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Extrakt	140,9	< 0,0001	645,9	< 0,0001	39,0	< 0,0001	1834,0	< 0,0001	153,4	< 0,0001
Temperatur	23,9	0,0005	37,6	< 0,0001	6,5	0,0235	91,8	< 0,0001	5,6	0,0329
Hefegabe	0,3	0,5979	2,8	0,1228	5,6	0,0323	4,5	0,0585	8,1	0,0131
Extrakt ×Temperatur	28,9	0,0002	3,8	0,0770						
Extrakt ×Hefegabe	10,9	0,0071					29,8	0,0002	6,5	0,0228
Temperatur ×Hefegabe	10,9	0,0071					4,4	0,0601		

Die vorliegenden Modelle werden am dominantesten von der Stammwürze beeinflusst. Bei den Stämmen W34/70, 308 und Hebru hat die Gärtemperatur einen deutlichen Einfluss. Bei dem Stamm Rh und bei der Trockenhefe ist dieser Einfluss gering und in etwa auf dem Niveau der Hefegabe, die für die drei anderen Stämme nahezu keine Rolle spielt.

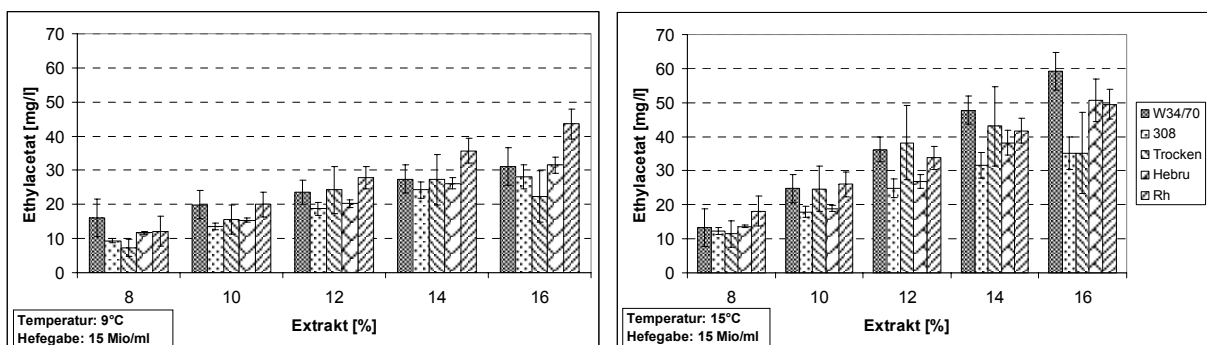
Die Stämme W34/70 und Hebru weisen dazu noch deutliche Interaktionen zwischen Faktoren auf, aber auch hier ist die Gewichtung unterschiedlich. Ob diese sehr unterschiedliche Regulierung der Ethylacetatbildung nun auf die mangelhaften Modelle zurückzuführen sind, oder ob sich die Hefestämme tatsächlich so deutlich unterscheiden, ist nicht feststellbar.

Bei der Darstellung der Einflüsse der Stammwürze bei 9 und 15 °C in Abb. 3.16 (a+b) wird schon durch die Konfidenzintervalle (95 %) deutlich, dass bei diesen Modellen



## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

große Unsicherheiten vorhanden sind. Die Darstellungen zeigen, dass bei niedrigen Stammwürzen (8 %) der Effekt einer Temperaturerhöhung um 6 °C eher gering ist, lediglich beim Stamm Rh wird die Konzentration deutlich gesteigert. Der Temperatureffekt ist bei den meisten Stämmen umso stärker, je höher der Extrakt ist. Sehr deutlich ist dieser Effekt bei dem Stamm W34/70 zu finden. Dieses trifft nicht für den Hefestamm Rh zu. Hier nimmt die Konzentration durch eine Temperaturerhöhung über den gesamten Extraktbereich gleichmäßig zu.



**Abb. 4.16 a+b:** Ethylacetatwerte in Abhängigkeit des Extraktes bei 9 °C (a) und 15 °C (b) für verschiedene Hefestämme

Technologisch ist das Verhalten von Hefestämmen bei verschiedenen Extraktgehalten beim High Gravity Brauen von großer Bedeutung. Die meisten Hefestämmen bilden mit steigender Stammwürze überproportional viel Ester damit hat ein mit High Gravity hergestelltes Bier nach dem Rückverdünnen noch eine deutlich höhere Konzentration an Estern, verglichen mit einem Bier, das ohne High Gravity hergestellt worden ist.

Das Modell für die Versuche im 20-l-Maßstab weist vergleichbare Probleme auf wie die Modelle beim Vergleich der Hefestämmen (Tab. 4.23). Die statistischen Kennzahlen des Modells sind sehr gut, jedoch ist der V<sub>k</sub> der Zentralpunkte mit 16 % sehr hoch. Zudem weist ein Kontrollversuch ebenfalls eine sehr deutliche Abweichung vom Modell auf. Die beiden anderen Kontrollversuche jedoch liegen mit etwa 10 % in einem noch akzeptablen Rahmen und in diesem Fall damit deutlich unterhalb des V<sub>k</sub>. Damit sollte das Modell die Zusammenhänge für die Ethylacetatbildung nährungsweise darstellen können. Die ungünstige Reproduzierbarkeit geht in die Darstellung der Konfidenzintervalle ein.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tab. 4.23: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Ethylacetat-Modells für Versuche im 20-l-Maßstab**

Ethylacetat			
Faktor	F-Wert	p-Wert	
Extrakt	515,7	< 0,0001	Gewählter Modelltyp quadratisch
Hefegabe	0,0	0,8987	Lack of Fit [p-Wert] 0,73
Temperatur	4,1	0,0509	Adj R-Squared 0,93
Belüftung	3,5	0,0705	Pred. R-Squared 0,90
Vitalität	2,9	0,0985	Adeq. Precision 29,59
Extrakt × Hefegabe	6,6	0,0155	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.] -
Extrakt × Temperatur	5,1	0,0311	<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>
Temperatur × Vitalität	3,9	0,0559	K1 [%] 10,4
			K2 [%] 38,8
			K3 [%] 11,2
			Vk Zentralpunkte [%] 16,0
			Kontrollvers. in Konfidenzintervall? ja; nein; ja

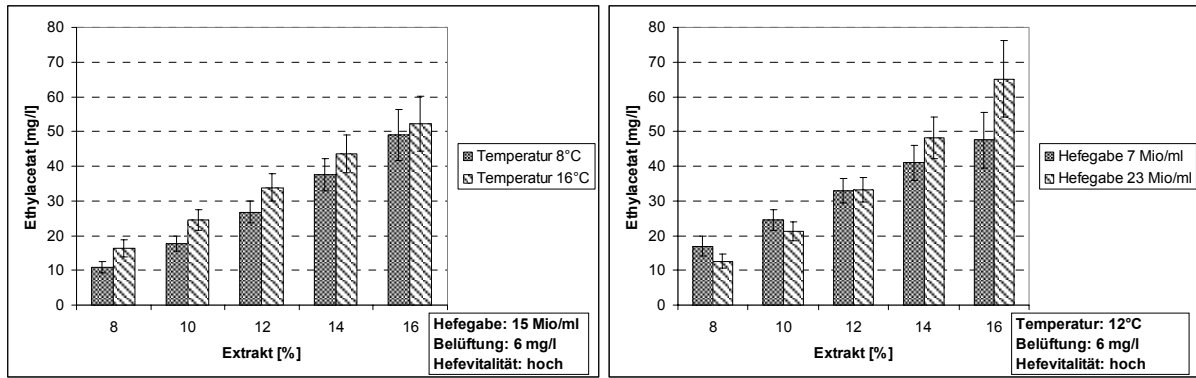
Modellgleichung hohe Vitalität:  $\text{Log}_{10}(\text{Ethylacetat}) = -0,53 + 0,16 \times \text{Extrakt} - 0,02 \times \text{Hefegabe} + 0,10 \times \text{Gärtemperatur} + 0,02 \times \text{Belüftung} - 0,004 \times \text{Extrakt}^2 - 0,003 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 0,002 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} - 0,002 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur}$

Modellgleichung niedrig Vitalität:  $\text{Log}_{10}(\text{Ethylacetat}) = -0,34 + 0,16 \times \text{Extrakt} - 0,02 \times \text{Hefegabe} + 0,10 \times \text{Gärtemperatur} + 0,02 \times \text{Belüftung} - 0,004 \times \text{Extrakt}^2 - 0,003 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 0,002 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} - 0,002 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur}$

Im Vergleich zum Verhalten des Stammes Hebru im 2-l-Maßstab ist der Temperatureffekt für den 20-l-Maßstab deutlich geringer. Auch wenn im Allgemeinen von einem starken Einfluss der Gärtemperatur auf die Esterbildung berichtet wird, so wird insbesondere für Ethylacetat für die Bereiche 8,5-16 °C bzw. 9-18 °C von einigen Autoren von einem sehr geringen Einfluss der Temperatur berichtet [144, 172]. In beiden Untersuchungen wurde der Hefestamm W34 verwendet. Auch wenn in der vorliegenden Untersuchung der Stamm Hebru verwendet wurde, ist ein ähnlich geringer Einfluss der Temperatur auf die Ethylacetatbildung denkbar.

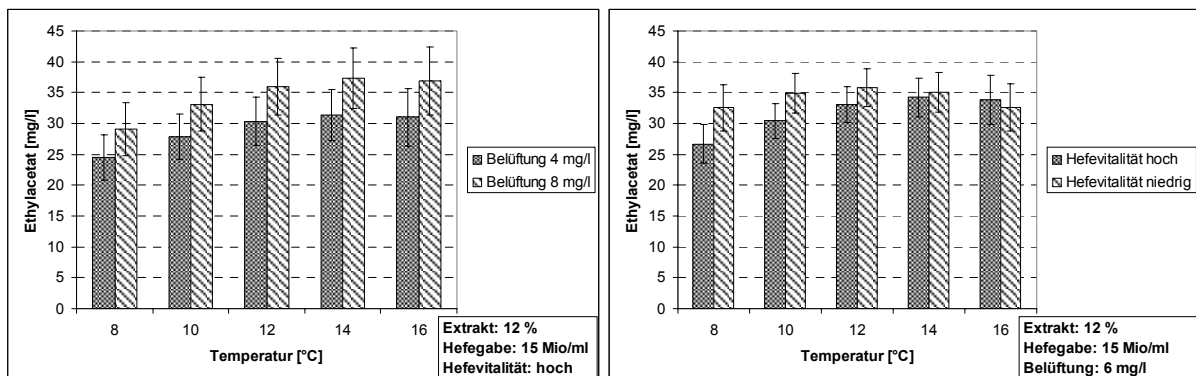
In Abb. 4.17 (a+b) ist der Einfluss von Stammwürze und Temperatur (a) als auch von Stammwürze und Hefegabe (b) auf die Konzentration von Ethylacetat dargestellt. Der Anstieg von Ethylacetat mit dem Extraktgehalt ist sehr deutlich (Verdopplung der Stammwürze führt zu 3 bis 5fachem Anstieg). Der Temperatureffekt ist in bestimmten Extraktbereichen zwar signifikant, jedoch nimmt die Unsicherheit des Modells mit steigendem Extraktgehalt zu. Wie aus den Modelltermen zu entnehmen ist, existiert eine Interaktion zwischen Extrakt und Hefegabe (Abb. 4.17 b). Diese zeigt sich in einem starken Anstieg des Ethylacetates bei hohen Hefegaben mit zunehmendem Extraktgehalt. Bei niedrigen Hefegaben ist der Anstieg geringer.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abb. 4.17 a+b: Einfluss von Extrakt/Temperatur (a) und Extrakt/Hefegabe auf die Bildung von Ethylacetat im 20-l-Maßstab**

In Abb. 4.18 a ist der Einfluss der Temperatur und der Belüftung auf den Gehalt an Ethylacetat dargestellt. Eine erhöhte Belüftung führt zu deutlich höheren Gehalten, jedoch sind diese Werte aufgrund der hohen Unsicherheit des Modells nicht signifikant. Bei niedrigen Temperaturen bilden Hefen mit einer schlechteren Vitalität höhere Gehalte an Ethylacetat, jedoch sind auch diese Werte nicht signifikant.



**Abb. 4.18: Einfluss von Temperatur/Belüftung (a) und Temperatur/Hefevitalität auf die Bildung von Ethylacetat im 20-l-Maßstab**

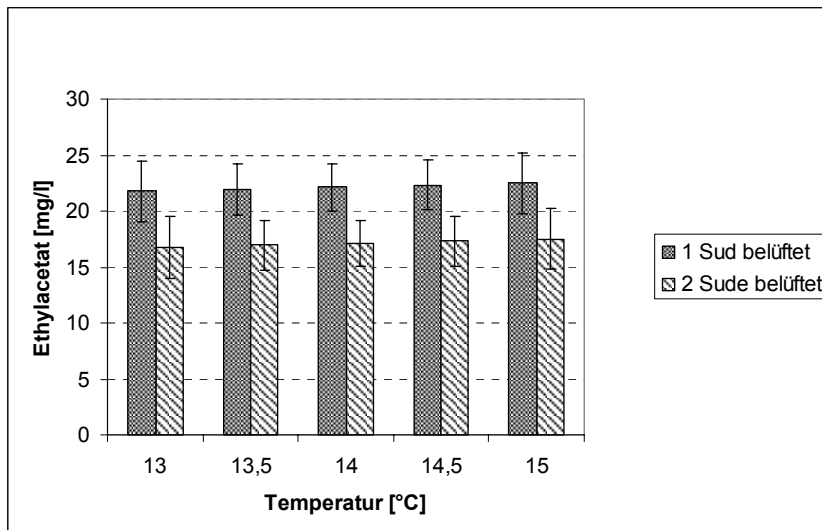
Im Bereich der Produktion ergaben die gewählten Variationen der Faktoren kein gutes Modell, da lediglich der Unterschied in der Belüftung durch die Draufasstechnik einen signifikanten Effekt ergab ( $p < 0,05$ ). Um ein Modell mit mehreren Faktoren bilden zu können, wurde die Temperatur in das Modell aufgenommen, auch wenn dieser Faktor keinen signifikanten Effekt aufweist (Tab. 4.24).

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tab. 4.24: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Ethylacetat-Modell der Versuche in Brauerei A**

Faktor	Ethylacetat			
	F-Wert	p-Wert		
Temperatur	0,2	0,6417	Lack of Fit [p-Wert]	0,04
Belüftung	15,6	0,0042	Curvature [p-Wert]	0,12
			Adj R-Squared	0,58
			Pred. R-Squared	0,33
			Adeq. Precision	6,12
Modellgleichungen:			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-
Belüftung 1 Sud: Ethylacetat =	$16,875 + 0,375 \times \text{Temperatur}$			
Belüftung 2 Sud: Ethylacetat =	$11,875 + 0,375 \times \text{Temperatur}$			

Die sich aus dem Modell ergebenden Zusammenhänge sind in Abb. 4.19 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nur die Belüftung einen Einfluss hat. Das Drauffassen eines belüfteten Sudes nach 6 h führt dabei zu niedrigeren Ethylacetat-Werten.



**Abb. 4.19: Einfluss von Temperatur und Belüftung auf die Bildung von Ethylacetat in Brauerei A**

Die in Tab. 4.25 dargestellten Werte für die Überprüfung auf Übertragbarkeit zwischen den Versuchsmaßstäben zeigen, dass dieses für Ethylacetat nicht möglich ist. Die Ergebnisse zwischen den beiden Pilotmaßstäben liegen noch in einem ähnlichen Bereich, wobei auch hier die Differenzen deutlich sind. Die Werte in der Produktion liegen weit unter den Werten der Kleingärungen. Aus diesen Versuchsreihen geht hervor, dass es schwierig ist, Vorhersagen über Ethylacetat-Gehalte zu machen. Eindeutige Einflussfaktoren sind lediglich der Hefestamm und der Extraktgehalt, wobei auch hier genaue Vorhersagen nicht getroffen werden können. Die Faktoren Temperatur und Belüftung haben zwar Einflüsse, jedoch ist hier

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

das Ausmaß kaum abschätzbar und bei der Belüftung ist auch die Richtung der Auswirkung nicht eindeutig. Eine höhere Belüftung zu Beginn der Gärung scheint höhere Werte zu verursachen. Wird im Rahmen der Draufflasstechnik zu einem späteren Zeitpunkt belüftet, so kommt es zu einer Reduzierung.

**Tab. 4.25: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Ethylacetat)**

Bedingungen/Belüftung	Ethylacetat			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	≈ 6 mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml	34,5 ± 2,1 mg/l	36,0 ± 3,6 mg/l	21,8 ± 2,7 mg/l	16,8 ± 2,7 mg/l
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml	34,3 ± 2,1 mg/l	38,4 ± 3,7 mg/l	21,8 ± 2,7 mg/l	16,8 ± 2,7 mg/l
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml	30,0 ± 2,7 mg/l	37,1 ± 4,0 mg/l	22,5 ± 2,7 mg/l	17,5 ± 2,7 mg/l
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml	30,9 ± 2,9 mg/l	38,6 ± 4,2 mg/l	22,5 ± 2,7 mg/l	17,5 ± 2,7 mg/l

### 4.2.3.2 Isoamylacetat

Isoamylacetat (3-Methyl-butyl-acetat) gilt als der aromarelevanteste Ester in Bier (Abschnitt 2.2.2). Die statistischen Kennzahlen der Modelle weisen etwas bessere Werte auf als die Modelle für Ethylacetat (Tab. 4.26). Jedoch sind die Variationskoeffizienten der Zentralpunkte ähnlich hoch wie die von Ethylacetat. Auch weisen die Kontrollversuche in vielen Fällen hohe Abweichungen auf. Werden die grau unterlegten Kontrollversuch nicht betrachtet, da diese Kontrollversuche im Verdacht stehen, selbst Ausreißer zu sein (siehe Abschnitt 4.2.2.1), so liegt die überwiegende Mehrheit der Kontrollversuche im Konfidenzintervall (95 %) des Modells. Dieses deutet darauf hin, dass die Modelle eine akzeptable Näherung für die tatsächlichen Zusammenhänge sind. Die Modellgleichungen sind im Anhang (AH Tab. 12) dargestellt.

**Tab. 4.26: Statistische Kennzahlen zur Beurteilung der Isoamylacetat-Modelle der verschiedenen Hefestämme**

	Isoamylacetat				
	W34/70	308	Trockenhefe	Hebru	Rh
Gewählter Modelltyp	linear	quadratisch	quadratisch	quadratisch	quadratisch
Lack of Fit [p-Wert]	0,40	0,05	0,37	0,26	0,83
Adj. R-Squared	0,62	0,89	0,80	0,98	0,93
Pred. R-Squared	0,52	0,83	0,70	0,92	0,91
Adeq. Precision	9,98	18,34	15,47	36,72	26,47
Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-	-	-	4	2
<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>					
K1 [%]	42,3	28,3	13,9	9,4	18,8
K2 [%]	6,1	15,6	40,9	19,0	8,3
K3 [%]		8,6	11,6	30,6	1,9
Vk der Zentralpunkte [%]	17,9	5,2	13,2	4,2	8,4
Kontrollversuch in 95% Konfidenzintervall des Modells?	nein; ja	nein; ja; ja	ja; nein; ja	ja; nein; nein	nein; ja; ja

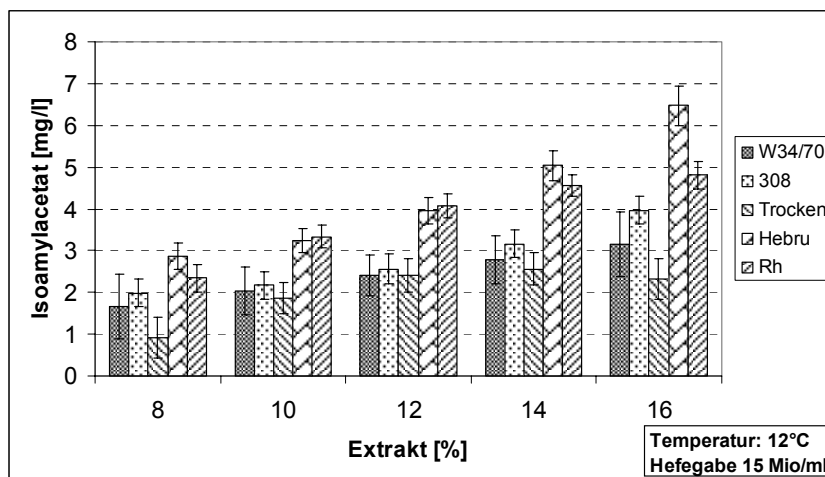
## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Anhand der F-Werte der Modelle (Tab. 4.27) wird deutlich, dass die Stammwürze, wie bereits bei den betrachteten, aliphatischen höheren Alkoholen und bei Ethylacetat, den stärksten Einfluss auf die Bildung von Isoamylacetat hat. Die Gärtemperatur ist bei den meisten Hefestämmen der zweitwichtigste Einflussfaktor. Hier bildet die Trockenhefe die Ausnahme, was jedoch wahrscheinlich auf das Rehydrieren zurückzuführen ist. Die Hefegabe hat in den meisten Fällen kaum einen Einfluss und es sind auch nur sehr wenige Interaktionen an der Bildung von Isoamylacetat beteiligt.

**Tab. 4.27: F-Werte und p-Werte der Modellterme für die Isoamylacetatbildung der Hefestämme**

Faktor	Isoamylacetat									
	W34/70		308		Trockenhefe		Hebru		Rh	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Extrakt	16,6	0,0011	135,2	< 0,0001	29,4	< 0,0001	562,0	< 0,0001	171,4	< 0,0001
Temperatur	13,6	0,0024	11,6	0,0047	6,5	0,0229	125,6	< 0,0001	21,7	0,0004
Hefegabe	0,1	0,7494	0,1	0,8179	20,9	0,0004	35,4	0,0001	7,2	0,0191
Extrakt ×Temperatur	3,3	0,0900					16,3	0,0024		
Extrakt ×Hefegabe										
Temperatur ×Hefegabe							6,8	0,0263		

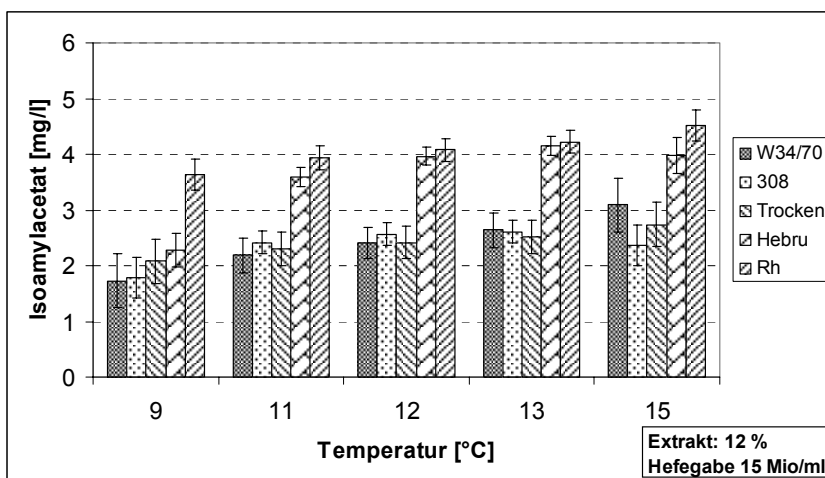
In Abb. 4.20 ist der Einfluss der Stammwürze auf die Konzentration von Isoamylacetat dargestellt. Grundsätzlich steigen die Werte mit steigendem Extraktgehalt an. Jedoch sind die Verläufe sehr unterschiedlich. So ist neben einem linearen Anstieg (W34/70) ein eher potentieller Anstieg (308, Hebru) bzw. ein logarithmischer Anstieg (Trockenhefe, Rh) zu finden. Im absoluten Bildungsvermögen zeigen die Stämme Hebru und Rh die höchsten Werte.



**Abb. 4.20: Isoamylacetatwerte in Abhängigkeit des Extraktes für verschiedene Hefestämme**

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Betrachtung der Gärtemperatur ergibt sich ein ähnliches Bild mit unterschiedlichen Verläufen (Abb. 4.21). Wie beim Extrakt führen höhere Gärtemperaturen zu erhöhten Werten von Isoamylacetat. Neben einem linearen Anstieg zwischen 9 und 15 °C (Rh) ist hier der dominierende Verlauf ein logarithmischer Anstieg, der bei höheren Temperaturen wieder abflacht (308, Trockenhefe, Hebru), wobei es bei den Stämmen 308 und Hebru zwischen 13 und 15 °C bereits zu einer Abnahme kommt. Der Stamm W34/70 weist einen S-förmigen Verlauf auf, wobei für diesen Stamm anhand des Konfidenzintervalls eine große Unsicherheit deutlich wird.



**Abb. 4.21: Isoamylacetatwerte in Abhängigkeit der Temperatur für verschiedene Hefestämme**

Für die Stämme W34/70 und 308 gibt es keine Abhängigkeit des Isoamylacetates von der Hefegabe, für die anderen drei Stämme kommt es bei einer Erhöhung der Hefegabe zu einer Abnahme des Isoamylacetates. Die Verläufe sind linear, wobei die Steigung bei den Hefestämmen unterschiedlich ist (Daten sind aus den Modellgleichungen AH Tab. 12 darstellbar). Für den Stamm Hebru waren im Vergleich der Hefestämme die Faktoren Extrakt und Temperatur die dominierenden, es lag aber noch ein deutlicher Einfluss der Hefegabe vor.

Aus Tab. 4.28 geht für den 20-I-Maßstab hervor, dass in diesem Fall für den Stamm Hebru nur noch die Faktoren Extrakt und Temperatur einen deutlichen Einfluss haben. Das Modell weist gute statistische Werte auf, wobei für einen der Kontrollversuche eine große Abweichung vom Modell vorliegt. Die anderen beiden Werte liegen deutlich innerhalb des V<sub>k</sub> der Zentralpunkte, der eine große Streuung aufweist. Ob die Abweichung des einen Kontrollversuches darauf zurückzuführen ist,

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

dass es sich bei dem Kontrollversuch um einen Ausreißer handelt, oder ob das Modell an dieser Stelle nicht funktioniert, kann nicht geklärt werden.

**Tab. 4.28: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Isoamylacetat-Modells für Versuche im 20-l-Maßstab**

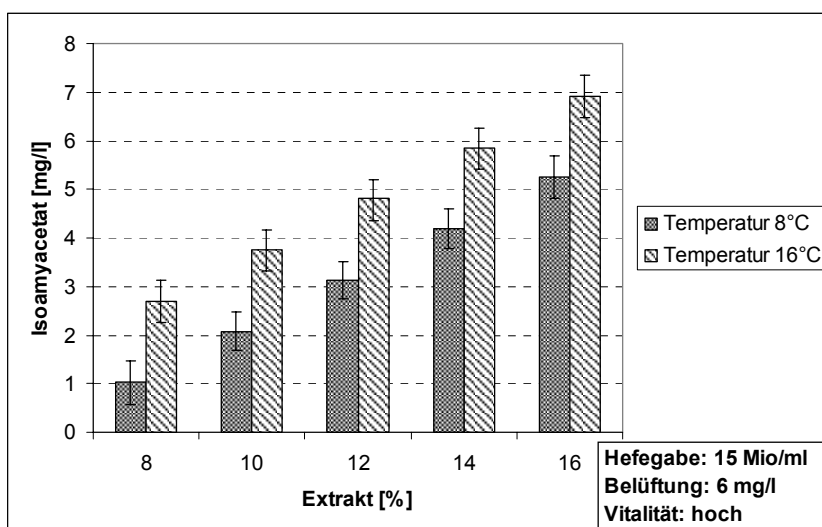
			Isoamylacetat	
Faktor	F-Wert	p-Wert		
Extrakt	417,1	< 0,0001	Gewählter Modelltyp	quadratisch
Hefegabe	3,8	0,0579	Lack of Fit [p-Wert]	0,67
Temperatur	29,7	< 0,0001	Adj R-Squared	0,92
Vitalität	0,5	0,4975	Pred. R-Squared	0,90
Temperatur × Vitalität	7,0	0,0122	Adeq. Precision	32,72
			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-
			<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>	
			K1 [%]	9,4
			K2 [%]	33,3
			K3 [%]	2,0
			Vk Zentralpunkte [%]	12,4
			Kontrollvers. in Konfidenzintervall?	
Modellgleichungen:			<i>nein</i> ; nein; ja	

Modellgleichungen:

hohe Vitalität: Isoamylacetat =  $-8,249 + 0,527 \times \text{Extrakt} - 0,025 \times \text{Hefegabe} + 0,913 \times \text{Gärtemperatur} - 0,029 \times \text{Gärtemperatur}^2$

niedrige Vitalität: Isoamylacetat =  $-6,724 + 0,527 \times \text{Extrakt} - 0,025 \times \text{Hefegabe} + 0,777 \times \text{Gärtemperatur} - 0,029 \times \text{Gärtemperatur}^2$

In Abb. 4.22 sind Extrakt und Gärtemperatur als dominierende Einflussfaktoren auf die Bildung von Isoamylacetat dargestellt. Der Konzentrationsverlauf in Abhängigkeit des Extraktes ist für die beiden Pilotmaßstäbe vergleichbar.



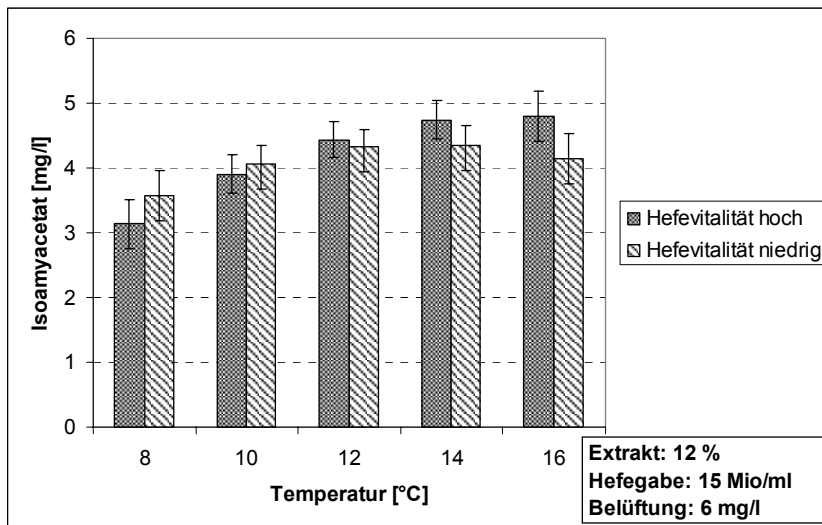
**Abb. 4.22: Einfluss von Extrakt und Gärtemperatur auf die Bildung von Isoamylacetat (20-l-Maßstab)**

In der Abb. 4.23 sind die Einflüsse von Temperatur und Vitalität auf den Gehalt an Isoamylacetat dargestellt, da die F-Werte der Modellterme eine Interaktion zwischen



## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vitalität und Temperatur zeigten. Wird in dieser Abbildung zunächst nur die hohe Vitalität betrachtet, so kann für den Temperatureinfluss der gleiche Verlauf von Isoamylacetat festgestellt werden wie im 2-I-Maßstab. Eine niedrige Hefevitalität verändert den Verlauf etwas, jedoch ist der Einfluss der Vitalität nicht signifikant. Ebenfalls zeigt die Hefegabe keinen signifikanten Einfluss (Daten durch Modellgleichung darstellbar), wobei sich eine Tendenz zu niedrigeren Werten bei höherer Hefegabe ergibt. Dieses bestätigt das Modell aus dem Vergleich der Hefestämme.



**Abb. 4.23: Einfluss von Gärtemperatur und Vitalität auf die Bildung von Isoamylacetat (20-I-Maßstab)**

Für die großtechnischen Versuche in Brauerei A stellte lediglich der Faktor Belüftung einen signifikanten Parameter dar (Tab. 4.29). Dass dieser Faktor im 20-I-Modell im Gegensatz dazu nicht-signifikant war, lässt sich wiederum aufgrund der Auswirkungen der Draufasstechnik erklären.

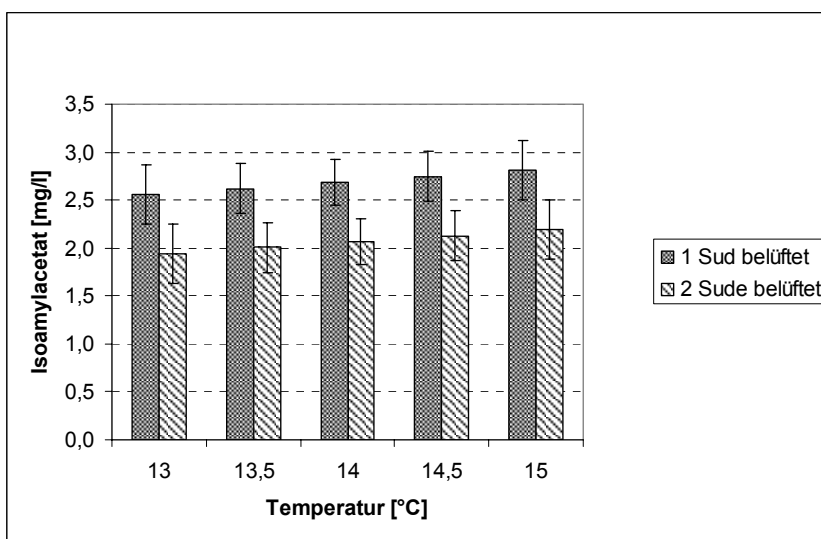
**Tab. 4.29: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Isoamylacetat-Modell der Versuche in Brauerei A**

Faktor	Isoamylacetat			
	F-Wert	p-Wert		
Temperatur	2,0	0,1937	Lack of Fit [p-Wert]	0,03
Belüftung	18,4	0,0027	Curvature [p-Wert]	0,53
			Adj R-Squared	0,65
			Pred. R-Squared	0,38
			Adeq. Precision	6,02
Modellgleichungen:			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-
Belüftung 1 Sud:	Isoamylacetat = 0,933 + 0,125 × Temperatur			
Belüftung 2 Sud:	Isoamylacetat = 0,317 + 0,125 × Temperatur			

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Variation der Temperatur um lediglich 2 °C ist zu gering, um einen signifikanten Effekt zu haben, und dass die Hefegabe trotz einer Verdopplung der Menge keine Rolle spielt, bestätigen die bereits dargestellten Modelle für Isoamylacetat. Um ein Mehrfaktorenmodell zu bilden, wurde der nicht-signifikante Faktor Temperatur mit in das Modell aufgenommen, was jedoch dazu führte, dass kein korrektes Modell gebildet werden konnte (ungenügender Lack-of-Fit und ungünstige  $r^2$ -Werte).

Aus Abb. 4.24 ist der Einfluss der Belüftung deutlich zu erkennen. In Übereinstimmung mit den Werten für Ethylacetat wirkt sich das Drauffassen eines belüfteten Sudes nach 6 h in einer Verringerung des Isoamylacetates aus.



**Abb. 4.24: Einfluss von Temperatur und Belüftung auf die Bildung von Isoamylacetat in Brauerei A**

Eine Übertragbarkeit zwischen den Pilotmaßstäben ist eingeschränkt möglich (Tab. 4.30). Bei zwei der Versuchskombinationen gibt es zwar einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten, jedoch ist der Unterschied nicht sehr groß. Daher können die Werte mit gewisser Vorsicht als übertragbar eingestuft werden. Eine Übertragung auf den großtechnischen Maßstab dagegen ist nicht möglich.

**Tab. 4.30: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Isoamylacetat)**

Bedingungen/Belüftung	Isoamylacetat			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	≈ 6 mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml	4,8 ± 0,2 mg/l	5,1 ± 0,3 mg/l	2,6 ± 0,3 mg/l	1,9 ± 0,3 mg/l
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml	4,2 ± 0,2 mg/l	4,9 ± 0,3 mg/l	2,6 ± 0,3 mg/l	1,9 ± 0,3 mg/l
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml	4,8 ± 0,4 mg/l	5,3 ± 0,4 mg/l	2,8 ± 0,3 mg/l	2,2 ± 0,3 mg/l
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml	4,0 ± 0,3 mg/l	5,0 ± 0,4 mg/l	2,8 ± 0,3 mg/l	2,2 ± 0,3 mg/l

**4.2.3.3 Summe Ethylester**

Eine weitere wichtige Gruppe von Estern stellen die Ethylester dar. Da bei ihrer Bildung nicht Acetyl-CoA sondern ein anderes Acyl-CoA neben Alkohol das Substrat bildet, kommen grundsätzlich andere Einflussfaktoren auf die Bildung in Frage als für die Acetatester (Abschnitt 2.2.2). Um diese darzustellen, wurden Buttersäure-, Hexansäure-, Octansäure- und Decansäure-Ethylester zu einem Summenparameter zusammengefasst und ausgewertet.

Da diese Ester im Rahmen der Bieraromastoffanalytik bestimmt werden, stehen nur Daten für den 20-I-Maßstab und für die großtechnischen Versuche zur Verfügung. Tab. 4.31 zeigt die Kennzahlen für die Summe der Ethylester. Die Kennzahlen des Modells weisen dieses als ein sehr gutes Modell aus, was durch eine sehr gute Übereinstimmung der Kontrollversuche mit den Modellwerten bestätigt wird.

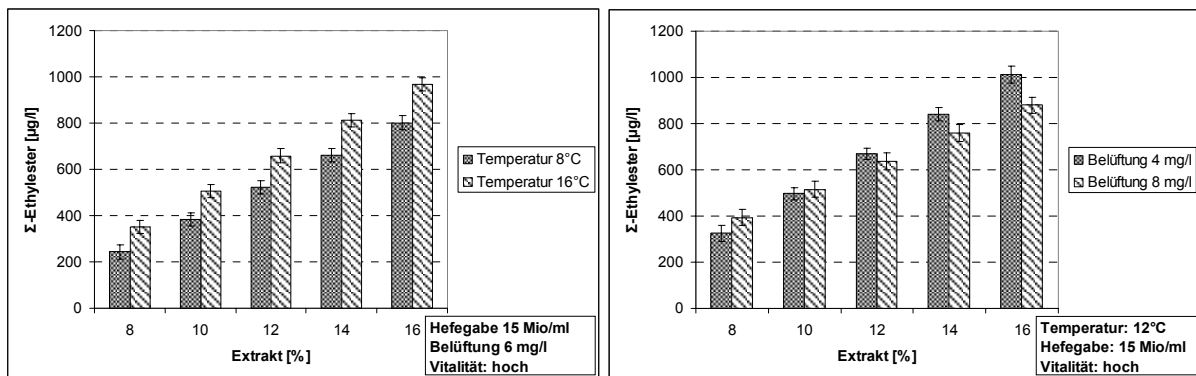
**Tab. 4.31: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Modells der Summe der Ethylester für Versuche im 20-I-Maßstab**

Summe Ethylester																																									
Faktor	F-Wert	p-Wert																																							
Extrakt	2815,2	< 0,0001																																							
Hefegabe	17,0	0,0003																																							
Temperatur	96,3	< 0,0001																																							
Belüftung	3,4	0,0769																																							
Vitalität	8,9	0,0056																																							
Extrakt × Hefegabe	3,7	0,0625																																							
Extrakt × Temperatur	3,9	0,0581																																							
Extrakt × Belüftung	19,6	0,0001																																							
Temperatur × Vitalität	6,3	0,0175																																							
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"></td> <td style="width: 40%;">Gewählter Modelltyp</td> <td style="width: 10%;">quadratisch</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Lack of Fit [p-Wert]</td> <td>0,86</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Adj R-Squared</td> <td>0,99</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Pred. R-Squared</td> <td>0,98</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Adeq. Precision</td> <td>65,61</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td colspan="3"><b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b></td> </tr> <tr> <td></td> <td>K1 [%]</td> <td>2,3</td> </tr> <tr> <td></td> <td>K2 [%]</td> <td>4,0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>K3 [%]</td> <td>9,9</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Vk Zentralpunkte [%]</td> <td>4,8</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Kontrollvers. in Konfidenzintervall?</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2" style="text-align: center;">ja; ja; ja</td> </tr> </table>				Gewählter Modelltyp	quadratisch		Lack of Fit [p-Wert]	0,86		Adj R-Squared	0,99		Pred. R-Squared	0,98		Adeq. Precision	65,61		Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-	<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>				K1 [%]	2,3		K2 [%]	4,0		K3 [%]	9,9		Vk Zentralpunkte [%]	4,8		Kontrollvers. in Konfidenzintervall?			ja; ja; ja	
	Gewählter Modelltyp	quadratisch																																							
	Lack of Fit [p-Wert]	0,86																																							
	Adj R-Squared	0,99																																							
	Pred. R-Squared	0,98																																							
	Adeq. Precision	65,61																																							
	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-																																							
<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>																																									
	K1 [%]	2,3																																							
	K2 [%]	4,0																																							
	K3 [%]	9,9																																							
	Vk Zentralpunkte [%]	4,8																																							
	Kontrollvers. in Konfidenzintervall?																																								
	ja; ja; ja																																								
Modellgleichungen																																									
hohe Vitalität: $\Sigma \text{ Ethylester} = -1117,00 + 89,84 \times \text{Extrakt} - 6,85 \times \text{Hefegabe} + 99,30 \times \text{Gärtemperatur} + 66,70 \times \text{Belüftung} - 0,19 \times \text{Hefegabe}^2 - 3,87 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 0,68 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,89 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur} - 6,21 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung}$																																									
niedrige Vitalität: $\Sigma \text{ Ethylester} = -1006,80 + 89,84 \times \text{Extrakt} - 6,85 \times \text{Hefegabe} + 92,34 \times \text{Gärtemperatur} + 66,70 \times \text{Belüftung} - 0,19 \times \text{Hefegabe}^2 - 3,87 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 0,68 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,89 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur} - 6,21 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung}$																																									

Ebenso wie bei den dargestellten Acetatestern und den aliphatischen höheren Alkoholen stellt die Stammwürze den dominantesten Einflussfaktor dar. Einen großen Einfluss hat die Gärtemperatur. Nennenswerte Einflüsse haben noch die Hefegabe und eine Interaktion zwischen Extrakt und Belüftung. Auch wenn der Einfluss gering ist, so hat die Hefevitalität hier ebenfalls eine gewisse Bedeutung. Im Allgemeinen kann jedoch festgestellt werden, dass die Vitalität kaum Auswirkungen auf die Stoffwechselprodukte hat. Lediglich für die Bildung von 2-Phenylethanol hat sie einen

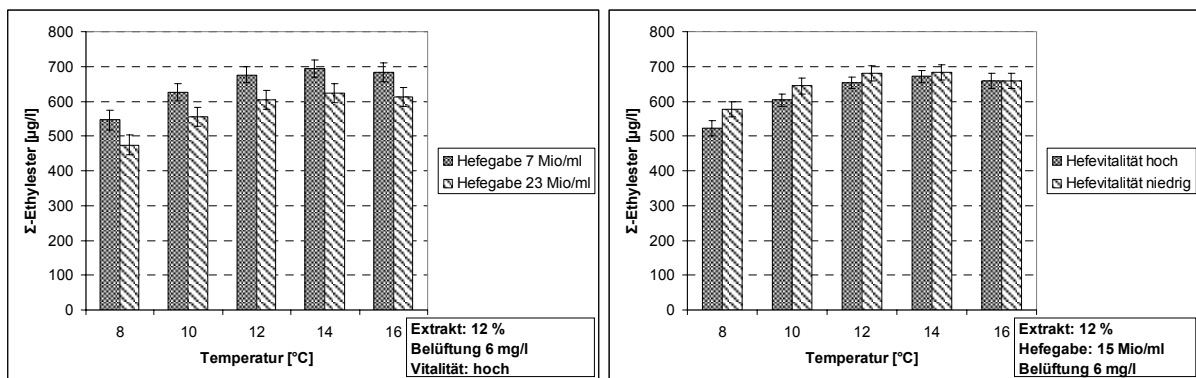
## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

nennenswerten Effekt. Dass der Einfluss des Extraktes linearer Natur ist, kann der Abb. 4.25 (a+b) entnommen werden. Mit steigendem Extrakt wird der Effekt der Gärtemperatur deutlicher. Die Belüftung für sich genommen hat keinen Einfluss auf die Ethylester, jedoch ist die Interaktion mit dem Extrakt deutlich, so dass bei niedrigen Stammwürzen eine höhere Belüftung mehr Ester bringt, dieser Effekt sich jedoch bei hohen Stammwürzen umkehrt und deutlich weniger Ester bei hohen Belüftungsraten gebildet werden.



**Abb. 4.25 a+b: Einfluss von Extrakt/Temperatur (a) und Extrakt/Belüftung auf die Bildung von Ethylestern im 20-I-Maßstab**

In Abb. 4.26 (a+b) ist der Einfluss der Temperatur auf die Ethylester bei unterschiedlichen Hefegaben (a) und Hefevitalitäten (b) dargestellt.



**Abb. 4.26 a+b: Einfluss von Temperatur/Hefegabe (a) und Temperatur/Vitalität (b) auf die Bildung von Ethylestern im 20-I-Maßstab**

Deutlich wird dabei, dass der Einfluss der Temperatur nicht linear über den untersuchten Bereich verläuft. Von 8 bis 12 °C (14 °C) ist zunächst ein Anstieg zu verzeichnen, jedoch geht bei weiter ansteigender Gärtemperatur die Konzentration an Ethylestern tendenziell wieder zurück. Eine Steigerung der Hefegabe führt zu einer

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

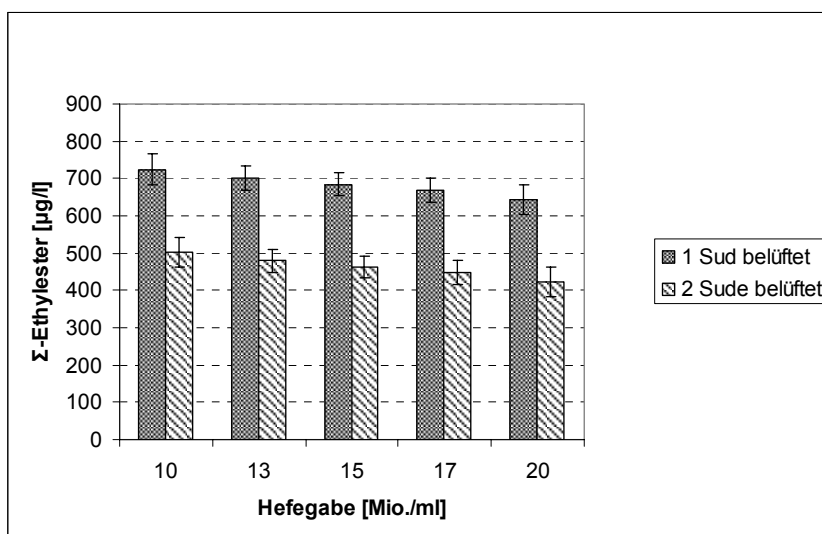
Verringerung der Ester (Abb. 4.26 a). Der Verlauf ist nahezu linear (darstellbar über die Modellgleichungen). Die vorhandene Interaktion zwischen Temperatur und Hefevitalität ist gering, so dass es lediglich bei niedrigen Temperaturen zu einem signifikanten Unterschied kommt (Abb. 4.23 b). Da im Temperaturbereich zwischen 12 und 16 °C die Konzentration von Ethylestern kaum durch die Temperatur beeinflusst wird, kann angenommen werden, dass für die Versuche in der Brauerei A die Temperatur keine signifikanten Term darstellt, da hier die Temperatur lediglich zwischen 13 und 15 °C variiert wurde. Diese Vermutung ist korrekt (Tab. 4.32).

**Tab. 4.32 Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Ethylester-Modell der Versuche in Brauerei A**

Faktor	Summe Ethylester			
	F-Wert	p-Wert		
Hefegabe	12,4	0,0078	Lack of Fit [p-Wert]	0,11
Belüftung	141,7	< 0,0001	Curvature [p-Wert]	0,44
			Adj R-Squared	0,94
			Pred. R-Squared	0,89
			Adeq. Precision	16,22
			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-

Modellgleichungen:  
 Belüftung 1 Sud: Summe Ethylester = 804,67 - 8,025 × Hefegabe  
 Belüftung 2 Sude: Summe Ethylester = 583,33 - 8,025 × Hefegabe

Signifikante Terme sind für diesen Zusammenhang die Hefegabe und die Belüftung. Die Hefegabe hatte im 20-l-Maßstab keinen sehr großen Einfluss und dieses bestätigen die Versuche im Produktionsmaßstab bei denen der Variationsbereich der Hefegabe annähernd mit dem des 20-l-Maßstabes übereinstimmt.



**Abb. 4.27: Einfluss von Hefegabe und Belüftung auf die Ethylesterbildung in Brauerei A**

Der dominante Einfluss der Belüftung ist wiederum Folge des Drauflassens mit einem Sudabstand von 6 h. Abb. 4.27 stellt diese Zusammenhänge graphisch dar. Wird der zweite Sud belüftet, reduziert sich der Gehalt der Ethylester stark. Damit reagieren die Ethylester auf diese Art des Drauflassens in derselben Weise wie die Acetatester, während die dargestellten Alkohole durch den zweiten belüfteten Sud gesteigert wurden. Mit steigender Hefegabe nimmt die Konzentration der Ethylester linear ab. Aus der statistischen Kennzahl „Curvature“ in Tab. 4.32 geht auch hervor, dass es sich tatsächlich um einen linearen Zusammenhang handelt. Diese steht in guter Übereinstimmung mit dem Modell des 20-I-Maßstabes.

Dass nicht nur die Zusammenhänge vergleichbar sind, sondern auch eine gute Übertragbarkeit der Werte vorhanden ist, zeigt Tab. 4.33. Die Konfidenzintervalle der Werte des 20-I-Maßstabs und der großtechnischen Versuche bei Belüftung eines Sudes überlappen deutlich, und damit ist eine Übertragbarkeit der Werte möglich.

**Tab. 4.33: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Summe Ethylester)**

Bedingungen/Belüftung	Summe Ethylester			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	≈ 6 mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml		732,9 ± 19,1 µg/l	724,4 ± 40,1 µg/l	503,1 ± 40,1 µg/l
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml		693,4 ± 19,1 µg/l	644,2 ± 40,1 µg/l	422,8 ± 40,1 µg/l
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml		737,3 ± 21,3 µg/l	724,4 ± 40,1 µg/l	503,1 ± 40,1 µg/l
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml		697,8 ± 21,3 µg/l	644,2 ± 40,1 µg/l	422,8 ± 40,1 µg/l

### 4.2.3.4 Gesamtdiskussion Ester

Es ist allgemein anerkannt, dass Hefestämme sich in dem Bildungsvermögen für Ester unterscheiden [68, 78, 80, 96, 143, 159, 194, 209, 213, 221, 230, 240, 289, 314, 315]. Dass die Bildung sich nicht nur in der absoluten Höhe unterscheidet, sondern auch die Bildung bei Variation der Gärungsparameter sich deutlich zwischen den Stämmen unterscheidet, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Dieses bestätigten die Untersuchungen aller Autoren, die verschiedene Hefestämme bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht haben [79, 80, 97, 96, 194, 221].

Ebenso wie beim Einfluss der Hefestämme wurde übereinstimmend berichtet, dass höhere Stammwürzen zu höheren Gehalten von Estern führen [39, 72, 78, 145, 190, 209, 213, 221, 253, 289, 315]. Viele der Autoren fanden einen überproportionalen Anstieg mit der Stammwürze [7, 78, 209, 315]. Dass es mit steigender

Würzekonzentration zu einer Erhöhung der Ester kommt, wird mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt. Bei den unterschiedlichen Hefestämmen ergeben sich jedoch deutlich unterschiedliche Einflüsse der Stammwürze. So kommt es bei einigen Stämmen zu proportionalen Anstiegen oder sogar zum Abflachen des Anstiegs. Auch wenn für die dargestellten Ester die Stammwürze immer den dominantesten Einflussfaktor darstellte, so wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen bei einigen Estern die nicht diskutiert werden konnten (Essigsäure-Octylester, Essigsäure-2-Phenylethylester) festgestellt, dass die Temperatur einen deutlich größeren Einfluss hat als der Extrakt (Anhang AH Tab. 13 + 14).

Eine Steigerung der Gärtemperatur führte übereinstimmend zu einer Erhöhung der Estergehalte [26, 39, 52, 68, 72, 78, 80, 96, 144, 172, 187, 203, 213, 221, 226, 246, 284, 289]. Im Allgemeinen wird dieses durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt, jedoch ist der Temperatureinfluss bei den verschiedenen Hefestämmen unterschiedlich stark, und es wurden für alle beobachteten Ester bei einigen Stämmen abfallende Werte im Bereich von 15 bis 16 °C gefunden. Auch ergaben die Untersuchungen, dass die Gärvolumina deutlichen Einfluss auf die Bildung der Ester haben. So wurde für den Hefestamm Hebru im 2-l-Maßstab ein deutlicher Temperatureinfluss für Ethylacetat festgestellt, im 20-l-Maßstab war dieser jedoch nur sehr gering. Im großtechnischen Maßstab hatte eine Erhöhung von 13 auf 15 °C für keinen der betrachteten Ester einen signifikanten Einfluss. Diese Unterschiede können eine mögliche Erklärung dafür liefern, dass in der Literatur ebenfalls unterschiedliche Angaben zu finden sind (siehe Abschnitt 2.2.2).

Für den Einfluss der Hefegabe auf die Gehalte von Ethylacetat gibt es unterschiedliche Aussagen. Einige Untersuchungen fanden einen Anstieg dieses Esters mit steigenden Hefegaben [26, 97, 203, 221], andere berichteten von gleich bleibenden oder fallenden Werten [163, 289]. Für Isoamylacetat [74, 163, 203, 289] und für Ethylester [203, 289] wurde ebenfalls von fallenden Werten berichtet. In der vorliegenden Untersuchung wurden für alle dargestellten Ester überwiegend fallende Werte, vereinzelt auch konstante Werte für unterschiedliche Hefestämme und Versuchsmaßstäbe gefunden. Im Produktionsmaßstab hatte eine Verdopplung der Hefegabe auf Ethylacetat und Isoamylacetat keine Auswirkung, auf die Ethylester jedoch eine reduzierende Wirkung.

Als wichtiger Faktor für die Vermehrung der Hefe wird die Belüftung mit einem großen Einfluss auf die Esterbildung in Verbindung gebracht. Die meisten Autoren berichteten dabei von sinkenden Estergehalten mit steigender Belüftung [7, 78, 97, 145, 163, 181, 190, 203, 209, 213, 221, 284]. Große Unterschiede wurden jedoch fast ausschließlich bei dem Vergleich zwischen unbelüfteten und belüfteten Würzen festgestellt [163, 181, 203]. Für den untersuchten Bereich im 20-l-Maßstab (4 bis 8 mg/l) wurden für die Belüftung in den vorliegenden Versuchen kaum Einflüsse festgestellt. Im Produktionsmaßstab wurde durch ein Drauflassverfahren mit einem Sudrhythmus von 6 h und zwei Suden pro Tank eine deutliche Abnahme aller untersuchter Ester festgestellt. Dieses steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von WACKERBAUER et al. [289] bzw. DREWS und RIEMANN [68], die zumindest für Isoamylacetat Steigerungen feststellten. Bei beiden Untersuchungen wurden jedoch Sudabstände von 24 h oder länger simuliert. SCHÖNDORFER et al. [242] fanden bei unterschiedlichen Drauflassvarianten sowohl steigende, als auch fallende Estergehalte.

Die Ethylester unterscheiden sich in ihrer Beeinflussung durch die Gärparameter kaum von den dargestellten Acetatestern. Dieses steht in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur [159].

Der Einfluss der Hefevitalität auf die Esterbildung ist in der Literatur nicht diskutiert. Wie bereits bei den höheren aliphatischen Alkoholen kann auch für die Ester kein nennenswerter Einfluss für den untersuchten Bereich (ICP 5,8 bzw. >6,2) beschrieben werden. Dass in diesem Bereich die Vitalität noch keine nennenswerte Rolle spielt, ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die Vermehrung nicht nennenswert betroffen war. Diese Aussage basiert auf der Verfolgung der Zellzahlen im Verlauf der Gärungen, deren Maxima im Anhang (AH Tab. 6a) dargestellt sind. Hier unterscheiden sich die Maxima der Versuche 1 bis 21 (hohe Vitalität) kaum von den korrespondierenden Versuchen mit niedriger Vitalität (22 bis 42). Diese Werte sind mit einer gewissen Unsicherheit verbunden, da nur einmal am Tag die Zellzahlen bestimmt wurden.

Auch wenn für Ethylacetat und Isoamylacetat die Modelle Unsicherheiten unterliegen, zeigen die Übereinstimmungen mit vielen Literaturangaben, dass die Modelle sich für die Darstellung der Zusammenhänge eignen.



#### 4.2.4 Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Bildung von Schwefeldioxid

Schwefeldioxid gehört in den im Bier vorkommenden Konzentrationen nicht zu den aromaktiven Substanzen. SO<sub>2</sub> ist jedoch von großer Bedeutung, da es durch seine reduzierenden Eigenschaften und seine Fähigkeit, mit Carbonylen Komplexe bilden zu können, Einfluss auf die Geschmacksstabilität des Bieres hat.

Ungünstigerweise ist die Reproduzierbarkeit von SO<sub>2</sub>-Werten bei Gärungen schlecht, was an den Variationskoeffizienten der Zentralpunkte für die verschiedenen Hefestämme in Tab. 4.34 abzulesen ist.

**Tab. 4.34: Statistische Kennzahlen zur Beurteilung der SO<sub>2</sub>-Modelle der verschiedenen Hefestämme**

Gewählter Modelltyp	Schwefeldioxid				
	W34/70	308	Trockenhefe	Hebru	Rh
	quadratisch	quadratisch	quadratisch	quadratisch	quadratisch
Lack of Fit [p-Wert]	0,52	0,03	0,58	0,11	0,98
Adj. R-Squared	0,90	0,91	0,99	0,85	1,00
Pred. R-Squared	0,86	0,87	0,96	0,63	1,00
Adeq. Precision	23,70	23,98	51,44	16,28	142,44
Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-	-	-	-	-
<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>					
K1 [%]	20,8	19,5	38,8	9,4	34,3
K2 [%]	13,3	15,3	266,7	0,0	300,0
K3 [%]		7,8	45,5	4,9	33,6
Vk der Zentralpunkte [%]	33,0	3,1	16,1	13,1	5,8
Kontrollversuch in 95% Konfidenzintervall des Modells?	ja; ja	nein, nein, ja	nein; nein; nein	ja; ja; ja	nein; nein; nein

Auch wenn die Kennzahlen der Modelle überwiegend gute Werte aufweisen, so sind die Abweichungen zwischen den Kontrollversuchen und den Modellwerten in vielen Fällen sehr groß. Dass hier zwei Abweichungen von mehreren 100 % aufweisen, ist dadurch erklärbar, dass diese Werte nahe Null liegen. Dieses stellt in sofern ein Problem dar, dass einmal die Messmethode im Bereich von 1 mg/l und darunter sehr ungenau ist und zum anderen eine geringe absolute Abweichung hier prozentual sehr hohe Werte erbringt. Grau unterlegt sind die Werte, bei denen die Kontrollversuche Resultate unter 2,0 mg/l aufwiesen. Das einzige Modell, welches eine sehr gute Darstellung des tatsächlichen Zusammenhangs erwarten lässt, ist das des Stammes Hebru.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

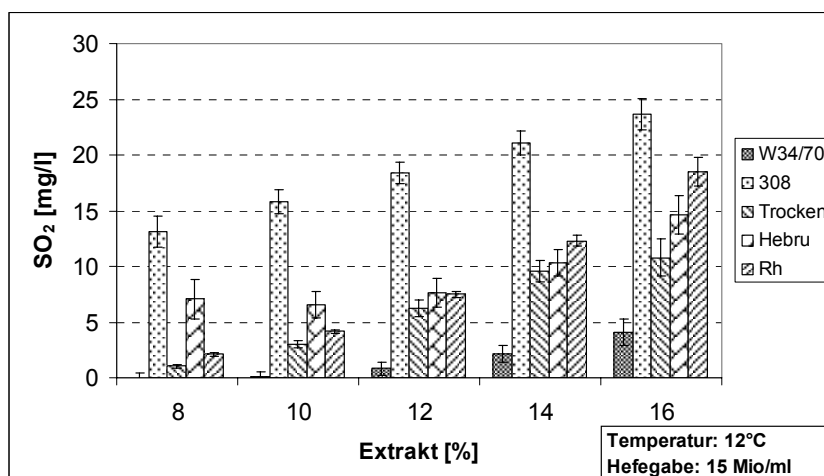
Aus der Betrachtung der F-Werte (Tab. 4.35) geht hervor, dass der Extraktgehalt den dominierenden Faktor darstellt, aber dass die Hefegabe in den meisten Fällen einen ähnlich großen Einfluss besitzt.

**Tab. 4.35: F-Werte und p-Werte der Modellterme für SO<sub>2</sub>-Bildung der Hefestämme**

Faktor	Schwefeldioxid									
	W34/70		308		Trockenhefe		Hebru		Rh	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Extrakt	83,9	< 0,0001	128,2	< 0,0001	554,7	< 0,0001	45,0	< 0,0001	4324,4	< 0,0001
Temperatur			7,6	0,0161	5,3	0,0408	4,6	0,0534	139,0	< 0,0001
Hefegabe	64,5	< 0,0001	37,2	< 0,0001	504,8	< 0,0001	22,0	0,0005	2312,4	< 0,0001
Extrakt ×Temperatur									171,1	< 0,0001
Extrakt ×Hefegabe					50,3	< 0,0001	5,7	0,0338	380,5	< 0,0001
Temperatur ×Hefegabe					9,0	0,0112	13,4	0,0033	56,3	< 0,0001

Die Gärtemperatur spielt eine untergeordnete Rolle. Bei den Stämmen, die Interaktionen von Faktoren aufweisen, haben diese zumeist größere Bedeutung als die Temperatur. Die Modellgleichungen für die SO<sub>2</sub>-Bildung der Hefestämme sind im Anhang dargestellt (AH Tab. 15).

In Abb. 4.28 ist der Einfluss des Extraktgehaltes auf die SO<sub>2</sub>-Bildung der verschiedenen Hefestämme dargestellt. Hier wird sehr deutlich, dass sich das Bildungsvermögen der Stämme unterscheidet. Bei einem Extraktgehalt von 12 % kommt es zwischen den Hefestämmen zu Unterschieden von bis zu 15 mg/l. Damit bestätigen diese Ergebnisse die Aussage von Autoren, die dem Stamm den größten Einfluss auf die Bildung von SO<sub>2</sub> zuschreiben [18, 153, 190].



**Abb. 4.28: SO<sub>2</sub>-Werte in Abhängigkeit des Extraktes für verschiedene Hefestämme**

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für den Einfluss des Extraktes kann festgestellt werden, dass steigende Extraktgehalte bei allen Hefestämmen zu deutlich erhöhten  $\text{SO}_2$ -Werten führen. Die Verläufe sind bei den meisten Stämmen linear, wobei die Stämme W34/70 und Hebru zunächst zwischen 8 und 12 % kaum einen Anstieg aufweisen und erst bei höheren Werten eine deutliche Zunahme verzeichnen.

Eine Erhöhung der Hefegabe senkt die  $\text{SO}_2$ -Werte deutlich (Abb. 4.29). Auch hier ist der Zusammenhang für die meisten Hefestämme linear. Der Verlauf bei Stamm W34/70 weist einen geringen Wiederanstieg von 19 auf 23 Mio. Zellen/ml auf. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass dieser Verlauf aufgrund der mangelhaften Reproduzierbarkeit der Gärungen in Hinblick auf niedrige  $\text{SO}_2$ -Gehalte resultiert.

Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass der Einfluss der Hefegabe ähnlich groß, wie der Effekt des Extraktgehaltes ist.

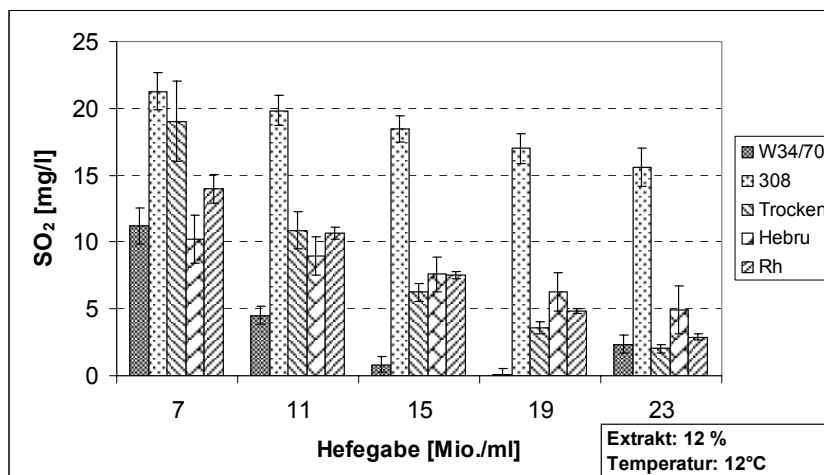


Abb. 4.29:  $\text{SO}_2$ -Werte in Abhängigkeit der Hefegabe für verschiedene Hefestämme

Die Temperatur hat wenig Effekt auf die Bildung von  $\text{SO}_2$ . Bei den meisten Stämmen kommt es jedoch mit zunehmender Temperatur zu einer leichten Zunahme. Der Stamm 308 weist bei ca. 12 °C ein Maximum aus, wobei die Unterschiede sehr gering sind. Die Darstellungen zeigen, dass der Hefestamm Hebru, der für die weiteren Versuchsreihen verwendet wird, in der Lage ist, hohe Werte an  $\text{SO}_2$  zu bilden.

Die schlechte Reproduzierbarkeit der Gärungen im Bezug zu den  $\text{SO}_2$ -Werten wird auch im 20-I-Maßstab durch den V<sub>k</sub> der Zentralpunkte deutlich (Tab. 4.36). Wie bei dem Vergleich der Hefestämme sind die statistischen Kennzahlen für das Modell in einem guten Bereich, aber der V<sub>k</sub> ist sehr hoch und damit ist eine Vorhersage von Werten kaum möglich. Die Kontrollversuche liegen in etwa im Bereich des V<sub>k</sub>, was

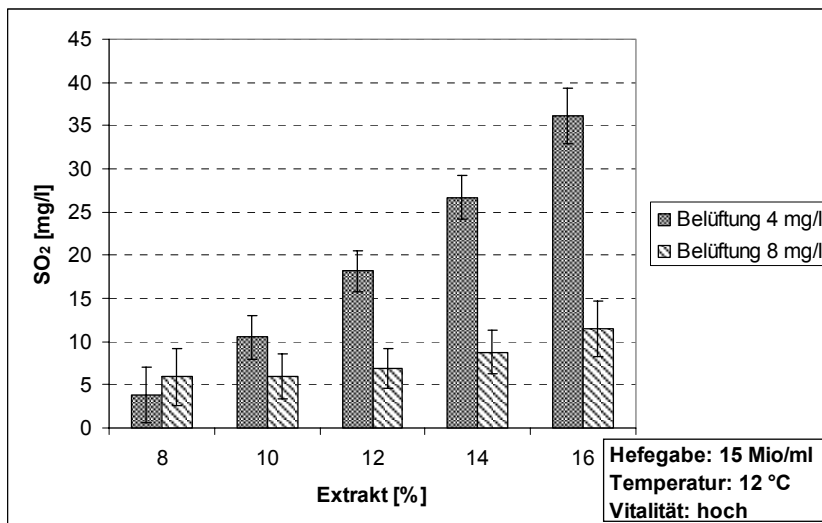
## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

zwar für das Modell spricht, wobei der Bereich als sehr groß angesehen werden muss. Dieses zeigt sich in den Diagrammen durch große Konfidenzintervalle.

**Tab. 4.36: Statistische Kennzahlen und F-Werte des SO<sub>2</sub>-Modells für Versuche im 20-I-Maßstab**

Schwefeldioxid				
Faktor	F-Wert	p-Wert		
Extrakt	356,4	< 0,0001	Gewählter Modelltyp	quadratisch
Hefegabe	29,8	< 0,0001	Lack of Fit [p-Wert]	0,22
Temperatur	0,0	0,9629	Adj R-Squared	0,93
Belüftung	51,4	< 0,0001	Pred. R-Squared	0,88
Vitalität	14,0	0,0008	Adeq. Precision	23,92
Extrakt × Hefegabe	13,1	0,0011	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-
Extrakt × Belüftung	42,7	< 0,0001	<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>	
Hefegabe × Temperatur	3,2	0,0858	K1 [%]	
			K2 [%]	27,8
			K3 [%]	16,9
			Vk Zentralpunkte [%]	22,4
			Kontrollvers. in Konfidenzintervall? nein; ja	
Modellgleichungen				
hohe Vitalität: $SO_2 = -52,73 + 6,45 \times \text{Extrakt} + 0,55 \times \text{Hefegabe} + 2,31 \times \text{Gärtemperatur} + 1,64 \times \text{Belüftung} + 0,11 \times \text{Extrakt}^2 + 0,02 \times \text{Hefegabe}^2 - 0,07 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 0,46 \times \text{Belüftung}^2 - 0,12 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} - 0,83 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} - 0,04 \times \text{Hefegabe} \times \text{Gärtemperatur}$				
niedrige Vitalität: $SO_2 = -49,69 + 6,45 \times \text{Extrakt} + 0,55 \times \text{Hefegabe} + 2,31 \times \text{Gärtemperatur} + 1,64 \times \text{Belüftung} + 0,11 \times \text{Extrakt}^2 + 0,02 \times \text{Hefegabe}^2 - 0,07 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 0,46 \times \text{Belüftung}^2 - 0,12 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} - 0,83 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} - 0,04 \times \text{Hefegabe} \times \text{Gärtemperatur}$				

Ein Wert der Kontrollversuche fehlt, da nicht genügend Probenmaterial für alle Analysen zur Verfügung stand. Die F-Werte zeigen, dass im 20-I-Maßstab der Effekt der Hefegabe nicht mehr im Bereich der Stammwürze liegt, und dass der Belüftung eine größere Bedeutung zukommt als der Hefegabe. Auch hat die Interaktion zwischen Extrakt und Belüftung einen größeren Einfluss als die Hefegabe. Der Einfluss von Stammwürze und Belüftung ist in Abb. 4.30 dargestellt.

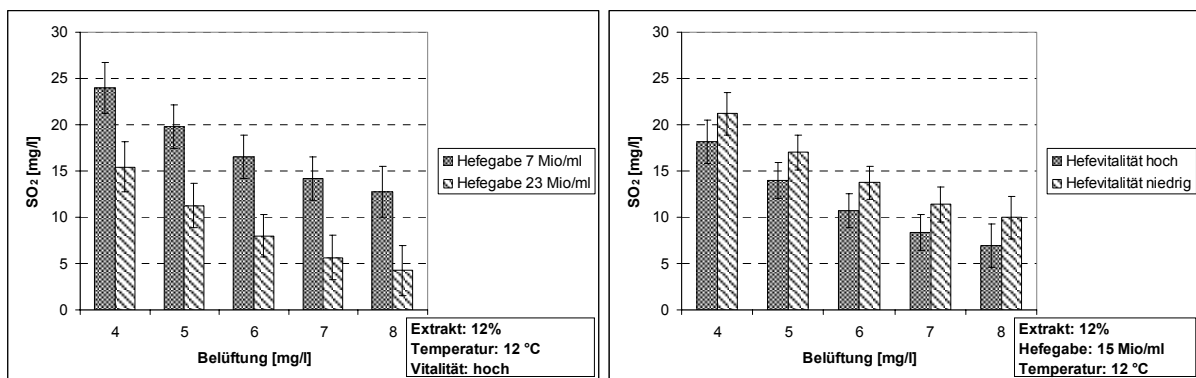


**Abb. 4.30: Einfluss von Extrakt und Belüftung auf die Bildung von SO<sub>2</sub> (20-I-Maßstab)**

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei einer hohen Belüftungsrate verdoppelt sich in etwa der Gehalt an  $\text{SO}_2$  bei einer Verdopplung des Extraktes, bei einer niedrigen Belüftung resultiert eine Verdopplung des Extraktes in einem 7fachen Gehalt an  $\text{SO}_2$ . Dass die Stammwürze einen großen Effekt auf die  $\text{SO}_2$ -Bildung hat, bestätigt die Untersuchungen anderer Autoren [197, 198, 200]. Beispielsweise fanden NARZIß et al. [197, 198] für eine Stammwürzeerhöhung von 11 auf 17 % einen 5fachen  $\text{SO}_2$ -Gehalt .

In der Abb. 4.31 (a+b) ist der Einfluss der Belüftung bei unterschiedlichen Hefegaben (a) und bei Variation der Hefevitalität (b) dargestellt. Aus Abb. 4.31 a geht hervor, dass die Hefegabe auch in dieser Versuchsreihe einen großen Einfluss auf die Bildung von  $\text{SO}_2$  hat.



**Abb. 4.31 a+b: Einfluss von Belüftung/Hefegabe (a) und Belüftung/Vitalität auf die Bildung von  $\text{SO}_2$  im 20-l-Maßstab**

In Übereinstimmung mit dem Vergleich der Hefestämme kommt es bei der Erhöhung der Hefegabe zu einer starken Abnahme des  $\text{SO}_2$ -Gehaltes. Die Hefevitalität (Abb. 4.31 b) hat zwar einen deutlichen Einfluss auf die Bildung von  $\text{SO}_2$  (ca. 3 mg/l), jedoch ist der Unterschied aufgrund der Unsicherheit des Modells nicht signifikant. Ein schlechterer Hefezustand führt demnach tendenziell zu einem erhöhten Gehalt an  $\text{SO}_2$ . Für die Hefevitalität gibt es keine direkt vergleichbaren Arbeiten zu diesem Zusammenhang, jedoch fanden PICKERELL et al. [220] erhöhte  $\text{SO}_2$ -Werte bei Hefen, die ungünstig gelagert wurden gegenüber den Ausgangshefen. Dieses bestätigt die gefundenen Zusammenhänge.

In Brauerei A ergab sich für die  $\text{SO}_2$ -Bildung ein gutes Modell (Tab. 4.37). Im Produktionsmaßstab ergab sich der deutlichste Effekt durch die Belüftung, dieser ist mit dem verwendeten Drauflassverfahren zu erklären. Die Hefegabe und eine

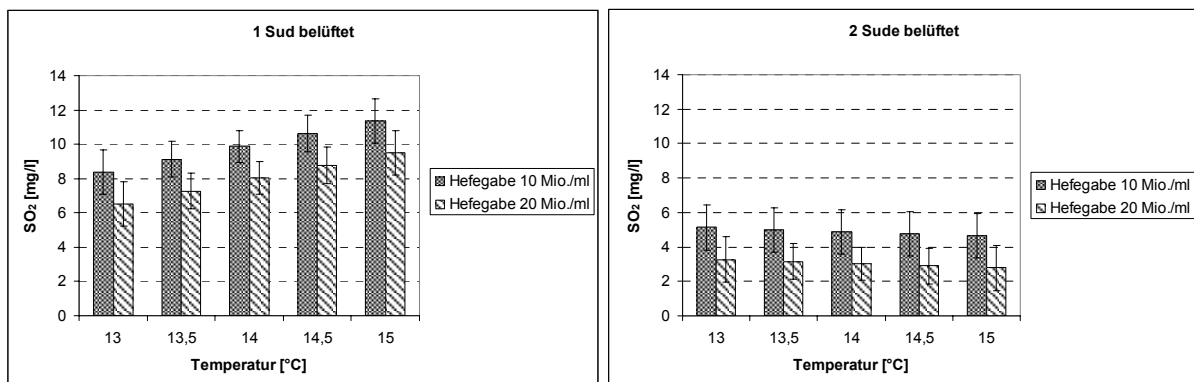
## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Interaktion zwischen Temperatur und Belüftung zeigen ebenfalls deutlichen Einfluss. Die Gärtemperatur für sich zeigt ebenfalls einen Einfluss, der jedoch geringer ausfällt als die anderen Effekte.

**Tab. 4.37: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das SO<sub>2</sub>-Modell der Versuche in Brauerei A**

Schwefeldioxid Brauerei A				
Faktor	F-Wert	p-Wert		
Temperatur	6,1	0,0488	Lack of Fit [p-Wert]	0,89
Hefegabe	13,3	0,0107	Curvature [p-Wert]	0,19
Belüftung	145,9	< 0,0001	Adj R-Squared	0,95
Temperatur × Belüftung	11,9	0,0136	Pred. R-Squared	0,89
			Adeq. Precision	16,96
Modellgleichungen:			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-
Belüftung 1 Sud: SO <sub>2</sub> = -9,28 + 1,50 × Temperatur - 0,19 × Hefegabe				
Belüftung 2 Sude: SO <sub>2</sub> = 10,23 - 0,25 × Temperatur - 0,19 × Hefegabe				

Abb. 4.32 (a+b) zeigt den Einfluss der Temperatur und der Belüftung auf den SO<sub>2</sub>-Gehalt wenn ein (a) bzw. beide Sude/Tank (b) belüftet wurden. Werden beide Sude belüftet, so hat die Temperatur nahezu keinen Effekt, wird dagegen nur ein Sud belüftet, so steigt der SO<sub>2</sub>-Gehalt mit steigender Temperatur. Ein ähnlich geringer Anstieg ist für den Stamm Hebru auch im Vergleich der Hefestämme zu finden, während im 20-l-Maßstab derselbe Hefestamm ein Maximum zwischen 12 und 14 °C hatte und danach wieder abfiel. NORDLÖV [200] fand für die SO<sub>2</sub>-Bildung ein Maximum bei etwa 16 °C, was in etwa mit den vorliegenden Daten übereinstimmt.



**Abb. 4.32 a+b: Einfluss von Temperatur und Hefegabe bei unterschiedlichen Belüftungen auf die Bildung von SO<sub>2</sub> in Brauerei A**

Eine Erhöhung der Hefegabe von 10 auf 20 Mio. Zellen/ml bewirkt in Brauerei A (Abb. 4.32 a+b) eine Verringerung des SO<sub>2</sub>-Gehaltes. Auch wenn diese deutlich ausfällt, ist sie unter allen Bedingungen nicht-signifikant, was auf die große Unsicherheit für das Modell zurückzuführen ist. Ein Rückgang des SO<sub>2</sub>-Gehaltes bei steigender Hefegabe

wurde für alle Versuchsreihen und mit allen Hefestämmen festgestellt. Bei diesen waren die Einflüsse der Variationen (7 auf 23 Mio. Zellen/ml) deutlich signifikant. Damit kann davon ausgegangen werden, dass dieser Zusammenhang korrekt ist, auch wenn in der Literatur widersprüchliche Angaben existieren. So wurden mit steigenden Hefegaben steigende SO<sub>2</sub>-Gehalte [197, 198], fallende SO<sub>2</sub>-Gehalte [200] und gleich bleibende Gehalte festgestellt [46].

Übereinstimmend wird in der Literatur berichtet, dass steigende Belüftungsraten zu sinkenden SO<sub>2</sub>-Gehalten führen [18, 46, 87, 190, 197, 198, 200, 308]. Mit den vorliegenden Versuchen kann dieses bestätigt werden. Im 20-l-Maßstab führten Variationen zwischen 4 und 8 mg/l zu deutlich signifikanten Werten. Für die Auswirkungen des Draufflassens eines belüfteten Sudes wird in der Literatur von einer Abhängigkeit vom Draufflasszeitpunkt berichtet. So sank der SO<sub>2</sub>-Gehalt bis zu einem Zeitpunkt von ca. 4 bis 6 h ab und steigt im Anschluss wieder an [18, 87, 271]. Da bei den Versuchen in Brauerei A ein Sudabstand von 6 h vorlag und hier ein großer Abfall des SO<sub>2</sub>-Gehaltes durch den belüfteten zweiten Sud verursacht wurde, kann hier ebenfalls von einer Übereinstimmung ausgegangen werden.

Für den Gehalt an SO<sub>2</sub> ergibt sich eine gute Übertragbarkeit zwischen den Versuchen im 2-l-Maßstab und den großtechnischen Gärungen mit einem belüfteten Sud (Tab. 4.38). Zwischen den beiden Pilotgärgrößen ist eine Übertragbarkeit denkbar, da die meisten Konfidenzintervalle überlappen. Bei den Ergebnissen des 20-l-Maßstabs und den großtechnischen Gärungen mit einem belüfteten Sud ist eine Überlappung der Konfidenzintervalle nur für zwei Versuchskombinationen der Fall. Aufgrund schwierigen Reproduzierbarkeiten ist beim Vergleichen von Ergebnissen für Schwefeldioxid mit Vorsicht vorzugehen.

**Tab. 4.38: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (SO<sub>2</sub>)**

Bedingungen/Belüftung	Schwefeldioxid			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	≈ 6 mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml	11,1 ± 1,6 mg/l	16,2 ± 2,0 mg/l	8,4 ± 1,3 mg/l	5,1 ± 1,3 mg/l
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml	6,4 ± 1,6 mg/l	9,7 ± 2,0 mg/l	6,5 ± 1,3 mg/l	3,3 ± 1,3 mg/l
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml	12,8 ± 2,1 mg/l	16,0 ± 2,1 mg/l	11,4 ± 1,3 mg/l	4,6 ± 1,3 mg/l
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml	6,3 ± 2,1 mg/l	8,7 ± 2,0 mg/l	9,5 ± 1,3 mg/l	2,8 ± 1,3 mg/l

### 4.3 Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Geschmacksstabilität

Die Geschmacksstabilität wird von vielen Faktoren beeinflusst (Abschnitt 2.3). Der Gehalt an Schwefeldioxid ist einer dieser Faktoren, dessen Beeinflussbarkeit durch die Gärparameter wurde im vorangegangenen Abschnitt 4.2.4 beschrieben. Neben antioxidativen Einflüssen spielen die Entstehung von alterungsrelevanten Aromakomponenten und maskierende Effekte eine Rolle für die Geschmacksstabilität.

Um die Entstehung von alterungsrelevanten Aromakomponenten zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Komponenten bestimmt, von denen bekannt ist, dass sie im Verlauf der Bieralterung zunehmen und damit im Verdacht stehen, zum Alterungsaroma beizutragen [153]. Als wichtigstes Kriterium der Geschmacksstabilität ist jedoch die sensorische Beurteilung zu sehen. Sowohl die Bestimmung der Alterungsindikatoren als auch die Alterungsverkostung wurde mit forciert gealterten Bieren durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4).

Für die Untersuchungen zur Geschmacksstabilität mussten die Versuche bis zum fertigen, abgefüllten Bier durchgeführt werden. Aus diesem Grund war es nur möglich, die Versuchsreihen im 20-l-Maßstab und die großtechnischen Versuchen daraufhin zu untersuchen.

#### 4.3.1 Einfluss der Gärparameter und der Hefevitalität auf die analytische und sensorische Geschmacksstabilität

Aufgrund ihres Verhaltens im Verlaufe der Bierlagerung dienen die in Tab. 4.39 aufgeführten Substanzen als Alterungsindikatoren.

**Tab. 4.39: Liste der Alterungsindikatoren**

Alterungsindikatoren	
2-Methyl-Butanal	Bernsteinsäure-Diethyl-Ester
3-Methyl-Butanal	Nicotinsäure-Ethyl-Ester
2-Furfural	Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester
5-Methyl-Furfural	2-Acetyl-Furan
Benzaldehyd	2-Propionyl-Furan
2-Phenyl-Ethanal	gamma-Nonalacton

Sie können im Einzelnen betrachtet werden, es ist jedoch sinnvoll, diese als Summenparameter zu verwenden. Zum einen ist dieses der Fall, da der genaue



Beitrag der einzelnen Substanzen zum Alterungsgeschmack nicht klar ist, und zum anderen die Einzelsubstanzen durch unterschiedlichen Einflüsse (z. B. Sauerstoff, Wärme) beeinflusst werden und damit in der Summe alle Einflüsse mitberücksichtigt werden [18, 153]. In der Regel wird die Summe der Alterungsindikatoren im forciert gealterten Bier betrachtet. Da bei den Versuchen im 20-I-Maßstab Variationen der Stammwürze vorgenommen wurden und diese sich durch die unterschiedlichen Mengen an Malz in den Werten der Alterungsindikatoren der frischen Biere deutlich unterschieden, wurde im vorliegenden Fall die Differenz zwischen den Alterungsindikatoren der frischen und forciert gealterten Biere (Delta-Summe Alterungsindikatoren) verwendet. Für die Versuche im großtechnischen Maßstab wurde ebenfalls diese Differenz verwendet, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

Die sensorische Beurteilung der Alterung erfolgte nach dem Verkostungsschema nach EICHHORN (Abschnitt 3.3.1).

Für die Alterungsnote muss vorweg festgestellt werden, dass die Unterschiede im Rahmen dieser Versuchsreihen nur sehr gering waren. Für den 20-I-Maßstab bewegten sich die Bewertungen, die bei den zugrunde liegenden Versuchen gefunden wurden, zwischen 1,1 und 2,1 (auf einer Skala von 1 bis 4), für die Versuche in Brauerei A mit einer Ausnahme (2,1) lediglich zwischen 1,6 und 1,8. Dies deutet darauf hin, dass die Auswirkungen von Variationen der Gärparameter keinen sehr deutlichen Einfluss auf den Grad der Alterung haben. Da gravierende Einflüsse wie Sauerstoffeintrag ins fertige Bier oder ähnliches durch entsprechende Arbeitsweise verhindert wurden, ist dieses Ergebnis auch erklärbar. Da jedoch deutliche Unterschiede in den Alterungsindikatoren auftraten, zeigt dies auch die Gärungsparameter einen Einfluss auf die Geschmacksstabilität haben. Diese auch sensorisch wahrnehmbaren Unterschiede wurden von den Verkostern jedoch viel deutlicher in der Alterungs-Akzeptanz vermerkt als in der Alterungsnote.

Die Kennzahlen für das Modell des Delta der Alterungsindikatoren im 20-I-Maßstab zeigen, dass es sich um ein gutes Modell handelt, wobei der Lack-of-Fit-Wert niedrig ist, aber nicht-signifikant (Tab. 4.40). Der Kontrollversuch 1 konnte aus Mangel an Probenmaterial nicht untersucht werden, aber die anderen beiden Kontrollversuche zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Modell.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tab. 4.40: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Modells für Delta der Alterungsindikatoren der Versuche im 20-I-Maßstab**

Delta-Summe Alterungsindikatoren				
Faktor	F-Wert	p-Wert		
Extrakt	283,1	< 0,0001	Gewählter Modelltyp	quadratisch
Hefegabe	2,3	0,1376	Lack of Fit [p-Wert]	0,07
Temperatur	6,4	0,0168	Adj R-Squared	0,90
Belüftung	0,7	0,4192	Pred. R-Squared	0,85
Vitalität	0,5	0,4693	Adeq. Precision	23,33
Hefegabe × Vitalität	21,4	< 0,0001	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	3, 24
Belüftung × Vitalität	9,0	0,0053	<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>	
Modellgleichungen			K1 [%]	
hohe Vitalität: Delta-Summe Alterungsindikatoren = 85,96 - 9,31 × Extrakt - 0,12 × Hefegabe + 1,79 × Gärtemperatur - 5,37 × Belüftung + 0,88 × Extrakt <sup>2</sup> + 0,08 × Hefegabe <sup>2</sup>			K2 [%]	6,3
			K3 [%]	2,0
			Vk Zentralpunkte [%]	8,0
			Kontrollvers. in Konfidenzintervall?	
			ja; ja	
niedrige Vitalität: Delta-Summe Alterungsindikatoren = 80,78 - 9,31 × Extrakt - 3,36 × Hefegabe + 1,79 × Gärtemperatur - 3,05 × Belüftung + 0,88 × Extrakt <sup>2</sup> + 0,08 × Hefegabe <sup>2</sup>				

Hauptsächlich wird die Zunahme der Alterungsindikatoren durch den Extrakt bestimmt. Die Hefegabe hat als Einzelfaktor kaum Auswirkungen auf die Zunahme der Alterungsindikatoren, jedoch zeigt dieser Faktor deutliche Interaktionen mit der Vitalität. Im Weiteren haben noch die Temperatur und die Interaktion zwischen Belüftung und Vitalität einen gewissen Einfluss auf die Zunahme der Alterungsindikatoren durch die forcierte Lagerung.

In den Tab. 4.41 und 4.42 sind die Kennzahlen für die Modelle der Alterungsnote und der Alterungsakzeptanz derselben Versuchsreihe dargestellt.

**Tab. 4.41: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Alterungsnoten-Modells für Versuche im 20-I-Maßstab**

Alterungsnote				
Faktor	F-Wert	p-Wert		
Extrakt	0,9	0,3591	Gewählter Modelltyp	quadratisch
Hefegabe	1,4	0,2476	Lack of Fit [p-Wert]	0,28
Temperatur	40,4	< 0,0001	Adj R-Squared	0,71
Belüftung	3,7	0,0628	Pred. R-Squared	0,55
Vitalität	0,0	0,8933	Adeq. Precision	15,00
Temperatur × Vitalität	4,8	0,0366	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-
Modellgleichungen			Vk Zentralpunkte [%]	5,5
hohe Vitalität: Summe Alterungsverkostung = 2,97 - 0,11 × Extrakt - 0,03 × Hefegabe - 0,18 × Gärtemperatur + 0,18 × Belüftung + 0,005 × Extrakt <sup>2</sup> + 0,001 × Hefegabe <sup>2</sup> + 0,007 × Gärtemperatur <sup>2</sup> + 0,017 × Belüftung <sup>2</sup>				
niedrige Vitalität: Summe Alterungsverkostung = 3,25 - 0,11 × Extrakt - 0,03 × Hefegabe - 0,21 × Gärtemperatur + 0,18 × Belüftung + 0,005 × Extrakt <sup>2</sup> + 0,001 × Hefegabe <sup>2</sup> + 0,007 × Gärtemperatur <sup>2</sup> + 0,017 × Belüftung <sup>2</sup>				

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Statistisch betrachtet handelt es sich in beiden Fällen um gute Modelle. Die Kontrollversuche konnten leider aus Mangel an Probenmaterial nicht verkostet werden.

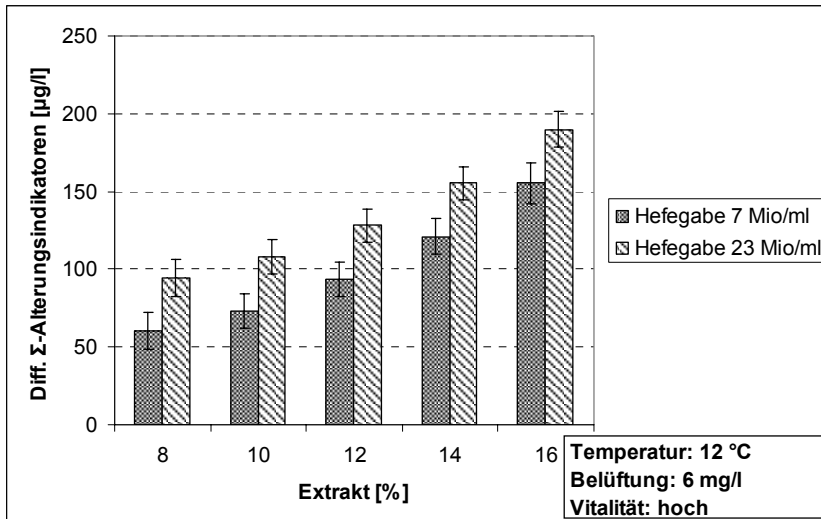
**Tab. 4.42: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Alterungsakzeptanz-Modells für Versuche im 20-I-Maßstab**

Alterungsakzeptanz				
Faktor	F-Wert	p-Wert		
Extrakt	0,0	0,8388	Gewählter Modelltyp	quadratisch
Hefegabe	22,3	< 0,0001	Lack of Fit [p-Wert]	0,18
Temperatur	25,3	< 0,0001	Adj R-Squared	0,73
Belüftung	4,6	0,0403	Pred. R-Squared	0,54
Vitalität	0,1	0,7613	Adeq. Precison	13,48
Extrakt × Belüftung	10,3	0,0033	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-
Hefegabe × Vitalität	3,1	0,0905	Vk Zentralpunkte [%]	3,4
Temperatur × Belüftung	6,2	0,0192		
Temperatur × Vitalität	4,0	0,0544		
Modellgleichungen				
hohe Vitalität: Alterungsakzeptanz = $-57,93 + 10,38 \times \text{Extrakt} + 0,83 \times \text{Hefegabe} + 8,91 \times \text{Gärtemperatur} + 5,76 \times \text{Belüftung} - 0,23 \times \text{Extrakt}^2 - 0,07 \times \text{Hefegabe}^2 - 0,23 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 0,87 \times \text{Belüftung}^2 - 0,84 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} - 0,42 \times \text{Gärtemperatur} \times \text{Belüftung}$				
niedrige Vitalität: Alterungsakzeptanz = $-76,54 + 10,38 \times \text{Extrakt} + 1,28 \times \text{Hefegabe} + 9,94 \times \text{Gärtemperatur} + 5,76 \times \text{Belüftung} - 0,23 \times \text{Extrakt}^2 - 0,07 \times \text{Hefegabe}^2 - 0,23 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 0,87 \times \text{Belüftung}^2 - 0,84 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} - 0,42 \times \text{Gärtemperatur} \times \text{Belüftung}$				

Beide Untersuchungsgrößen weisen einen geringen Variationskoeffizienten für die fünf Zentralpunkte aus. Dies zeigt, dass die sensorische Untersuchung eine gute Reproduzierbarkeit aufweist. Die F-Werte für das Modell der Alterungsnote zeigen, dass diese Größe fast ausschließlich durch die Gärtemperatur beeinflusst ist. Das Akzeptanzmodell ist durch deutlich mehr Parameter beeinflusst. Auch wenn die Gärtemperatur hier ebenfalls der stärkste Einflussfaktor ist, so weist die Hefegabe hier einen vergleichbaren Wert auf. Dass der Extrakt für sich jedoch die Alterungsverkostung kaum beeinflusst ist überraschend, da die Alterungsindikatoren mit steigendem Extrakt deutlich zunehmen.

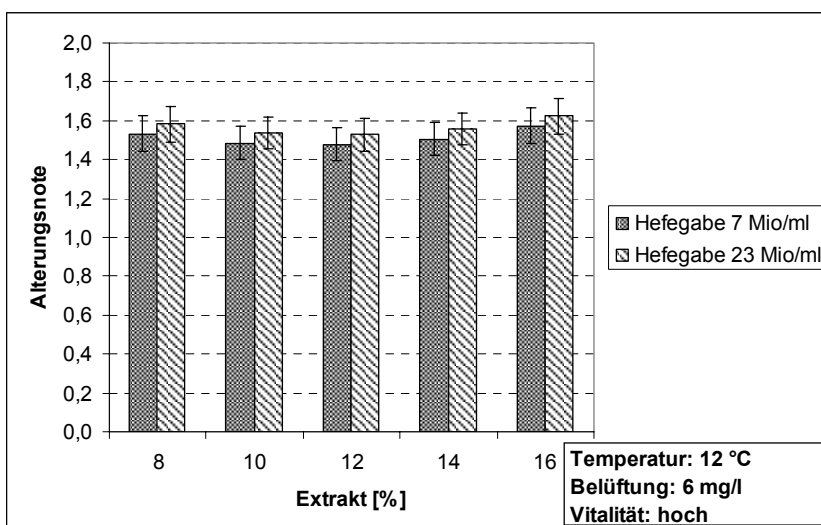
In Abb. 4.33 ist der Einfluss der Stammwürze und der Hefegabe auf die Zunahme der Alterungsindikatoren dargestellt. Obwohl durch die Verwendung der Differenz der Alterungsindikatoren gleiche Ausgangsbedingungen für die Versuche mit unterschiedlichen Stammwürzen geschaffen wurden, nehmen die Alterungsindikatoren mit der Stammwürze deutlich zu. Dieses ist durch größere Mengen an Reaktionspartnern für Entstehung von Alterungskomponente zu erklären.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

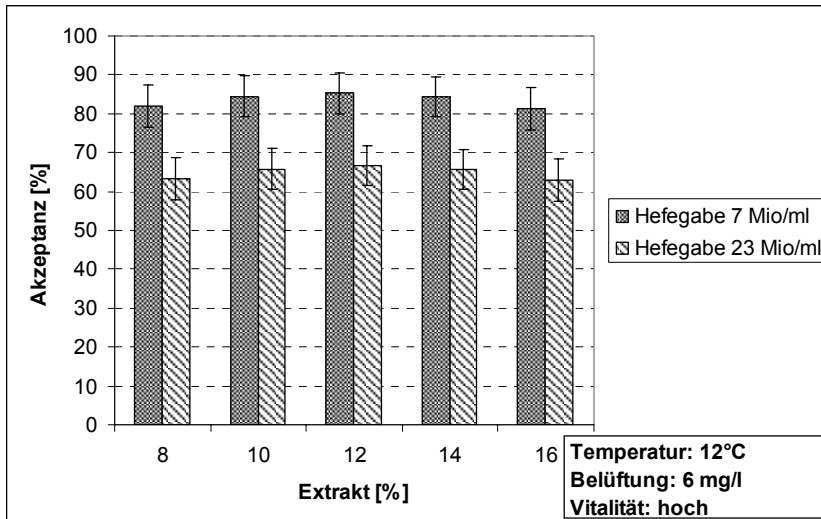


**Abb. 4.33: Einfluss von Extrakt und Hefegabe auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab)**

Dass dieser erhöhte Gehalt nicht direkt zu einer schlechteren Geschmacksstabilität führt, zeigen die Abb. 4.34 und 4.35. Für die Alterungsnote zeigt sich in Abb. 4.34, dass im Rahmen der Parametervariationen kaum Unterschiede für die Alterungsnote zu finden sind. Es kommt nur zu geringfügigen Tendenzen. Eine wirkliche Tendenz für den Einfluss der Stammwürze ist hier jedoch nicht zu finden. Das wird durch die Alterungsakzeptanz (Abb. 4.35) bestätigt. Ein wichtiger Grund dafür, dass die starke Steigerung der Alterungsindikatoren keinen Einfluss auf die Verkostungsergebnisse hat, ist die Tatsache, dass mit den erhöhten Stammwürzen auch deutlich mehr Aromakomponenten wie höhere Alkohole und Ester entstehen (siehe Abschnitte 4.2.2 und 4.2.3), die die Alterungsaromen maskieren können.



**Abb. 4.34: Einfluss von Extrakt und Hefegabe auf die Alterungsnote (20-I-Maßstab)**



**Abb. 4.35: Einfluss von Extrakt und Hefegabe auf die Alterungsakzeptanz (20-I-Maßstab)**

Hohe Hefegaben verstärken die Zunahme der Alterungsindikatoren gegenüber niedrigen Hefegaben über den gesamten Extraktbereich signifikant (Abb. 4.33). In der Alterungsnote zeigt sich hier nur eine geringfügige Tendenz in die gleiche Richtung, aber in der Alterungsakzeptanz spiegelt sich dieser Einfluss deutlich wider. Hier führt eine erhöhte Hefegabe zu einer signifikanten Verschlechterung der Akzeptanz.

Der starke Einfluss der Hefegabe auf das Delta der Alterungsindikatoren ist auch in Abb. 4.36 gut zu erkennen, in der der Einfluss der Hefegabe und der Belüftung auf diese Zielgröße dargestellt ist.

Höhere Belüftungsraten führen zu geringeren Anstiegen der Alterungsindikatoren. Auch wenn dieser Effekt deutlich ist (ca. 20 % geringere Zunahme), so ist er aufgrund einer hohen Unsicherheit des Modells nicht signifikant.

Der relative deutliche Einfluss der Belüftung auf das Delta der Alterungsindikatoren verursacht bei der Verkostung jedoch nur eine tendenzielle Verbesserung mit höheren Belüftungsraten. Das gilt sowohl für die Alterungsnote als auch für die Alterungsakzeptanz (Abb. 4.37 + Abb. 4.38).

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

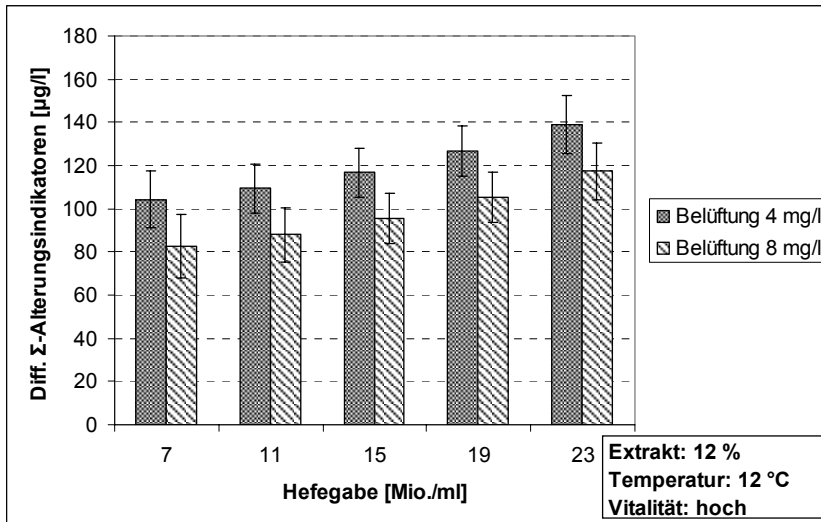


Abb. 4.36: Einfluss von Hefegabe und Belüftung auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab)

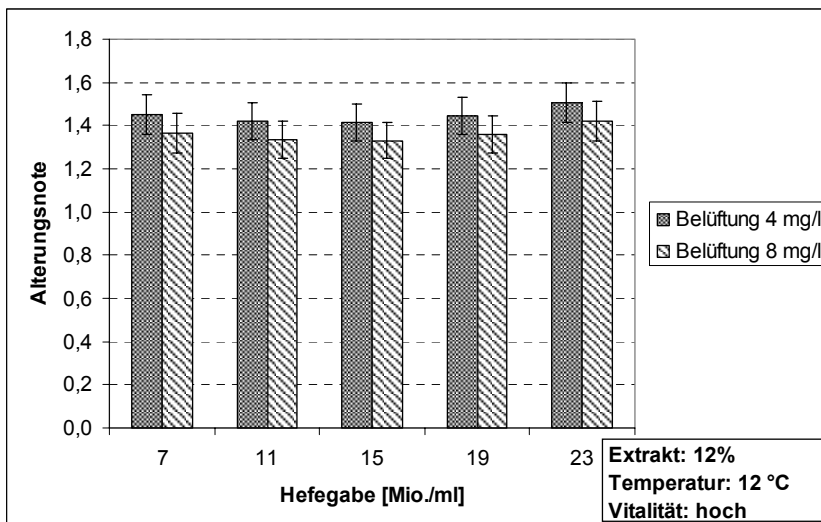


Abb. 4.37: Einfluss von Hefegabe und Belüftung auf die Alterungsnote (20-I-Maßstab)

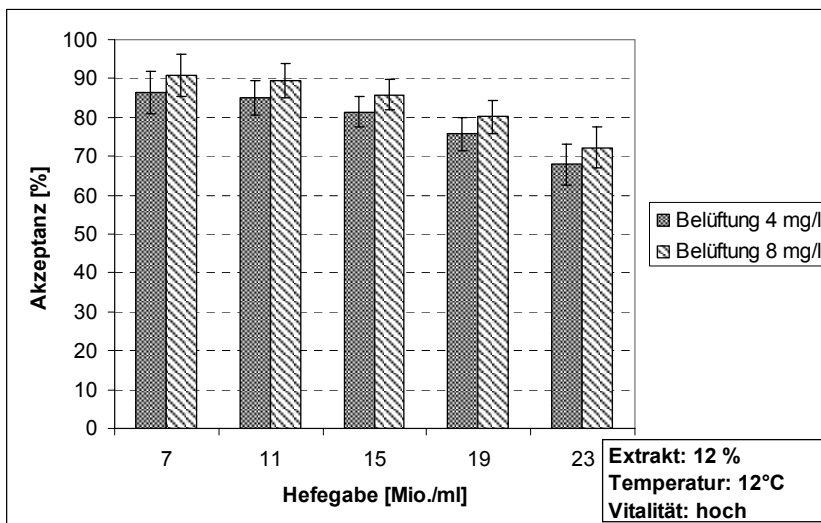


Abb. 4.38: Einfluss von Hefegabe und Belüftung auf die Alterungsakzeptanz (20-I-Maßstab)

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Höhere Temperaturen verursachen eine gleichmäßige Erhöhung des Delta der Alterungsindikatoren, die jedoch geringer ist als die der Belüftung. Aufgrund der Unsicherheiten des Modells kann diese Entwicklung nur als tendenziell bezeichnet werden (Abb. 4.39).

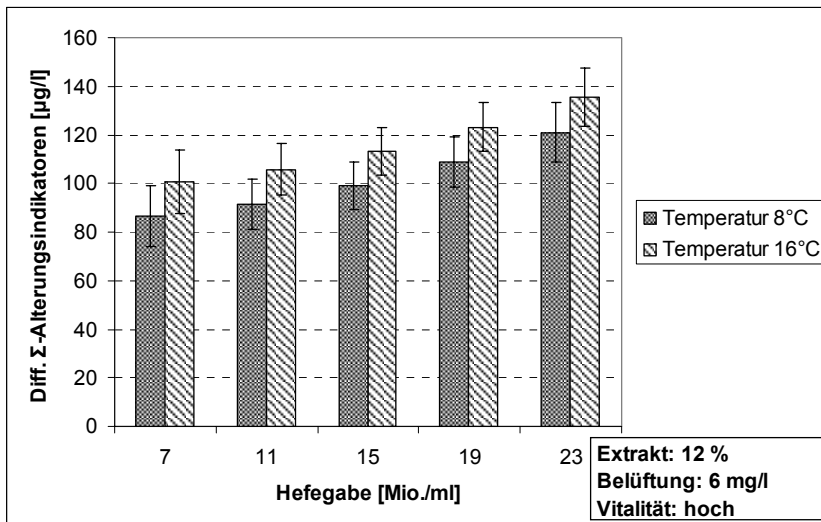


Abb. 4.39: Einfluss von Hefegabe und Temperatur auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab)

Die Temperatur bewirkt bei der Alterungsnote zum Teil sogar signifikante Änderungen, jedoch wirkt sich hier die Temperaturerhöhung trotz tendenziell erhöhter Alterungsindikatoren positiv auf die Alterungsnote aus (Abb. 4.40).

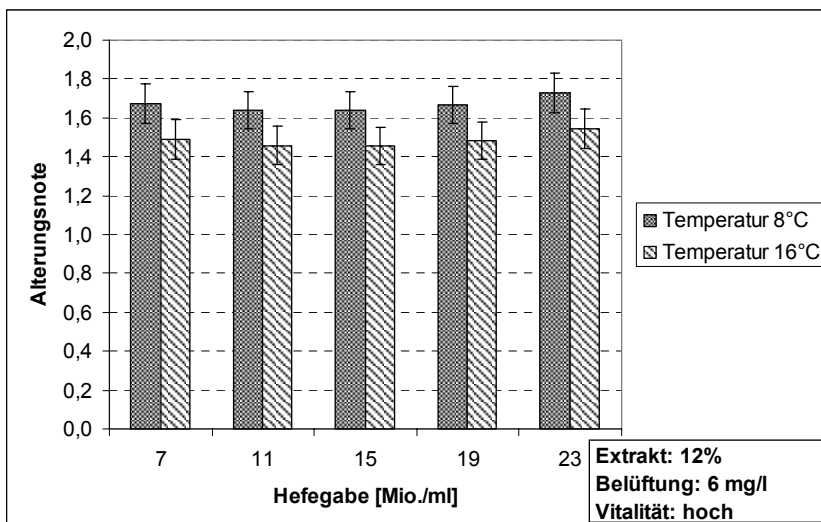


Abb. 4.40: Einfluss von Hefegabe und Temperatur auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab)

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Akzeptanz zeigt sich ebenfalls eine höhere Temperatur als vorteilhaft, jedoch sind hier die Unterschiede nicht signifikant (Abb. 4.41). Dass trotz eines erhöhten Delta der Alterungsindikatoren die Alterungsverkostung bei höheren Temperaturen besser ausfällt, dürfte auf eine stärkere Bildung aromarelevanter Stoffe zurückzuführen sein. Dieser Zusammenhang wird im Abschnitt 4.3.2 behandelt.

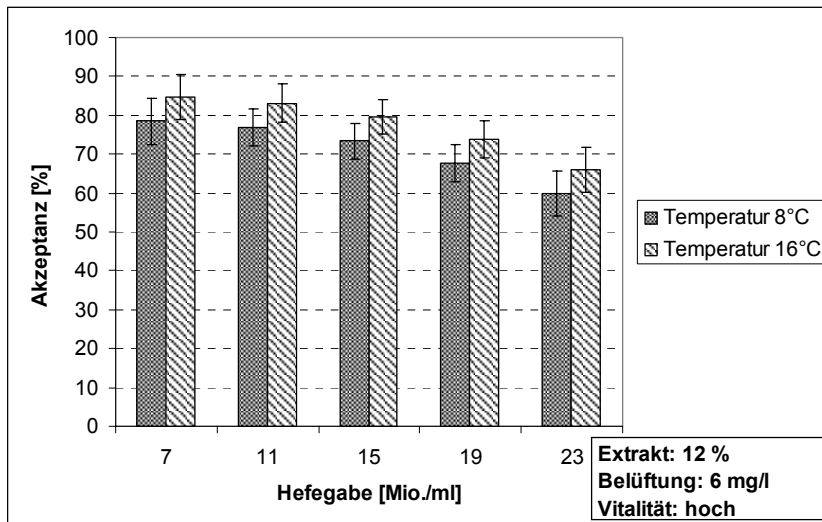


Abb. 4.41: Einfluss von Hefegabe und Temperatur auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab)

Wie aus Tabelle 4.40 hervorgeht, wird das Modell für das Delta der Alterungsindikatoren durch die Interaktion zwischen Hefegabe und Vitalität beeinflusst. Interaktionen bedeuten, dass gegenläufige Entwicklungen der Zielgröße verursacht werden. Dieses ist in Abb. 4.42 klar zu erkennen.

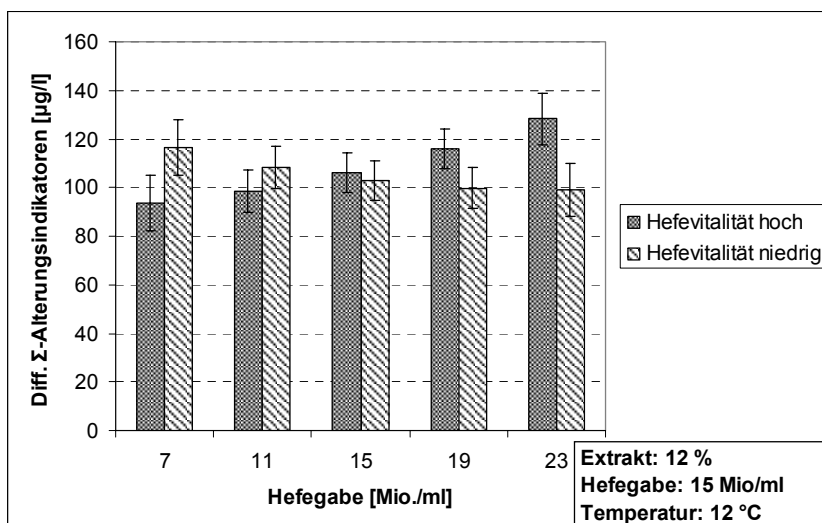
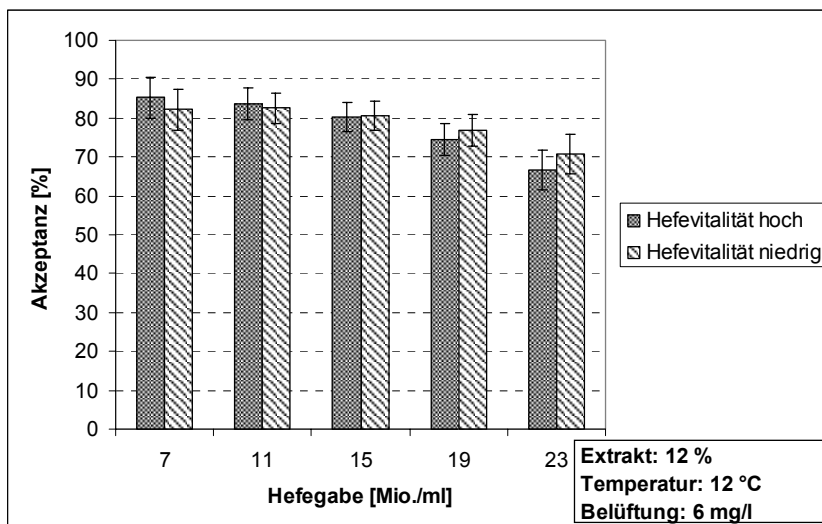


Abb. 4.42: Einfluss von Hefegabe und Vitalität auf das Delta der Alterungsindikatoren (20-I-Maßstab)



## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei einer Hefe in einem sehr guten Zustand wird die Zunahme der Alterungsindikatoren mit höheren Hefegaben größer, bei einem schlechteren Hefezustand sinkt das Delta der Alterungsindikatoren mit steigender Hefegabe, wobei die meisten der Veränderungen nicht signifikant sind. Für die Alterungsnote hat die Vitalität keine nennenswerten Auswirkungen. Die Alterungsakzeptanz kann für diese Parameterkombination eine ähnliche Tendenz festgestellt werden wie für das Delta der Alterungsindikatoren, jedoch ist diese sehr schwach, sodass hier auch keine Interpretationen vorgenommen werden kann (Abb. 4.43).



**Abb. 4.43: Einfluss von Hefegabe und Vitalität auf die Alterungsakzeptanz (20-I-Maßstab)**

Die Hefevitalität hat für die untersuchte Variation (ICP >6,2 und ICP 5,8) neben der in Abb. 4.42 dargestellten Interaktion für das Delta der Alterungsindikatoren keinen nennenswerten Einfluss auf die Geschmacksstabilität.

In der Brauerei A ergaben sich die in Tab. 4.43 dargestellten Kennzahlen und F-Werte für das Modell der Differenzen zwischen den Alterungsindikatoren der frischen und forciert gealterten Biere. Bei dem ansonsten sehr guten Modell muss beachtet werden, dass die Curvature signifikant ist, damit ist der angenommene lineare Zusammenhang zwischen den Versuchspunkten nicht korrekt. Die Differenz der Alterungsindikatoren wird in Brauerei A durch viele Faktoren bzw. Interaktionen beeinflusst. Insbesondere die Belüftung hat deutlichen Einfluss und verursacht sehr viele Interaktionen. Dies wird auf die verwendete Draufflasstechnik zurückzuführen sein, da die Belüftung im 20-l-Maßstab nur einen geringen Einfluss hatte. Am

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

stärksten wird die Zunahme der Alterungsindikatoren durch die Hefegabe und die Interaktion zwischen Hefegabe und Belüftung beeinflusst.

**Tab. 4.43: Statistische Kennzahlen und F-Werte des Modells für Delta der Alterungsindikatoren der Versuche in Brauerei A**

Delta-Summe Alterungsindikatoren Brauerei A			
Faktor	F-Wert	p-Wert	
Temperatur	31,7	0,0111	Lack of Fit [p-Wert] 0,61
Hefegabe	276,5	0,0005	Curvature [p-Wert] 0,03
Belüftung	133,3	0,0014	Adj R-Squared 0,99
Temperatur × Hefegabe	0,0	0,9041	Pred. R-Squared 0,89
Temperatur × Belüftung	16,5	0,0270	Adeq. Precision 34,64
Hefegabe × Belüftung	267,9	0,0005	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.] -
Temperatur × Hefegabe × Belüftung	91,4	0,0024	

Modellgleichungen:

Belüftung 1 Sud:  $-145,13 + 18,50 \times \text{Temperatur} + 25,95 \times \text{Hefegabe} - 1,85 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$

Belüftung 2 Sud:  $437,13 - 28,50 \times \text{Temperatur} - 18,9 \times \text{Hefegabe} + 1,80 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$

In den Tab. 4.44 und 4.45 sind die Kennzahlen der Modelle für die Alterungsnote und für die Alterungsakzeptanz dargestellt.

**Tab. 4.44: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Modell der Alterungsnote der Versuche in Brauerei A**

Alterungsnote Brauerei A			
Faktor	F-Wert	p-Wert	
Temperatur	10,9	0,0455	Lack of Fit [p-Wert] 0,74
Hefegabe	12,3	0,0395	Curvature [p-Wert] 0,17
Belüftung	6,5	0,0846	Adj R-Squared 0,81
Temperatur × Hefegabe	6,4	0,0856	Pred. R-Squared 0,18
Temperatur × Belüftung	0,0	0,8582	Adeq. Precision 9,00
Hefegabe × Belüftung	9,7	0,0528	Eliminierte Ausreißer [Stdnr.] -
Temperatur × Hefegabe × Belüftung	3,1	0,1784	

Modellgleichungen:

Belüftung 1 Sud:  $1,91 - 0,02 \times \text{Temperatur} + 0,05 \times \text{Hefegabe} - 0,003 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$

Belüftung 2 Sud:  $-1,44 + 0,20 \times \text{Temperatur} + 0,29 \times \text{Hefegabe} - 0,018 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$

**Tab. 4.45: Statistische Kennzahlen und F-Werte für das Modell der Alterungsverkostung der Versuche in Brauerei A**

Alterungsakzeptanz Brauerei A			
Faktor	F-Wert	p-Wert	
Temperatur	15,0	0,0117	Lack of Fit [p-Wert] 0,81
Hefegabe	70,4	0,0004	Curvature [p-Wert] 0,49
Belüftung	0,0	1,0000	Adj R-Squared 0,92
Temperatur × Hefegabe	10,4	0,0233	Pred. R-Squared 0,85
Hefegabe × Belüftung	26,7	0,0036	Adeq. Precision 16,14
			Eliminierte Ausreißer [Stdnr.] -

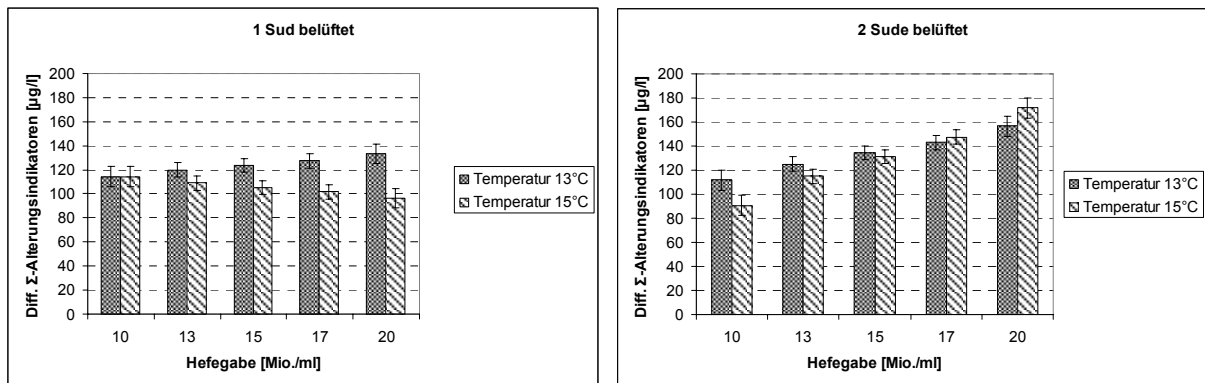
Modellgleichungen:

Belüftung 1 Sud:  $128,75 - 3,75 \times \text{Temperatur} - 6,25 \times \text{Hefegabe} + 0,42 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$

Belüftung 2 Sud:  $148,75 - 3,73 \times \text{Temperatur} - 7,58 \times \text{Hefegabe} + 0,42 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Modelle zeichnen sich durch gute statistische Kennzahlen aus. Beide Modelle werden deutlich von der Hefegabe und der Interaktion der Hefegabe und der Belüftung beeinflusst. Das stimmt mit der Beeinflussung der Alterungsindikatoren überein. Für die Alterungsnote spielt die Temperatur noch eine deutlichere Rolle als bei der Alterungsakzeptanz. In Abb. 4.44 (a+b) sind diese Zusammenhänge für das Delta der Alterungsindikatoren dargestellt.



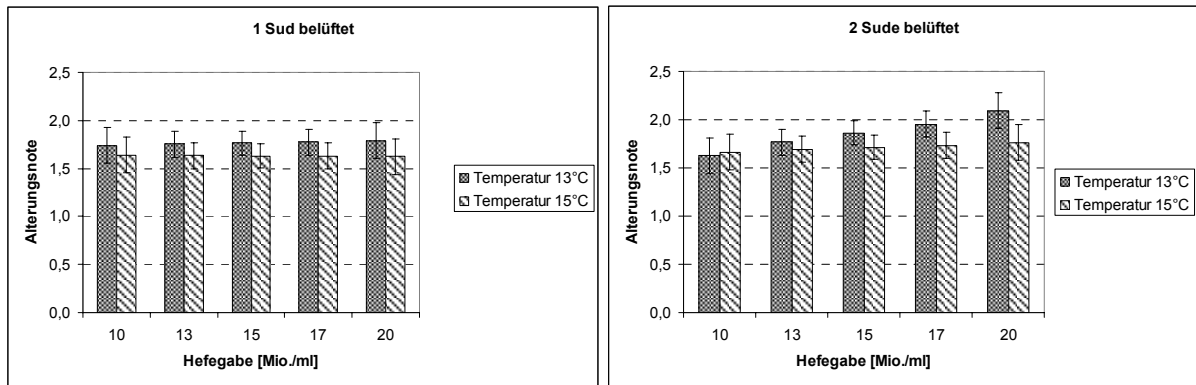
**Abb. 4.44 a+b: Einfluss von Temperatur, Hefegabe und Belüftung auf das Delta der Alterungsindikatoren in Brauerei A**

Da die dargestellten linearen Verläufe nicht korrekt sind, müssen hauptsächlich die Werte bei 10 bzw. 20 Mio. Zellen/ml betrachtet werden, da diese die tatsächlichen Versuchsergebnisse repräsentieren. Werden beide Sude pro Tank belüftet (Abb. 4.44 b), so wird der negative Einfluss einer erhöhten Hefegabe, wie er im 20-l-Maßstab vorlag, bestätigt. Der Einfluss der Temperatur ist jedoch uneinheitlich. Wird nur der erste der beiden Sude pro Tank belüftet (Abb. 4.44 a), so wird nur bei 13 °C das Delta der Alterungsindikatoren mit größerer Hefegabe gesteigert, bei 15 °C ist die Zunahme der Alterungsindikatoren zwischen frischem und forciert gealtertem Bier geringer.

Wie bereits bei den Versuchen im 20-l-Maßstab ist ein Einfluss der Gärparameter auf die Geschmacksstabilität anhand der Alterungsnote kaum erkennbar (Abb. 4.45 a+b). Die Alterungsakzeptanz erweist sich auch bei diesen Versuchen als deutlich sensibler gegenüber dem Einfluss von Variationen der Gärungsparameter auf die Geschmacksstabilität (Abb. 4.46 a+b).

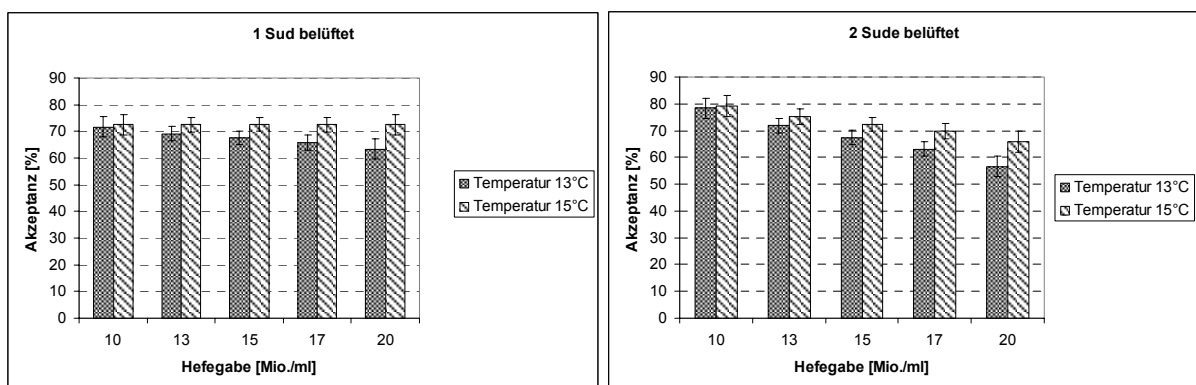
Die Entwicklung des Delta der Alterungsindikatoren und die Zusammenhänge für die Alterungsakzeptanz zeigen wie bei den Versuchen im 20-l-Maßstab eine gute Übereinstimmung. Werden beide Sude pro Tank belüftet, so kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Alterungsindikatoren und zu einer Abnahme der Akzeptanz.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abb. 4.45 a+b: Einfluss von Temperatur, Hefegabe und Belüftung auf die Alterungsnote in Brauerei A**

Ähnlich wie bei den Pilotversuchen ist bei der Akzeptanz ein gewisser Vorteil von höheren Gärttemperaturen zu erkennen, obwohl das Delta der Alterungsindikatoren bei 15 °C eine größere Steigerung erfährt als bei 13 °C. Die Übereinstimmung zwischen dem Verlauf der Alterungsindikatoren und der Akzeptanz ist ebenfalls bei den Versuchen vorhanden, bei denen nur einer der beiden Sude pro Tank belüftet wurde. Bei 13 °C kommt es mit Erhöhung der Hefegabe von 10 auf 20 Mio. Zellen/ml zu einer Steigerung der Alterungsindikatoren sowie einer Verringerung der Akzeptanz. Die Verringerung des Delta der Alterungsindikatoren bei 15 °C im Verlauf der Hefegabeerhöhung spiegelt sich in der Akzeptanz nicht deutlich wider, da es hier zu keiner Veränderung der Akzeptanz kommt.



**Abb. 4.46 a+b: Einfluss von Temperatur, Hefegabe und Belüftung auf die Alterungsakzeptanz in Brauerei A**

Da die Verfahrensweise mit Belüftung eines Sudes am ehesten mit den Versuchen im 20-l-Maßstab vergleichbar ist, muss festgestellt werden, dass die Übereinstimmung zwischen Pilot- und Produktionsmaßstab zum Teil nicht sehr gut ist. So ist der deutlich negative Einfluss einer Erhöhung der Hefegabe, die im Pilotmaßstab vorliegt

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

im großtechnischen Maßstab bei einem belüfteten Sud nicht vollständig nachvollziehbar. Aus diesem Grund sollte auch eine Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen den Maßstäben nicht möglich sein.

**Tab. 4.46: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Delta-Summe Alterungsindikatoren)**

Bedingungen/Belüftung	Diff. $\Sigma$ -Alterungsindikatoren			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	$\approx 6$ mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml		107,7 $\pm$ 9,4 $\mu$ g/l	114,4 $\pm$ 8,2 $\mu$ g/l	111,6 $\pm$ 8,2 $\mu$ g/l
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml		129,3 $\pm$ 8,8 $\mu$ g/l	133,4 $\pm$ 8,2 $\mu$ g/l	156,6 $\pm$ 8,2 $\mu$ g/l
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml		111,3 $\pm$ 10,5 $\mu$ g/l	114,4 $\pm$ 8,2 $\mu$ g/l	90,6 $\pm$ 8,2 $\mu$ g/l
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml		132,9 $\pm$ 9,7 $\mu$ g/l	96,4 $\pm$ 8,2 $\mu$ g/l	171,6 $\pm$ 8,2 $\mu$ g/l

Überraschender Weise ist die Übertragbarkeit jedoch mit Ausnahme der Bedingungen 15 °C und 20 Mio. Zellen/ml (Tab. 4.46) sehr gut. Da sich in den großtechnischen Versuchen die einzelnen Versuchskombinationen jeweils auf einen einzigen Versuch stützen, ist es möglich, dass bei diesen Bedingungen ein Fehler vorlag (Versuchsdurchführungsfehler oder Analysenfehler) und dieses zu einem verfälschten Bild führte. Dieses kann jedoch im Nachhinein nicht mehr festgestellt werden.

**Tab. 4.47: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Alterungsnote)**

Bedingungen/Belüftung	Alterungsnote			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	$\approx 6$ mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml		1,44 $\pm$ 0,08	1,74 $\pm$ 0,18	1,63 $\pm$ 0,18
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml		1,47 $\pm$ 0,08	1,79 $\pm$ 0,18	2,09 $\pm$ 0,18
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml		1,44 $\pm$ 0,09	1,63 $\pm$ 0,18	1,66 $\pm$ 0,18
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml		1,49 $\pm$ 0,09	1,62 $\pm$ 0,18	1,76 $\pm$ 0,18

**Tab. 4.48: Prüfung der Versuchsmaßstäbe auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse (Alterungsakzeptanz)**

Bedingungen/Belüftung	Akzeptanz			
	2l-Gärungen	20l-Gärungen	3000hl-Gärungen	
	$\approx 6$ mg/l	6 mg/l	1 Sud	2 Sude
12,7%; 13°C; 10 Mio./ml		84,8 $\pm$ 4,3 %	71,7 $\pm$ 3,8 %	78,3 $\pm$ 3,8 %
12,7%; 13°C; 20 Mio./ml		72,1 $\pm$ 4,3 %	63,3 $\pm$ 3,8 %	56,7 $\pm$ 3,8 %
12,7%; 15°C; 10 Mio./ml		84,4 $\pm$ 4,6 %	72,5 $\pm$ 3,8 %	79,1 $\pm$ 3,8 %
12,7%; 15°C; 20 Mio./ml		72,8 $\pm$ 4,6 %	72,5 $\pm$ 3,8 %	65,8 $\pm$ 3,8 %

Eine Übertragbarkeit der Alterungsnote scheint nicht möglich zu sein, auch wenn zwei der Versuchskombinationen Überlappungen der Konfidenzintervalle aufweisen (Tab.

4.47). Generell sind die Werte im großtechnischen Maßstab schlechter als die des Pilotmaßstabes. Das gilt auch für die Alterungsakzeptanz (Tab. 4.48). Hier weisen drei Werte jeweils einen um etwa 10 % schlechter liegenden Wert für die großtechnischen Versuche auf. Lediglich bei den Bedingungen 15 °C und 20 Mio. Zellen/ml stimmen die Werte auffällig überein. Da es sich wieder um dieselbe Versuchskombination handelt, bei der das Delta der Alterungsindikatoren eine deutliche Abweichung aufwies, bleibt der Verdacht bestehen, dass bei dieser Parameterkombination ein Versuchsfehler vorliegt. Da dieser Fehler bei mindestens zwei unterschiedlichen Analysen vorliegt, wäre ein Analysenfehler auszuschließen, und damit würde es sich um einen Fehler in der Durchführung handeln. Dieses stellt jedoch die bisher diskutierten Ergebnisse im Produktionsmaßstab in Frage. Die Art des Einflusses weist deutlich auf einen Fehler bei der Hefegabe hin und mit Ausnahme der Gärzeit und des Schwefeldioxids ergab sich für keine der betrachteten Zielgrößen eine deutliche Beeinflussung durch die Hefegabe und damit wäre auch der Einfluss des Versuchsfehlers auf die bisher diskutierten Ergebnisse nur minimal.

Ein interessanter Aspekt des Vergleiches der Maßstäbe ist der Unterschied in der Alterungsverkostung. Die großtechnischen Versuche weisen sensorisch eine deutlich schlechtere Geschmackstabilität auf als die Versuche im Pilotmaßstab, obwohl beispielsweise die Differenzen der Alterungsindikatoren kaum Unterschiede aufweisen. Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass die höheren Alkohole ebenfalls vergleichbare Werte lieferten. Aber ein entscheidender Unterschied wurde bei den aromaintensiven Estern Ethylacetat und Isoamylacetat festgestellt. Hier ergaben die Gärungen im Pilotmaßstab einen um etwa ein Drittel höheren Wert für Ethylacetat und eine nahezu doppelt so hohe Konzentration an Isoamylacetat (siehe Tab. 4.25 und 4.30). Dieser Zusammenhang weist deutlich darauf hin, dass die Geschmackstabilität von der Biermatrix abhängt und dass Substanzen wie Ester maskierende Effekte aufweisen können.

### **4.3.2 Betrachtung verschiedener Einflussfaktoren der Geschmacksstabilität unter Variation der Gärparameter und der Hefevitalität**

Im vorangegangenen Abschnitt (4.3.1) konnte gezeigt werden, dass es eine gute Übereinstimmung zwischen dem Delta der Summe der Alterungsindikatoren und der Alterungsverkostung, im vorliegenden Fall insbesondere mit der Alterungsakzeptanz,

existiert. Das gilt natürlich auch für die absolute Summe der Alterungsindikatoren, wobei im 20-I-Maßstab diese Übereinstimmung etwas geringer ausfällt, als für das Delta der Alterungsindikatoren (Modelldaten und Modellgleichungen im Anhang AH Tab. 16-18). Die sehr gute Übereinstimmung zwischen Alterungsverkostung und den entsprechenden analytischen Daten wurde bei der Entwicklung der verwendeten Methoden überzeugend dargestellt [75, 153, 171, 191, 192, 193]. Jedoch kann mit den Alterungsindikatoren nicht immer die sensorisch gefundene Alterung erklärt werden. Beispielsweise spiegelt sich der starke Anstieg der Alterungsindikatoren bei der Steigerung der Stammwürze nicht in den Verkostungsergebnissen wider (Abschnitt 4.3.1). In diesem Zusammenhang wurde bereits auf maskierende Effekte hingewiesen, jedoch haben noch weitere Faktoren Einfluss auf die Geschmacksstabilität wie z. B. antioxidative Substanzen (Abschnitt 2.3).

Um in diesem Zusammenhang den Einfluss des Zusammenwirkens von Faktoren beurteilen zu können, wird im Folgenden die Entwicklung einiger Faktoren bei Variation der Gärparameter den Einwicklungen der sensorischen Alterung der forciert gealterten Biere aus dem 20-I-Maßstab gegenübergestellt. Dabei werden folgende Zielgrößen betrachtet:

- Alterungsnote (forciert gealtert)
- Alterungsakzeptanz (forciert gealtert)
- Summe Alterungsindikatoren (forciert gealtert)
- Delta der Summe der Alterungsindikatoren (forciert gealtert)
- Schwefeldioxid
- Lag-Time
- Summe der höheren Alkohole
- Summe der Ester (Bieraromastoffanalytik)
- Ethylacetat
- Isoamylacetat

Die Werte für die dargestellten Versuchsbedingungen wurden aus den jeweiligen Modellen berechnet. Die bisher noch nicht verwendeten Modelle sind mit einigen Kennzahlen im Anhang (AH Tab.16-18) dargestellt.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Summe der höheren Alkohole sind Propanol-1, 2-Methylpropanol, 2-Methylbutanol und 3-Methylbutanol zusammengefasst und in der Summe der Ester fließen die in Tab. 4.49 dargestellten Substanzen ein.

**Tab. 4.49: Komponenten der Summe der Ester (Bieraromastoffanalytik)**

Summe der Ester (Bieraromastoffanalytik)	
Essigsäure-Isobutylester	Essigsäure-2-Phenylethylester
Essigsäure-Hexylester	Buttersäure-Ethylester
Essigsäure-Heptylester	Hexansäure-Ethylester
Essigsäure-Octylester	Octansäure-Ethylester
Essigsäure-Furfurylester	Decansäure-Ethylester

Neben dem SO<sub>2</sub> als starke antioxidative und maskierend wirkende Substanz (Abschnitt 2.3) wurde noch die Lag-Time in diese Darstellung aufgenommen. Die Lag-Time gilt als objektives Kriterium für die endogene antioxidative Aktivität von Bier [18, 83, 85, 87, 88, 190, 257, 269, 271, 272, 273].

In Tab. 4.50 sind die Veränderungen der einzelnen Größen bei Variation der Stammwürze dargestellt. Alle anderen Gärparameter bleiben unverändert.

**Tab. 4.50: Einflussgrößen der Bieralterung bei Variation der Stammwürze**

Hefegabe 15 Mio./ml; Temperatur 12°C; Belüftung 6 mg/l; Vitalität hoch					
Extrakt	8%	10%	12%	14%	16%
Alterungsnote	1,50	1,45	1,44	1,47	1,54
Akzeptanz [%]	76,8	79,4	80,2	79,2	76,4
Summe Alterungsindikatoren [µg/l]	117	144	176	213	253
Diff. Summe Alterungsindikatoren [µg/l]	73	86	106	133	168
Schwefeldioxid [mg/l]	3,0	6,4	10,7	15,9	22,0
Lag-Time [min]	98	101	104	107	110
Σ-höhere Alkohole [mg/l]	79,1	90,8	102,5	114,2	125,9
Σ-Ester (Bieraromastoffanalytik) [µg/l]	1152	1555	1894	2169	2380
Ethylacetat [mg/l]	14,6	22,8	33,0	44,5	55,7
Isoamylacetat [mg/l]	2,3	3,4	4,4	5,5	6,5

Bei einer Verdopplung der Stammwürze erreicht die Summe der Alterungsindikatoren bzw. das Delta der Alterungsindikatoren Werte die oberhalb der doppelten Konzentration liegen. Die sensorische Alterung bleibt über den gesamten Stammwürzebereich etwa auf demselben Niveau. Beim SO<sub>2</sub> gab es einen Anstieg auf einen Wert, der über dem 7fachen der Ausgangskonzentration lag. Die Lag-Time erfährt dadurch ebenfalls einen Anstieg. Die antioxidative Wirkung, die durch die Lag-Time gemessen wird und maßgeblich durch SO<sub>2</sub> bewirkt wird, reduziert die Radikalgenerierung im Verlaufe der forcierten Alterung und sollte damit bereits zu geringeren Mengen an Alterungskomponenten geführt haben (Abschnitt 2.3.1). Ebenso sollte die maskierende Wirkung des SO<sub>2</sub> durch Bildung von Carbonyl-Sulfit-



## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Komplexen im Verlauf der forcierten Alterung stattgefunden haben. Damit ist davon auszugehen, dass ohne die hohen SO<sub>2</sub>-Werte noch deutlich mehr Alterungsindikatoren gebildet worden wären.

Entscheidend für die geringfügige Änderung in der sensorischen Alterung ist aber der starke Anstieg von Aromakomponenten im Bier. Insbesondere die Ester steigen deutlich an. Die Summe der Ester aus der Bieraromastoffanalytik verdoppelt sich nahezu, Ethylacetat steigt um mehr als das 4fache und Isoamylacetat verdreifacht sich nahezu. Dass die Alterungsverkostung trotz deutlich weitersteigender Esterwerte oberhalb von 12 % Extrakt tendenziell wieder abnimmt, ist durch die Absolutgehalte der Ester zu erklären. HERRMANN [116] stellte fest, dass Ethylacetat und Isoamylacetat sich je nach Konzentration in ihrem sensorischen Eindruck gegenseitig beeinflussen. Bei Ethylacetatwerten oberhalb von 45 mg/l und Isoamylacetatwerten oberhalb von 4 mg/l lies die Esternote eines Bieres sehr stark nach und bei sehr hohen Werten (Ethylacetat >50 mg/l und Isoamylacetat >6 mg) schmeckten die Biere sogar „leer“. Dies kann damit auch dazu führen, dass die Alterungsaromen wieder deutlicher wahrnehmbar werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Modelle für Isoamylacetat und Ethylacetat Unsicherheiten aufweisen (Abschnitt 4.2.3).

In Tab. 4.51 sind die Veränderungen der einzelnen Größen bei Variation der Gärtemperatur dargestellt.

**Tab. 4.51: Einflussgrößen der Bieralterung bei Variation der Gärtemperatur**

Extrakt 12%; Hefegabe 15 Mio./ml; Belüftung 6 mg/l; Vitalität niedrig					
Temperatur	8°C	10°C	12°C	14°C	16°C
Alterungsnote	1,73	1,56	1,44	1,37	1,36
Akzeptanz	69,7	76,1	80,7	83,4	84,2
Summe Alterungskomponenten	173	171	173	181	193
Diff. Summe Alterungskomponenten	96	99	103	106	110
SO <sub>2</sub>	12,6	13,4	13,7	13,4	12,5
Lag-Time	125	119	112	107	102
Σ-höhere Alkohole	93,5	97,5	102,5	108,7	116,0
Σ-Ester (Bieraromastoffanalytik)	1404	1685	1909	2076	2186
Ethylacetat	32,5	35,0	35,8	35,0	32,6
Isoamylacetat	3,6	4,1	4,3	4,4	4,1

Auffällig ist hier ein starker Anstieg der Akzeptanz mit der Gärtemperatur. Die Alterungskomponenten nehmen mit Steigerung der Temperatur leicht zu, damit sollte eher eine Verschlechterung der sensorischen Alterung erwartet werden. Der SO<sub>2</sub>-Gehalt verändert sich kaum, ist jedoch auf einem hohen Niveau. Die Lag-Time verringert sich mit steigender Gärtemperatur, was in Übereinstimmung mit den ansteigenden Alterungskomponenten steht. Die deutliche Verbesserung der

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

sensorischen Alterungswahrnehmung muss jedoch durch die Biermatrix verursacht werden. Zwischen 8 und 10 °C reagiert in erster Linie Isoamylacetat mit einem deutlichen Anstieg und auch hier ist der größte Anstieg in der Akzeptanz zu finden. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur reagieren Ethylacetat und Isoamylacetat mit schwankenden Werten, die sich jedoch nicht deutlich verändern. In diesem Bereich kann jedoch von einer hohen Aromaintensität dieser Ester ausgegangen werden, da HERRMANN [116] die höchste Aromaintensität durch Zusammenwirken von Ethylacetat und Isoamylacetat bei Konzentrationen von 25 mg/l (Ethylacetat) und 4 mg/l (Isoamylacetat) festgestellt hat. Das weitere Ansteigen der Alterungsakzeptanz kann auf das weitere Ansteigen der untersuchten Summe der Ester und der höheren Alkohole zurückzuführen sein.

Im vorangegangenen Abschnitt 4.3.2 wurde festgestellt, dass die Hefegabe einen starken Einfluss auf die Geschmacksstabilität hat. Ebenso hat die Belüftung einen Einfluss, jedoch stellte sich dieser nicht so deutlich dar, wie der der Hefegabe. In den Tabellen 4.52 und 4.53 sind diese beiden Einflussgrößen kombiniert dargestellt.

**Tab. 4.52: Einflussgrößen der Bieralterung bei niedriger Hefegabe und Variation der Belüftung**

Extrakt 12 %; Hefegabe 7 Mio./ml; Gärtemperatur 12°C; Vitalität hoch					
Belüftung	4 mg/l	5 mg/l	6 mg/l	7 mg/l	8 mg/l
Alterungsnote	1,45	1,48	1,48	1,44	1,37
Akzeptanz [%]	86,5	85,0	85,3	87,2	90,9
Summe Alterungsindikatoren [µg/l]	166	170	174	178	182
Diff. Summe Alterungsindikatoren [µg/l]	104	99	94	88	83
Schwefeldioxid [mg/l]	24,0	19,8	16,5	14,2	12,8
Lag-Time [min]	129	123	118	113	109
Σ-höhere Alkohole [mg/l]	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7
Σ-Ester (Bieraromastoffanalytik) [µg/l]	1948	1973	1999	2024	2049
Ethylacetat [mg/l]	30,2	31,5	32,9	34,4	35,9
Isoamylacetat [mg/l]	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6

**Tab. 4.53: Einflussgrößen der Bieralterung bei hoher Hefegabe und Variation der Belüftung**

Extrakt 12 %; Hefegabe 23 Mio./ml; Gärtemperatur 12°C; Vitalität hoch					
Belüftung	4 mg/l	5 mg/l	6 mg/l	7 mg/l	8 mg/l
Alterungsnote	1,50	1,53	1,53	1,49	1,42
Akzeptanz [%]	67,9	66,4	66,6	68,6	72,3
Summe Alterungsindikatoren [µg/l]	223	211	199	187	175
Diff. Summe Alterungsindikatoren [µg/l]	139	134	128	123	117
Schwefeldioxid [mg/l]	15,5	11,3	8,0	5,7	4,2
Lag-Time [min]	99	96	93	90	88
Σ-höhere Alkohole [mg/l]	106,3	106,3	106,3	106,3	106,3
Σ-Ester (Bieraromastoffanalytik) [µg/l]	1650	1676	1701	1726	1752
Ethylacetat [mg/l]	30,4	31,8	33,2	34,6	36,1
Isoamylacetat [mg/l]	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2

In Tab. 4.52 sind die Zielgrößen bei konstanter Hefegabe von 7 Mio. Zellen/ml und Variation der Belüftung dargestellt. In Tab. 4.53 ist ebenfalls die Variation der Belüftung dargestellt, jedoch bei einer Hefegabe von 23 Mio. Zellen/ml. Der Unterschied in der sensorisch wahrnehmbaren Alterung zwischen der hohen und der niedrigen Hefegabe ist hier deutlich zu erkennen. Die Veränderung mit der Belüftung verläuft für beide Hefegaben gleichförmig. Bei einem Anstieg der Belüftung von 4 auf 5 mg/l kommt es zunächst zu einem geringfügigen Rückgang der Akzeptanz, während mit weiterer Steigerung der Belüftung ein Anstieg zu beobachten ist. Im Fall der niedrigen Hefegabe erreicht die Akzeptanz hier einen Wert von 90 %, was einer kaum wahrnehmbaren Alterung entspricht (100 % = keine Alterung).

Das Delta der Alterungsindikatoren geht bei der niedrigen Hefegabe auch mit steigender Belüftung zurück, wodurch die Verbesserung der Alterungsnote und der Akzeptanz erklärbar wäre. Jedoch steigt die Gesamtsumme der Alterungsindikatoren bei Steigerung der Belüftung an, daher muss eine höhere Belüftung bei niedrigen Hefegaben bereits zu einer Steigerung der Alterungsindikatoren im frischen Bier führen. In diesem Zusammenhang ist jedoch schwer zu erklären, warum es mit steigender Belüftung zu einer Verbesserung der sensorischen Alterung kommt. Bei den höheren Alkoholen und den Estern gibt es kaum Änderungen. Lediglich Ethylacetat verzeichnet einen nennenswerten Anstieg, jedoch sollte es nach HERRMANN [116] in dem vorliegenden Bereich nicht zu einer Steigerung der Intensität des Esteraromas kommen, der die Alterung überdecken kann .

Zu erklären ist damit auch nicht der deutliche Unterschied zwischen den Hefegaben. Die höheren Alkohole und Ester liegen für beide Hefegaben in ähnlichen Bereichen. Das Niveau der Summe der Alterungsindikatoren liegt bei der hohen Hefegabe zwar bei niedrigen Belüftungsraten deutlich über dem der niedrigen Hefegabe, wodurch der Unterschied in der Sensorik zu erklären wäre, jedoch liegt dieser Wert für beide Hefegaben bei 8 mg/l Belüftung auf dem gleichen Niveau. Daher kann nur spekuliert werden, dass in erster Linie der Anstieg der Alterungsindikatoren relevant ist. Dies könnte der Fall sein, wenn beispielsweise die im frischen Bier vorhandenen Carbonyle zum einem großen Teil mit Sulfite Komplexe bilden und damit erst die im Verlaufe der Alterung entstehenden Carbonyle aromarelevant sind. Im vorliegenden Fall stand auf alle Fälle genügend Sulfite für die Komplexbildung zur Verfügung. Mit der Differenz der

Alterungsindikatoren lässt sich der Verlauf der sensorischen Alterung am einfachsten erklären.

Wird davon ausgegangen, dass die absolute Summe der Alterungsindikatoren der relevantere Wert ist, so muss die Belüftung alterungsrelevante Reaktionen auslösen, die mit den dargestellten Werten nicht erfasst werden, um die vorliegenden Verläufe zu erklären. Dass eine hohe Belüftung einen positiven Effekt auf die Geschmacksstabilität hat und dieser Eindruck nicht auf einem ungenügenden Modell beruht, kann anhand der tatsächlich gefundenen Werte dargestellt werden. Für jeden der Parameter wurden Versuche an den so genannten Sternpunkten im Rahmen der RSM Versuchsplanung durchgeführt (Abschnitt 3.1.1.2). Diese sind Versuchskombinationen, bei denen alle anderen Faktoren auf den Werten der Zentralpunkte belassen werden, und nur für den zu untersuchende Faktor ein Extremwert gewählt wird, der außerhalb des eigentlichen Untersuchungsbereiches liegt. Für eine hohe Belüftung lag dieser Extremwert bei über 9 mg/l, und dieses wurde nur über langes und intensives Belüften erreicht. Die beiden Versuche, die mit diesen Bedingungen durchgeführt wurden (mit hoher und niedriger Hefevitalität), wiesen die besten Alterungsnoten (1,15 und 1,1) und die höchsten Akzeptanzen (95 und 96,7 %) aller 42 Versuche im 20-I-Maßstab auf (Versuche mit den Standardnr. 16 und 37 in AH Tab. 6f). Dieses weist deutlich auf einen positiven Einfluss von hohen Belüftungsraten hin.

### **4.3.3 Gesamtdiskussion Geschmacksstabilität**

Wie die dargestellten Untersuchungen zeigen, haben die Gärbedingungen deutliche Auswirkungen auf die Geschmacksstabilität. Jedoch wurden diese Aspekte in der Literatur bisher kaum betrachtet. Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Stammwürzen auf die Geschmacksstabilität wurden nicht gefunden, obwohl international das High-Gravity-Brauen weit verbreitet ist und den Stand der Technik darstellt. Anhand der hier dargestellten Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass trotz einer deutlichen Zunahme der Alterungsindikatoren die Stammwürze keinen bedeutenden Einfluss auf die sensorische Alterung hat. Interessant ist hier, dass das Verhältnis der Ester zueinander einen Einfluss auf die Wahrnehmung der Alterung hat (Abschnitt 4.3.2). Durch die unterschiedlich verlaufende Zunahme der einzelnen Ester mit steigendem Extrakt können sich beim

Rückverdünnen von High-Gravity-Bieren diese Verhältnisse ungünstig entwickeln und damit die sensorische Alterung verstärken.

In den vorliegenden Untersuchungen hatte die Hefegabe einen sehr starken Einfluss auf die Geschmacksstabilität. Eine hohe Hefegabe wirkte sich deutlich negativ auf die Bildung von Alterungsindikatoren und die Alterungsakzeptanz aus. Ein Grund dafür ist eine höhere SO<sub>2</sub>-Bildung bei niedrigen Hefegaben. SO<sub>2</sub> stellt eine stark antioxidativ wirkende Substanz dar, die das Entstehen von Radikalen verhindern bzw. verzögern kann und damit die Bildung von Alterungskomponenten verringert [5, 18, 270, 281]. Außerdem ist SO<sub>2</sub> in der Lage, Carbonyl-Sulfit-Komplexe zu bilden und damit alterungsrelevante Stoffe in nicht aromaaktiver Form zu binden [18, 25, 70, 107, 134, 153, 200]. Da jedoch durch den verwendeten Hefestamm insgesamt ein hohes Niveau an SO<sub>2</sub> erreicht wurde, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem vorliegenden Effekt der Hefegabe auf die Geschmacksstabilität ausschließlich um Auswirkungen von SO<sub>2</sub> handelt. Dass sich durch die größere Vermehrung eine größere Reduktionskraft der Hefe ergeben würde, ist ebenfalls eher unwahrscheinlich, da im frischen Zustand die Biere mit niedriger Hefegabe mehr Alterungsindikatoren aufwiesen als die Bier mit hoher Hefegabe (Berechnung der Werte durch Modellgleichung AH Tab.18 möglich).

LUSTIG [153] bzw. NARZIß et. al [191] fanden bei einer Verdopplung der Hefegabe kaum Veränderungen bei den Alterungsindikatoren bzw. bei der Alterungsverkostung. Jedoch wurde bei diesen Untersuchungen gleichzeitig die Belüftung stark variiert, sodass der Effekt der Hefegabe kaum beurteilt werden kann.

LUSTIG [153] bzw. NARZIß et. al [191] fanden negative Einflüsse mit steigender Belüftung. Deutlich waren diese bei der Verwendung von reinem Sauerstoff für die Würzebelüftung. Ein Vergleich mit den vorliegenden Versuchen ist jedoch wieder schwer zu ziehen, da immer mit einer Zweitbelüftung nach 6 h gearbeitet wurde. Dieses ist zwar vergleichbar mit den vorliegenden großtechnischen Versuchen, jedoch wurden bei diesen keine Variationen bei der Erstbelüftung durchgeführt. Somit kann ein Vergleich der Ergebnisse nicht vorgenommen werden.

In den vorliegenden Versuchen führten höhere Belüftungsraten zu leichten Verbesserungen bei den Alterungsindikatoren und bei der Verkostung. Wie beschrieben (Abschnitt 4.3.2), führten die Versuche mit den höchsten Belüftungsraten (sterile Luft, nicht reiner Sauerstoff) zu den besten Verkostungsergebnissen. Die

genauen Gründe dafür sind nicht bekannt. In der vorliegenden Untersuchung wurden trotz der intensiven Belüftung noch ausreichende Mengen an SO<sub>2</sub> gebildet, sodass sich die positiven Einflüsse einer guten Belüftung mit einer guten antioxidativen Aktivität ergänzen konnten. Ein weiterer Aspekt der hohen Belüftungsraten ist, dass die Gehalte an Acetaldehyd deutlich gesenkt werden können (Berechnung der Werte durch Modellgleichung AH Tab.18 möglich). Es wird davon ausgegangen, dass Acetaldehyd aromaintensivere Carbonyle aus den Carbonyl-Sulfit-Komplexen verdrängen kann und damit Alterungskomponenten freisetzt [27, 153, 281]. Durch ein geringeres Vorhandensein von Acetaldehyd können mehr negative Carbonyle gebunden bleiben. Dass intensive Belüftung, wie beispielsweise bei einer Flotation, positiven Einfluss auf die Geschmacksstabilität haben können, zeigen Untersuchungen von NARZIß et al. [192].

Die Erhöhung der Gärtemperatur von 8 auf 16 °C führte in den dargestellten Versuchen im Pilotmaßstab zu leichten Anstiegen der Alterungsindikatoren. Dieses wurde durch LUSTIG [153] bzw. NARZIß et. al [191] bestätigt, die im selben Temperaturbereich einen Anstieg verzeichneten, bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur auf 20 °C gingen die Alterungsindikatoren wieder zurück. Bei LUSTIG bzw. NARZIß wurden die Biere mit höheren Gärtemperaturen in der Alterungsverkostung schlechter bewertet, jedoch findet sich ein Hinweis, dass die schlechtere Bewertung nicht nur auf die Alterung sondern auf ein extrem verändertes Aromaprofil zurückzuführen war. In den vorliegenden Versuchen sind die Biere, die bei höherer Temperatur vergoren wurden, tendenziell besser beurteilt worden. Dieses wird auf erhöhte Werte an aromaintensiven Substanzen wie Estern und höheren Alkoholen zurückgeführt. In den Versuchen im Produktionsmaßstab wurden die Biere, die bei höheren Temperaturen hergestellt wurden, tendenziell besser beurteilt, obwohl die Temperatur um lediglich 2 °C verändert wurde. HASHIMOTO [111] empfahl zur Verbesserung der Geschmacksstabilität ebenfalls Maßnahmen, die die Estergehalte erhöhen.

Die Ester unterliegen jedoch im abgefüllten Bier Abbaureaktionen, die zum Teil chemischer Natur und zum Teil enzymatischer Natur sind [199, 279, 281]. Insbesondere der enzymatische Abbau der Ester kann zu einem starken Rückgang des Esteraromas führen, was eine frühere und stärkere Wahrnehmung des Alterungsaromas verursacht. Dieser Aspekt kann ebenfalls die sensorischen

Analysen der Geschmackstabilität in der vorliegenden Arbeit beeinflusst haben, jedoch wurden die Aromakomponenten im forciert gealterten Bier nicht bestimmt. Die Aktivität der Esterasen im abgefüllten Bier kann durch die Anwendung einer Kurzzeiterhitzung minimiert werden.

Das wichtige Thema Hefevitalität hat im untersuchten Bereich von ICP 5,8 und ICP >6,2 kaum Auswirkungen auf die Geschmacksstabilität. Sie ist an Interaktionen beteiligt, jedoch ist der Einfluss weder auf die Alterungsindikatoren noch auf die Verkostung deutlich. Dass Hefevitalitäten auch im deutlich schlechteren Bereich keinen einheitlichen Einfluss auf die Alterungsindikatoren hatten, zeigen Untersuchungen von BACK et al. [21], bei denen Hefechargen unterschiedlichen Vitalitäten von ICP 5,3 bis ICP 5,9 untersucht wurden.

### **5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Messung der Hefevitalität untersucht, um die Gäraktivität einer Hefesuspension vor einer Verwendung beurteilen zu können. Im Weiteren wurden die Auswirkungen der Variation von Gärparametern auf die Bildung von Stoffwechselprodukten und die Geschmacksstabilität in zwei unterschiedlichen Pilotmaßstäben (2 l und 20 l) sowie im Produktionsmaßstab (3000 hl) untersucht. Im 20-l-Maßstab wurde zusätzlich noch die Hefevitalität variiert, um den Einfluss des Hefezustandes auf die Bildung von Stoffwechselprodukten und auf die Geschmackstabilität zu ermitteln.

Um den physiologischen Zustand von Hefe beurteilen zu können, wurden sieben Methoden im Hinblick auf die zu erwartende Gäraktivität getestet. Dazu wurden vier Hefestämme in unterschiedlichen physiologischen Zuständen verwendet. Auch wenn mehrere Tests gute Ergebnisse aufwiesen, so wurde letztlich die S-ICP Methode aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit und ihrer guten Aussagekraft für die weiteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendet.

Als repräsentative Stoffwechselprodukte der Hefe wurden höhere Alkohole, Ester und Schwefeldioxid untersucht. In der Literatur herrscht zum Teil Uneinigkeit darüber, wie sich die Gärbedingungen auf die Bildung der unterschiedlichen Substanzen auswirken. Diese widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Autoren werden im wesentlichen durch die Verwendung unterschiedlicher Hefestämme und Gärbedingungen verursacht. Aus diesem Grund wurden für die vorliegenden Untersuchungen die in Deutschland am meisten verwendeten Hefestämme ausgewählt, und es wurde in drei Versuchsmaßstäben (inkl. Produktionsmaßstab) gearbeitet. Durch die Anwendung einer statistischen Versuchsplanung und die Auswertung über Modellgleichungen, ist es in der vorliegenden Arbeit möglich, relevante Einflussfaktoren zu bestimmen und deren Wirkung auf Zielgrößen darzustellen. Diese umfangreichen Daten liefern viele klare Zusammenhänge, wie die Stoffwechselprodukte durch die Gärbedingungen gesteuert werden können.

Über den Einfluss der Hefevitalität auf Aromakomponenten gibt es kaum Erkenntnisse in der Literatur. In dieser Arbeit konnte erstmalig klar dargestellt werden,



dass es bei einer Variation der Vitalität im untersuchten Bereich zwar bereits zu deutlichen Unterschieden in der Gärzeit kommt, jedoch noch kein nennenswerter Einfluss auf die Aromastoffe vorliegt. Dieses kann dadurch erklärt werden, dass die Hefevermehrung durch die vorgenommenen Variationen der Vitalität nicht beeinträchtigt wurde. Erst bei einer weiteren Schwächung der Hefe und dadurch bedingter geringerer Vermehrung kommt es auch zu einer Veränderung der Aromakomponenten.

Auch über den Einfluss von Änderungen der Gärparameter und der Hefevitalität auf die Geschmacksstabilität sind in der Literatur kaum Informationen zu finden. Hauptsächlich beschränken sich diese auf die Beeinflussung der SO<sub>2</sub>-Bildung. Erstmals konnte jedoch gezeigt werden, dass die Gärparameter, wie die Stammwürze, Gärtemperatur, Hefegabe und Belüftung deutliche Auswirkungen auf die Geschmacksstabilität haben und dieses sowohl analytisch als auch sensorisch darstellbar ist. Diese Auswirkungen gehen auch deutlich über den Einfluss des SO<sub>2</sub> hinaus.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die statistische Versuchsplanung ein funktionierendes Instrument darstellt, um die komplexen Zusammenhänge bei der Bierbereitung zu erfassen.

## Anhang

**AH Tab. 1: ICP-Werte und tote Zellen für den Vergleich der Hefestämme**

Bezeichnung	ICP-Wert [pH-Einheiten]	Methylenblautote
W34/70	6,54	< 1%
Hebru	6,51	< 1%
Rh	6,47	1,7%
308	6,58	1%
Trockenhefe	5,89	ca. 50%

**AH Tab. 2: ICP-Werte und tote Zellen für Versuche im 20-l-Maßstab**

Standardnr.	ICP-Wert [pH-Einheiten]	Methylenblautote [%]	Standardnr.	ICP-Wert [pH-Einheiten]	Methylenblautote [%]
1	6,35	2,7	22	5,83	4,6
2	6,38	2,1	23	5,78	3,5
3	6,35	2,7	24	5,83	4,6
4	6,6	3,1	25	5,77	7,1
5	6,38	2,1	26	5,78	3,5
6	6,66	1,9	27	5,81	3,3
7	6,58	1,9	28	5,81	3,3
8	6,6	3,1	29	5,8	7,1
9	6,66	1,9	30	5,81	3,3
10	6,6	3,1	31	5,8	7,1
11	6,38	2,1	32	5,75	3,5
12	6,66	1,9	33	5,81	3,3
13	6,38	2,1	34	5,78	3,5
14	6,66	1,9	35	5,81	3,3
15	6,38	2,1	36	5,75	3,5
16	6,24	2,7	37	5,82	4,6
17	6,6	3,1	38	5,77	7,1
18	6,66	1,9	39	5,81	3,3
19	6,24	2,7	40	5,82	4,6
20	6,24	2,7	41	5,82	4,6
21	6,6	3,1	42	5,77	7,1
K1	6,38	2,1			
K2	6,6	3,1			
K3	6,51	4,7			

**Tab. 3: Daten der Reproduzierbarkeitsanalyse für den Vergleich der Vitalitätsmethoden**

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
ICP [pH]	6,50	6,45	6,37	6,35	6,43
S-ICP [pH]	6,75	6,70	6,75	6,69	6,84
Druckaufbau [bar]	3,3	3,25	3,35	3,25	3,2
Diared. [diff. mg/l]	0,7	0,7	0,5	0,6	0,5
VT [mM NaOH/min]	8,85	7,89	10	10,73	9,06
AP (GAP) [pH]	1,30	1,47	1,25	1,22	1,36
AP (WAP) [pH]	2,22	2,01	2,20	2,04	2,19
AP (GIPE) [pH]	0,92	0,54	0,95	0,82	0,83
Formazan [I440/I600]	1,19	1,37	1,42	1,35	1,52

Tab. 4 a-c: Daten der Korrelationsanalyse für den Vergleich der Vitalitätsmethoden

a)

W34/70										
Probe	Zeit bis 4 % [h]	ICP [pH]	S-ICP [pH]	Druck-aufbau [bar]	Diared. [diff. mg/l]	YMI [mM NaOH/min]	APT (GAP) [pH]	APT (WAP) [pH]	APT (GIPE) [pH]	Formazan [I440/I600]
0 Probe	56	6,08	6,11	3,95	0,7	4,78	2,09	1,66	0,43	1,62
1 h EtOH	89	5,49	5,47	2,3	0,4		1,96	0,7	1,27	1,36
1 Tag NE	67	5,77	5,79	2,7	0,2		1,83	0,15	1,68	0,94
0 Probe	53	5,92	5,9	3,15	0,7	3,47	1,95	0,27	1,68	1,6
0,1 % H2O2	60	5,77	5,73	2,75	0,8		1,51	0,01	1,33	1,61
1 % H2O2	79	5,5	5,44	0,35	0,6		0,24	-0,39	-0,16	1,47
15 % Sorbit	160	5,19	5,38	0	0,1		-0,06	-0,125	-0,185	0,2
20 % Sorbit	173	5,12	5,23	0	0,1		-0,155	-0,07	-0,225	0,11

b)

Hebru										
Probe	Zeit bis 4 % [h]	ICP [pH]	S-ICP [pH]	Druck-aufbau [bar]	Diared. [diff. mg/l]	YMI [mM NaOH/min]	APT (GAP) [pH]	APT (WAP) [pH]	APT (GIPE) [pH]	Formazan [I440/I600]
0 Probe	56	6,14	6,41	3,5	0,8	6	2,1	1,8	0,3	1,52
1 h EtOH	70	5,76	6,13	2,8	0,7		2,01	1,27	0,75	1,47
2 h EtOH	115	5,27	5,33	1,25	0,4		1,57	-0,4	1,4	0,93
0 Probe	81	6	5,99	2,95	0,7	5,11	2,06	1,47	0,59	1,66
0,1 % H2O2	93	5,84	5,91	2,7	0,7	1,91	1,89	0,825	1,06	1,66
1 % H2O2	112	5,63	5,75	0,7	0,6		1,38	0,33	1,05	1,54
1 Tag NE	70	5,96	6,02	2,2	0,2		1,81	-0,12	1,56	0,82
15 % Sorbit	185	5,22	5,36	0,7	0		0,56	0,11	0,45	0,38

c)

W68										
Probe	Zeit bis 4 % [h]	ICP [pH]	S-ICP [pH]	Druck-aufbau [bar]	Diared. [diff. mg/l]	YMI [mM NaOH/min]	APT (GAP) [pH]	APT (WAP) [pH]	APT (GIPE) [pH]	Formazan [I440/I600]
0 Probe	39	6,1	6,19	2,45	1,2	5,86	1,88	1,3	0,75	1,62
1 h EtOH	37	6,09	6,03	2,35	1,1	4,49	2,13	1,11	1,02	1,51
1 Tag NE	40	5,86	5,74	3	0,8	4,2	2,17	1,39	0,78	1,49
3 Tage NE	52	5,43	5,48	2,3	0,4	3,6	2,07	0,86	1,22	0,73
0 Probe	36	5,97	6,4	3	1	-	1,75	0,87	0,88	1,67
0,1 % H2O2	40	5,94	6,3	2,4	0,8	-	2,07	1,24	0,83	1,02
1 % H2O2	54	5,89	5,91	0,9	0,8	-	1,67	0,98	0,69	1,54
15 % Sorbit	48	5,47	5,63	1,95	0,7	-	1,89	0,46	1,43	0,86
20 % Sorbit	63	5,36	5,49	1,2	0,4	-	1,63	0,3	1,33	0,49

Tab. 4 d-f: Daten der Korrelationsanalyse für den Vergleich der Vitalitätsmethoden

d)

W175										
Probe	Zeit bis 4 % [h]	ICP [pH]	S-ICP [pH]	Druckaufbau [bar]	Diared. [diff. mg/l]	YMI [mM NaOH/min]	APT (GAP) [pH]	APT (WAP) [pH]	APT (GIPE) [pH]	Formazan [I440/I600]
0 Probe	37	5,89	5,92	3,55	0,9	2,35	2	0,28	1,71	1,58
1 h EtOH	40	5,78	5,74	2,4	0,6	-	1,92	0,4	1,52	1,18
1 Tag NE	63	5,38	5,37	1	0,3	-	1,41	0,39	1,02	0,48
3 Tage NE	71	5,33	5,26	0,4	0,3	-	0,77	0,19	0,59	0,3
0 Probe	36	5,79	6,01	3,7	1	2,77	2,06	0,29	1,77	1,59
0,1 % H2O2	54	5,58	5,69	0,7	0,1	-	0,86	0,17	0,7	1,35
15 % Sorbit	110	5,3	5,28	0,8	0,7	-	0,56	0,11	0,45	0,19
20 % Sorbit	126	5,24	5,24	0,4	0,4	-	0,07	0,01	-0,01	0,13

e)

$r^2$								
	ICP	S-ICP	GAP (APT)	WAP (APT)	GIPE (APT)	Diacetylred.	Druckaufbau	Formazan
W34/70	0,8521	0,6728	0,6919	0,1602	0,4908	0,6568	0,7034	0,8806
Hebru	0,751	0,7452	0,9274	0,3123	0,0105	0,5051	0,6764	0,4518
W68	0,6426	0,5791	0,3103	0,5143	0,2628	0,6655	0,6888	0,5261
W175	0,7629	0,7026	0,827	0,6528	0,8235	0,0879	0,5288	0,7555

f)

r								
	ICP	S-ICP	GAP (APT)	WAP (APT)	GIPE (APT)	Diacetylred.	Druckaufbau	Formazanb.
W34/70	0,9231	0,8202	0,8318	0,4002	0,7006	0,8104	0,8387	0,9384
Hebru	0,8666	0,8632	0,9630	0,5588	0,1025	0,7107	0,8224	0,6722
W68	0,8016	0,7610	0,5570	0,7171	0,5126	0,8158	0,8299	0,7253
W175	0,8734	0,8382	0,9094	0,8080	0,9075	0,2965	0,7272	0,8692

**AH Tab. 5 a: Ergebnisliste für die Untersuchung der Hefestämme (Hefestamm W34/70)**

Standardnr.	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4% [h]	SO <sub>2</sub> [mg/l]	Zeit bis Diacetyl 0,3mg/l [h]	Propanol-1 [mg/l]	Ethylacetat [mg/l]	2-Methylpropanol [mg/l]	3-Methylbutanol [mg/l]	2-Methylbutanol [mg/l]	Buttersäureethyl-ester [mg/l]	3-Methylbutyl-acetat [mg/l]	2-Methylbutyl-acetat [mg/l]	Hexansäureethyl-ester [mg/l]
1	90	2,4	76	9	24	8	32	9,2	0,1	1,9	0,2	0,2
2	334	10,5	276	13	32	10	46	15	0,2	2,6	0,2	0,4
3	44	2,6	66	15	15	14	37	12	0,1	2,1	0,3	0,2
4	196	13,3	130	16	48	12	49	16	0,2	4,0	0,3	0,4
5	51	0,5	118	13	11	12	33	10	0,1	1,1	0,1	0,2
6	228	4,1	400	18	32	12	48	15	0,1	2,0	0,2	0,3
7	25	0,2	90	15	15	15	41	13	0,1	1,9	0,2	0,1
8	97	4,3	159	14	73	13	45	17	0,2	4,6	0,6	0,5
9	41	1,3	82	15	13	14	38	12	0,1	1,3	0,2	0,2
10	131	4,8	129	21	46	14	60	17	0,1	2,6	0,2	0,3
11	123	2,2	145	14	19	9	39	12	0,1	1,0	0,1	0,2
12	73	2,0	81	16	30	11	45	13	0,1	2,8	0,3	0,4
13	122	10,2	105	12	29	9	42	12	0,1	1,6	0,1	0,2
14	68	1,5	145	15	24	10	44	13	0,1	2,0	0,2	0,4
15	78	2,2	103	14	29	10	42	12	0,1	2,4	0,2	0,3
16	78	2,1	96	14	33	10	42	12	0,1	2,8	0,3	0,4
17	76	1,1	80	15	47	11	43	13	0,2	3,7	0,4	0,4
18	79	2,4	101	15	35	11	47	14	0,1	2,9	0,3	0,4
19	81	3,1	108	14	31	10	45	13	0,1	2,5	0,2	0,4
K1	98	2,4	90	16	30	10	43	12	0,1	2,6	0,2	0,3
K2	64	1,5	90	16	39	11	45	13	0,1	3,3	0,3	0,4
K3												
<b>Modellerstellung</b>												
<i>Eliminierte Ausreißer</i>	12				17		8,10					
Modellwert K1	95,7	2,9	87,8	10,1	23,7	8,2	33,8	10,1		1,5		
Modellwert K2	54,2	1,7	90,4	15,8	38,2	11,2	45,4	13,8		3,1	0,2	0,3
Modellwert K3												
Abweichung K1[%]	2,3	20,8	2,4	36,9	21,0	18,0	21,4	15,8		42,3	100,0	100,0
Abweichung K2[%]	15,3	13,3	0,4	1,3	2,1	1,8	0,9	6,2		6,1	20,0	15,0
Abweichung K3[%]												
Vk [%]	2,3	33,0	11,0	3,8	20,2	5,3	4,9	6,5		17,9	29,9	11,8

**AH Tab. 5 b: Ergebnisliste für die Untersuchung der Hefestämme (Hefestamm 308)**

Standardnr.	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4% [h]	SO <sub>2</sub> [mg/l]	Zeit bis Diacetyl 0,3mg/l [h]	Propanol- 1 [mg/l]	Ethylacetat [mg/l]	2-Methyl- propanol [mg/l]	3-Methyl- butanol [mg/l]	2-Methyl- butanol [mg/l]	Buttersäure- ethyl-ester [mg/l]	3- Methylbutyl- acetat [mg/l]	2- Methylbutyl- acetat [mg/l]	Hexansäure- ethyl-ester [mg/l]
1	130	12,0	66	9	9	12	36	11	0,1	1,2	0,1	0,3
2	389	22,9	264	16	25	13	52	16	0,2	3,0	0,2	0,7
3	66	14,2	74	10	12	12	37	12	0,1	1,9	0,2	0,4
4	295	18,5	138	18	34	18	52	20	0,2	3,4	0,3	0,5
5	70	7,8	234	10	9,7	13	39	12	0,1	1,3	0,1	0,3
6	279	18,6	478	18	34	14	55	16	0,2	3,4	0,2	0,6
7	31	9,5	85	16	12	16	38	12	0,1	1,6	0,2	0,2
8	177	18,6	140	22	36	16	61	18	0,2	3,9	0,3	0,5
9	49	13,3	91	13	14	15	41	13	0,1	2,0	0,2	0,3
10	237	24,1	134	19	43	15	56	18	0,3	4,2	0,3	0,5
11	189	11,6	332	12	18	11	43	13	0,01	1,7	0,1	0,5
12	104	18,2	78	16	27	13	50	15	0,1	2,7	0,2	0,4
13	176	21,6	68	13	31	13	49	16	0,2	3,0	0,3	0,5
14	93	13,1	157	14	18	12	48	14	0,1	2,1	0,2	0,5
15	126	17,9	108	14	28	13	49	15	0,1	2,4	0,2	0,4
16	123	19,1	97	14	27	13	49	15	0,1	2,4	0,2	0,4
17	123	19,4	97	14	27	13	50	16	0,1	2,5	0,2	0,4
18	123	18,5	97	14	30	13	48	15	0,2	2,7	0,2	0,4
19	123	18,8	97	14	30	13	49	15	0,2	2,6	0,2	0,4
K1	152	15,9	300	9	19	9	37	10,1	0,1	1,8	0,1	0,5
K2	54	14,4	122	13	11	12	40	12	0,1	1,6	0,1	0,3
K3	134	20,5	167	17	34	14	55	16	0,2	2,9	0,2	0,4
<b>Modellerstellung</b>												
<i>Eliminierte Ausreißer</i>	9	4	1		14							
Modellwert K1	142,2	12,8	255,0	9,8	11,0	11,2	38,7	11,7	0,1	1,3	0,1	0,4
Modellwert K2	48,2	12,2	93,3	14,8	15,1	14,6	43,0	12,7	0,1	1,9	0,2	0,3
Modellwert K3	146,4	18,9	146,8	16,8	40,8	13,4	52,9	16,3	0,2	3,2	0,3	0,5
Abweichung K1[%]	6,4	19,5	15,0	8,9	42,1	24,4	4,6	15,8	0,0	28,3	0,0	20,0
Abweichung K2[%]	10,7	15,3	23,5	13,8	37,3	21,7	7,5	5,8	0,0	15,6	70,0	6,7
Abweichung K3[%]	9,3	7,8	12,1	1,2	20,0	4,0	3,9	1,6	17,5	8,6	25,0	17,5
Vk [%]	1,1	3,1	5,0	0,0	5,3	0,0	1,4	2,9	39,1	5,2	0,0	0,0

**AH Tab. 5 c: Ergebnisliste für die Untersuchung der Hefestämme (Trockenhefe)**

Standardnr.	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4% [h]	SO <sub>2</sub> [mg/l]	Zeit bis Diacetyl 0,3mg/l [h]	Propanol-1 [mg/l]	Ethylacetat [mg/l]	2-Methylpropanol [mg/l]	3-Methylbutanol [mg/l]	2-Methylbutanol [mg/l]	Buttersäureethyl-ester [mg/l]	3-Methylbutyl-acetat [mg/l]	2-Methylbutyl-acetat [mg/l]	Hexansäureethyl-ester [mg/l]
1	146	3,5	280	7,8	10	8,7	41	10	0,1	1,4	0,1	0,3
2	443	16,0	546	15,0	27	15	52	18	0,3	2,5	0,2	0,6
3	82	6,4	220	8,4	13	11	36	14	0,1	1,3	0,2	0,2
4	276	27,7	278	14,0	40	20	50	21	2,0	3,5	0,4	0,6
5	112	0,3	468	9,5	8,8	13	45	14	0,1	0,5	0,1	0,1
6	145	4,7	550	15,0	15	17	57	18	0,2	1,1	0,1	0,3
7	53	0,2	214	9,7	8,3	15	43	17	0,1	0,8	0,1	0,2
8	129	5,9	238	18,0	37	19	61	22	0,3	2,2	0,2	0,3
9	72	0,9	220	11,0	6,8	25	49	22	0,1	0,6	0,1	0,1
10	190	11,9	284	16,0	29	18	57	21	0,2	2,3	0,2	0,5
11	194	5,6	330	12,0	17	12	49	14	0,1	1,6	0,2	0,3
12	92	6,6	198	14,0	37	16	53	20	0,2	2,6	0,3	0,3
13	168	20,1	220	11,0	34	15	46	17	0,2	3,0	0,4	0,5
14	90	1,7	218	15,0	14	16	53	19	0,1	1,2	0,2	0,2
15	100	5,3	216	14,0	36	15	53	19	0,3	2,6	0,3	0,3
16	104	7,7	194	14,0	39	17	53	20	0,2	2,9	0,4	0,3
17	103	5,8	188	13,0	32	14	52	18	0,2	2,2	0,3	0,3
18	107	7,5	194	14,0	44	16	54	20	0,3	3,1	0,4	0,3
19	105	6,3	198	13,0	38	15	53	19	0,3	2,5	0,3	0,3
K1	170	6,7	360	8,7	15	9,7	42	11	0,1	1,8	0,2	0,3
K2	70	0,3	230	11,0	12	16	47	18	0,1	1,1	0,2	0,2
K3	116	3,3	245	15,0	35	16	57	20	0,3	1,9	0,2	0,3
<b>Modellerstellung</b>												
<i>Eliminierte Ausreißer</i>						9		9			5	
Modellwert K1	167,4	4,1	294,4	9,1	13,0	10,0	44,0	11,4	0,1	1,6	0,1	0,3
Modellwert K2	65,7	1,1	201,8	11,8	16,2	15,0	46,8	17,2	0,1	1,6	0,2	0,2
Modellwert K3	105,6	4,8	221,5	15,2	29,2	16,9	56,8	20,7	0,2	2,1	0,2	0,3
Abweichung K1[%]	1,5	38,8	18,2	4,6	13,3	3,1	4,8	3,6	30,0	13,9	30,0	10,0
Abweichung K2[%]	6,1	266,7	12,3	7,3	35,0	6,3	0,4	4,4	20,0	40,9	15,0	10,0
Abweichung K3[%]	9,0	45,5	9,6	1,3	16,6	5,6	0,4	3,5	26,7	11,6	10,0	6,7
Vk [%]	2,5	16,1	5,4	4,0	11,6	7,4	1,3	4,4	21,1	13,2	16,1	0,0

**AH Tab. 5 d: Ergebnisliste für die Untersuchung der Hefestämme (Hefestamm Hebru)**

Standardnr.	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4% [h]	SO <sub>2</sub> [mg/l]	Zeit bis Diacetyl 0,3mg/l [h]	Propanol- 1 [mg/l]	Ethylacetat [mg/l]	2-Methyl- propanol [mg/l]	3-Methyl- butanol [mg/l]	2-Methyl- butanol [mg/l]	2-Methyl- propyl-acetat [mg/l]	Buttersäure- ethylester [mg/l]	3- Methylbutyl- acetat [mg/l]	Hexansäure- ethylester [mg/l]
1	92	3,1	170	11	13	12	42	12	0,1	0,1	1,8	0,2
2	364	17,2	200	14	30	18	62	20	0,1	0,2	4,7	0,5
3	48	12,5	90	16	14	17	44	15	0,1	0,1	3,2	0,3
4	238	22,0	150	17	42	21	71	25	0,1	0,2	5,0	0,5
5	61	6,1	240	14	11	16	47	13	0,1	0,1	1,5	0,2
6	244	13,5	360	21	34	19	73	23	0,1	0,2	4,1	0,5
7	33	5,6	122	17	13	17	49	15	0,1	0,1	2,0	0,2
8	122	9,7	142	22	60	22	79	25	0,1	0,2	6,0	0,5
9	43	8,0	102	17	14	18	46	14	0,1	0,1	2,5	0,2
10	163	10,8	144	20	60	21	74	24	0,2	0,3	6,7	0,5
11	163	5,1	218	15	19	13	54	16	0,1	0,1	2,1	0,3
12	77	7,3	94	19	29	21	67	21	0,1	0,1	4,0	0,4
13	123	11,1	65	15	31	17	61	20	0,1	0,2	4,5	0,5
14	68	4,5	100	21	27	22	66	21	0,1	0,1	3,6	0,3
15	82	6,3	108	17	30	19	62	20	0,1	0,1	3,9	0,4
16	87	8,4	100	17	27	18	60	19	0,1	0,1	3,7	0,3
17	85	9,0	96	17	30	18	58	18	0,1	0,1	4,1	0,4
18	81	8,7	120	18	29	20	62	20	0,1	0,1	4,0	0,4
19	81	8,0	125	18	30	20	56	21	0,1	0,1	4,1	0,4
K1	118	5,3	184	11	10	13	46	14	0,04	0,1	1,6	0,3
K2	41	6,4	95	19	11	18	50	14	0,1	0,1	2,1	0,2
K3	96	8,2	145	20	28	20	71	22	0,1	0,1	3,6	0,4
<b>Modellerstellung</b>												
<i>Eliminierte Ausreißer</i>											4	
Modellwert K1	105,3	4,8	167,1	11,7	14,2	13,2	44,1	13,4			1,8	0,2
Modellwert K2	42,8	6,4	99,7	17,5	15,7	18,4	54,3	17,3			2,5	0,3
Modellwert K3	98,1	7,8	134,4	20,8	43,5	21,1	68,7	21,8			4,7	0,4
Abweichung K1[%]	10,8	9,4	9,2	6,4	42,0	1,5	4,1	4,3	100,0	100,0	9,4	26,7
Abweichung K2[%]	4,4	0,0	4,9	7,9	42,7	2,2	8,6	23,6	100,0	100,0	19,0	25,0
Abweichung K3[%]	2,2	4,9	7,3	4,0	55,4	5,5	3,2	0,9	100,0	100,0	30,6	2,5
Vk [%]	3,2	13,1	11,4	4,0	11,6	7,4	1,3	4,4	0,0	21,1	13,2	0,0



**AH Tab. 5 e: Ergebnisliste für die Untersuchung der Hefestämme (Hefestamm Rh)**

Standardnr.	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4% [h]	SO <sub>2</sub> [mg/l]	Zeit bis Diacetyl 0,3mg/l [h]	Propanol-1 [mg/l]	Ethylacetat [mg/l]	2-Methylpropanol [mg/l]	3-Methylbutanol [mg/l]	2-Methylbutanol [mg/l]	Buttersäureethyl-ester [mg/l]	3-Methylbutyl-acetat [mg/l]	2-Methylbutyl-acetat [mg/l]	Hexansäureethyl-ester [mg/l]
1	84	2,6	94	9,1	13	14	51	17	0,1	2,4	0,3	0,3
2	320	11,4	250	16,0	52	19	66	25	0,3	6,1	0,6	0,4
3	48	5,5	64	12,0	15	17	51	19	0,06	2,8	0,36	0,28
4	226	36,5	127	17,0	60	20	68	27	0,3	5,4	0,5	0,4
5	40	0,6	145	12,0	8	20	52	18	0	1,4	0,17	0,19
6	175	6,5	270	18,0	41	25	76	30	0,2	4,0	0,4	0,3
7	21	0,4	64	16,0	20	25	34	21	0,1	2,5	0,3	0,2
8	86	12,0	136	18,0	42	23	83	29	0,2	5,2	0,5	0,3
9	40	2,1	80	13,0	21	21	57	20	0,1	2,6	0,3	0,3
10	140	18,7	190	16,0	39	20	71	26	0,2	4,8	0,5	0,4
11	124	5,3	166	13,0	23	17	62	22	0,1	3,4	0,4	0,4
12	60	7,7	78	15,0	30	18	65	23	0,1	4,3	0,5	0,3
13	112	13,8	74	13,0	35	14	60	21	0,2	4,5	0,5	0,4
14	56	2,9	78	16,0	28	22	69	24	0,1	4,1	0,5	0,3
15	70	8,1	87	14,0	31	18	67	24	0,1	4,2	0,5	0,3
16	74	7,7	120	14,0	30	18	66	24	0,1	4,0	0,5	0,4
17	71	7,0	95	14,0	36	18	66	23	0,2	4,6	0,5	0,4
18	72	7,2	93	14,0	30	17	65	22	0,1	3,7	0,4	0,3
19	72	7,6	99	14,0	32	17	65	22	0,1	3,9	0,4	0,3
K1	100	3,5	106	5,1	24	7,4	29	9	0,1	3,2	0,3	0,3
K2	34	0,4	61	14,0	25	21	56	20	0,1	3,5	0,4	0,2
K3	82	10,7	106	16,0	39	24	73	26	0,1	4,3	0,5	0,3
<b>Modellerstellung</b>												
<i>Eliminierte Ausreißer</i>		1	1				7			2		
Modellwert K1	91,6	4,7	115,1	9,9	16,7	14,5	53,4	18,2	0,1	2,6	0,4	0,3
Modellwert K2	31,1	1,6	71,9	14,9	21,7	21,3	60,4	21,0	0,1	3,2	0,4	0,3
Modellwert K3	79,7	7,1	128,8	16,2	34,6	21,2	73,7	26,1	0,2	4,4	0,5	0,3
Abweichung K1[%]	8,4	34,3	8,6	94,1	30,4	95,9	84,1	102,2	0,0	18,8	23,3	10,0
Abweichung K2[%]	8,5	300,0	17,9	6,4	13,2	1,4	7,9	5,0	30,0	8,3	7,5	30,0
Abweichung K3[%]	2,8	33,6	21,5	1,3	11,3	11,7	1,0	0,4	60,0	1,9	6,0	3,3
Vk [%]	2,1	5,8	12,8	0,0	7,8	3,1	1,3	4,3	37,3	8,4	11,9	16,1

**AH Tab. 6 a: Ergebnisliste 1 für die Versuche im 20-l-Maßstab**

Standardnr.	E <sub>s</sub> End [%]	Alkohol [Vol %]	pH <sub>End</sub>	Schaum Lg-Foamtester [sek.]	Diacetyl <sub>Schlauchzeitpunkt</sub> [mg/l]	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4% [h]	Zellzahl <sub>max</sub> [Mio./ml]
1	2,64	6,64	4,49	121	0,42	71	74,0
2	3,21	6,95	4,66	134	0,25	365	44,4
3	2,76	6,72	4,43	123	0,26	89	63,0
4	1,30	3,22	4,34	106	0,39	65	39,1
5	3,36	6,89	4,64	133	0,27	405	37,3
6	1,40	3,34	4,29	94	0,23	36	47,5
7	1,35	3,37	4,10	101	0,42	18	67,8
8	1,43	3,20	4,39	103	0,22	119	23,6
9	0,95	2,27	4,22	98	0,17	20	35,0
10	3,37	8,34	4,65	148	0,16	338	48,4
11	2,41	5,04	4,55	112	0,2	164	47,8
12	2,22	5,00	4,38	120	0,47	65	61,6
13	2,14	5,22	4,56	123	0,62	316	28,6
14	2,08	5,04	4,21	114	0,18	35	60,3
15	2,44	4,98	4,48	112	0,4	106	40,5
16	1,95	5,07	4,22	108	0,47	67	50,9
17	2,08	4,96	4,28	110	0,33	86	45,8
18	2,14	5,04	4,39	107	0,38	80	45,9
19	1,97	4,95	4,27	107	0,36	71	60,1
20	2,00	5,05	4,27	110	0,34	78	52,5
21	2,09	4,90	4,27	116	0,35	83	45,9
22	2,84	6,88	4,57	127	0,35	91	53,4
23	3,25	7,02	4,71	125	0,19	450	43,4
24	2,92	6,64	4,52	134	0,33	144	55,9
25	1,62	3,28	4,39	100	0,34	84	36,3
26	3,67	6,24	4,71	133	0,19	570	36,4
27	1,36	3,29	4,19	93	0,35	37	65,0
28	1,36	3,39	4,12	103	0,44	23	59,1
29	1,61	3,19	4,41	114	0,26	133	26,3
30	0,77	1,85	4,33	98	0,22	23	35,9
31	3,59	8,47	4,67	141	0,13	358	56,8
32	2,50	4,94	4,57	130	0,25	182	37,5
33	2,12	5,13	4,38	108	0,52	68	61,0
34	2,44	5,09	4,59	118	0,28	430	27,5
35	2,10	5,10	4,30	113	0,47	39	69,4
36	2,50	4,94	4,50	114	0,45	110	42,5
37	2,01	5,05	4,26	111	0,35	76	55,6
38	2,24	4,76	4,32	115	0,53	85	51,8
39	1,96	5,00	4,31	114	0,36	89	59,0
40	2,03	5,01	4,28	112	0,4	74	55,9
41	2,00	5,07	4,26	114	0,41	73	55,6
42	2,16	4,96	4,31	108	0,51	92	47,8
K1	2,45	5,01	4,49	125	0,31	162	35,2
K2	2,46	5,09	4,33	122	0,38	112	49,7
K3	2,21	5,28	4,15	111	0,69	58	42,9

**Modellerstellung**

<i>Eliminierte Ausreißer</i>			27	27			
Modellwert K1			4,36	113,8	0,38	139,6	38,8
Modellwert K2			4,37	111,2	0,33	100,6	48,8
Modellwert K3			4,20	113	0,42	47,2	63,1
Abweichung K1[%]			2,90	8,96	22,58	13,83	10,2
Abweichung K2[%]			0,92	8,85	13,16	10,18	1,8
Abweichung K3[%]			1,20	1,80	39,13	18,62	47,1
Vk [%]	3,38	1,28	1,23	3,34	5,46	7,14	12,6

**AH Tab. 6 b: Ergebnisliste Bieraromastoffe 1 für die Versuche im 20-l-Maßstab**

Standardnr.	Hexanol-1 [µg/l]	Heptanol-1 [µg/l]	Octanol-1 [µg/l]	Decanol-1 [µg/l]	2-Phenyl- ethanol [µg/l]	Furfuryl- alkohol [µg/l]
1	21	3,8	12,0	4,2	37285	5756
2	23	5,0	10,0	2,7	14857	4477
3	19	3,5	13,0	3,8	44166	3651
4	13	2,5	7,4	2,2	13869	2024
5	21	5,1	7,5	2,1	15684	3567
6	15	4,4	18,0	6,0	33639	2211
7	16	4,9	20,0	6,7	34232	2678
8	11	1,9	9,0	2,6	17609	1617
9	9	1,0	12,0	4,5	22270	1233
10	28	4,5	13,0	3,1	26084	6585
11	18	4,1	10,0	1,4	24482	2669
12	18	4,2	4,4	4,3	25981	3771
13	17	9,0	12,0	2,2	10016	2850
14	22	4,7	14,0	5,0	46470	4046
15	21	4,1	12,0	6,0	22053	3425
16	16	5,1	10,0	3,5	33776	3963
17	24	3,0	15,0	4,0	31140	4152
18	20	4,6	13,0	4,5	27554	2955
19	17	5,3	11,0	3,1	26826	4268
20	18	5,1	13,0	3,5	29837	3983
21	20	2,7	13,0	3,3	31393	4135
22	24	1,0	12,0	3,0	33897	6111
23	28	5,0	11,0	7,6	14760	6932
24	25	4,3	14,0	3,8	37045	6080
25	12	4,5	5,0	1,7	11908	3132
26	22	4,8	7,9	2,0	14907	5031
27	18	5,1	14,0	5,5	33282	3952
28	16	5,8	20,0	6,7	34798	3216
29	12	4,3	6,3	1,9	15803	3134
30	11	4,8	16,0	5,8	21233	1602
31	26	5,4	10,0	2,6	25429	6432
32	18	4,2	8,7	1,7	23424	3103
33	19	6,0	16,0	5,3	27887	4086
34	17	10,0	5,0	1,8	9644	3993
35	22	5,6	23,0	7,1	43832	4832
36	20	4,5	10,0	4,1	21857	3569
37	22	5,5	14,0	3,9	33404	2780
38	16	1,0	8,8	2,4	27062	2926
39	16	3,8	17,0	5,5	34217	2367
40	25	5,5	12,0	3,5	25823	4139
41	20	5,5	11,0	3,2	25670	5250
42	20	2,7	9,1	2,5	27507	4293
K1	17	4,0	7,5	2,8	16375	2841
K2	20	2,3	12,0	2,9	32887	3212
K3	21	4,0	14,0	3,9	44061	4400
<b>Modellerstellung</b>						
<i>Eliminierte Ausreißer</i>				23	39	
Modellwert K1	17,6	4,9	10,0	2,7	20705	3327,9
Modellwert K2	19,2	3,9	12,1	3,2	28261	3657,6
Modellwert K3	20,1	3,7	15,3	5,2	37180	4086,1
Abweichung K1[%]	3,5	22,5	33,3	3,6	26,44	17,14
Abweichung K2[%]	4,0	69,6	0,8	10,3	14,07	13,87
Abweichung K3[%]	4,3	7,5	9,3	33,3	15,62	7,13
Vk [%]	13,6	29,2	10,9	15,4	7,07	13,78

**AH Tab. 6 c: Ergebnisliste Bieraromastoffe 2 für die Versuche im 20-l-Maßstab**

Standardnr.	Essig-säure-Isobutyl-ester [µg/l]	Essig-säure-Hexyl-ester [µg/l]	Essig-säure-Heptyl-ester [µg/l]	Essig-säure-Octyl-ester [µg/l]	Essig-säure-Furfuryl-ester [µg/l]	Essigsäure-2-Phenyl-ethylester [µg/l]	Butter-säure-Ethyl-ester [µg/l]	Hexan-säure-Ethyl-ester [µg/l]	Octan-säure-Ethyl-ester [µg/l]	Decan-säure-Ethyl-ester [µg/l]
1	172	9,0	2,0	5,2	24,0	1696	172	272	475	83
2	122	9,1	2,8	4,6	22,0	605	185	224	324	70
3	161	9,5	2,0	5,4	25,0	2003	159	261	409	64
4	38	3,0	3,2	2,3	7,7	299	44	57	101	17
5	100	8,0	2,6	3,1	20,0	576	171	218	311	59
6	80	4,6	1,8	4,7	11,0	988	48	113	182	16
7	69	3,5	2,2	4,1	8,1	695	35	89	163	22
8	44	3,4	1,1	2,5	8,8	447	53	100	126	20
9	27	1,9	1,2	2,4	3,6	306	20	50	79	8
10	163	10,0	2,0	4,7	23,0	1160	273	337	469	84
11	100	9,9	3,1	5,1	21,0	1169	126	235	273	46
12	114	6,5	5,6	3,9	21,0	839	98	190	260	4,4
13	50	4,0	2,3	1,9	14,0	191	91	91	126	15
14	157	8,7	2,5	6,3	20,0	1687	92	175	274	49
15	132	9,8	3,0	5,9	23,0	994	132	233	289	49
16	116	8,0	5,0	4,5	22,0	1210	97	210	319	45
17	101	7,6	2,1	4,0	20,0	1251	104	223	323	42
18	110	7,4	2,3	4,5	20,0	893	103	186	293	33
19	109	7,6	3,4	4,7	23,0	1014	104	204	285	34
20	110	7,8	4,3	4,6	23,0	1113	103	210	302	35
21	95	7,3	1,9	3,1	18,0	1184	100	203	289	35
22	152	8,4	4,4	3,7	23,0	1546	183	265	480	103
23	166	11,0	3,0	4,9	33,0	806	248	270	315	72
24	117	7,7	2,1	3,2	21,0	1706	158	227	411	68
25	45	3,6	2,3	4,4	11,0	309	55	88	116	22
26	119	10,0	2,9	3,5	26,0	687	183	259	303	66
27	95	4,9	2,2	4,7	13,0	1073	51	107	198	20
28	66	3,6	2,7	4,6	9,2	659	39	99	180	15
29	43	3,7	1,8	3,3	12,0	488	56	103	113	22
30	31	1,6	1,5	2,7	3,6	317	23	47	81	8
31	150	9,6	2,4	4,4	23,0	1105	279	330	476	105
32	94	9,2	3,2	5,1	24,0	1176	115	250	275	50
33	90	6,1	3,2	4,0	18,0	746	87	167	292	33
34	78	6,6	4,0	3,8	22,0	324	115	128	165	34
35	143	7,2	2,2	4,2	19,0	1485	83	157	310	34
36	116	9,4	3,5	5,8	24,0	939	128	236	284	49
37	98	7,2	4,1	3,4	19,0	1215	94	193	296	40
38	111	8,6	2,5	5,0	20,0	1066	109	264	292	48
39	102	7,0	2,0	4,2	15,0	1054	97	211	325	35
40	102	7,3	4,7	3,1	20,0	1037	98	189	296	38
41	115	7,9	3,9	4,5	23,0	1073	114	242	299	20
42	111	8,5	2,5	3,7	19,0	1270	114	234	315	54
K1	90	7,7	2,8	5,2	21,0	559	115	185	237	43
K2	117	9,3	2,3	4,1	26,0	1594	121	248	345	46
K3	139	8,3	3,0	4,2	19,0	1914	107	230	368	52
<b>Modellerstellung</b>										
<i>Eliminierte Ausreißer</i>	23				39					
Modellwert K1	90,3	7,0	2,8	3,4	18,7	697,6	102,6	174,6	246,3	30,4
Modellwert K2	122,1	9,2	2,6	5,3	22,7	1264	127,1	244,4	314,2	45,6
Modellwert K3	134,1	7,8	2,9	4,7	21,2	1370,9	100,4	209,3	334,5	34,4
Abweichung K1[%]	0,33	9,1	0,0	34,6	11,0	24,79	10,78	5,62	3,92	29,30
Abweichung K2[%]	4,36	1,1	13,0	29,3	12,7	20,70	5,04	1,45	8,93	0,87
Abweichung K3[%]	3,53	6,0	3,3	11,9	11,6	28,38	6,17	9,00	9,10	33,85
Vk [%]	6,42	2,6	36,4	15,8	10,4	12,95	1,60	6,51	5,07	9,95

**AH Tab. 6 d: Ergebnisliste Bieraromastoffe 3 für die Versuche im 20-l-Maßstab**

Standardnr.	Isovalerian-säure [µg/l]	Hexan-säure [µg/l]	Octan-säure [µg/l]	Nonan-säure [µg/l]	Decan-säure [µg/l]	Dodecan-säure [µg/l]	α-Terpineol [µg/l]	Linalool [µg/l]	γ-Nona-lacton [µg/l]
1	50	3411	6569	11,0	874	141	2,9	8,6	28
2	60	2870	4837	11,0	721	113	2,1	27,0	30
3	54	2920	6009	10,0	600	110	2,5	7,9	28
4	30	1378	3108	4,1	271	18	Sp.	5,7	17
5	98	2637	4993	9,5	702	101	3,3	30,0	30
6	53	2308	5368	10,0	276	30	2,6	18,0	22
7	47	1650	4683	12,0	449	30	2,5	17,0	23
8	23	1866	4321	5,6	407	45	1,5	4,4	17
9	66	1064	3380	7,9	254	20	1,6	12,0	14
10	58	3839	6067	9,0	711	54	3,4	7,7	28
11	19	3060	5983	11,0	717	147	1,7	27,0	27
12	45	2532	5538	11,0	527	86	3,4	27,0	27
13	n.a.	1179	2468	6,6	114	17	2,0	25,0	25
14	n.a.	2451	5089	13,0	703	59	1,8	28,0	30
15	26	3316	6264	12,0	667	125	Sp.	27,0	29
16	54	2710	5634	9,2	544	81	2,6	7,6	25
17	42	3244	6293	7,6	500	83	Sp.	9,3	27
18	69	2652	5694	11,0	437	60	3,7	26,0	29
19	61	2891	5336	8,8	422	73	3,1	7,6	24
20	56	3021	5668	8,8	423	64	3,0	8,3	25
21	32	3149	5936	6,5	452	77	Sp.	8,2	27
22	148	3792	6831	9,1	1156	241	Sp.	8,5	29
23	51	4100	4973	10,0	763	97	6,3	32,0	33
24	51	3578	6576	8,7	676	126	Sp.	9,2	32
25	42	1929	3723	5,5	451	55	2,9	4,8	16
26	120	3107	5220	11,0	848	104	1,9	31,0	29
27	43	2598	5065	9,5	311	25	3,0	19,0	22
28	31	1783	4663	10,0	269	28	2,4	18,0	21
29	68	2175	4932	6,5	635	90	2,9	4,8	20
30	49	1334	3329	5,5	239	18	2,2	2,7	12
31	55	3791	6326	9,2	946	95	3,5	7,5	30
32	57	3104	6287	11,0	899	165	1,9	28,0	26
33	46	2298	5438	12,0	414	50	3,2	26,0	28
34	59	1932	3429	8,6	440	38	4,0	27,0	28
35	45	2704	5706	13,0	377	38	3,6	27,0	32
36	43	3229	6145	11,0	758	174	2,1	27,0	28
37	68	2883	6272	7,5	532	81	Sp.	8,9	29
38	48	2709	5674	8,0	681	143	2,6	6,4	23
39	45	2463	6057	10,0	445	47	2,7	6,1	25
40	43	3393	5968	6,4	518	96	Sp.	8,5	27
41	n.a.	3383	5797	9,3	180	44	3,5	8,0	27
42	54	3275	6205	7,0	768	188	Sp.	7,8	27
K1	90	2450	4964	9,5	606	103	2,1	26,0	27
K2	26	3208	6716	7,1	603	122	Sp.	9,5	27
K3	70	3586	6508	8,8	607	148	Sp.	9,3	30
<b>Modellerstellung</b>									
<i>Eliminierte Ausreißer</i>									
Modellwert K1	49,8	2540,8	5000,6	7,9	382,1	63,3		13,4	25,9
Modellwert K2	36,5	3075,3	6119,8	10,1	606,4	103,9		14,4	27,2
Modellwert K3	55,2	2925,5	5963,3	10,8	522,4	73,3		13,0	27,8
Abweichung K1[%]	44,67	3,71	0,74	16,8	36,95	38,54	100,0	48,5	4,07
Abweichung K2[%]	40,38	4,14	8,88	42,3	0,56	14,84		51,6	0,74
Abweichung K3[%]	21,14	18,42	8,37	22,7	13,94	50,47		39,8	7,33
Vk [%]	28,62	7,75	6,14	19,6	7,20	13,16	11,6	66,6	7,38

**AH Tab. 6 e: Ergebnisliste höhere Alkohole und Ester für die Versuche im 20-l-Maßstab**

Standardnr.	Acetaldehyd [mg/l]	Propanol -1 [mg/l]	Ethylacetat [mg/l]	2-Methylpropanol [mg/l]	3-Methylbutanol [mg/l]	2-Methylbutanol [mg/l]	Buttersäureethylester [mg/l]	3-Methylbutylacetat [mg/l]	2-Methylbutylacetat [mg/l]	Hexansäureethylester [mg/l]
1	15,0	14	45	26	75	31	0,2	6,3	0,7	0,4
2	18,0	12	55	21	55	25	0,3	5,2	0,6	0,4
3	13,0	16	47	25	78	28	0,2	7,3	0,7	0,4
4	5,0	8	10	11	40	13	0,05	1,0	0,1	0,1
5	16,0	12	43	18	61	22	0,2	4,7	0,4	0,3
6	3,3	10	14	15	45	15	0,05	2,3	0,2	0,2
7	2,3	11	13	17	49	16	0,04	1,7	0,2	0,1
8	6,0	7	12	11	41	13	0,1	1,5	0,2	0,1
9	1,3	6,6	7,7	11	34	10	0,1	0,8	0,1	0,1
10	20,0	14	83	25	74	29	0,4	9,0	0,7	0,5
11	12,0	8,4	37	15	57	19	0,2	5,5	0,5	0,3
12	10,0	11	29	19	62	22	0,1	4,0	0,5	0,3
13	7,5	19	17	14	49	16	0,1	1,3	0,2	0,1
14	3,7	15	37	23	65	24	0,1	5,0	0,6	0,3
15	13,0	9,2	28	18	56	22	0,1	4,2	0,5	0,3
16	5,0	13	41	18	57	20	0,1	5,2	0,5	0,3
17	7,0	11	33	17	59	20	0,1	4,0	0,4	0,2
18	6,0	10	45	17	60	21	0,2	5,3	0,6	0,3
19	7,4	10	30	16	51	18	0,1	4,0	0,4	0,3
20	6,6	11	34	17	54	19	0,1	4,2	0,4	0,3
21	7,0	11	36	16	55	18	0,1	4,3	0,4	0,2
22	22,0	14	57	27	75	30	0,2	5,9	0,6	0,3
23	22,0	13	62	25	62	28	0,3	6,5	0,7	0,4
24	14,2	13,5	41	20	70	24	0,2	5,7	0,5	0,3
25	11,0	8,3	13	10	38	12	0,1	1,3	0,1	0,1
26	16,0	10	50	19	57	22	0,2	5,7	0,5	0,4
27	2,0	11	18	16	48	16	0,1	2,6	0,3	0,1
28	3,0	11	18	17	48	18	0,1	2,1	0,2	0,2
29	8,7	7,3	14	10	41	12	0,1	1,7	0,2	0,2
30	2,7	6,9	6,9	11	32	10	0,1	0,8	0,1	0,1
31	18,0	14	74	23	69	26	0,3	7,2	0,6	0,4
32	13,0	7,9	34	14	56	17	0,1	4,9	0,4	0,3
33	5,6	11	36	19	62	22	0,1	4,0	0,4	0,3
34	14,0	12	33	14	42	16	0,2	2,3	0,3	0,2
35	5,8	15	28	24	64	24	0,1	4,0	0,4	0,3
36	12,0	8,6	28	16	55	20	0,1	4,2	0,4	0,3
37	7,0	12	34	18	59	20	0,1	3,8	0,4	0,2
38	10,0	10	43	16	54	19	0,2	5,3	0,6	0,5
39	8,0	12	27	18	56	20	0,1	3,7	0,4	0,3
40	8,0	10	36	17	54	20	0,1	3,9	0,4	0,2
41	9,0	10	42	16	55	20	0,1	4,4	0,5	0,3
42	10,0	10	39	16	54	19	0,1	4,4	0,5	0,24
K1	13,0	9	26	15	52	19	0,1	3,2	0,4	0,3
K2	9,0	10	59	17	58	20	0,2	7,5	0,7	0,4
K3	6,0	15	42	23	66	24	0,1	5,0	0,5	0,2
<b>Modellerstellung</b>										
<i>Eliminierte Ausreißer</i>	33;12	13								
Modellwert K1	7,9	10,2	28,7	15,6	51,7	18,3	0,1	3,5	0,3	0,2
Modellwert K2	9,2	9,8	36,1	17,4	58,2	20,7	0,1	5,0	0,5	0,3
Modellwert K3	6,7	12,7	37,3	20,9	63,5	23,0	0,1	4,9	0,6	0,3
Abweichung K1[%]	39,2	13,3	10,4	4,0	0,6	3,7	20,0	9,4	17,5	20,0
Abweichung K2[%]	2,2	2,0	38,8	2,4	0,3	3,5	40,0	33,3	27,1	27,5
Abweichung K3[%]	11,7	15,3	11,2	9,1	3,8	4,2	10,0	2,0	24,0	45,0
Vk [%]	7,8	5,2	16,0	3,3	6,6	6,8	37,3	12,4	20,3	21,1

**AH Tab. 6 f: Ergebnisliste Geschmacksstabilität für die Versuche im 20-I-Maßstab**

Standardnr.	Lag-Time [min]	ARV [%]	ARP [%]	Reduktionsvermögen [%]	Stabilitäts-Index	SO <sub>2</sub> [mg/l]	FAN <sub>End</sub> [g/100ml]	Alterungs-note	Alterungs-akzeptanz [%]
1	103	91	83	56,5	0,79	26,6	16,20	1,35	85,0
2	125	91	85	55,7	0,84	27,0	26,53	1,75	65,0
3	86	83	84	54,9	0,73	19,7	14,46	1,48	78,3
4	116	93	57	20,8	0,67	6,3	5,38	1,70	68,3
5	100	89	84	55,3	0,78	18,4	24,77	1,55	78,3
6	102	92	54	20,7	0,63	5,1	4,94	1,60	73,3
7	81	92	57	19,7	0,59	3,2	3,61	1,62	66,7
8	104	92	59	18,9	0,64	5,3	4,89	1,57	71,7
9	105	92	46	14,9	0,60	2,1	2,49	1,63	71,7
10	132	93	86	57,4	0,87	33,3	27,89	1,80	65,0
11	172	96	78	34,3	0,88	25,8	14,33	1,47	88,3
12	90	89	75	31,5	0,68	11,2	11,35	1,63	54,3
13	99	86	78	34,9	0,70	3,4	16,70	2,08	58,3
14	92	91	75	31,7	0,68	8,9	8,19	1,65	71,7
15	154	92	75	36,8	0,83	26,1	14,30	1,28	88,3
16	91	93	77	30,6	0,69	7,4	7,99	1,15	96,7
17	117	95	77	29,1	0,75	7,8	9,93	1,40	80,0
18	95	93	76	30,7	0,70	10,7	11,39	1,38	81,7
19	111	93	78	32,4	0,74	13,1	9,75	1,48	76,7
20	84	91	78	34,0	0,68	10,3	9,42	1,58	75,0
21	107	93	80	29,6	0,73	7,8	9,79	1,50	78,3
22	115	93	89	59,0	0,84	33,4	19,38	1,60	75,0
23	152	95	87	52,9	0,90	33,4	25,54	1,95	56,7
24	104	91	87	54,9	0,80	26,5	18,84	1,40	80,0
25	132	96	63	18,2	0,72	10,2	8,14	1,68	76,7
26	107	90	83	49,2	0,78	21,3	26,00	1,85	65,0
27	93	95	55	24,0	0,63	6,7	4,22	1,42	80,0
28	90	93	54	25,5	0,62	4,7	4,05	1,48	75,0
29	128	96	57	17,4	0,69	3,3	7,25	1,90	55,0
30	87	91	47	13,2	0,56	4,8	2,72	1,48	76,7
31	139	92	90	64,2	0,91	31,8	28,49	1,67	70,0
32	122	94	79	31,6	0,76	23,4	14,57	1,65	75,0
33	92	92	70	34,2	0,68	9,3	10,80	1,68	58,3
34	136	91	75	31,3	0,78	16,3	18,11	1,92	63,3
35	88	92	73	33,5	0,68	10,0	8,67	1,28	88,3
36	129	95	73	33,6	0,77	29,2	14,43	1,43	83,3
37	114	95	75	30,7	0,74	10,2	9,39	1,10	95,0
38	147	95	71	28,3	0,79	13,8	10,77	1,37	81,7
39	101	95	76	31,5	0,72	11,0	9,51	1,42	81,7
40	148	94	75	31,9	0,81	14,2	10,80	1,45	81,7
41	105	95	75	30,5	0,72	13,1	9,95	1,57	75,0
42	121	93	76	28,8	0,75	16,7	10,99	1,27	90,0
K1									
K2	128	92	78	32,3	0,77	15,1	9,65		
K3	91	92	78	32,1	0,70	7,1	5,83		
<b>Modellerstellung</b>									
<i>Eliminierte Ausreißer</i>		3							
Modellwert K1	111,4	91,7	76,1		0,7	10,0	12,6		
Modellwert K2	115,8	93,7	77,5		0,8	19,3	12,4		
Modellwert K3	91,5	91,2	75,5		0,7	8,3			
Abweichung K1[%]									
Abweichung K2[%]	9,5	1,8	0,6	100	0,2	27,8	28,5		
Abweichung K3[%]	0,5	0,9	3,2	100	0,5	16,9	100		
Vk [%]	12,9	1,5	1,9	6,5	3,9	22,4	7,6	5,5	3,4

**AH Tab. 6 g: Ergebnisliste Alterungsindikatoren (frisch) 1 für die Versuche im 20-l-Maßstab**

Standardnr.	2-Methyl-Butanal [µg/l]	2-Methyl-Butanal [µg/l]	2-Furfural [µg/l]	5-Methyl-Furfural [µg/l]	Benzaldehyd [µg/l]	2-Phenyl-Ethanal [µg/l]	Bernsteinsäure-Diethyl-Ester [µg/l]	Nicotinsäure-Ethyl-Ester [µg/l]
1	n.a.	20,0	Sp.	5,3	Sp.	12,0	Sp.	Sp.
2	n.a.	25,0	17	6,3	0,7	19,0	3,2	7,5
3	n.a.	17,0	Sp.	4,4	Sp.	9,5	Sp.	3,5
4	n.a.	9,5	11	3,1	0,5	10,0	Sp.	1,8
5	n.a.	28,0	39	6,8	1,0	31,0	3,6	12,0
6	n.a.	n.a.	Sp.	3,6	Sp.	8,6	Sp.	2,2
7	n.a.	11,0	Sp.	4,2	Sp.	10,0	Sp.	Sp.
8	14,0	11,0	8	3,4	1,0	7,5	Sp.	1,5
9	18,0	5,1	Sp.	Sp.	1,2	4,2	Sp.	Sp.
10	n.a.	25,0	Sp.	5,1	Sp.	15,0	2,6	3,4
11	n.a.	n.a.	13	4,8	0,5	11,0	2,8	4,7
12	n.a.	15,0	Sp.	5,3	Sp.	12,0	Sp.	Sp.
13	n.a.	16,0	7	5,1	0,8	12,0	1,4	5,3
14	n.a.	10,0	13	5,0	0,7	15,0	2,9	4,9
15	n.a.	n.a.	10	5,5	0,7	14,0	2,5	4,0
16	n.a.	16,0	Sp.	5,0	1,5	12,0	Sp.	Sp.
17	n.a.	17,0	14	4,3	0,6	14,0		4,7
18	n.a.	17,0	Sp.	3,9	Sp.	12,0	2,8	2,7
19	26,0	21,0	Sp.	4,6	Sp.	10,0	Sp.	Sp.
20	n.a.	n.a.	Sp.	3,9	1,1	11,0	Sp.	2,0
21	n.a.	15,0	14	4,5	0,9	14,0	1,1	5,2
22	n.a.	n.a.	47	5,3	1,2	25,0	1,9	12,0
23	n.a.	24,0	16	5,6	1,1	18,0	1,7	2,3
24	13,0	24,0	26	5,2	1,0	17,0	1,6	8,9
25	7,9	11,0	Sp.	3,0	Sp.	5,6	Sp.	Sp.
26	n.a.	25,0	15	5,8	1,4	24,0	2,8	6,5
27	n.a.	11,0	Sp.	Sp.	Sp.	11,0	Sp.	n.a.
28	n.a.	11,0	Sp.	3,8	1,1	11,0	Sp.	2,3
29	n.a.	13,0	Sp.	Sp.	Sp.	6,8	n.a.	n.a.
30	n.a.	6,3	Sp.	Sp.	Sp.	4,3	Sp.	Sp.
31	n.a.	24,0	Sp.	Sp.	Sp.	11,0	Sp.	Sp.
32	n.a.	32,0	13	4,8	0,8	15,0	2,8	4,0
33	n.a.	14,0	Sp.	4,5	Sp.	8,4	Sp.	3,2
34	n.a.	15,0	8	5,5	0,9	10,0	2,5	2,1
35	n.a.	15,0	11	6,1	0,7	15,0	2,1	5,9
36	n.a.	n.a.	13	5,4	0,5	20,0	1,0	4,0
37	n.a.	6,9	6	3,2	0,5	6,9	1,0	4,7
38	n.a.	26,0	10	4,1	0,5	15,0	0,8	3,5
39	n.a.	n.a.	Sp.	4,2	Sp.	7,0	Sp.	2,8
40	n.a.	12,0	15	4,7	0,7	8,6	0,7	6,1
41	n.a.	22,0	10	4,0	0,7	16,0	Sp.	2,1
42	n.a.	16,0	10	4,2	0,4	15,0	0,7	3,6
K1								
K2	n.a.	14,0	10	5,0	0,5	8,3	Sp.	4,6
K3	n.a.	11,0	13	4,4	0,8	12,0	1,0	4,2
<b>Modellerstellung</b>								
<i>Eliminierte Ausreißer</i>								
Modellwert K1								
Modellwert K2								
Modellwert K3								
Abweichung K1[%]								
Abweichung K2[%]								
Abweichung K3[%]								
Vk [%]		14,4	0,0	7,8	29,0	14,7	61,6	42,2



**AH Tab. 6 h: Ergebnisliste Alterungsindikatoren (frisch) 2 für die Versuche im 20-l-Maßstab**

Standardnr.	Phenyl-essigsäure-Ethyl-Ester [µg/l]	2-Acetyl-Furan [µg/l]	2-Propionyl-Furan [µg/l]	gamma-Nonalacton [µg/l]	Σ Wärme-Indikatoren [µg/l]	Σ Sauerstoff-Indikatoren [µg/l]	Σ Alterungs-komponenten [µg/l]
1	0,9	7,9	2,9	24	24	27	67
2	1,1	10,0	1,6	27	44	45	111
3	0,9	11,0	n.a.	23	23	26	65
4	0,3	5,6	2,0	14	25	20	56
5	1,0	n.a.	2,2	40	78	60	152
6	0,7	5,5	2,0	17	17	8,6	38
7	Sp.	5,2	n.a.	18	18	21	48
8	0,4	7,6	n.a.	14	22	19	52
9	Sp.	Sp.	Sp.	10	10	10	20
10	1,4	8,6	3,1	23	23	40	83
11	0,6	10,0	1,6	25	37	12	69
12	0,9	7,9	2,9	24	24	27	67
13	0,6	n.a.	2,2	24	31	29	69
14	n.a.	10,0	1,4	28	41	25	86
15	0,7	10,0	1,8	25	35	14	71
16	0,8	12,0	2,9	21	21	30	71
17	0,7	11,0	n.a.	22	37	31	83
18	1,0	8,0	n.a.	23	23	29	68
19	0,8	11,0	3,6	21	21	31	72
20	0,6	12,0	2,1	21	21	12	51
21	0,7	11,0	n.a.	22	36	30	83
22	1,0	16,0	n.a.	27	74	26	125
23	0,8	11,0	3,1	29	44	43	110
24	1,2	12,0	2,3	25	51	42	115
25	0,6	4,3	2,0	13	13	17	39
26	1,0	9,5	1,1	26	41	50	112
27	Sp.	6,2	n.a.	17	17	23	46
28	0,7	5,6	n.a.	18	18	23	51
29	n.a.	Sp.	Sp.	13	13	20	33
30	Sp.	Sp.	n.a.	8,9	8,9	11	19
31	Sp.	10,0	Sp.	23	23	34	68
32	0,5	11,0	8,3	23	36	48	111
33	1,0	8,8	n.a.	24	24	22	61
34	0,6	10,0	n.a.	30	38	26	83
35	1,4	12,0	2,6	27	38	30	93
36	0,6	12,0	2,0	25	38	20	79
37	0,8	5,3	0,8	24	29	14	55
38	0,5	11,0	2,0	20	30	42	90
39	Sp.	8,9	11,0	22	22	7	53
40	0,7	12,0	n.a.	22	36	22	76
41	0,6	11,0	n.a.	20	30	38	84
42	0,6	11,0	1,9	20	30	31	79
K1							
K2	0,7	14,0	1,8	23	33	23	77
K3	1,1	10,0	1,7	25	38	24	79
<b>Modellerstellung</b>							
<i>Eliminierte Ausreißer</i>							
Modellwert K1					34,2	28,2	80,4
Modellwert K2					30,2	26,4	78,3
Modellwert K3					27,9	24	68
Abweichung K1[%]							
Abweichung K2[%]					8,5	14,8	1,7
Abweichung K3[%]					26,6	0,0	13,9
Vk [%]	20,0	14,3	37,2	3,8	29,6	30,8	18,5

**AH Tab. 6 i: Ergebnisliste Alterungsindikatoren (forciert) 1 für die Versuche im 20-I-Maßstab**

Standardnr.	2-Methyl-Butanal [µg/l]	2-Methyl-Butanal [µg/l]	2-Furfural [µg/l]	5-Methyl-Furfural [µg/l]	Benzaldehyd [µg/l]	2-Phenyl-Ethanal [µg/l]	Bernsteinsäure-Diethyl-Ester [µg/l]	Nicotinsäure-Ethyl-Ester [µg/l]
1	n.a.	26	144	6,5	1,1	19,0	Sp.	13,0
2	n.a.	44	169	7,5	0,9	37,0	3,3	18,0
3	n.a.	51	203	5,2	Sp.	22,0	2,2	15,0
4	n.a.	15	72	3,7	0,8	15,0	Sp.	5,3
5	n.a.	34	179	7,7	1,4	35,0	3,7	21,0
6	n.a.	11	65	3,8	Sp.	11,0	Sp.	4,0
7	n.a.	11	89	4,7	1,1	15,0	Sp.	5,5
8	n.a.	14	65	3,9	1,0	14,0	0,5	5,0
9	n.a.	9,4	42	5,2	2,2	9,3	Sp.	3,6
10	n.a.	44	174	6,7	1,0	37,0	2,7	21,0
11	n.a.	n.a.	69	5,6	0,8	17,0	2,9	11,0
12	n.a.	36	103	5,7	1,4	24,0	Sp.	8,4
13	n.a.	20	80	5,9	0,9	21,0	3,3	11,0
14	n.a.	15	125	6,4	0,9	24,0	3,8	11,0
15	n.a.	32	88	6,2	1,0	20,0	2,8	11,0
16	n.a.	n.a.	76	5,7	1,5	18,0	Sp.	7,2
17	n.a.	18	87	5,1	0,8	20,0	0,9	10,0
18	n.a.	n.a.	95	5,6	1,5	23,0	4,1	7,3
19	28	27	91	4,6	1,0	20,0	Sp.	8,4
20	n.a.	12	85	4,5	1,3	19,0	Sp.	9,1
21	n.a.	16	102	5,2	0,9	24,0	1,6	11,0
22	n.a.	39	192	6,1	1,4	32,0	1,9	20,0
23	n.a.	n.a.	138	6,7	1,5	37,0	2,9	14,0
24	n.a.	33	241	6,1	1,6	31,0	2,2	20,0
25	n.a.	24	44	4,9	Sp.	13,0	Sp.	2,6
26	n.a.	44	146	7,3	1,4	43,0	3,0	19,0
27	n.a.	13	64	5,3	Sp.	14,0	Sp.	3,2
28	n.a.	11	70	5,7	0,9	13,0	S.p.	3,9
29	n.a.	17	63	4,5	Sp.	12,0	Sp.	3,2
30	n.a.	6,7	27	3,2	Sp.	5,3	Sp.	Sp.
31	n.a.	n.a.	208	5,9	0,8	40,0	1,5	18,0
32	n.a.	35	118	5,7	1,0	28,0	2,7	15,0
33	n.a.	17	79	5,8	1,1	18,0	Sp.	7,4
34	n.a.	20	78	5,7	1,0	24,0	3,1	6,6
35	n.a.	16	94	6,8	0,8	23,0	1,8	12,0
36	n.a.	n.a.	84	5,7	0,7	28,0	1,0	10,0
37	n.a.	17	82	5,1	0,7	18,0	1,1	10,0
38	n.a.	29	100	5,2	0,8	24,0	0,9	10,0
39	n.a.	10	81	5,2	Sp.	12,0	2,1	8,7
40	25	20	82	5,0	0,7	19,0	1,4	10,0
41	n.a.	35	92	5,4	1,1	24,0	Sp.	8,1
42	n.a.	27	92	5,0	0,7	24,0	0,7	11,0
K1								
K2	n.a.	26	84	5,2	0,6	21,0	0,9	10,0
K3	n.a.	16	113	5,9	0,8	20,0	1,2	14,0
<b>Modellerstellung</b>								
<i>Eliminierte Ausreißer</i>								
Modellwert K1								
Modellwert K2								
Modellwert K3								
Abweichung K1[%]								
Abweichung K2[%]								
Abweichung K3[%]								
Vk [%]		34,8	7,4	9,1	26,5	10,2	76,5	15,6

**AH Tab. 6 j: Ergebnisliste Alterungsindikatoren (forciert) 2 für die Versuche im 20-I-Maßstab**

Standardnr.	Phenyl- essigsäure- Ethyl-Ester [µg/l]	2- Acetyl- Furan [µg/l]	2- Propionyl- Furan [µg/l]	gamma- Nonalacton [µg/l]	Σ Wärme- Indikatoren [µg/l]	Σ Sauerstoff- Indikatoren [µg/l]	Σ Alterungs- komponenten [µg/l]	Diff. Σ Alterungs- komponenten [µg/l]
1	1,1	14,0	3,4	30	174	46	246	179
2	1,3	14,0	2,5	34	203	81	312	201
3	1,1	14,0	3,4	30	233	73	332	267
4	0,5	8,3	2,0	16	87	31	133	77
5	1,2	n.a.	2,3	35	214	70	299	147
6	0,7	5,7	2,4	20	85	22	120	82
7	0,7	5,6	2,1	25	114	27	154	106
8	0,4	9,0	1,1	17	83	29	126	74
9	Sp.	5,8	Sp.	16	58	21	90	70
10	1,5	10,0	3,7	27	201	82	308	225
11	0,7	11,0	1,8	31	101	18	140	71
12	1,1	11,0	3,4	29	131	62	214	147
13	0,7	n.a.	2,4	29	109	42	164	95
14	1,1	14,0	2,1	32	157	40	224	138
15	0,7	13,0	2,2	31	119	54	197	126
16	1,0	13,0	3,9	23	99	19	142	71
17	0,9	13,0	1,9	27	114	39	174	91
18	1,1	10,0	2,6	29	124	24	172	104
19	0,8	13,0	3,7	23	114	47	184	112
20	0,8	13,0	3,0	22	107	32	160	109
21	0,8	15,0	2,3	26	128	41	193	110
22	1,2	16,0	2,0	27	219	72	318	193
23	1,1	13,0	3,3	32	170	39	235	125
24	1,4	15,0	3,8	26	268	65	362	247
25	0,7	6,0	2,3	14	58	37	109	70
26	1,1	14,0	1,8	33	179	88	294	182
27	0,7	6,9	2,3	20	84	27	126	80
28	0,7	6,1	3,0	22	92	25	132	81
29	Sp.	5,7	1,9	14	77	29	118	85
30	Sp.	Sp.	1,9	11	38	12	55	36
31	1,4	11,0	2,7	26	234	41	297	229
32	0,7	13,0	2,7	36	154	65	244	133
33	1,1	9,4	2,7	30	110	36	165	104
34	0,7	11,0	3,6	26	104	45	173	90
35	1,9	14,0	2,7	34	128	40	195	102
36	0,7	12,0	2,6	28	113	29	164	85
37	0,9	13,0	1,7	24	106	36	165	110
38	0,6	13,0	2,5	24	124	54	201	111
39	0,9	11,0	2,5	25	106	22	150	97
40	0,7	14,0	1,7	24	106	39	167	91
41	0,8	12,0	2,9	23	116	60	197	113
42	0,6	13,0	2,6	24	116	52	189	110
K1								0
K2	0,8	15,0	2,1	25	109	48	181	104
K3	1,2	13,0	2,7	39	152	37	212	133
<b>Modellerstellung</b>								
<i>Eliminierte Ausreißer</i>					5			3,24
Modellwert K1					107,9	44,5	173,9	100,7
Modellwert K2					118,4	44,4	183,0	110,5
Modellwert K3					139,9	42,9	207,5	130,3
Abweichung K1[%]								
Abweichung K2[%]					8,6	7,5	1,1	6,3
Abweichung K3[%]					8,0	15,9	2,1	2,0
Vk [%]	14,8	14,0	25,5	11,3	7,2	24,2	7,1	8,0

**AH Tab. 7 a: Ergebnisliste 1 für die Versuche in Brauerei A**

Standardnr.	E <sub>s End</sub> [%]	Alkohol [Vol %]	pH <sub>End</sub>	Schaum NIBEM [sek.]	Zeit bis Diacetyl 0,2mg/l [h]	Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4% [h]
1	2,75	5,71	4,39	127	131	82
2	2,25	5,99	4,31	119	100	52
3	2,58	5,49	4,35	125	150	56
4	2,28	5,84	4,27	126	105	40
5	2,08	5,75	4,22	134	116	62
6	2,58	5,57	4,22	125	96	52
7	2,38	5,69	4,12	119	118	44
8	2,13	5,69	4,09	123	96	38
9	2,49	5,52	4,26	119	102	54
10	1,99	5,96	4,10	119	110	48
11	2,35	5,62	4,31	116	111	59
12	1,88	5,80	4,06	113	105	40

**AH Tab. 7 b: Ergebnisliste höhere Alkohole und Ester für die Versuche in Brauerei A**

Standardnr.	Acetaldehyd [mg/l]	Propanol-1 [mg/l]	Ethylacetat [mg/l]	2-Methylpropanol [mg/l]	3-Methylbutanol [mg/l]
1	16,7	11	21	17	63
2	13,3	12	25	17	68
3	14,8	11	22	16	62
4	11,6	13	24	23	72
5	11,5	15	15	21	72
6	10,9	19	16	24	72
7	11,7	18	19	24	71
8	9,9	19	15	26	72
9	14,0	11	16	15	65
10	11,1	17	17	23	71
11	15,3	11	18	15	64
12	9,2	19	16	27	76

Standardnr.	2-Methylbutanol [mg/l]	Buttersäure-ethylester [mg/l]	3-Methylbutyl-acetat [mg/l]	2-Methylbutyl-acetat [mg/l]	Hexansäure-ethylester [mg/l]
1	21	0,1	2,8	0,3	0,2
2	21	0,1	2,9	0,3	0,2
3	21	0,1	2,4	0,3	0,2
4	24	0,1	3,1	0,3	0,2
5	21	0,1	1,8	0,2	0,2
6	19	0,1	2	0,2	0,2
7	19	0,1	2	0,2	0,14
8	20	0,1	2	0,2	0,13
9	19	0,1	2,4	0,2	0,2
10	18	0,1	2,2	0,2	0,2
11	20	0,1	2,3	0,2	0,2
12	20	0,1	2,2	0,2	0,2

**AH Tab. 7 c: Ergebnisliste Bieraromastoffe für die Versuche in Brauerei A**

Standardnr.	Hexanol-1 [µg/l]	Heptanol-1 [µg/l]	Octanol-1 [µg/l]	Decanol-1 [µg/l]	2-Phenyl- ethanol [µg/l]	Furfuryl- alkohol [µg/l]	Essigsäure- Isobutyl- ester [µg/l]	Essigsäure- Hexylester [µg/l]	Essigsäure- Heptylester [µg/l]
1	32	4,1	10	3,0	32325	5839	73	6,6	2,1
2	21	3,6	11	3,8	38044	3682	70	5,6	1,9
3	27	4,1	10	3,1	28845	3954	66	5,4	1,9
4	26	3,4	14	3,7	40329	5227	94	5,2	1,7
5	20	4,3	15	3,7	39014	5535	50	2,8	1,4
6	25	4,7	20	5,1	53832	2976	56	3,5	1,2
7	23	n.a.	16	3,8	47344	4493	59	3,0	1,5
8	24	n.a.	19	5,0	59565	3702	72	4,8	1,8
9	19	n.a.	10	3,2	33763	3122	59	5,6	2,0
10	27	n.a.	16	4,8	48333	3517	63	4,2	1,7
11	20	n.a.	10	2,9	32144	2655	57	5,1	1,8
12	22	n.a.	20	5,6	59594	3017	71	4,1	1,6

Standardnr.	Essigsäure- Octylester [µg/l]	Essigsäure- Furfuryl- ester [µg/l]	Essigsäure- 2-Phenyl- ethylester [µg/l]	Butter- säure- Ethylester [µg/l]	Essigsäure- 2-Phenyl- ethylester [µg/l]	Butter- säure- Ethylester [µg/l]	Hexan- säure- Ethylester [µg/l]	Octansäure- Ethylester [µg/l]	Decansäure- Ethylester [µg/l]
1	3,4	18	809	101	809	101	234	329	87
2	4,0	17	945	93	945	93	209	318	86
3	3,6	17	722	91	722	91	202	282	73
4	4,2	18	1076	99	1076	99	203	314	71
5	3,3	14	600	79	600	79	166	232	42
6	3,9	12	778	72	778	72	151	212	44
7	3,2	13	686	66	686	66	130	163	32
8	4,4	13	887	66	887	66	140	172	30
9	4,1	16	837	81	837	81	235	288	72
10	4,4	14	816	77	816	77	167	223	52
11	3,6	15	717	87	717	87	212	292	79
12	4,5	13	978	72	978	72	173	204	45

Standardnr.	Isovalerian- säure [µg/l]	Hexansäure [µg/l]	Octansäure [µg/l]	Nonan- säure [µg/l]	Decansäure [µg/l]	Dodecan- säure [µg/l]	Linalool [µg/l]	γ- Nonalacton [µg/l]
1	60	3353	5876	8,9	1262	334	4,8	37
2	77	2400	5413	8,6	1138	163	3,9	34
3	69	2802	5278	8,5	1046	196	4,0	39
4	76	2754	5135	7,6	935	202	7,0	34
5	63	2137	4011	6,1	601	99	5,5	33
6	170	1760	3681	6,9	613	91	6,5	36
7	91	1663	2761	5,2	394	47	6,0	36
8	116	1392	2774	5,7	371	41	4,4	41
9	64	2125	5388	8,2	1078	124	3,9	31
10	118	1880	3548	6,6	619	111	4,5	35
11	63	2251	5438	9,5	1161	161	3,6	34
12	109	1449	3485	6,8	566	89	4,8	36

**AH Tab. 7 d: Ergebnisliste Geschmacksstabilität für die Versuche in Brauerei A**

Standardnr.	Lag-Time [min]	ARV [%]	ARP [%]	Reduktionsvermögen [%]	Stabilitäts-Index	SO <sub>2</sub> [mg/l]	FAN <sub>End</sub> [g/100ml]	Alterungs-note	Alterungs-akzeptanz [%]
1	91	91	84	53,4	0,76	8,2	14,39	1,73	71,7
2	75	90	82	55,5	0,72	11,5	14,60	1,63	71,7
3	76	88	84	50,5	0,71	6,8	11,39	1,78	63,3
4	68	80	83	50,3	0,67	9,5	12,40	1,62	71,7
5	51	78	82	45,5	0,62	4,7	11,32	1,63	78,3
6	55	80	82	40,3	0,62	5,1	9,18	1,67	80,0
7	49	78	83	42,8	0,61	3,6	7,97	2,10	56,7
8	48	81	82	47,7	0,63	2,2	6,53	1,77	66,7
9	74	92	82	53,3	0,72	8,5	13,67	1,60	73,3
10	69	90	83	47,8	0,70	4,5	8,84	1,65	71,7
11	84	92	82	52,2	0,74	10,5	14,54	1,68	70,0
12	67	90	83	49,2	0,69	4,9	7,26	1,77	68,3

**AH Tab. 7 e: Ergebnisliste Alterungsindikatoren (frisch) für die Versuche in Brauerei A**

Standardnr.	2-Methyl-Butanal [µg/l]	2-Methyl-Butanal [µg/l]	2-Furfural [µg/l]	5-Methyl-Furfural [µg/l]	Benzaldehyd [µg/l]	2-Phenyl-Ethanal [µg/l]	Bernsteinsäure-Diethyl-Ester [µg/l]	Nicotinsäure-Ethyl-Ester [µg/l]
1	14	24	11,0	5,6	0,6	13,0	Sp.	n.a.
2	12	17	7,5	5,6	0,4	10,0	0,7	n.a.
3	15	21	9,0	5,3	0,5	11,0	Sp.	4,8
4	28	n.a.	11,0	4,9	0,5	8,7	1,0	4,6
5	19	n.a.	10,0	5,1	0,6	9,5	0,7	4,6
6	n.a.	n.a.	16,0	5,0	1,1	9,9	Sp.	5,8
7	n.a.	n.a.	13,0	4,8	1,0	10,0	0,9	5,4
8	n.a.	12	12,0	5,8	0,6	7,3	Sp.	4,6
9	12	n.a.	7,7	4,8	0,5	8,6	0,8	3,1
10	n.a.	n.a.	11,0	5,5	0,5	6,6	Sp.	n.a.
11	11	20	7,6	5,1	0,4	7,8	Sp.	n.a.
12	n.a.	n.a.	7,5	5,3	0,5	7,9	Sp.	n.a.

Standardnr.	Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester [µg/l]	2-Acetyl-Furan [µg/l]	2-Propionyl-Furan [µg/l]	gamma-Nonalacton [µg/l]	Σ Wärme-Indikatoren [µg/l]	Σ Sauerstoff-Indikatoren [µg/l]	Σ Alterungs-komponenten [µg/l]
1	0,5	20	n.a.	31	41	37	105
2	0,6	18	2,4	27	35	28	90
3	0,4	18	n.a.	28	37	32	93
4	0,7	20	2,7	25	36	9	74
5	0,6	20	2,2	25	35	10	74
6	0,6	18	n.a.	30	45	11	80
7	0,6	16	n.a.	29	42	11	76
8	0,6	17	n.a.	31	43	19	86
9	0,4	18	2,2	22	30	9	65
10	0,5	16	n.a.	28	39	7	68
11	0,4	15	2,5	25	33	28	84
12	0,5	19	2,1	25	32	8	68

**AH Tab. 7 f: Ergebnisliste Alterungsindikatoren (forciert) für die Versuche in Brauerei A**

Standardnr.	2-Methyl-Butanal [µg/l]	2-Methyl-Butanal [µg/l]	2-Furfural [µg/l]	5-Methyl-Furfural [µg/l]	Benzaldehyd [µg/l]	2-Phenyl-Ethanal [µg/l]	Bernsteinsäure-Diethyl-Ester [µg/l]	Nicotinsäure-Ethyl-Ester [µg/l]
1	15	31	104	6,4	0,8	17	Sp.	n.a.
2	19	31	97	6,4	0,7	14	1,2	13
3	17	27	114	6,4	0,9	16	1,3	13
4	29	15	89	5,4	0,8	9	1,3	12
5	n.a.	12	100	5,5	0,7	12	n.a.	12
6	n.a.	17	81	5,7	1,4	11	0,9	12
7	n.a.	16	136	5,9	1,1	12	1,4	13
8	n.a.	19	152	7	0,8	11	Sp.	13
9	13	20	94	5,7	0,6	15	1,1	11
10	n.a.	13	124	6,4	0,6	9	0,8	12
11	n.a.	23	107	6,1	0,7	14	0,9	11
12	n.a.	16	109	6,4	0,5	9	1,0	10

Standardnr.	Phenyl-essigsäure-Ethyl-Ester [µg/l]	2-Acetyl-Furan [µg/l]	2-Propionyl-Furan [µg/l]	gamma-Nonalacton [µg/l]	Σ Wärme-Indikatoren [µg/l]	Σ Sauerstoff-Indikatoren [µg/l]	Σ Alterungs-komponenten [µg/l]	Diff. Σ Alterungs-komponenten [µg/l]
1	0,5	20	2,3	36	141	49	219	114
2	0,7	18	3,0	33	129	45	204	114
3	0,6	21	2,2	38	152	44	226	133
4	1,0	21	2,8	34	123	16	170	96
5	0,8	21	2,3	31	131	25	186	112
6	0,7	17	1,7	35	116	29	171	91
7	0,9	20	1,5	37	173	30	233	157
8	0,9	21	2,0	44	196	31	258	172
9	0,6	19	2,3	29	123	35	187	122
10	0,7	18	2,0	35	159	23	209	141
11	0,8	20	2,8	31	138	37	205	121
12	0,8	22	2,1	31	140	26	198	130

**AH Tab. 8: Modellgleichungen für den Vergleich der Hefestämme (Gärzeit bis E<sub>s</sub> 4 %)**

Hefestamm	Modellgleichungen Gärzeit bis E <sub>s</sub> 4%
<b>W34/70</b>	$1/\text{Wurzel}(\text{Gärzeit bis } E_s \text{ 4\%}) = 0,03861 - 0,01322 \times \text{Extrakt} + 0,01939 \times \text{Temperatur} + 0,00521 \times \text{Hefegabe} + 0,00054 \times \text{Extrakt}^2 - 0,00037 \times \text{Temperatur}^2 - 0,00011 \times \text{Hefegabe}^2 - 0,00056 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} - 0,00017 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,00017 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$
<b>308</b>	$\text{Log}_{10}(\text{Gärzeit bis } E_s \text{ 4\%}) = 3,029 + 0,069 \times \text{Extrakt} - 0,213 \times \text{Temperatur} - 0,024 \times \text{Hefegabe} - 0,0019 \times \text{Extrakt}^2 + 0,0059 \times \text{Temperatur}^2 + 0,0002 \times \text{Hefegabe}^2 + 0,0034 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} + 0,009 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,0007 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$
<b>Trockenhefe</b>	$1/\text{Wurzel}(\text{Gärzeit bis } E_s \text{ 4\%}) = -0,10901 + 0,00037 \times \text{Extrakt} + 0,03194 \times \text{Temperatur} + 0,00047 \times \text{Hefegabe} - 0,00089 \times \text{Temperatur}^2 - 0,00056 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} - 0,00009 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe}$
<b>Hebru</b>	$1/\text{Wurzel}(\text{Gärzeit bis } E_s \text{ 4\%}) = -0,07506 - 0,01213 \times \text{Extrakt} + 0,04302 \times \text{Temperatur} + 0,00103 \times \text{Hefegabe} + 0,00042 \times \text{Extrakt}^2 - 0,00139 \times \text{Temperatur}^2 - 0,00049 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} - 0,00006 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,00010 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$
<b>Rh</b>	$1/\text{Wurzel}(\text{Gärzeit bis } E_s \text{ 4\%}) = 0,00948 - 0,00923 \times \text{Extrakt} + 0,02362 \times \text{Temperatur} + 0,00321 \times \text{Hefegabe} + 0,00040 \times \text{Extrakt}^2 - 0,00061 \times \text{Temperatur}^2 - 0,00001 \times \text{Hefegabe}^2 - 0,00055 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} - 0,00024 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,00024 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$

**AH Tab. 9: Modellgleichungen für den Vergleich der Hefestämme (2-Methylbutanol)**

Hefestamm	Modellgleichungen 2-Methylbutanol
<b>W34/70</b>	$2\text{-Methylbutanol} = 10,739 - 1,4099 \times \text{Extrakt} + 0,3267 \times \text{Temperatur} + 0,3585 \times \text{Hefegabe} + 0,0835 \times \text{Extrakt}^2 - 0,0104 \times \text{Hefegabe}^2$
<b>308</b>	$2\text{-Methylbutanol} = -5,193 + 0,251 \times \text{Extrakt} + 1,835 \times \text{Temperatur} + 0,291 \times \text{Hefegabe} - 0,08 \times \text{Temperatur}^2 + 0,052 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} - 0,012 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} - 0,017 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$
<b>Trockenhefe</b>	$2\text{-Methylbutanol} = -35,449 + 1,080 \times \text{Extrakt} + 5,895 \times \text{Temperatur} + 0,406 \times \text{Hefegabe} - 0,218 \times \text{Temperatur}^2 - 0,023 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe}$
<b>Hebru</b>	$2\text{-Methylbutanol} = -3,085 + 1,200 \times \text{Extrakt} + 0,567 \times \text{Temperatur} + 0,063 \times \text{Hefegabe}$
<b>Rh</b>	$2\text{-Methylbutanol} = 5,1625 + 1,050 \times \text{Extrakt} + 0,233 \times \text{Temperatur} + 0,163 \times \text{Hefegabe}$

**AH Tab. 10: Modellgleichungen für den Vergleich der Hefestämme (3-Methylbutanol)**

Hefestamm	Modellgleichungen 3-Methylbutanol
W34/70	$3\text{-Methylbutanol} = -11,494 + 1,622 \times \text{Extrakt} + 4,667 \times \text{Temperatur} + 0,159 \times \text{Hefegabe} - 0,157 \times \text{Temperatur}^2$
308	$3\text{-Methylbutanol} = 13,961 + 2,125 \times \text{Extrakt} + 0,433 \times \text{Temperatur} + 0,188 \times \text{Hefegabe}$
Trockenhefe	$3\text{-Methylbutanol} = 11,872 + 0,450 \times \text{Extrakt} + 2,627 \times \text{Temperatur} + 1,355 \times \text{Hefegabe} - 0,187 \times \text{Temperatur}^2 - 0,049 \times \text{Hefegabe}^2 + 0,094 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} + 0,047 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$
Hebru	$3\text{-Methylbutanol} = 1,157 + 3,275 \times \text{Extrakt} + 1,067 \times \text{Temperatur} + 0,425 \times \text{Hefegabe}$
Rh	$3\text{-Methylbutanol} = 17,423 + 1,470 \times \text{Extrakt} + 3,991 \times \text{Temperatur} - 0,968 \times \text{Hefegabe} - 0,182 \times \text{Temperatur}^2 + 0,056 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,071 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$

**AH Tab. 11: Modellgleichungen für den Vergleich der Hefestämme (Ethylacetat)**

Hefestamm	Modellgleichungen Ethylacetat
W34/70	$\text{Ethylacetat} = 112,880 - 6,152 \times \text{Extrakt} - 8,619 \times \text{Temperatur} - 4,069 \times \text{Hefegabe} + 0,646 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} + 0,148 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,198 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$
308	$1/\text{Wurzel}(\text{Ethylacetat}) = 1,240 - 0,061 \times \text{Extrakt} - 0,092 \times \text{Temperatur} - 0,001 \times \text{Hefegabe} + 0,002 \times \text{Extrakt}^2 + 0,003 \times \text{Temperatur}^2 + 0,0004 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur}$
Trockenhefe	$\text{Log}_{10}(\text{Ethylacetat}) = -1,975 + 0,479 \times \text{Extrakt} + 0,033 \times \text{Temperatur} - 0,012 \times \text{Hefegabe} - 0,017 \times \text{Extrakt}^2$
Hebru	$1/(\text{Ethylacetat}) = 0,327 - 0,019 \times \text{Extrakt} - 0,024 \times \text{Temperatur} + 0,002 \times \text{Hefegabe} + 0,001 \times \text{Extrakt}^2 + 0,001 \times \text{Temperatur}^2 - 0,0001 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} - 0,0001 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$
Rh	$\text{Ethylacetat} = -41,899 + 5,624 \times \text{Extrakt} + 1,000 \times \text{Temperatur} + 0,909 \times \text{Hefegabe} - 0,114 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe}$

**AH Tab. 12: Modellgleichungen für den Vergleich der Hefestämme (Isoamylacetat)**

Hefestamm	Modellgleichungen Isoamylacetat
W34/70	$\text{Isoamylacetat} = 2,053 - 0,188 \times \text{Extrakt} - 0,148 \times \text{Temperatur} - 0,008 \times \text{Hefegabe} + 0,031 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur}$
308	$\text{Isoamylacetat} = -5,559 - 0,375 \times \text{Extrakt} + 1,375 \times \text{Temperatur} - 0,003 \times \text{Hefegabe} + 0,026 \times \text{Extrakt}^2 - 0,054 \times \text{Temperatur}^2$
Trockenhefe	$\text{Isoamylacetat} = -7,023 + 1,362 \times \text{Extrakt} + 0,110 \times \text{Temperatur} - 0,074 \times \text{Hefegabe} - 0,049 \times \text{Extrakt}^2$
Hebru	$\text{Isoamylacetat} = -8,536 - 0,967 \times \text{Extrakt} + 2,315 \times \text{Temperatur} + 0,057 \times \text{Hefegabe} + 0,044 \times \text{Extrakt}^2 - 0,093 \times \text{Temperatur}^2 + 0,029 \times \text{Extrakt} \times \text{Temperatur} - 0,009 \times \text{Temperatur} \times \text{Hefegabe}$
Rh	$\text{Isoamylacetat} = -5,454 + 1,067 \times \text{Extrakt} + 0,146 \times \text{Temperatur} - 0,031 \times \text{Hefegabe} - 0,032 \times \text{Extrakt}^2$

**AH Tab. 13: Statistische Kennzahlen von Modellen für verschiedene Essigsäureester**

	Essigsäure-Isobutylester	Essigsäure-Hexylester	Essigsäure-Heptylester	Essigsäure-Octylester	Essigsäure-Furfurylester	Essigsäure-2-Phenylethylester
Gewählter Modelltyp	quadratisch	quadratisch	quadratisch	quadratisch	quadratisch	quadratisch
Lack of Fit [p-Wert]	0,07	0,12	0,86	0,95	0,62	0,96
Adj. R-Squared	0,93	0,92	0,47	0,72	0,94	0,97
Pred. R-Squared	0,91	0,87	0,40	0,58	0,92	0,95
Adeq. Precision	31,95	24,35	11,18	12,55	33,96	36,90
Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	23	-	-	-	39	-
<b>Diff. Modelle/ Kontrollversuche</b>						
K1 [%]	0,3	9,1	0,0	34,6	11,0	24,8
K2 [%]	4,4	1,1	13,0	29,3	12,7	20,7
K3 [%]	3,5	6,0	3,3	11,9	11,6	28,4
Vk der Zentralpunkte [%]	6,4	2,6	36,4	15,8	10,4	13,0
Kontrollversuch in 95% Konfidenzintervall des Modells?	ja; ja; ja	nein; ja; ja	ja; ja; ja	nein; nein; nein	nein; nein; nein	nein; nein; nein



**AH Tab. 14: F- und p-Werte von Modellen verschiedener Essigsäureester**

Faktor	Essigsäure-Isobutylester		Essigsäure-Hexylester		Essigsäure-Heptylester		Essigsäure-Octylester		Essigsäure-Furfurylester		Essigsäure-2-Phenylethylester	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Extrakt	395,7	< 0,0001	345,1	< 0,0001	8,7	0,0056	14,1	0,0008	469,6	< 0,0001	333,1	< 0,0001
Hefegabe	0,8	0,3864	20,6	< 0,0001			4,7	0,0396	1,9	0,1775	38,3	< 0,0001
Temperatur	123,6	< 0,0001	4,9	0,0337			29,4	< 0,0001	0,0	0,8409	659,4	< 0,0001
Belüftung	11,5	0,0019	10,2	0,0033	2,3	0,1414	12,8	0,0014	9,9	0,0036	7,6	0,0100
Vitalität	1,2	0,2798	0,3	0,5937			0,1	0,7090	5,6	0,0247	0,1	0,8061
Extrakt × Hefegabe							3,3	0,0788			17,8	0,0002
Extrakt × Temperatur			5,0	0,0327			3,9	0,0586			21,7	< 0,0001
Extrakt × Belüftung			11,2	0,0022	6,6	0,0142	7,2	0,0123				
Extrakt × Vitalität	3,2	0,0856					7,1	0,0128				
Hefegabe × Temperatur							3,9	0,0586	3,0	0,0921	5,0	0,0331
Hefegabe × Belüftung							3,9	0,0591				
Temperatur × Vitalität	8,5	0,0066	13,4	0,0009			23,7	< 0,0001	17,3	0,0002	10,7	0,0027

**AH Tab. 15: Modellgleichungen für den Vergleich der Hefestämme (Schwefeldioxid)**

Hefestamm	Modellgleichungen Schwefeldioxid
W34/70	$Wurzel(SO_2) = 2,106 + 0,193 \times Extrakt - 0,305 \times Hefegabe + 0,007 \times Hefegabe^2$
308	$SO_2 = -38,11 + 1,31 \times Extrakt + 7,25 \times Temperatur - 0,35 \times Hefegabe - 0,28 \times Temperatur^2$
Trockenhefe	$Log_{10}(SO_2) = -2,0255 + 0,4513 \times Extrakt + 0,0616 \times Temperatur - 0,0886 \times Hefegabe - 0,0169 \times Extrakt^2 + 0,0053 \times Extrakt \times Hefegabe - 0,0030 \times Temperatur \times Hefegabe$
Hebru	$SO_2 = -0,2428 - 3,2185 \times Extrakt + 1,8486 \times Temperatur + 1,3922 \times Hefegabe + 0,2031 \times Extrakt^2 - 0,0473 \times Extrakt \times Hefegabe - 0,0964 \times Temperatur \times Hefegabe$
Rh	$Log_{10}(SO_2) = -0,4802 + 0,0460 \times Extrakt + 0,1369 \times Temperatur - 0,0389 \times Hefegabe - 0,0047 \times Extrakt^2 - 0,0074 \times Temperatur^2 - 0,0011 \times Hefegabe^2 + 0,0090 \times Extrakt \times Temperatur + 0,0050 \times Extrakt \times Hefegabe - 0,0026 \times Temperatur \times Hefegabe$

**AH Tab. 16: Statistische Kennzahlen von verschiedenen Modellen**

	Σ- Alterungs- indikatoren (frisch)	Σ- Alterungs- indikatoren (forciert)	Lag- Time	Σ-höhere Alkohole	Σ-Ester (Bieraromastoffe)	Acetaldehyd
Gewählter Modelltyp	quadratisch	quadratisch	liniar	quadratisch	quadratisch	quadratisch
Lack of Fit [p-Wert]	0,71	0,16	0,84	0,26	0,97	0,09
Adj. R-Squared	0,81	0,89	0,50	0,94	0,97	0,95
Pred. R-Squared	0,74	0,79	0,41	0,93	0,96	0,92
Adeq. Precision	18,79	19,51	10,75	44,81	39,38	33,03
Eliminierte Ausreißer [Stdnr.]	-	-	-	-	-	12; 33
<b>Diff. Modell/ Kontrollversuche</b>						
K1 [%]			9,1	1,6	12,9	39,2
K2 [%]	1,7	1,1	9,5	2,2	14,3	2,2
K3 [%]	13,9	2,1	0,5	7,3	22,9	11,7
Vk der Zentralpunkte [%]	18,5	7,1	12,9	5,2	8,6	7,8
Kontrollversuch in 95% Konfidenzintervall des Modells?	ja; ja	ja; ja	ja; ja	ja; ja; nein	nein; nein; nein	nein; ja; ja

AH Tab. 17: F- und p-Werte von verschiedenen Modellen

Faktor	Σ-Alterungsindikatoren (frisch)		Σ-Alterungsindikatoren (forciert)		Lag-Time		Σ-höhere Alkohole		Σ-Ester (Biaromastoffe)		Acetaldehyd	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Extrakt	129,6	< 0,0001	98,3	< 0,0001	5,6	0,0234	559,1	< 0,0001	888,6	< 0,0001	582,7	< 0,0001
Hefegabe	2,9	0,0984	0,0	0,9149	11,0	0,0021	14,6	0,0005	21,6	< 0,0001	0,1	0,8170
Temperatur	0,2	0,6280	5,0	0,0330	15,6	0,0004	128,0	< 0,0001	504,9	< 0,0001	74,4	< 0,0001
Belüftung	0,0	0,9392	1,4	0,2542	9,0	0,0049			2,5	0,1247	29,5	< 0,0001
Vitalität	0,7	0,3989	0,1	0,7025	4,3	0,0450			0,2	0,6498	32,9	< 0,0001
Extrakt × Hefegabe			6,7	0,0153					11,9	0,0018	6,7	0,0150
Extrakt × Temperatur									35,5	< 0,0001	18,6	0,0002
Extrakt × Belüftung	3,4	0,0744	1,2	0,2881	11,0	0,0021			4,0	0,0556	0,6	0,4481
Hefegabe × Temperatur									4,7	0,0383		
Hefegabe × Belüftung			3,2	0,0867								
Hefegabe × Vitalität			8,9	0,0059					12,2	0,0016	8,1	0,0084
Temperatur × Belüftung			2,8	0,1038								
Temperatur × Vitalität	6,0	0,0199									4,0	0,0555

AH Tab. 18: Modellgleichungen von verschiedenen Modellen

		Modellgleichungen
Σ-Alterungsindikatoren (frisch)	hohe Vitalität	$\text{Log}_{10}(\text{Summe Alterungsindikatoren}) = 0,5159 + 0,2214 \times \text{Extrakt} - 0,0051 \times \text{Hefegabe} - 0,0607 \times \text{Gärtemperatur} + 0,0856 \times \text{Belüftung} - 0,0056 \times \text{Extrakt}^2 + 0,0021 \times \text{Gärtemperatur}^2 - 0,0072 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung}$
	niedrige Vitalität	$\text{Log}_{10}(\text{Summe Alterungsindikatoren}) = 0,3115 + 0,2214 \times \text{Extrakt} - 0,0051 \times \text{Hefegabe} - 0,0419 \times \text{Gärtemperatur} + 0,0856 \times \text{Belüftung} - 0,0056 \times \text{Extrakt}^2 + 0,0021 \times \text{Gärtemperatur}^2 - 0,0072 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung}$
Σ-Alterungsindikatoren (forciert)	hohe Vitalität	$\text{Summe Alterungsindikatoren} = 95,47 + 7,43 \times \text{Extrakt} + 11,61 \times \text{Hefegabe} - 18,88 \times \text{Gärtemperatur} - 18,28 \times \text{Belüftung} + 0,55 \times \text{Extrakt}^2 + 0,16 \times \text{Hefegabe}^2 + 0,59 \times \text{Gärtemperatur}^2 - 0,73 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 1,22 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} - 1,00 \times \text{Hefegabe} \times \text{Belüftung} + 1,22 \times \text{Gärtemperatur} \times \text{Belüftung}$
	niedrige Vitalität	$\text{Summe Alterungsindikatoren} = 142,32 + 7,43 \times \text{Extrakt} + 8,30 \times \text{Hefegabe} - 18,88 \times \text{Gärtemperatur} - 18,28 \times \text{Belüftung} + 0,55 \times \text{Extrakt}^2 + 0,16 \times \text{Hefegabe}^2 + 0,59 \times \text{Gärtemperatur}^2 - 0,73 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 1,22 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} - 1,00 \times \text{Hefegabe} \times \text{Belüftung} + 1,22 \times \text{Gärtemperatur} \times \text{Belüftung}$
Lag-Time	hohe Vitalität	$(\text{Lag-Time})^{-1,33} = 0,00446 - 0,00036 \times \text{Extrakt} + 0,000041 \times \text{Hefegabe} + 0,000063 \times \text{Gärtemperatur} - 0,00055 \times \text{Belüftung} + 0,000054 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung}$
	niedrige Vitalität	$(\text{Lag-Time})^{-1,33} = 0,00425 - 0,00036 \times \text{Extrakt} + 0,000041 \times \text{Hefegabe} + 0,000063 \times \text{Gärtemperatur} - 0,00055 \times \text{Belüftung} + 0,000054 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung}$
Σ-höhere Alkohole		$\text{Summehöhere Alkohole} = 11,696 + 5,852 \times \text{Extrakt} + 0,472 \times \text{Hefegabe} - 0,549 \times \text{Gärtemperatur} + 0,140 \times \text{Gärtemperatur}^2$
Σ-Ester (Biaromastoffe)	hohe Vitalität	$\text{Summe Ester} = -2594,42 + 220,88 \times \text{Extrakt} - 30,04 \times \text{Hefegabe} + 212,78 \times \text{Gärtemperatur} + 150,64 \times \text{Belüftung} - 8,03 \times \text{Extrakt}^2 - 0,69 \times \text{Hefegabe}^2 - 7,16 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 4,51 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 10,02 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur} - 10,44 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} - 1,83 \times \text{Hefegabe} \times \text{Gärtemperatur}$
	niedrige Vitalität	$\text{Summe Ester} = -2147,67 + 220,88 \times \text{Extrakt} - 30,04 \times \text{Hefegabe} + 176,83 \times \text{Gärtemperatur} + 150,64 \times \text{Belüftung} - 8,03 \times \text{Extrakt}^2 - 0,69 \times \text{Hefegabe}^2 - 7,16 \times \text{Gärtemperatur}^2 + 4,51 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 10,02 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur} - 10,44 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung} - 1,83 \times \text{Hefegabe} \times \text{Gärtemperatur}$
Acetaldehyd	hohe Vitalität	$\text{Wurzel}(\text{Acetaldehyd}) = 3,1390 + 0,2487 \times \text{Extrakt} - 0,0667 \times \text{Hefegabe} - 0,2268 \times \text{Gärtemperatur} - 0,1991 \times \text{Belüftung} + 0,0044 \times \text{Hefegabe}^2 + 0,0170 \times \text{Belüftung}^2 - 0,0064 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,0136 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur} - 0,0140 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung}$
	niedrige Vitalität	$\text{Wurzel}(\text{Acetaldehyd}) = 3,5054 + 0,2487 \times \text{Extrakt} - 0,0357 \times \text{Hefegabe} - 0,2654 \times \text{Gärtemperatur} - 0,1991 \times \text{Belüftung} + 0,0044 \times \text{Hefegabe}^2 + 0,0170 \times \text{Belüftung}^2 - 0,0064 \times \text{Extrakt} \times \text{Hefegabe} + 0,0136 \times \text{Extrakt} \times \text{Gärtemperatur} - 0,0140 \times \text{Extrakt} \times \text{Belüftung}$

## Literaturverzeichnis

- 1 Brockhaus Enzyklopädie online <http://www.brockhaus-enzyklopaedie.de>. - Aktualisierungsdatum: 31.03.2006.
- 2 Abalos, A.; Maximo, F.; Manresa, M. A.; Bastida, J.: Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77 (2002), Nr. 7, S. 777–784
- 3 Ahrenst-Larsen, B.; Levin Hansen, H.: Gaschromatographische Untersuchungen über die Geschmacksstabilität von Bier. In: *Brauwissenschaft* 16 (1963), Nr. 10, S. 393–397
- 4 Alexandre, H.; Plourde, L.; Charpentier, C.; Francois, J.: Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiology-Sgm* 144 (1998), Nr. S. 1103–1111
- 5 Andersen, M. L.; Outtrup, H.; Skibsted, L. H.: Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000), Nr. 8, S. 3106–3111
- 6 Andersen, M. L.; Skibsted, L. H.: Modification of the levels of polyphenols in wort and beer by addition of hexamethylenetetramine or sulfite during mashing. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001), Nr. 11, S. 5232–5237
- 7 Anderson, R. G.; Kirsop, B. H.: Control of Volatile Ester Synthesis during Fermentation of Wort of High Specific Gravity. In: *Journal of the Institute of Brewing* 80 (1974), Nr. 1, S. 48–55
- 8 Angelino, S. A. G. F.; Mockingbode, H. C. M.; Vermeire, H. A.: Activity of Sulfate-Metabolizing Enzymes and Sulfur-Dioxide Formation during Main Fermentation. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 42 (1989), Nr. 12, S. 476–481
- 9 Anness, B. J.; Reed, R. J. R.: Lipids in the Brewery - a Material Balance. In: *Journal of the Institute of Brewing* 91 (1985), Nr. 2, S. 82–87
- 10 Anness, B. J.; Reed, R. J. R.: Lipids in Wort. In: *Journal of the Institute of Brewing* 91 (1985), Nr. 5, S. 313–317
- 11 Axcell, B.; O'Connor-Cox: The Concept of Yeast Vitality – an Alternativ Approach. In: *Proceedings of the 24th Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section), Singapore*. 1996, S. 64–71
- 12 Äyräpää, T.: Formation of higher alcohols from <sup>14</sup>C-labeled valine and leucine. In: *Journal of the Institute of Brewing* 73 (1967), Nr. 1, S. 17–30
- 13 Äyräpää, T.: Formation of higher alcohols from amino acids derived from yeast proteins. In: *Journal of the Institute of Brewing* 73 (1967), Nr. 1, S. 30–33
- 14 Äyräpää, T.: Formation of higher alcohols by various yeasts. In: *Journal of the Institute of Brewing* 74 (1968), Nr. 2, S. 169–178
- 15 Äyräpää, T.: Der Einfluß der Temperatur auf die Bildung höherer Alkohole durch Kulturhefen. In: *Brauwissenschaft* 23 (1970), Nr. 2, S. 48–55
- 16 Äyräpää, T.; Lindström, I.: Influence of long-chain fatty acids on the formation of esters by brewer's yeast. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1973, S. 271–283
- 17 Back, W.: *Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil 2. Fruchtsaft- und Limonadenbetriebe, Wasser, Betriebshygiene, Milch und Molkereiprodukte, Begleitorganismen der Getränkeindustrie*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2000

- 18 Back, W.: *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2005
- 19 Back, W.; Forster, C.: Hefemanagement und Anstelltechnologie mit ihren Auswirkungen auf Geschmack und Geschmacksstabilität. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1999, S. 627–636
- 20 Back, W.; Forster, C.; Krottenthaler, M.; Lehmann, J.; Sacher, B.; Thum, B.: New research findings on improving taste stability. In: *Brauwelt International* (1999), Nr. 5, S. 394–405
- 21 Back, W.; Imai, T.; Forster, C.; Narziß, L.: Hefevitalität und Bierqualität. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 51 (1998), Nr. 11/12, S. 189–195
- 22 Baltes, W.: Die Bedeutung der Maillardreaktion für die Aromabildung in Lebensmitteln. In: *Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie* 34 (1980), Nr. 2, S. 39–47
- 23 Bamforth, C. W.: Making sense of flavor change in beer. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 37 (2000), Nr. 2, S. 165–171
- 24 Bamforth, C. W.; Muller, R. E.; Walker, M. D.: Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing: a review. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 51 (1993), Nr. 3, S. 79–88
- 25 Barker, R. L.; Gracey, D. E. F.; Irwin, A. J.; Pipasts, P.; Leiska, E.: Liberation of Staling Aldehydes during Storage of Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 89 (1983), Nr. 6, S. 411–415
- 26 Barker, R. L.; Irwin, A. J.; Murray, C. R.: The relationship between fermentation variables and flavor volatiles by direct gas chromatographic injection of beer. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 29 (1992), Nr. 1, S. 11–17
- 27 Barker, R. L.; Pipasts, P.; Gracey, D. E. F.: Examination of beer carbonyls as their oximes by gas chromatography-mass spectrometry. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 47 (1989), Nr. 1, S. 9–14
- 28 Baxter, E. D.: Lipoxidases in Malting and Mashing. In: *Journal of the Institute of Brewing* 88 (1982), Nr. 6, S. 390–396
- 29 Baxter, E. D.: Recognition of 2 Lipases from Barley and Green Malt. In: *Journal of the Institute of Brewing* 90 (1984), Nr. 4, S. 277–281
- 30 Belitz, H.-D.; Grosch, W.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 4. überarbeitete Auflage Berlin: Springer-Lehrbuch, 1992
- 31 Blockmans, C.; Devreux, A.; Masschelein, C. A.: Formation of carbonyl compounds and flavour changes in beer. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1975, S. 699–713
- 32 Blockmans, C.; Heilporn, M.; Masschelein, C. A.: Scope and limitations of enzymic deoxygenating methods to improve flavor stability of beer. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 45 (1987), Nr. 3, S. 85–90
- 33 Blockmans, C.; Masschelein, C. A.; Devreux, A.: Origin of certain carbonyl compounds formed during the aging of beer. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1979, S. 279–291
- 34 Blockmans, C.; Van de Meerssche, J.; Masschelein, C. A.; Devreux, A.: Photodegradation and formation of carbonyl- and sulfur compounds in beer. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1981, S. 347–357

- 35 Bohmann, J. J.: Bestimmung und Alterungsverhalten des Bieres. 2. Teil: Das Verhalten einiger flüchtiger Verbindungen bei thermischer Belastung. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 38 (1985), Nr. 2, S. 79–85
- 36 Boivin, P.; Allain, D.; Clamagirant, V.; Maillard, M. N.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; Richard, H.; Nicolas, J.; Forget-Richard, F.: Assay of antioxidant activity of barley and malt by various methods. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1993, S. 397–404
- 37 Boivin, P.; Malanda, M.; Maillard, M. N.; Berset, C.; Richard, H.; Hugues, M.; Richard-Forget, F.; Nicolas, J.: Role of the natural antioxidants of malt in the organoleptic stability of beer. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1995, S. 159–168
- 38 Boulton, C.: Trehalose, glycogen and sterol. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (1st Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2000, S. 10–18
- 39 Boulton, C.; Quain, D.: *Brewing Yeast & Fermentation*. 1 Oxford: Blackwell Science Ltd., 2001
- 40 Boulton, C. A.; Box, W. G.; Quain, D. E.; Molzahn, S. W.: Vicinal diketone reduction as a measure of yeast vitality. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1999, S. 687–694
- 41 Boulton, C. A.; Box, W. G.; Quain, D. E.; Molzahn, S. W.: Vicinal diketone reduction as a measure of yeast vitality. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 38 (2001), Nr. 2, S. 89–93
- 42 Boulton, C. A.; Jones, A. R.; Hinchliffe, E.: Yeast physiological condition and fermentation performance. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 385–392
- 43 Boulton, C. A.; Quain, D. E.: Yeast, oxygen and the control of brewery fermentations. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1987, S. 401–408
- 44 Bracey, D.; Holyoak, C. D.; Nebe-von Caron, G.; Coote, P. J.: Determination of the intracellular pH (pH(i)) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H<sup>+</sup>-ATPase. In: *Journal of Microbiological Methods* 31 (1998), Nr. 3, S. 113–125
- 45 Brenner, M. W.; Khan, A. A.: Furfural and beer color as indices of beer flavor deterioration. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 34 (1976), Nr. 1, S. 14–19
- 46 Brewer, J. D.; Fenton, M. S.: The formation of sulfur dioxide during fermentation. In: *Proceedings of the Convention - Institute of Brewing (Asia Pacific Section)* 16th (1980), Nr. S. 155–164
- 47 Bright, D.; Stewart, G. G.; Patino, H.: A novel assay for antioxidant potential of specialty malts. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57 (1999), Nr. 4, S. 133–137
- 48 Brown, A. K.; Hammond, J. R. M.: Flavour control in small-scale beer fermentations. In: *Food and Bioproducts Processing* 81 (2003), Nr. C1, S. 40–49
- 49 Bugghey, L. A.: A review of polyphenolic antioxidants in hops, brewing and beer. In: *The Brewer International* 4 (2001), Nr. S. 21–25
- 50 Burberg, F.; Back, W.: Apparative Möglichkeiten der Malz-, Würze- und Bierbereitung. In: *Brauwelt* 145 (2006), Nr. 18, S. 536–539

- 51 Calahorra, M.; Martinez, G. A.; Hernandez-Cruz, A.; Pena, A.: Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. In: *Yeast* 14 (1998), Nr. 6, S. 501–515
- 52 Calderbank, J.; Hammond, J. R. M.: Influence of Higher Alcohol Availability on Ester Formation by Yeast. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52 (1994), Nr. 2, S. 84–90
- 53 Callaerts, G.; Iserentant, D.; Verachtert, H.: Relationship between trehalose and sterol accumulation during oxygenation of cropped yeast. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 51 (1993), Nr. 2, S. 75–77
- 54 Cantrell, I. C.; Anderson, R. G.: Yeast performance in production fermentations. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1983, S. 481–488
- 55 Carmelo, V.; Santos, H.; SaCorreia, I.: Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1325 (1997), Nr. 1, S. 63–70
- 56 Chandrasena, G.; Walker, G. M.; Staines, H. J.: Use of response surfaces to investigate metal ion interactions in yeast fermentations. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55 (1997), Nr. 1, S. 24–29
- 57 Chen, E. C. H.: The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 36 (1978), Nr. 1, S. 39–43
- 58 Chevance, F.; Guyot-Declerck, C.; Dupont, J.; Collin, S.: Investigation of the beta-damascenone level in fresh and aged commercial beers. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002), Nr. 13, S. 3818–3821
- 59 Cockburn, M.; Earnshaw, P.; Eddy, A. A.: Stoichiometry of Absorption of Protons with Phosphate and L-Glutamate by Yeasts of Genus *Saccharomyces*. In: *Biochemical Journal* 146 (1975), Nr. 3, S. 705–712
- 60 Coghe, S.; Vanderhaegen, B.; Pelgrims, B.; Basteyns, A. V.; Delvaux, F. R.: Characterization of dark specialty malts: New insights in color evaluation and pro- and antioxidative activity. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 61 (2003), Nr. 3, S. 125–132
- 61 Collin, S.; Montesinos, M.; Meersman, E.; Swinkels, W.; Dufour, J. P.: Yeast dehydrogenase activities in relation to carbonyl compounds removal from wort and beer. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 409–416
- 62 D'Amore, T.; Celotto, G.; Stewart, G. G.: Advances in the fermentation of high-gravity wort. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 337–344
- 63 Dale, A. R.; Pollock, J. R. A.; Moll, M.; That, V.: A Means to Reduce Formation of Precursors of 2-Trans-Nonenal in Brewing. In: *Journal of the Institute of Brewing* 83 (1977), Nr. 2, S. 88–91
- 64 Dalgliesh, C. E.: Flavour Stability. In: *Proceedings of the 16th EBC Congress*. European Brewery Convention (Hrsg.), 1977, S. 623–659
- 65 De Cooman, L.; Aerts, G.; Overmeire, H.; De Keukeleire, D.: Alterations of the profiles of iso-alpha-acids during beer ageing, marked instability of trans-iso-alpha-acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso-alpha-acids. In: *Journal of the Institute of Brewing* 106 (2000), Nr. 3, S. 169–178

- 66 Denhollander, J. A.; Ugurbil, K.; Brown, T. R.; Shulman, R. G.: P-31 Nuclear Magnetic-Resonance Studies of the Effect of Oxygen Upon Glycolysis in Yeast. In: *Biochemistry* 20 (1981), Nr. 20, S. 5871–5880
- 67 Doderer, A.; Kokkelink, I.; Van der Veen, S.; Valk, B. E.; Douma, A. C.: Purification and characterization of lipooxygenase from germinating barley. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 109–116
- 68 Drews, B.; Riemann, J.: Der Einfluß einiger gärungstechnologischer Faktoren auf den Gehalt des Bieres an höheren aliphatischen Alkoholen und Isoamylacetat. In: *Monatsschrift für Brauerei* 20 (1967), Nr. 7, S. 254–268
- 69 Drost, B. W.; Van Eerde, P.; Hoekstra, S. F.; Strating, J.: Fatty acids and staling of beer. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1971, S. 451–458
- 70 Dufour, J. P.: Influence of industrial brewing and fermentation working conditions on beer sulfur dioxide level and flavor stability. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 209–216
- 71 Dufour, J. P.; Leus, M.; Baxter, A. J.; Hayman, A. R.: Characterization of the reaction of bisulfite with unsaturated aldehydes in a beer model system using nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57 (1999), Nr. 4, S. 138–144
- 72 Dufour, J. P.; Malcorps, P.; Silcock, P.: Control of ester synthesis during brewery fermentation. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (2nd Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2003, S. 213–233
- 73 Eddy, A. A.; Nowacki, J. A.: Stoichiometrical Proton and Potassium Ion Movements Accompanying Absorption of Amino Acids by Yeast *Saccharomyces-Carlsbergensis*. In: *Biochemical Journal* 122 (1971), Nr. 5, S. 701–711
- 74 Edelen, C. L.; Miller, J. L.; Patino, H.: Effects of yeast pitch rates on fermentation performance and beer quality. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 33 (1996), Nr. 1, S. 30–32
- 75 Eichhorn, P.: *Untersuchungen zur Geschmacksstabilität*. Freising-Weihenstephan, Technische Universität München, Dissertation, 1991
- 76 Eichhorn, P.; Komori, T.; Miedaner, H.; Narziß, L.: Alterungscarbonyl im subppb Bereich. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1989, S. 717–724
- 77 Enari, T.-M.; Makinen, V.; Haikara, A.: The Formation of Flavor Compounds During Fermentation. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 7 (1970), Nr. 1, S. 11–15
- 78 Engan, S.: Esters in Beer. In: *Brewers Digest* 49 (1974), Nr. 11, S. 40–48
- 79 Engan, S.: The role of esters in beer flavor. In: *Monograph - European Brewery Convention*. 1982, S. 123–134
- 80 Engan, S.; Aubert, O.: Relations Between Fermentation Temperatures and The Formation of Some Flavour Components. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1977, S. 591–607
- 81 Fernandez, S.; Gonzalez, G.; Sierra, A.: The acidification power test and the behavior of yeast in brewery fermentations. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 28 (1991), Nr. 2, S. 89–95
- 82 Forster, C.; Back, W.: Untersuchungen über den Einfluß der Anstell- und Belüftungstechnik zylindrokonischer Gärtanks auf die antioxidative Aktivität von

- Bier. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1999, S. 727–734
- 83 Forster, C.; Schwieger, J.; Narziß, L.; Back, W.; Uchida, M.; Ono, M.; Yanagi, K.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität von Bier mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie freier Radikale. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 52 (1999), Nr. 5/6, S. 86–93
- 84 Foster, R. T., II; Samp, E. J.; Patino, H.: Multivariate modeling of sensory and chemical data to understand staling in light beer. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 59 (2001), Nr. 4, S. 201–210
- 85 Foster, R. T.; Samp, E. J.; Patino, H.; Barr, D. P.: Electron paramagnetic resonance (EPR) profiling for potential flavor stability improvements in beer. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 38 (2001), Nr. 4, S. 247–250
- 86 Francois, J.; Vanschaftingen, E.; Hers, H. G.: The Mechanism by Which Glucose Increases Fructose 2,6-Bisphosphate Concentration in *Saccharomyces-Cerevisiae* - a Cyclic-Amp-Dependent Activation of Phosphofructokinase-2. In: *European Journal of Biochemistry* 145 (1984), Nr. 1, S. 187–193
- 87 Franz, O.: *Sytematische Untersuchungen zur endogenen zur antioxidativen Aktivität von hellem, untergärigem Bier unter besonderer Berücksichtigung technologischer Maßnahmen beim Brauprozess* Freising-Weihenstephan, Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation, 2005
- 88 Franz, O.; Back, W.: Stability index - a new approach to measure the flavor stability of beer. In: *Technical Quarterly & the MBAA Communicator* 40 (2003), Nr. 1, S. 20–24
- 89 Fujii, T.; Kobayashi, O.; Yoshimoto, H.; Furukawa, S.; Tamai, Y.: Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997), Nr. 3, S. 910–915
- 90 Fujii, T.; Yoshimoto, H.; Tamai, Y.: Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the ATF1 gene encoding the alcohol acetyltransferase. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81 (1996), Nr. 6, S. 538–542
- 91 Fujiwara, D.; Kobayashi, O.; Yoshimoto, H.; Harashima, S.; Tamai, Y.: Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. In: *Yeast* 15 (1999), Nr. 12, S. 1183–1197
- 92 Fukuda, K.; Yamamoto, N.; Kiyokawa, Y.; Yanagiuchi, T.; Wakai, Y.; Kitamoto, K.; Inoue, Y.; Kimura, A.: Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. In: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998), Nr. 10, S. 4076–4078
- 93 Fukui, N.; Kogin, A.; Furukubo, S.; Kondo, H.; Yomo, H.; Kakimi, Y.: Evaluation of Yeast Activity and Its Application to Our Industrial Brewing. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 33 (1996), Nr. 3, S. 166–169
- 94 Furukubo, S.; Matsumoto, T.; Yomo, H.; Fukui, N.; Ashikari, T.; Kakimi, Y.: The in vivo <sup>31</sup>P-NMR analysis of brewing yeast and its practical application to



- brewing. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1997, S. 423–430
- 95 Garbe, L.-A.; Huebke, H.; Tressl, R.: Oxygenated fatty acids and flavour stability - new insights. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 2003, S. 69/61–69/69
- 96 Geiger, E.: Einfluß der gärungstechnologischen Maßnahmen auf das Verhalten einiger Gärungsnebenprodukte. In: *Der Weihenstephaner* (1977), Nr. 4, S. 179–190
- 97 Geiger, E.: Einfluß der gärungstechnologischen Maßnahmen auf das Verhalten einiger Gärungsnebenprodukte. In: *Der Weihenstephaner* (1977), Nr. 3, S. 139–142
- 98 Gijs, L.; Chevance, F.; Jerkovic, V.; Collin, S.: How low pH can intensify beta-damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002), Nr. 20, S. 5612–5616
- 99 Gijs, L.; Collin, S.: Effect of the reducing power of a beer on dimethyltrisulfide production during aging. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 60 (2002), Nr. 2, S. 68–70
- 100 Gijs, L.; Perpete, P.; Timmermans, A.; Collin, S.: 3-methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyl trisulfide in aged beers. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000), Nr. 12, S. 6196–6199
- 101 Gillies, R. J.; Ugurbil, K.; Denhollander, J. A.; Shulman, R. G.: P-31 Nmr-Studies of Intracellular pH and Phosphate-Metabolism during Cell-Division Cycle of *Saccharomyces-Cerevisiae*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 78 (1981), Nr. 4, S. 2125–2129
- 102 Gorret, N.; Maubois, J. L.; Engasser, J. M.; Ghoul, M.: Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. In: *Journal of Applied Microbiology* 90 (2001), Nr. 5, S. 788–796
- 103 Greenhoff, K.; Wheeler, R. E.: Evaluation of stale flavor and beer carbonyl development during normal and accelerated aging utilizing liquid and high-pressure liquid chromatography. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1981, S. 405–412
- 104 Grönqvist, A.; Siirila, J.; Virtanen, H.; Home, S.; Pajunen, E.: Carbonyl compounds during beer production and in beer. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1993, S. 421–428
- 105 Guido, L. F.; Carneiro, J. R.; Santos, J. R.; Almeida, P. J.; Rodrigues, J. A.; Barros, A. A.: Simultaneous determination of E-2-nonenal and beta-damascenone in beer by reversed-phase liquid chromatography with UV detection. In: *Journal of Chromatography A* 1032 (2004), Nr. 1–2, S. 17–22
- 106 Guido, L. F.; Rodrigues, P. G.; Rodrigues, J. A.; Goncalves, C. R.; Barros, A. A.: The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. In: *Food Chemistry* 87 (2004), Nr. 2, S. 187–193
- 107 Gyllang, H.; Winge, M.; Korch, C.: Regulation of SO<sub>2</sub> Formation During Fermentation. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1989, S. 347–354
- 108 Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989

- 109 Hashimoto, N.: Oxidation of higher alcohols by melanoidins in beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 78 (1972), Nr. 1, S. 43–51
- 110 Hashimoto, N.: Amino-carbonyl reaction during wort boiling in relation to flavor stability of beer. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 11 (1974), Nr. 2, S. 121–126
- 111 Hashimoto, N.: Melanoidin-Mediated Oxidation; A Greater Involvement in Flavour Staling. In: *Report of the Research Laboratories of Kirin Brewery Company* 31 (1988), Nr. S. 19–32
- 112 Hashimoto, N.; Eshima, T.: Oxidative-Degradation of Isohumulones in Relation to Flavor Stability of Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 85 (1979), Nr. 3, S. 136–140
- 113 Hashimoto, N.; Kuroiwa, Y.: Pathways for the formation of volatile aldehydes during storage of bottled beer. In: *Report of the Research Laboratories of Kirin Brewery Company* 18 (1975), Nr. S. 1–11
- 114 Heggart, H. M.; Margaritis, A.; Stewart, R.; Pikington, J. H.; Sobczak, J.; Russell, I.: Measurement of Brewing Yeast Viability and Vitality: A Review of Methods. In: *Technical Quarterly Master Brewers Association of America* 37 (2000), Nr. 4, S. 409–430
- 115 Henriques, M.; Quintas, C.; LoureiroDias, M. C.: Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. In: *Microbiology-Uk* 143 (1997), Nr. S. 1877–1883
- 116 Herrmann, M.: *Entstehung und Beeinflussung qualitätsbestimmender Aromastoffe bei der Herstellung von Weißbier*. Freising-Weihenstephan, Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation, 2005
- 117 Hiraishi, A.: Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88 (1999), Nr. 5, S. 449–460
- 118 Holtman, W. L.; VredenburgHeistek, J. C.; Schmitt, N. F.; Feussner, I.: Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley. In: *European Journal of Biochemistry* 248 (1997), Nr. 2, S. 452–458
- 119 Hori, T.; Imai, T.; Yasuda, Y.; Takeuchi, T.; Ohkochi, M.: The relationship between yeast vitality and yeast handling. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 37 (2000), Nr. 1, S. 31–35
- 120 Hugues, M.; Boivin, P.; Gaillard, F.; Nicolas, J.; Thiry, J. M.; Richardforget, F.: 2 Lipoxygenases from Germinated Barley - Heat and Kilning Stability. In: *Journal of Food Science* 59 (1994), Nr. 4, S. 885–889
- 121 Huvaere, K.; Andersen, M. L.; Olsen, K.; Skibsted, L. H.; Heyerick, A.; De Keukeleire, D.: Radicaloid-type oxidative decomposition of beer bittering agents revealed. In: *Chemistry-a European Journal* 9 (2003), Nr. 19, S. 4693–4699
- 122 Hysert, D. W.; Morrison, N. M.: Sulfate metabolism during fermentation. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 34 (1976), Nr. 1, S. 25–31
- 123 Ilett, D. R.: Aspects of the analysis, role, and fate of sulfur dioxide in beer - a review. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 32 (1995), Nr. 4, S. 213–221
- 124 Imai, T.; Nakajima, I.; Ohno, T.: Development of a new method for evaluation of yeast vitality by measuring intracellular pH. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52 (1994), Nr. 1, S. 5–8

- 125 Imai, T.; Ohno, T.: Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. In: *Journal of Biotechnology* 38 (1995), Nr. 2, S. 165–172
- 126 Imai, T.; Ohno, T.: The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 61 (1995), Nr. 10, S. 3604–3608
- 127 Irwin, A. J.; Barker, R. L.; Pipasts, P.: The role of copper, oxygen, and polyphenols in beer flavor instability. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49 (1991), Nr. 3, S. 140–149
- 128 Iserentant, D.; Geenens, W.; Verachtert, H.: Titrated acidification power: A simple and sensitive method to measure yeast vitality and its relation to other vitality measurements. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54 (1996), Nr. 2, S. 110–114
- 129 Kaltner, D.: *Untersuchungen zur Ausbildung des Hopfenaromas und technologische Maßnahmen zur Erzeugung hopfenaromatischer Biere*. Freising, Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation, 2000
- 130 Kaneda, H.; Kano, Y.; Koshino, S.; Ohyanishiguchi, H.: Behavior and Role of Iron Ions in Beer Deterioration. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (1992), Nr. 11, S. 2102–2107
- 131 Kaneda, H.; Kano, Y.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Kamada, K.: The role of free radicals in beer oxidation. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 47 (1989), Nr. 2, S. 49–53
- 132 Kaneda, H.; Kano, Y.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Koshino, S.: Role of active oxygens on deterioration of beer flavor. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 433–440
- 133 Kaneda, H.; Kobayashi, N.; Furusho, S.; Sahara, H.; Koshino, S.: Reducing activity and flavor stability of beer. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 32 (1995), Nr. 2, S. 90–94
- 134 Kaneda, H.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Munekata, M.; Koshino, S.: Contribution of Carbonyl-Bisulfite Adducts to Beer Stability. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (1994), Nr. 11, S. 2428–2432
- 135 Kara, B. V.; Simpson, W. J.; Hammond, J. R. M.: Prediction of the Fermentation Performance of Brewing Yeast with the Acidification Power Test. In: *Journal of the Institute of Brewing* 94 (1988), Nr. 3, S. 153–158
- 136 Klimovitz, R. J.; Kindraka, J. A.: The impact of various antioxidants on flavor stability. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 26 (1989), Nr. 2, S. 70–74
- 137 Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Kano, Y.; Koshino, S.: Lipid oxidation during wort production. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1993, S. 405–412
- 138 Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Kano, Y.; Koshino, S.: The Production of Linoleic and Linolenic Acid Hydroperoxides during Mashing. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 76 (1993), Nr. 5, S. 371–375
- 139 Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Kano, Y.; Koshino, S.: Behavior of Lipid Hydroperoxides during Mashing. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52 (1994), Nr. 4, S. 141–145
- 140 Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Kuroda, H.; Kobayashi, M.; Kurihara, T.; Watari, J.; Shinotsuka, K.: Simultaneous determination of mono-, di-, and

- trihydroxyoctadecenoic acids in beer and wort. In: *Journal of the Institute of Brewing* 106 (2000), Nr. 2, S. 107–110
- 141 Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Kuroda, H.; Watari, J.; Kurihara, T.; Shinotsuka, K.: Behavior of mono-, di-, and trihydroxyoctadecenoic acids during mashing and methods of controlling their production. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90 (2000), Nr. 1, S. 69–73
- 142 Kraber, S.; Whitcomb, P.; Andersen, M.: *Handbook for Experimenters*. Minneapolis: Stat-Ease, Inc., 2005
- 143 Kruger, L.; Pickerell, A. T. W.; Axcell, B.: The Sensitivity of Different Brewing Yeast Strains to Carbon-Dioxide Inhibition - Fermentation and Production of Flavor-Active Volatile Compounds. In: *Journal of the Institute of Brewing* 98 (1992), Nr. 2, S. 133–138
- 144 Kumada, J.; Nakajima, S.; Takahashi, T.; Narziß, L.: Einfluss von Druck und Temperatur bei der Gärung auf den Stoffwechsel der Hefe und Bierqualität. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1975, S. 615–623
- 145 Kunze, W.: *Technologie Brauer und Mälzer*. 7. völlig neu bearbeitete Auflage Berlin: Versuchs und Lehrbrauerei Verlag, 1994
- 146 Kuroda, H.; Kobayashi, N.; Kaneda, H.; Watari, J.; Takashio, M.: Characterization of factors that transform linoleic acid into di- and trihydroxyoctadecenoic acids in mash. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93 (2002), Nr. 1, S. 73–77
- 147 Laurent, M.; Geldorf, B.; Van Nederveelde, L.; Dupire, S.; Debourg, A.: Characterization of the aldoketoreductase yeast enzymic system involved in the removal of wort carbonyls during fermentation. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1995, S. 337–344
- 148 Lee, S.; Villa, K.; Patino, H.: Yeast strain development for enhanced production of desirable alcohols/esters in beer. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 53 (1995), Nr. 4, S. 153–156
- 149 Lentini, A.: A Review of the Various Methods Available for Monitoring the Physiological Status of Yeast: Yeast Viability and Vitality. In: *Ferment* 6 (1993), Nr. S. 321–327
- 150 Lentini, A.; Rogers, P.; Higgins, V.; Dawes, I.; Chandler, M.; Stanley, G.; Chambers, P.: The impact of ethanol stress on yeast physiology. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (2nd Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2003, S. 25–38
- 151 Lermusieau, G.; Liegeois, C.; Collin, S.: Reducing power of hop cultivars and beer ageing. In: *Food Chemistry* 72 (2001), Nr. 4, S. 413–418
- 152 Liegeois, C.; Lermusieau, G.; Collin, S.: Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000), Nr. 4, S. 1129–1134
- 153 Lustig, S.: *Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Lagerung von Flaschenbier und deren technologische Beeinflussung beim Brauprozess*. Freising-Weihenstephan, Technische Universität München, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaft, Dissertation, 1994
- 154 Lustig, S.; Miedaner, H.; Narziß, L.; Back, W.: Untersuchungen flüchtiger Aromastoffe bei der Bieralterung mittels multidimensionaler

- Gaschromatographie. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1993, S. 445–452
- 155 Lustig, S.; Miedaner, H.; Narziß, L.; Back, W.: Beeinflussung alterungsrelevanter Aromastoffe durch technologische Maßnahmen bei der Malz-, Würze- und Bierbereitung. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1995, S. 499–506
- 156 Lyness, C. A.; Steele, G. M.; Stewart, G. G.: Investigating ester metabolism: Characterization of the ATF1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55 (1997), Nr. 4, S. 141–146
- 157 Majara, M.; O'Connor-Cox, E. S. C.; Axcell, B. C.: Trehalose - A stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54 (1996), Nr. 4, S. 221–227
- 158 Majara, M.; O'ConnorCox, E. S. C.; Axcell, B. C.: Trehalose - An osmoprotectant and stress indicator compound in high and very high gravity brewing. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54 (1996), Nr. 3, S. 149–154
- 159 Malcorps, P.; Cheval, J. M.; Jamil, S.; Dufour, J. P.: A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49 (1991), Nr. 2, S. 47–53
- 160 Mändl, B.; Geiger, E.; Piendl, A.: Über die Bildung höherer aliphatischer Alkohole im Zusammenhang mit dem Substratabbau der Hefe. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1975, S. 539–563
- 161 Mason, A. B.; Dufour, J.-P.: Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. In: *Yeast* 16 (2000), Nr. 14, S. 1287–1298
- 162 Mathieu, C.; Van den Berg, L.; Iserentant, D.: Prediction of yeast fermentation performance using the acidification power test. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 273–280
- 163 Maule, D. R.: Rapid gas chromatographic examination of beer flavor. In: *Journal of the Institute of Brewing* 73 (1967), Nr. 4, S. 351–361
- 164 Mazon, M. J.; Gancedo, J. M.; Gancedo, C.: Inactivation of Yeast Fructose-1,6-Bisphosphatase - In vivo Phosphorylation of the Enzyme. In: *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), Nr. 3, S. 1128–1130
- 165 McCaig, R.; Bendiak, D. S.: Yeast handling studies. I. Agitation of stored pitching yeast. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 43 (1985), Nr. 2, S. 114–118
- 166 McCaig, R.; Bendiak, D. S.: Yeast handling studies. II. Temperature of storage of pitching yeast. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 43 (1985), Nr. 2, S. 119–122
- 167 McMurrugh, I.; Madigan, D.; Kelly, R. J.; Smyth, M. R.: The role of flavanoid polyphenols in beer stability. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54 (1996), Nr. 3, S. 141–148
- 168 Meilgaard, M. C.: Flavor chemistry of beer. I. Flavor interaction between principal volatiles. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 12 (1975), Nr. 2, S. 107–117
- 169 Meilgaard, M. C.: Flavor chemistry of beer. II. Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 12 (1975), Nr. 3, S. 151–168

- 170 Miedaner, H.: *Brautechnische Analysenmethoden, Band II*. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK, 2002
- 171 Miedaner, H.; Narziß, L.; Eichhorn, P.: Einige Faktoren der Geschmacksstabilität - sensorische und analytische Bewertung. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 401–408
- 172 Miedaner, H.; Narziß, L.; Woerner, G.: Über den Einfluß der Gärungsparameter Temperatur und Druck auf die Entwicklung einiger Gärungsnebenprodukte des Bieres. In: *Brauwissenschaft* 27 (1974), Nr. 8, S. 208–215
- 173 Mikyska, A.; Hrabak, M.; Haskova, D.; Srogl, J.: The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. In: *Journal of the Institute of Brewing* 108 (2002), Nr. 1, S. 78–85
- 174 Mochaba, F.; O'Connor-Cox, E. S. C.; Axcell, B. C.: Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56 (1998), Nr. 1, S. 1–6
- 175 Mochaba, F.; O'ConnorCox, E. S. C.; Axcell, B. C.: Metal ion concentration and release by a brewing yeast: Characterization and implications. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54 (1996), Nr. 3, S. 155–163
- 176 Mochaba, F.; Torline, P.; Axcell, B.: A Novel and Rapid Method for the Determination of Glycogen in Pitching Yeasts. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52 (1994), Nr. 4, S. 145–147
- 177 Mochaba, F. M.; O'ConnorCox, E. S. C.; Axcell, B. C.: A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. In: *Journal of the Institute of Brewing* 103 (1997), Nr. 2, S. 99–102
- 178 Moll, M.; Moll, N.: Principle ways of the formation of carbonyl compounds by aldol condensation. In: *Brauerei-Rundschau* 101 (1990), Nr. 6, S. 99–103
- 179 Mönch, D.; Krüger, E.; Stahl, U.: Wirkung von Streß auf Brauereihefen. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 48 (1995), Nr. 9–10, S. 288–299
- 180 Montgomery, D. C.: *Design and analysis of experiments*. 5. ed. New York: Wiley, 2001
- 181 Moonjai, N.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H.: The effects of linoleic acid supplementation of cropped yeast on its subsequent fermentation performance and acetate ester synthesis. In: *Journal of the Institute of Brewing* 108 (2002), Nr. 2, S. 227–235
- 182 Moonjai, N.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H.: Unsaturated fatty acid supplementation of stationary-phase brewing yeast and its effects on growth and fermentation ability. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (2nd Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2003, S. 110–119
- 183 Moonjai, N.; Verstrepen, K. J.; Shen, H. Y.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H.; Delvaux, F. R.: Linoleic acid supplementation of a cropped brewing lager strain: Effects on subsequent fermentation performance with serial repitching. In: *Journal of the Institute of Brewing* 109 (2003), Nr. 3, S. 262–272
- 184 Mück, E.; Narziß, L.: The Fermentation Activity Apparatus - A Means for Determining Yeast Vitality. In: *Brauwelt International* (1988), Nr. 1, S. 61–68
- 185 Muller, D.; Holzer, H.: Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 103 (1981), Nr. 3, S. 926–933

- 186 Murray, C. R.; Barich, T.; Taylor, D.: The effect of yeast storage conditions on subsequent fermentations. In: *Technical Quarterly Master Brewers Association of America* 21 (1984), Nr. 4, S. 189–194
- 187 Nakatani, K.; Fukui, N.; Nagami, K.; Nishigaki, M.: Kinetic analysis of ester formation during beer fermentation. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49 (1991), Nr. 4, S. 152–157
- 188 Narziß, L.: Die Bierbrauerei- *Die Technologie der Würzebereitung*. 7. Auflage Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1992
- 189 Narziß, L.: Die Bierbrauerei- *Die Technologie der Malzbereitung*. 7. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1999
- 190 Narziß, L.: *Abriss der Bierbrauerei*. 7., aktualisierte und erweiterte Auflage Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2004
- 191 Narziß, L.; Back, W.; Miedaner, H.; Lustig, S.: Untersuchung zur Beeinflussung der Geschmacksstabilität durch Variation technologischer Parameter bei der Bierherstellung. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 52 (1999), Nr. 11/12, S. 192–206
- 192 Narziß, L.; Miedaner, H.; Eichhorn, P.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität des Bieres (Teil 1). In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 52 (1999), Nr. 3/4, S. 49–57
- 193 Narziß, L.; Miedaner, H.; Eichhorn, P.: Untersuchungen zur Geschmacksstabilität des Bieres (Teil 2). In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 52 (1999), Nr. 5/6, S. 80–85
- 194 Narziß, L.; Miedaner, H.; Gresser, A.: Heferasse und Bierqualität - Die Bildung der Ester während der Gärung. In: *Brauwelt* 123 (1983), Nr. 45, S. 2024–2034
- 195 Narziß, L.; Miedaner, H.; Gresser, A.: Heferassen und Bierqualität - Bildung der höheren Alkohole während der Gärung. In: *Brauwelt* 123 (1983), Nr. 27, S. 1139–1144
- 196 Narziß, L.; Miedaner, H.; Lustig, S.: Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Alterung des Bieres. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 52 (1999), Nr. 9/10, S. 164–175
- 197 Narziß, L.; Reicheneder, E.; Nothhaft, H.: Über den Schwefeldioxidgehalt des Bieres. In: *Brauwelt* 122 (1982), Nr. 15, S. 627–636
- 198 Narziß, L.; Reicheneder, E.; Nothhaft, H.: Über den Schwefeldioxidgehalt des Bieres. In: *Brauwelt* 122 (1982), Nr. 12, S. 502–519
- 199 Neven, H.; Delvaux, F.; Derdelinckx, G. S.: Flavor evolution of top fermented beers. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 34 (1997), Nr. 2, S. 115–118
- 200 Nordlöv, H.: Formation of sulfur dioxide during beer fermentation. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1985, S. 291–298
- 201 Nordström, K.: Formation of EtOAc in fermentation with brewers' yeast. II. Kinetics of formation from ethanol and influence of acetaldehyde. In: *Journal of the Institute of Brewing* 68 (1962), Nr. S. 188–196
- 202 Nordström, K.: Formation of ethyl acetate in fermentation with brewers, yeast. IV. Metabolism of acetyl coenzyme A. In: *Journal of the Institute of Brewing* 69 (1963), Nr. S. 142–153
- 203 Norstedt, C.; Bengtsson, A.; Bennet, P.; Lindstrom, I.; Ayrapaa, T.: Technological measures to control the formation of esters during beer fermentation. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1975, S. 581–600

- 204 Noshiro, A.; Purwin, C.; Laux, M.; Nicolay, K.; Scheffers, W. A.; Holzer, H.: Mechanism of Stimulation of Endogenous Fermentation in Yeast by Carbonyl Cyanide Meta-Chlorophenylhydrazone. In: *Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), Nr. 29, S. 14154–14157
- 205 Nykänen, L.; Nykänen, I.: Production of Esters by Different Yeast Strains in Sugar Fermentations. In: *Journal of the Institute of Brewing* 83 (1977), Nr. 1, S. 30–31
- 206 O'Connor-Cox, E. S. C.; Majara, M. M.; Lodolo, E. J.; Mochaba, F. M.; Axcell, B. C.: The Use of Yeast Glycogen and Trehalose Content as Indicators for Process Optimisation. In: *Ferment* 7 (1996), Nr. S. 321–328
- 207 Ohloff, G.: Recent developments in the field of naturally-occurring aroma components. In: *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* 35 (1978), Nr. S. 431–527
- 208 Opekarova, M.; Sigler, K.: Acidification Power - Indicator of Metabolic-Activity and Autolytic Changes in *Saccharomyces-Cerevisiae*. In: *Folia Microbiologica* 27 (1982), Nr. 6, S. 395–403
- 209 Palmer, A. K.; Rennie, H.: Ester Control in High Gravity Brewing. In: *Journal of the Institute of Brewing* 80 (1974), Nr. 5, S. 447–454
- 210 Papula, L.: *Mathematik für Ingenieure und Naturwissenschaftler - Vektoranalysis, Wahrscheinlichkeitsrechnung, mathematische Statistik, Fehler- und Ausgleichsrechnung*. 3 Braunschweig: Vieweg, 1994
- 211 Park, H.; Bakalinsky, A. T.: SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast* 16 (2000), Nr. 10, S. 881–888
- 212 Patino, H.; Edelen, C.; Miller, J.: Alternative measures of yeast vitality: use of cumulative acidification power and conductance. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 51 (1993), Nr. 3, S. 128–132
- 213 Peddie, H. A. B.: Ester Formation in Brewery Fermentations. In: *Journal of the Institute of Brewing* 96 (1990), Nr. 5, S. 327–331
- 214 Pena, A.; Ramirez, J.; Rosas, G.; Calahorra, M.: Proton-Pumping and the Internal Ph of Yeast-Cells, Measured with Pyranine Introduced by Electroporation. In: *Journal of Bacteriology* 177 (1995), Nr. 4, S. 1017–1022
- 215 Peng, L. F.; Xu, X. B.; Mu, H. L.; Hoy, C. E.; Adler-Nissen, J.: Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. In: *Enzyme and Microbial Technology* 31 (2002), Nr. 4, S. 523–532
- 216 Peppard, T. L.: Dimethyl Trisulfide, Its Mechanism of Formation in Hop Oil and Effect on Beer Flavor. In: *Journal of the Institute of Brewing* 84 (1978), Nr. 6, S. 337–340
- 217 Peppard, T. L.; Halsey, S. A.: Malt Flavor - Transformation of Carbonyl-Compounds by Yeast during Fermentation. In: *Journal of the Institute of Brewing* 87 (1981), Nr. 6, S. 386–390
- 218 Peppard, T. L.; Halsey, S. A.: The Occurrence of 2 Geometrical-Isomers of 2,4,5-Trimethyl-1,3-Dioxolane in Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 88 (1982), Nr. 5, S. 309–312
- 219 Pfenninger, H. B.: *Brautechnische Analysenmethoden, Band III*. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK, 1996
- 220 Pickerell, A. T. W.; Hwang, A.; Axcell, B. C.: Impact of yeast-handling procedures on beer flavor development during fermentation. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49 (1991), Nr. 2, S. 87–92



- 221 Piendl, A.; Geiger, E.: Technological factors in the formation of esters during fermentation. In: *Brewers Digest* 55 (1980), Nr. 5, S. 26–35
- 222 Portillo, F.; Serrano, R.: Growth-Control Strength and Active-Site of Yeast Plasma-Membrane Atpase Studied by Site-Directed Mutagenesis. In: *European Journal of Biochemistry* 186 (1989), Nr. 3, S. 501–507
- 223 Potreck, M.: *Optimierte Messung der Bierschaumstabilität in Abhängigkeit von Milieubedingungen und fluiddynamischen Kennwerten*. Berlin, Technischen Universität Berlin, Fakultät III – Prozesswissenschaften, Dissertation, 2004
- 224 Powell, C. D.: Yeast Viability by Fluorescent Staining. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 63 (2005), Nr. 4, S. 220–224
- 225 Purwin, C.; Nicolay, K.; Scheffers, W. A.; Holzer, H.: Mechanism of Control of Adenylate-Cyclase Activity in Yeast by Fermentable Sugars and Carbonyl Cyanide Meta-Chlorophenylhydrazone. In: *Journal of Biological Chemistry* 261 (1986), Nr. 19, S. 8744–8749
- 226 Quain, D. E.: Studies on Yeast Physiology-Impact on Fermentation Performance and Product Quality. In: *Journal of the Institute of Brewing* 94 (1988), Nr. 5, S. 315–323
- 227 Quain, D. E.; Thurston, P. A.; Tubb, R. S.: The Structural and Storage Carbohydrates of *Saccharomyces-Cerevisiae* - Changes during Fermentation of Wort and a Role for Glycogen Catabolism in Lipid Biosynthesis. In: *Journal of the Institute of Brewing* 87 (1981), Nr. 2, S. 108–111
- 228 Quain, D. E.; Tubb, R. S.: The importance of glycogen in brewing yeasts. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 19 (1982), Nr. 1, S. 29–33
- 229 Rabaste, F.; Sancelme, M.; Delort, A. M.; Blais, J.; Bolard, J.: Intracellular pH of *Candida-Albicans* Blastospores as Measured by Laser Microspectrofluorometry and P-31-Nmr. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1268 (1995), Nr. 1, S. 41–49
- 230 Ramos-Jeunehomme, C.; Laub, R.; Masschelein, C. A.: Why is ester formation in brewery fermentations yeast strain dependent? In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1991, S. 257–264
- 231 Renger, R. S.; Vanhateren, S. H.; Luyben, K. C. A. M.: The Formation of Esters and Higher Alcohols during Brewery Fermentation - the Effect of Carbon-Dioxide Pressure. In: *Journal of the Institute of Brewing* 98 (1992), Nr. 6, S. 509–513
- 232 Rice, J. F.; Chicoye, E.; Helbert, J. R.; Garver, J.: Inhibition of beer volatiles formation by carbon dioxide pressure. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 35 (1977), Nr. 1, S. 35–40
- 233 Rodrigues, P. G.; Barros, A. A.; Rodrigues, J. A.; Ferreira, A. A.; Goncalves, C.; Hammond, J. R. M.: Vitaltitration: A New Method for Assessment of Yeast Vitality. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 41 (2004), Nr. 3, S. 277–281
- 234 Rolland, F.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M.: Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. In: *Fems Yeast Research* 2 (2002), Nr. 2, S. 183–201
- 235 Rosa, M. F.; SaCorreia, I.: Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. In: *Fems Microbiology Letters* 135 (1996), Nr. 2-3, S. 271–274
- 236 Sakuma, S.; Kowaka, M.: Flavor characteristics of cis-3-nonenal in beer. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52 (1994), Nr. 2, S. 37–41

- 237 Salhany, J. M.; Yamane, T.; Shulman, R. G.; Ogawa, S.: High-Resolution P-31 Nuclear Magnetic-Resonance Studies of Intact Yeast-Cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975, S. 4966–4970
- 238 Sall, C. J.; Seipp, J. F.; Pringle, A. T.: Changes in brewers' yeast during storage and the effect of these changes on subsequent fermentation performance. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 46 (1988), Nr. 2, S. 23–25
- 239 Santos, J. R.; Carneiro, J. R.; Guido, L. F.; Almeida, P. J.; Rodrigues, J. A.; Barros, A. A.: Determination of E-2-nonenal by high-performance liquid chromatography with UV detection - Assay for the evaluation of beer ageing. In: *Journal of Chromatography A* 985 (2003), Nr. 1-2, S. 395–402
- 240 Schermers, F. H.; Duffus, J. H.; Macleod, A. M.: Studies on Yeast Esterase. In: *Journal of the Institute of Brewing* 82 (1976), Nr. 3, S. 170–174
- 241 Schieberle, P.: Primary odorants of pale lager beer. Differences to other beers and changes during storage. In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 193 (1991), Nr. 6, S. 558–565
- 242 Schöndorfer, H.; Miedaner, H.; Narziß, L.: Ein Beitrag zur Technologie der Angärung. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1981, S. 277–284
- 243 Schulthess, D.; Ettlinger, L.: Influence of Concentration of Branched-Chain Amino-Acids on Formation of Fusel Alcohols. In: *Journal of the Institute of Brewing* 84 (1978), Nr. 4, S. 240–243
- 244 Schwarz, P.; Stanley, P.; Solberg, S.: Activity of lipase during mashing. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 60 (2002), Nr. 3, S. 107–109
- 245 Seaston, A.; Inkson, C.; Eddy, A. A.: Absorption of Protons with Specific Amino-Acids and Carbohydrates by Yeast. In: *Biochemical Journal* 134 (1973), Nr. 4, S. 1031–1043
- 246 Sendra, J. M.; Todo, V.; Pinaga, F.; Izquierdo, L.; Carbonell, J. V.: Evaluation of the effects of yeast strain and fermentation conditions on the volatile concentration profiles of pilot plant lager beers. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 47 (1994), Nr. 10, S. 316–321
- 247 Serrano, R.: Energy-Requirements for Maltose Transport in Yeast. In: *European Journal of Biochemistry* 80 (1977), Nr. 1, S. 97–102
- 248 Serrano, R.; Kiellandbrandt, M. C.; Fink, G. R.: Yeast Plasma-Membrane Atpase Is Essential for Growth and Has Homology with (Na<sup>++</sup>K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-Atpases. In: *Nature* 319 (1986), Nr. 6055, S. 689–693
- 249 Shimizu, C.; Nara, Y.; Takashio, M.: Ethyl pyruvate - A new indicator of flavor stability of beer and its controlling factors. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 63 (2005), Nr. 3, S. 135–141
- 250 Siddique, R.; Smart, K. A.: Predicting fermentation performance using proton efflux. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (1st Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2000, S. 46–54
- 251 Smart, K. A.: The Death of the Yeast Cell. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (1st Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2000, S. 105–113
- 252 Stenroos, L. E.: Effects of time, temperature, and air on various finished beer components. In: *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists*. 1974, S. 50–56

- 253 Stewart, G.; Lyness, A.; Younis, O.: The control of ester synthesis during wort fermentation. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 36 (1999), Nr. 1, S. 61–66
- 254 Stewart, G. G.: Yeast Management - The Balance Between Fermentation Efficiency and Beer Quality. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 38 (2001), Nr. 1, S. 47–53
- 255 Suomalainen, H.: Yeast Esterases and Aroma Esters in Alcoholic Beverages. In: *Journal of the Institute of Brewing* 87 (1981), Nr. 5, S. 296–300
- 256 Szlavko, C. M.: Influence of Wort Glucose Level on Formation of Aromatic Higher Alcohols. In: *Journal of the Institute of Brewing* 80 (1974), Nr. 6, S. 534–539
- 257 Takaoka, S.; Kondo, H.; Uchida, M.; Kawasaki, Y.: Improvement of beer flavor stability by applying ESR method to industrial plant. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 35 (1998), Nr. 3, S. 157–161
- 258 Takeuchi, T.; Imai, T.: Relationship between cell deterioration and plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (1st Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2000, S. 27–33
- 259 Thevelein, J. M.; Beullens, M.; Honshoven, F.; Hoebeeck, G.; Detremmerie, K.; Denhollander, J. A.: Regulation of the Camp Level in the Yeast *Saccharomyces-Cerevisiae* - Intracellular Ph and the Effect of Membrane Depolarizing Compounds. In: *Journal of General Microbiology* 133 (1987), Nr. S. 2191–2196
- 260 Thiele, F.; Back, W.: Measurement of yeast vitality using a modified version of the intracellular pH measurement (ICP). In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 58 (2005), Nr. 1/2, S. 2–5
- 261 Thomas, D.; Surdin-Kerjan, Y.: Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 61 (1997), Nr. 4, S. 503–532
- 262 Thum, B.; Back, W.: Schonende Analysenmethoden zur Quantifizierung von Schlüsselaromastoffen in Bier. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1999, S. 45–52
- 263 Thum, B.; Miedaner, H.; Narziß, L.; Back, W.: Bildung von "Alterungscarbonylen" - mögliche Mechanismen und Bedeutung bei der Bierlagerung. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1995, S. 491–498
- 264 Thurston, P. A.; Quain, D. E.; Tubb, R. S.: The control of volatile ester biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1981, S. 197–206
- 265 Thurston, P. A.; Taylor, R.; Ahvenainen, J.: Effects of Linoleic-Acid Supplements on the Synthesis by Yeast of Lipids and Acetate Esters. In: *Journal of the Institute of Brewing* 87 (1981), Nr. 2, S. 92–95
- 266 Tressl, R.; Bahri, D.; Silwar, R.: Bildung von Aldehyden durch Lipidoxidation und deren Bedeutung als "Off-Flavor"-Komponenten in Bier. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1979, S. 27–41
- 267 Tressl, R.; Kossa, T.; Renner, R.: Über die Bildung von Aromastoffen in Malz, Würze und Bier. In: *Monatsschrift für Brauerei* 27 (1974), Nr. 5, S. 98–102
- 268 Tsukatani, T.; Oba, T.; Ukeda, H.; Matsumoto, K.: Spectrophotometric assay of yeast vitality using 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzoquinone and tetrazolium salts. In: *Analytical Sciences* 19 (2003), Nr. 5, S. 659–664

- 269 Uchida, M.; Ono, M.: Improvement for oxidative flavor stability of beer - Role of OH-radical in beer oxidation. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54 (1996), Nr. 4, S. 198–204
- 270 Uchida, M.; Ono, M.: Determination of hydrogen peroxide in beer and its role in beer oxidation. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57 (1999), Nr. 4, S. 145–150
- 271 Uchida, M.; Ono, M.: Technological approach to improve beer flavor stability: Adjustments of wort aeration in modern fermentation systems using the electron spin resonance method. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (2000), Nr. 1, S. 30–37
- 272 Uchida, M.; Ono, M.: Technological approach to improve beer flavor stability: Analysis of the effect of brewing processes on beer flavor stability by the electron spin resonance method. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (2000), Nr. 1, S. 8–13
- 273 Uchida, M.; Suga, S.; Ono, M.: Improvement for oxidative flavor stability of beer - Rapid prediction method for beer flavor stability by electron spin resonance spectroscopy. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54 (1996), Nr. 4, S. 205–211
- 274 Van Eerde, P.; Strating, J.: Trans-2-nonenal. In: *Monograph - European Brewery Convention*. 1982, S. 117–121
- 275 Van Gheluwe, G.; Chen, E.; Valyi, Z.: Factors affecting the formation of fusel alcohols during fermentation. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 12 (1975), Nr. 3, S. 169–175
- 276 Van Haecht, J. L.; Dufour, J. P.: The production of sulfur compounds by brewing yeast: A review. In: *Cerevisia* 20 (1995), Nr. 1, S. 51–64
- 277 Van Zandycke, S.; Siddique, R.; Smart, K. A.: The role of the membrane in predicting yeast quality. In: *Technical Quarterly & the MBAA Communicator* 40 (2003), Nr. 3, S. 169–173
- 278 Van Zandycke, S. M.; Simal, O.; Smart, K. A.: Vitality assessment using the fluorescent stain FUN1. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (2nd Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2003, S. 162–168
- 279 Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Coghe, S.; Verstrepen, K. J.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G.: Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003), Nr. 23, S. 6782–6790
- 280 Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Daenen, L.; Verstrepen, K. J.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G.: Furfuryl ethyl ether: Important aging flavor and a new marker for the storage conditions of beer. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004), Nr. 6, S. 1661–1668
- 281 Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G.: The chemistry of beer aging - a critical review. In: *Food Chemistry* 95 (2006), Nr. 3, S. 357–381
- 282 Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G.: Influence of the brewing process on furfuryl ethyl ether formation during beer aging. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004), Nr. 22, S. 6755–6764
- 283 Verstrepen, K. J.; Derdelinckx, G.; Dufour, J. P.; Winderickx, J.; Pretorius, I. S.; Thevelein, J. M.; Delvaux, F. R.: The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene ATF1 is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. In: *Fems Yeast Research* 4 (2003), Nr. 3, S. 285–296

- 284 Verstrepen, K. J.; Derdelinckx, G.; Dufour, J. P.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M.; Pretorius, I. S.; Delvaux, F. R.: Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (2003), Nr. 2, S. 110–118
- 285 Verstrepen, K. J.; Iserentant, D.; Malcorps, P.; Derdelinckx, G.; Van Dijck, P.; Winderickx, J.; Pretorius, I. S.; Thevelein, J. M.; Delvaux, F. R.: Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? In: *Trends in Biotechnology* 22 (2004), Nr. 10, S. 531–537
- 286 Verstrepen, K. J.; Moonjai, N.; Bauer, F. F.; Derdelinckx, G.; Dufour, J. P.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M.; Pretorius, I. S.; Delvaux, F. R.: Genetic regulation of ester synthesis in yeast: new facts, insights and implications for the brewer. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (2nd Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2003, S. 234–248
- 287 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.; Delvaux, F. R.: Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003), Nr. 9, S. 5228–5237
- 288 Wackerbauer, K.: Der Einfluß der Hefegabe auf Gärung und Bierqualität. In: *Monatsschrift für Brauerei* 22 (1969), Nr. 8, S. 211–216
- 289 Wackerbauer, K.; Krämer, P.; Toussaint, H. J.: Technologische Parameter der Esterbildung. In: *Monatsschrift für Brauerei* 33 (1980), Nr. 3, S. 91–99
- 290 Wackerbauer, K.; Meyna, S.: Freie und triglycerid-gebundene Hydroxyfettsäuren in Gerste und Malz. 1. Einfluss von Sorte Provenienz und Erntejahr. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 55 (2002), Nr. 3/4, S. 52–57
- 291 Wackerbauer, K.; Meyna, S.; Marre, S.: Hydroxy fatty acids as indicators for ageing and the influence of oxygen in the brewhouse on the flavor stability of beer. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 56 (2003), Nr. 9/10, S. 174–178
- 292 Wackerbauer, K.; Tayama, T.; Kunerth, S.: Neuer Erkenntnisse des Einflusses der Hefelagerung auf die Gäraktivität und Vitalität von Hefen in nachfolgenden Gärungen. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 50 (1997), Nr. 7/8, S. 132–137
- 293 Walters, M. T.; Heasman, A. P.; Hughes, P. S.: Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability .1. Forced-aging. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55 (1997), Nr. 2, S. 83–89
- 294 Walters, M. T.; Heasman, A. P.; Hughes, P. S.: Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability .2. Extended storage trials. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55 (1997), Nr. 3, S. 91–98
- 295 Wang, P. S.; Siebert, K. J.: Determination of trans 2-nonenal in beer. In: *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas* 11 (1974), Nr. 2, S. 110–117
- 296 Wellhoener, U.; Geiger, E.: Aktivität des Hefeenzym Maltase als Indikator für den physiologischen Zustand der Bierhefe. In: *Der Weihenstephaner* (2003), Nr. 4, S. 141–144
- 297 Wellhoener, U.; Geiger, E.: Definition of the physiological condition of a brewers yeast by means of enzyme activity measurements during propagation and fermentation. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 2003, S. 55/51–55/11

- 298 Wember, T.: *Technische Statistik und statistische Versuchsplanung*. 7. Aufl. Willich: P & P Informationstechnologie GmbH, 1999
- 299 Wheeler, R. E.; Pragnell, M. J.; Pierce, J. S.: Identification of factors affecting flavor stability in beer. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 1971, S. 423–436
- 300 White, L. R.; Richardson, K. E.; Schiewe, A. J.; White, C. E.: Comparison of yeast viability/vitality methods and their relationship to fermentation performance. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (2nd Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2003, S. 138–148
- 301 White, P. A.; Kennedy, A. I.; Smart, K. A.: Osmotolerance and the adaptive osmotic stress response in ale and lager brewing yeast. In: *Proceedings of the Congress - European Brewery Convention*. 2003, S. 52/51–52/12
- 302 Wijewickreme, A. N.; Kitts, D. D.: Oxidative reactions of model Maillard reaction products and alpha-tocopherol in a fluor-lipid mixture. In: *Journal of Food Science* 63 (1998), Nr. 3, S. 466–471
- 303 Wijewickreme, A. N.; Kitts, D. D.; Durance, T. D.: Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondialyzable model Maillard reaction products. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997), Nr. 12, S. 4577–4583
- 304 Wijewickreme, A. N.; Krejpcio, Z.; Kitts, D. D.: Hydroxyl scavenging activity of glucose, fructose, and ribose-lysine model Maillard products. In: *Journal of Food Science* 64 (1999), Nr. 3, S. 457–461
- 305 Williams, R. S.; Gracey, D. E. F.: Beyond dimethyl sulfide: the significance to flavor of thioesters and polysulfides in Canadian beers. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 40 (1982), Nr. 2, S. 68–71
- 306 Williams, R. S.; Wagner, H.: The isolation and identification of new staling related compounds from beer. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 36 (1978), Nr. 1, S. 27–31
- 307 Williams, R. S.; Wagner, H. P.: Contribution of hop bitter substances to beer staling mechanisms. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 37 (1979), Nr. 1, S. 13–19
- 308 Wurzbacher, M.; Franz, O.; Back, W.: Control of sulphite formation of lager yeast. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 59 (2005), Nr. 11/12, S. 10–17
- 309 Yamashoji, S.; Hess, B.: Activation of Yeast 6-Phosphofructo-2-Kinase by Protein-Kinase and Phosphate. In: *FEBS Letters* 178 (1984), Nr. 2, S. 253–256
- 310 Yamashoji, S.; Hess, B.: Yeast 6-Phosphofructo-2-Kinase. In: *FEBS Letters* 172 (1984), Nr. 1, S. 51–54
- 311 Yang, G. S.; Schwarz, P. B.: Activity of Lipxygenase Isoenzymes during Malting and Mashing. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 53 (1995), Nr. 2, S. 45–49
- 312 Yoshimoto, H.; Fukushige, T.; Yonezawa, T.; Sone, H.: Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (2002), Nr. 4-5, S. 501–508
- 313 Younis, O.; Stewart, G.: The Effect of Wort Maltose Content on Volatile Production and Fermentation Performance in Brewing Yeast. In: Smart, K. A.: *Brewing Yeast Fermentation Performance (1st Edition)*. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2000, S. 170–176

- 314 Younis, O. S.; Stewart, G. G.: Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of the Institute of Brewing* 104 (1998), Nr. 5, S. 255–264
- 315 Younis, O. S.; Stewart, G. G.: Effect of malt wort, very-high-gravity malt wort, and very-high-gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57 (1999), Nr. 2, S. 39–45
- 316 Zufall, C.; Kunerth, S.; Tietje, N.; Wackerbauer, K.: Beeinflussung der Hefevitalität durch physikalischen Druck. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 53 (2000), Nr. 3/4, S. 44–49

## Lebenslauf

Frithjof Thiele, geboren am 08. Dezember 1972 in Homburg/Saar

- |                        |  |
|------------------------|--|
| <b>07/1979-06/1983</b> | Albert von Reinach Grundschule, Kelkheim/Ts.   |
| <b>07/1983-06/1990</b> | Staufenschule Kelkheim, Gesamtschule   |
| <b>07/1990-06/1993</b> | Ludwig Erhard Schule, Berufliches Gymnasium<br>Fachrichtung Wirtschaft<br>Abschluss: Abitur  |
| <b>09/1993-01/1996</b> | Binding Brauerei AG, Frankfurt am Main<br>Berufsausbildung zum Brauer und Mälzer   |
| <b>02/1996-09/1996</b> | Cerveceria y Malteria Paysandú S.A., Paysandú<br>Uruguay Praktikum im Bereich Technische Leitung<br>Mälzerei und Qualitätssicherung Brauerei |
| <b>11/1996-03/2002</b> | TU München Weihenstephan,<br>Studium Brauwesen und Getränketechnologie   |
| <b>10/2000-07/2001</b> | Heriot Watt University, Edinburgh Auslandssemester<br>im Studiengang Brewing and Distilling  |
| <b>Seit 05/2002</b>    | Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für<br>Technologie der Brauerei I der TU München-<br>Weihenstephan                              |