

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

**Molekulare Charakterisierung der
altersbedingten Trübungsbildung in Bieren**

Benedikt Jürgen Bächler

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Rychlik

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Thomas F. Hofmann
2. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 10.06.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 14.12.2021 angenommen.

Für meine Familie.

Für Annika.

Und für mich.

„(...) wir [sind] gleichsam Zwerge, die auf den Schultern von Riesen sitzen, um mehr und Entfernteres als diese sehen zu können – freilich nicht dank eigener scharfer Sehkraft oder Körpergröße, sondern weil die Größe der Riesen uns emporhebt.“

- Bernhard von Chartres

DANKE!

Möchte ich allen Menschen sagen, die mich auf diesem Weg und darüber hinaus begleitet haben. Die mich bestärkt, unterstützt, gefördert, gefordert, ermutigt und ertragen haben. Allen, ohne die diese Arbeit niemals entstanden oder zu Ende gebracht worden wäre. *Ehre, wem Ehre gebührt.* (J. W. von Goethe)

Danke Herr **Prof. Hofmann**, für die Aufnahme und die Ausbildung an Ihrem Lehrstuhl, die in jeder Hinsicht lehrreichen Jahre voller Höhen und Tiefen und die motivierenden Diskussionen.

Danke *Teppichfraktion!* Ohne euch wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. **Roman, Oli, Timo** und **Stefan**, vielen Dank für eure Unterstützung bei jedem Anliegen zu jedem Zeitpunkt und dass eure Türen immer offenstanden. Danke **Corinna**, dass du immer ein offenes Ohr hattest. Und danke **Angela**, dass du dich als gute Seele des Lehrstuhls immer eingesetzt hast!

Danke **Andreas**, für die Begleitung des Projekts und deine allzeit kritische Sicht auf die Dinge und danke **Tini, Julia** und **Martina** für die konstruktive Kooperation.

Danke allen aktiven und engagierten Operatoren! Insbesondere an **Oli, Richy** und **Michi** für die Zauberei am NMR, an **Basti** und **Gerold** für eure unschlagbar zuverlässige Hilfe an der IC und an **Mats, Matze, Pät** und **Karin** für eure Unterstützung am TOF-MS. Mein besonderer Dank geht dabei an **Max Dietz, Max Kranz, Karin Sebald** und **Roman Lang** für die sehr lehrreichen Stunden über die Anwendung, Reparatur und v.a. Tücken der LCMS-Technik.

Danke **Sonja Fröhlich, Florian Utz** und **Marc Krauß**, dass ihr diese Arbeit mit eurem Eifer weite Schritte vorwärtsgebracht habt.

Danke meinen lieben **LaborkollegInnen**, für die gute Stimmung und Zusammenarbeit und dass ihr bei vernachlässigten Spüldiensten stets nachsichtig mit mir wart. Danke an alle, die ihre Aufgaben gewissenhaft wahrgenommen und zum guten Arbeitsklima beigetragen haben.

Ein Jahr lang durfte ich am BayBioMS arbeiten. Danke **Karin** und danke **Herr Hofmann**, für das entgegengebrachte Vertrauen. Und Danke **Tina, Chen, Ute, Hermine, Susi, Miri, Nina, Franzi** und **Evi** für die super Zeit mit euch und alles dabei Gelernte! Außerdem würde diese Arbeit ohne die Expertise und Hilfe von **Steffi, Tina, Miri, Franzi** und **Hermine** nicht existieren. **Chen**, *especially to you, thank you so much for your support* – Danke!!

Danke **Anja, Laura, Valerian** und **Edwin**, für die unbürokratische ICP-MS-Hilfe und danke **Peter**, für deine didaktisch wertvolle Statistik-Beratung.

Danke **Max, Karin** und **Annika**, dass ihr euch die Korrektur dieser Arbeit angetan habt!

Danke den besten Bürokollegen aller Zeiten! **Karin** und **Chris**, es war mir ein inneres Blumenpflücken mit euch. Und was ist das Leben schon ohne gute Nachbarschaft - danke **Johanna!**

Wer mich kennt weiß, wie gut gelaunt ich hungrig bin. Danke an die treue Mensa-Truppe. Und wer gerne isst, sollte auch sporteln. Danke **Gerold, Alin** und **Dani** - die weltbeste Laufgruppe!

Ohne die **AG Junge LebensmittelchemikerInnen** und das **ACS student chapter** wäre mein Weg anders verlaufen. Danke an jede/n, die/der sich uneigennützig außerhalb des Hörsaals engagiert und Bock hat, was zu bewegen!

Wirklich gute Freunde sind Menschen, die uns ganz genau kennen, und trotzdem zu uns halten. (Marie von Ebner-Eschenbach)

Danke **Phips**, für jeden Lernmarathon, GAP-Abend, deine ansteckende Begeisterung und die Wahnsinns-Zeit in der StuSta! Danke **Basti, Christoph, Flo, Gerold, Johanna, Marie, Mats, Pät, Peter, Roman, Stefan** und **Thomas**, euer Einfluss geht so weit über Studium und den Lehrstuhl hinaus.

Wahre Freundschaften sind mit nichts auf der Welt aufzuwiegen, außer mit bedingungsloser Gegenseitigkeit. Danke **Romy** und **Willi**, dass ich Teil der besten Moosgassen-Gang der Welt sein durfte. Danke **Tim**, dass du schon länger mein Freund bist, als ich mich zurückerinnern kann. Und danke **Alin, Babsi, Karin, Kathi, Max, Oliver** und **Valerian** – euer Anteil passt nicht in diese Zeilen, ich hoffe das wisst ihr. Vielen vielen Dank für *alles!*

Neben jedem starken Mann steht eine viel stärkere Frau. **Annika**, dir verdanke ich, dies hier überhaupt schreiben zu können. Danke für dein Verständnis und deine Geduld mit mir. Dafür, dass du immer zu mir stehst und es immer wieder geschafft hast, mich aufzupäppeln. Dein Anteil an dieser Arbeit, und was du mir bedeutest, ist nicht in Worte zu fassen. Danke!

Danke Familie! Danke **Andreas** und **Tanja**, dass ich immer euer kleiner Bruder sein werde. Und allen voran: danke **Mama** und **Papa**. Für alle meine Möglichkeiten, alle meine Chancen und all das, wofür ihr in Verbindung zurückgesteckt habt. Danke für die Vermittlung von Werten, danke für meine Freiheiten und danke für die Grenzen, wo sie nötig waren. Danke für eure bedingungslose Unterstützung. Danke für mein unbeschwertes Leben!

Euch allen seien Schweiß, Tränen, womöglich auch etwas Blut, Nerven, graue Haare, schlaflose Nächte, Lebensjahre und vor allem aber die letztendliche Freude und Genugtuung gewidmet, die in diese Arbeit geflossen sind. Undenkbar ohne euch.

VON HERZEN DANKE.

Vorbemerkungen

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Juli 2015 bis Dezember 2019 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, TUM School of Life Sciences (bis 2020 Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt) der Technischen Universität München in Freising unter der Leitung und Betreuung von Prof. Dr. Thomas F. Hofmann durchgeführt.

Die holistischen Messungen der Proteome mittels nano-LC-ESI-Orbitrap-MS und die multivariate Datenauswertung der Proteomik-Studien wurden am Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS), TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München, in Zusammenarbeit mit Dr. Stephanie Heinzlmeir, Dr. Tina Ludwig, M.Sc. Miriam Abele und Dr. Chen Meng durchgeführt.

Die Brauversuche und die Charakterisierung der hierfür eingesetzten Rohstoffe wurden von M.Sc. Christina Cotterchio und LM.-Chem. Julia Wannemacher am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie der Technischen Universität München unter der Betreuung von Dr. Martina Gastl und Prof. Dr. Thomas Becker durchgeführt.

Enzymaktivitätsmessungen konnten am Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie an der Technischen Universität München (Leibniz-LSB@TUM) in Freising durchgeführt werden.

Die ICP-MS-Messungen wurden am Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, unter Betreuung von Prof. Dr. Bernhard Michalke und von der Kalb Analytik AG, Feldkirch, Österreich, in Zusammenarbeit mit Anja Geisinger, Laura Nikolatti und M.Sc. Valerian Kalb unter Leitung von Dr. Edwin Kalb durchgeführt.

Die CHNS-Verbrennungsanalysen wurden in der Abteilung Zentralanalytik der Fakultät für Chemie, Technische Universität München, Garching, in Zusammenarbeit mit Ulrike Ammari durchgeführt.

Multivariate Datenanalysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Andreas Dunkel (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik bzw. Leibniz-LSB@TUM) und Dr. Chen Meng (BayBioMS).

Teile dieser Arbeit wurden auf internationalen Fachkongressen veröffentlicht:

Baechler, B.; Dietz, M.; Dresel, M.; Dunkel, A.; Hofmann, T.: Development of an ECHO-UHPLC-MS/MS(MRM) technique for the analysis of bitter-tasting metabolites in hops and beers. 7. Berliner LC-MS/MS-Symposium, Berlin, Germany, 2017. (Posterbeitrag, ausgezeichnet)

Baechler, B.; Dunkel, A.; Hofmann, T.: The chemistry of beer haze. 255th American Chemical Society National Meeting, New Orleans, LA, USA, 2018. (Fachvortrag)

Baechler, B.; Dunkel, A.; Hofmann, T.: Age-induced haze formation in beer. 258th American Chemical Society National Meeting, San Diego, CA, USA, 2019. (Fachvortrag)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Bier und der Brauprozess	1
1.2.	Biertrübung und chemische Bialterung.....	6
1.2.1.	Trübungsrelevante Bierinhaltsstoffe.....	9
1.2.1.1.	Proteine	9
1.2.1.2.	Kohlenhydrate	14
1.2.1.3.	Metallionen.....	15
1.2.1.4.	Sekundärmetabolite	17
1.2.1.5.	Weitere trübungsbeeinflussende Parameter.....	24
1.3.	Trübungsmessung	25
2.	Problemstellung und Zielsetzung	27
3.	Ergebnisse und Diskussion	29
3.1.	Unterschiedliche Trübungsneigungen kommerzieller Biere	29
3.2.	Molekulare Charakterisierung der Biertrübung	32
3.2.1.	Proteomikstudien.....	33
3.2.1.1.	Qualitative Proteomanalyse mittels SDS-PAGE	33
3.2.1.2.	Gesamtproteingehalte von Bier und Biertrübung.....	35
3.2.1.3.	Holistische Proteomanalyse	40
3.2.2.	Ermittlung des Kohlenhydratgehaltes von Biertrübung.....	55
3.2.3.	Wassergehaltsbestimmung von Biertrübung.....	58
3.2.4.	Quantifizierung von Hopfenbitterstoffen und Polyphenolen.....	59
3.2.5.	Quantifizierung von Ionen in Bier und Biertrübung	65
3.2.6.	Diskussion	68
3.3.	Identifizierung trübungsauslösender Bierinhaltsstoffe.....	77

3.3.1.	Einflüsse hoch- und niedermolekularer Bierinhaltsstoffe auf die Trübungsstabilität.	77
3.3.2.	Einfluss von Hopfenphenolen auf die Trübungsstabilität	81
3.3.3.	Einfluss von Metallionen auf die Trübungsstabilität.....	83
3.3.4.	Einfluss organischer Komplexbildner auf die Trübungsstabilität.....	91
3.3.5.	Einfluss der Oxalatoxidaseaktivität auf die Trübungsstabilität	96
3.3.6.	Einfluss des antioxidativen Potentials auf die Trübungsstabilität.....	98
3.3.7.	Rekonstitution des Biertrübungsprozesses im Modell	102
3.3.8.	Korrelation der trübungsrelevanten Parameter in Handelsproben.....	105
3.4.	Diskussion	119
4.	Experimenteller Teil.....	131
4.1.	Reagenzien, Materialien und Untersuchungsmaterial	131
4.1.1.	Reagenzien	131
4.1.2.	Materialien	133
4.1.3.	Untersuchungsmaterial.....	134
4.1.3.1.	Handelsproben und Versuchsbiere	134
4.1.3.2.	Biertrübungen	136
4.2.	Trübungsaktivitätsorientierte Fraktionierung (Ultrafiltration)	137
4.3.	Forcierte Bialterung.....	137
4.4.	Isolierung der Biertrübung.....	138
4.5.	Extraktion der Biertrübung	138
4.6.	Nephelometrische Trübungsmessung.....	139
4.7.	Quantifizierung niedermolekularer Bierinhaltsstoffe	141
4.7.1.	Hopfenbitterstoffe und Polyphenole mittels ECHO-LC-MS/MS	141
4.7.2.	Gesamtkohlenhydratgehalt mittels HPIC nach saurer Vollhydrolyse	143
4.7.3.	Wassergehaltsbestimmung mittels Karl-Fischer-Titration.....	144

4.7.4.	Ionenbestimmung mittels ICP-MS nach oxidativem Aufschluss	144
4.7.5.	Enzymatische Bestimmung des Oxalsäuregehaltes.....	145
4.8.	Proteomanalysen	146
4.8.1.	Bestimmung der Gesamtproteingehalte von Bier und Biertrübung.....	146
4.8.1.1.	<i>Bradford</i> -Assay (Biere).....	146
4.8.1.2.	Elementaranalyse (Biertrübungen).....	148
4.8.2.	Holistische Proteomik	148
4.8.2.1.	Probenvorbereitung mittels SDS-PAGE und In-Gel-Verdau	148
4.8.2.2.	Analyse der Peptide mittels nano-LC-ESI-Orbitrap-MS	150
4.8.2.3.	Statistische Analyse der Proteomdaten.....	150
4.8.3.	Enzymatische Bestimmung der Oxalatoxidase-Aktivität.....	152
4.9.	Untersuchung des Trübungseinflusses ausgewählter physikochemischer Parameter sowie der Trübungsaktivität ausgewählter Fraktionen und Bierinhaltsstoffe	154
4.9.1.	Trübungsaktivität der Ultrafiltrationsfraktionen LMW und HMW	155
4.9.2.	Trübungsaktivität von Hopfeninhaltsstoffen	156
4.9.3.	Trübungsaktivität von Metallionen.....	157
4.9.3.1.	Dotierung von EDTA zu Bier	157
4.9.3.2.	Trübungsaktivität einzelner Ionen und Ionenspezies	157
4.9.3.3.	Verdünnungsreihen von Eisen (Fe) und Kupfer (Cu).....	158
4.9.4.	Trübungsaktivität von Oxalsäure.....	159
4.9.5.	Trübungsaktivität von Oxalatoxidase (OxOx)	159
4.9.5.1.	Dotierung von OxOx zu Bier.....	159
4.9.5.2.	Dotierung von OxOx-Modulatoren zu Bier	159
4.9.6.	Einfluss des antioxidativen Potentials auf die Trübungsneigung	160
4.9.6.1.	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Trübungsstabilität	160
4.9.6.2.	Einfluss von Katalase auf die Trübungsstabilität.....	160
4.9.7.	Rekombination eines Modells zur initialen Trübungsbildung	161

4.9.7.1.	HMW + Fe.....	161
4.9.7.2.	HMW + Fe + Oxalsäure.....	162
4.9.7.3.	HMW + Fe + Oxalsäure + OxOx.....	162
4.9.8.	Einfluss des pH-Werts auf die Trübungsstabilität.....	163
4.10.	Ionenchromatographie (HPIC)	163
4.11.	Tandem-Massenspektrometrie (UHPLC-MS/MS).....	164
5.	Zusammenfassung	167
6.	Literaturverzeichnis.....	171
7.	Anhang.....	185

Abkürzungen

ASBC	American Society of Brewing Chemists
BSA	Bovines Serumalbumin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CAA	Chloracetamid
CE	Collision Energy
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXP	Cell Exit Potential
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek(-Theorie)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Declustering Potential
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Entrance Potential
ESI	Electrospray-Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie (<i>electron spin resonance</i>)
FA	Ameisensäure
FDR	Falscherkennungsrate (<i>false discovery rate</i>)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HMW	Hochmolekulare Bierfraktion (> 1 kDa)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
iBAQ	Intensity Based Absolute Quantification
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LMW	Niedermolekulare Bierfraktion (< 1 kDa)

LTP	Lipidtransferprotein
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NaOH	Natronlauge
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NVP	<i>N</i> -Vinyl-2-pyrrolidon
OxOx	Oxalatoxidase
p.a.	pro analysis
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
pH	potentia hydrogenii
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
qNMR	quantitative Kernspinresonanzspektroskopie
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPE	Festphasenextraktion
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
UF	Ultrafiltration
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
VIS	Sichtbarer Wellenlängenbereich (<i>visible</i>)

XIC

Extracted Ion Chromatogram

ZZuIV

Zusatzstoff-Zulassungsverordnung

Einheiten und Symbole

%	Prozent
[C]	Carbamidomethylierung
°C	Grad Celcius
μ	mikro
Å	Ångström
c	Konzentration
Da	Dalton
EBC	European Brewery Convention (Trübungsmaßeinheit)
g	Gramm
Gew.-%	Gewichtsprozent
Hz	Hertz
l	Liter
m	Meter
M	Molarität / Molare Konzentration in [mol/l] / Molmasse in [g/mol]
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Mol
nC	Nanocoulomb
nm	Nanometer
NTU	Nephelometric Turbidity Units (Trübungsmaßeinheit)
p	Druck
ppm	parts per million

rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
t_R	Retentionszeit
U	unit (Maß für die enzymatische Aktivität)
Vol.-%	Volumenprozent
λ	Wellenlänge [nm]
λ_{\max}	Absorptionsmaximum [nm]
σ	Standardabweichung

Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

1.1. Bier und der Brauprozess

Seit mehr als 3000 Jahren trinkt der Mensch Bier oder bierähnliche Zubereitungen. So simpel die (heutige) Zutatenliste nach dem Deutschen Reinheitsgebot von 1516 auch erscheinen mag, so entsteht nach einem über die Jahrtausende hinweg ausgereiften Brauprozess ein derart komplex zusammengesetztes Lebensmittel, dass Forschungen zu den grundlegendsten Merkmalen des Bieres bis heute Rätsel aufgeben. Aus Gerste, Hopfen, Wasser und Hefe entsteht nach entsprechender Vorbereitung und Verarbeitung der Zutaten ein Getränk, welches in der Regel eine goldgelbe bis dunkelbraune Farbe, frisch eingeschenkt eine weiße Schaumkrone, Kohlensäure, ein getreidiges bis karamelliges und teils fruchtiges Aroma sowie einen süß-herben bis bitteren Geschmack aufweist.

Heute ist die Brauindustrie ein milliardenschwerer Wirtschaftsfaktor. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2018 etwa 94 Millionen Hektoliter Bier ausgestoßen. Damit beträgt der Anteil der deutschen Brauereien am weltweiten Bierausstoß knapp 5 %. Die Deutschen trinken pro Kopf und Jahr rund 102 Liter Bier, wobei der Umsatz der über 1500 deutschen Braustätten im Jahr 2018 bei über 8 Milliarden Euro lag (Bart-Haas-Group, 2019; Deutscher Brauer-Bund, 2019; The Brewers of Europe, 2019). Speziell an deutsche, nach dem Reinheitsgebot gebraute Biere, für die per Gesetz keinerlei Zusatzstoffe zur Haltbarmachung oder anderweitigen Beeinflussung der Beschaffenheit erlaubt sind, werden hohe Qualitätsansprüche gestellt. Diese betreffen natürlich sicherheitsrelevante Aspekte, wie Kontaminanten und mikrobielle Belastungen, aber nicht zuletzt sensorische Parameter, womit sowohl eine geeignete Rohstoffwahl als auch eine detailliert geregelte Prozessführung für die Qualität des Produktes entscheidend sind. Die Rohstoffe werden geprüft und anschließend in einem technologisch sowie biochemisch anspruchsvollen Brauprozess verarbeitet. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Biertrübung als sensorischem Qualitätsparameter befasst, sollen eingangs zunächst der Einfluss des Brauprozesses und anschließend die Einflüsse unterschiedlicher Rohstoffzusammensetzungen sowie etwaiger Substanzen auf die Trübungsbildung diskutiert und der aktuelle Stand der Wissenschaft dazu zusammengefasst werden.

Bierzubereitung

Zur Übersicht ist der Brauvorgang in Abbildung 1 verallgemeinert dargestellt.

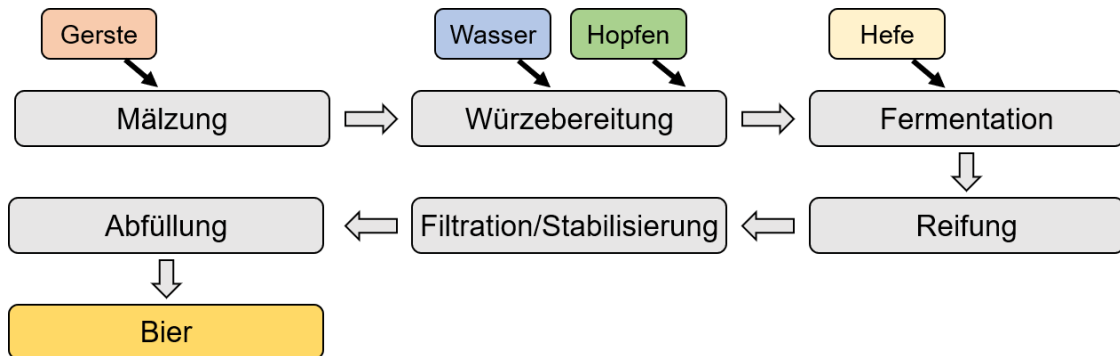


Abbildung 1: Allgemeine schematische Darstellung des Brauprozesses

Nachfolgend sollen die einzelnen Prozessschritte, jeweils im Hinblick auf die Fragestellung einer unerwünschten Trübungsbildung, detailliert beschrieben werden.

Mälzung

Bei der Gerstenverarbeitung werden zunächst durch das **Weichen** der getrockneten, gesäuberten und sortierten Getreidekörner enzymatische Prozesse initiiert. Hierbei werden die Mehlkörper über eine definierte Wasserzugabe und die Regelung der Luftfeuchtigkeit auf eine Kornfeuchte von 43 bis 50 % eingestellt. Bei einer konstanten Temperatur von 14 bis 18 °C werden die Gerstenkörner unter Sauerstoffzufuhr zum **Keimen** angeregt. Im Zuge der Keimung werden Wachstumsprozesse im Korn angeregt, die mit der Ausschüttung und Aktivierung unterschiedlicher Enzyme, wie Glucanasen, Amylasen, Cellulasen, Peptidasen und Phosphatasen einhergehen. Diese Enzyme bauen makromolekulare Kornbestandteile wie Proteine und Polysaccharide zu niedermolekularen Substanzen, wie Dextrine, Mono- und Disaccharide sowie Oligopeptide und Aminosäuren ab. Diese niedermolekularen Substanzen können im weiteren Brauprozess als Edukte für die Generierung von Aroma-, Geschmacks- und Farbstoffen dienen und außerdem von Hefen bei der Gärung metabolisiert werden. Auf diese Weise wird das sogenannte Grünmalz mit einem Restwassergehalt von etwa 45 % erhalten. Um das leicht verderbliche Gut zu trocknen und die enzymatischen Prozesse zu stoppen, wird die Restfeuchte und folglich auch die erwünschte Farbe beim anschließenden **Darren** auf 3,5 bis 4 % (helles Malz) beziehungsweise 1,5 bis 2 % (dunkles Malz) eingestellt. Bei 85 °C (helles Malz) bis zu 105 °C (dunkles Malz/Röstmalz) entstehen bei der Bräunung im Zuge eintretender *Maillard*-Reaktionen wichtige Farb- und Aromastoffe. Das somit gewonnene Darrmalz ist lagerfähig und kann zur Würzebereitung eingesetzt werden (Narziß *et al.*, 2017; Belitz *et al.*, 2012; Pires & Brányik, 2015).

Würzebereitung

Die Zubereitung der Bierwürze beginnt nach dem **Schroten** des Darrmalzes. Hierbei sollten unterschiedliche Teile der Getreidekörner unterschiedlich stark zerkleinert werden, um erwünschte Stoffe, wie die Inhaltsstoffe des Mehlkörpers, zugänglich zu machen, unerwünschte Bestandteile, wie Bitterstoffe aus den Spelzen, hingegen zurückzuhalten. Grobe Bestandteile des Schrotens dienen beim späteren Läutern als Filtrierhilfe. Beim **Maischen** liegt das Hauptaugenmerk auf dem enzymatischen Abbau hochmolekularer Gerstenbestandteile, wie Stärke und Proteine. Die malzeigenen Enzyme besitzen unterschiedliche pH- und Temperaturoptima, weshalb die Prozessführung beim Maischen von großer Bedeutung für den Typ und die Qualität des späteren Bieres ist. Die wichtigsten Enzyme stellen hierbei die Amylasen für den Stärkeabbau und die Endopeptidasen für die Proteindegradation dar. Die Optima dieser Enzymklassen liegen in einem Temperaturbereich von 40 - 75 °C und einem pH-Bereich von pH 4,6 - pH 5,8. Entscheidend ist, die richtigen Zeitpunkte abzapfen, an denen der enzymatische Abbau weit genug, aber noch nicht zu weit vorangeschritten ist. Speziell die Proteinfraction hat einen entscheidenden Einfluss auf die Bierqualität, was sensorische Parameter ebenso wie die Bierstabilität anbelangt. So sollten im Zuge des Maischens zwar trübungsaktive Proteine weitmöglichst degradiert werden, schaumaktive Proteine hingegen den Prozess überdauern und ins Bier gelangen. Die anschließende Trennung der Würze von den unlöslichen Malzbestandteilen, dem Treber, wird als **Läutern** bezeichnet, was heutzutage in der Regel mittels Läuterbottich oder über Maischefilter bewerkstelligt wird. An das Läutern schließt sich das **Würzekochen unter Hopfenzugabe** an, wobei auch hier die erwünschte Biersorte über die Menge und den Zeitpunkt der Hopfengabe sowie die Dauer und Temperaturführung des Kochprozesses entscheidet. Beim Kochen wird die Würze eingedampft und der entstehende Heißtrub abgetrennt. Die erwünschten, lipophilen Hopfenbitterstoffe werden aus den eingesetzten Hopfenprodukten (z.B. Dolden, Pellets oder Extrakte) extrahiert und durchlaufen im Zuge niedriger pH-Werte und hohen Temperaturen chemische Isomerisierungen. So werden α -Säuren, die Humulone, zu den besser wasserlöslichen *iso*- α -Säuren, den Isohumulonen, umgelagert. β -Säuren, die Lupulone, können aufgrund ihrer chemischen Struktur und der zusätzlichen Prenylseitenkette im Vergleich zu den α -Säuren nicht äquivalent isomerisieren (siehe Abbildung 4, Seite 17). Jedoch konnte gezeigt werden, dass sie unter den Bedingungen, wie sie beim Würzekochen herrschen, zu den sogenannten Huluponen oxidieren können (Verzele & de Keukeleire, 1991). Des Weiteren weisen einige Hopfenbittersäuren einen bakteriziden Charakter auf, was in Kombination mit der Sterilisierung durch den Kochprozess zur mikrobiellen Stabilität der Würze beiträgt (Cattoor *et al.*, 2013;

Simpson & Smith, 1992; Simpson, 1993; Vogt, 2015; Hughes, 2000). Nach dem Abkühlen der fertigen Würze auf 6 – 8 °C und Abtrennung des dabei entstandenen Kältetrubs wird die Würze in den Gärtank überführt (Belitz *et al.*, 2012; Pires & Brányik, 2015; Narziß *et al.*, 2017).

Fermentation

In der Bierbrauerei werden grundsätzlich zwei Hefearten unterschieden, die obergärige und die untergärige Hefe. Während obergärige Hefen bei der Vermehrung Zellverbände bilden und aufgrund der Gasbildung im Verlauf der Gärung an die Oberfläche aufsteigen, sinken die einzelligen untergärigen Hefen an den Boden des Fermentationsgefäßes ab. Die Wahl der *Saccharomyces*-Kulturen richtet sich ebenso wie die Architektur der Gärtanks, die Temperaturführung und die Fermentationsdauer nach dem Typ des herzustellenden Bieres. Zur Herstellung eines untergärigen Bieres wird die auf 5 – 6 °C gekühlte Würze z.B. mit Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* angestellt. Die **Hauptgärung** läuft bei Temperaturen von 8 – 14 °C über einen Zeitraum von 6 – 10 Tagen ab. Durch die dabei stattfindende alkoholische Gärung werden typischerweise Alkoholgehalte im Bereich von 4 – 6 Vol.-% erreicht. Das entstandene Jungbier wird zur **Nachgärung** in geschlossene Tanks überführt und bei -2 – 3 °C gelagert. Lager- und Pilsener Biere reifen so in der Regel noch 4 – 8 Wochen nach, wobei weitere Aromastoffe gebildet werden, mehr Kohlenstoffdioxid entsteht, die Hefe sich absetzt und sich das Bier durch die Abscheidung von Trubbestandteilen klärt (Pires & Brányik, 2015; Belitz *et al.*, 2012; Narziß *et al.*, 2017).

Filtration und Stabilisierung

Der Großteil der heutzutage gebrauten Biere wird vor der Abfüllung filtriert, um Schwebstoffe und Hefezellen zu entfernen und dem Verbraucher ein klares, ansprechendes und frisch wirkendes Produkt anzubieten. Durch diesen Prozessschritt und den Einsatz unterschiedlicher Filterhilfsstoffe, wie beispielsweise Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) oder Kieselgel, soll das Bier außerdem hinsichtlich seiner sensorischen Eigenschaften stabilisiert werden, indem vermeintlich trübungsfördernde Substanzen wie Proteine, Polyphenole und Metallionen beim Aufschlemmen mit den Filterhilfsstoffen an diese adsorbieren und anschließend bei der Filtration zusammen mit dem Trägerstoff entfernt werden. Hierdurch soll eine längere Haltbarkeit des fertigen Produkts, sowohl im Hinblick auf die Geschmacksstabilität als auch auf die Trübungsstabilität, erreicht werden. Wie unter 1.2.1. näher erläutert, werden hauptsächlich den Polyphenolen und bestimmten Proteinen trübungsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Apperson *et al.* konnten unter Anwendung von Fluoreszenzmessungen zeigen, dass Silikagel effektiv hydrophile Bierproteine bindet, die in der Diskussion stehen, trübungsaktiv zu sein (Apperson *et al.*, 2002). Durch die Anwendung von PVPP können die

Polyphenolgehalte des Bieres signifikant herabgesetzt werden, was meist in direkten Zusammenhang mit einer besseren Trübungsstabilität gebracht wird (McMurrough *et al.*, 1992; McMurrough *et al.*, 1996; Mikyška *et al.*, 2002; Mikyška *et al.*, 2019; Papp *et al.*, 2001). Die Affinität von PVPP für Polyphenole wird der vermeintlichen Strukturähnlichkeit des synthetischen Kunststoffes mit Polyprolin zugeschrieben, einem Peptid, welches in einigen Modellsystemen zum Einsatz kommt, da es einen trübungsaktiven Charakter aufweist (Aron & Shellhammer, 2010; Schmidt, 2012). Polyprolin wiederum soll die Interaktion von Polyphenolen mit als trübungsaktiv geltenden, prolinreichen Proteinen, den Hordeinen, imitieren.

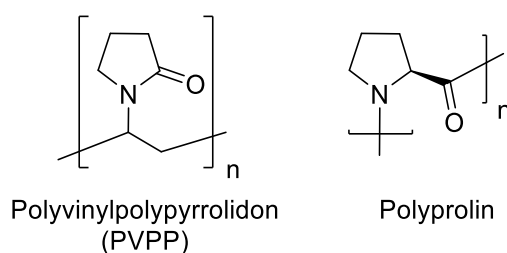


Abbildung 2: Gegenüberstellung der Strukturformeln von PVPP und Polyprolin, deren Wechselwirkungen mit Polyphenolen in Modellstudien mit denen des prolinreichen Hordeins verglichen werden. (Belitz *et al.*, 2012; Schmidt, 2012)

Die Braupraxis zeigt, dass eine Behandlung mit PVPP und Kieselgel durchaus stabilisierende Effekte auf das fertige Bier haben kann, welche die Mindesthaltbarkeit und letztlich die Verbraucherakzeptanz steigern (Belitz *et al.*, 2012; Madigan *et al.*, 2000; Marković *et al.*, 2003; McMurrough *et al.*, 2018; Narziß *et al.*, 2017; Pires & Brányik, 2015).

1.2. Biertrübung und chemische Bialterung

Die Trübung eines Bieres ist zweifelsohne das primäre Qualitätsmerkmal, welches vom Konsumenten noch vor der Öffnung der Bierflasche beurteilt und eingeschätzt wird. Während man bei den Präzipitaten des Brauprozesses, die im Zuge der Würzekochung und Abkühlung anfallen, von *Trub* spricht (Heißtrub, Kältetrub), bezeichnet das Wort *Trübung* die letztlich das fertige Bier, erwünscht oder unerwünscht, trübenden Feststoffe. Trübungserscheinungen können als Folge von technologischen Fehlern in der Prozessführung auftreten, wie beispielsweise einer fehlerhaften Temperaturführung, Gärungsproblemen oder hygienischen Unregelmäßigkeiten. Treten solcherlei Fehler auf, können sie aber in der Regel durch korrigierendes Eingreifen in den Brauprozess behoben werden. Die vorliegende Arbeit hingegen, befasst sich mit der Untersuchung unerwünschter Biertrübung als Alterungserscheinung, was auch als *kolloidale Stabilität* bezeichnet wird.

Biertrübung als kolloidaler Niederschlag

Biertrübung wird in der Brauwissenschaft als kolloidaler Niederschlag beschrieben, dessen Partikel in Bier unlöslich und fein verteilt sind. Kolloide können per Definition organischen oder anorganischen Ursprungs sein, wobei ihr Charakteristikum eine trübe, leimartige Beschaffenheit ist. Die *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) definierte 1971 alle Objekte, die mindestens eine Dimension in der Größenordnung 1 – 1000 nm aufweisen, als Kolloide (IUPAC, 1971). Sie folgen den Prinzipien der Brownschen Molekularbewegung, weswegen in einem kolloidalen System eine disperse Phase in einem Dispersionsmedium (über einen definierten Zeitraum hinweg) gleichmäßig verteilt ist. Gängige Beispiele für kolloidale Dispersionen sind Nebel als Verteilung von Flüssigkeit in Luft, Tabakrauch als Dispersion von Feststoff in Luft oder, im Fokus dieser Arbeit, trübes Bier als kolloidale Dispersion von Feststoff in Flüssigkeit (Ferstl, 2002; Grasso *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2003; Hofmann, 2004).

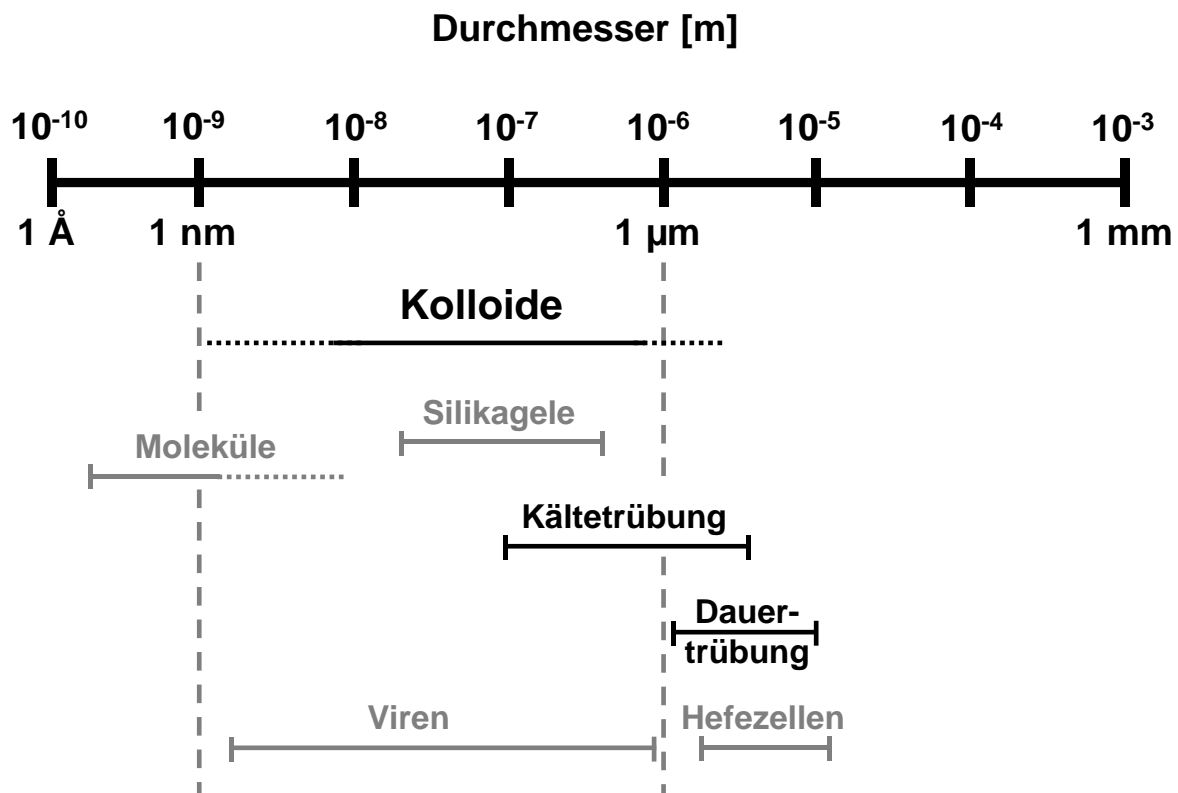


Abbildung 3: Dimensionale Einordnung und Größenverteilung von Kolloiden. (Hofmann, 2004; Wainwright, 1974)

Differenzierung zwischen Dauer- und Kältetrübung

In der Literatur werden zwei Arten von Trübungen unterschieden. Während sich die im Englischen als *chill haze* bezeichnete **Kältetrübung** bei niedrigen Temperaturen um 4 °C ausbildet und bei Erwärmung auf Raumtemperatur wieder in Lösung geht, ist die **Dauertrübung** (oder Alterungstrübung, engl. *permanent haze*), auch bei höheren Temperaturen in Bier unlöslich. Verantwortlich gemacht werden dafür bislang Übergänge von nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen, zu kovalenten Bindungen, wie z.B. die Reaktion von Lysinseitenketten bestimmter Proteine mit oxidierten Polyphenolen (Asano *et al.*, 1982; Aron & Shellhammer, 2010; Pöschl, 2009). Bislang werden die beiden Trübungsarten hauptsächlich aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften hinsichtlich der Solubilität unterschieden. Die speziellen Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung sind bislang wenig erforscht. Auch fehlen oftmals stichhaltige geräteanalytische Nachweise der beschriebenen Reaktionen, die für den Übergang von nicht-kovalenten zu kovalenten Verbindungen verantwortlich gemacht werden. Weitere Kenntnisse zu diesen beiden Aspekten wären auch von Nöten, um

Aussagen darüber treffen zu können, ob die Kältetrübung zu Recht als Vorläufer der Dauertrübung betrachtet wird, oder ob unter Umständen in beiden Fällen grundverschiedene Prozesse ablaufen. In der Bierforschung wurden oftmals über die Beobachtung von Konzentrationsveränderungen einzelner Analyten, beispielsweise im Zuge eines Alterungsprozesses, Rückschlüsse auf die möglichen chemischen Ursachen gezogen. In einigen Forschungsarbeiten wurden über Ergebnisse aus artifiziellen Modellsystemen Parallelen für Bier gezogen, obwohl diese Modelle teils weit von der natürlichen Biermatrix abwichen, worauf später noch genauer eingegangen wird (Miedl *et al.*, 2005; Siebert *et al.*, 1996a; Siebert, 1999; Siebert & Lynn, 2000, 2003). Da die chemische Zusammensetzung von Bier und speziell die der Biertrübung äußerst komplex ist, sind direkte Beweise der beschriebenen Zusammenhänge oft nicht trivial. Auch Loch-Ahring beschreibt dieses Missverhältnis zwischen Modellstudien und deren Relevanz für Realproben sowie das Fehlen stichhaltiger analytischer Nachweise in seiner Publikation (hier speziell in Bezug auf Protein-Polyphenol-Interaktionen): *„Due to the ability of polyphenols to form haze with proteins in model reactions, these interactions have been assumed to be responsible for haze reactions in the beverage container, too. Despite theoretical considerations and model reactions, no haze formation mechanism has been proved yet.“* (Loch-Ahring *et al.*, 2008). Zwar liegt auch diese Arbeit bereits über 10 Jahre zurück, jedoch gab es in der Zwischenzeit keinen Durchbruch, was die Aufklärung der chemischen Mechanismen zur Trübungsbildung anbelangt.

1.2.1. Trübungsrelevante Bierinhaltsstoffe

Der Wissensstand zu Biertrübung wird nach wie vor kontrovers diskutiert und die kausale Ableitung eines Modells ist bislang noch nicht möglich. Daher sollen folgend die molekulare Zusammensetzung sowie trübungsauslösende Bierinhaltsstoffe näher betrachtet werden. Die erste sehr ausführliche Arbeit zur Zusammensetzung der kolloidalen Biertrübung wurde von Bengough bereits im Jahr 1955 publiziert. Darin beschreibt er schon sehr detailliert, wie komplex sich die Trübungspartikel zusammensetzen und machte nach Lösemittel-Fraktionierung quantitative Abschätzungen der Hauptbestandteile (Bengough & Harris, 1955). Die folgenden Jahrzehnte brachten umfassenderes Wissen über Trübungsbestandteile hervor, wie beispielsweise in den Arbeiten zu hoch- und niedermolekularen Trübungsbildnern von Asano näher beschrieben (Asano *et al.*, 1982; Asano *et al.*, 1984). Dennoch stellt sich nach wie vor die Kernfrage nach den ursächlich trübungsauslösenden Substanzen und den trübungsbeeinflussenden physikochemischen Parametern. Denn wie mehrfach gezeigt wurde, sind viele der in großen Quantitäten nachgewiesenen Trübungsinhaltsstoffe oft nicht direkt, oder zumindest nicht isoliert, für eine Trübungsbildung verantwortlich. Demnach kann von der Quantität nicht zwingend, oder nur bedingt, auf die Trübungseigenschaft eines Analyten geschlossen werden. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Ursachenforschung, also darauf, welche Substanzen als Initiatoren der unerwünschten Biertrübung gelten. Als Grundlage soll daher im Folgenden ein Überblick über die bisher publizierten Arbeiten im Zusammenhang mit Trübungsbildung in Bier gegeben und diese Arbeiten diskutiert werden.

1.2.1.1. Proteine

Proteine werden nach aktuellem Wissensstand eng mit der sensorischen Qualität von Bier und insbesondere der kolloidalen Stabilität in Verbindung gebracht. Sie gelten, wie folgend eingehend erläutert wird, als Hauptbestandteile der Biertrübung und einigen Proteinen bzw. Proteinklassen werden trübungsfördernde Eigenschaften zugeschrieben.

Proteingehalt der Biertrübung und trübungsaktive Proteinfractionen

Wie eingangs erwähnt, geht die erste sehr umfassende chemische Analyse zur Zusammensetzung der Biertrübung auf Bengough zurück, der größere Mengen Niederschlag aus Bier isolierte und einer Lösemittelfraktionierung unterzog. Anhand des Stickstoffgehalts und Umrechnung nach Kjeldahl wies er in Trübungen aus unterschiedlichen untergärigen Bieren hohe Gehalte an proteinischem Material nach und bezifferte die Proteingehalte auf 44 % bis 59 % (Bengough & Harris, 1955). Belleau wies mittels Mikro-Kjeldahl-Methode bis zu 34 % Proteinanteil in der Trübung nach (Belleau & Dadic, 1981).

1979 untersuchte Nadzeyka den Zusammenhang zwischen dem Gesamtproteingehalt von drei Bierfraktionen mit unterschiedlichen Molekulargewichten (MW 13 500 – 35 000 Da, 35 000 – 75 000 Da und >75 000 Da) in 7 Bieren. Für alle drei Fraktionen fand er positive Korrelationen mit der Trübungsneigung der Biere. Je größer der Anteil an hochmolekularen Substanzen war, umso stärker ausgeprägt war der Eintritt der Kälte-trübung. Über alle Fraktionen hinweg fand er zwar keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Gesamt-Aminosäurezusammensetzung der Proteinfractionen und der Trübungsneigung, bei Betrachtung der einzelnen Fraktionen jedoch, erwiesen sich statistisch Alanin, Tyrosin und Prolin als Einflussfaktoren (Nadzeyka *et al.*, 1979). Allerdings ist die geringe Stichprobengröße und damit die eventuelle Überinterpretation der Daten kritisch zu betrachten.

Hordeine

In späteren Arbeiten wurde immer detaillierter auf die molekulare Zusammensetzung von Proteinfractionen eingegangen. Die Arbeit von Asano aus dem Jahr 1982 zählt zu den meistzitierten unter den die Biertrübung betreffenden Publikationen. Er beschreibt die nach mehrstufigen Isolierungsschritten erhaltenen trübungsaktiven Proteinfractionen als „Proteine I, II, III und IV“ mit Molekulargewichten zwischen 1000 und 40000 kDa sowie hohen Prolingehalten. Aus dieser Beobachtung schloss er, dass es sich bei den trübungsaktiven Proteinen hauptsächlich um die prolinreichen Hordeine der Gerste handeln muss (Asano *et al.*, 1982). Da seine Arbeit für diese bis heute gängige Annahme maßgeblich ist, soll sie an dieser Stelle etwas ausführlicher betrachtet und in einigen Punkten hinterfragt werden. Asano fraktionierte über mehrere Stufen (Ultrafiltration, Präzipitation mit Ammoniumsulfat, Ionenaustauschchromatographie und Gelchromatographie), wonach bereits die Annahme gerechtfertigt ist, ob die proteinischen Bierbestandteile danach noch in ihrer nativen Form vorliegen und ob ohnehin nur die stabilsten Peptide und Proteine solcherlei Aufarbeitungen überdauern. Zur Indikation der Trübungsaktivität der gewonnenen Fraktionen versetzte er diese mit Polyphenolen und erhitzte die Protein-Polyphenol-Lösungen auf 100 °C, was wiederum stark von üblichen Lagerungsbedingungen abweicht. Es ist anzunehmen, dass nach einer gewissen Erhitzungsdauer die meisten Proteine unter diesen Umständen auch ohne die Anwesenheit von Polyphenolen denaturieren und ggf. präzipitieren. Insgesamt sollte hinterfragt werden, ob die Ergebnisse angesichts der stark artifizialen Bedingungen geeignet sind, um den natürlichen Trübungsprozess abzubilden.

Auch Lopez und Edens untersuchten den Einfluss prolinreicher Proteine auf die Trübungsbildung (Lopez & Edens, 2005). Sie versetzten eine Gliadin-Fraktion aus Weizen vor der Polyphenolzugabe mit Endoprotease aus *Aspergillus*, woraufhin sie eine verminderte

Trübungsausbildung beobachteten. Ebenso verhielt es sich für Enzym-behandelte Biere, denen sie ebenfalls eine verbesserte Lagerfähigkeit attestierten. Als Grund führten sie die spezifischen Spaltstellen der Endoprotease an, welche bevorzugt nach Prolin schneidet. In Kombination mit der Annahme, dass trübungsaktive Proteine prolinreiche Proteine sind, schlossen sie aus diesem Experiment, dass die Endoprotease spezifisch trübungsaktive Proteine hydrolysiert. Allerdings untermauerten sie diese These nicht mit Proteomik-Studien aus denen hervorgeht, welche Proteine exakt degradiert werden. Daher ist aus der Studie nicht die Trübungsaktivität spezifischer Proteine ableitbar, da die Endoprotease ungezielt alle zugänglichen Peptide und Proteine spaltet, allerdings zeigten sie den allgemeinen Einfluss von Proteinen auf die Trübungsneigung.

Siebert zählt ebenfalls zu den meistzitierten Autoren zum Thema Bierstabilität. Er greift die Veröffentlichungen von Asano aus den Jahren 1980 und 1982 auf, in denen auch Unterschiede zwischen schaum- und trübungsaktiven Proteinen konstatiert wurden (Asano & Hashimoto, 1980; Asano *et al.*, 1982). Er bestätigte in seinen Arbeiten jeweils die Thesen von Asano und klassifiziert speziell die prolinreichen Proteine als trübungsverantwortlich. Jedoch basieren die in den Modellstudien eingesetzten Nachweisreaktionen für schaum- und trübungsaktive Proteine sowie trübungsaktive Polyphenole auf unspezifischen und bislang im Detail nicht aufgeklärten Reaktionsmechanismen zwischen den zu bestimmenden Analyten und Tanninen, Polyprolin oder Reagenzien des *Bradford*-Assays (Siebert & Lynn, 1997).

Die meisten Arbeiten auf dem Gebiet der Biertrübung bedienen sich Modellsystemen, wobei die Erkenntnisse oft direkt auf Bier projiziert werden. So wurde als trübungsaktives Protein meist Hordein in Form eines Malzextrakts, als nicht trübungsaktives Protein Lysozym oder bovines Serumalbumin (BSA), als trübungsaktives Polyphenol Tannin und als nicht trübungsaktives Polyphenol Epicatechin eingesetzt. Auch Reaktionen zwischen Polyprolin und Flavanolen sowie Modellsysteme basierend auf Casein und Catechin bzw. Casein und Stärke wurden untersucht, um die Biertrübungsbildung besser zu verstehen (Eagles & Wakeman, 2002; Siebert *et al.*, 1996a; Siebert & Lynn, 1997; Siebert & Lynn, 1998; Siebert & Lynn, 2000, 2003; Siebert, 2006; Yang & Siebert, 2001). Diese exemplarisch erwähnten Modellsysteme weisen jedoch erhebliche Entfernungen zur realen Matrix Bier auf. Trotzdem wurden Erkenntnisse daraus direkt auf Bier übertragen, weshalb Diskrepanzen zwischen den vereinfachten Modellen und einer komplexen Realprobe bedacht werden sollten.

Dass Rückschlüsse von Modellsystemen auf reale Systeme irreführend sein können, zeigte unter anderem die Arbeit von Schmidt zu Teegetränken mit Milchzusätzen (Schmidt, 2012). Sie führte ebenfalls Modellexperimente mit Polyprolin durch, zeigte aber auch, dass die

Bindungsaffinität nativer Proteine (Mucin, Caseine, Lactoglobuline, Lysozym und Pepsin) an (-)-Epigallocatechin-3-gallat nicht mit deren Prolingehalt korreliert. Im Zuge dessen führte sie an, dass die Struktur des Liganden weitaus wichtiger sei als die Struktur bzw. die Aminosäurezusammensetzung der Proteine. Nichtsdestotrotz wird nach wie vor an Hordeinen und allgemein prolinreichen Polypeptiden und deren trübungsaktivem Potential festgehalten. Demgegenüber hinterfragen neuere Arbeiten diesen Aspekt kritisch.

Modernere und sensitivere Methoden der Proteomik ermöglichen immer genauere und gezieltere Einblicke in das Proteom der Biertrübung. So wurde nach und nach auch der Einfluss einzelner Proteine und Peptide und nicht mehr nur der Einfluss ganzer Proteinfractionen oder -extrakte diskutiert. *Limure et al.* verglichen vier unterschiedliche Biere sowie deren Trübungen hinsichtlich der Proteinzusammensetzungen mittels Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS. Ihr Fokus lag dabei auf der Untersuchung des Einflusses der Silika-Stabilisierung auf das Proteom sowie die kolloidale Stabilität. Sie konnten zwar erneut feststellen, dass Silika-behandelte Biere nach dem durchgeführten Forcierungstest stabiler sind, jedoch stellten sie die These, dass hauptsächlich prolinreiche Hordeine präzipitieren, infrage. Sie zeigten, dass der Prolingehalt der isolierten Trübungen stark variierte (zwischen 5,6 – 27,9 mol%) und kamen zu dem Schluss, dass neben Hordeinen auch andere Proteine maßgeblich an der Trübungsbildung beteiligt sein müssen. Außerdem zeigten sie, dass die Proteine Z4 und Z7 stark an Silika haften, LTP1, BDAI-1, CMe und CMb hingegen nicht. Sie stellten die These auf, dass Hordeine eventuell initial Trübungspartikel ausbilden, die in Trübung stark angereicherten Proteine BDAI-1, CMe und CMb aber wichtige Wachstumsfaktoren der Kolloide darstellen (*Limure et al.*, 2009).

Jin et al. führten Proteomik-Studien durch und verfolgten die Veränderungen der Hordeine über den Brauprozess. Sie fanden heraus, dass ein Großteil der Hordeine den Brauprozess nicht oder nicht unverändert überdauert und dass nur ein geringer Anteil der verbleibenden Hordeine (B und γ 3) in Biertrübung nachweisbar ist. Sie diskutierten, dass die verhältnismäßig prolinreichen Speicherproteine eventuell weniger bedeutend für die Trübungsbildung sein könnten als bislang angenommen (*Jin et al.*, 2011). *Schulte et al.* konnten in modernen Proteomik-Studien ebenfalls feststellen, dass Prolamine eine untergeordnetere Rolle bei der Trübungsbildung einnehmen könnten, als bisher angenommen. Sie verglichen das Proteom von frischem und gealtertem Bier sowie der daraus nach 5 Jahren Lagerungszeit gewonnenen Trübung nach Deglykierung. Aus der diskutierten Proteingruppe konnten sie lediglich D-Hordein nachweisen und auch die Prolingehaltsbestimmung unterstrich ihre Hypothese über

die Wichtigkeit der Hordeine, da sie nur geringe Mengen an Prolin in der Trübung feststellten (Schulte *et al.*, 2016).

Lipidtransferproteine, Protein Z und Trypsininhibitoren

Lipidtransferproteine (LTP) und Protein Z wurden in verschiedenen Isoformen bereits ausgiebig als majore Proteine in Bier (Curioni *et al.*, 1995; Fasoli *et al.*, 2010; Hejgaard & Kaersgaard, 1983; Imure *et al.*, 2010; Imure & Sato, 2013; Sun *et al.*, 2019) und in Biertrübung beschrieben (Jin *et al.*, 2011, 2012; Schulte *et al.*, 2016). Schulte *et al.* zeigten mit Hilfe eines Massenspektrometrie-basierten Proteomik-Ansatzes durch einen Vergleich von frischem und gealtertem Bier und der korrespondierenden Trübung, dass sich in Biertrübung hauptsächlich die Proteine 3a, BDAI-1, Bwiph, CMb, CMe, LTP1 und Z4 anreichern (Schulte *et al.*, 2016). Jongberg *et al.* vermuteten Bindungen zwischen LTP1 und diversen Polyphenolen, welche sie allerdings nur aus Konzentrationsveränderungen der Polyphenole schlossen. Sie zeigten keine direkten Messungen der diskutierten Komplexe, um die Bindungen zwischen Proteinen und Polyphenolen zu bestätigen (Jongberg *et al.*, 2020).

Robinson *et al.* führten ausführliche Studien zu BTI-CMe (*barley trypsin inhibitor of the chloroform/methanol type*) durch. Sie fanden, dass Biere, die aus einer Gerstenvarietät gebraut wurden, welche dieses Protein nicht aufweist, stabiler sind als jene Biere, welche die Proteinbande mit ca. 12 kDa zeigen und schlossen hieraus auf die Trübungsaktivität von BTI-CMe. Allerdings basiert die angeführte Argumentationskette auf der Annahme, dass an Silika adsorbierte Proteine pauschal trübungsaktiv sind. Außerdem verglichen sie Biere, die aus unterschiedlichen Gersten gebraut wurden, wobei es sich letztlich um relativ unterschiedliche Produkte handeln dürfte (Robinson *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2007). Studien von Ye *et al.* untermauerten diese Ergebnisse. Sie exprimierten BTI-CMe *in vitro* und dotierten es nach Isolierung aus dem *E. coli*-Lysat und Aufreinigung zu Bier. Dabei stellten sie eine erhöhte Trübungsbildung in den BTI-CMe-dotierten Bieren im Vergleich zur Referenz fest (Ye *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2014). Sie zeigten damit allerdings nur eine Momentaufnahme, da nach der Dotierung keine Equilibrierungszeiten eingehalten und die Trübung direkt gemessen wurde. Damit kann zunächst nicht geklärt werden, ob es sich um Solubilisierungseffekte handelt, oder tatsächlich um den Einfluss des Proteins auf die Trübungsbildung durch Wechselwirkungen mit anderen Bierkomponenten. Um derlei Artefakte ausschließen zu können, wäre ein Forcierungsansatz über einen längeren Zeitraum nötig gewesen.

Trotz der Gegensätzlichkeit vieler Forschungsarbeiten lässt sich dennoch zusammenfassend festhalten, dass Proteine sowohl in quantitativer Hinsicht als auch bezüglich ihrer

Trübungsaktivität einen wichtigen und ausschlaggebenden Faktor bei der Trübungsbildung darstellen.

1.2.1.2. Kohlenhydrate

Die Quantifizierung von Kohlenhydraten in komplexen Matrices stellt seit jeher eine analytische Herausforderung dar. Die Schwierigkeiten bei der akkuraten Quantifizierung, insbesondere von Polysacchariden, aufgrund ihrer Komplexität und Diversität sowie der unterschiedlichen chemischen Stabilitäten, spiegeln sich auch bei der Biertrübung wider. Während Bengough einen Kohlenhydratanteil von 2 – 4 % nachwies, veröffentlichten Schulte *et al.* Kohlenhydratgehalte in Trübungen aus unterschiedlichen Bieren zwischen 15 – 23 % (Bengough & Harris, 1955; Schulte *et al.*, 2016). Damit könnten Kohlenhydrate zwar einen gewichtigen Anteil der Trübungspartikel darstellen, ihr direkter Einfluss auf die Trübungsbildung wird heute allerdings als untergeordnet angenommen.

Polysaccharide

Es wurden Studien zum Einfluss von Polysacchariden auf die Trübungsbildung auf Basis von Wein und Modellsystemen durchgeführt, deren Übertragbarkeit auf Bier nur bedingt gegeben ist. Als Beispiele seien an dieser Stelle Modelle auf Basis von Gallussäure-basierten Polyphenolen bzw. galloylierten Kohlenhydraten (z.B. Tannine) und für Bier minder relevanten Polysacchariden, wie Galactomannane, Gummi Arabicum oder Pektin genannt (Luck *et al.*, 1994; McManus *et al.*, 1985). Auch wurden Fraktions-, Rekombinations- und Dotierungsexperimente durchgeführt, aus denen abgeleitet wurde, dass Polysaccharide keinen maßgeblichen Einfluss auf die Trübungsbildung oder deren Intensität zu haben scheinen (Gazzola *et al.*, 2012; Jaeckels *et al.*, 2016; Sommer *et al.*, 2019). Einen deutlich größeren Einfluss als die Polysaccharidkonzentration zeigten der pH-Wert und die Ionenstärke der untersuchten Matrices (Dufrechou *et al.*, 2015). Der Einfluss von Polysacchariden auf Trübungsneigung von Bier kann damit als bislang geringfügig erforscht eingestuft werden.

Mono-, Di- und Oligosaccharide

Es wird bereits seit längerem diskutiert, dass trübungsaktive Proteine im Brauprozess posttranslationalen Modifikationen unterliegen. Moderne Proteomikstudien zeigten, dass Trübungsproteine tatsächlich in hohem Maße glykiert vorliegen. Basierend auf diesen Ergebnissen können begründete Annahmen gemacht werden, dass Reaktionen von Proteinen und Kohlenhydraten zwar einen indirekten, aber dennoch bedeutsamen Einfluss auf die Trübungsbildung haben könnten. Durch chemische Modifikationen werden hydrophobe

Proteine, wie LTPs, in besser lösliche und chemisch stabilere Formen überführt, welche den Brauprozess besser überdauern und ins fertige Produkt gelangen können. Dort wirken sie dann wiederum als kritischer Faktor hinsichtlich der kolloidalen Stabilität des Bieres (Schulte *et al.*, 2016; Schulz *et al.*, 2018). Ebenso können *Maillard*-Reaktionen, z.B. zwischen Monosacchariden und Proteinen, dazu beitragen, dass Metalle durch die entstehenden Maillardprodukte (MRPs) besser komplexiert und der negative Einfluss der Ionen auf die Bierqualität dadurch verringert wird (Oñate-jaén *et al.*, 2006).

Zusammenfassend konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden, ob Kohlenhydrate und speziell Polysaccharide tatsächlich einen maßgeblichen, chemischen Einfluss auf die Trübungsbildung haben, oder ob sie bei stattfindenden Präzipitationen lediglich mitgerissen werden, was zu höheren Trübungswerten führt. Basierend auf den heute vorliegenden Forschungsergebnissen kann die Rolle der Polysaccharide für die Trübungsbildung aber wohl als untergeordnet und deren Reaktionsvermögen als nicht ausschlaggebend eingestuft werden, wobei der Kohlenhydratgehalt von Trübungspartikeln dennoch teils erheblich zu sein scheint. Dahingegen könnten niedermolekulare Kohlenhydrate wichtige Proteinmodulatoren darstellen.

1.2.1.3. Metallionen

In seinen ausführlichen Studien zur Trübungszusammensetzung berichtete Bengough bereits über die Anreicherung der Übergangsmetalle Kupfer (**Cu**), Zink (**Zn**) und Eisen (**Fe**) in Biertrübung (Bengough & Harris, 1955). Auch Chapon untersuchte die Zusammensetzung der Trübung hinsichtlich der Metallionen. Er beschrieb 0,7 – 3 % Asche in der Trockenmasse der Trübung, die Anreicherung von **Cu**, **Fe**, Calcium (**Ca**) und Magnesium (**Mg**) und außerdem, dass die relativen Verhältnisse der Ionen im Bier nicht den quantitativen Verhältnissen in der Trübung entsprechen, was auf eine spezifische Anreicherung einiger Elemente hindeute (Chapon, 1965).

Metalle wurden auch in neueren Studien vielfach mit unterschiedlichen unerwünschten Qualitätsminderungen in Verbindung gebracht. Zufall *et al.* untersuchten den Einfluss von **Cu**, **Fe** und Mangan (**Mn**), indem sie während des Brauprozesses zu verschiedenen Zeitpunkten Metallionen zusetzten. Sie kamen zu dem Schluss, dass **Fe** und **Cu** bereits während des Brauprozesses in großen Mengen abgeschieden werden (Heißtrubabtrennung und Fermentationsabsatz). **Mn** hingegen überdauere den Brauprozess in größeren Mengen, wodurch es letztlich ins Bier gelangt und einen signifikanten Einfluss auf die oxidative Stabilität

hat (Zufall & Tyrell, 2008). Wietstock zeigte kürzlich, dass der mengenmäßig größte Eintrag von Metallen durch das Malz erfolgt, wobei Hopfen ebenfalls verhältnismäßig große Mengen an Metallen, insbesondere **Fe** und **Cu** aufweist (Wietstock *et al.*, 2018). Dies könnte für die Stabilität kaltgehopfter oder hopfengestopfter Biere von Bedeutung sein.

Fenton- und Fenton-ähnliche Reaktionen und Haber-Weiss-Zyklus

Nachdem nahezu alle Qualitätsparameter mit dem Ionengehalt und der Verfügbarkeit von Metallionen im Bier in Verbindung gebracht werden, wird deren Rolle bei der Trübungsbildung chemisch zumeist auf deren redoxaktives Potential zurückgeführt. Speziell den Übergangsmetallen **Fe** und **Cu** wird ein trübungsbeeinflussender Charakter im Zusammenhang mit der durch sie katalysierten Oxidation von Polyphenolen und/oder Proteinen attestiert (Kaneda *et al.*, 1990).

Die bekannteste und am meisten diskutierte Reaktion, die oxidative Schäden in organischen Matrices hervorrufen kann, ist die *Fenton*-Reaktion (Fenton, 1894). Fenton erkannte, dass **Fe(II)** Peroxide reaktiv spalten kann, wodurch es selbst zu **Fe(III)** oxidiert wird.



Gleichung 1: Reaktionsgleichung der Fenton-Reaktion.

An die *Fenton*-Reaktion schließt sich eine Radikalkettenreaktion, der sogenannte *Haber-Weiss*-Zyklus an. Die im Zuge der *Fenton/Haber-Weiss*-Reaktion entstehenden Radikale, insbesondere das hochreaktive Hydroxylradikal, sind starke Oxidantien und können beispielsweise Sekundärmetaboliten oder Proteine oxidieren und so biologische Matrices zerstören. Außerdem kann die Radikalbildung im Zuge der sogenannten *photo-Fenton*-Reaktion bei Wellenlängen im UV-Bereich massiv verstärkt werden (Ruppert *et al.*, 1993). Dies kann die Lichtempfindlichkeit von Bier erklären, welches unter Sonneneinstrahlung ebenfalls trüb wird und daher vorzugsweise in Braunglasflaschen oder andere UV-Licht-undurchlässige Materialien abgefüllt werden sollte. **Cu** und **Mn** weisen ebenfalls ein redoxchemisches Potential auf und können Spaltungen von Peroxiden verursachen, was als *Fenton*-ähnliche Reaktion bezeichnet wird. Die Übergangsmetalle **Fe**, **Cu** und **Mn** üben durch ihr Redoxpotential damit maßgeblichen Einfluss auf wichtige Qualitätsparameter des Bieres aus und können unter anderem die Trübungsstabilität beeinträchtigen. Die dabei im Bier ausgelösten Reaktionen sind auf chemischer Ebene allerdings noch weitgehend ungeklärt. Zudem existieren noch nicht viele Untersuchungen, die gezielt den Einfluss des Metallgehalts auf die kolloidale Stabilität des Bieres behandeln.

1.2.1.4. Sekundärmetabolite

Niedermolekulare Stoffwechselprodukte, welche nicht dem Primärstoffwechsel, also dem Erhalt, dem Wachstum oder der Verbreitung zugewiesen werden, werden als Sekundärmetabolite bezeichnet. Diese können in vielen Organismen sehr spezielle Funktionen, wie die gezielte Abwehr von Fraßfeinden oder die Regulierung des Hormonhaushaltes einnehmen und dienen in manchen Fällen zudem als Markersubstanzen, da sie einzigartig für eine bestimmte Lebensform sind, wie beispielsweise Hopfenbittersäuren. Einige der Sekundärmetabolite aus Gerste, Hopfen und Hefe werden als trübungsbeeinflussend diskutiert und sollen daher im Folgenden näher betrachtet werden.

Hopfenbitterstoffe

Abbildung 4 gibt zunächst einen Überblick über die Strukturen und Nomenklatur der Hopfenbittersäuren.

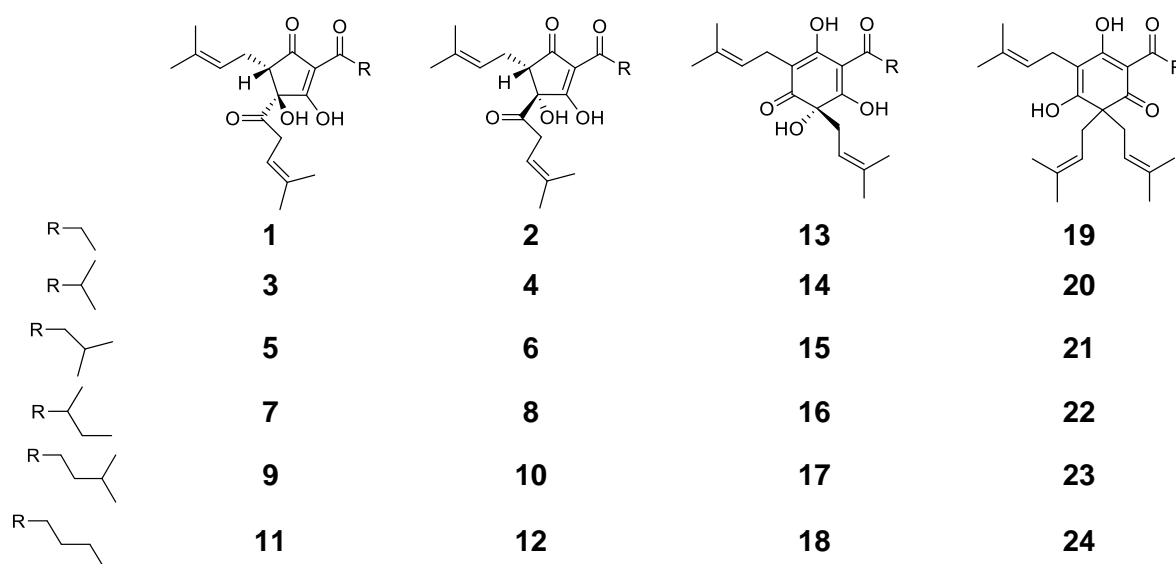


Abbildung 4: Übersicht über die Strukturen der *iso-α*-Säuren *trans*-Isoposthumulon (1), *cis*-Isoposthumulon (2), *trans*-Isocohumulon (3), *cis*-Isocohumulon (4), *trans*-Isohumulon (5), *cis*-Isohumulon (6), *trans*-Isoadhumulon (7), *cis*-Isoadhumulon (8), *trans*-Isoprehumulon (9), *cis*-Isoprehumulon (10), *trans*-Isoadprehumulon (11) und *cis*-Isoadprehumulon (12), die α -Säuren Posthumulon (13), Cohumulon (14), Humulon (15), Adhumulon (16) Prehumulon (17) und Adprehumulon (18) sowie die β -Säuren Postlupulon (19) Colupulon (20), Lupulon (21), Adlupulon (22), Prelupulon (23) und Adprelupulon (24). (Intelmann *et al.*, 2009)

Zur Rolle der Hopfenbittersäuren bei der Trübungsbildung ist bislang wenig bekannt. Loch-Ahring *et al.* konnten mittels LC-MS-Analysen erstmals eindeutig Hopfensäuren in Biertrübung nachweisen. Sie beschrieben α - und β -Säuren (Humulon, Cohumulon, Adhumulon; Lupulon,

Colupulon, Adlupulon) in beträchtlichen Konzentrationen in der Kälte-trübung, brachten diese jedoch nicht mit der Trübungsneigung in Verbindung (Loch-Ahring *et al.*, 2008). Evans untersuchte unter anderem den Einfluss von α -Säuren auf die Schaumbildung und stellte hier schaumpositive Effekte aufgrund der Wechselwirkung mit Proteinen fest. Da die Schaumproteine auch in der Trübung nachweisbar sind, postulierte er, dass es nicht verwunderlich sei, wenn man diese Hopfenstoffe auch in der Trübung nachweisen könne. α -Säuren seien aber nicht trübungsauslösend oder fördernd, sondern lediglich stark an das präzipitierende proteinische Material anhaftend (Evans *et al.*, 2011). Wietstock fand, dass α -, β - und *iso*- α -Säuren stark mit Eisen- und Kupferionen wechselwirken und in höheren Konzentrationen sogar Niederschläge von dunkler Farbe bilden. Da die Hopfenbitterstoffe nur mit Fe(III) präzipitierten, nicht aber mit Fe(II), postulierte er einen Mechanismus, in dem Fe(III) als Zentralatom dreifach koordiniert von α -Säuren vorliegt (Wietstock *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse könnten entgegen der bisherigen Meinung einen Anhaltspunkt dafür geben, dass Hopfensäuren einen Impuls zur Trübungsbildung leisten könnten. Außerdem könnten sie negativ auf die Bierstabilität wirkende Übergangsmetallionen komplexieren und so deren schadhafte Wirkungen inhibieren oder zumindest verlangsamen.

Polyphenole

In der Diskussion um die chemisch zugrundeliegenden Mechanismen der Biertrübungsbildung stehen Protein-Polyphenol-Wechselwirkungen seit Jahrzehnten im Fokus. Wie eingangs bereits erwähnt, werden Polyphenole durch ihre Affinität zur Interaktion mit Proteinen für die initiale Trübungsbildung verantwortlich gemacht, wobei brautechnologisch versucht wird, die Polyphenolgehalte in Bier z.B. unter Einsatz von PVPP zu regulieren. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Stabilisierung mit PVPP die Gesamtpolyphenolgehalte im Bier und auch die Trübungsbildung reduziert (McMurrough *et al.*, 1992; McMurrough *et al.*, 1996; Mikyška *et al.*, 2002; Mikyška *et al.*, 2019). Mittlerweile wird der Einfluss der Polyphenole auf die Trübungsbildung aber in einer nicht unerheblichen Anzahl an Publikationen kritisch hinterfragt und oft als weniger bedeutend betrachtet, als es viele Autoren bislang beschrieben. Zunächst soll ein Überblick über die diversen chemischen Strukturen der stark diskutierten Stoffgruppe gegeben werden, bevor Ergebnisse zahlreicher Studien zu einem wissenschaftlichen *Status quo* zusammengefasst werden. Abbildung 5 fasst die nachfolgend diskutierten Strukturen von Mono-, Di- und Oligomeren sowie deren Nomenklatur zusammen.

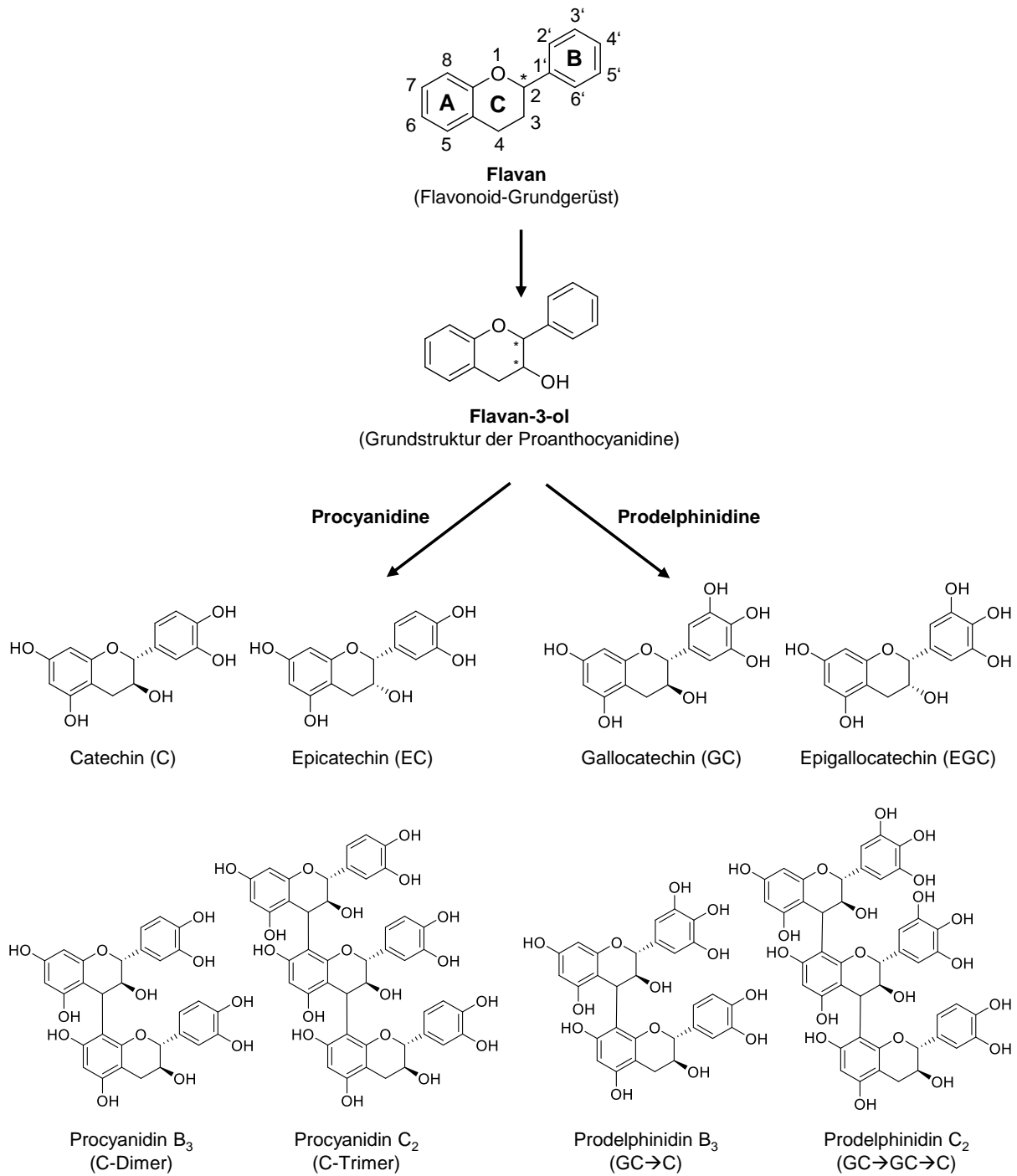


Abbildung 5: Übersicht über die in Verbindung mit Biertrübung diskutierte Polyphenole. (Papagiannopoulos, 2008)

Die aufgrund der Diversität polyphenolischer Strukturen recht komplizierte Nomenklatur sollte strikt befolgt werden. Jedoch kommt es in der Literatur sowie im allgemeinen Sprachgebrauch gelegentlich zur Durchmischung einiger Begrifflichkeiten bzw. Inkonsequenz bei der Einhaltung der Hierarchie bei der Bezeichnung von polyphenolischen Strukturklassen. Ein Beispiel ist der Begriff *Tannin*.

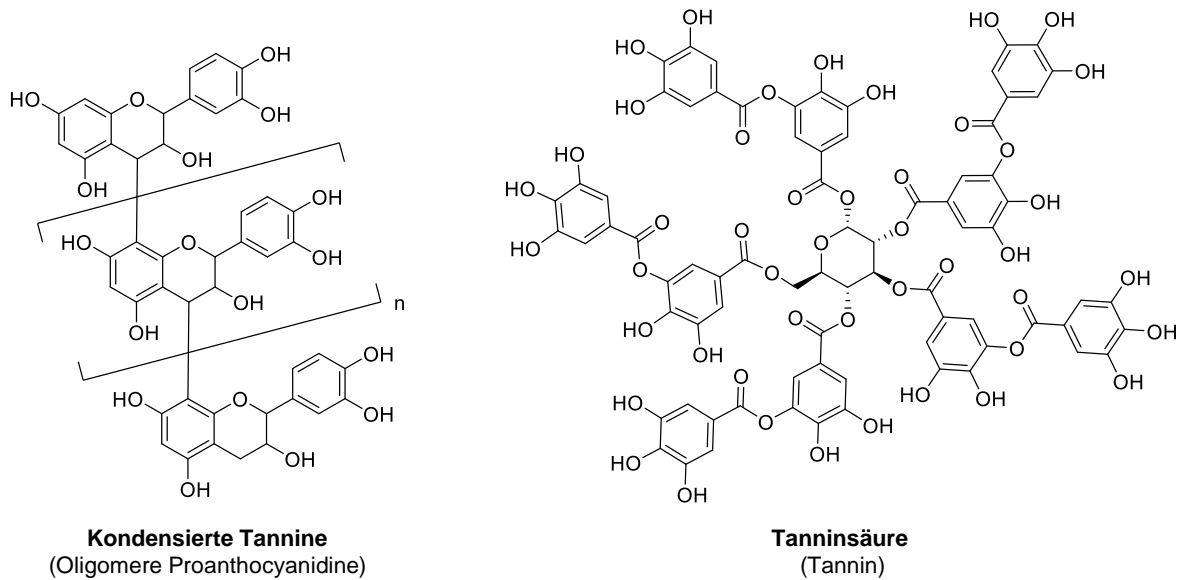


Abbildung 6: Struktur von kondensierten Tanninen (engl. *tannin(s)*), hier beispielhaft als Oligomer des (Epi-)Catechins dargestellt, und von Tanninsäure (engl. *tannic acid*), eine mehrfach galloylierte Glucoseeinheit, die im Deutschen auch unter der Bezeichnung *Tannin* geführt wird. Die Begrifflichkeiten können zu Verwechslungen zwischen den englischen (*tannin*) und deutschen (*Tannin*) Benennungen führen. (Nechepurenko *et al.*, 2009; Veisi *et al.*, 2019)

Während es sich bei den *kondensierten Tanninen* um Polymere von Proanthocyanidinen (z.B. (Epi-)Catechine oder (Epi-)Gallocatechine) handelt, beschreibt *Tannin* eigentlich die Substanz Tanninsäure, eine mehrfach galloylierte Glucose. Dennoch wird in der Literatur oft der Begriff *Tannin* äquivalent für oligomere Proanthocyanidine (engl. *tannin(s)*) verwendet und kann daher im Zusammenhang mit der Tanninsäure (engl. *tannic acid*) für Verwirrung sorgen.

Wie auch bei der Forschung um den Einfluss der Proteine gehen vielzitierte Arbeiten auf die Gruppe um Asano zurück. Er untersuchte in diesem Zusammenhang unter anderem den Einfluss von Catechinen. Nach der Forcierung einer Protein-Polyphenol-Lösung berechnete er nach Abtrennung der dabei entstandenen Trübung aus der Differenz von Catechin im ursprünglichen Bier und dem von der Trübung befreiten Überstand die Menge an proteingebundenem Catechin (Asano *et al.*, 1982). Catechin als Flavan-3-ol und Proanthocyanidine als Oligo- bzw. Polymere von Catechin weisen spezielle Affinität zu

trübungsaktivem Bierprotein auf, wobei die Trübungsaktivität umso höher ist, je höher der Polymerisierungsgrad der Polyphenole ist (Asano *et al.*, 1984). Später publizierte Asano weiterführende Experimente zum Einfluss von nieder- und höhermolekularen Polyphenolen auf die Ausbildung der Kältetrübung. Er stellte fest, dass höhermolekulare Polyphenole, wie Proanthocyanidin-Tetramere und -Pentamere sowie das Trimer Procyanidin C₂, ausgeprägte Wechselwirkungen mit Bierproteinen zeigen, welche zur Trübungsbildung führen. Die niedermolekularen Monomere Catechin und Epicatechin, ebenso wie deren Dimere Procyanidin B₃ und Prodelphinidin B₃ hingegen, entfalten erst nach einer kurzen Lagerungsdauer unter oxidativen Bedingungen (Luftsauerstoff) ein erhöhtes Trübungspotential. Hierbei beobachteten die Autoren für Catechin und Epicatechin sehr ähnliche Aktivitäten. Sie schlossen daraus, dass die *aktiven* Polymere, die im Brauprozess entstehen, bereits mit dem Heiß- und Kalttrub sowie dem Fermentationsabsatz ausgeschieden werden. Die weniger Protein-affinen Mono- und Dimere hingegen überdauern den Brauprozess und gelangen ins Bier, wo sie im Verlauf der Lagerung oxidiert und damit zu trübungsaktiven Polyphenolen *aktiviert* werden (Asano *et al.*, 1984). Auch McMurrrough stellte für oxidierte Polyphenole stärkere Trübungseigenschaften fest als für die nicht-oxidierten Formen (McMurrrough & Hennigan, 1984).

Delcour untersuchte ebenfalls den Einfluss von Flavanolen und Proanthocyanidinen auf die Trübungsbildung. Er verglich die Trübungsstabilität von Bieren, die aus einem Proanthocyanidin-freien Gerstenmalz gebraut wurden mit solchen, die aus einem regulären Malz gebraut wurden und stellte erhebliche Stabilitätsunterschiede fest (Delcour *et al.*, 1984a). Der Vergleich der beiden Biere sollte jedoch mit Vorsicht gezogen werden, da im Prinzip grundlegend verschiedene Biere aus unterschiedlichen Rohstoffen gebraut wurden. In weiteren Experimenten untermauerte er seine Befunde mit weiteren Brauversuchen, für die er erneut Bier aus derselben Proanthocyanidin-freien Gerstenvariante und einem Tannin-freien Hopfenextrakt braute, um so durch gezielte Dotierung einzelner Polyphenole deren Trübungseigenschaften bestimmen zu können. Speziell Catechin, Epicatechin, Procyanidin B₃ und B₆ sowie oligomere Procyanidine zeigten in seinen Experimenten einen entscheidenden Einfluss auf die Trübungsbildung, wobei entgegen der Arbeit von Asano Catechin als weniger trübungsaktiv als Epicatechin festgestellt wurde (Asano *et al.*, 1984; Delcour *et al.*, 1984b). Delcour untersuchte zudem den Einfluss der Hopfenpolyphenole und kam zu dem Ergebnis, dass diese ebenso trübungsaktiv wirken wie die des Malzes. Lediglich die Mengenunterschiede von verwendetem Malz und eingesetztem Hopfenprodukt führen letztlich dazu, dass den gerstenstämmigen Phenolen ein größerer Stellenwert zukommt. Qualitativ

spielt die Polyphenolquelle hinsichtlich der Trübungsaktivität jedoch keine Rolle (Delcour *et al.*, 1984a).

Kusche untersuchte die Kinetik der Trübungsbildung und korrelierte dabei den Abbau von Polyphenolen mit der Trübungsneigung von Xerogel[®]-behandelten Bieren. Zwar wurden für einige Polyphenole relativ gute Korrelationskoeffizienten aus deren Konzentrationsabnahme und der Trübungsneigung erzielt, allerdings verglich der Autor gleichzeitig mehrere Parameter. Er begründete seine Befunde mit den Einflüssen von Catechin, Epicatechin, nicht weiter spezifizierten monomeren und dimeren Flavan-3-olen und deren Summe sowie Procyanidin B₃ und Prodelphinidin B₃. Ebenso wie in Asanos Studien und entgegen denen von Delcour zeigten Catechin und Epicatechin in seinen Experimenten ein ähnliches Verhalten hinsichtlich ihrer Trübungsaktivität (Asano *et al.*, 1984; Delcour *et al.*, 1984b; Kusche & Geiger, 2007). Im Prinzip zeigte er, dass Xerogel[®]- bzw. PVPP-behandeltes Bier stabiler ist als die unbehandelte Referenz. Der kausale Zusammenhang zwischen den Polyphenolen und der Trübungsbildung fehlt allerdings. Die Auswirkungen der Stabilisation sind, wie bereits diskutiert, mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht nur auf die Veränderung der Polyphenolfraktion der Biere einzugrenzen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Bierpolyphenole in komplexen, weitgehend undefinierbaren Strukturen vorliegt, die sich mittels Thiolyse nicht spalten und identifizieren lassen (Callemien & Collin, 2008; Callemien *et al.*, 2008). Dies könnte bedeuten, dass neben den viel diskutierten und gut messbaren Catechinen sowie deren Polymeren auch noch andere, höher kondensierte und schwer zu analysierende Polyphenole an der Trübungsbildung beteiligt sind.

Während in anderen biologischen Matrices wie Wein und Speichel bereits Wechselwirkungen zwischen Polyphenolen und Prolin-reichen Proteinen mittels NMR- und MS-Studien untersucht wurden, fehlen für Bier derlei Forschungen noch weitgehend (Delius *et al.*, 2017; García-Estévez *et al.*, 2017; Luck *et al.*, 1994; Zimmermann *et al.*, 2019). Um das komplexe Zusammenspiel zwischen Proteinen und Polyphenolen zu vereinfachen und auf diesem Weg bessere Einblicke in die zugrunde liegenden Reaktionen zu gewinnen, wurden auch Modellstudien, z.B. mit bovinem Serumalbumin (Geng *et al.*, 2020) oder Caseinen (Aguíé-Béghin *et al.*, 2008) durchgeführt. Diese führten unter anderem zu der Erkenntnis, dass Epigallocatechin mit beta-Casein wechselwirkt, Epicatechin hingegen nicht. Daraus schlossen die Autoren, dass Wasserstoffbrücken von modifizierten Polyphenolen einen wichtigeren Stellenwert für etwaige Wechselwirkungen mit Proteinen einnehmen, als hydrophobe

Wechselwirkungen an den aromatischen Ringen (Aguié-Béghin *et al.*, 2008). Allerdings ist auch hier die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Matrix Bier nur bedingt möglich.

Wie bereits angesprochen, wurden unter Anwendung moderner Messtechniken immer mehr Forschungsarbeiten veröffentlicht, welche die Rolle der Polyphenole bei der Trübungsbildung infragestellen. So erkannten beispielsweise Ye *et al.* keine Korrelationen zwischen den Gesamtpolyphenolgehalten und den Trübungscharakteristika untersuchter Biere (Ye *et al.*, 2016). Papp *et al.* dotierten stabilisiertes Bier mit Catechin bzw. Ferulasäure und unterzogen es anschließend einer forcierten Alterung. Dieses Vorgehen brachte keine eindeutigen Ergebnisse über deren Einfluss auf die Trübungsstabilität hervor (Papp *et al.*, 2001). Loch-Ahring *et al.* konnten mittels neuesten LC-MS/MS-Analysen keine Proanthocyanidine in der Kälte-trübung nachweisen. In DMSO-Extrakten der isolierten Trübungspartikel fanden sie weder Monomere, noch Dimere oder Trimere von Polyphenolen (Loch-Ahring *et al.*, 2008). Sie stellten damit die These der Wechselwirkung von oxidierten oder kondensierten Flavan-3-olen mit Proteinen stichhaltig infrage. Auch Pöschl *et al.* konnten in ihren Untersuchungen keinen Einfluss von phenolischen Säuren, Isoxanthohumol, Hopfenbittersäuren oder Gerbstoffextrakten aus Hopfen auf die Trübungsneigung feststellen (Pöschl, 2009). Die angegebenen Arbeiten könnten somit wichtige Hinweise darauf geben, dass Stabilisierungen neben der Polyphenolzusammensetzung auch andere trübungsrelevante Parameter des Bieres verändern und die erhöhte Stabilität nicht zwangsläufig ausschließlich auf geringere Polyphenolgehalte zurückzuführen ist.

Viele der publizierten Arbeiten, welche die Rolle der Polyphenole in den Fokus der Trübungsbildung rücken, sind entweder bereits vor einigen Jahren durchgeführt worden, basieren auf Modellsystemen, die teils sehr weit von der Matrix Bier abweichen, oder bedienen sich Differenzanalysen ausgewählter Komponenten in frischem und gealtertem Bier. Ein Beispiel für letzteres ist die Arbeit von Jongberg. Aus Konzentrationsabnahmen verschiedener Polyphenole (Gallensäure, Hydroxyphenylmilchsäure, Salicylsäure, Chlorogensäure, Vanillinsäure, Epicatechin, Ferulasäure und Luteolin) nach forcierter Alterung schlossen sie darauf, dass diese Oxidations- und Polymerisationsreaktionen eingehen und dadurch nucleophile Angriffsstellen für reaktive Gruppen an Proteinseitenketten darstellen, wie z.B. Thiol- und Aminofunktionen (Jongberg *et al.*, 2020). Sie belegten aber weder die Bildung der Polymere, noch präsentierten sie Daten zu den vermuteten Bindungen zwischen Proteinen und Polyphenolen.

Zusammenfassend wird die Rolle der Polyphenole ebenso wie die Sinnhaftigkeit des PVPP-Einsatzes, auch unter ökonomischen sowie ökologischen Aspekten, nach wie vor in der Fachwelt kontrovers diskutiert.

1.2.1.5. Weitere trübungsbeeinflussende Parameter

Im Folgenden sollen ergänzend zu den oben im Detail diskutierten Stoffklassen noch weitere physiko-chemische Parameter dargestellt werden, welche die Trübungsbildung beeinflussen können. Einige dieser Parameter stehen in direktem oder indirektem Zusammenhang mit den bereits beschriebenen Substanzen.

Siebert brachte den Ethanolgehalt und den pH-Wert in einem Modell in einen allgemeinen Zusammenhang mit der Trübungsbildung, wie in Abbildung 7 dargestellt.

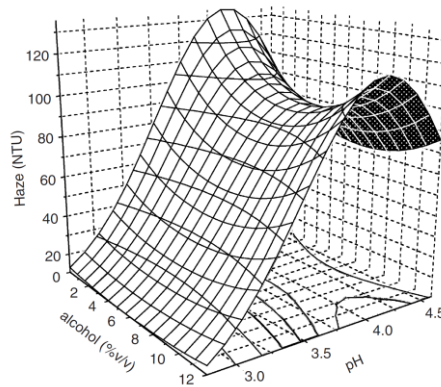


Abbildung 7: Response-Surface-Modell zum Zusammenhang von Ethanolgehalt und pH-Wert mit der Trübungsbildung in einem Modellsystem aus Gliadin und Tanninsäure. (Siebert *et al.*, 1996)

Bei der dargestellten Grafik muss beachtet werden, dass sie auf einem Modellsystem beruht, für das Gliadin und Tanninsäure eingesetzt wurden (Siebert *et al.*, 1996a). Die Abbildung zeigt für dieses System, dass die Trübungsbildung generell pH-Wert-abhängig zu sein scheint, in saurem Milieu praktisch nicht stattfindet und, dass Ethanol in biertypischen Mengen (um 5 Vol.-%) einen leicht stabilisierenden Effekt zeigt. Aber wie erwähnt, bezieht dieses Modell nur sehr wenige Parameter einer weitaus komplexeren Matrix ein, weswegen es lediglich als Anhaltspunkt dienen kann. Während bei diesem System die Lagerungstemperatur nicht variiert wurde, beschreibt Kusche außerdem, dass eine höhere Lagerungstemperatur zu verstärkter Trübungsbildung führt (Kusche & Geiger, 2007).

Der Einfluss von Sauerstoff auf die oxidative Schädigung wird grundsätzlich von der Fachwelt akzeptiert. Kuchel beschreibt in seinem Review die Rolle von Sauerstoff bei der negativen

Beeinflussung etwaiger Qualitätsparameter des Bieres, wie Aroma, Geschmack und Erscheinungsbild. Er stellt die These auf, dass bereits Mengen von >1 ppb O_2 dazu beitragen können, das Mindesthaltbarkeitsdatum des Produkts zu verringern. Würde man es schaffen, den Sauerstoffanteil auf $<0,1$ ppb zu reduzieren, würde sich das positiv auf die Haltbarkeit des Bieres auswirken (Kuchel *et al.*, 2006). Bamforth stellt allerdings die Frage, warum Bier, welches unter komplett anaeroben Bedingungen hergestellt wurde, trotzdem oxidativen Schaden nehme (Bamforth, 2000). Auch Robinson stellte bei seinen Forschungen fest, dass Bier, welches unter Stickstoffatmosphäre gebraut wurde, sogar schlechtere Stabilitätswerte aufwies als das unter Standardbedingungen gebraute Bier (Robinson *et al.*, 2004).

1.3. Trübungsmessung

Der Trübungsgrad einer Flüssigkeit hängt unter anderem von der Menge, Größe, Homogenität und Verteilung von Partikeln in der Suspension ab. Die quantitative Erfassung dieses sensorischen Qualitätsparameters erfolgt mit Hilfe von Trübungsmessgeräten. Hierbei kann grundsätzlich zwischen der *Turbidimetrie* und der *Nephelometrie* unterschieden werden. Die begrifflichen Feinheiten und die Verwendung der beiden Bezeichnungen verschwimmen im allgemeinen Sprachgebrauch oftmals und werden fälschlicherweise adäquat verwendet. In beiden Fällen handelt es sich um non-destruktive Analysen zur Bestimmung der Trübungsintensität mit Hilfe eines photometrischen Trübungsmessgerätes.

Bei der **Turbidimetrie** wird die Abschwächung eines linear durch eine Suspension geleiteten Lichtstrahls bestimmt. Diese Technik wird in der Regel verwendet, um stark getrübe Proben und solche, welche Partikel $> 1 \mu\text{m}$ aufweisen, zu analysieren (Bamforth, 2016; Narziß *et al.*, 2017). Die **Nephelometrie** hingegen bedient sich des *Tyndall*-Effekts, welcher bereits 1866 von John Tyndall beschrieben wurde. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, dass Kolloide in einer Suspension Licht streuen können (Remane & Reschetilowski, 2020). Daher wird bei der Nephelometrie die Intensität des Streulichts in bestimmten Winkeln zum einfallenden Lichtstrahl gemessen. Gebräuchlich ist hierbei die Messung der *Vorwärtsstreuung* in einem Winkel von $12^\circ - 35^\circ$, sowie die Messung der *Seitwärtsstreuung* in einem Winkel von 90° zum einfallenden Lichtstrahl (Bamforth, 2016; Narziß *et al.*, 2017).

Gemäß DIN EN ISO 7027:2016 wird in der vorliegenden Arbeit die Einheit NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*) verwendet. Diese weltweit harmonisierte Norm schreibt vor, dass die Wellenlänge des durch die Lichtquelle ausgesandten Lichts im Infrarotbereich von

860 ± 10 nm liegen muss und, dass das Streulicht mittels Photodetektoren in Winkeln von 12° und 90° zum eingestrandten Lichtstrahl gemessen wird (DIN EN ISO 7027-1:2016-11).

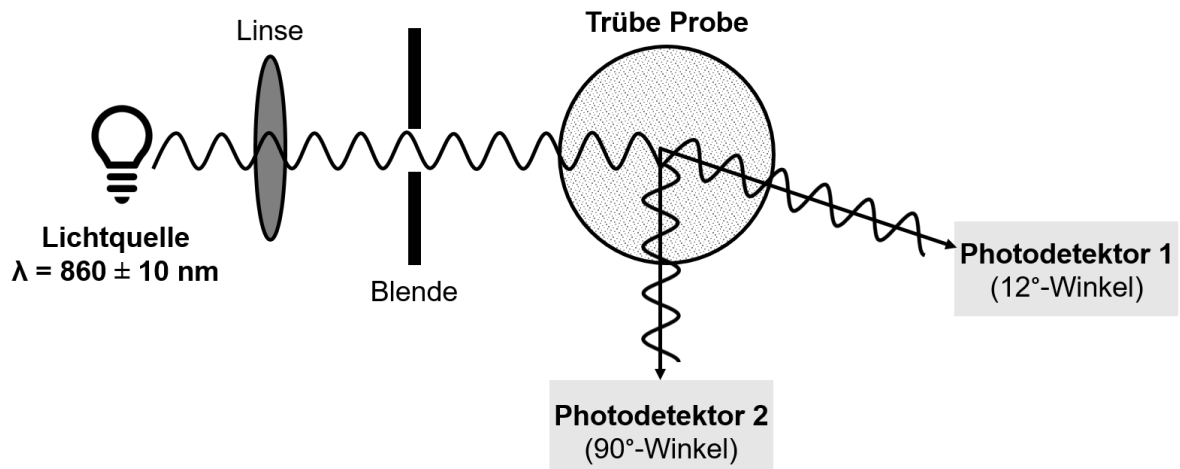


Abbildung 8: Strahlengang eines Nephelometers. Eingestrahktes Infrarotlicht der Wellenlänge 860 nm wird fokussiert und durch Kolloide in der Probe gestreut. Die Intensität des Streulichts wird in Winkeln von 12° und 90° zum einfallenden Lichtstrahl gemessen und dadurch der Trübheitsgrad der Probe bestimmt.

Bei einer Wellenlänge um 860 nm ist die photochemische Interferenz zwischen Probe und eingestrahktem Licht möglichst gering. Zwar steigt die Lichtstreuung mit kürzeren Wellenlängen, wodurch Messungen sensitiver würden, allerdings zeigen bei Wellenlängen im oder nahe des VIS-Bereichs vor allem farbige Proben deutliche Interferenzen, was wiederum das Grundrauschen nachteilig beeinflusst. Das eingestrahkte Licht würde zum Teil von der Probe absorbiert und das Messergebnis dadurch verfälscht. Neben der Einheit NTU finden auch noch andere Einheiten Anwendung, wie beispielsweise EBC (*European Brewery Convention*) und ASBC (*American Society of Brewing Chemists*) in der Brauwissenschaft oder FNU (*Formazine Nephelometric Units*) in der Wassertechnologie. Alle Einheiten lassen sich aber durch einfache Faktoranzwendung in NTU umrechnen (Narziß *et al.*, 2017; DIN EN ISO 7027-1:2016-11).

2. Problemstellung und Zielsetzung

Dem Qualitätsanspruch und der Erwartungshaltung der Konsumenten nachkommend, handelt es sich bei den untergärigen Biertypen Pilsener und Lager in der Regel um klare Getränke. Dabei kommt dem Trübheitsgrad eines Bieres ein mindestens ebenso großer Stellenwert zu, wie den anderen grundlegenden sensorischen Qualitätsparametern Farbe, Geschmack, Aroma und Schaumbildung. Allerdings kann die Trübung eines Bieres, im Gegensatz zu den anderen sensorischen Eindrücken, bereits vor der Öffnung einer Flasche beurteilt werden, was die Biertrübung zum primären Qualitätsmerkmal und zugleich zum limitierenden Faktor hinsichtlich der Mindesthaltbarkeit macht. Dennoch konnten die grundlegenden chemischen Vorgänge, die initial zu einer unerwünschten Trübungsbildung im Verlauf der Lagerung führen, bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden und sollten deshalb im Rahmen dieser Arbeit mit modernsten Analysemethoden weiterführend untersucht werden.

Neben alterungsbedingten Trübungen treten in seltenen Fällen auch Spontantrübungen auf, die sich binnen kurzer Zeit nach der Abfüllung und weit vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums einstellen. In beiden Fällen sind die zugrundeliegenden chemischen Interaktionen noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit sollte daher zunächst die molekulare Zusammensetzung von Trübungspartikeln aus unterschiedlichen untergärigen Bieren erarbeitet werden, um darauf aufbauend trübungsrelevante und insbesondere trübungsauslösende Bierinhaltsstoffe zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der als trübungsrelevant diskutierten Bierinhaltsstoffe für die Trübungsbildung auf molekularer Ebene detailliert untersucht werden, um darauf basierend mögliche Zusammenhänge zwischen den Einflüssen von Rohstoffen und Prozessparametern und dem Verhalten der trübungsaktiven Substanzen über den Brauprozess und im fertigen Produkt zu erschließen.

Hierzu sollten unter anderem moderne massenspektrometrische Methoden der Metabolomik und Proteomik in Kombination mit multivariaten Datenanalysen zum Einsatz kommen. In matrixnahen Modellsystemen sollte die Bieralterung simuliert und so gezielt der Einfluss einzelner Substanzen auf die Trübungsbildung untersucht werden. Die Identifizierung und Quantifizierung trübungsrelevanter Komponenten sollte den Grundstein für weitere Studien legen, um künftig Qualitätsparameter von Rohstoffen und die Einflüsse von Verarbeitungsprozessen auf die kolloidale Stabilität von Bier besser beurteilen zu können.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Unterschiedliche Trübungsneigungen kommerzieller Biere

Bisherige Arbeiten bedienten sich meist artifizierlicher Modellsysteme, um Mechanismen der Trübungsbildung in Bier zu untersuchen, wodurch gute Grundlagen geschaffen werden, aber zwangsläufig Diskriminierungen bei der Übertragung auf Realproben auftreten können. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit auf die brautechnologische Praxis so weit wie möglich zu gewährleisten, sollten die erhobenen Daten anhand von kommerziellen Bierproben geprüft werden. Hierzu musste zunächst eine praxisrelevante Einschätzung des Trübungsverhaltens unterschiedlicher Biere erfolgen, wofür eine Auswahl kommerziell erhältlicher Biere mit vergleichbarem Mindesthaltbarkeitsdatum auf deren kolloidale Stabilität hin untersucht wurde. Hierfür wurden 12 Pilsener Biere (**Biere 1-12**) und 12 Lagerbiere (**Biere 13-24**), wie unter 4.3. beschrieben, in Triplikaten einem Warm-Kalt-Zyklus, also einer forcierten Alterung unterzogen und deren Trübungsverhalten über einen Zeitraum von insgesamt 506 h analysiert. Die aus den regelmäßig vorgenommenen nephelometrischen Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen (0 °C und 25 °C) resultierenden Trübungsverlaufskurven, also die sich aus der Trübungsintensität über die Forcierungszeit ergebenden Funktionen, sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

Wie den Verläufen zu entnehmen ist, verhielten sich die 24 untersuchten Biere hinsichtlich der Kinetik der Trübungsbildung ähnlich, zeigten aber deutliche Unterschiede im Ausmaß der Trübungsintensität. Lediglich ein Pilsener (**10**) und ein Lagerbier (**16**) wichen im Trübungsverlauf der Gesamttrübung dahingehend ab, dass sie schon zu einem frühen Zeitpunkt eine vergleichsweise intensivere Gesamttrübung aufwiesen, wodurch sich die Anpassungskurven der **Biere 10** und **16** geometrisch von den Verläufen der anderen Bier unterschieden (siehe Abbildung 10). Die Differenz zwischen der Gesamttrübung und der Dauertrübung eines Bieres wird durch die Kältetrübung beschrieben (Gesamttrübung = Dauertrübung + Kältetrübung). Die Pilsener **Biere 1, 4, 5, 6** und **9** sowie das **Lagerbier 17** wiesen nur sehr schwache Gesamttrübungen auf und zeigten keine oder fast keine Dauertrübung, was auf eine geringe Ausprägung der Kältetrübung rückschließen lässt. Wohingegen sowohl bei den Pilsener **Bieren 7, 8** und **10** als auch bei den **Lagerbieren 18, 20, 22** und **24** sehr ausgeprägte Trübungseintritte zu beobachten waren.

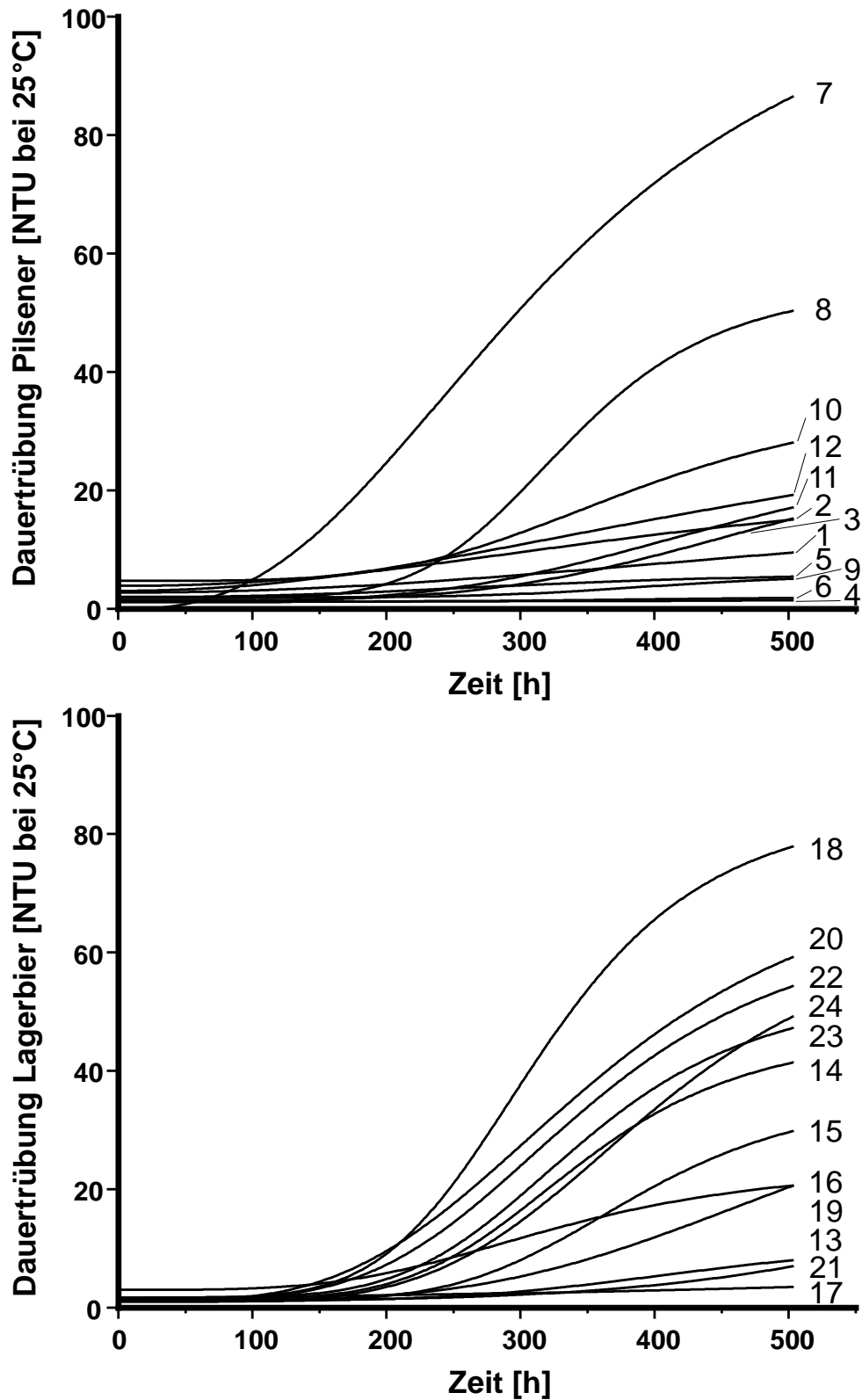


Abbildung 9: Trübungsverlaufskurven der Dauertrübung (Trübungsmessung bei 25 °C) von 12 Pilsener Bieren (Biere 1-12, oben) und 12 Lagerbieren (Biere 13-24, unten). Die Verlaufskurven entsprechen den polynomialen Regressionen durch die jeweiligen Datenpunkte ($n = 3$).

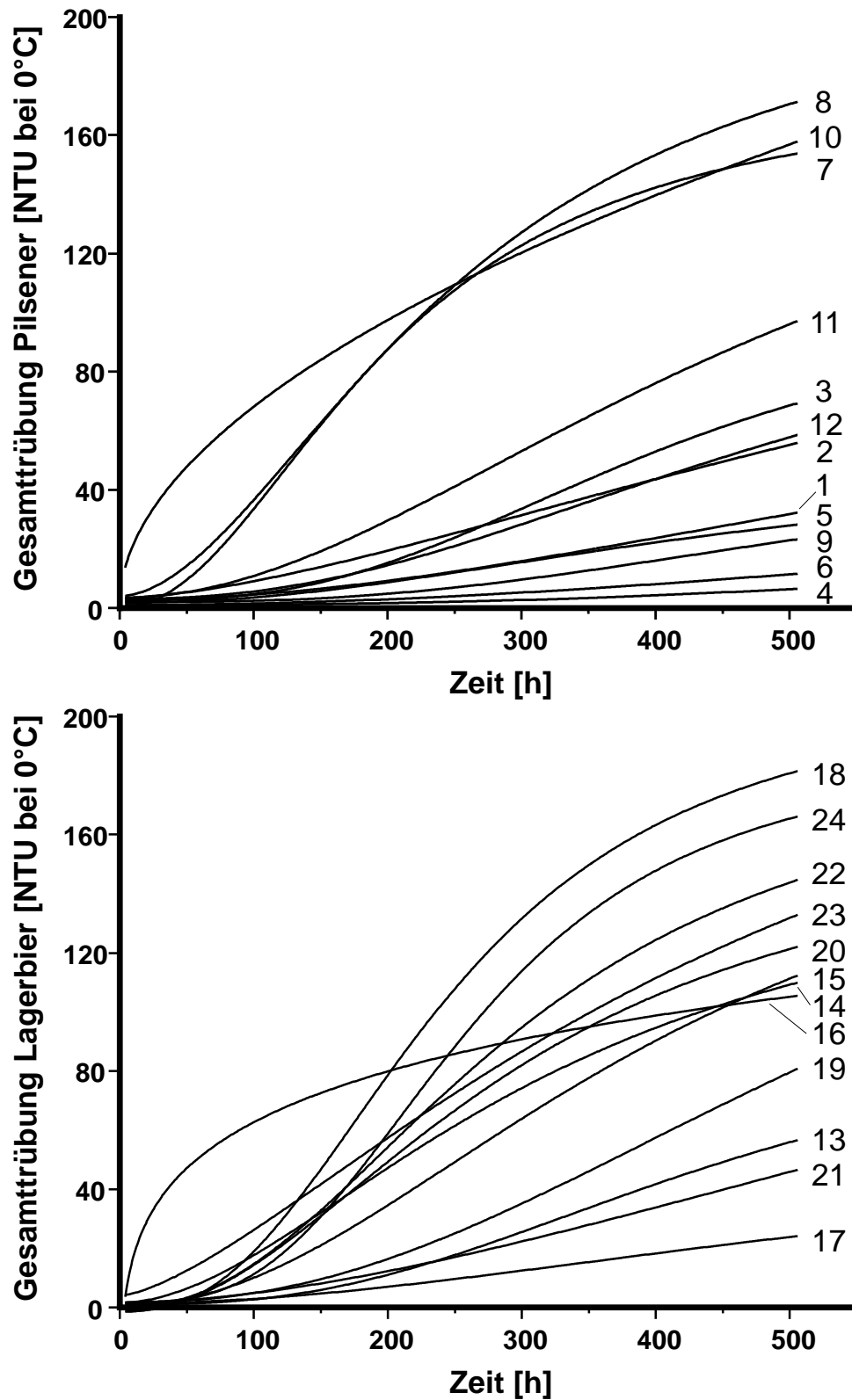


Abbildung 10: Trübungsverlaufskurven der Gesamttrübung (Trübungsmessung bei 0 °C) von 12 Pilsener Bieren (Biere 1-12, oben) und 12 Lagerbieren (Biere 13-24, unten). Die Verlaufskurven entsprechen den polynomialen Regressionen durch die jeweiligen Datenpunkte ($n = 3$).

Interessanterweise stammten die trübungsstabileren Biere bis auf zwei Ausnahmen (**Biere 1** und **5**) von Großbrauereien, während die kolloidal instabileren Biere allesamt von kleinen mittelständischen Brauereien produziert wurden. Hierbei wiederum entsprangen die am stärksten dauergetrübten **Biere 7, 18** und **20** sowie die **Biere 8** und **24** jeweils sogar derselben Brauerei. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass für diese Biere von der jeweiligen Brauerei dieselben oder ähnliche Rohstoffe verwendet wurden, was gegebenenfalls Hinweise darauf zulässt, dass die kolloidale Stabilität in Zusammenhang mit der Rohstoffzusammensetzung steht.

Durch die forcierte Alterung konnten nicht nur deutliche Unterschiede hinsichtlich der Trübungsstabilität zwischen unterschiedlichen Bierstilen festgestellt werden, sondern auch zwischen Bieren derselben Sorte. In Anbetracht dessen, dass es sich hinsichtlich der Rohstoffe und der Brauprozesse insgesamt um relativ ähnlich hergestellte Biere handeln dürfte, zeigten sich dennoch klare Varianzen in der kolloidalen Stabilität. Dies rückte die Frage nach den molekularen Ursachen und damit einhergehend den trübungsbeeinflussenden Parametern und Verbindungen in den Fokus der vorliegenden Arbeit. Um dem auf den Grund zu gehen, wurde zunächst die molekulare Zusammensetzung von Biertrübungspartikeln quantitativ erfasst. Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für die gezielte Betrachtung der Einflüsse einzelner Komponenten auf die Trübungsneigung und damit für die Identifizierung trübungsrelevanter Bierinhaltsstoffe.

3.2. Molekulare Charakterisierung der Biertrübung

Um trübungsbeeinflussende Faktoren identifizieren zu können, wurde zunächst die chemische Zusammensetzung von Biertrübung aufgeklärt. Im Zuge dieser molekularen Charakterisierung wurden sowohl bereits literaturbekannte als auch bislang nicht in Verbindung mit der Trübungsbildung gebrachte hochmolekulare und niedermolekulare Komponenten des Bieres, respektive der Biertrübung, analysiert und quantifiziert. Die Aufklärung der chemischen Zusammensetzung der Trübungspartikel dient als Basis für die Identifizierung der für die Trübungsbildung verantwortlichen Bierinhaltsstoffe.

3.2.1. Proteomikstudien

Wie unter 1.2.1.1. beschrieben, stellen Proteine einen wichtigen Hauptbestandteil der Biertrübung dar. Daher wurde die Zusammensetzung der Proteinfraction der Biertrübung eingehend analysiert, um zum einen den absoluten Anteil an proteinischem Material und zum anderen die qualitative und quantitative Zusammensetzung hinsichtlich der abundantesten Proteine in den Trübungspartikeln zu bestimmen.

3.2.1.1. Qualitative Proteomanalyse mittels SDS-PAGE

Um einen ersten Einblick in die Proteinfraction der Biertrübung zu erhalten und die Auswirkungen der Trübungspräzipitation auf das Bierproteom zu untersuchen, wurde ein frisches Pilsener Bier (**Bier B.A**) nach Denaturierung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert und mit dem korrespondierenden gealterten und geklärten Bier (**Bier B.Ag**) sowie der daraus isolierten Biertrübung (**Trübung T.A**) anhand der Proteinbanden verglichen. Abbildung 11 zeigt das erhaltene Gel nach Anfärbung der aufgetrennten Proteinbanden mit Coomassie-Blau.

Nach Anfärbung der aufgetrennten Proteinbanden zeigten sich in den Bierproben insbesondere zwei dominante Banden bei ca. 10 kDa und 40 kDa. Die Bande bei ca. 10 kDa rührt hauptsächlich von der Gruppe der Lipidtransferproteine (LTP) her, welche Molekulargewichte (MW) zwischen 10 – 12 kDa aufweisen (Limure *et al.*, 2010; Lindorff-Larsen & Winther, 2001; Marion *et al.*, 2007). Die Bande im Bereich von ca. 40 kDa lässt sich den Serpinen zuordnen, deren MW 40 – 42 kDa betragen und denen unter anderem die Proteine Z4 und Z7 zugehören (Asano *et al.*, 1982; Curioni *et al.*, 1995). Die SDS-PAGE-Analyse zeigte zum einen die Abreicherung des Gesamtproteins im geklärten Bier **B.Ag** im Vergleich zum frischen Bier **B.A** und ließ zum anderen eine starke Anreicherung proteinischen Materials in der korrespondierenden Biertrübung **T.A** vermuten, wobei die Einwaagen aufgrund stark schwankender Ausbeuten bei der Trübungsisolierung nicht exakt auf diese referenziert werden konnten. Speziell die den Banden bei 10 und 40 kDa zugeordneten Proteingruppen finden sich stark angereichert in der Biertrübung wieder.

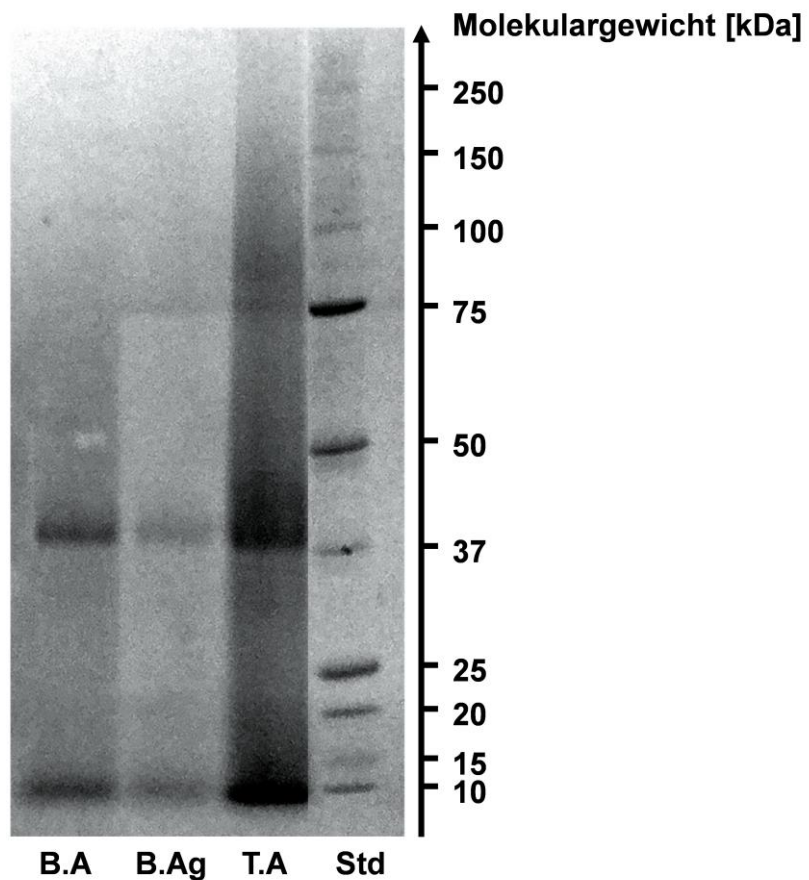


Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) eines frischen Pilsener Bieres (B.A), des daraus nach Alterung und Abtrennung der Biertrübung erhaltenen geklärten Bieres (B.Ag) und der dabei gewonnenen Biertrübung (T.A) nach Anfärbung mit Coomassie-Blau im Vergleich mit einem Peptid-Standard (Std).

Im Vergleich mit bereits mehreren publizierten Arbeiten zu Untersuchungen des Malz- und Bierproteoms mittels (2D-)Gelelektrophoresen und massenspektrometrischer Identifizierung der Proteine, stehen die Ergebnisse der hier durchgeführten Analyse im Einklang mit der Literatur (Asano *et al.*, 1982; Curioni *et al.*, 1995; Fasoli *et al.*, 2010; Hejgaard & Kaersgaard, 1983; Imure *et al.*, 2010). LTP, Serpine und einige Enzyminhibitoren werden dort als die abundantesten Proteine in Bier beschrieben, weshalb es sinnvoll erscheint, dass die Banden bei ca. 10 kDa und ca. 40 kDa am intensivsten auftreten und als LTP bzw. Protein Z-Gruppe klassifiziert wurden. Ebenso wurde die Anreicherung speziell dieser Proteine in Biertrübung bereits diskutiert, was im Zuge der MS-basierten Proteomikstudien (siehe 3.2.1.3.) nochmals eingehend analysiert wurde (Dietz, 2019; Fasoli *et al.*, 2010; Imure *et al.*, 2009; Imure *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2012; Perrocheau *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2012). Die ausgeprägte Schlierenbildung bei der Biertrübungsprobe könnte durch hohe Polysaccharidgehalte

hervorgerufen werden, weshalb diese Stoffklasse später ebenfalls noch eingehend untersucht werden sollte (siehe 3.2.2.). Des Weiteren beobachteten Jongberg *et al.* für die Gruppe der LTP unterschiedliche Trennverhalten in der Gelelektrophorese, was sie auf unstöchiometrische Proteinmodifikationen, u.a. in Form von Glykierungen zurückführten (Jongberg *et al.*, 2020). Da LTP eine mengenmäßig dominante Gruppe der Bierproteine bilden und sich, den vorliegenden Daten zufolge, in erheblichem Ausmaß in Biertrübung anreichern, könnte eine weitere Erklärung für die ausgeprägte Schlierenbildung auch die Menge an unterschiedlich glykiertem LTP sein, wonach unterschiedliche Laufweiten für Proteine derselben Proteingruppe auftreten können.

3.2.1.2. Gesamtproteingehalte von Bier und Biertrübung

Aufgrund eindeutiger Hinweise auf eine ausgeprägte Abreicherung proteinischen Materials im Verlauf der Bieralterung und hoher Proteingehalte in der Biertrübung, sollte folgend der Gesamtproteingehalt von Bier und Biertrübung untersucht werden. In der Proteinanalytik gilt die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach Bradford nach wie vor als robuste Standardmethode zur Ermittlung des Proteingehalts einer Probe (Bradford, 1976). Von Williams *et al.* konnte zudem gezeigt werden, dass für die Matrix Bier reproduzierbare Ergebnisse zu erwarten sind (Williams *et al.*, 1995). Während Bier ohne weitere Probenvorbereitung nach Entgasung direkt zur Analyse eingesetzt werden konnte, traten bei der isolierten Biertrübung erhebliche Löslichkeitsprobleme auf, welche die detaillierte Analyse der Partikel erschwerte. Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Trübung in unterschiedlichen pufferhaltigen sowie pufferfreien Systemen aus wässrigen und organischen Lösungsmitteln bei unterschiedlichen pH-Werten und unter Anpassung etwaiger physikalischer Parameter (Temperatur, Druck, Homogenisation unter starker physikalischer Beanspruchung) zu solubilisieren. Am vielversprechendsten zeigte sich ein in Proteomikstudien gebräuchliches Puffergemisch, welches eine Urea-Konzentration von 8 mol/l aufweist, obgleich sich diese Lösung weder zur Proteinbestimmung nach Bradford noch zur direkten Analyse mittels chromatographisch-massenspektrometrischer Methoden eignete. Aufgrunddessen wurde der Proteingehalt der Bierproben mittels Bradfordassay bestimmt und der Proteingehalt der Biertrübungsproben mittels Verbrennungsanalyse über den Gesamtstickstoffgehalt.

Proteingehaltsbestimmung von frischem und gealtertem Bier mittels Bradfordassay

Wie unter 4.8.1.1. beschrieben, wurde zunächst der Proteingehalt des frischen Bieres **B.A** mit dem Proteingehalt des korrespondierenden gealterten und geklärten Bieres **B.Ag** verglichen, um ein Maß für die Proteinpräzipitation im Verlauf der Bieralterung zu erhalten.

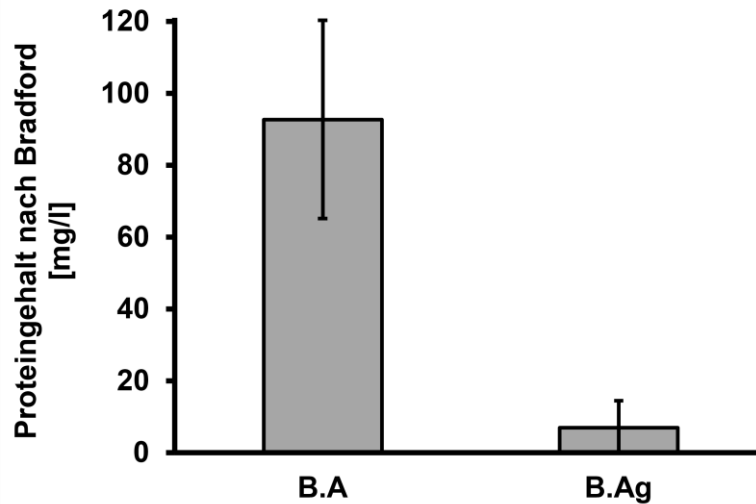


Abbildung 12: Gesamtproteingehalte eines frischen Pilsener Bieres (Bier B.A) und des nach Alterung und Abtrennung der Biertrübung erhaltenen geklärten Bieres (Bier B.Ag) nach Bradford. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n = 4).

Im direkten Vergleich von frischem und gealtertem Bier zeigte sich eine deutliche Abnahme des Proteingehalts nach Präzipitation und Abtrennung der Trübungspartikel. Während der Proteingehalt des frischen Bieres **B.A** im Bradfordassay zu rund 100 mg/l bestimmt wurde, war im geklärten Bier **B.Ag** nahezu kein proteinisches Material mehr nachweisbar. In Relation zu anderen untergärigen Bieren handelte es sich hier um ein Pilsener Bier mit vergleichsweise niedrigem Proteingehalt. Typische Proteingehalte nach Bradford in untergärigen Bieren wurden von Williams zu 0,2 bis 0,5 g/l bestimmt (Williams *et al.*, 1995). Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass im frischen Bier **B.A** ohnehin wenig proteinisches Material vorhanden war, dieses jedoch nahezu vollumfänglich präzipitierte. Demnach war zu erwarten, dass der Proteingehalt der korrespondierenden Trübung entsprechend hoch ausfällt. Wie die SDS-PAGE-Analyse (3.2.1.1.) zeigte, lag im gealterten Bier durchaus noch proteinisches Material vor, aber unter Umständen fällt im Zuge der Bieralterung ein Großteil Bradford-sensitiver Proteine aus.

Proteingehaltsbestimmung von Biertrübungsproben mittels Verbrennungsanalyse

Da sich isolierte Biertrübungspartikel wie erläutert in etwaigen Medien als unlöslich erwiesen, wurden die lyophilisierten Trübungsproben im CHNS-Analysator (Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Stickstoff (N) und Schwefel (S)) durch oxidative Verbrennung aufgeschlossen und analysiert. Hierbei werden organische Verbindungen bei etwa 1000 °C vollständig in die Gase CO₂, SO₂, H₂O und N₂ überführt, welche nach gaschromatographischer Auftrennung (GC) mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektion (WLD) quantitativ erfasst werden können. Aus der GC-WLD-Analyse ergibt sich damit unter anderem der Gesamtstickstoffgehalt der Probe, woraus unter Anwendung des Kjeldahl-Faktors von 6,25 der Proteingehalt der Probe berechnet werden kann (Kjeldahl, 1883).

Bier **B.A** zeigte im Verlauf der Alterung eine starke Proteinabreicherung, weshalb in der korrespondierenden Biertrübung **T.A** hohe Proteingehalte vermutet wurden. Neben der Trübung **T.A** wurden außerdem noch weitere Biertrübungen aus anderen untergärigen Bieren untersucht (Trübungen **T.B – T.E**, siehe 4.1.3.), um die Effekte der Proteinanreicherung in Biertrübung fundiert beurteilen zu können. Abbildung 13 zeigt die Proteingehalte der fünf untersuchten Biertrübungen.

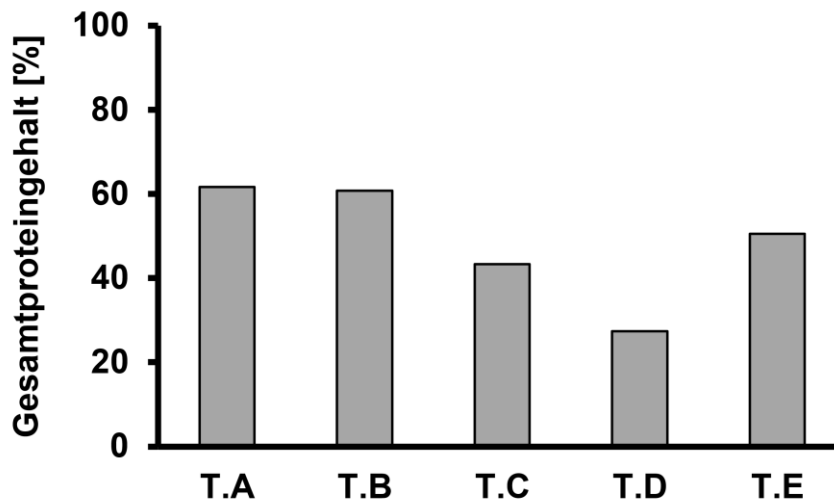


Abbildung 13: Mittels Verbrennungsanalyse quantifizierte Gesamtproteingehalte der aus den Bieren **B.A**, **B.B**, **B.C**, **B.D** und **B.E** isolierten Biertrübungen **T.A**, **T.B**, **T.C**, **T.D** und **T.E** (n = 2).

Aus den Verbrennungsanalysen ergaben sich Proteingehalte der unterschiedlichen Trübungsproben zwischen 40 % und 60 %, mit Ausnahme der Probe **T.D**, deren Proteingehalt zu rund 30 % bestimmt wurde. Wie vermutet, zeigte **T.A**, wie auch **T.B**, einen außergewöhnlich hohen Proteinanteil von rund 60 %. Die Tatsache, dass die Trübung **T.D** mit ca. 30 % Protein nur in etwa die Hälfte dessen aufwies, könnte mitunter damit erklärt werden, dass es sich bei

Bier **B.D** um ein mit hochgelöstem Malz gebrautes und doppelt gehopft Bier handelte (CO₂-Extrakt zu Kochbeginn und Pellets Typ 90 zur Whirlpoolhopfung). In diesem Fall wird zum einen durch die Prozessführung bei der Mälzung eine höhere Proteaseaktivität hervorgerufen, was im Verlauf des Maischens zu einer stärkeren Proteindegradation und damit zu niedrigen Proteingehalten im fertigen Bier führen kann und zum anderen kann eine höhere Hopfengabe zu einer verstärkten Proteinfällung führen (Narziß *et al.*, 2017).

Die Daten der Verbrennungsanalysen bestätigten die Annahme, dass in Biertrübungen tendenziell hohe Proteingehalte zu erwarten sind, welche sich aus den Ergebnissen der SDS-PAGE-Analyse und der Proteinbestimmung nach Bradford ergab. Die Trübungen **T.A** und **T.B** wurden aus den gealterten kommerziellen Bieren **B.A** und **B.B** isoliert, während die Trübungen **T.C**, **T.D** und **T.E** aus den gealterten Projektbieren **B.C**, **B.D** und **B.E** gewonnen wurden. Obwohl damit alle untersuchten Trübungen unterschiedlichen Ursprungs waren, wiesen alle Proben hohe bis sehr hohe Gehalte an proteinischem Material auf. Dies ließ darauf schließen, dass Proteine in jedem Fall eine maßgebliche Rolle bei der Trübungsbildung spielen. Die vorliegenden Daten decken sich mit früheren Studien zum Proteingehalt von Biertrübung. Bengough bezifferte den proteinischen Anteil auf rund 40 %, Belleau ebenso wie Siebert stellten Gehalte von rund 30 % fest (Belleau & Dadic, 1981; Bengough & Harris, 1955; Siebert *et al.*, 1981). Delvaux fand in Trübungen aus belgischen Weißbieren sogar bis zu 80 % Protein, wobei die Varianz hier zwischen 7 % und 80 % lag und Weißbiere nicht direkt mit den hier untersuchten untergärigen, ausschließlich mit Gerstenmalz gebrauten Bieren verglichen werden können (Delvaux *et al.*, 2000).

Bei der Verbrennungsanalyse kann nicht zwischen Stickstoffquellen differenziert werden. Ebenso wie bei der Bestimmung nach Kjeldahl wird jede stickstoffhaltige Verbindung, unabhängig davon, ob sie von proteinischem Charakter oder Bestandteil der niedermolekularen Fraktion ist, aufgeschlossen und zu Ammoniak (Kjeldahl), respektive N₂ (Elementaranalyse) umgesetzt. Dementsprechend muss beachtet werden, dass alle stickstoffhaltigen Verbindungen, wie z.B. freie Aminosäuren und Nukleotide, zum berechneten Gesamtproteingehalt beitragen und dadurch höhere Proteingehalte als die tatsächlich vorliegenden vorgetäuscht werden können. Des Weiteren sollte bei Anwendung des empirisch ermittelten Kjeldahl-Faktors die Aminosäureverteilung in den analysierten Proteinen berücksichtigt werden. Demnach sollten durch die Proteine der Biertrübung keine überdurchschnittlich hohen Einträge von Arginin (**R**) oder Histidin (**H**) erfolgen. Dies könnte ansonsten zu einer Verzerrung des Ergebnisses führen, da diese beiden Aminosäuren relativ betrachtet einen höheren molaren Stickstoffanteil aufweisen als die anderen kanonischen

Aminosäuren. Dies konnte anhand der Ergebnisse der weiter unten beschriebenen holistischen Proteomanalysen (siehe 3.2.1.3.) und der daraus erhaltenen Proteinlisten der in Biertrübung identifizierten und relativ zueinander quantifizierten Proteine überprüft werden. Abbildung 14 zeigt die Aminosäuren-Verteilung über die in der Biertrübung **T.A** vorliegenden Proteine.

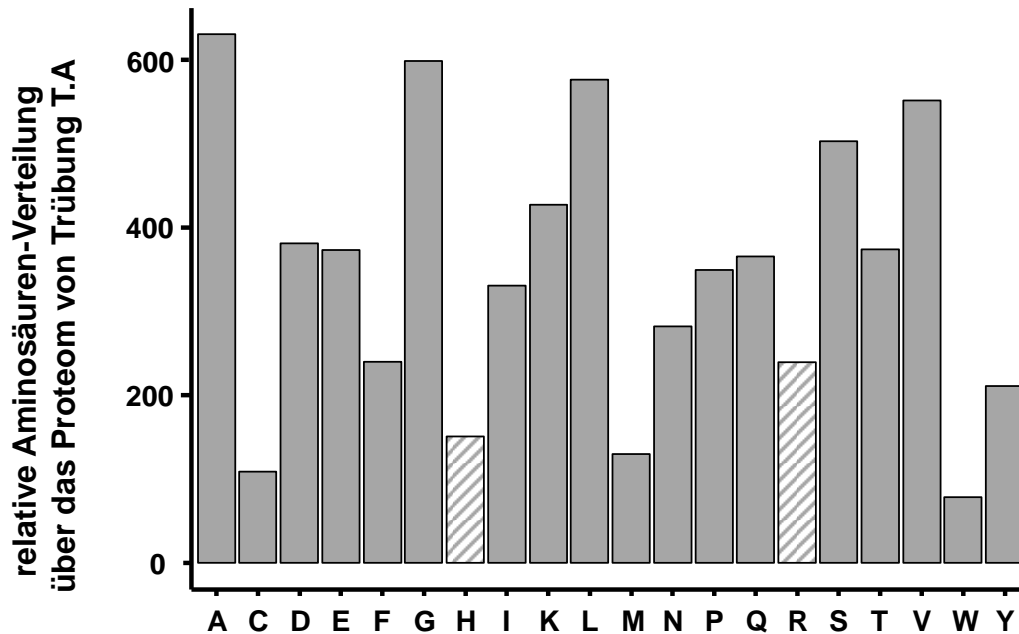


Abbildung 14: Auf Basis der im Proteom der Biertrübung **T.A** identifizierten Proteine (siehe 3.2.1.3) berechnete Aminosäuren-Verteilung. Die stickstoffreichen Aminosäuren Histidin (**H**) und Arginin (**R**) sind hervorgehoben.

Die auf Basis der in Trübung **T.A** identifizierten Proteine berechnete Aminosäuren-Verteilung zeigte, dass die Trübungsproteine keine unverhältnismäßig hohen Gehalte der stickstoffreichen Aminosäuren Arginin (**R**) und Histidin (**H**) aufwiesen. In diesem Fall war die Anwendung des Kjeldahl-Umrechnungsfaktors von 6,25 also möglich. Die Proteinbestimmung wurde von Kjeldahl ursprünglich empirisch für die Malz- und Bieranalytik im Carlsberg Laboratorium entwickelt, weswegen zu erwarten war, dass die Vorgehensweise auch für die Analyse der Biertrübungsbestandteile adaptiert werden kann (Kjeldahl, 1883). Zudem zeigte bereits die SDS-PAGE-Analyse (siehe 3.2.1.1.) vergleichbare Proteinverteilungen im Bier und der Biertrübung. Die Anwendung des Kjeldahlfaktors zur Proteingehaltsbestimmung von Bieren ist eine in der ernährungswissenschaftlichen Gemeinschaft anerkannte Methode (Souci *et al.*, 2008). Des Weiteren folgt die hier bestimmte Aminosäuren-Verteilung der allgemeinen, natürlichen Verteilung von Aminosäuren in pflanzlichen Lebensmitteln (Belitz *et al.*, 2012; Bruice, 2004).

Zusammenfassend konnte auf Basis der erhobenen Proteomdaten vermutet werden, dass Proteine eine wichtige Rolle für die Biertrübungsbildung spielen. Daher sollten die Proteine der Biertrübung unter Anwendung moderner massenspektrometrischer Methoden der holistischen Proteomik eingehend analysiert werden.

3.2.1.3. Holistische Proteomanalyse

Die Quantifizierungsdaten der Gesamtproteingehalte in frischem und gealtertem Bier sowie in unterschiedlichen Biertrübungsproben zeigten, dass Proteine einen Hauptbestandteil der Biertrübung darstellen. Daher sollte folgend die Proteinfraction der Biertrübung eingehend charakterisiert werden, um zu untersuchen, welche Bierproteine im Detail an der Trübungsbildung beteiligt sind. Hierzu wurden massenspektrometrische und bioinformatische Techniken der holistischen Proteomik (*shotgun proteomics*) angewandt. Die Proben wurden wie unter 4.8.2. beschrieben mittels tryptischem In-Gel-Verdau für die Analyse vorbereitet und die so erhaltenen Peptide mit nano-LC-ESI-Orbitrap-MS analysiert. Durch einen Datenbankabgleich konnten diese den Proteinen, denen sie ursprünglich entstammen, zugeordnet und so Proteinlisten der in Biertrübung identifizierten Proteine erstellt werden. Des Weiteren ermöglicht die iBAQ-Technik (*intensity-based absolute quantification*) einen Vergleich der Proteingehalte unterschiedlicher Trübungsproben ohne die Verwendung von Markierungsreagenzien oder isopenmarkierten Standards. iBAQ-Werte repräsentieren Absolutwerte für die Menge eines Proteins oder einer Proteingruppe in einer Probe. Hierbei wird die Summe der *counts* aller vom Massenspektrometer erfassten Peptide eines Proteins gebildet und diese auf die Anzahl der theoretisch möglichen Spaltpeptide referenziert. Auf diese Weise können molare Mengenverhältnisse aller in einer Probe identifizierten Proteine ermittelt werden, was quantitative Rankings entsprechend der Abundanz der Proteine ermöglicht (Krey *et al.*, 2014; Nagaraj *et al.*, 2011; Schwanhäusser *et al.*, 2011).

Bei Betrachtung der Verhältnisse der Proteine in den fünf Trübungsproben **T.A**, **T.B**, **T.C**, **T.D** und **T.E** ließ sich feststellen, dass sich bereits 70 % bis 80 % des proteinischen Materials durch die 20 abundantesten Proteine abbilden lassen, wie in Abbildung 15 dargestellt.

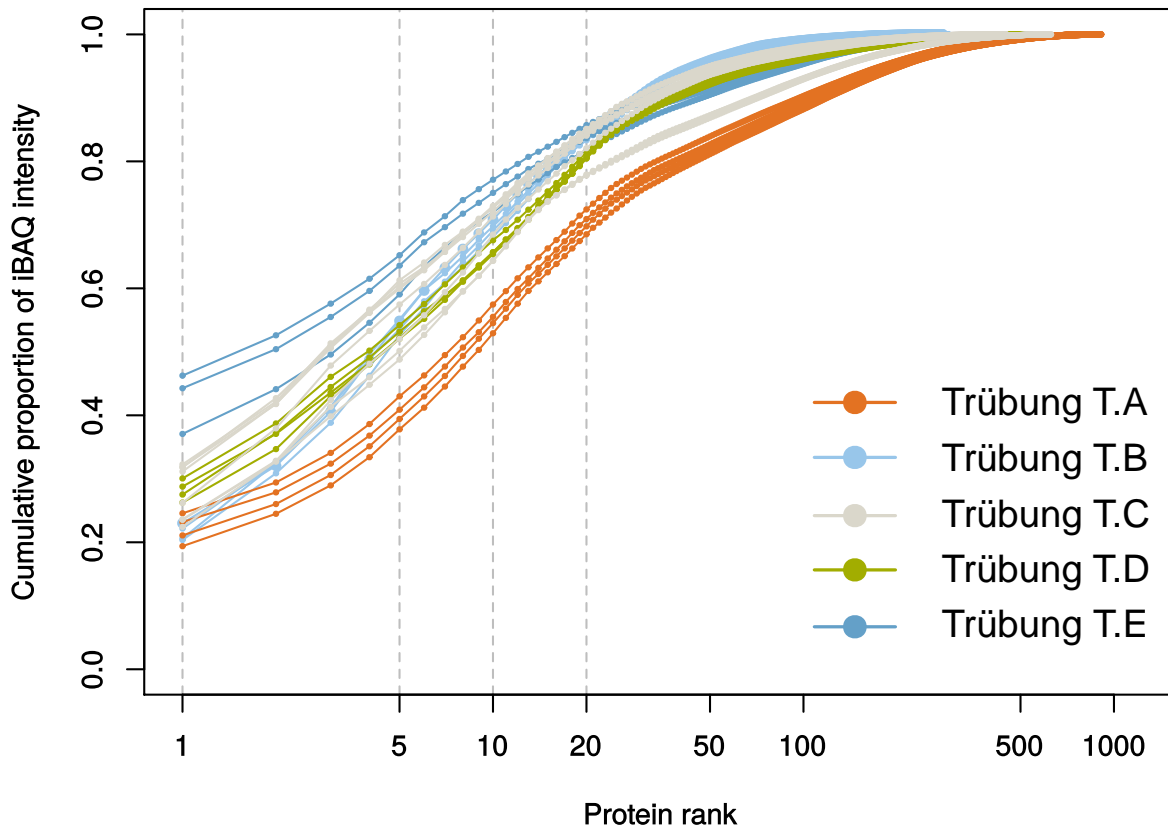


Abbildung 15: Anzahl der detektierten Proteine in einer Trübungsprobe, von links nach rechts in absteigender Abundanz sortiert (x) gegen den auf Basis der iBAQ-Intensitäten berechneten, prozentualen molaren Anteil am Gesamtproteom (y). Die 20 abundantesten Proteine repräsentieren mengenmäßig 70 % bis 80 % des Gesamtproteoms der untersuchten Biertrübungen T.A, T.B, T.C, T.D und T.E (n = 4).

Während die y-Achse den prozentualen Mengenanteil am Gesamtproteingehalt auf Basis der iBAQ-Intensität abbildet, gibt die x-Achse die Anzahl der nach Abundanz geordneten Proteine an. Ein Schnittpunkt bei $x = 20$ und $y = 0.8$, wie im Falle der Trübung T.D, ist demnach so zu interpretieren, dass in dieser Trübung die 20 abundantesten Proteine 80 % des gesamten detektierten Proteoms der Probe repräsentieren. Dementsprechend war den vorliegenden Daten zu entnehmen, dass das abundanteste Protein, welches in allen Biertrübungsproben Serpin Z4 entsprach (siehe Tabellen 1 bis 3), allein bereits zwischen 20 % und 50 % des Gesamtproteoms der Biertrübung abdeckt. Wie bereits bekannt und mehrfach in der Literatur beschrieben, stellt Serpin Z4 auch das mengenmäßig dominierende Protein in Bier dar (Curioni *et al.*, 1995; Fasoli *et al.*, 2010; Imure & Sato, 2013).

Nach Reduzierung der sehr großen Datenmenge der *shotgun proteomics*-Analyse auf die Top 20 Proteine und quantitativem Ranking anhand der iBAQ-Intensitäten wurden die in Tabelle 1 bis 3 (Seiten 43-45) dargestellten Proteinlisten der Trübungen **T.A – T.E** erhalten. Die Annotation der Proteine erfolgte wie unter 4.8.2.3. beschrieben mittels Datenbankabgleich (www.uniprot.org) und unter Anwendung der beschriebenen Kriterien für manuelle Annotationen ("≥99 % identity" bzw. "≥99 % similarity" wurden als zutreffend für eine korrekte Identifizierung des Proteins angenommen).

Protein Serpin Z4 stellte in allen Biertrübungsproben das abundanteste Protein dar. *limure et al.* diskutierten bereits die Trübungsaktivität von Protein Z, nachdem sie die Proteome von unstabilierten mit denen von Silica-behandelten Bieren miteinander verglichen. Hierbei stellten sie fest, dass das trübungsstabilere, Silica-behandelte Bier, weniger Protein Z aufwies als die native Probe, während die Gehalte anderer Proteine, wie beispielweise BDAI-1, CMb und CMe, in beiden Bieren nahezu unverändert waren. Daraus schlossen sie, dass Protein Z trübungsaktiv sein müsse (*limure et al.*, 2009). Vor dem Hintergrund, dass Protein Z jedoch nicht nur, wie hier gezeigt, in der Biertrübung, sondern, wie in der Literatur bereits mehrfach beschrieben, auch in Bier das mengenmäßig dominierende Protein darstellt, wäre es auch möglich, dass ihre Ergebnisse nicht die Trübungsaktivität von Protein Z4 zeigen, sondern dass nach einer Reduktion des Proteingehalts durch Silica-Behandlung insgesamt weniger Material zur Präzipitation zur Verfügung steht und der Trübungseintritt damit verlangsamt oder weniger intensiv erfolgt (*Curioni et al.*, 1995; *Fasoli et al.*, 2010; *limure & Sato*, 2013).

Die untersuchten Trübungsproben ähnelten sich in qualitativer Hinsicht stark. Etwa jeweils die Hälfte der 20 abundantesten Proteine war in allen Trübungen identisch, wobei die quantitative Rangordnung der einzelnen Proteine nicht immer exakt übereinstimmte. Unterschiede könnten durch unterschiedliche Rohstoffe und Prozessparameter, z.B. bei der Mälzung, bedingt sein. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Trübungsproteine deckten sich mit bisherigen Forschungsarbeiten, die hauptsächlich von der Gruppe um *limure* durchgeführt wurden (*limure et al.*, 2010; *limure & Sato*, 2013). Insgesamt sind in der Literatur nur wenige vergleichbare Daten zum Biertrübungsproteom zu finden, insbesondere was quantitative Aussagen betrifft.

Tabelle 1: Nach absteigenden iBAQ-Intensitäten sortierte Liste der jeweils 20 abundantesten Proteine in den Biertrübungen T.A und T.B.

Trübung aus Bier B.A (T.A)			Trübung aus Bier B.B (T.B)		
Protein ID	Organismus*	Proteinname	Protein ID	Organismus*	Proteinname
A0A287NA39	HORVD	Serpin Z4	A0A287NA39	HORVD	Serpin Z4
P00925	YEAST	Phosphopyruvate hydratase	A0A287PVL8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb
B7X708	SACPS	Glyceraldhyde-3-phosphate dehydrogenase	M0UY52	HORVD	Trypsin inhibitor CMe
A0A287SR97	HORVD	Serpin Z7	M0V3U0	HORVD	LTP 1
P00360	YEAST	Glyceraldhyde-3-phosphate dehydrogenase 1	F2EI31	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1
M0V3U0	HORVD	LTP 1	A0A287SR97	HORVD	Serpin Z7
F2EI31	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1	A0A287JQN1	HORVD	AAI domain-containing protein
P00330	YEAST	Alcohol dehydrogenase 1	A0A287W0A8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMa
P00924	YEAST	Enolase 1	M0UYA9	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BMAI-1
P00560	YEAST	Phosphoglycerate kinase	M0Y227	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMe
A0A287PVL8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb	F2EAF6	HORVD	Barwin
P23776	YEAST	Glucan 1,3-beta-glucosidase I/II	A0A287G115	HORVD	D Hordein
P00549	YEAST	Pyruvate kinase 1	P00925	YEAST	Phosphopyruvate hydratase
M0WPC3	HORVD	LTP 2	P23776	YEAST	Glucan 1,3-beta-glucosidase I/II
P00950	YEAST	Phosphoglycerate mutase 1	B7X708	SACPS	Glyceraldhyde-3-phosphate dehydrogenase
A0A287JQN1	HORVD	AAI domain-containing protein	M0VH55	HORVD	AAI domain-containing protein
A0A287W0A8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMa	M0WPC3	HORVD	LTP 2
P00942	YEAST	Triosephosphate isomerase	P00924	YEAST	Enolase 1
M0UY52	HORVD	Trypsin inhibitor CMe	P38248	YEAST	Cell wall protein ECM33p

*Organismen: HORVD: *Hordeum vulgare*; YEAST: *Saccharomyces cerevisiae*; SACPS: *Saccharomyces pastorianus*

Tabelle 2: Nach absteigenden iBAQ-Intensitäten sortierte Liste der jeweils 20 abundantesten Proteine in den Biertrübungen T.C und T.D.

Trübung aus Bier B.C (T.C)			Trübung aus Bier B.D (T.D)		
Protein ID	Organismus*	Proteinname	Protein ID	Organismus*	Proteinname
A0A287NA39	HORVD	Serpin Z4	A0A287NA39	HORVD	Serpin Z4
B7X708	SACPS	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	B7X708	SACPS	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P00925	YEAST	Phosphopyruvate hydratase	A0A287PVL8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb
P00924	YEAST	Enolase 1	P00925	YEAST	Phosphopyruvate hydratase
A0A287SR97	HORVD	Serpin Z7	A0A287SR97	HORVD	Serpin Z7
P00360	YEAST	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	P00942	YEAST	Triosephosphate isomerase
M0UY52	HORVD	Trypsin inhibitor CMe	F2EI31	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1
A0A287PVL8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb	M0UY52	HORVD	Trypsin inhibitor CMe
P00359	YEAST	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	P00924	YEAST	Enolase 1
P00942	YEAST	Triosephosphate isomerase	P00360	YEAST	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1
P00330	YEAST	Alcohol dehydrogenase 1	P00950	YEAST	Phosphoglycerate mutase 1
P00950	YEAST	Phosphoglycerate mutase 1	P00359	YEAST	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3
P00560	YEAST	Phosphoglycerate kinase	P00330	YEAST	Alcohol dehydrogenase 1
P06169	YEAST	Pyruvate decarboxylase isozyme 1	P11353	YEAST	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase
F2EI31	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1	A0A287G115	HORVD	D Hordein
P12709	YEAST	Glucose-6-phosphate isomerase	M0WPC3	HORVD	LTP 2
B7X717	SACPS	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	M0V3U0	HORVD	LTP 1
P00549	YEAST	Pyruvate kinase 1	M0Y227	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMd
M0WPC3	HORVD	LTP 2	P06169	YEAST	Pyruvate decarboxylase isozyme 1

*Organismen: HORVD: *Hordeum vulgare*; YEAST: *Saccharomyces cerevisiae*; SACPS: *Saccharomyces pastorianus*

Tabelle 3: Nach absteigenden iBAQ-Intensitäten sortierte Liste der 20 abundantesten Proteine in der Biertrübung T.E.

Trübung aus Bier B.E (T.E)		
Protein ID	Organismus*	Proteinname
A0A287NA39	HORVD	Serpin Z4
A0A287SR97	HORVD	Serpin Z7
B7X708	SACPS	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase
M0UY52	HORVD	Trypsin inhibitor CMe
P00925	YEAST	Phosphopyruvate hydratase
P00360	YEAST	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1
A0A287PVL8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb
P00942	YEAST	Triosephosphate isomerase
P00330	YEAST	Alcohol dehydrogenase 1
F2EI31	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1
P00549	YEAST	Pyruvate kinase 1
P00560	YEAST	Phosphoglycerate kinase
P00950	YEAST	Phosphoglycerate mutase 1
P00924	YEAST	Enolase 1
P11353	YEAST	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase
M0WPC3	HORVD	LTP 2
P06169	YEAST	Pyruvate decarboxylase isozyme 1
P14540	YEAST	Fructose-bisphosphate aldolase
P02994	YEAST	Elongation factor 1-alpha

*Organismen: HORVD: *Hordeum vulgare*; YEAST: *Saccharomyces cerevisiae*; SACPS: *Saccharomyces pastorianus*

In früheren Arbeiten wurde die Klasse der Hordeine aufgrund ihres hohen Prolingehaltes und den dadurch bedingten Besonderheiten in den Tertiärstrukturen hauptverantwortlich für die Trübungsbildung gemacht (Asano *et al.*, 1982; Siebert *et al.*, 1996a; Siebert *et al.*, 1996b). Neuere Forschungen mit moderneren Analysetechniken konnten indes bereits zeigen, dass der Großteil der Hordeine schon über den Brauprozess hinweg abgebaut wird und in der alterungsbedingten Trübung nur noch geringe Mengen, u.a. von Hordein B und γ 3-Hordein, nachweisbar sind (Jin *et al.*, 2011, 2012; Sun *et al.*, 2019). Diese aktuelleren Beobachtungen decken sich mit den vorliegenden Daten und lassen die Vermutung zu, dass Hordeine unter Umständen nicht den maßgeblichen Faktor bei der Trübungsbildung spielen. Allerdings kann anhand der hier erhobenen Daten nicht gezeigt werden, welche Rolle sie in der initialen Phase der Trübungsbildung einnehmen könnten. Die Hypothese, dass Hordeine aufgrund ihrer besonderen Tertiärstruktur eher zur Denaturierung und damit zur Präzipitation neigen als andere Proteine, wodurch sie im Anfangsstadium der Trübungsbildung wie Impfkristalle fungieren und damit die Trübungsbildung insgesamt in Gang setzen oder beschleunigen könnten, konnte bislang allerdings noch nicht stichhaltig bewiesen oder gänzlich widerlegt werden.

Die sehr ähnlichen Trübungszusammensetzungen der alterungsbedingten Präzipitate aus fünf unterschiedlichen Bieren ließen vergleichbare Mechanismen bei der Trübungsbildung vermuten. Außerdem wurden die Parallelen hinsichtlich der quantitativen Rangordnung zwischen den Proteinen der untersuchten Biertrübungen und Bier im Allgemeinen als Indiz für unspezifische Präzipitationsvorgänge auf Proteinebene betrachtet, wonach Proteine sich entsprechend ihrer Abundanzen im Bier auch in der Trübung wiederfinden. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden die Top 20 Proteine der frischen Biere **B.A** und **B.B** denen der korrespondierenden Trübungen **T.A** und **T.B** gegenübergestellt.

Tabelle 4: Nach absteigenden iBAQ-Intensitäten sortierte Liste der jeweils 20 abundantesten Proteine in Bier B.A und der korrespondierenden Trübung T.A.

Bier B.A			Trübung aus Bier B.A (T.A)		
Protein ID	Organismus*	Proteinname	Protein ID	Organismus*	Proteinname
A0A287NA39	HORVD	Serpins Z4 LTP 1 LTP 2	A0A287NA39	HORVD	Serpins Z4
M0V3U0	HORVD		P00925	YEAST	Phosphopyruvate hydratase
M0WPC3	HORVD		B7X708	SACPS	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase
A0A287SR97	HORVD	Serpins Z7 AAI domain-containing protein (predicted protein)	A0A287SR97	HORVD	Serpins Z7
M0VH55	HORVD		P00360	YEAST	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1
F2E131	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1 Sterol-binding protein PRY 1	M0V3U0	HORVD	LTP 1
P47032	YEAST		F2E131	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1
A0A287JQN1	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb Baker's asthma allergen BDP	P00330	YEAST	Alcohol dehydrogenase 1
A0A287PVL8	HORVD		P00924	YEAST	Enolase 1
A0A287G115	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMa D Hordein	P00560	YEAST	Phosphoglycerate kinase
A0A287W0A8	HORVD		A0A287PVL8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb
P05759	YEAST	Trypsin inhibitor CMe Ubiquitin-40S	P23776	YEAST	Glucan 1,3-beta-glucosidase I/II
M0UY52	HORVD		P00549	YEAST	Pyruvate kinase 1
B3IUB4	SACPS		M0WPC3	HORVD	LTP 2
Q5UNP2	HORVD	Serpins Z7 Serpins domain-containing protein (predicted protein)	P00950	YEAST	Phosphoglycerate mutase 1
A0A287SR28	HORVD		A0A287JQN1	HORVD	AAI domain-containing protein
A0A287N9R7	HORVD	Putative protease inhibitor	A0A287W0A8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMa
A0A287PDT2	HORVD		P00942	YEAST	Triosephosphate isomerase
M0W4X5	HORVD		M0UY52	HORVD	Trypsin inhibitor CMe

*Organismen: HORVD: *Hordeum vulgare*; YEAST: *Saccharomyces cerevisiae*; SACPS: *Saccharomyces pastorianus*

Tabelle 5: Nach absteigenden iBAQ-Intensitäten sortierte Liste der jeweils 20 abundantesten Proteine in Bier B.B und der korrespondierenden Trübung T.B.

Bier B.B		Trübung aus Bier B.B (T.B)	
Protein ID	Organismus*	Proteinname	Proteinname
A0A287NA39	HORVD	Serpin Z4	Serpin Z4
M0V3U0	HORVD	LTP 1	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb
M0WPC3	HORVD	LTP 2	Trypsin inhibitor CMe
A0A287SR97	HORVD	Serpin Z7	LTP 1
A0A287PVL8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMb	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1
M0VH55	HORVD	AAI domain-containing protein (predicted protein)	Serpin Z7
A0A287JQN1	HORVD	Baker's asthma allergen BDP	AAI domain-containing protein
F2E131	HORVD	Alpha-amylase inhibitor BDAI-1	AAI domain-containing protein
P47032	YEAST	Sterol-binding protein PRY 1	AAI domain-containing protein
M0UY52	HORVD	Trypsin inhibitor CMe	AAI domain-containing protein
A0A287G115	HORVD	D Hordein	AAI domain-containing protein
G5UNP2	HORVD	LTPx	AAI domain-containing protein
A0A287JK80	HORVD	AAI domain-containing protein	AAI domain-containing protein
M0Y227	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMd	AAI domain-containing protein
P05759	YEAST	Ubiquitin-40S	AAI domain-containing protein
P00924	YEAST	Enolase 1	AAI domain-containing protein
A0A287PDT2	HORVD	Ubiquitin	AAI domain-containing protein
A0A287W0A8	HORVD	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMa	LTP 2
A0A287SR28	HORVD	Serpin Z7	Enolase 1
			Cell wall protein ECM33p

*Organismen: HORVD: *Hordeum vulgare*; YEAST: *Saccharomyces cerevisiae*; SACPS: *Saccharomyces pastorianus*

Im Einklang mit Literaturdaten wurden auch im Zuge der hier durchgeführten Untersuchung Protein Z als Summe der beiden Isoformen Serpin Z4 und Z7 sowie die Lipidtransferproteine LTP1 und LTP2 als mengenmäßig dominierende Proteine im nativen Bier nachgewiesen (Curioni *et al.*, 1995; Fasoli *et al.*, 2010). Die in den Tabellen 4 und 5 hervorgehobenen Proteine der Biere **B.A** und **B.B** entsprechen denen, die auch in der korrespondierenden Trübung unter den 20 abundantesten nachgewiesen wurden. Im Falle von Bier **B.A** waren dies 12 von 20, während bei Bier **B.B** sogar 15 der 20 abundantesten Proteine auch unter den Top 20-Proteinen der Biertrübung nachgewiesen werden konnten. Zudem verhielten sich die quantitativen Verteilungen in den Trübungen weitgehend entsprechend denen im jeweiligen Bier, was die Vermutung bekräftigte, dass die Proteine im Zuge der Biertrübungsbildung entsprechend ihrer Abundanzen präzipitieren. Eine Ausnahme bildeten hierbei die LTP, welche sich hinsichtlich der quantitativen Rangordnung in den Trübungen im Vergleich zum Bier weiter unten wiederfanden. Allerdings könnte dieser Effekt auf posttranslationale Modifikationen (PTM) zurückgeführt werden. Speziell für die Gruppe der LTP wurden im Bier umfangreiche und unstöchiometrische PTM nachgewiesen, insbesondere Glykierungen an Lysinseitenketten und Oxidationen von Methionin, Prolin und Tryptophan (Schulz *et al.*, 2018; Stanislava, 2010). Die Vielzahl an unterschiedlichen Möglichkeiten der PTM und der fehlenden Stöchiometrie kann zu einer komplexen Mischung unterschiedlich modifizierter LTP und damit zu einer Art Verdünnungseffekt führen (Jongberg *et al.*, 2020; Perrocheau *et al.*, 2005). Außerdem könnten modifizierte Peptide im Zuge der Proteomanalyse anhand des Datenbankabgleichs nicht mehr auf LTP rückführbar sein.

Zusammenfassend ließen sich die Daten der *shotgun*-Analysen bis hierhin so deuten, dass die Biertrübungsbildung vermutlich nicht auf spezifischen Wechselwirkungen, ausgehend von Proteinen basiert, sondern diese eher durch Präzipitationen infolge anderer trübungsauslösender Reaktionen unspezifisch mitgerissen werden und deshalb entsprechend ihrer Abundanzen im Bier auch in der Trübung wiederzufinden waren. Dennoch war anzunehmen, dass die Menge an vorhandenem Protein im Bier einen Einfluss auf die Trübungsintensität und damit unter Umständen auch auf den Zeitpunkt des merklichen Trübungseintritts ausübt.

Um die Vermutung unspezifischer Präzipitationen der Proteinfraktion auf Basis der gesamten Proteomdaten eingehender zu studieren sollte speziell auf den Vergleich der Proteome von frischem und gealtertem Bier anhand der Biere **B.A** und **B.B** eingegangen werden. Hierzu wurden die iBAQ-Intensitäten der Proteine im frischen Bier mit denen des korrespondierenden gealterten und geklärten Bieres verglichen und die Daten in Form von *volcano plots* dargestellt, welche auf den Daten von *t*-Tests basieren. Abbildung 16 zeigt den Vergleich der Proteome des frischen Bieres **B.A** mit dem korrespondierenden gealterten Bier **B.Ag**.

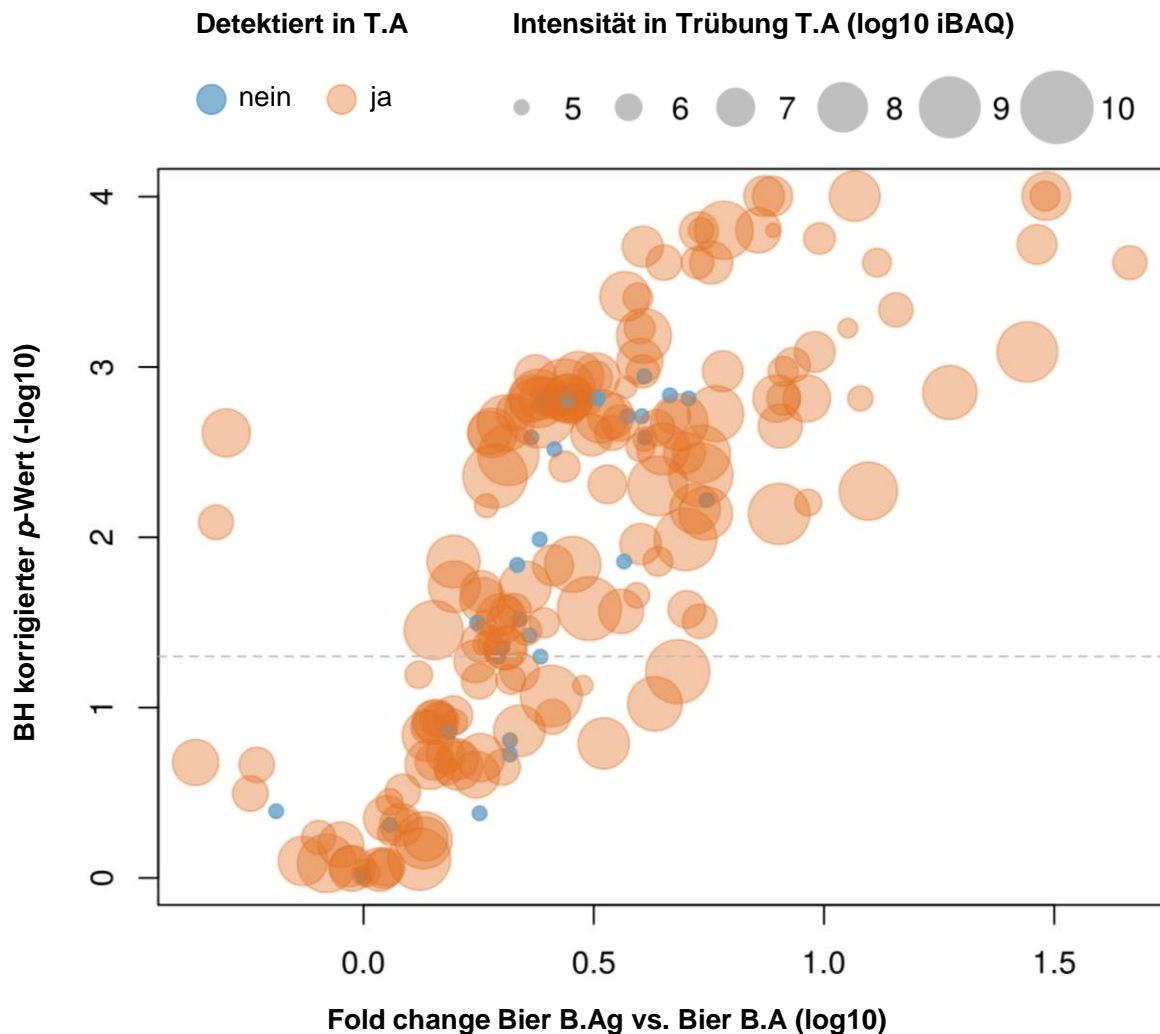


Abbildung 16: Volcano plot zur Gegenüberstellung der Proteome von frischem Bier B.A und gealtertem Bier B.Ag. Datenpunkte rechts von $x = 0.0$ repräsentieren die im frischen Bier B.A angereicherten Proteine, Datenpunkte links von $x = 0.0$ repräsentieren die im gealterten Bier B.Ag angereicherten Proteine. Alle orange gekennzeichneten Proteine wurden auch in der korrespondierenden Trübung T.A nachgewiesen. Die gestrichelte horizontale Linie entspricht dem Signifikanzniveau, welches anhand der Falscherkennungsrate nach Benjamini-Hochberg (BH) ermittelt wurde. Alle Werte oberhalb dieser Linie sind demnach als signifikant unterschiedlich in den beiden Proben zu interpretieren ($n = 4$).

Im *volcano plot* werden Daten entsprechend ihrer *p*-Werte und dem *fold change* (FC) geordnet. In Abbildung 16 finden sich diejenigen Proteine, die im frischen Bier höher konzentriert sind als im gealterten Bier rechts von $x = 0.0$ und diejenigen Proteine, die im Vergleich im gealterten Bier höher konzentriert vorliegen, links von $x = 0.0$. Je größer der Konzentrationsunterschied eines Proteins in den beiden Proben ist, also je höher der *fold change* und je kleiner der *p*-Wert, desto weiter oben außen befindet sich der Datenpunkt im Diagramm. Alle Werte oberhalb der getrichelten Linie können als signifikant unterschiedlich interpretiert werden. Des Weiteren können der Grafik Informationen über das Vorhandensein des Proteins sowie dessen iBAQ-Konzentration in der korrespondierenden Trübung **T.A** entnommen werden (orange: in T.A detektiert; blau: nicht in T.A detektiert; je größer der orange Datenpunkt, desto höher die iBAQ-Intensität in der Trübung, log₁₀-logarithmiert).

Die erhobenen Daten zeigten, dass sich nahezu alle in Bier detektierten Proteine auch in der entsprechenden Biertrübung wiederfanden (orange Datenpunkte). Außerdem wurden annähernd alle Proteine als im frischen Bier angereichert klassifiziert (rechts von $x = 0.0$), was im Umkehrschluss bedeutete, dass sich im Verlauf der Bieralterung nahezu alle Proteine des frischen Bieres abreicherten. Eine Verdeutlichung dieses Effekts gelang mithilfe eines Venn Diagramms.

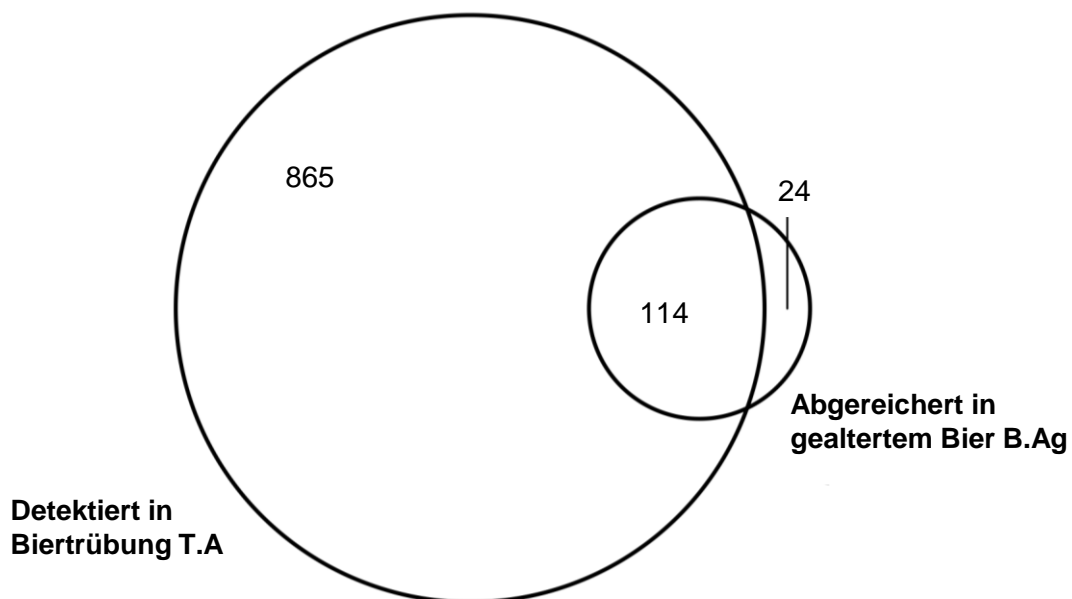


Abbildung 17: Venn-Diagramm zur Darstellung der im Verlauf der Bieralterung abgereicherten Proteine in Bier B.Ag (gesamt $114+24=138$, kleiner Kreis) und der in der korrespondierenden Biertrübung T.A detektierten Proteine (gesamt $865+114=979$, großer Kreis). Die Schnittmenge von 114 Proteinen repräsentiert die als abgereichert klassifizierten und in der Trübung nachgewiesenen Proteine.

Überschneidungen im Venn Diagramm sind so zu interpretieren, dass alle angelegten Kriterien (hier: ‚detektiert in Trübung A‘ und ‚als abgereichert klassifiziert in gealtertem Bier Ag im Vergleich zum frischen Bier A‘) auf die angegebene Anzahl an Proteinen zutreffen. Während im frischen Bier **B.A** insgesamt 201 Proteine detektiert wurden, konnten im gealterten Bier **B.Ag** noch 186 Proteine detektiert werden, jedoch in deutlich geringeren Konzentrationen (Daten jeweils nicht abgebildet). Von diesen 186 Proteinen wurden wiederum 138 Proteine (114+24), also rund 75 % aller überhaupt im gealterten Bier nachgewiesenen Proteine, als gegenüber mit dem frischen Bier abgereichert klassifiziert. Über 80 % der abgereicherten Proteine (114 von 138) wurden in der korrespondierenden Biertrübung **T.A** nachgewiesen. Lediglich 24 Proteine wurden als abgereichert klassifiziert und konnten in der Trübung nicht nachgewiesen werden, was neben Modifikationen und (bio)chemischen Degradationsprozessen auch mit Verlusten im Zuge der Probenvorbereitung zusammenhängen kann. Damit ließ sich über die Hälfte aller im frischen Bier nachgewiesenen Proteine in der korrespondierenden Biertrübung nachweisen und annähernd alle Proteine, welche sich im Verlauf der Alterung im Bier abreicherten, fanden sich auch in der entsprechenden Trübung wieder.

Die Tatsache, dass in der Biertrübung fast 1000 Proteine, und damit rund fünfmal mehr Proteine als im nativen Bier (201) detektiert wurden, könnte unter anderem auf einen ausgeprägten Konzentrationseffekt im Verlauf der Präzipitation zurückzuführen sein. Die Proteinkonzentrationen vieler Proteine im Bier sind so gering, dass sie nicht detektiert werden können. Werden sie allerdings im Zuge der Trübungsbildung im Niederschlag angereichert, welcher, wie unter 3.2.1.2. bereits gezeigt, sehr hohe Proteinkonzentrationen aufweist, sind die Konzentrationen ausreichend, um diese Proteine mit dem durchgeführten Proteomik-Ansatz nachweisen zu können. Des Weiteren könnten etwaige Denaturierungs- oder Umlagerungsprozesse sowie posttranslationale Modifikationen (PTM) dazu führen, dass ein Bierprotein in der Trübung in mehreren unterschiedlichen Isoformen und Modifizierungen vorliegt, was beim Datenbankabgleich Mehrfachannotationen desselben Proteins zur Folge haben kann.

Entsprechend dem für Bier **B.A** beschriebenen Vorgehen wurden auch die Proteomdaten von Bier **B.B** analysiert. Zunächst wurden die iBAQ-Intensitäten der Proteine im frischen Bier **B.B** mit denen des korrespondierenden gealterten und geklärten Bieres **B.Bg** verglichen und die Daten in Form eines *volcano plot* dargestellt.

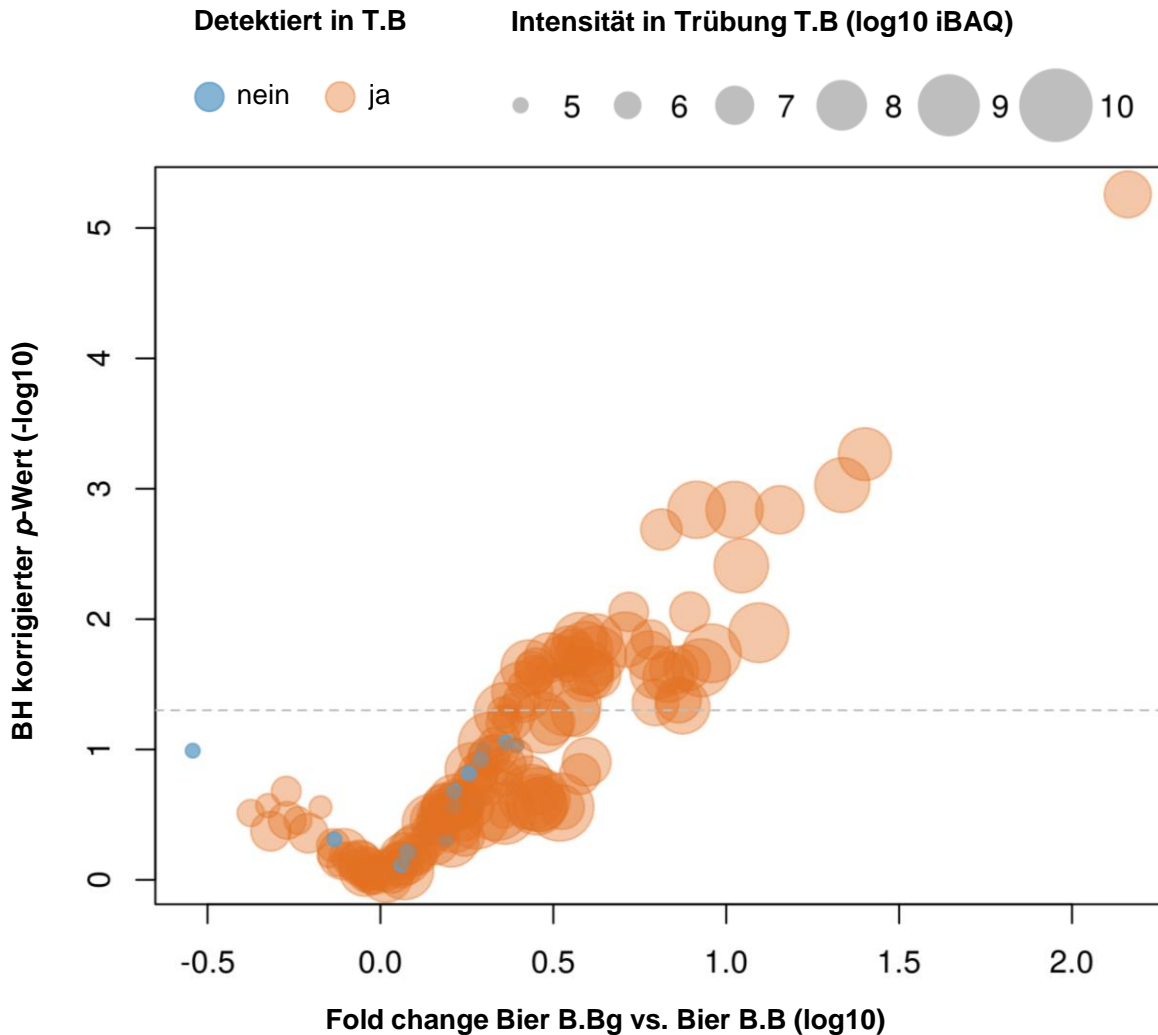


Abbildung 18: Volcano plot zur Gegenüberstellung der Proteome von frischem Bier **B.B** und gealtertem Bier **B.Bg**. Datenpunkte rechts von $x = 0.0$ repräsentieren die im frischen Bier **B.B** angereicherten Proteine, Datenpunkte links von $x = 0.0$ repräsentieren die im gealterten Bier **B.Bg** angereicherten Proteine. Alle orange gekennzeichneten Proteine wurden auch in der korrespondierenden Trübung **T.B** nachgewiesen. Die gestrichelte horizontale Linie entspricht dem Signifikanzniveau, welches anhand der Falscherkennungsrate nach Benjamini-Hochberg (BH) ermittelt wurde. Alle Werte oberhalb dieser Linie sind demnach als signifikant unterschiedlich in den beiden Proben zu interpretieren ($n = 4$).

Auch im Falle von Bier **B.B** zeigte sich, dass sich nahezu die komplette proteinische Fraktion des frischen Bieres im Verlauf der Alterung abreichert. Noch deutlicher als bei Bier **B.A** zeigte sich hier, dass bis auf wenige Ausnahmen alle Proteine, welche als abgereichert klassifiziert wurden, auch in der Trübung nachgewiesen werden konnten (orange Datenpunkte).

Auch im Fall von Bier **B.B** zeigte eine Darstellung der Daten als Venn-Diagramm, dass nahezu alle der 50 (48+2) als im gealterten Bier abgereichert klassifizierten Proteine unter den 331 Trübungsproteinen von Biertrübung **T.B** wiedergefunden wurden.

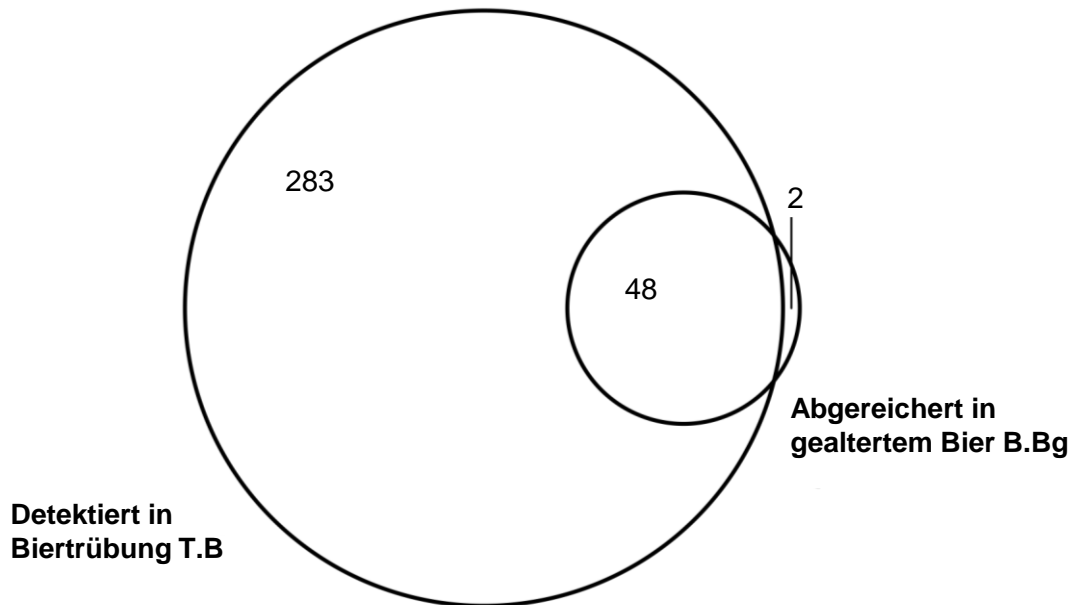


Abbildung 19: Venn-Diagramm zur Darstellung der im Verlauf der Bieralterung abgereicherten Proteine in Bier B.Bg (gesamt $48+2=50$, kleiner Kreis) und der in der korrespondierenden Biertrübung T.B detektierten Proteine (gesamt $283+48=331$, großer Kreis). Die Schnittmenge von 48 Proteinen repräsentiert die als abgereichert klassifizierten und in der Trübung wiedergefundenen Proteine.

Während im frischen Bier **B.B** insgesamt 154 Proteine detektiert wurden, konnten im gealterten Bier **B.Bg** noch 115 Proteine detektiert werden, jedoch in deutlich niedrigeren Konzentrationen (Daten jeweils nicht abgebildet). Von diesen 115 Proteinen wurden wiederum 50 Proteine ($48+2$), also fast die Hälfte aller im gealterten Bier nachgewiesenen Proteine, als abgereichert klassifiziert. 96 % und damit annähernd alle der abgereicherten Proteine (48 von 50), wurden letztlich auch in der korrespondierenden Biertrübung **T.B** nachgewiesen. Lediglich 2 Proteine wurden als abgereichert klassifiziert und konnten in der Trübung nicht nachgewiesen werden, was neben PTM und (bio)chemischen Degradationsprozessen auch mit Verlusten im Zuge der Probenvorbereitung zusammenhängen kann. Damit konnte ein Drittel aller im frischen Bier **B.B** nachgewiesenen Proteine in der korrespondierenden

Biertrübung **T.B** nachgewiesen werden, wobei sich annähernd alle Proteine, welche sich im Verlauf der Alterung im Bier abreicherten, auch in der entsprechenden Trübung wiederfanden.

Die absoluten Unterschiede der in **T.A** (ca. 1000) und **T.B** (ca. 300) detektierten Proteine können auf unterschiedliche Probeneinwaagen aufgrund sehr begrenzter Probenmengen zurückgeführt werden (ca. Faktor 3), was allerdings keinen Einfluss auf die Aussagen der durchgeführten Experimente hatte. Hinsichtlich der quantitativen Rangordnung der Top 20-Proteine sowie der Muster der Proteinabreicherungen im Bier im Zuge der Alterung bzw. der Proteinanreicherung in der jeweiligen Biertrübung zeigten beide Matrices A und B sehr ähnliche und damit vergleichbare Daten. Auch die allgemeine Trübungszusammensetzung beider Proben war sehr ähnlich (siehe 3.2.6.).

Anhand der beiden kommerziellen, alterungsgetrübten Biere **B.A** und **B.B** konnte damit gezeigt werden, dass sich der Großteil aller im nativen Bier vorkommenden Proteine im Verlauf der Bieralterung abreichert und sich diese, als abgereichert identifizierten Proteine, auch nahezu vollständig in der korrespondierenden Trübung wiederfinden. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Daten der SDS-PAGE-Analyse und dem Bradford-Assay (siehe 3.2.1.1. und 3.2.1.2), wonach sich die proteinische Fraktion des Bieres im Verlauf der Alterung insgesamt maßgeblich abreichert und Biertrübungen mitunter sehr hohe Proteingehalte aufweisen. Zusammenfassend deuteten die im Rahmen der durchgeführten Proteomikstudien erhobenen Daten zudem eher auf unspezifische als auf spezifische Wechselwirkungen der Proteinfraction im Verlauf der Biertrübungsbildung hin.

3.2.2. Ermittlung des Kohlenhydratgehaltes von Biertrübung

Wie eingangs unter 1.2.1.2. beschrieben, sind in Biertrübungen mitunter hohe Gehalte an Kohlenhydraten zu erwarten (Bengough & Harris, 1955; Schulte *et al.*, 2016). Im Zuge der SDS-PAGE-Analyse konnten aufgrund von Schlierenbildungen im Gel ebenfalls bereits Vermutungen über das Vorhandensein von Polysacchariden in der Biertrübung angestellt werden (siehe 3.2.1.1.). Aufgrund der bereits erläuterten Unlöslichkeit der Trübungspartikel, ihrer komplexen Zusammensetzung und der schwierigen Extraktion von Polysacchariden aus dem Präzipitat, wurde der Kohlenhydratanteil nach Vollhydrolyse mit Schwefelsäure anhand der Quantifizierung der dabei freigesetzten Glucose mittels Ionenchromatographie (HPIC) semiquantitative abgeschätzt.

Wie in der Literatur beschrieben, besteht die Kohlenhydratfraktion von Bier hauptsächlich aus Glucose-Oligomeren. Neben geringen Mengen an niedermolekularen Nicht-Glucose-Kohlenhydraten, wie Fructose und Sucrose, sowie hochmolekularem Arabinoxylan, sind überwiegend niedermolekulare Hexosen und Maltosen, höhermolekulare Maltodextrine sowie hochmolekulare Polysaccharide wie Stärke und β -Glucane nachzuweisen (Bamforth, 1999; Delvaux *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2005; Steiner *et al.*, 2010). Nicht-Glucose-basierte Kohlenhydrate nehmen im Bier nur einen sehr geringen Anteil von weniger als 5 bis 10 % der Gesamtkohlenhydratfraktion ein (Nogueira *et al.*, 2005). Demnach konnte von der angewandten Methode ein guter Näherungswert für den tatsächlichen Kohlenhydratanteil von Bier und Biertrübung erwartet werden.

Zunächst wurden die Kohlenhydratgehalte der frischen Biere **B.A** und **B.B** den Gehalten der korrespondierenden gealterten und geklärten Biere **B.Ag** und **B.Bg** gegenübergestellt.

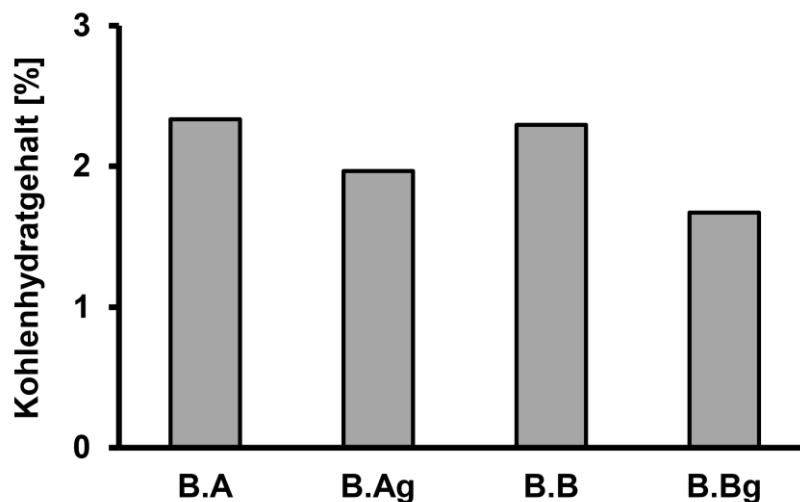


Abbildung 20: Gesamtkohlenhydratgehalte zweier frischer Biere B.A und B.B und der korrespondierenden gealterten und geklärten Biere B.Ag und B.Bg (n = 2).

Die Analysen ergaben für das frische Pilsener Bier **B.A** und das frische Lagerbier **B.B** Kohlenhydratgehalte zwischen rund 2 und 2,5 %, wobei die Gehalte mit 1,5 bis 2 % in den gealterten Bieren niedriger lagen. Dies deutete bereits darauf hin, dass sich ein Anteil der Kohlenhydratfraktion bei der Präzipitation in den Trübungspartikeln anreichern könnte. Buckee bezifferte den Kohlenhydratanteil von Vollbier auf 1 – 6 Gew.-%, während Bamforth von rund 2 – 4 Gew.-% ausgeht (Bamforth, 2005; Buckee & Hargitt, 1977). Nogueira *et al.* publizierten ca. 5 Gew.-% Maltose als majores Kohlenhydrat (Nogueira *et al.*, 2005). In einer aktuelleren Arbeit gehen Rakete *et al.* von Maltotetraose als abundantestem Kohlenhydrat in Bier aus und veröffentlichten Gehalte von 1,2 Gew.-% nach Quantifizierung mittels HPLC-FLD (Rakete & Glomb, 2013). Damit standen die hier ermittelten Werte gut im Einklang mit Literaturwerten,

weshalb angenommen werden konnte, dass die Analyse der Glucose nach Vollhydrolyse eine gute Näherung für den Gesamtkohlenhydratgehalt darstellt.

Um nun die Kohlenhydratgehalte der Trübungsproben **T.A** und **T.B** zu ermitteln, wurden diese wie unter 4.7.2. beschrieben analysiert. Des Weiteren wurden die aus den **Bieren B.C, B.D** und **B.E** isolierten Trübungen **T.C, T.D** und **T.E** ebenfalls untersucht, um die Daten fundiert einordnen zu können.

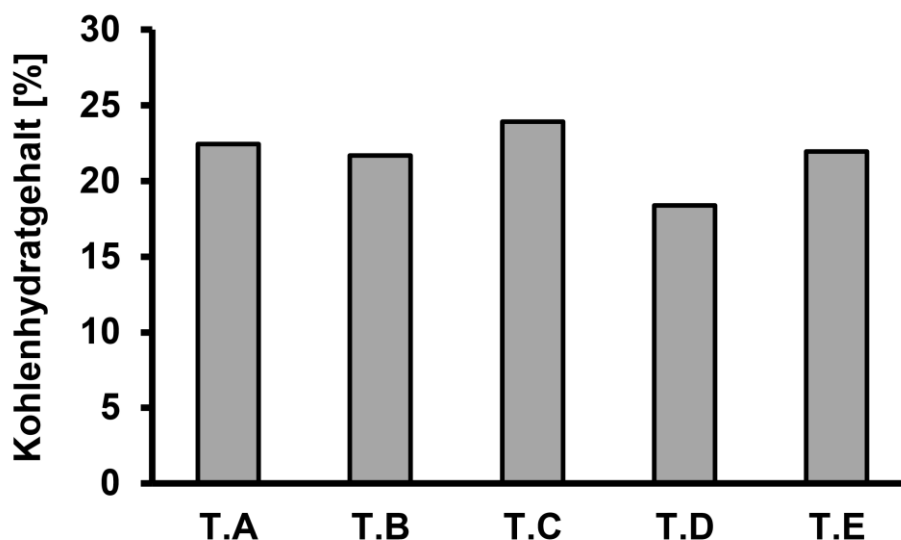


Abbildung 21: Gesamtkohlenhydratgehalte der Biertrübungen T.A, T.B, T.C, T.D und T.E aus den unterschiedlichen Bieren B.A, B.B, B.C, B.D und B.E (siehe 4.1.3) (n = 2).

Die Untersuchungen zeigten, dass ein großer Massenanteil der Trübungspartikel auf die Saccharidfraktion der Biere zurückgeführt werden kann. Die Kohlenhydratgehalte der analysierten Trübungen liegen zwischen 18 und 25 %. Damit machen glucosidische Substanzen einen maßgeblichen Anteil der Trübung aus. In der Literatur finden sich nur sehr wenige vergleichbare Daten für den Kohlenhydratgehalt von Biertrübung, wobei die von Schulte *et al.* publizierten Werte von 15 – 23 % sehr gut mit den hier erhaltenen Werten übereinstimmen (Schulte *et al.*, 2016). Bei dieser Analyse sollte beachtet werden, dass neben Kohlenhydraten auch andere oxidierbare Analyten, wie z.B. freie Aminosäuren, welche als Nebenprodukte im Zuge der Hydrolyse aus Proteinen entstehen können, detektiert werden. Daneben müssen weitere methodische Herausforderungen, wie unvollständige Hydrolysen der zu bestimmenden Kohlenhydrate, die Nicht-Erfassung von Nicht-Glucose-Kohlenhydraten sowie unvermeidbare Nebenreaktionen im Zuge der Probenvorbereitung (z.B. unter Hitzeeinwirkung) beachtet werden, dennoch war anhand der Datenabgleiche mit Literaturwerten zu Kohlenhydratgehalten von Bieren und Biertrübungen davon auszugehen, dass die durchgeführte Analyse als gute semi-quantitative Näherung betrachtet werden kann.

3.2.3. Wassergehaltsbestimmung von Biertrübung

Nachdem anhand des hochmolekularen Protein- und Kohlenhydratanteils bereits über 50 Massen-% der Inhaltsstoffe der isolierten Biertrübungen erklärt werden konnten, sollten im Folgenden niedermolekulare Verbindungen eingehend analysiert werden.

Um den Restwassergehalt der lyophilisierten Trübungspartikel zu bestimmen, wurde die Titration nach Karl Fischer angewandt (Fischer, 1935). Mit diesem Verfahren ist es aufgrund der Selektivität für Wasser und der geringen Anfälligkeit für Nebenreaktionen möglich, neben freiem Wasser auch gebundenes, sogenanntes Kristallwasser, über einen großen linearen Bereich zu erfassen und zu quantifizieren. Des Weiteren eignet sich die Karl-Fischer-Titration auch für feste, unlösliche Proben, wie sie hier in Form der Trübungspartikel vorlagen. Zur Ermittlung der Wassergehalte der Trübungsproben **T.A**, **T.B**, **T.C**, **T.D** und **T.E** wurden die Präzipitate wie unter 4.7.3. beschrieben exakt eingewogen und in das Reaktionsgefäß des automatisierten und gegen einen käuflich erworbenen Wasserstandard kalibrierten Titrator gegeben. Die Ergebnisse der Wassergehaltsbestimmung sind in Abbildung 22 dargestellt.

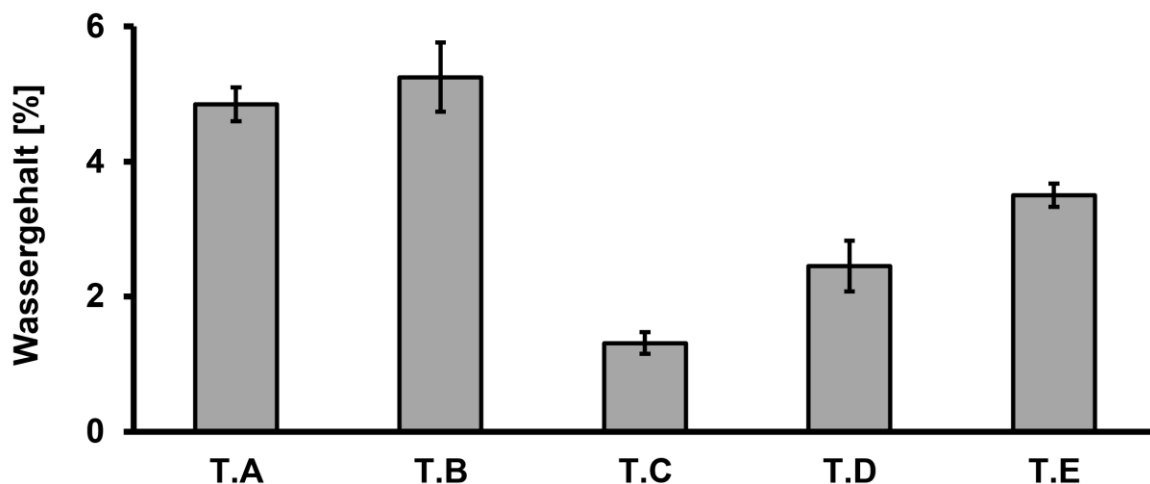


Abbildung 22: Mittels Karl-Fischer-Titration bestimmte Restwassergehalte der lyophilisierten Biertrübungsproben T.A, T.B, T.C, T.D und T.E. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n = 3).

Die Wassergehalte der lyophilisierten Biertrübungen lagen zwischen 1,5 und 5 %. In der Literatur existieren bislang keine Vergleichswerte für den Restwassergehalt isolierter Trübungspartikel. Aus den vorliegenden Daten lässt sich jedoch entnehmen, dass die Schwankungen zwischen den Proben beträchtlich sein können und gebundenes Restwasser in der Gesamtbilanz einen gewichtigen Massenanteil der Präzipitate ausmachen kann. Neben Trocknungseffekten bei der Lyophilisierung könnten auch unterschiedliche Protein- und Kohlenhydratzusammensetzungen dazu führen, dass unterschiedliche Mengen an

Kristallwasser in den komplex zusammengesetzten Trübungsproben gebunden werden oder sich die Präzipitate hygroskopisch verhalten.

3.2.4. Quantifizierung von Hopfenbitterstoffen und Polyphenolen

Die untersuchten Biertrübungen **T.A**, **T.B**, **T.C**, **T.D** und **T.E** setzten sich zu rund 50 bis 90 % aus proteinischem Material, Kohlenhydraten und Wasser zusammen. Der verbleibende Anteil musste demnach niedermolekularen Ursprungs sein und wurde deshalb im Folgenden analysiert.

Wie eingangs unter 1.2.1.4. ausführlich diskutiert, stehen insbesondere Polyphenole im Verdacht, Trübungsbildungen auslösen zu können. Nachdem dieses Feld bereits umfassend und mit kontroversen Ergebnissen beforscht wurde, sollte im Zuge dieser Arbeit erstmalig ein besonderes Augenmerk auf die Hopfenphenole und -bittersäuren als bekannte Interaktionspartner von Bierproteinen gelegt werden. Wietstock *et al.* postulierten Interaktionen zwischen Hopfensäuren und Metallionen, die zur Ausbildung von Präzipitaten führen können, brachten dies aber nicht weiter in Verbindung mit der Trübungsstabilität von Bier (Wietstock *et al.*, 2016). Repräsentativ für die unterschiedlichen Strukturklassen der in Bier vorkommenden Hopfenphenole wurden hier die hydrophoben Verbindungen Xanthohumol (**1**), α - und β -Säuren (**3-8**), das mittelpolare Isoxanthohumol (**2**) und die *iso*- α -Säuren (**9-14**) sowie das *co*-Multifidolglucopyranosid (**15**) als Vertreter hydrophiler phenolischer Strukturen detailliert untersucht. Hierzu wurden die genannten Analyten in frischem und gealtertem Bier sowie in Extrakten der Biertrübungen mittels LC-MS/MS_{MRM} unter Anwendung der ECHO-Technik quantifiziert. Abbildung 23 zeigt die extrahierten Chromatogramme (XIC) der Analyten für die simultane Quantifizierung. Bei einer ECHO-Methode werden zu definierten Zeitpunkten nach der Probeninjektion Standard-Lösungen in den chromatographischen Probenlauf injiziert. 3,2 min nach der Probeninjektion wird, wie unter 4.7.1. beschrieben, eine Lösung von *co*-Multifidolglucopyranosid, nach 8,5 min eine Mischung aus Isoxanthohumol und Xanthohumol und nach 18,5 min eine Mischung aus *cis*-Isocohumulon, Humulon und Colupulon injiziert. So eluieren die injizierten Standards, welche den zu analysierenden Metaboliten identisch oder strukturähnlich sind, zeitlich leicht versetzt. Auf diese Weise können sie unter vergleichbaren LCMS-Bedingungen, wie z.B. Matrixeffekte zu einem bestimmten Zeitpunkt der chromatographischen Trennung, detektiert und als interne Standards zur Quantifizierung der Zielanalyten herangezogen werden (Dresel *et al.*, 2015; Haseleu *et al.*, 2010; Intelmann *et al.*, 2009).

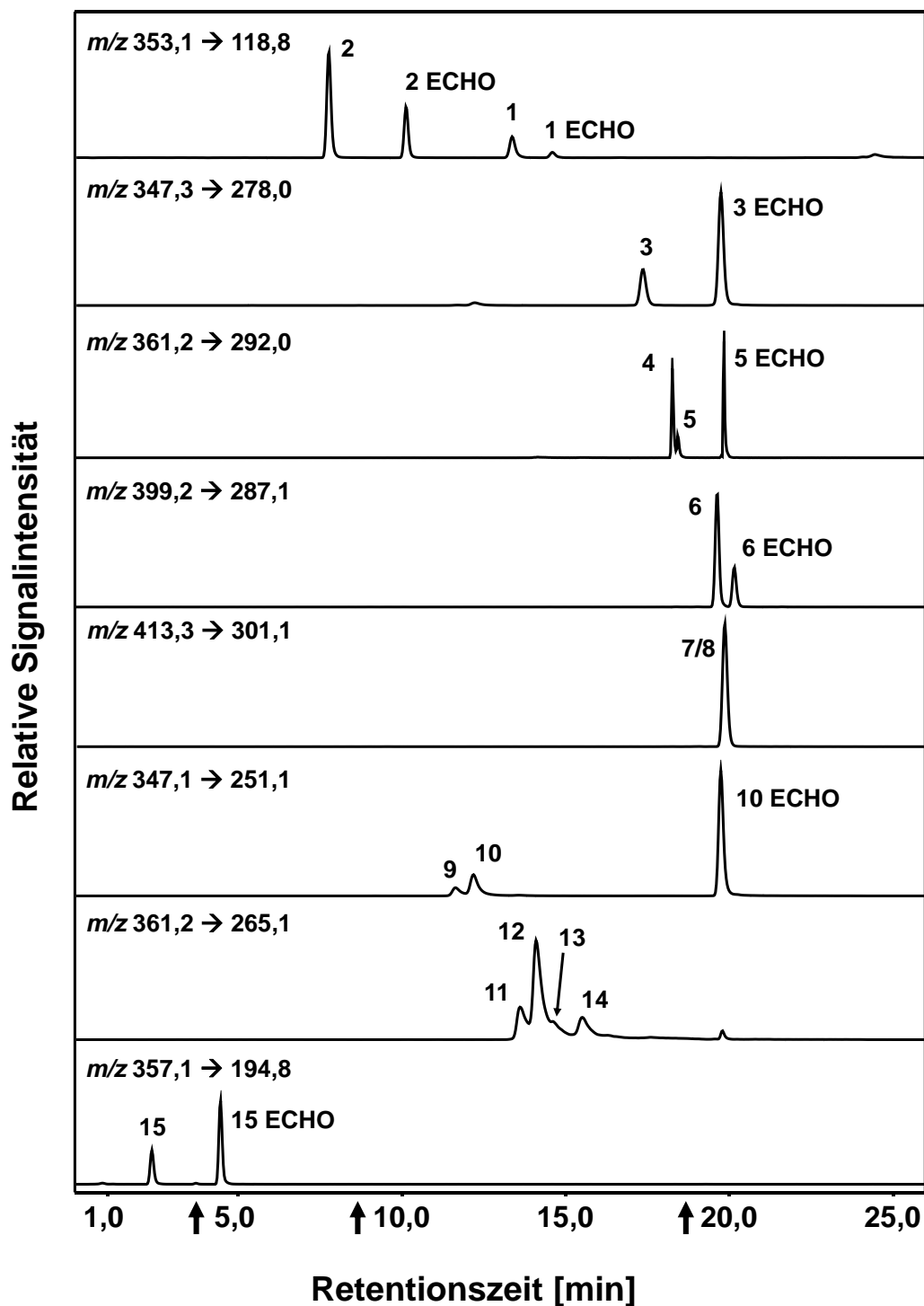


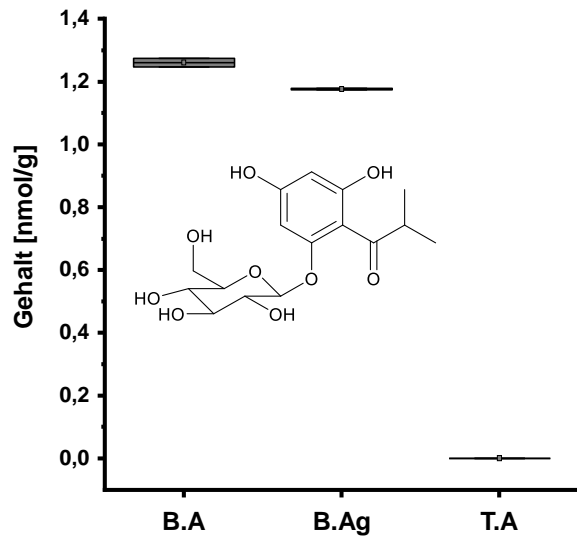
Abbildung 23: Extrahierte Chromatogramme (XIC) der für die Quantifizierung der Hopfenbitterstoffe herangezogenen MRM-Übergänge. Xanthohumol (1) und Isoxanthohumol (2), die α -Säuren Cohumulon (3), Adhumulon (4) und Humulon (5), die β -Säuren Colupulon (6), Adlupulon (7) und Lupulon (8), die *iso*- α -Säuren *trans*-Isocohumulon (9), *cis*-Isocohumulon (10), *trans*-Isoadhumulon (11), *cis*-Isoadhumulon (12), *trans*-Isohumulon (13) und *cis*-Isohumulon (14) sowie co-Multifidolglucopyranosid (15). Die Pfeile auf der Zeitachse markieren die Zeitpunkte der ECHO-Injektionen (3,2 min, 8,5 min und 18,5 min).

Eine Referenzierung der quantitativen Daten auf die Trübungsausbeute war aus unterschiedlichen Gründen nicht sinnvoll. Die Trübungsbildung stellt einen komplexen dynamischen Prozess dar, zu dem auch in der Literatur bislang keine Daten hinsichtlich der Trübungsausbeute aus definierten Biervolumina existieren. Das Ausmaß der Präzipitation bewegte sich zum Zeitpunkt der Probenahme in einer Größenordnung von 100 mg Trübung pro 1000 ml Bier, unterlag jedoch starken Schwankungen. Die Trübungsbildung ist unter anderem abhängig von der Lagerdauer bis zur Probenahme, von den Lagerungsbedingungen (Lichteinflüsse, Lagerungstemperatur und Temperaturschwankungen) und nicht zuletzt von der Probenmatrix, also vom Bier selbst. In Summe führten die genannten Faktoren zu einer begrenzten Vergleichbarkeit der Trübungsausbeuten sowie stark variierenden Werten bei der Bestimmung ebendieser, weshalb die diesbezüglich erhobenen Daten als nicht ausreichend belastbar für eine Normalisierung der Quantifizierungsdaten betrachtet wurden. Stattdessen wurden die ermittelten Gehalte in den Bieren **B.A** und **B.Ag** sowie der Trübung **T.A** im Folgenden relativ betrachtet, um zu zeigen, welche Analyten sich im Verlauf der Bieralterung verhältnismäßig am stärksten in der Biertrübung anreichern.

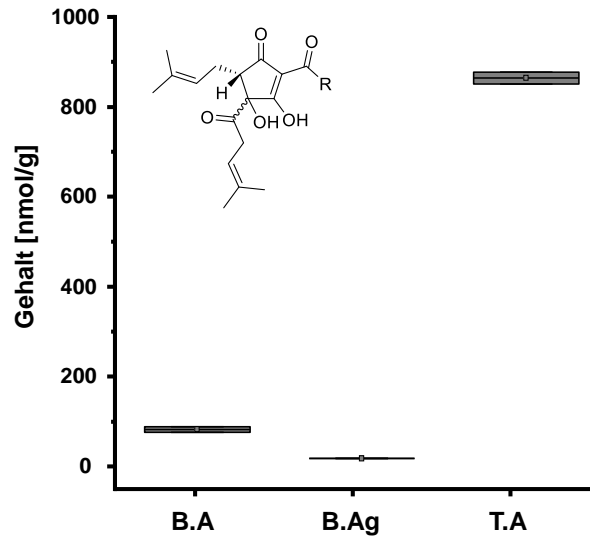
Bei der Analyse frischer und gealterter Biere zeigten sich deutliche Konzentrationsunterschiede hinsichtlich der untersuchten Metabolite. Insbesondere starke Anreicherungseffekte hydrophober Verbindungen in der Biertrübung waren zu beobachten, wie nachfolgend am Beispiel von Bier **B.A**, dem gealterten und geklärten Bier **B.Ag** und der korrespondierenden Trübung **T.A** in Abbildung 24 gezeigt.

Beim hydrophilen *co*-Multifidolglucopyranosid (**15**) konnte kein ausgeprägter Abbau im Verlauf der Alterung festgestellt werden. Die Substanz konnte auch nicht in der untersuchten Biertrübung nachgewiesen werden. Die Isohumulone (**9-14**) unterlagen einer Degradation über den Lagerungszeitraum und konnten auch leicht angereichert in der Biertrübung nachgewiesen werden, wobei kein unterschiedliches Verhalten der Isomere festgestellt wurde. Entgegen der polaren (**15**) und mittelpolaren (**9-14**) Analyten zeigten die hydrophoberen Substanzen deutlich stärkere Degradationseffekte im Bier und Anreicherungen in der Trübung. Xanthohumol (**1**) und Isoxanthohumol (**2**) wurden im Verlauf der Lagerung vollständig aus dem Bier entfernt, was entweder auf chemische Umwandlungs- bzw. Abbaureaktionen (Dresel, 2013) oder, in Anbetracht der hohen Konzentrationseffekte, auf den Übergang vom Bier in die Biertrübung hindeutet. Vergleichbare Effekte zeigten sich auch für die Humulone (**3-5**) und Lupulone (**6-8**), wobei die β -Säuren (**6-8**) die ausgeprägtesten Anreicherungsfaktoren in der Biertrübung aufwiesen (siehe Tabelle 6, Seite 64).

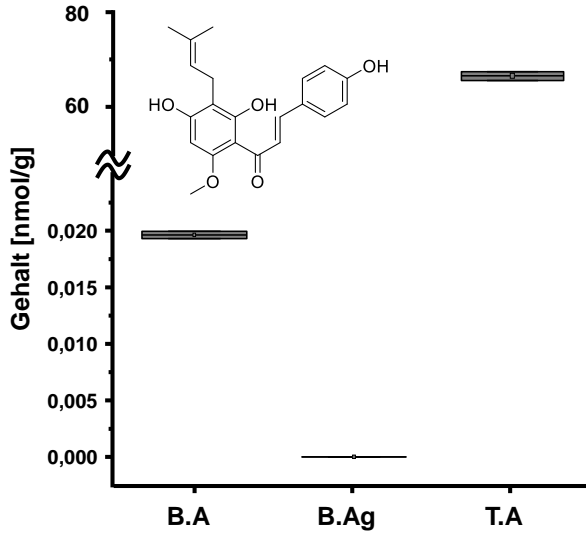
co-Multifidolglucopyranosid (15)



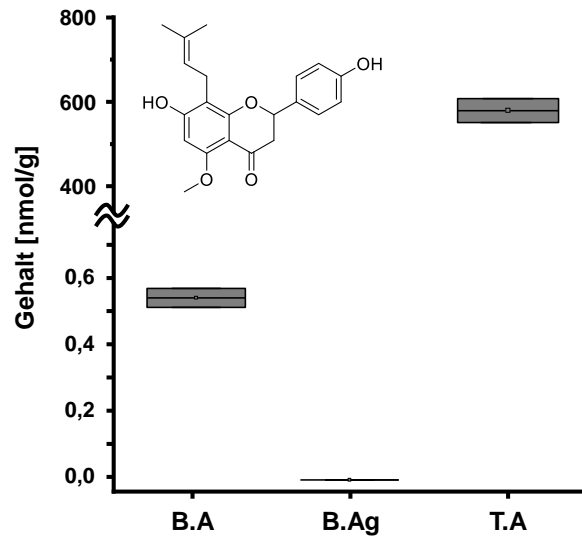
iso- α -Säuren (9-14)



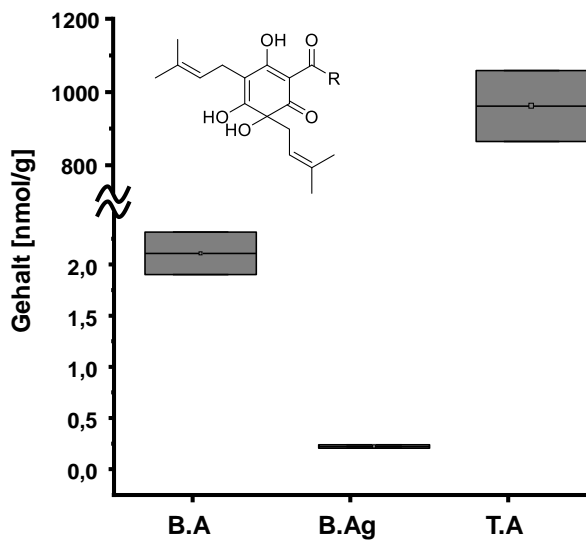
Xanthohumol (1)



Isoxanthohumol (2)



α -Säuren (3-5)



β -Säuren (6-8)

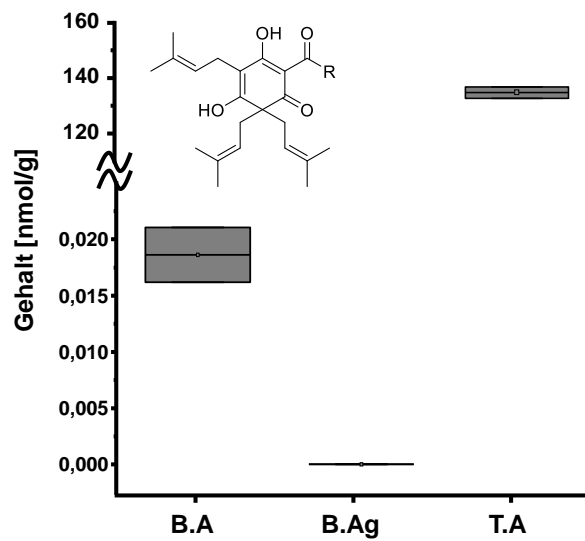


Abbildung 24: Boxplots der mittels ECHO-UHPLC-ESI-MS/MS(MRM) bestimmten Gehalte der Hopfenphenole im frischen Bier B.A, im gealterten und geklärten Bier B.Ag und der korrespondierenden Biertrübung T.A (n = 2). Die Stoffgruppen der α -Säuren (3-5), β -Säuren (6-8) und *iso*- α -Säuren (9-14) wurden jeweils in Summe betrachtet.

Während bei den Hopfenbittersäuren keine spezifischen Verschiebungen der Konzentrationsverhältnisse in der Biertrübung im Vergleich zum frischen Bier festgestellt wurden, zeigte sich dies im Falle der Xanthohumole (1,2). Das Verhältnis von Isoxanthohumol (2) zum hydrophoberen Xanthohumol (1) im frischen Bier lag bei rund 30:1 und verschob sich in der Biertrübung zugunsten des unpolaren Xanthohumols (1) auf ca. 10:1. Xanthohumol (1) reicherte sich damit im Vergleich dreimal stärker in der Trübung an als das hydrophilere Isoxanthohumol (2). Hierbei war außerdem zu beobachten, dass sich im Zuge der Bieralterung beide Metabolite nahezu vollständig im Bier abreicherten und im gealterten Bier nicht mehr nachweisbar waren.

Für Chalcone (wie 1) und Flavanone (wie 2) konnten Geng *et al.* bereits zeigen, dass die Bindungsaffinitäten an Proteine unter anderem positiv mit den $\log P$ -Werten der Metabolite korrelieren (Geng *et al.*, 2020). Der $\log P$ -Wert beschreibt den Verteilungskoeffizienten einer Substanz in dem Zweiphasengemisch *n*-Octanol/Wasser. Je höher der $\log P$ -Wert, desto hydrophober die Substanz. Für Xanthohumol (1) beträgt dieser 5,1, für Isoxanthohumol (2) 4,1 (Cheng *et al.*, 2007; PubChem, 2019b, 2019c).

Des Weiteren zeigten Untersuchungen zum Verhalten von Prenylflavanoiden über den Brauprozess bereits, dass sowohl Xanthohumol (1) als auch Isoxanthohumol (2) stark mit der hochmolekularen Matrix wechselwirken und unter anderem als Bestandteile des Heiß- und Kalttrubs präzipitieren, wobei im Verhältnis zu den eingesetzten Mengen mehr Xanthohumol (1) als Isoxanthohumol (2) ausfällt (Stevens *et al.*, 1999). Für die Bieralterung wurde dies bislang noch nicht untersucht, es könnten aber ähnliche Mechanismen zugrundeliegen.

Neben der Anreicherung von Xanthohumol (1) war auch eine ausgeprägte Anreicherung der hydrophoben Humulone und Lupulone zu beobachten. Da jedoch in keinen Fällen spezifische An- oder Abreicherungen der *cis/trans*- oder *ad/n*-Isomere in der Biertrübung festgestellt werden konnten, wurden die Stoffgruppen der *iso*- α -, α - und β -Säuren jeweils in Summe betrachtet. Tabelle 6 stellt die Anreicherungsfaktoren der einzelnen Stoffklassen in der Trübung ihren mittleren Hydrophobizitäten ($\log P$ -Werte) gegenüber.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der Anreicherungsfaktoren der untersuchten Hopfenphenole in Biertrübung und ihren log*P*-Werten.

Substanz(klasse)	Anreicherungsfaktor*	log <i>P</i> **
co-Multifidolglucopyranosid (15)	0	0,7
iso- α -Säuren (9-14)	10	3,8
α -Säuren (3-5)	456	4,1
Isoxanthohumol (2)	1056	4,1
Xanthohumol (1)	3390	5,1
β -Säuren (6-8)	7243	6,7

* entspricht [Gehalt in der Trübung] / [Gehalt im frischen Bier]

** Maß für die Hydrophobizität einer Verbindung; arithmetisches Mittel der log*P*-Werte der Isomere, (Cheng *et al.*, 2007; PubChem, 2019a)

Betrachtet man die Anreicherungen der unterschiedlichen Metabolite in der Biertrübung, so lässt sich erkennen, dass diese mit steigender Hydrophobizität der Analyten stark zunimmt. Während sich polare und mittelpolare Phenole, wie das co-Multifidolglucopyranosid (15) und die iso- α -Säuren (9-14) gar nicht oder nur schwach in der Trübung anreichern, findet im Falle der unpolaren Xanthohumole (1,2), der α - (3-5) und insbesondere der β -Säuren (6-8) eine starke Anreicherung in der Trübungsmatrix statt. iso- α -Säuren (9-14) unterliegen im Zuge der Bieralterung etwaigen Abbaureaktionen, deren Produkte in ihren Strukturen sehr divers sind. Dies könnte letztlich zu einer Art Verdünnungseffekt führen, wodurch diese Stoffklasse im Verlauf der Alterung zu vielen unterschiedlichen, im einzelnen aber schwer nachweisbaren Metaboliten degradiert (Haseleu *et al.*, 2009a, 2009b; Intelmann & Hofmann, 2010; Intelmann *et al.*, 2011). Insbesondere die Adsorption der Lupulone (6-8) an Präzipitate im Verlauf des Brauprozesses wurde bereits von Loch-Ahring *et al.* beobachtet. Sie beschreiben in ihrer Arbeit die Ausscheidung von β -Säuren beim Würzekochen durch Adsorption an Treber und Trubbestandteile. Zur Biertrübung schreiben sie weiters, dass sich diese eher aus hydrophoben Analyten, als aus hydrophilen zusammensetzt. Dazu verglichen sie unspezifisch zwei Aufarbeitungen desselben Bieres mittels Festphasenextraktion (SPE) mit dem DMSO-Extrakt der nach Alterung aus dem Bier gewonnenen Trübung. Die hydrophobe Aufarbeitung über C18-Material bildete das Analytspektrum der Trübung hierbei besser ab, als die hydrophile Aufarbeitung über eine Polyamid-Phase (Loch-Ahring *et al.*, 2008). Während diese Beobachtungen qualitativer Natur waren, liegen durch die hier durchgeführte Arbeit erstmals quantitative Werte vor, die das Verhalten der Hopfenmetabolite bei der Trübungsbildung detailliert darstellen und die bisherigen Literaturdaten ergänzen.

3.2.5. Quantifizierung von Ionen in Bier und Biertrübung

Neben den bisher analysierten organischen Inhaltsstoffen der Biertrübung wird in der Literatur auch die Anreicherung anorganischer Bestandteile diskutiert, wobei wie unter 1.2.1.3. beschrieben insbesondere Metallionen im Fokus stehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Biere und Biertrübungen mittels ICP-MS (Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie) auf ihre Metallgehalte untersucht. Dazu wurde das Probenmaterial zunächst oxidativ aufgeschlossen, um die einzelnen Elemente anschließend zu quantifizieren. Der große Vorteil dieser Methode besteht vor allen Dingen in der vollständigen Zersetzung der Probe, sodass von der Matrix keine störenden Effekte mehr ausgehen, was die exakte Analyse der komplex zusammengesetzten Bier- und vor allen Dingen der Biertrübungsproben ermöglichte. Nachfolgend wurden die Metallgehalte der beiden Bierproben **B.A** (frisch) und **B.Ag** (gealtert) sowie der korrespondierenden Biertrübung **T.A** untersucht.

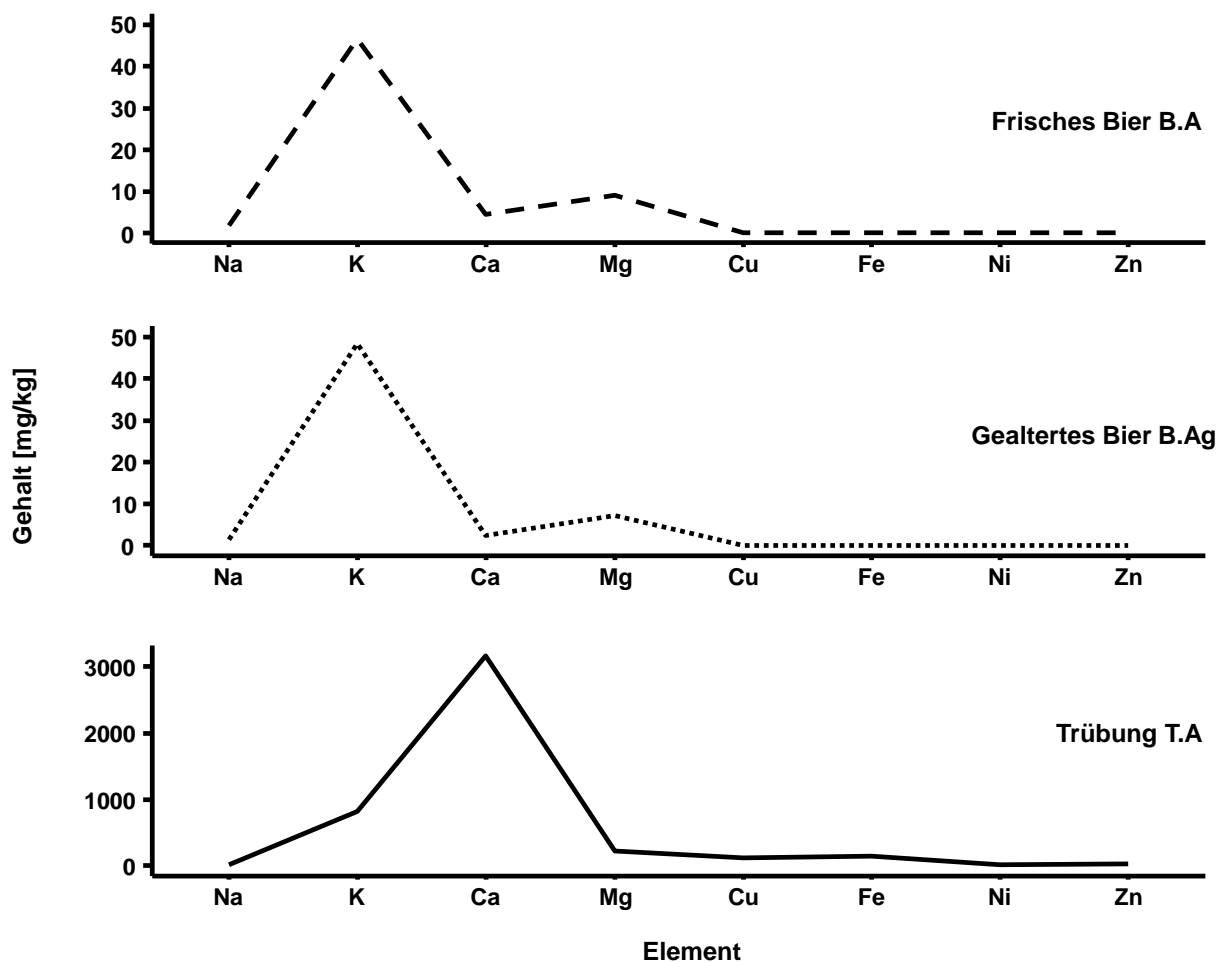


Abbildung 25: Nach oxidativem Aufschluss mittels ICP-MS bestimmte Metallgehalte im frischen Pilsener Bier B.A (oben), im gealterten und geklärten Bier B.Ag (Mitte) und in der korrespondierenden Biertrübung T.A (unten) (n = 2).

Während im frischen Bier **B.A** ebenso wie im gealterten Bier **B.Ag** jeweils Kalium (**K**) mit rund 50 mg/kg das majore Ion darstellte, kehrte sich das Verhältnis in der Trübung **T.A** von einwertigen zu mehrwertigen Ionen um. Obwohl keine deutlichen Unterschiede zwischen frischem und geklärtem Bier festzustellen waren, war die Anreicherung speziell hoher Mengen an Calcium (**Ca**) in der Biertrübung mit über 3000 mg/kg beträchtlich.

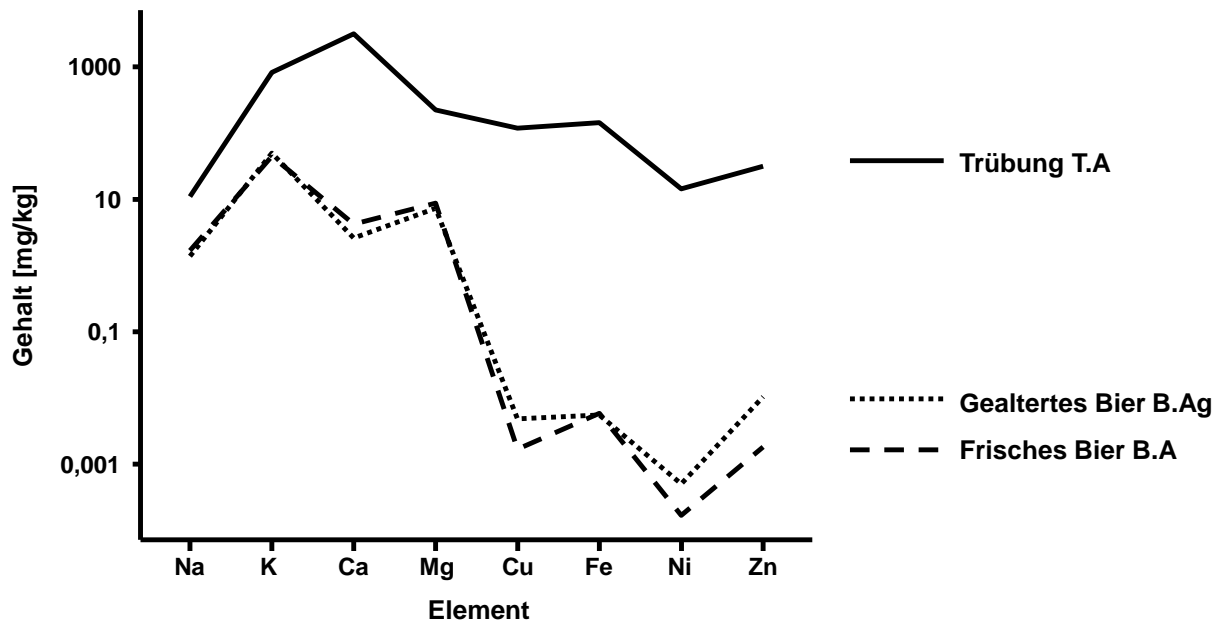


Abbildung 26: Nach oxidativem Aufschluss mittels ICP-MS bestimmte Metallgehalte im frischen Pilsener Bier B.A, im gealterten und geklärten Bier B.Ag und der korrespondierenden Biertrübung T.A (n = 2).

Die Zusammenfassung der Daten in einem Diagramm unter Logarithmierung der y-Achse verdeutlichte die Anreicherung der einzelnen Elemente in der Biertrübung. Während sich in **T.A** nicht das in **B.A** und **B.Ag** abundanteste, einwertige Alkalimetall Kalium (**K**), sondern das zweiwertige Erdalkalimetall Calcium (**Ca**) stark anreicherte, traf dies auch auf die potentiell mehrwertigen Übergangsmetalle zu. Kupfer (**Cu**), Eisen (**Fe**), Nickel (**Ni**) und Zink (**Zn**) unterlagen im Verlaufe der Bieralterung und Trübungsbildung offenbar ebenfalls einer ausgeprägten Anreicherung. Verglichen mit Calcium (**Ca**) waren diese aufgrund der deutlich niedrigeren Ausgangsmengen im Bier sogar noch weitaus größer, wie eine Auftragung der Anreicherungsfaktoren in Abbildung 27 zeigt. Hinsichtlich der Übergangsmetalle wurde bei diesem Experiment nahe der Nachweisgrenze des ICP-MS gearbeitet, was hinsichtlich der Messunsicherheiten zu größeren Schwankungen führen kann und daher Unterschiede im frischen und gealterten Bier unter Umständen nicht mehr korrekt aufgelöst werden konnten.

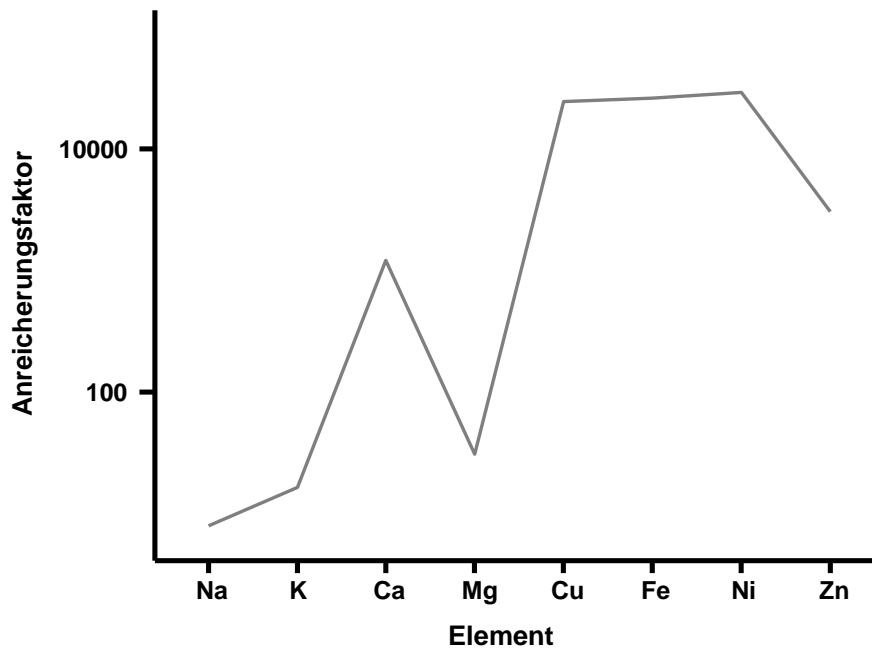


Abbildung 27: Darstellung der Anreicherungs faktoren* der einzelnen Elemente in der Biertrübung T.A gegenüber dem frischen Bier B.A (n = 2). (*Anreicherungs faktor = Gehalt T.A / Gehalt B.A)

Wie hier gezeigt werden konnte, scheint die Anreicherung der Übergangsmetalle noch spezifischer zu sein als die der Alkali- und Erdalkalimetalle. Die relativen Verhältnisse der Ionen in der Trübung entsprachen außerdem nicht denen im Bier, was auch bereits von Chapon beobachtet wurde. Er schreibt von 0,7 – 3 % Asche in der Trübung, wobei Kupfer, Eisen, Calcium, Magnesium, und Silicium die abundantesten Metalle darstellten (Chapon, 1965). Diese Beobachtungen konnten durch die durchgeführten Analysen gestützt werden, was im Falle der Metallionen die These zuließ, dass bei der Trübungsbildung keine willkürliche Präzipitation der Elemente entsprechend ihrer Abundanz im Ausgangsmaterial stattfindet, sondern spezifische Wechselwirkungen zur Anreicherung bestimmter Elemente in der Biertrübung führen. Dies machte speziell die Übergangsmetalle zu interessanten Analyten im Hinblick auf potentielle trübungsauslösende Substanzen, weshalb dies später eingehender untersucht wurde (siehe 3.3.3.).

3.2.6. Diskussion

Im Rahmen einer umfassenden molekularen Charakterisierung wurden die Majorkomponenten alterungsbedingter Biertrübung quantitativ erfasst. Abbildung 28 gibt einen Überblick über die ermittelten Zusammensetzungen der fünf untersuchten Biertrübungen **T.A**, **T.B**, **T.C**, **T.D** und **T.E**.

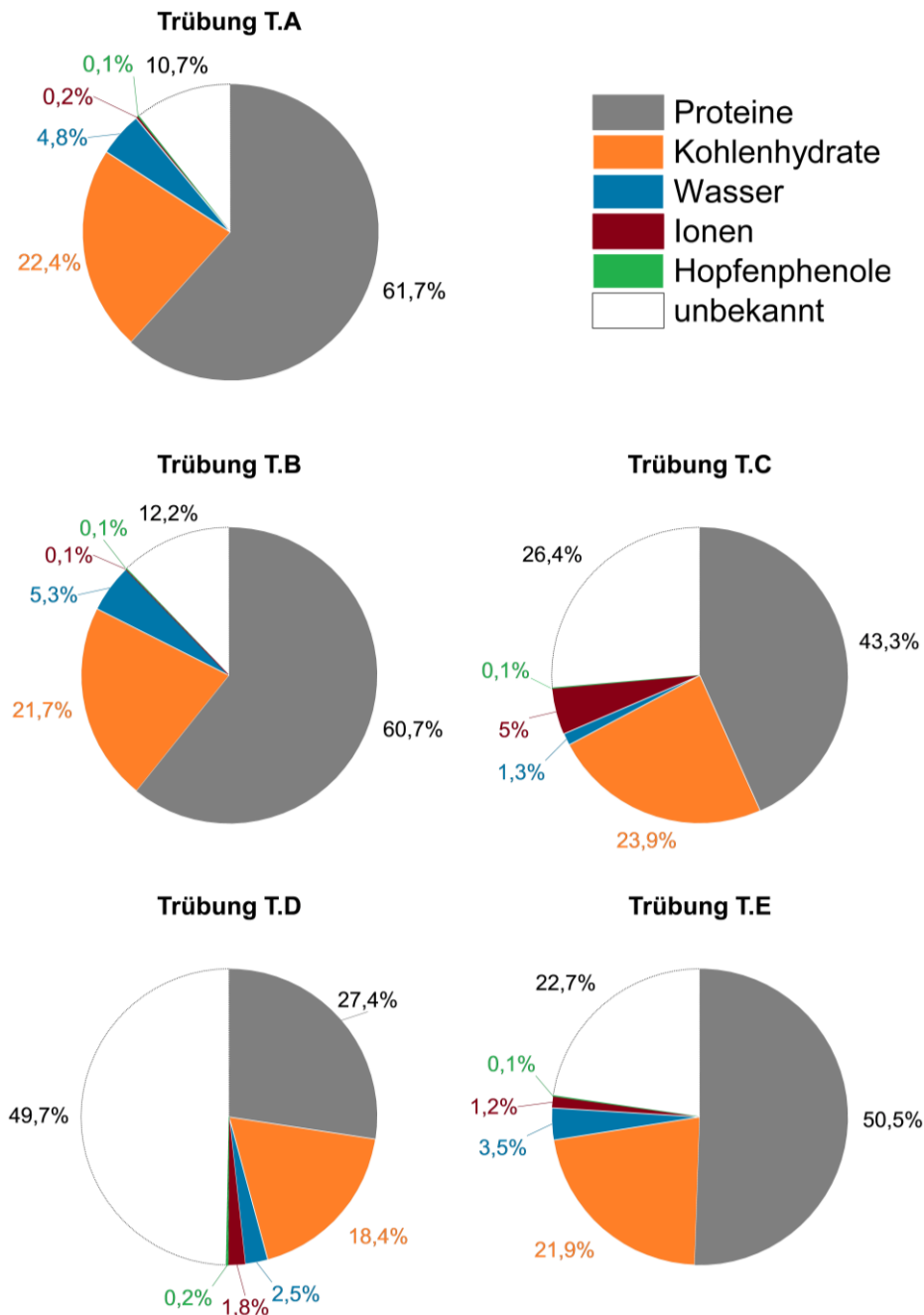


Abbildung 28: Ermittelte Trübungszusammensetzungen der alterungsbedingten Gesamttrübungen aus den Bieren B.A, B.B, B.C, B.D und B.E.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die molekulare Zusammensetzung der untersuchten Trübungspartikel nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnten bis zu 90 Gew.-% der Trübungsbestandteile erfasst werden, was eine hinreichende Grundlage für weitere Untersuchungen bot. Auffällig war, dass die Trübungen aus den fünf untergärigen Bieren durchaus unterschiedlich zusammengesetzt waren. Bei Bier **B.A** handelte es sich um ein kommerzielles Pilsener, bei Bier **B.B** um ein kommerzielles helles Vollbier und bei den Bieren **B.C**, **B.D** und **B.E** um speziell für diese Forschungsarbeit gebraute Versuchsbiere, welche sich im Lösungsgrad des verwendeten Malzes und dem Hopfenregime unterschieden. Für Bier **B.C** wurde niedrig gelöstes Malz verwendet und mit Pellets Typ-90 gehopft, für die Biere **B.D** und **B.E** kam hoch gelöstes Malz zum Einsatz, wobei Bier **B.D** mit einem CO₂-Extrakt und Pellets Typ-90 und Bier **B.E** nur mit Pellets Typ-90 gehopft wurde (siehe 4.1.3.).

Die Anteile an Kohlenhydraten waren mit rund 21 ± 3 % sehr ähnlich verteilt, wobei Trübung **T.C** mit 23,9 % den höchsten Kohlenhydratanteil aufwies. Dies könnte durch die Verwendung von niedrig gelöstem Malz und damit einhergehend einem höheren Gehalt an β -Glucan erklärt werden. Diese Werte decken sich mit Literaturdaten von 15 – 23 % Kohlenhydratanteil in Trübungen aus unterschiedlichen Bieren (Bengough & Harris, 1955; Schulte *et al.*, 2016). Die größten Unterschiede konnten in der mengenmäßig dominierenden Proteinfraction festgestellt werden, wobei die mitunter sehr hohen Proteingehalte der fünf Biertrübungen zwischen 27 und 61 % lagen. Die Trübungen **T.A** und **T.B** wiesen deutliche Unterschiede im Gesamtproteingehalt auf, der mangels Informationen über die verwendeten Rohstoffe und den Brauprozess der beiden Brauereien aber nicht tiefreichend begründet werden konnte. Bei den Versuchsbieren zeigten die Trübungen **T.C** und **T.E**, welche beide nur einmal mit Pellets gehopft wurden, vergleichbare Proteingehalt mit rund 43 bzw. 50 %, während Trübung **T.D** den mit Abstand niedrigsten Proteingehalt aller fünf Biertrübungen aufwies. Dies könnte auf die zusätzliche Hopfung mit dem α -Säure-reichen CO₂-Extrakt zurückgeführt werden, wodurch bereits beim Brauprozess vermehrt proteinische Bestandteile ausgeschieden werden könnten. Im Vergleich zu den anderen vier Trübungen, zeigte Trübung **T.D** auch einen in etwa doppelt so hohen Gehalt an Hopfenphenolen, was angesichts der beschriebenen doppelten Hopfung sinnig ist. Die Anteile dieser Minorkomponenten lagen bei den anderen Trübungen bei $< 0,1$ Gew.-%. Der Restwassergehalt nach Lyophilisierung lag bei allen Proben < 5 %, allerdings konnten noch deutliche Unterschiede im Mineralstoffgehalt festgestellt werden. Während die Trübungen der beiden kommerziellen Biere, **T.A** und **T.B**, sehr geringe Ionengehalte von $< 0,1$ % aufwiesen, waren diese bei den drei Versuchsbieren erheblich höher, wobei sich der Unterschied zu **T.C** (5 %) sogar auf Faktor 50 belief.

Zusammenfassend stehen die vorliegenden Daten dahingehend im Einklang mit bisherigen Literaturdaten, dass auch in früheren Arbeiten enorme Varianzen hinsichtlich der Trübungszusammensetzungen festgestellt wurden. Bengough beispielsweise bezifferte in seiner Arbeit den Proteingehalt der untersuchten Alterungstrübung auf 44 – 59 % (Bengough & Harris, 1955). Er stellte dies in Relation zu vergleichbaren Arbeiten, wobei er anmerkte, dass unterschiedliche Autoren stark variierende Proteingehalte zwischen 25 und 69 % beschrieben. Später bezifferten Siebert *et al.* den Proteinanteil wiederum zu 17 – 32 % und den Kohlenhydratgehalt sogar auf 68 – 82 %, wohingegen Bengough lediglich von 2 – 4 % schrieb (Leiper *et al.*, 2003; Siebert *et al.*, 1981). Diese Varianzen decken sich mit den Daten der hier untersuchten Proben. Auch Polyphenol- und Metallgehalte werden in der Literatur mit weit streuenden Werten beziffert. Die Betrachtung solch kontroverser Daten zeigt zum einen die Komplexität der Biertrübungsbildung, zum anderen könnte die Annahme gemacht werden, dass es sich bei den ablaufenden Prozessen um unspezifische, willkürliche Vorgänge handelt und deshalb die Streuung, vor allen Dingen der quantitativen Daten, derart immens ist. Allerdings fielen im Rahmen dieser Arbeit auch sehr spezifische Anreicherungen auf, weswegen vermutet wurde, dass der Auslöser für die Präzipitationsvorgänge hochspezifische Reaktionen sein könnten, deren Produkte wie Impfkristalle wirken, auf Basis derer relativ unspezifische Folgereaktionen stattfinden können. Zu nennen sind beispielsweise die Verschiebung der Verhältnisse von polaren zu unpolaren Analyten in der Trübung im Vergleich zum Bier und die ausgeprägte Anreicherung von Metallionen (siehe 3.2.4. und 3.2.5.).

Wie bereits geschildert, konnten die Kompositionen der fünf untersuchten Biertrübungen **T.A**, **T.B**, **T.C**, **T.D** und **T.E** bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Basierend auf Literaturdaten ist jedoch zu vermuten, dass es sich hierbei teils um Polyphenole bzw. phenolische Säuren und Tannine handelt (Bengough & Harris, 1955; Belleau & Dadic, 1981; Dadic & Belleau, 1980; Delvaux *et al.*, 2000). Polymerisierte niedermolekulare Substanzen können mitunter analytisch schwer erfassbare Stoffgruppen darstellen, die anhand der hier angewandten, zielgerichteten Methoden nicht bestimmt werden konnten. Daneben wurden bei der Kohlenhydrat-Analytik (siehe 3.2.2.) nur Glucose-basierte Saccharide erfasst, Nicht-Glucose-Kohlenhydrate, wie z.B. Arabinose bzw. Arabinoxylan, Fructose und Fucose könnten ebenfalls noch einen gewissen Anteil der Trübung ausmachen (Buckee & Hargitt, 1977; Nogueira *et al.*, 2005; Rakete & Glomb, 2013). Die Lipidfraktion des Bieres, bestehend aus unterschiedlichen Fettsäuren, Hydroxyfettsäuren, Sterolen und fettlöslichen Vitaminen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehend untersucht. In Anbetracht der festgestellten Anreicherung hydrophober Substanzen und Lipidtransferproteinen in der Trübung könnten deshalb auch hier möglicherweise noch gewisse Anteile in den Kolloiden zu vermuten sein (Hamberg, 1991; Marion *et al.*, 2007; Souci

et al., 2008). Im Zuge der ICP-MS-Analyse (siehe 3.2.5.) wurden Metall- und Übergangsmetallkationen analysiert, wobei in der Matrix noch die entsprechenden Gegenionen enthalten sind. Ob und in welchem Umfang die Anionen ebenfalls Teil der Biertrübung sind, kann anhand der erhobenen Daten nicht hinreichend diskutiert werden, allerdings enthält Bier in der Regel größere Mengen der organischen Säuren Äpfelsäure und Citronensäure (Souci *et al.*, 2008). Ob diese im Verlauf der Alterung ebenfalls präzipitieren und damit zur Trübungsintensität beitragen können, wurde nicht untersucht. Wie bereits gezeigt, können unter anderem *iso*- α -Säuren im Verlauf der Bieralterung unterschiedlichen Abbaureaktionen unterliegen, deren Produkte in ihren chemischen Strukturen divers sind (Haseleu *et al.*, 2009a, 2009b; Intelmann & Hofmann, 2010; Intelmann *et al.*, 2011). Diese Abbau- und Umwandlungsprodukte könnten ebenfalls Bestandteile der Biertrübung sein, wurden aber aufgrund der Natur der zielgerichteten LC-MS/MS-Analyse im Zuge der durchgeführten Untersuchungen nicht bestimmt.

Während in früheren Arbeiten meist diejenigen Proteine oder Proteingruppen als *trübungsaktiv* bezeichnet wurden, von denen die höchsten Gehalte in Trübung vorlagen oder die sich im Verlauf der Bieralterung am stärksten abgereicherten, sind die Diskussionen neuerer Arbeiten meist zurückhaltender. Als trübungsaktiv gelten heute solche Substanzen, die tatsächlich an Schlüsselreaktionen, welche unmittelbar eine Präzipitation hervorrufen können, beteiligt sind, also als *trübungsauslösend* oder *-verursachend* bezeichnet werden können. Im Falle der Proteine konnte dies jedoch bislang noch nicht anhand von praxisrelevanten Studien, also z.B. in Bier-adäquaten Matrices, gezeigt werden, indem die Rolle eines Proteins bei der Trübungsbildung chemisch entschlüsselt wurde. Aber unabhängig davon, ob Proteine durch spezifische Wechselwirkungen präzipitieren oder im Verlauf der Bieralterung von anderen Substanzen als Trübungsbestandteile mitgerissen werden, stellen sie einen quantitativen Hauptbestandteil der Biertrübung dar und nehmen so mindestens Einfluss auf die Trübungsintensität. Daher war eine eingehende Untersuchung des Bier- und Biertrübungsproteoms essentiell für das Verständnis beider Matrices. Zudem zählen Proteine zu den mitunter am stärksten beforschten und diskutierten Trübungsbestandteilen.

Der Vergleich von frischem und gealtertem Bier mittels *Bradford*-Assay (siehe 3.2.1.2.) zeigte, dass sich die Proteinfraction insgesamt im Verlauf der Alterung nahezu vollständig abreichert. Diese Daten ergänzten sich gut mit den Erkenntnissen aus der SDS-PAGE-Analyse, im Zuge derer ebenfalls eine deutliche Intensitätsabnahme der Proteinbanden im gealterten Bier zu beobachten war und sich entsprechend dazu stark ausgeprägte Banden bei der

korrespondierenden Trübung zeigten (siehe 3.2.1.1.). Im Speziellen zeigten sich hier die Banden bei 10 kDa (LTP) und 40 kDa (Serpine) als besonders intensiv.

Die im Rahmen des holistischen Ansatzes herausgearbeiteten Proteinlisten der abundantesten Proteine in Bier und Biertrübung stimmten gut mit Literaturdaten überein. Einige Autoren beschrieben bereits einen trübungsaktiven Charakter für die Proteine CMe, BDAI-1 und Hordein (Asano & Hashimoto, 1980; Asano *et al.*, 1982; Evans *et al.*, 2003; Imure *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2007; Siebert, 1999). In früheren Arbeiten wurde oftmals ein Fokus auf den Einfluss der prolinreichen Hordeine auf die Trübungsbildung gelegt (Asano *et al.*, 1982; Asano *et al.*, 1984; Siebert & Lynn, 1997). Speziell die Gruppe um Asano publizierte Arbeiten, in denen sie Gerstenproteine als hauptsächlich trübungsverantwortlich charakterisierten und Hordeine als ausschlaggebend für die initiale Phase der Trübungsbildung einstufen (Asano *et al.*, 1982; Asano *et al.*, 1984). Dies konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Unter den Top 20 Proteinen der untersuchten Trübungen war Serpin Z4 das dominierende Protein, wohingegen Hordein nur in zwei Trübungsproben, **T.B** und **T.D**, unter den 20 abundantesten Proteinen nachgewiesen wurde (siehe 3.2.1.3.). Zu beachten ist hierbei allerdings, dass Asano *et al.* vorrangig *chill haze* untersuchten, während sich die hier durchgeführten Experimente mit *age-related haze* befassten. Der tatsächliche Einfluss von Hordeinen auf die Trübungsbildung wurde in neueren Forschungsarbeiten dennoch tendenziell angezweifelt. Als majore Proteine der Biertrübung wurden unter Anwendung unterschiedlicher MS-basierter Methoden vorrangig die Proteine Z4, Z7, LTP1, BDAI-1, CMe, CMb, 3a und Bwiph nachgewiesen, Hordeine hingegen konnten nur in Ausnahmefällen und als Minorkomponenten der Proteinfraction der Trübungspartikel beobachtet werden (Imure *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011, 2012; Perrocheau *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2019). Diese Daten decken sich qualitativ mit den erarbeiteten Proteinlisten, allerdings existieren bislang keine vergleichbaren quantitativen Literaturdaten zum Bier- und *haze*-Proteom, z.B. zur Gegenüberstellung der iBAQ-Werte der identifizierten Proteine.

Es sollte beachtet werden, dass bei der holistischen Proteomanalyse Hopfenproteine aufgrund der schwachen Datenlage zum Zeitpunkt der Analysen im Hinblick auf Proteindatenbanken nicht in die Auswertung miteinbezogen werden konnten. Gerade Hopfenprodukte wie Pellets oder (getrocknete) Dolden könnten, je nach Art des Hopfenregimes, sowohl qualitativ als auch quantitativ einen bedeutenden Beitrag zum Bierproteom leisten. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit nur tryptische Peptide analysiert, da die Vergleichbarkeit mit Literaturdaten hier als am größten erachtet wurde. Wie die Daten jedoch zeigten, wurden in jeder Trübungsprobe unter den Top 20 Proteinen mindestens zwei Trypsin-Inhibitoren des

Typs CMa, CMb, CMd bzw. CMe in größeren Mengen detektiert. Dahingehend muss die Möglichkeit von Diskriminierungen durch Inhibierungen der verwendeten Protease beim In-Gel-Verdau bedacht werden.

Daneben unterliegen Proteine im Verlaufe der Bieralterung etwaigen chemischen Veränderungen, wie Glykierungen, Sulfatierungen, Phosphorylierungen und Oxidationen. Speziell an Lipidtransferproteinen (LTP) und Serpinen wurde eine Vielzahl, meist unstöchiometrischer posttranslationaler Modifikationen (PTM) nachgewiesen. Am häufigsten treten PTM in Form von Glykierungen an Lysinseitenketten sowie Oxidationen von Methionin, Prolin und Tryptophan auf (Jongberg *et al.*, 2020; Perrocheau *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2018). Dies kann dazu führen, dass ein Protein nach einer PTM anhand eines Datenbankabgleichs der Spaltpeptide nicht mehr als das ursprüngliche Protein identifiziert werden kann, da die detektierten Peptidfragmente nicht mehr den theoretischen Spaltpeptiden des nativen Proteins zugeordnet werden können. Außerdem tragen unterschiedliche PTM an einem Protein zu mehrfachen Annotationen dieses Proteins bei der Datenauswertung bei.

Neben dem Anteil an proteinischem Material zeichneten Kohlenhydrate für einen maßgeblichen Massenanteil der Biertrübung von rund 20 % verantwortlich (siehe 3.2.2.). Allerdings konnten anhand der durchgeführten Analyse keine Rückschlüsse auf die Ursprünge der nach saurer Vollhydrolyse bestimmten Glucose gezogen werden. Bier stellt eine kohlenhydratreiche Matrix da, weswegen sowohl der Niederschlag von Oligo- und Polysacchariden als auch die Präzipitation von niedermolekularen Zuckereinheiten als möglich betrachtet werden können. Des Weiteren beschrieben, wie eingangs und im vorangegangenen Absatz erläutert, bereits mehrere Autoren die Glykierung von Proteinen im Verlauf der Bierherstellung, z.B. durch die Reaktion von Lysinseitenketten mit Hexosen im Zuge des Maischens und der Würzekochung. Dies konnte unter anderem sehr ausgeprägt für LTP1 gezeigt werden, welches ebenfalls in größeren Mengen in Biertrübung nachgewiesen wurde (Stanislava, 2010). Ein wesentlicher Anteil der Kohlenhydrate in den Trübungspartikeln könnte also von glykierten Proteinen stammen. Im Hinblick auf die hohen Gesamtproteingehalte der Trübungsproben ist es denkbar, dass ein wesentlicher Teil glykiert vorliegt. Dies würde zu hohen Kohlenhydratgehalten der Biertrübung führen, ohne dass Polysaccharide direkt chemisch an den präzipitationsauslösenden Reaktionen beteiligt sind. Unter Umständen kommt Kohlenhydraten damit eine indirekte Rolle bei der Trübungsbildung zu. Dadurch, dass im Zuge des Herstellungsprozesses Polysaccharide in kleinere, besser löslichere und reaktivere Saccharide gespalten werden, können Proteine überhaupt erst PTMs unterworfen

werden, was wiederum deren Löslichkeiten verbessert und dazu führt, dass sie bis ins fertige Bier und schlussendlich in die Biertrübung gelangen können.

Ebenfalls in Verbindung mit den hohen Proteingehalten in Biertrübung könnte die Anreicherung von Hopfenmetaboliten in den Trübungspartikeln gebracht werden. Die Wechselwirkungen von Hopfenbittersäuren mit Bierproteinen wurden bereits ausgiebig in der Fachwelt diskutiert, wobei meist der Einfluss der Sekundärmetabolite auf die Schaumqualität im Fokus stand (Evans *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2011; Evans & Sheehan, 2018; Hughes, 2000). Ein direkter Einfluss der Hopfenphenole auf die Trübungsbildung konnte bislang allerdings noch nicht gezeigt werden. Jedoch wurden die als schaumaktiv bekannten Proteine, wie z.B. LTP1 und Serpin Z4, auch in bedeutenden Mengen in der Biertrübung nachgewiesen und auch andere Autoren zogen bereits Parallelen zwischen Schaumproteinen und solchen, die im Präzipitat nachgewiesen wurden (Asano *et al.*, 1982; Dietz, 2019; Evans *et al.*, 2011; Jimure *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2008; Sorensen *et al.*, 1993). Demnach schien es sinnig, dass bei hohen Proteingehalten in der Trübung auch ein entsprechender Gehalt an Hopfensäuren festzustellen war.

Hierbei konnten speziell starke Anreicherungen der sehr hydrophoben und in Bier nur gering konzentrierten Humulone (**3-5**) und Lupulone (**6-8**) nachgewiesen werden, welche auf die diskutierten Wechselwirkungen mit der Proteinfraction zurückgeführt werden könnten, sowie eine spezifische Anreicherung von Xanthohumol (**1**) im Vergleich zum hydrophileren Isoxanthohumol (**2**). Hier zeigte sich die Besonderheit, dass sich im Zuge der Bieralterung beide Metabolite nahezu vollständig im Bier abreicherten und im gealterten Bier nicht mehr nachweisbar waren, sich das Konzentrationsverhältnis aber dennoch um den Faktor 3 hin zum hydrophoberen Xanthohumol (**1**) verschob (siehe 3.2.4.). Würden beide Substanzen gleichermaßen und vollständig als Trübungsbestandteile präzipitieren, dürfte sich ihr molares Verhältnis in der Trübung nicht maßgeblich ändern. Dennoch lag eine deutliche Anreicherung von Xanthohumol (**1**) gegenüber Isoxanthohumol (**2**) vor, was auf selektive Prozesse hindeutete.

Eine Erklärung könnte eine sukzessive chemische Umsetzung von Isoxanthohumol (**2**) zurück zu Xanthohumol (**1**) im Verlauf der Lagerung sein. Bei der Isomerisierung von Xanthohumol (**1**) zu Isoxanthohumol (**2**), welche säurekatalysiert und unter hohen Temperaturen bei der Würzekochung abläuft, handelt es sich um eine *Michael*-Addition, wie in Abbildung 29 dargestellt (Michael, 1887; Stevens *et al.*, 1999).

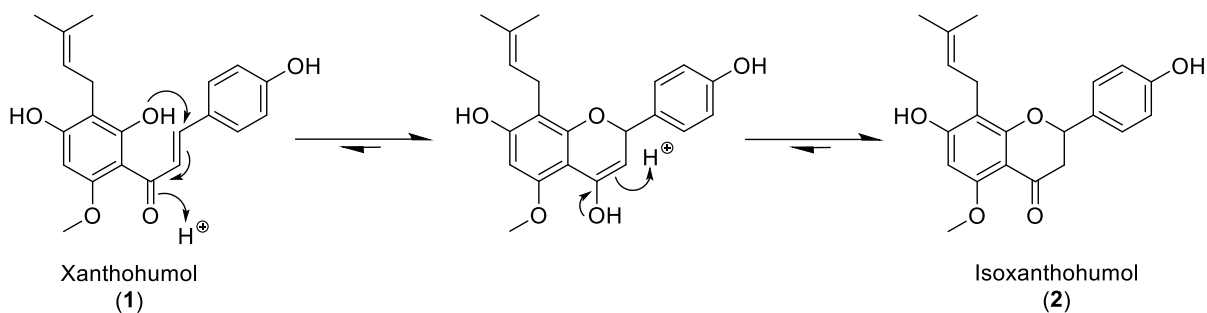


Abbildung 29: Isomerisierung von Xanthohumol (1) zu Isoxanthohumol (2) im Zuge einer *Michael-Addition* (Michael, 1887), einer säurekatalysierte Gleichgewichtsreaktion, wie sie z.B. bei der Würzekochung stattfindet (Stevens *et al.*, 1999).

Durch die nucleophile Addition der phenolischen Hydroxylgruppe an die α,β -ungesättigte Ketofunktion des Xanthohumols (1) erfolgt ein thermodynamisch begünstigter Hexagon-Ringschluss zum Isoxanthohumol (2). *Michael-Additionen* sind naturgemäß Gleichgewichtsreaktionen und bereits Verzele *et al.* konnten zeigen, dass Isoxanthohumol (2) sowohl basen-, als auch säurekatalysiert wieder zu Xanthohumol (1) zurückreagieren kann (Verzele *et al.*, 1957). Das thermodynamische Gleichgewicht liegt jedoch weit auf der Seite des Isoxanthohumols (2). Würde der Lösung Xanthohumol (1) allerdings selektiv entzogen, stellte sich das Gleichgewicht stets neu ein, und der Gehalt an Isoxanthohumol (2) nähme dadurch sukzessive ab. Dies wäre erklärbar durch sehr starke oder irreversible hydrophobe Wechselwirkungen von Xanthohumol (1) mit der Biertrübungsmatrix. Hierdurch würde Xanthohumol (1) der Gleichgewichtsreaktion durch Präzipitation konstant entzogen und reicherte sich so in der Trübung gegenüber dem Isoxanthohumol (2) an. Die Wechselwirkungen von Isoxanthohumol (2) mit der Biertrübungsmatrix hingegen sind als schwächer und reversible anzunehmen, sodass es immer in sehr geringen, nicht nachweisbaren Konzentrationen frei in Lösung vorliegt und zu Xanthohumol (1) zurückreagieren kann. Diese Hypothese könnte durch ein Lagerungsexperiment untersucht werden, in dem ungehopftes Bier ausschließlich mit Isoxanthohumol (2) dotiert und für längere Zeit gelagert wird. Die sich im Verlauf der Alterung bildenden Trübungspartikel sollten entsprechend Xanthohumol (1)-haltig sein. Des Weiteren könnten die beiden Substanzen unterschiedlichen Abbauwegen unterliegen, die dazu führen, dass nur Teile der ursprünglich im Bier vorhandenen Mengen an Xanthohumol (1) und Isoxanthohumol (2) zu Inhaltsstoffen der Trübung werden und der Rest andere Abbauewege durchläuft, wodurch sich die Verhältnisse ebenfalls verschieben würden.

Zusammenfassend deuteten die ermittelten Anreicherungen der Hopfenphenole darauf hin, dass es sich bei dieser Stoffklasse um interessante Analyten hinsichtlich der Trübungsbildung

handeln könnte. Daher wurde ihr Einfluss auf die Trübungsstabilität von Bier gezielt untersucht (siehe 3.3.2.).

Ebenso wie im Falle der Hopfenphenole konnten auch für Metallionen mutmaßlich hochspezifische Anreicherungen in Biertrübung festgestellt werden (siehe 3.2.5.). Wie aufgrund einschlägiger Fachliteratur zu erwarten war, zeigte sich im nativen Bier Kalium (**K**) als abundantestes Ion (Souci *et al.*, 2008). In der Trübung hingegen reicherte sich Calcium (**Ca**) in erheblichem Umfang an, ebenso wie andere zwei- bzw. potentiell mehrwertige Ionen, insbesondere die Übergangsmetalle Eisen (**Fe**) und Kupfer (**Cu**) dominierten hier mit Anreicherungsfaktoren um 10.000. Auch Bengough beschrieb bereits eine starke Anreicherung von **Fe** und **Cu** in Biertrübung um den Faktor 4000 – 80.000 und Chapon außerdem, dass die molare Verteilung der Metalle im Bier nicht der in der Trübung entsprach (Bengough & Harris, 1955; Chapon, 1965). Die genauen Ursachen für die Anreicherung dieser Elemente in der Trübung konnten bislang noch nicht vollständig geklärt werden, aufgrund der vielfältigen Bindungsaffinitäten von beispielsweise **Fe**, könnten jedoch unterschiedliche Mechanismen eine Rolle für den Eintrag in die Trübungspartikel spielen. In Anbetracht der hohen Proteingehalte der Trübungen wäre es möglich, dass die Ionen teilweise in Proteinkomplexen eingebunden präzipitieren, wobei u.a. Melanoidine die Fähigkeit aufweisen, **Fe** zu binden, die bekanntermaßen bei der Mälzung entstehen (Hashimoto, 1972; Morales, 2005). Auch Lipidtransferproteine und Peptide der Gerste können hohe Bindungsaffinitäten zu Metallionen aufweisen, weshalb bei hohen LTP-Gehalten in der Trübung auch hohe Metallgehalte möglich sind (Bamdad & Chen, 2013; Eckert *et al.*, 2014; Gorjanović *et al.*, 2004).

Neben Proteinen werden Metalle auch von Kohlenhydraten gebunden (Alekseev *et al.*, 1998; Gyurcsik & Nagy, 2000; Weymouth-Wilson, 1997). In Kombination mit den hohen Kohlenhydrat-Gehalten der Trübungen könnte dies ebenfalls eine Möglichkeit des Eintrags der Ionen in die Kolloide sein. Teile der unersuchten Trübungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert, aber es ist zu vermuten, dass hierunter auch ein gewisser Anteil an Polyphenolen vorliegt. Für komplexe Matrices konnte gezeigt werden, dass Polyphenole und Hydroxylgruppen im Allgemeinen **Fe** komplexieren können (Brune *et al.*, 1991). Angesichts der komplexen Matrix der Biertrübung könnten die Möglichkeiten von Ioneneinträgen also vielfältig sein. Dennoch stellten die spezifischen Anreicherungen einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen betreffend die Trübungsaktivität der Metallionen dar (siehe 3.3.3.).

3.3. Identifizierung trübungsauslösender Bierinhaltsstoffe

Die umfassende Qualifizierung und Quantifizierung hoch- und niedermolekularer Inhaltsstoffe der Biertrübung brachte neue Erkenntnisse über deren molekulare Zusammensetzung hervor. Neben der ausgeprägten Anreicherung unpolarer Analyten, wie Xanthohumole (**1,2**) und Lupulone (**6,7,8**), konnten auch hohe Metallgehalte in den untersuchten Trübungspartikeln festgestellt werden, wobei insbesondere eine starke Anreicherung von Calcium (**Ca**) sowie der Übergangsmetalle Eisen (**Fe**), Kupfer (**Cu**) und Zink (**Zn**) zu beobachten war. Die Proteinfraction wurde detailliert analysiert, der Gesamtproteingehalt quantifiziert und die abundantesten Proteine in der Biertrübung identifiziert. Proteine konnten als majore Bestandteile der Biertrübung eingestuft werden, daneben zeigten sich hohe Gehalte an Kohlenhydraten und bis zu 5 % Kristallwasser. Basierend auf dem erlangten Wissen über die molekulare Zusammensetzung der Biertrübung, sollten nun jene Faktoren identifiziert werden, welche der initialen Trübungsbildung zugrundeliegen.

3.3.1. Einflüsse hoch- und niedermolekularer Bierinhaltsstoffe auf die Trübungsstabilität

Die Quantifizierung des Proteingehaltes der Biertrübung zeigte, dass Proteine einen maßgeblichen Mengenanteil der Trübung ausmachen (siehe 3.2.1.2.). Die untersuchten Trübungen wiesen Proteingehalte von bis zu 60 % auf und stellten damit regelrechte Proteinisolate dar. Daher sollte zunächst untersucht werden, unter welchen Bedingungen hochmolekulare Bierinhaltsstoffe, wie beispielsweise Proteine, zur Präzipitation gebracht werden und inwiefern diese Prozesse von niedermolekularen Bierkomponenten beeinflusst werden. Hierzu wurde Bier **B.B** als kommerzielles, in gleichbleibender Qualität verfügbares, unstabiliertes und in vorangegangenen Studien bereits detailliert analysiertes Vollbier verwendet, welches bei den Untersuchungen der Trübungsstabilitäten kommerzieller Biere mittlere Stabilitätswerte aufwies (siehe 3.1.). Damit konnte erwartet werden, dass im Zuge der forcierten Alterungen unter verschiedenen Bedingungen sowohl stabilisierende als auch trübungsfördernde Effekte erkannt werden können. Bier **B.B** wurde für das folgende Experiment, wie unter 4.2. beschrieben, mittels Ultrafiltration in die hochmolekulare Fraktion (**B.HMW**) und die niedermolekulare Fraktion (**B.LMW**) separiert. Der Proteingehalt der beiden Fraktionen wurde mittels Bradfordassay bestimmt, wobei sich zeigte, dass die HMW das komplette Proteom enthielt, während in der LMW kein proteinisches Material mehr nachweisbar war (Daten nicht dargestellt).

Anschließend wurden die gewonnenen Fraktionen in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen bezogen auf die originäre Bierkonzentration rekombiniert (siehe 4.9.1.) und wie unter 4.3. beschrieben einer forcierten Alterung unterzogen und dabei die Trübungsintensität der Rekombinate verfolgt. Die Bezeichnungen „0“ bis „4“ entsprechen jeweils der auf die ursprüngliche Bierkonzentration bezogenen Konzentration der jeweiligen Fraktion. Wobei „0“ bedeutet, dass die Fraktion nicht zugesetzt wurde, „1“ bedeutet, dass sie in Bierkonzentration zugesetzt wurde und „2“, „3“ und „4“, dass sie in doppelter, dreifacher bzw. vierfacher Bierkonzentration zugegeben wurde. Damit entspräche **1HMW+1LMW** also dem **Bierrekombinat**, nach Wiedervereinigung der beiden Ultrafiltrationsfraktionen in originärer Bierkonzentration. Abbildung 30 zeigt die resultierenden Trübungsverlaufskurven, wobei einmal die LMW-Konzentration gegenüber einer konstanten HMW-Konzentration erhöht wurde (Abbildung 30 oben) und umgekehrt einmal die HMW-Konzentration gegen eine konstante LMW-Konzentration erhöht wurde (Abbildung 30 unten).

Während die HMW ohne Zugabe der LMW ein trübungsstabiles System darstellte (**1HMW+0LMW**), trat bei Zugabe der LMW-Fraktion unmittelbar eine Trübungsbildung auf, die sich mit steigender LMW-Konzentration rasch intensivierte. Während das Bierrekombinat (**1HMW+1LMW**) in seiner Stabilität annähernd dem nativen Bier **B.B** entsprach, führte bereits eine Verdopplung des LMW-Anteils verglichen mit der originären Bierkonzentration (**1HMW+2LMW**) zu einem starken Anstieg der Trübungsbildung. Dies zeigte, wie sensibel das System Bier auf geringe Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung mit signifikanten Verschlechterungen der Trübungsstabilität reagieren kann.

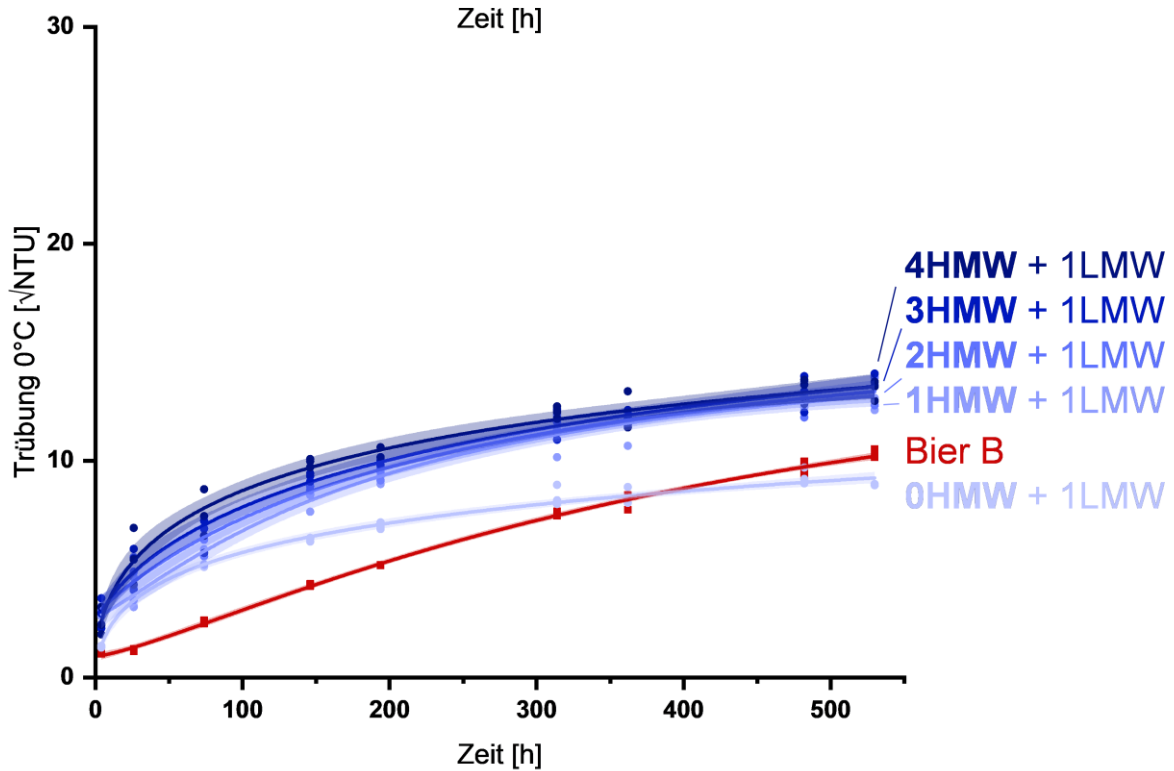
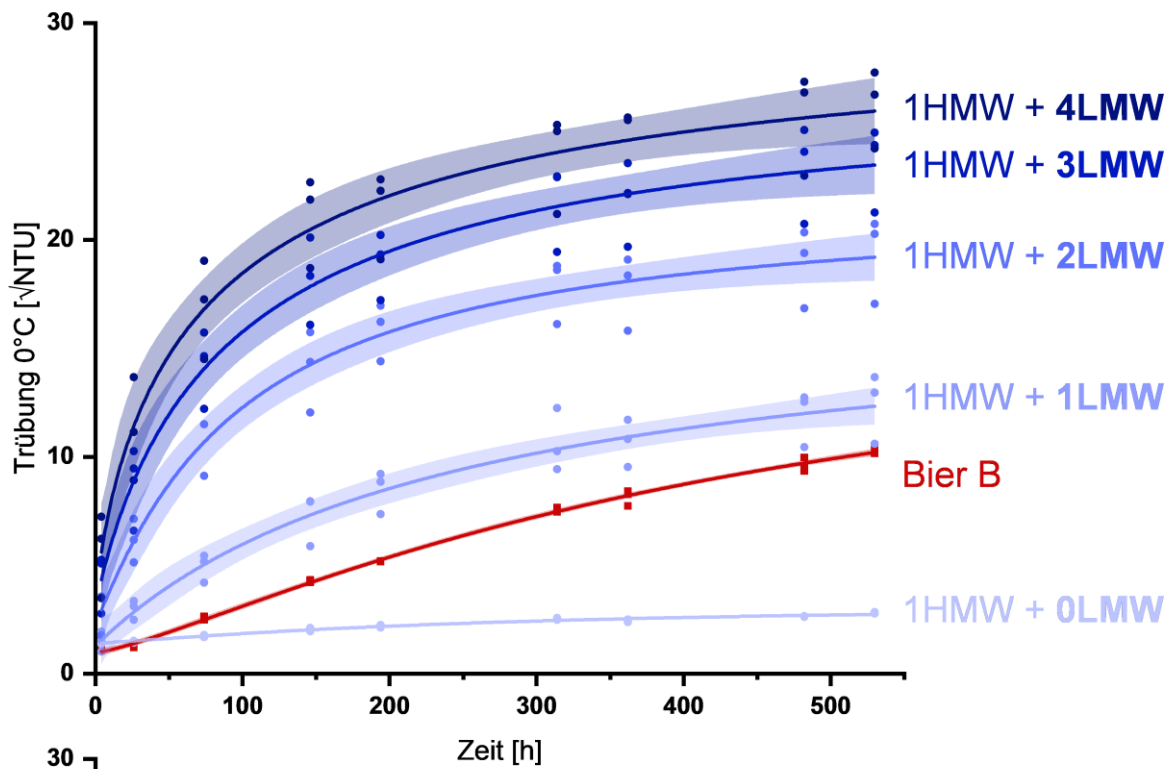


Abbildung 30: Trübungsverlaufskurven unterschiedlicher Rekombinate aus der mittels Ultrafiltration (*cut off* 1 kDa) aus Bier B.B gewonnenen hochmolekularen (B.HMW) und niedermolekularen (B.LMW) Fraktion. Oben: Sukzessive Erhöhung der LMW-Konzentration (keine Zugabe der LMW [0LMW] bis 4-fache Bierkonzentration der LMW [4LMW]) gegenüber einer konstanten HMW-Konzentration in Bierkonzentration [1HMW]. Unten: Sukzessive Erhöhung der HMW-Konzentration (keine Zugabe der HMW [0HMW] bis 4-fache Bierkonzentration der HMW [4HMW]) gegenüber einer konstanten LMW-Konzentration in Bierkonzentration [1LMW]. Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar (n = 3).

Während im Zuge der sukzessiven Erhöhung des LMW-Anteils die Trübungsintensität konsequent anstieg (Abbildung 30 oben), war dies bei einer Erhöhung der HMW-Konzentration nicht zu beobachten (Abbildung 30 unten). Hier wurde bald ein Plateau der Trübungsbildung erreicht, welches offenbar durch den LMW-Anteil limitiert ist. Interessanterweise wies die LMW in Bierkonzentration ohne Zugabe der HMW (**0HMW+1LMW**) bereits in etwa die Trübungsneigung des nativen Bieres **B.B** auf. Jedoch mit dem Unterschied, dass die Trübungsverlaufskurve von **0HMW+1LMW** zu einem späten Zeitpunkt abflachte, wodurch sie sich bei ca. 400 h mit der weiter ansteigenden Trübungsverlaufskurve des nativen Bieres **B.B** kreuzte. Dies kann ein Indiz dafür sein, dass initial die LMW maßgeblich für die Auslösung der Trübung ist, im Verlauf der Trübungsbildung dann allerdings HMW-Komponenten wie Proteine und Polysaccharide mitgerissen werden, was die Trübungsintensität quantitativ beeinflusst. Dies würde die stärkere Trübung des nativen Bieres **B.B** im Vergleich zur Probe **0HMW+1LMW** erklären, da im Bier noch hochmolekulare Substanzen enthalten sind, die copräzipitieren und so insgesamt höhere Trübungswerte verursachen. Gestützt wird diese These von der Tatsache, dass eine Erhöhung des HMW-Anteils über die Bierkonzentration hinaus keine Auswirkung mehr auf das Ausmaß der Trübungsbildung hat. Außerdem decken sich damit diese Daten mit den Ergebnissen der durchgeführten Proteomik-Studien, wonach Proteine entsprechend ihrer Abundanzen im Bier auch in der Trübung wiederzufinden waren und demnach keine spezifischen Wechselwirkungen der Proteinfraction bzw. einzelner Proteine zu vermuten waren, die zur Trübungsbildung führen.

Auf Grundlage dieses Experiments war demnach anzunehmen, dass niedermolekulare Komponenten den limitierenden Faktor bei der Trübungsbildung darstellen und die LMW die initial trübungsverursachenden Substanzen enthält, welche letztendlich einen entscheidenden Einfluss auf die Präzipitation der Proteinfraction des Bieres haben können. Daher wurde im Folgenden speziell der Einfluss der niedermolekularen Bierfraktion auf die Trübungsneigung untersucht, um trübungsverantwortliche Substanzen zu identifizieren.

3.3.2. Einfluss von Hopfenphenolen auf die Trübungsstabilität

Nachdem der starke Einfluss der LMW auf die Trübungsneigung von Bier gezeigt werden konnte, sollte auf Basis der bereits erhobenen Quantifizierungsdaten gezielt nach trübungsverursachenden Bierinhaltsstoffen gesucht werden, welche zur Präzipitation der hochmolekularen Bierfraktion beitragen.

Hierzu wurden zunächst Hopfenkomponenten eingehender untersucht, da für diese, wie unter 3.2.4. beschrieben, hohe Anreicherungsfaktoren in der Biertrübung festgestellt werden konnten. Es wurde vermutet, dass sie im Zuge selektiver Prozesse unter anderem mit Proteinen wechselwirken und diese dadurch denaturieren könnten, wodurch es zum Trübungseintritt kommt. Bier **B.B** wurde deshalb mit Xanthohumol (**1**) und mit unterschiedlichen Hopfenextrakten versetzt und forciert gealtert (siehe 4.9.2.). Der Einsatz von Extrakten diente der Abdeckung einer großen Bandbreite diverser polyphenolischer Substanzen, die während des Brauprozesses aus dem Hopfen ins Bier übergehen. Für die Forcierung wurden ein α -Säuren-Extrakt (Abdeckung der Stoffklasse der Humulone (**3-5**)), ein β -Säuren-Extrakt (Abdeckung der Stoffklasse der Lupulone (**6-8**)) und ein *iso*- α -Säuren-Extrakt (Abdeckung der Stoffklasse der Isohumulone (**9-14**)) verwendet. Die Trübungsverlaufskurven des dotierten Bieres sowie der unbehandelten Referenz sind Abbildung 31 zu entnehmen.

Interessanterweise zeigten weder das Xanthohumol (**1**), noch einer der Hopfenextrakte einen trübungsverstärkenden Einfluss. Die Kurvenverläufe der dotierten Biere und der unbehandelten Kontrollen waren über den Forcierungszeitraum hinweg nahezu identisch. Basierend auf den Erkenntnissen der quantitativen Untersuchungen der Biertrübung, wäre ein Zusammenhang der hydrophoben Hopfeninhaltsstoffe mit der Trübungsbildung bzw. -auslösung naheliegend gewesen (siehe 3.2.4.). Allerdings erwiesen sich weder die Hopfenbittersäuren noch das Xanthohumol oder die ebenfalls in den Hopfenextrakten vorliegenden Polyphenole als trübungsbeeinflussend.

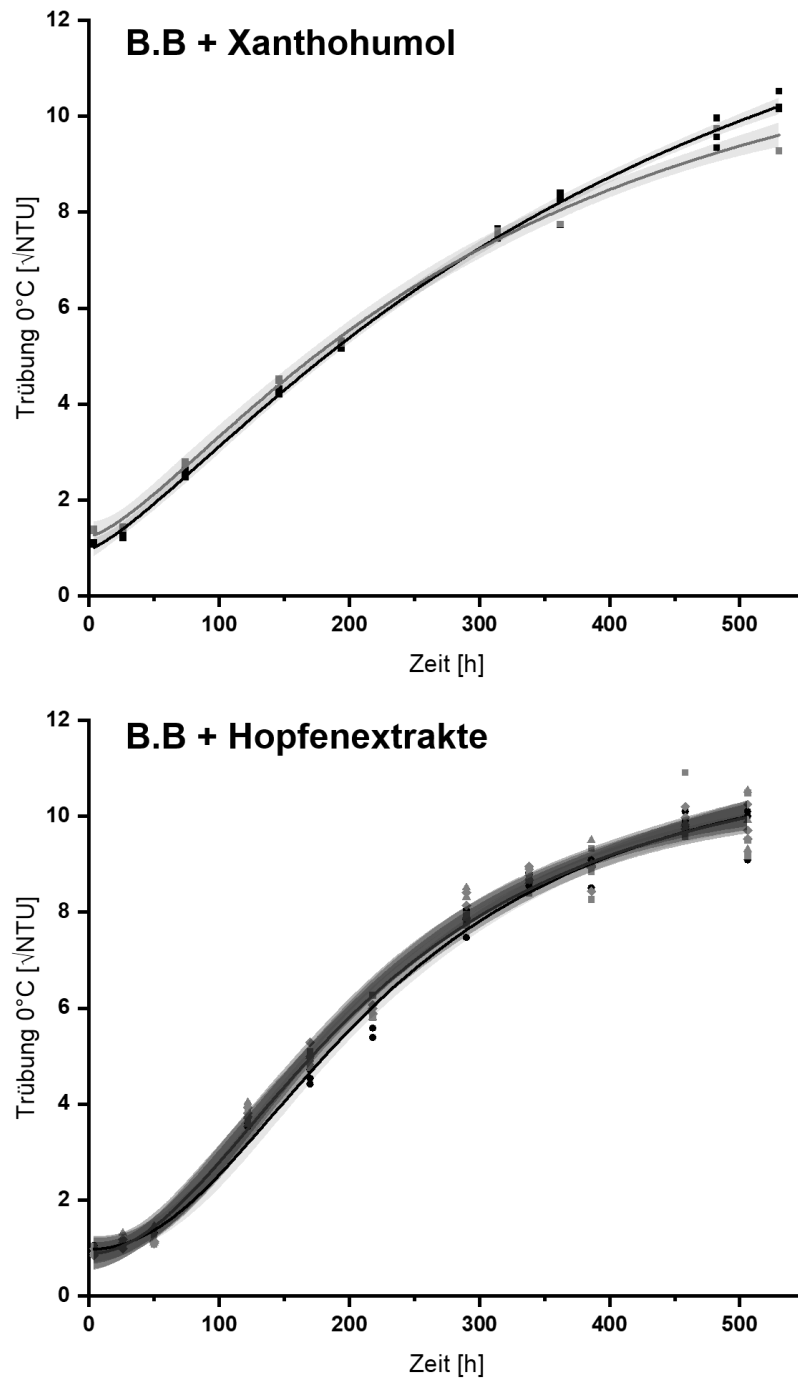


Abbildung 31: Trübungsverlaufskurven zum Einfluss von Hopfeninhaltsstoffen in 20-facher Bierkonzentration auf die Trübungsstabilität von Bier B.B. Oben: Bier B.B. dotiert mit Xanthohumol (grau) im Vergleich zum unbehandelten Bier B.B. (schwarz). Unten: Bier B.B. dotiert mit unterschiedlichen Hopfenextrakten (grau; ▲ α -Säuren-Extrakt, ◆ β -Säuren-Extrakt, ■ *iso*- α -Säuren-Extrakt) im Vergleich zum unbehandelten Bier B.B. (schwarz). Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar (n = 3).

Eine Erklärung für die dennoch enorme Anreicherung der Hopfenmetabolite in den Trübungspartikeln könnte in den physiko-chemischen Eigenschaften der Biertrübung liegen. Kolloide können hydrophobe Substanzen anlagern und haben für gewöhnlich negative Oberflächenladungen (Hofmann, 2004). Xanthohumole, α - und β -Säuren könnten demnach durch hydrophobe Wechselwirkungen an Kolloidpartikel anhaften und außerdem durch ihren Lewis-Säure-Charakter die Partikel insgesamt stabilisieren, indem sie das negative Potential an der Kolloidoberfläche wie eine Art Tensid stabilisieren. Des Weiteren sind Wechselwirkungen von Hopfenbittersäuren mit Bierproteinen hinreichend bekannt und eingehend erforscht (Evans & Sheehan, 2018; Hughes, 2000). Starke Interaktionen könnten dazu führen, dass an Protein adsorbierte Hopfeninhaltsstoffe bei der Präzipitation des Proteins mitgerissen werden und sich deshalb in der Trübung anreichern. Nachdem keine trübungsbeeinflussenden Effekte der Hopfenphenole nachgewiesen werden konnten, musste die Ursache für den trübungsauslösenden Charakter der LMW in anderen niedermolekularen Komponenten des Bieres zu finden sein. Neben den Hopfensäuren zeigten auch Metallionen ausgeprägte Anreicherungen in der Biertrübung, weshalb diese im Folgenden näher untersucht wurden.

3.3.3. Einfluss von Metallionen auf die Trübungsstabilität

In Biertrübung konnten bis zu 3 g/kg Calcium (**Ca**) und außerdem hohe Anreicherungsfaktoren der Übergangsmetalle festgestellt werden (siehe 3.2.5.). Um zu untersuchen, ob Metallionen einen Beitrag zur Trübungsbildung leisten, wurde Bier **B.B** mit dem Chelatbildner Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt, um Metallionen zu komplexieren und aus dem Bier zu entfernen. Die Trübungsverlaufskurven der forcierten Alterung des EDTA-behandelten Bieres im Vergleich zum unbehandelten Bier **B.B** sind Abbildung 32 zu entnehmen.

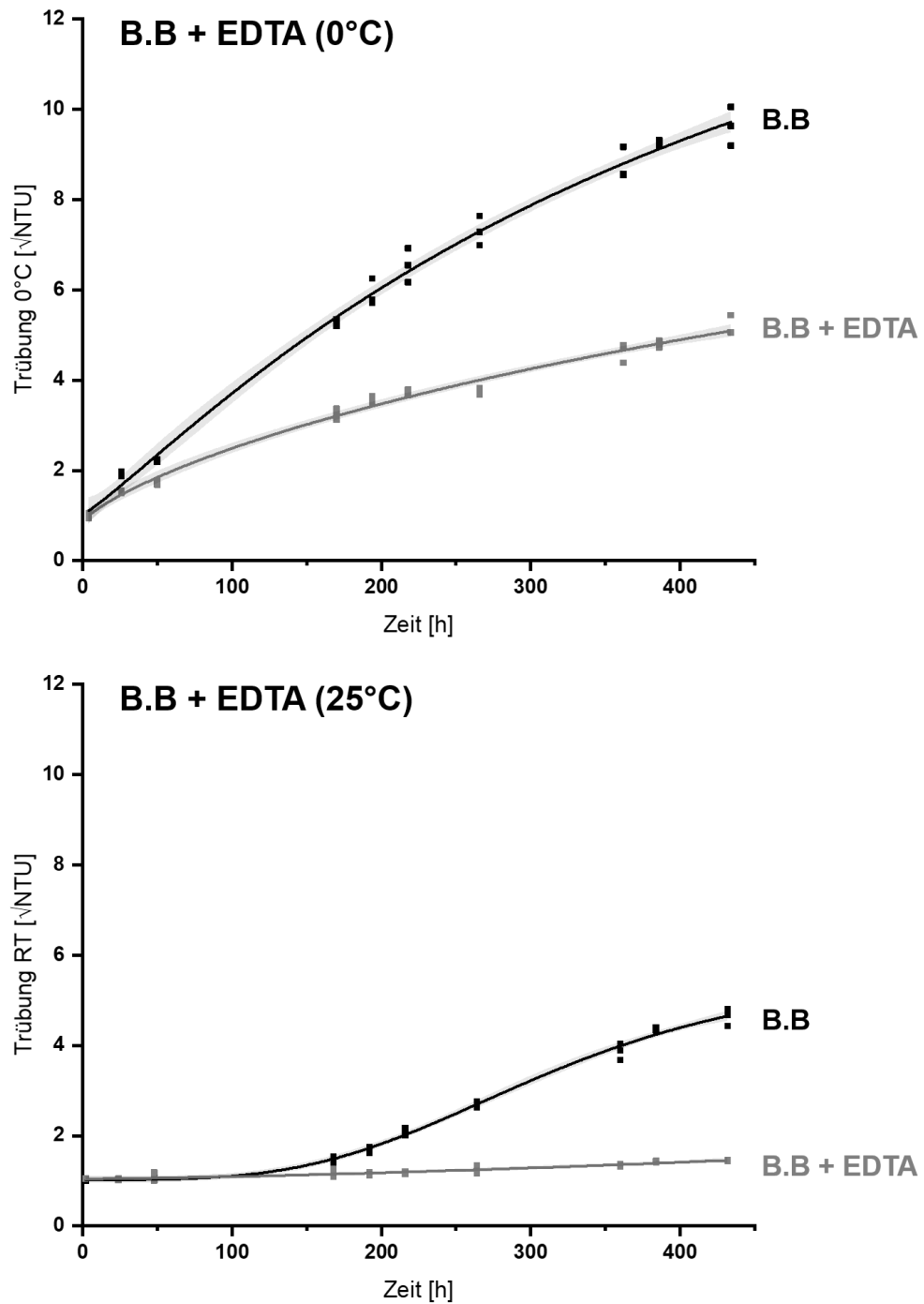


Abbildung 32: Trübungsverlaufskurven zum Einfluss von EDTA auf die Trübungsstabilität von Bier B.B. Oben: Messung der Gesamttrübung (NTU bei 0 °C) des EDTA-dotierten Bieres B.B (grau) im Vergleich zum unbehandelten Bier B.B (schwarz). Unten: Messung der Dauertrübung (NTU bei RT) des EDTA-dotierten Bieres B.B (grau) im Vergleich zum unbehandelten Bier B.B (schwarz). Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar (n = 3).

Wie sich zeigte, führt eine Behandlung mit EDTA zu einer weitgehenden kolloidalen Stabilisierung des Bieres und hinsichtlich der Dauertrübung sogar zu einem beinahe vollkommen trübungsstabilen System. Während sich im EDTA-dotierten Bier die Kälte-trübung noch in geringem Maße ausbildet (Abbildung 32 oben), ist über den Forcierungszeitraum hinweg praktisch kein Eintritt der Dauertrübung zu beobachten (Abbildung 32 unten). Dieses Ergebnis deckt sich mit einem Befund von Kaneda, der ebenfalls eine trübungsstabilisierende Wirkung von EDTA feststellte. Allerdings wendete dieser eine andere Forcierungsmethode an und verfolgte die Trübungsbildung nur über einen kürzeren Zeitraum von 5 Tagen (Kaneda *et al.*, 1990).

Aus dem Experiment konnte folglich zwar geschlossen werden, dass Metallionen potentiell einen trübungsfördernden Charakter aufweisen, allerdings bindet EDTA neben dem in der Trübung abundantesten Metall **Ca** auch andere Kationen, wie z.B. Eisen (**Fe**), Kupfer (**Cu**), Magnesium (**Mg**) und Zink (**Zn**), in sehr stabilen, teils schwer löslichen oder irreversiblen Chelat-Komplexen (Kunze & Schwedt, 2009). Da auch die Übergangsmetalle starke Anreicherungseffekte in der Biertrübung zeigten, wurde in einem weiterführenden Experiment der Einfluss einzelner Ionenspezies auf die Trübungsbildung untersucht. Als Matrix diente hierbei das mit EDTA stabilisierte Bier B:B (**REF**), das, wie unter 4.9.3. beschrieben, nach EDTA-Dotierung und Zugabe der jeweiligen Salzlösungen in äquimolaren Konzentrationen einer forcierten Alterung unterzogen wurde. Die Trübungsverlaufskurven der erhaltenen Bierproben sind in Abbildung 33 dargestellt.

Die Dotierung einzelner Ionenspezies nach EDTA-Behandlung zeigte deutlich, dass die in Trübung (stark) angereicherten Elemente Calcium (**Ca**) und Magnesium (**Mg**), ebenso wie das zweiwertige Mangan (**Mn**) keinen trübungsverstärkenden Charakter aufweisen. Während das Übergangsmetall Zink (**Zn**) und das Erdmetall Aluminium (**Al**) moderate trübungsverstärkende Eigenschaften besitzen, zeigten Kupfer (**Cu**) und Eisen (**Fe**) starke Effekte hinsichtlich der negativen Beeinflussung der kolloidalen Bierstabilität. **Cu** verhielt sich dabei in ein- und zweiwertigem Zustand sehr ähnlich, wohingegen bei **Fe** deutliche Unterschiede in der Trübungsaktivität von **Fe(II)** und **Fe(III)** zu beobachten waren. Ähnlich wie nach **Cu**-Dotierung stieg die Trübungsintensität nach Zugabe von **Fe(II)** nach einer kurzen *lag*-Phase unmittelbar stark an, wobei der Effekt von **Fe** bei äquimolarer Dotierung (1 mmol/l) deutlich größer war als der des **Cu** und weit intensivere Trübungen eintraten.

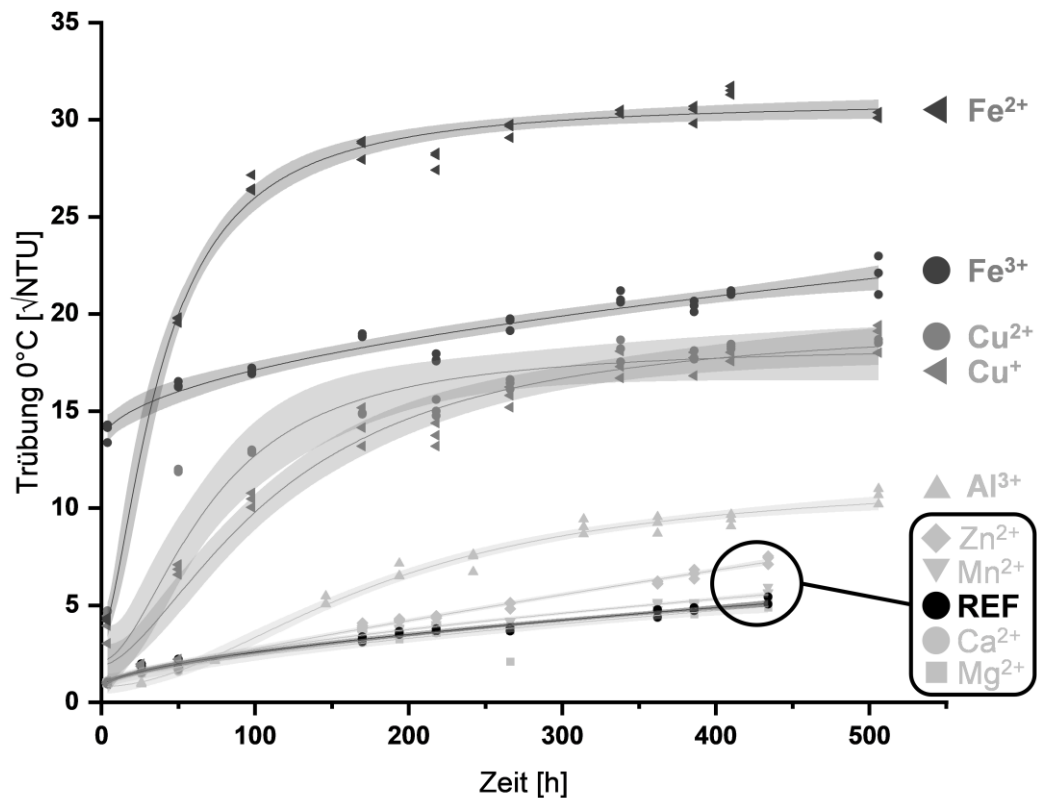


Abbildung 33: Trübungsverlaufskurven der Gesamttrübung (NTU bei 0 °C) von EDTA-behandeltem Bier B.B (REF) und REF nach Zugabe unterschiedlicher Ionenspezies zu 1 mmol/l. Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar (n = 3).

Eine *lag*-Phase existierte im Falle von **Fe(III)** nicht. Dessen Trübungspotential schien so ausgeprägt zu sein, dass es nach Dotierung der **Fe(III)**-Lösung unmittelbar zum Trübungseintritt kam. Um auszuschließen, dass es sich hierbei lediglich um Löslichkeitseffekte handelte, wurden Blindkontrollen mitgeführt, bei denen dieselbe **Fe(III)**-Lösung zu einer 95/5 Wasser/Ethanol-Mischung mit pH 4,5 gegeben wurde. Hierbei trat keine sofortige Präzipitation auf, wie sie beispielsweise von Eisenhydroxiden erwartet werden könnte. Ebenso verhielt es sich für die **Fe(II)**-Lösung (Daten der Blindkontrollen nicht abgebildet). Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens von **Fe(II)** und **Fe(III)** konnte die Annahme gemacht werden, dass zunächst eine Oxidation von **Fe(II)** zu **Fe(III)** stattfinden muss, um eine Trübungsaktivität hervorzurufen bzw. zu erhöhen. In einem Kontrollexperiment konnte dies ebenfalls gezeigt werden, indem einem klaren EDTA-behandelten Bier (**REF**) die entsprechende **Fe(II)**-Lösung zugeben wurde (kein sofortiger Trübungseintritt). Diese Probe wurde anschließend mit Wasserstoffperoxid versetzt, wodurch äquivalent zur **Fe(III)**-Dotierung ein unmittelbarer

Trübungseintritt festgestellt wurde. Diese Beobachtungen deckten sich mit Daten von Kaneda *et al.* Sie zeigten anhand von ESR-Messungen (Elektronenspinresonanz), dass in frischem Bier Eisen in der Oxidationsstufe 2 (**Fe(II)**) dominiert, welches im Verlauf der Alterung zu **Fe(III)** oxidiert wird. Allerdings lag der Fokus ihrer Arbeit nicht auf der Trübungsbildung, sondern auf dem Einfluss von **Fe** und **Cu** auf die Aroma- und Geschmacksveränderung von Bier im Laufe der Lagerung (Kaneda *et al.*, 1992).

Ca und **Mg** konnten auf Basis der vorliegenden Daten als nicht trübungsaktiv charakterisiert werden. Dennoch lag eine starke Anreicherung in der Trübung vor, was ggf. auf die physikalischen Eigenschaften von Kolloiden zurückgeführt werden kann. Bei einem biertypischen pH-Wert von ca. pH 4,5 besitzen Kolloide in der Regel negativ geladene Oberflächen, wonach es möglich wäre, dass Kationen an Trübungspartikel anhaften können (Hofmann, 2004). Initial trübungsauslösende Eigenschaften weisen sie hierdurch aber nicht auf, im Gegensatz zu den Übergangsmetallen **Fe** und **Cu**, was auch bereits von Chapon konstatiert wurde. Er führte seine These, dass **Fe** und **Cu** am wichtigsten für die Trübungsbildung seien, darauf zurück, dass sie redox-aktiv sind und als Katalysatoren für die Radikalbildung agieren (Chapon, 1965).

Um die Trübungsaktivität von **Fe** und **Cu** eingehender zu studieren und ihre unterschiedlichen Trübungseigenschaften detailliert zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen der Übergangsmetalle in Bier **B.B** angesetzt und die mit unterschiedlichen Konzentrationen von **Fe** bzw. **Cu** versetzten Bierproben forciert gealtert. Da es praktisch nicht möglich war, die im Bier vorhandenen Mengen an Ionen exakt mit EDTA zu komplexieren, ohne einen unbekanntem EDTA-Überschuss zu generieren, diente in diesem Experiment das native Bier **B.B** als Dotierungsmatrix. Diesem wurden, wie unter 4.9.3.3. beschrieben, unterschiedlich konzentrierte Lösungen von **Cu(I)** bzw. **Cu(II)** (Abbildung 34) und **Fe(II)** bzw. **Fe(III)** (Abbildung 35) zugesetzt, um deren Verhalten über verschiedene Konzentrationsbereiche hinweg zu analysieren. Als Referenz diente hierbei das unbehandelte Bier **B.B**.

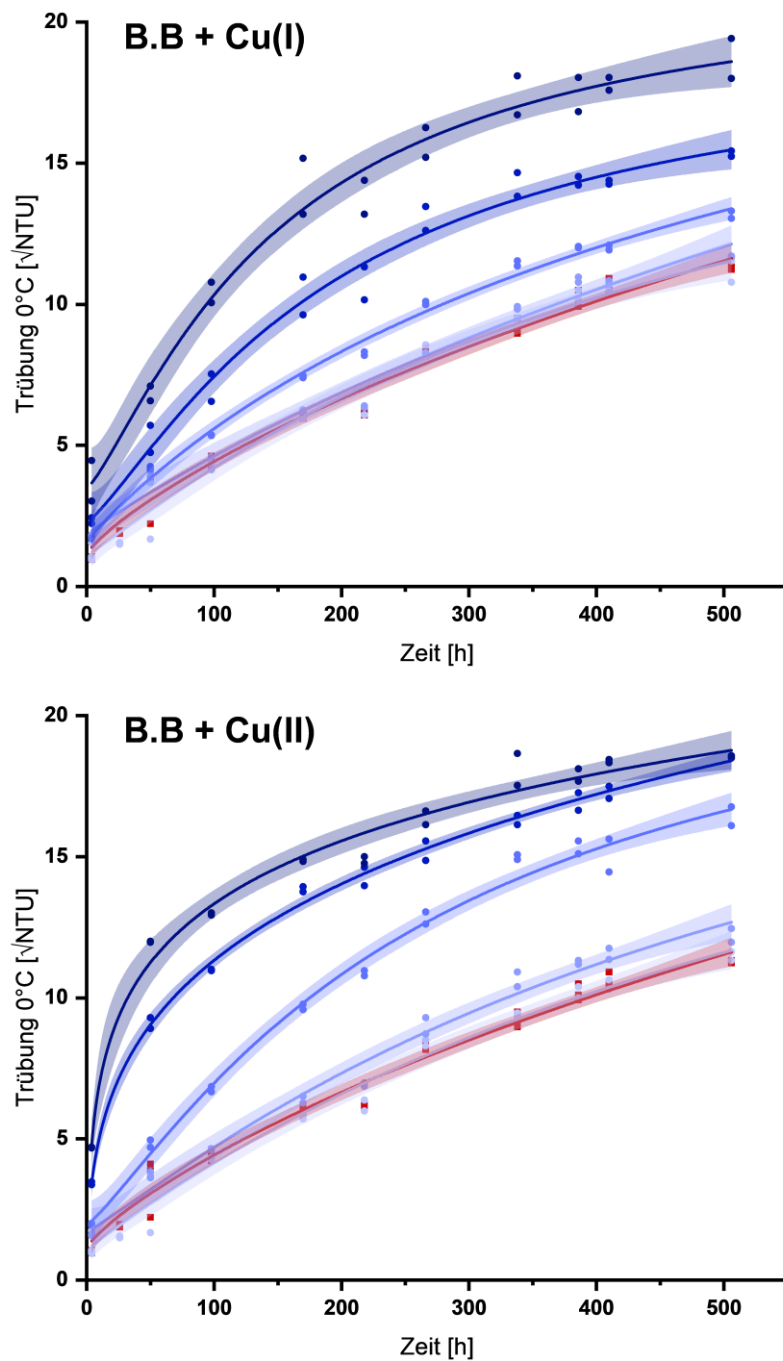


Abbildung 34: Trübungsverlaufskurven zum Einfluss von Kupferionen auf die Trübungsstabilität von Bier B.B. Oben: Bier B.B. (rot) dotiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cu^+ . Unten: Bier B.B. (rot) dotiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cu^{2+} . Die Kupferkonzentrationen betragen 1, 10, 100, 500 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ (niedrigste hellblau nach höchste dunkelblau). Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar ($n = 3$).

Es war deutlich erkennbar, dass sich **Cu(I)** und **Cu(II)** in ihrer Trübungsaktivität kaum unterscheiden. In beiden Fällen traten Trübungen in vergleichbarem Ausmaß auf, wobei **Cu(II)** eine geringfügig stärkere Trübungsaktivität aufwies als **Cu(I)**. Während **Cu(I)** ab einer Dotierung von 100 $\mu\text{mol/l}$ trübungsverstärkende Effekte zeigte, waren diese für **Cu(II)** bereits ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zu beobachten. Im Vergleich zur Kupferkonzentration im nativen **Bier B** von 0,3 $\mu\text{mol/l}$ entsprachen die Aktivitätsschwellen in etwa dem Faktor 34 (bei **Cu(II)**) bzw. 334 (bei **Cu(I)**), der demnach theoretisch nötig wäre, um durch eine Erhöhung der Kupferkonzentration im Vergleich zum nativen Bier messbar trübungsverstärkende Effekte feststellen zu können. In gleicher Weise wurde die Trübungsaktivität von **Fe** analysiert (Abbildung 35).

Bei Betrachtung der Trübungsaktivität unterschiedlicher Eisenspezies waren auf Anhieb deutliche Unterschiede zwischen **Fe(II)** und **Fe(III)** festzustellen. Während die Trübungsverläufe nach Dotierung von zwei- oder dreifach geladenem **Fe** in niedrigen Konzentrationsbereichen (1 – 100 $\mu\text{mol/l}$) noch nahezu identisch waren, traten bei höherer **Fe**-Dotierung unterschiedliche Reaktivitäten auf. **Fe(II)** wirkte initial nicht trübungsaktiv und die Trübungsverlaufskurve stieg im Vergleich zum unbehandelten **Bier B** nach einer kurzen *lag*-Phase steil an. **Fe(III)** hingegen rief unmittelbar nach Zugabe zum Bier eine Trübungsbildung hervor, wie auch bereits im vorangegangenen Experiment nach EDTA-Behandlung festgestellt und gegen Blindproben abgesichert werden konnte. Es konnte daher vermutet werden, dass im Falle von **Fe** die ionische Form der Oxidationsstufe 3 die trübungsaktive Ionenspezies darstellt, wonach **Fe(II)** im Bier zunächst oxidiert und dadurch hinsichtlich der Trübungsaktivität *aktiviert* wird. **Fe(III)** könnte dabei entweder selbst als präzipitierendes Agens wirken, oder zur Oxidation anderer Analyten, wie Polyphenolen oder Proteinen, beitragen.

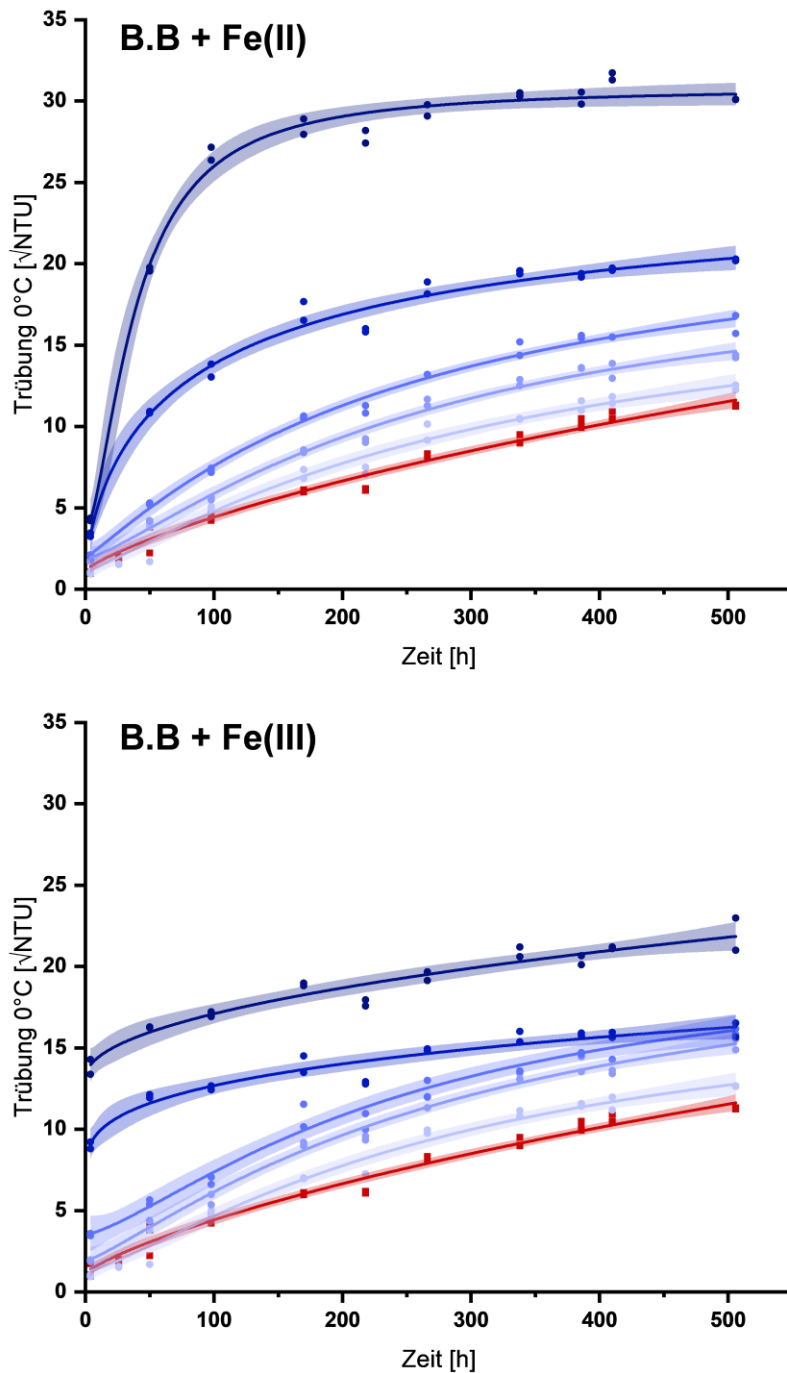


Abbildung 35: Trübungsverlaufskurven zum Einfluss von Eisenionen auf die Trübungsstabilität von Bier B.B. Oben: Bier B.B. (rot) dotiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fe^{2+} . Unten: Bier B.B. (rot) dotiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fe^{3+} . Die Eisenkonzentrationen betragen 1, 10, 100, 500 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ (niedrigste hellblau nach höchste dunkelblau). Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar ($n = 3$).

Bemerkenswert war im Falle von **Fe**, dass im Gegensatz zu **Cu** bereits geringste Konzentrationserhöhungen ausreichend waren, um die Stabilität des Bieres signifikant herabzusetzen. Während im Falle von **Cu** eine rund 30-fache Konzentrationserhöhung gegenüber der natürlichen Bierkonzentration benötigt wurde, um Unterschiede in der Bierstabilität feststellen zu können, war im Falle von **Fe** bereits in etwa eine Verdopplung des ohnehin sehr niedrigen Eisengehalts ausreichend, um das Bier zu destabilisieren. Der **Fe**-Gehalt von Bier **B.B** beläuft sich auf 0,6 µmol/l. Unabhängig davon, ob es sich um **Fe(II)** oder **Fe(III)** handelt, genügte bereits eine Zugabe von 1 µmol/l, um die kolloidale Stabilität des Bieres negativ zu beeinflussen. Dies zeigte eindrücklich, dass **Fe** im Hinblick auf die Trübungsstabilität eine ausschlaggebende Bedeutung zukommt und im Bier diesbezüglich ein sehr sensibles Gleichgewicht vorherrschen muss, welches bereits durch geringste Abweichungen negativ beeinflusst werden kann. Dass derlei Unterschiede im Metallgehalt in der Praxis durchaus relevant und realistisch sein können, wurde bereits gezeigt. Binns stellte in einer umfassenden Studie von 144 Lagerbieren teils deutliche Unterschiede hinsichtlich der Metallgehalte fest. Er analysierte dabei unter anderem auch die Gehalte von Eisen und Kupfer, wobei sich deren Konzentrationen bisweilen um mehr als eine Größenordnung (Fe 0,04 – 0,44 mg/l, Cu 0,01 – 0,41 mg/l) unterschieden (Binns *et al.*, 1978).

3.3.4. Einfluss organischer Komplexbildner auf die Trübungsstabilität

Anhand der Experimente zum Einfluss von anorganischen Ionen auf die Trübungsbildung konnte gezeigt werden, dass Bier nach einer EDTA-Behandlung nahezu vollkommen trübungsstabil ist. Demnach war anzunehmen, dass die durch EDTA komplexierten Metallionen den entscheidenden Impuls zur initialen Trübungsbildung geben und damit ein ausschlaggebender Bestandteil der niedermolekularen Bierfraktion (LMW) sind, welcher trübungsauslösend auf die hochmolekulare Bierfraktion (HMW) wirkt (siehe 3.3.1.). In Zuge dessen wurden die Übergangsmetalle Eisen (**Fe**) und Kupfer (**Cu**) als besonders trübungsaktiv identifiziert, wobei **Fe** einen deutlich stärkeren negativen Einfluss auf die Bierstabilität hatte als **Cu**.

Biere einer EDTA-Stabilisierung zu unterziehen, um einen Trübungseintritt zugunsten eines verlängerten Mindesthaltbarkeitsdatums zu verhindern oder zu verzögern, wäre neben gesundheitlichen und sensorischen Aspekten auch deshalb nicht praxisrelevant, da EDTA nach der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV) als Zusatzstoff E 385 ohnehin nur

bedingt für Lebensmittel zugelassen ist und nach dem Reinheitsgebot gebrauten Bier allgemein keine Additive zugesetzt werden dürfen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Bundesrepublik Deutschland 05.07.2017). Aufgrunddessen stand das Verständnis der nativen Biermatrix und der von Natur aus inhärenten, niedermolekularen Analyten im Fokus, um herauszufinden, welche chemischen Prozesse, ausgehend von den bislang vorliegenden Erkenntnissen, letztlich eine Trübungsbildung begünstigen oder auch verlangsamen können. Speziell mehrbasige organische Säuren können ähnlich ausgeprägte Komplexbildungseigenschaften aufweisen wie EDTA und damit in der Lage sein, Metallionen in stabilen Chelatkomplexen zu binden. Zu den stärksten organischen Komplexbildnern zählt die einfachste Dicarbonsäure Oxalsäure, die bereits 1776 von Carl Wilhelm Scheele erstmals isoliert und beschrieben wurde (Remane & Reschetilowski, 2020). Seither wurde sie aufgrund ihrer speziellen chemischen und biochemischen Eigenschaften, wie der vergleichsweise hohen Acidität und dem Komplexbildnerischen sowie insektiziden Potenzial, intensiv erforscht. In Bier kommt Oxalsäure natürlicherweise in Größenordnungen von bis zu 30 mg/l vor (Maya *et al.*, 2011; Salamon *et al.*, 2012).

Wie bereits erwähnt, führte Chapon seine Beobachtungen, dass **Fe** und **Cu** am wichtigsten für die Trübungsbildung seien, darauf zurück, dass sie redox-aktiv sind und als Katalysatoren für die Radikalbildung im Zuge der *Fenton*-Reaktion agieren können (Chapon, 1965). Die Auswirkungen der komplexierenden Eigenschaften der Oxalsäure im Rahmen der *Fenton*-Reaktion wiederum, wurden von der Forschungsgruppe um Georgi untersucht. Dabei studierten sie unter anderem den Einfluss von Komplexbildnern auf die Oxidation von organischem Material durch die im Zuge der *Fenton*-Reaktion gebildeten Radikale (Georgi *et al.*, 2007). Abbildung 36 zeigt am Beispiel von Benzol, welche Auswirkung die Dotierung unterschiedlicher Komplexbildner auf das *Fenton*-System und damit auf die Oxidation von organischem Material hat.

Der optimale pH-Wert für die *Fenton*-Reaktion liegt in etwa bei pH 3, weswegen auch im wässrigen System ohne Komplexbildnersagens keine vollständige Umsetzung des Benzols erfolgte. Allerdings wiesen EDTA und Oxalsäure annähernd gleiche Reaktivitäten auf und waren im Stande, die Oxidation des organischen Materials nahezu vollständig zu unterbinden (Georgi *et al.*, 2007).

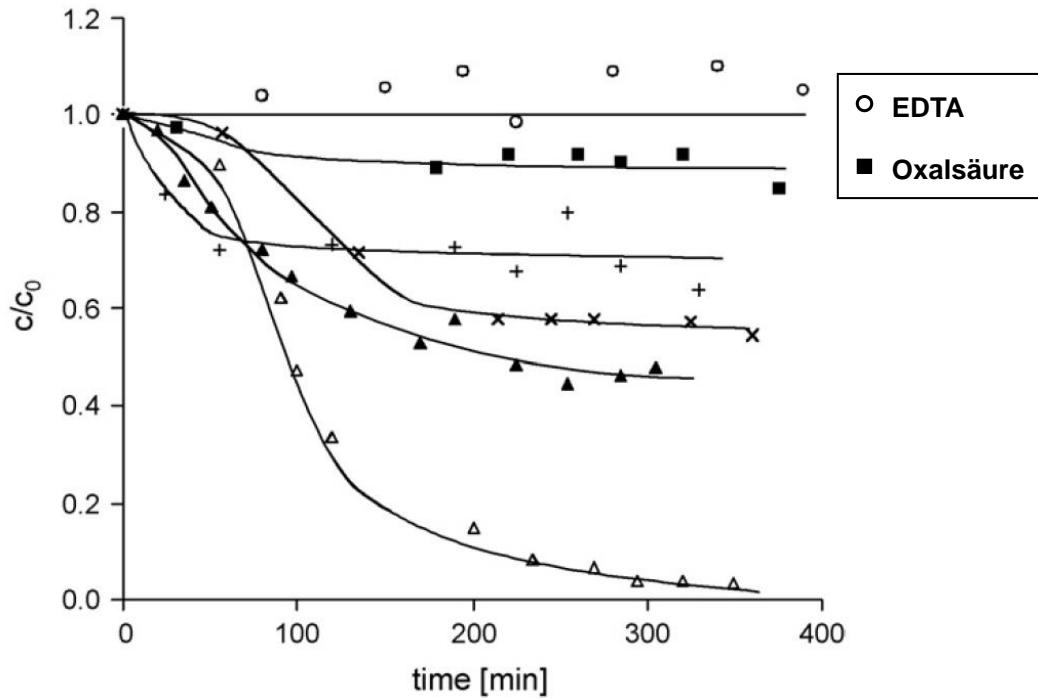


Abbildung 36: Einfluss unterschiedlicher Komplexbildner auf die Oxidation von Benzol im Zuge der *Fenton*-Reaktion bei pH 5 in einer Lösung aus Benzol, Fe(III), H₂O₂ und dem jeweiligen Komplexbildner (○ EDTA, ■ Oxalsäure, + Wasser, × polymerisiertes Hydrochinon, ▲ Nitrilotriessigsäure, △ Huminsäure). (Georgi *et al.*, 2007)

Im Hinblick auf diese vergleichbaren Effekte von EDTA und Oxalsäure bezüglich der Beeinflussung redox-chemischer Vorgänge, sollte im Folgenden die Rolle der Oxalsäure hinsichtlich der Trübungsstabilität eingehend untersucht werden.

Zunächst wurde der Einfluss erhöhter Oxalsäurekonzentrationen auf die Trübungsneigung von Bier untersucht. Hierfür wurde Bier **B.B** wie unter 4.9.4. beschrieben mit der dreifachen Menge der im nativen Bier nachgewiesenen Oxalsäure-Konzentration versetzt und die Probe parallel zur unbehandelten Referenz wie unter 4.3. beschrieben einer forcierten Alterung unterzogen.

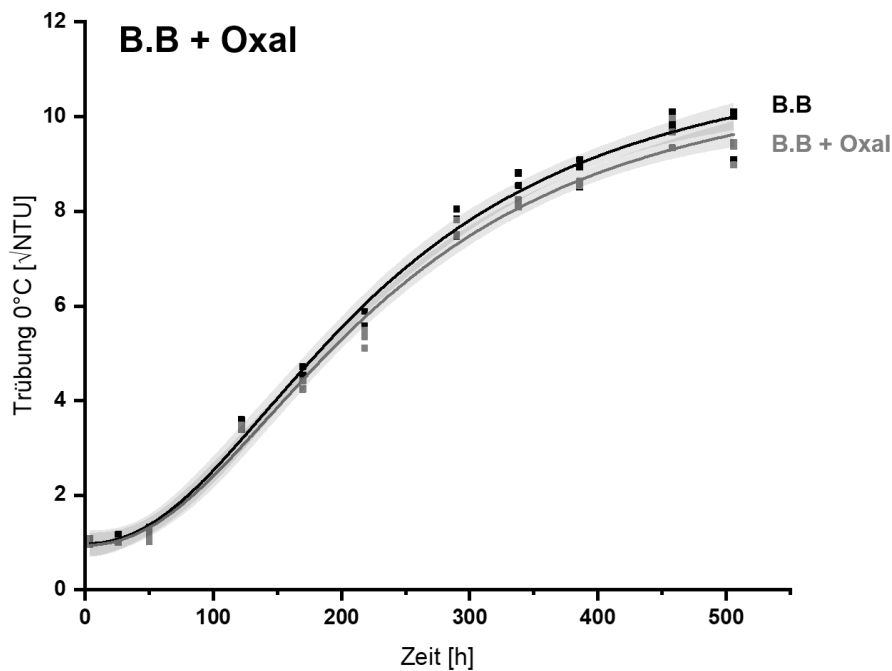


Abbildung 37: Einfluss einer erhöhten Oxalsäure-Konzentration (Oxal) auf die Trübungsneigung von Bier B.B. Trübungsverlaufskurven von Bier B.B. (schwarz) und von Bier B.B. dotiert mit 0,3 mmol/l Oxalsäure (grau), dem Dreifachen der nativen Oxalsäure-Konzentration von Bier B.B. Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar (n = 3).

Der native Oxalsäuregehalt von Bier **B.B** wurde zu 13 mg/l (= 0,1 mmol/l) bestimmt. Wurde dieser durch Dotierung von Kaliumoxalat auf das Dreifache erhöht, was mit rund 40 mg/l in etwa 25 % mehr sind, als der höchste, überhaupt von Salamon *et al.* in Bier gemessene Oxalsäure-Gehalt (30 mg/l), waren dennoch keine Effekte auf die Trübungsstabilität des Bieres zu beobachten (Salamon *et al.*, 2012). In Anbetracht dessen, dass Bier **B.B** außerdem auch einen vergleichsweise hohen Calcium-Gehalt (**Ca**) von 2 mmol/l aufwies, war davon auszugehen, dass die Bildung von **Ca**-Oxalat ebenfalls nicht den entscheidenden Impuls zur Trübungsbildung gibt, da **Ca** ausreichend im Überschuss vorhanden war, um zusammen mit dem dotierten Oxalat als Calciumoxalat zu präzipitieren. Des Weiteren war anzunehmen, dass hinsichtlich der Komplexierung der im Bier enthaltenen Metallionen mit Oxalsäure in Bier **B.B** bereits ein Equilibrium vorlag, warum durch weitere Zugabe von Oxalsäure keine erhöhte Trübungsstabilisierung erreicht wurde. Im Umkehrschluss bedeutete dies wiederum, dass nicht die Oxalsäure den negativen Faktor für die Bierstabilität darstellt, wie beispielsweise im Falle von Oxalattrübungen, die in Folge prozesstechnischer Probleme auftreten können,

sondern womöglich die im Bier von Oxalsäure gebundenen Analyten, wie z.B die als trübungsaktiv identifizierten Metalle Eisen (**Fe**) und Kupfer (**Cu**) (Steiner *et al.*, 2010).

Daher wurde folgend, ergänzend zur Oxalat-Dotierung, das entsprechende Omissionsexperiment durchgeführt, bei dem Bier **B.B** die Oxalsäure mittels enzymatischer Behandlung selektiv entzogen wurde. Dies geschah, wie unter 4.9.5.1. beschrieben, durch Behandlung des Bieres mit dem Enzym Oxalatoxidase (**OxOx**; EC 1.2.3.4), welche Oxalsäure zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoffperoxid umsetzt (Bernier & Berna, 2001; Borowski *et al.*, 2005). Abbildung 38 zeigt das Trübungsverhalten des **OxOx**-behandelten Bieres verglichen mit der unbehandelten Referenz im Zuge der forcierten Alterung.

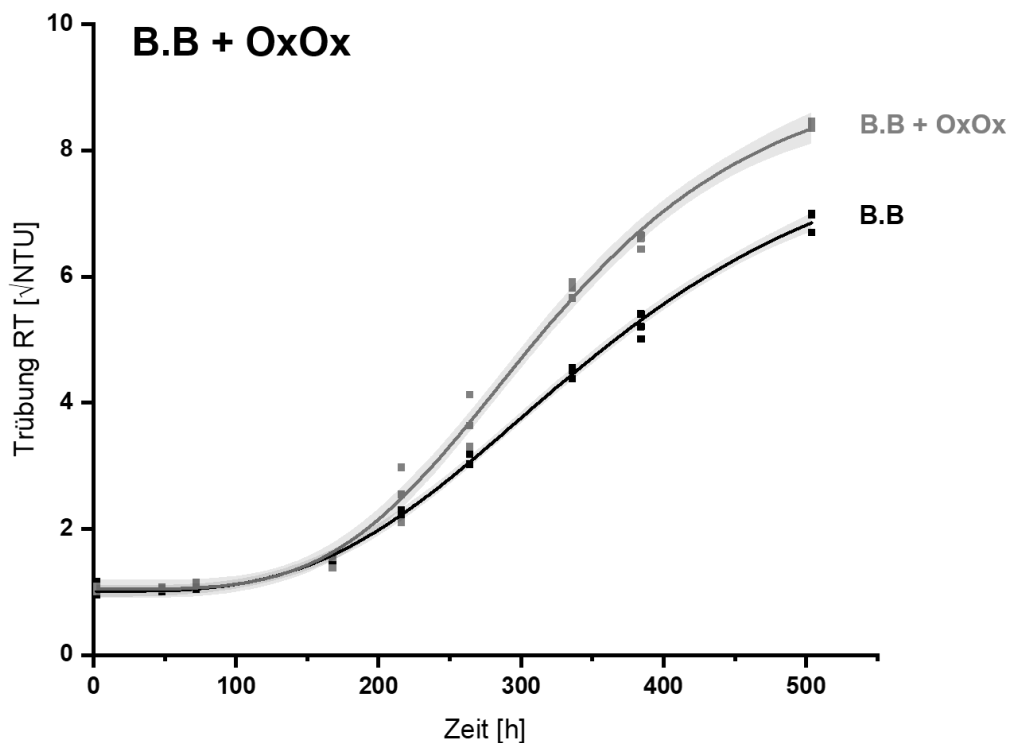


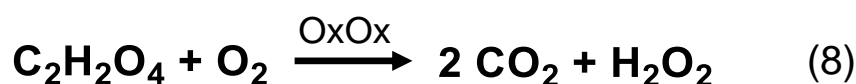
Abbildung 38: Einfluss des Entzugs von Oxalsäure auf die Trübungsstabilität von Bier B.B. Trübungsverlaufskurven von Bier B.B (schwarz) und von Bier B.B dotiert mit 4 $\mu\text{U}/\mu\text{l}$ Oxalatoxidase (OxOx) (grau). Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar ($n = 3$).

Wie den Trübungsverlaufskurven zu entnehmen ist, unterschied sich das Trübungsverhalten des **OxOx**-behandelten Bieres deutlich von dem des unbehandelten Bieres **B.B.** Während ein Zusatz von Oxalsäure die Bierstabilität nicht beeinträchtigte, bewirkte deren selektiver Entzug durch Erhöhung der **OxOx**-Aktivität des Bieres auf ca. das Dreifache der nativen **OxOx**-Aktivität eine kolloidale Destabilisierung des Systems. Dies ließ den Schluss zu, dass geringe Mengen Oxalsäure in Bier einen wichtigen, stabilisierenden Faktor darstellen. Dies könnte auf die Komplexbildung und dadurch die redox-chemische Inaktivierung trübungsaktiver Übergangsmetallionen zurückzuführen sein. Insbesondere mehrwertige Kationen, wie **Fe** und **Cu**, werden ionisch von Oxalsäure in stabilen Chelatkomplexen gebunden (Tapparo *et al.*, 2020). Die Komplexbildung kann Redoxreaktionen wie die *Fenton*-Reaktion unterbinden und Ionen außerdem vor Hydratisierungen schützen, wodurch beispielsweise Eisenionen nicht zu unlöslichen Eisenhydroxiden reagieren können und so in Lösung gehalten werden (Georgi *et al.*, 2007).

3.3.5. Einfluss der Oxalatoxidaseaktivität auf die Trübungsstabilität

Basierend auf den erhobenen Daten konnte vermutet werden, dass Oxalsäure als zentrales Element bei der kolloidalen Stabilisierung von Bier agiert, womit die Aktivität des Oxalat-abbauenden Enzyms Oxalatoxidase (**OxOx**) in den Fokus rückte. **OxOx** gilt als thermisch und pH-stabiles Enzym, das natürlicherweise unter anderem in Gerste (*Hordeum vulgare*) vorkommt (Dumas *et al.*, 1993; Hurkman & Tanaka, 1996; Kanauchi *et al.*, 2009; Sugiura *et al.*, 1979). Aufgrund der Stabilitätseigenschaften ist anzunehmen, dass **OxOx** den Brauprozess überdauern und ins fertige Bier gelangen kann. Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, nimmt die Bierstabilität mit Erhöhung der **OxOx**-Aktivität signifikant ab, weswegen diese im Folgenden eingehend untersucht werden sollte.

Die **OxOx** ist, wie der Name bereits beschreibt, ein Oxalsäure-abbauendes Enzym, welches im Pflanzenreich weit verbreitet ist (Bernier & Berna, 2001; Çalışkan & Cuming, 2000; Carter & Thornburg, 1999; Dunwell *et al.*, 2008). Es handelt sich um ein Mangan-bindendes, Germin-ähnliches Protein, welches die Umsetzung von Oxalsäure ($C_2H_2O_4$) und Sauerstoff (O_2) zu



Gleichung 8: Vom Enzym Oxalatoxidase (**OxOx**, EC 1.2.3.4) katalysierte Umsetzung von 1 mol Oxalsäure ($C_2H_2O_4$) und 1 mol Sauerstoff (O_2) zu 2 mol Kohlenstoffdioxid (CO_2) und 1 mol Wasserstoffperoxid (H_2O_2). (Borowski *et al.*, 2005; Lane, 1994)

Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysiert, wie in Gleichung 8 dargestellt (Borowski *et al.*, 2005; Lane, 1994).

Um den im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersuchten, qualitätsmindernden Einfluss der **OxOx** auf die kolloidale Bierstabilität eingehender zu analysieren, wurde Bier **B.B**, wie unter 4.9.5.2. beschrieben, mit zwei Modulatoren der **OxOx** versetzt. Koyama beschrieb für *o*-Phenylendiamin einen **OxOx**-aktivierenden Effekt, während Kaliumiodid in ihren Experimenten **OxOx**-inhibierende Eigenschaften aufwies (Koyama, 1988). Abbildung 39 zeigt die Trübungsverlaufskurven nach Dotierung von Bier **B.B** mit *o*-Phenylendiamin bzw. Kaliumiodid im Vergleich zur unbehandelten Referenz.

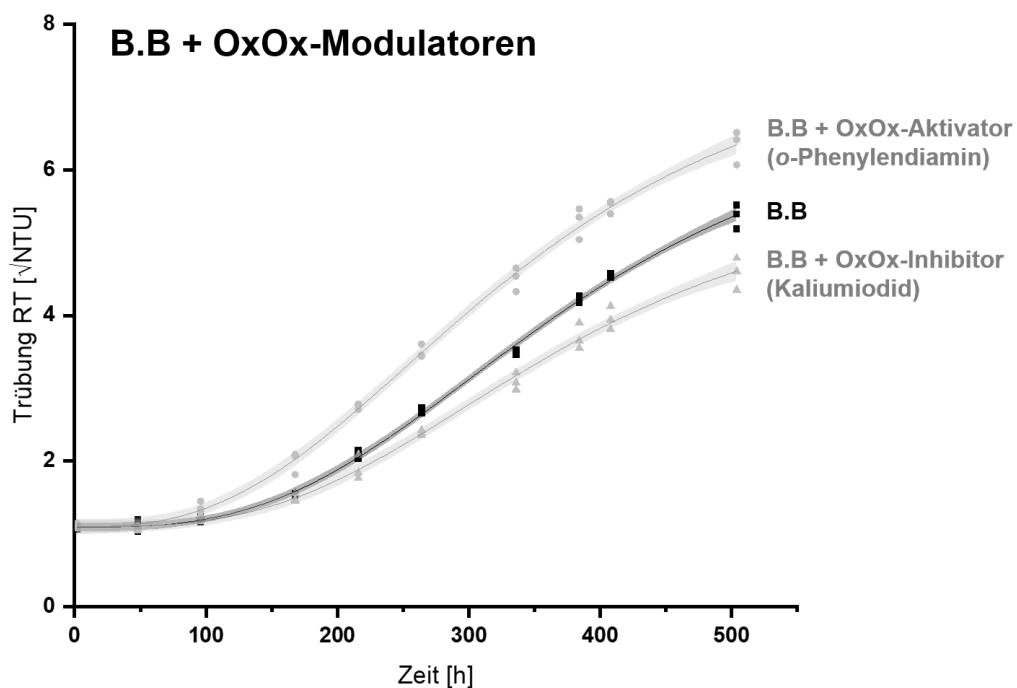


Abbildung 39: Einfluss von Modulatoren der Oxalatoxidase (OxOx) auf die Trübungsstabilität von Bier B.B. Trübungsverlaufskurven von Bier B.B. (schwarz), von Bier B.B. dotiert mit 0,1 mmol/l *o*-Phenylendiamin (OxOx-Aktivator; ● grau) und von Bier B.B. dotiert mit 1 mmol/l Kaliumiodid (OxOx-Inhibitor; ▲ grau). Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar ($n = 3$).

Die native OxOx-Aktivität von Bier B wurde zu 2,1 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$ bestimmt. Die Dotierung des Bieres mit einem **OxOx**-Aktivator bzw. einem **OxOx**-Inhibitor zeigte, dass sich die Trübungsneigungen der dotierten Biere in beiden Fällen entsprechend der von Koyama beschriebenen Aktivitäten der eingesetzten Substanzen verhielten (Koyama, 1988). Bei Zugabe des **OxOx**-Aktivators *o*-Phenylendiamin zeigte Bier **B.B** im Vergleich zur

unbehandelten Referenz eine höhere Trübungsneigung. Wurde der **OxOx**-Inhibitor Kaliumiodid zugesetzt, war ein verzögerter und über den beobachteten Zeitraum hinweg geringerer Trübungseintritt im Vergleich zur unbehandelten Referenz zu beobachten. Dieses Experiment untermauerte den Befund, dass die **OxOx**-Aktivität einen direkten Einfluss auf die Trübungsneigung von Bier haben kann.

Da eine vollständige Inhibierung der **OxOx** aufgrund der Komplexität der Biermatrix nicht möglich war und abgesichert werden musste, dass die beobachteten Effekte auch tatsächlich in Zusammenhang mit den eingesetzten Enzym-Modulatoren stehen, sollte die hinter dem Trübungseintritt vermutete oxidative Reaktionskaskade weiter untersucht werden. Denn im Zuge des **OxOx**-katalysierten Abbaus von Oxalsäure entsteht neben CO_2 auch H_2O_2 (siehe Gleichung 8, Seite 96), was einen zusätzlichen negativen Effekt auf die Bierstabilität haben könnte. Um zu studieren, ob neben dem Abbau der Oxalsäure auch die Bildung von Wasserstoffperoxid einen entscheidenden Einfluss auf die Destabilisierung des Bieres hat, wurde diese Reaktion im Folgenden genauer analysiert.

3.3.6. Einfluss des antioxidativen Potentials auf die Trübungsstabilität

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein Zusatz von Oxalatoxidase (**OxOx**) die Trübungsstabilität von Bier deutlich verringern kann (siehe 3.3.5.). Entscheidend dürften hierbei die Freisetzung von trübungsaktiven Metallionen aus Oxalsäure-Chelat-Komplexen und die Entstehung von Wasserstoffperoxid als Reaktionsprodukt der enzymatischen Umsetzung von Oxalsäure sein. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob das entstehende H_2O_2 einen zusätzlichen negativen Einfluss auf die Trübungsbildung hat. Um dies zu prüfen, wurde Bier **B.B** zum einen mit H_2O_2 und zum anderen mit dem Enzym Katalase (EC 1.11.1.6) versetzt, um dem System das im Verlaufe der Lagerung entstehende H_2O_2 selektiv zu entziehen.

Katalase ist ein hochspezifisches Enzym und die katalysierte Umsetzung von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff zählt mit einer Geschwindigkeitskonstante von bis zu $k = 1,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, bezogen auf die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes, zu den schnellsten bekannten, in der Natur vorkommenden enzymkatalysierten Reaktionen (Alfonso-Prieto *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2004; Lardinois *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1999; Raducan *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Eigenschaften eignete sich Katalase besser, um die Rolle des Wasserstoffperoxids bei der kolloidalen Stabilität zu studieren, als unspezifische Antioxidantien, wie etwa Ascorbinsäure oder andere Vitamine. Abbildung 40 zeigt den Einfluss einer Dotierung von H_2O_2 und Katalase zu Bier **B.B.**

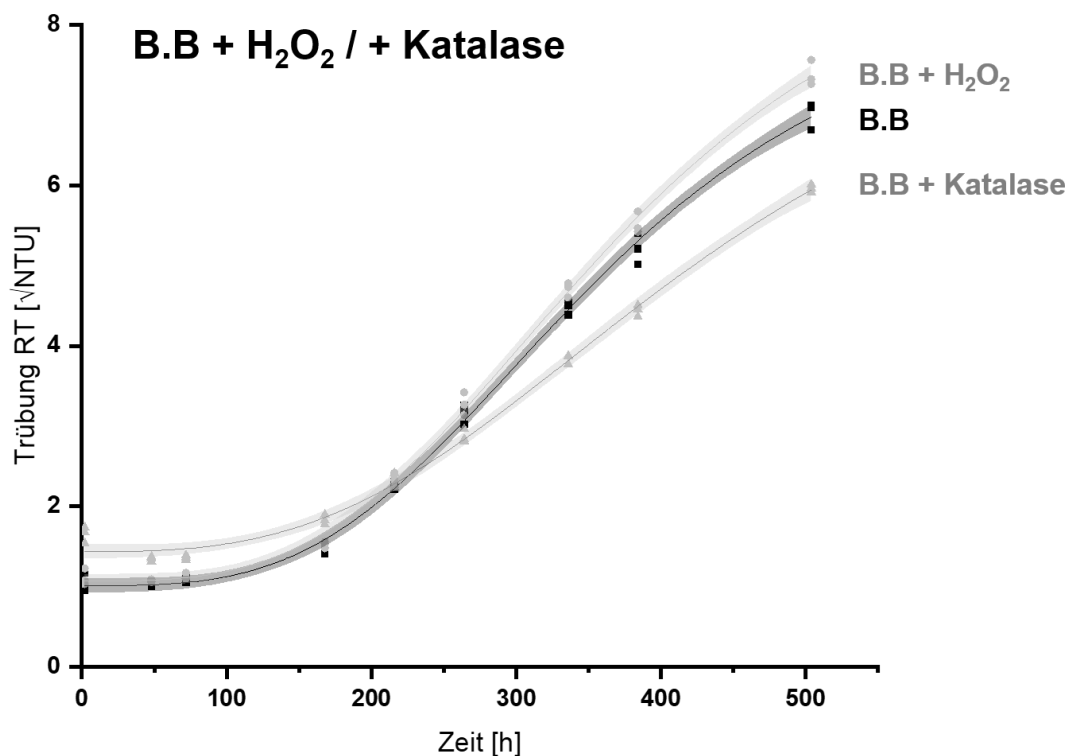


Abbildung 40: Einflüsse von H_2O_2 und Katalase auf die Trübungsneigung von Bier **B.B.**. Trübungsverlaufskurven von Bier **B.B.** (schwarz), von Bier **B.B.** dotiert mit $500 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 (● grau) und von Bier **B.B.** dotiert mit $10 \text{ mU}/\mu\text{l}$ Katalase (▲ grau). Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar ($n = 3$).

Entgegen den Erwartungen führte eine Zugabe von H_2O_2 nicht zu einer deutlich stärkeren Trübungsneigung. Dies könnte darauf hindeuten, dass Peroxide nicht den limitierenden Faktor bei der Trübungsbildung darstellen und die geringen Mengen an OxOx-produziertem Peroxid bereits ausreichen, um die Oxidation von freigesetztem Fe(II) zu beschleunigen. Größere H_2O_2 -Konzentrationen hingegen könnten bereits hemmend auf die Radikalkettenreaktion wirken und diese zum Abbruch bringen. Dies beschrieb Trommler, der die Oxidation von organischem Material im Zuge der *Fenton*-Reaktion studierte. Er stellte hierbei ebenfalls fest, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. die Umsatzrate durch eine relative Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration nicht weiter erhöht werden konnte. Er begründete diese Beobachtung damit, dass Hydroxylradikale aus der Radikalkettenreaktion von größeren Mengen H_2O_2 direkt wieder abgefangen werden und die Reaktion dadurch zum Erliegen kommt (Trommler, 2007).

Im Gegensatz dazu konnte die Trübungsneigung durch Zugabe von Katalase und damit dem Entzug von H_2O_2 herabgesetzt werden, wodurch das dotierte Bier gegenüber der unbehandelten Referenz kolloidal stabilisiert wurde. Dies untermauerte, dass der Trübungseintritt auch von der Entstehung von H_2O_2 mitbestimmt wird, was wiederum die Hypothese untermauerte, dass die Aktivität der Peroxid-generierenden **OxOx** die Trübungsstabilität von Bier ebenfalls direkt beeinflussen kann. Auch deckte sich dies mit den Erkenntnissen von Uchida und Kaneda, welche die H_2O_2 -Bildung im Verlauf der Bieralterung und dessen negativen Einfluss auf die Bierqualität ebenfalls nachweisen konnten, allerdings führten sie keine Erklärungen zum Ursprung des H_2O_2 an (Kaneda *et al.*, 1989; Kaneda *et al.*, 1990; Uchida & Ono, 1999).

Eine vollständige Unterdrückung des Trübungseintritts, wie im Falle einer EDTA-Zugabe (siehe 3.3.3.), war in diesem Experiment nicht zu beobachten und aufgrund unterschiedlicher Faktoren auch nicht zu erwarten. Rein thermodynamischen Überlegungen zufolge, wäre die Katalase-katalysierte Degradation von H_2O_2 unter optimalen Bedingungen mit einer Geschwindigkeitskonstante $k = 1,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ um Größenordnungen schneller als die Oxidation von **Fe(II)** zu trübungsaktivem **Fe(III)** durch H_2O_2 , welche dem 1. Schritt der *Fenton*-Reaktion entspricht (Gleichung 1, Seite 120) und lediglich mit einer Geschwindigkeitskonstante um $k = 76$ abläuft (Fischbacher *et al.*, 2017; Pignatello *et al.*, 2006; Walling, 1975; Wiegand *et al.*, 2017). Dies spräche dafür, dass der Trübungseintritt, insofern er hauptsächlich von H_2O_2 -abhängigen Reaktionen begünstigt wird, durch den Einsatz von Katalase maßgeblich unterbunden würde. Jedoch konnte dies nur teilweise beobachtet werden, was auf mehrere Gründe zurückgeführt werden kann. Die optimalen Bedingungen für eine maximale Katalase-Aktivität liegen bei physiologischen Temperaturen um 30 – 40 °C und

milden pH-Werten zwischen pH 6 – pH 8 (Aebi, 1974; Costa *et al.*, 2002; Matsuyama, 1933). Die vorliegende Bierprobe hingegen wurde Temperaturschwankungen zwischen 0 und 40 °C ausgesetzt und wies einen pH-Wert von pH 4,5 auf. Außerdem können in einer komplexen Matrix etwaige Inhibierungen des Enzyms oder Nebenreaktionen wie Komplexierungen der Substrate nicht ausgeschlossen werden. Zudem können zahlreiche H₂O₂-unabhängige Redoxreaktionen ablaufen, wie Autoxidationen oder die photo-*Fenton*-Reaktion, für welche bereits geringste, in der Praxis unvermeidbare Mengen an Sauerstoff ausreichend sind und aus welchen ebenfalls reaktive Sauerstoff- oder Hydroxylradikal-Spezies hervorgehen können, die zur Bierschädigung führen (Kuchel *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2004; Vasquez-Medrano *et al.*, 2018).

Zusammenfassend untermauerte das durchgeführte Experiment dennoch die Annahme, dass H₂O₂, und damit die OxOx-Aktivität, einen Einfluss auf die Trübungsbildung nimmt, was schlussendlich zu einer Hypothese über die Zusammenhänge von Oxalsäuregehalt, Eisengehalt und OxOx-Aktivität mit der Trübungsneigung führte. Darauf basierend wurde ein biernahes Modellsystem für die Biertrübungsbildung unter Einbeziehung der genannten Parameter konstruiert, welches unter 3.4.7. erläutert wird.

3.3.7. Rekonstitution des Biertrübungsprozesses im Modell

Auf Basis der durchgeführten Forcierungsexperimente konnte eine Hypothese über eine wechselseitige Beziehung mehrerer Parameter aufgestellt werden, welche in Kombination direkten Einfluss auf die Biertrübungsbildung und damit die kolloidale Bierstabilität nehmen. Für Eisen (**Fe**) und Kupfer (**Cu**) konnten trübungsverstärkende Effekte nachgewiesen werden, wobei **Fe** als weitaus potenter im Hinblick auf die negative Beeinflussung der Bierstabilität charakterisiert wurde. Eine Erhöhung der Oxalatoxidase-Aktivität (**OxOx**) von Bier führt ebenfalls zu einem Anstieg der Trübungsintensität. Dies konnte in Zusammenhang mit dem Abbau von Oxalsäure (**Oxal**) gebracht werden, welche im Bier in geringen Konzentrationen eine stabilisierende Funktion durch die Komplexbildung der schädigenden Übergangsmetallionen einnimmt, wodurch diese redox-chemisch inaktiviert werden.

Um diese trianguläre Verknüpfung von Oxalsäure (**Oxal**), Eisen (**Fe**) und Oxalatoxidase (**OxOx**) zu verifizieren, wurde ein Modellsystem aus den als trübungsrelevant identifizierten Komponenten erstellt. Als Matrix diente hochmolekulare Bierfraktion von Bier **B.B** (**B.HMW**; *cut off* 1 kDa). Obwohl diese einen Großteil des präzipitierenden Materials, wie Proteine und Kohlenhydrate, beinhaltet, lag sie ohne Zugabe von LMW-Komponenten nahezu vollkommen trübungsstabil vor (siehe 3.3.1.). Damit stellte die HMW eine geeignete bierähnliche Matrix dar, um durch gezielte Dotierung weiterer LMW-Komponenten deren Einfluss auf die Trübungsstabilität analysieren zu können. **B.HMW** wurde mit **Fe(II)** bzw. **Fe(III)** und/oder **Oxal** und/oder **OxOx** versetzt und die Trübungsstabilität der erhaltenen Proben mittels forcierter Alterung bestimmt.

Die Konzentrationen der Dotierungen wurden dabei so gewählt, dass das Modellsystem dem nativen Bier **B.B** möglichst ähnlich war. Für Bier **B.B**, einem kommerziellen hellen Lagerbier, wurden 0,6 µmol/l **Fe**, 140 µmol/l **Oxal** und eine **OxOx**-Aktivität von 2,1 µU/µl quantifiziert (siehe 3.3.8.). Damit lagen die Konzentrationen im Modell mit 1 µmol/l **Fe**, 100 µmol/l **Oxal** und 2,1 µU/µl **OxOx** nahe denen des nativen Bieres **B.B**.

Anhand dieses Modells sollte überprüft werden, ob **Oxal** einen durch **Fe** verursachten Trübungseintritt inhibieren oder verzögern kann und ob dieser Effekt durch Zugabe des Enzyms **OxOx** und dem damit verbundenen Abbau des Oxalats wieder aufgehoben wird. In Abbildung 41 sind die Trübungsverlaufskurven des beschriebenen Modellsystems dargestellt.

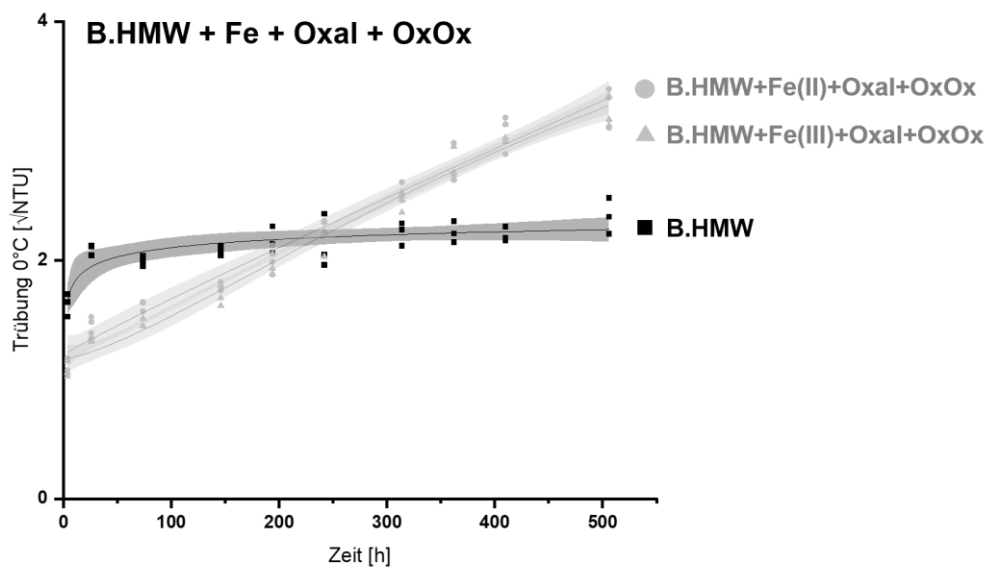
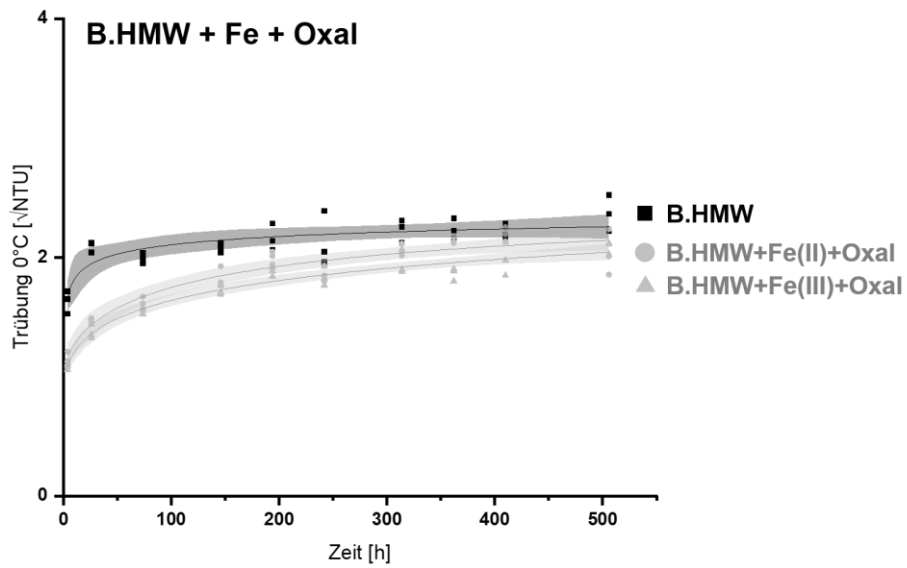
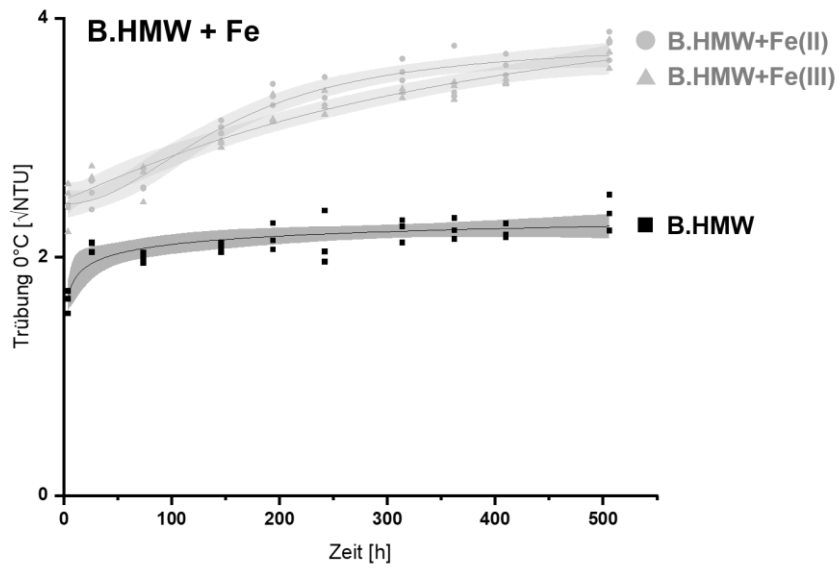


Abbildung 41: Forcierte Alterung der aus den als trübungsrelevant identifizierten Bierinhaltsstoffen zusammengestellten Rekombinate. Seite 103 oben: Trübungsverlaufskurven der hochmolekularen Fraktion aus Bier B.B (B.HMW; schwarz) dotiert mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Fe(II) (● grau) bzw. Fe(III) (▲ grau). Seite 103 Mitte: Trübungsverlaufskurven der hochmolekularen Fraktion aus Bier B.B (B.HMW; schwarz) dotiert mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Fe(II) (● grau) bzw. Fe(III) (▲ grau) und je 100 $\mu\text{mol/l}$ Oxalsäure (Oxal). Seite 103 unten: Trübungsverlaufskurven der hochmolekularen Fraktion aus Bier B.B (B.HMW; schwarz) dotiert mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Fe(II) (● grau) bzw. Fe(III) (▲ grau), je 100 $\mu\text{mol/l}$ Oxalsäure (Oxal) und je 2,1 $\mu\text{U}/\mu\text{l}$ Oxalatoxidase (OxOx). Die Schattierungen stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar. (n = 3)

Die Dotierung von **Fe(II)** und **Fe(III)** zur **B.HMW** führte, ebenso wie bei der Dotierung zu Bier (vgl. 3.3.3.), unmittelbar zum Trübungseintritt (Abbildung 41, oben). Bei diesem Experiment wurden sehr geringe **Fe**-Konzentrationen dotiert, was der Grund dafür sein könnte, dass im Gegensatz zur Dotierung zu Bier keine Unterschiede in Trübungsverläufen der **Fe(II)**- und der **Fe(III)**-dotierten HMW zu erkennen waren. Möglicherweise werden die geringen Mengen an frei vorliegenden **Fe(II)**-Ionen umgehend zum trübungsaktiven **Fe(III)** oxidiert, weshalb nahezu identische Verläufe zu beobachten waren. Durch die kombinierte Zugabe von **Fe** und **Oxal** zur **B.HMW** konnte der trübungsauslösende Effekt nivelliert werden (Abbildung 41, Mitte), was vermutlich auf eine Komplexierung von **Fe** durch **Oxal** zurückzuführen ist. **Oxal** kann sowohl **Fe(II)**- als auch **Fe(III)**-Ionen komplexieren. Im Rekombinat (Abbildung 41, unten) konnte der trübungsauslösende Effekt von **Fe** durch den Einsatz von **OxOx** mit einer zeitlichen Verzögerung wieder hervorgerufen werden, was vermutlich auf den Abbau der stabilisierenden **Oxal** durch **OxOx** zurückzuführen ist, wodurch das im Chelatkomplex chemisch inaktive **Fe** freigesetzt wird. Danach könnte wiederum **Fe(II)** umgehend zu **Fe(III)** oxidiert werden und freigesetztes **Fe(III)** seine trübungsauslösenden Eigenschaften direkt entfalten. Die Verzögerung des Trübungseintritts könnte von einer verlangsamten Umsetzung der **Oxal** durch **OxOx** in Gegenwart von **Fe** herrühren, wie von Pang *et al.* beschrieben (Pang *et al.*, 2015). Eine isolierte Dotierung von **Oxal** bzw. **OxOx** zur **B.HMW** führte ebenso wie die Kombination aus beiden ohne die Zugabe von **Fe** in Kontrollexperimenten nicht zur Trübungsbildung (Daten nicht dargestellt).

Dieses Experiment zeigte, dass **Oxal** einen entscheidenden Beitrag zur kolloidalen Stabilität von Bier leisten kann, der vermutlich in Zusammenhang mit der Komplexierung freier **Fe**-Ionen als lösliches Oxalatoferrat steht. Außerdem kann das Enzym **OxOx** durch den Abbau der stabilisierenden Oxalsäure eine Freisetzung des gebundenen **Fe** bewirken, infolgedessen es zur initialen Trübungsbildung kommt.

3.3.8. Korrelation der trübungsrelevanten Parameter in Handelsproben

Anhand eines biernahen Modellsystems konnte gezeigt werden, dass die Faktoren Eisengehalt (**Fe**), Oxalsäuregehalt (**Oxal**) und Oxalatoxidase-Aktivität (**OxOx**) im Bier einander beeinflussen und in Kombination unmittelbaren Einfluss auf die Trübungsstabilität nehmen. Die Hypothese aus den durchgeführten Experimenten lautete, dass **Fe** im nativen Bier vorwiegend als **Fe(II)** unter anderem von **Oxal** komplexiert vorliegt. Dadurch ist es chemisch inaktiv und oxidationsgeschützt und kann nicht zum trübungsaktiven **Fe(III)** reagieren, weswegen das Bier kolloidal stabil ist. Wird **Oxal** im Verlauf der Lagerung durch das Enzym **OxOx** abgebaut, wird **Fe(II)** freigesetzt und zu **Fe(III)** oxidiert, was einen Trübungseintritt auslöst. Außerdem entsteht bei der Umsetzung von **Oxal** durch **OxOx** Wasserstoffperoxid, was die qualitätsmindernden Oxidationsreaktionen zusätzlich beschleunigt. Es ergaben sich daraus drei maßgebliche und zusammenhängende Faktoren, die für die kolloidale Bierstabilität von Bedeutung sind und die im Modellsystem bestätigt werden konnten. **Fe** als potentiell trübungsaktiver Bierinhaltsstoff, **Oxal** als stabilisierende Komponente und das Enzym **OxOx**, welches durch den von ihm katalysierten Abbau von **Oxal** und das dabei entstehende H_2O_2 maßgeblich destabilisierend wirkt.

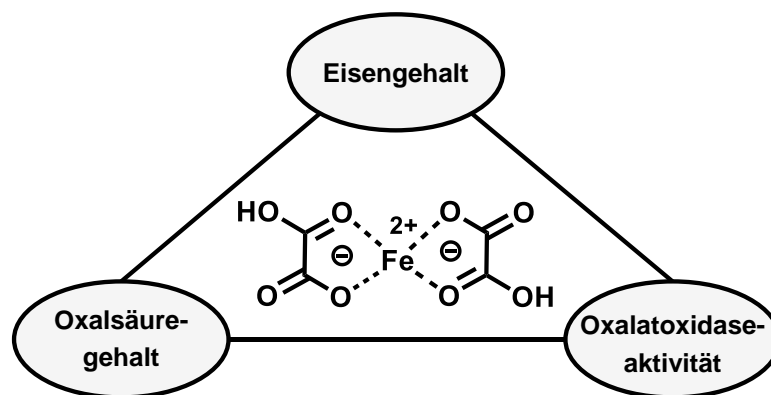


Abbildung 42: Trianguläre Beziehung zwischen dem Eisen- bzw. Oxalsäuregehalt und der Oxalatoxidase-Aktivität im Hinblick auf die Ausbildung von Oxalatoferrat und damit auf die Trübungsstabilität von Bier.

Bier stellt zweifelsohne eine sehr komplexe Matrix dar und auch matrixnahe Modelle lassen in der Regel nur eingeschränkte Bewertungen der Relevanz der als trübungsbeeinflussend identifizierten Parameter zu. Deshalb wurden auf Basis der bisherigen Erkenntnisse Untersuchungen an Realproben durchgeführt, um die anhand von Quantifizierungen, Dotierungs- und Forcierungsexperimenten sowie Modellsystemen erarbeitete Hypothese über das Zusammenwirken der beschriebenen Komponenten bei der Trübungsbildung zu prüfen. Nur so konnte sichergestellt werden, dass die unter artifiziellen Bedingungen erzielten Ergebnisse auch die Komplexität realer Bierproben abbilden und damit auf die Praxis übertragbar sind.

Um die Abhängigkeit zwischen den beschriebenen Parametern und der Trübungsneigung zu untersuchen, wurden in 24 kommerziellen Bierproben (12 Lagerbiere, 12 Pilsener Biere) der Eisengehalt (**Fe**), der Oxalsäuregehalt (**Oxal**) und die Oxalatoxidase-Aktivität (**OxOx**) quantifiziert und diese Daten mit den eingangs untersuchten Trübungsstabilitäten dieser Biere korreliert (siehe 3.1., Abbildungen 9 und 10, Seite 30-31). Auf diese Weise sollte getestet werden, ob sich die unterschiedlichen kolloidalen Stabilitäten der analysierten Handelsproben anhand der aufgestellten Hypothese erklären ließen. Abbildung 43 gibt zunächst einen Überblick über die quantifizierten Parameter in den **Bieren 1-24**.

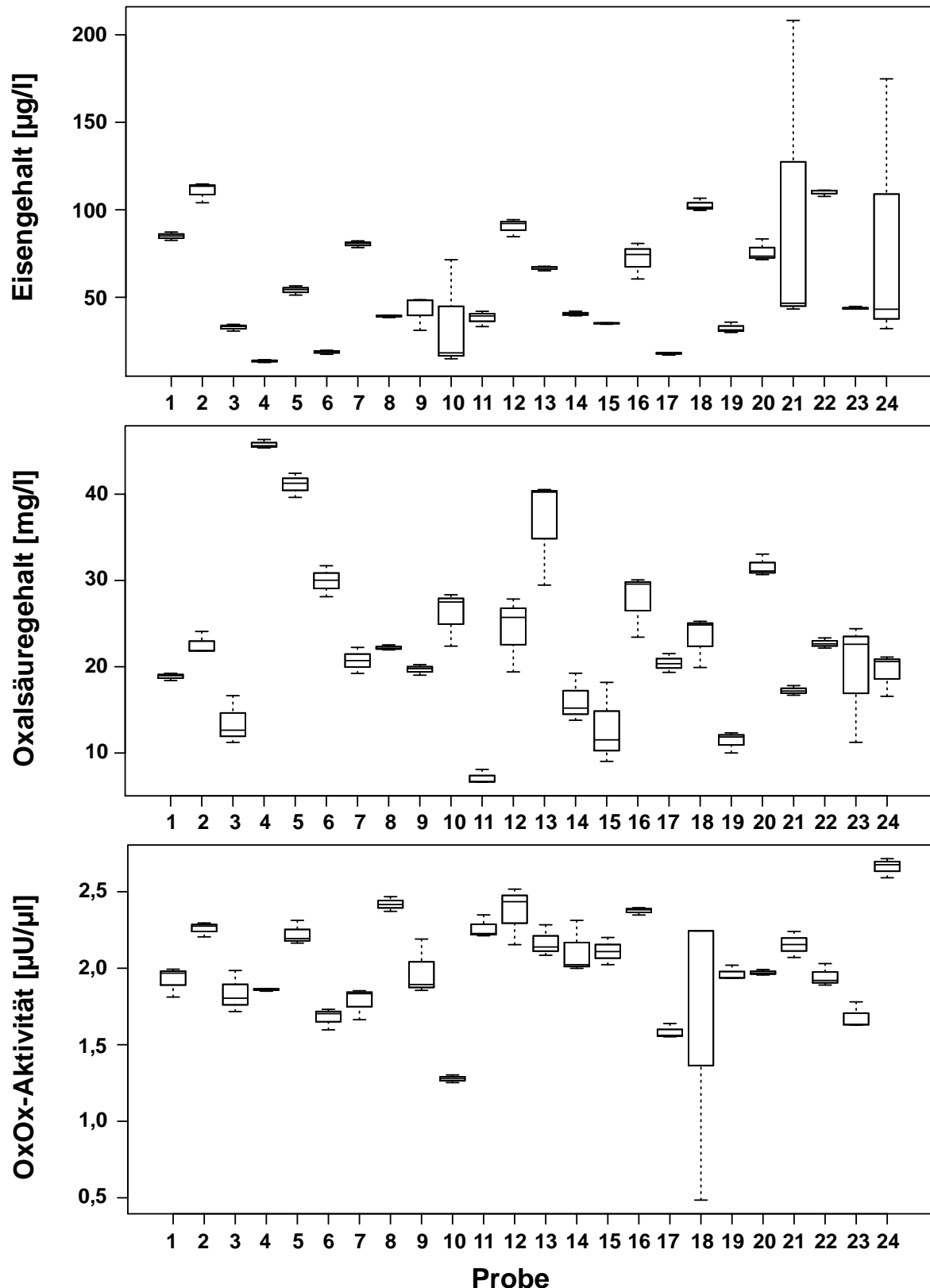


Abbildung 43: Box-Whiskers-Plots der für die Korrelation mit der Trübungsstabilität erhobenen quantitativen Daten der kommerziellen Biere 1-24. Oben: Eisengehalte der Biere 1-24 in [$\mu\text{g/l}$] ($n = 3$). Mitte: Oxalsäuregehalte der Biere 1-24 in [mg/l] ($n = 3$). Unten: Oxalatoxidase-Aktivität der Biere 1-24 in [$\mu\text{U}/\mu\text{l}$] ($n = 3$).

Wie Abbildung 43 zu entnehmen ist, waren die quantitativen Daten, die als Grundlage für die Korrelation mit den Trübungsneigungen der Biere dienten, konsistent und konnten mit hohen Genauigkeiten und geringen Fehlern bestimmt werden. Größere Abweichungen innerhalb eines Triplikats traten nur vereinzelt auf (Eisengehalte der **Biere 10, 21, 24**; Oxalsäuregehalte der **Biere 13, 23**; OxOx-Aktivität von **Bier 18**). Dies kann mitunter darauf zurückzuführen sein, dass es sich letztlich um fermentierte Lebensmittel und damit komplexe biologische Matrices handelt. Die Datenlage war jedoch nicht hinreichend, um einzelne Werte statistisch valide als Ausreißer ausschließen zu können, weswegen alle Daten mit in die folgende multivariate Auswertung einbezogen wurden.

Insgesamt war zu beobachten, dass sich bei den einzelnen Parametern teils erhebliche quantitative Unterschiede zwischen den Bieren zeigten. Die jeweils niedrigsten und höchsten **Fe-** bzw. **Oxal-** Gehalte unterschieden sich um bis zu Faktor 10. Die Enzymaktivitäten zeigten zwar keine so großen Differenzen, dennoch wurde im **OxOx-**aktivsten **Bier 24** noch eine mehr als doppelt so hohe Enzymaktivität festgestellt, verglichen mit der niedrigsten **OxOx-**Aktivität in **Bier 10**. Zu beachten war, dass es sich um 24 handelsübliche Biere zweier Bierstile handelte, deren Herstellung sich hinsichtlich der Zutaten und der Prozessführung, mit Ausnahme der Hopfengabe, allerdings nicht maßgeblich voneinander unterscheiden sollte (Lagerbier und Pilsener Bier). Dennoch zeigten die Biere deutliche Unterschiede bezüglich der analysierten Parameter. In Summe bildeten die Genauigkeit der quantitativen Analysen zusammen mit der Beobachtung, dass sich die betrachteten Parameter in den einzelnen Bieren teils deutlich voneinander unterschieden, eine solide Grundlage für die folgenden Korrelationsberechnungen.

Die Handelsproben **1 - 24** wurden wie unter 4.3. beschrieben einer forcierten Alterung unterzogen, wobei über den Verlauf der Lagerung hinweg die Trübungsintensitäten regelmäßig bei unterschiedlichen Temperaturen erfasst wurden. Die Gesamttrübung wurde bei 0 °C (**t0**) bestimmt, die Dauertrübung bei 25 °C (**t25**). Die Abbildungen 9 und 10 (siehe 3.1, Seite 30-31) zeigen die resultierenden Trübungsverlaufskurven aller Biere. Um die quantifizierten Parameter mit den Trübungsdaten der Bierproben zu korrelieren, wurden die Trübungsstabilitäten zunächst einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, *principle component analysis*) unterzogen (Abbildungen 44 und 45).

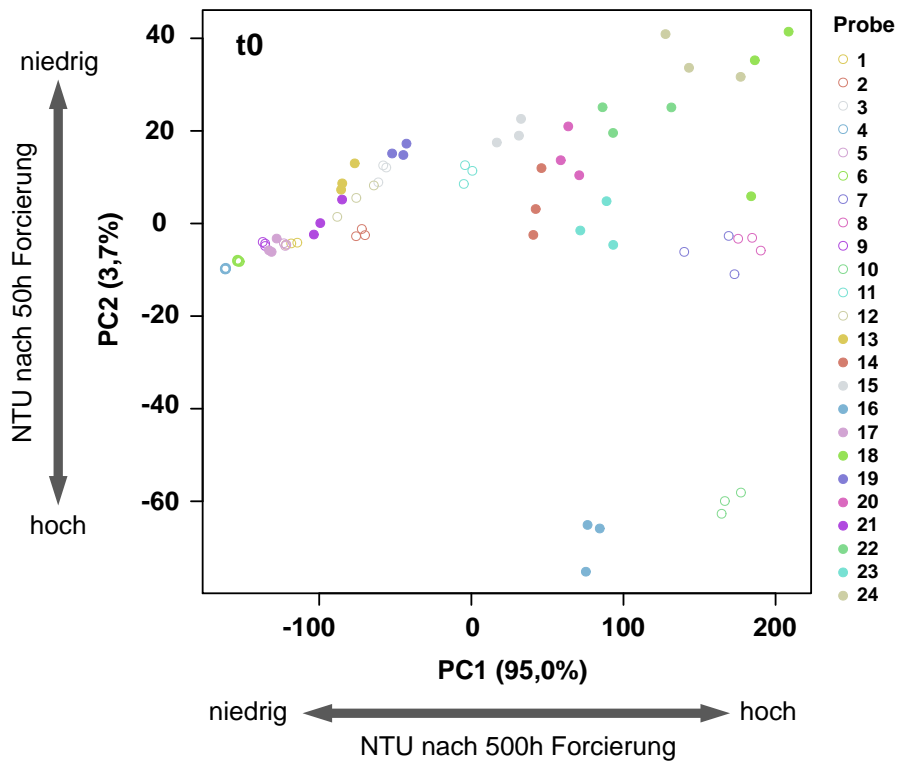


Abbildung 44: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Trübungsstabilitäten der kommerziellen Biere 1-24 zur Gesamtrübung (t_0 = Trübungsmessung bei 0 °C).

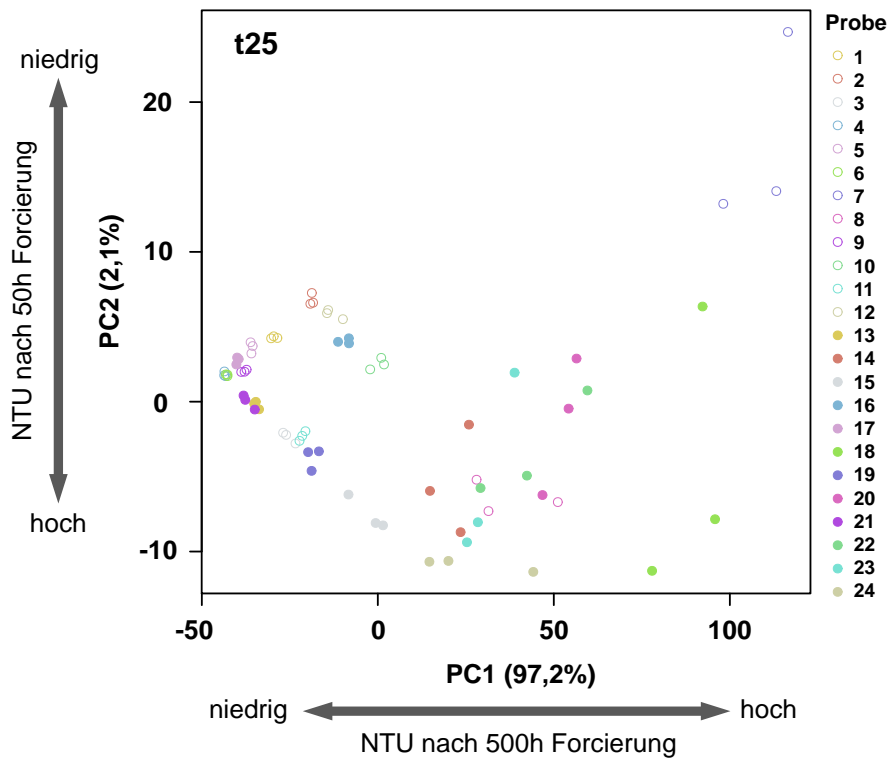


Abbildung 45: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Trübungsstabilitäten der kommerziellen Biere 1-24 zur Dauertrübung (t_{25} = Trübungsmessung bei 25 °C).

Durch die Auswertung der Trübungsdaten mittels PCA ergab sich eine Ordnung der Proben auf Basis der Trübungswerte (NTU) zu frühen Zeitpunkten (Forcierungszeit 50 h) bzw. späten Zeitpunkten (Forcierungszeit 500 h) der forcierten Bieralterung. Entlang der 1. Hauptkomponente **PC1** erfolgte die Ordnung der Daten von niedrigen NTU (-PC1) nach hohen NTU (+PC1) nach 500 h Forcierungszeit. Entlang der 2. Hauptkomponente **PC2** erfolgte die Ordnung der Proben von hohen NTU (-PC2) nach niedrigen NTU (+PC2) nach 50 h der Forcierung. Demnach fanden sich die Biere, die am Ende der forcierten Alterung hohe Trübungswerte aufwiesen, rechts (+PC1) und die Biere, welche nicht zur Trübungsbildung neigten, links (-PC1). Jene Biere, die schon im frühen Stadium der forcierten Alterung vergleichsweise hohe NTU aufwiesen, bei denen die Trübungsintensität also bereits zu Beginn der Alterung stark anstieg (z.B. **Biere 10 und 16; t0**), lagen in der PCA unten (-PC2) und solche Biere, deren Trübungsintensität langsamer anstieg (z.B. **Bier 7; t25**), fanden sich in der PCA oben (+PC2).

Sowohl bei der Gesamttrübung (**t0**), als auch bei der Dauertrübung (**t25**) zeigte sich, dass die Varianz der Proben besser durch die 1. Hauptkomponente (**PC1**) beschrieben wird (Trübung nach 500 h) als durch die 2. Hauptkomponente (**PC2**) (Trübung nach 50 h). Außerdem stand bei den durchgeführten Untersuchungen weniger die Dynamik der Trübungsbildung als das Ausmaß ebendieser im Fokus, also die Gesamtintensität der Trübungsbildung und damit die Menge des gebildeten Präzipitats im beobachteten Zeitraum. Deshalb wurde für die nachfolgenden Korrelationsberechnungen **PC1** herangezogen, um diese mit den quantitativen Daten (Eisengehalt (**Fe**), Oxalsäuregehalt (**Oxal**) und **OxOx**-Aktivität) zu korrelieren.

Korrelation des Eisengehalts mit der Trübungsstabilität

Zunächst sollten die in den **Bieren 1-24** quantifizierten Parameter jeweils isoliert mit den Trübungsdaten korreliert werden, um auszuschließen, dass die Korrelation aller Daten durch eine Übergewichtung eines Einzelparameters im Sinne einer Überinterpretation negativ beeinflusst wird. Hierzu wurden die ermittelten quantitativen Werte zu den Eisengehalten (**Fe**) der 24 Bierproben mit **PC1** aus der PCA der Trübungsdaten linear korreliert (Abbildung 46).

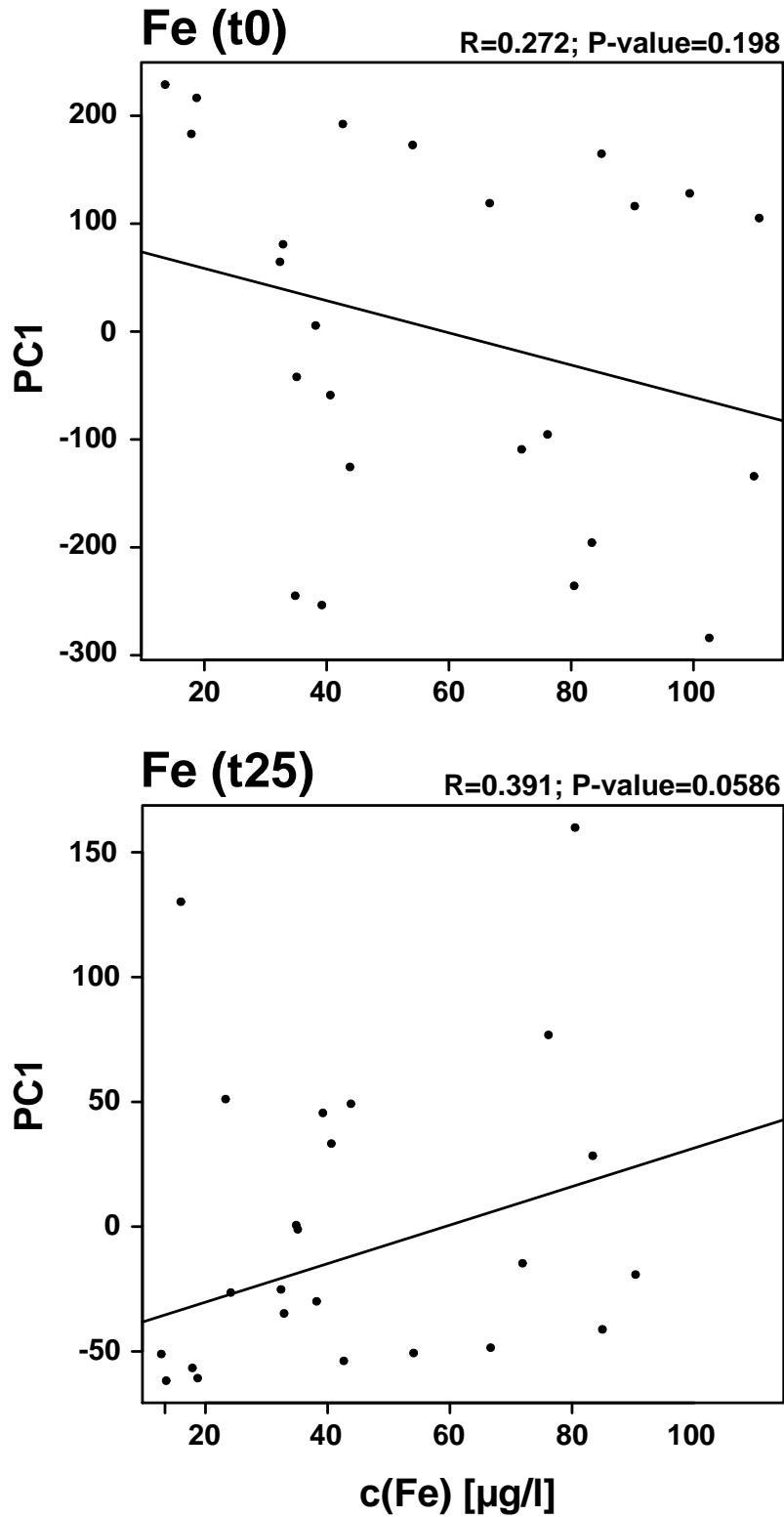


Abbildung 46: Lineare Korrelation der Eisengehalte (Fe) der kommerziellen Bierproben 1-24 in $[\mu\text{g/l}]$ (x) mit ihren Trübungsstabilitäten ($y = \text{PC1}$). Oben: Gesamttrübung (t_0 = Trübungsmessung bei $0\text{ }^\circ\text{C}$). Unten: Trübungsdaten der Dauertrübung (t_{25} = Trübungsmessung bei $25\text{ }^\circ\text{C}$).

Die Regressionskoeffizienten der erhaltenen Regressionsgeraden von $R_{t_0} = 0,272$ ($R^2(t_0) = 0,074$) und $R_{t_{25}} = 0,391$ ($R^2(t_{25}) = 0,153$) zeigten, dass der Eisengehalt der Biere isoliert keinen aussagekräftigen Faktor für die Vorhersage der Trübungsstabilität darstellt. Die Eisenkonzentration korrelierte isoliert betrachtet nicht mit dem Trübungsverhalten der untersuchten Biere.

Korrelation des Oxalsäuregehalts mit der Trübungsstabilität

Weiters wurden die Oxalsäuregehalte (**Oxal**) der **Biere 1-24** mit deren Trübungsstabilitäten korreliert. Hierzu wurden ebenfalls die quantifizierten Oxalsäuregehalte mit **PC1** aus der PCA der Trübungsdaten linear korreliert (Abbildung 47).

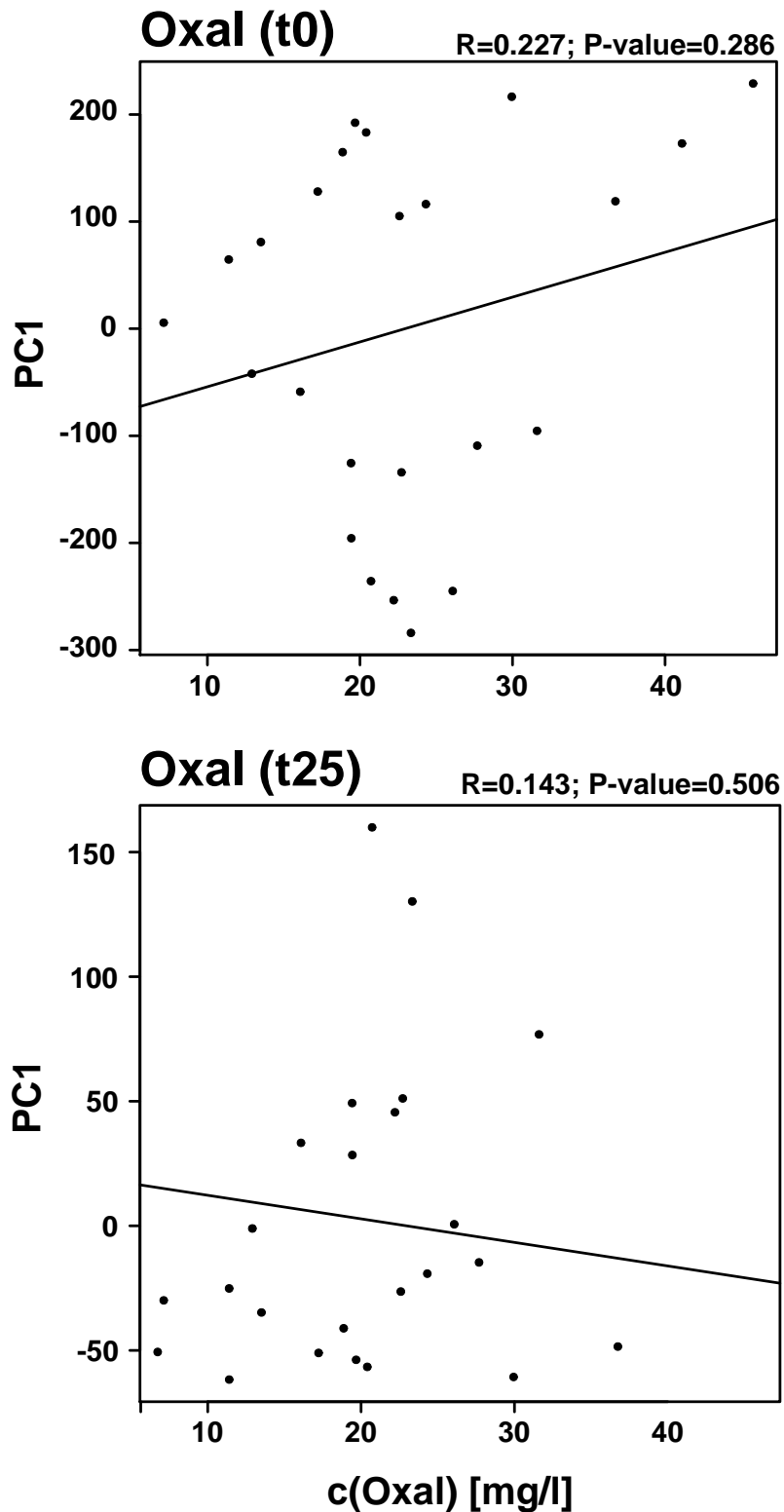


Abbildung 47: Lineare Korrelation der Oxalsäuregehalte (Oxal) der kommerziellen Bierproben 1-24 in [mg/l] (x) mit ihren Trübungsstabilitäten (y = PC1). Oben: Trübungsdaten der Gesamtrübung (t0 = Trübungsmessung bei 0 °C). Unten: Trübungsdaten der Dauertrübung (t25 = Trübungsmessung bei 25 °C).

Die Regressionskoeffizienten der erhaltenen Regressionsgeraden von $R_{t_0} = 0,227$ ($R^2(t_0) = 0,052$) und $R_{t_{25}} = 0,143$ ($R^2(t_{25}) = 0,021$) zeigten, dass auch der Oxalsäuregehalt der Biere isoliert betrachtet keinen aussagekräftigen Faktor für die Vorhersage der Trübungsstabilität der Proben darstellte. Ebenso wie die Eisenkonzentration korrelierte demnach auch die Oxalsäurekonzentration der untersuchten Biere einzeln betrachtet nicht mit deren Trübungsverhalten.

Korrelation der Oxalatoxidaseaktivität mit der Trübungsstabilität

Äquivalent zum Eisen- und Oxalsäuregehalt wurde auch die Oxalatoxidaseaktivität (**OxOx**) mit den Trübungsstabilitäten der **Biere 1-24** korreliert. Hierzu wurden ebenfalls die quantifizierten **OxOx**-Aktivitätswerte der Bierproben mit **PC1** aus der PCA der Trübungsdaten linear korreliert (Abbildung 48).

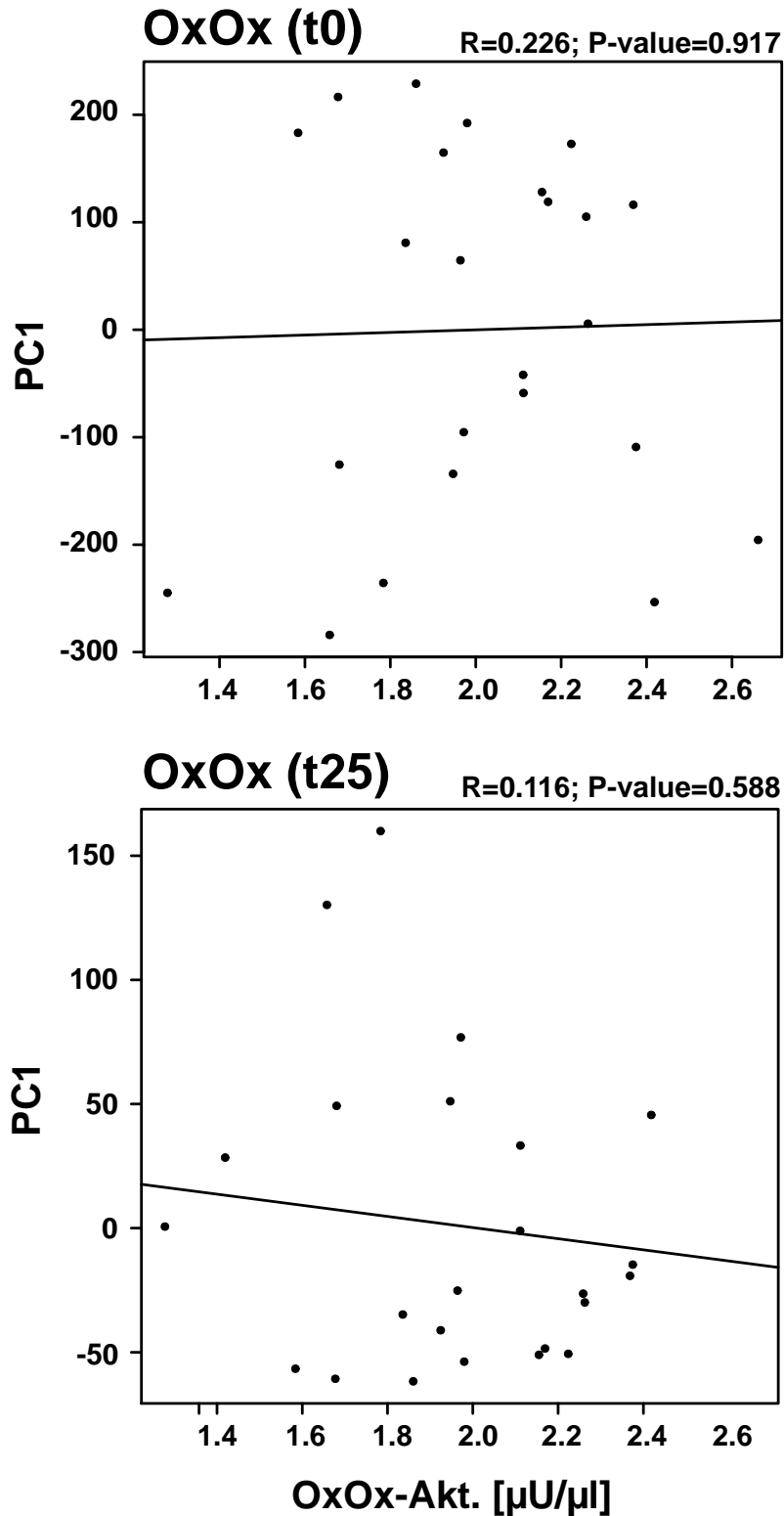


Abbildung 48: Lineare Korrelation der Oxalatoxidaseaktivität (OxOx) der kommerziellen Bierproben 1-24 in [$\mu\text{U}/\mu\text{l}$] (x) mit ihren Trübungsstabilitäten ($y = \text{PC1}$). Oben: Trübungsdaten der Gesamttrübung ($t_0 =$ Trübungsmessung bei 0°C). Unten: Trübungsdaten der Dauertrübung ($t_{25} =$ Trübungsmessung bei 25°C).

Auch hier zeigten die erhaltenen Regressionskoeffizienten von $R_{t_0} = 0,023$ ($R^2(t_0) = 0,001$) und $R_{t_{25}} = 0,116$ ($R^2(t_{25}) = 0,014$), dass die Oxalatoxidaseaktivität, ebenso wie die zuvor betrachteten Eisen- bzw. Oxalsäuregehalte, separat betrachtet keinen aussagekräftigen Faktor für die Vorhersage der Trübungsstabilität darstellt.

Korrelation von Eisengehalt, Oxalsäuregehalt und Oxalatoxidaseaktivität mit der Trübungsstabilität

Anhand isolierter Betrachtungen der Faktoren Eisengehalt (**Fe**), Oxalsäuregehalt (**Oxal**) und Oxalatoxidaseaktivität (**OxOx**) konnten keine Korrelationen eines einzelnen Parameters mit dem Trübungsverhalten der **Biere 1-24** festgestellt werden. Auf Basis der durchgeführten Experimente wurde die Hypothese aufgestellt, dass in einem nativen System, in dem die Inhaltsstoffe zunächst in einem chemischen Gleichgewicht und damit stabil (gelöst) vorliegen, lediglich eine Interaktion aller drei Parameter mit der Trübungsneigung in Verbindung gebracht werden kann. Daher wurde folgend ein Korrelationsmodell berechnet, um zu prüfen, ob sich auf Basis der kombinierten Parameter eine Vorhersage für das Trübungsverhalten eines Bieres und damit dessen Trübungsstabilität ableiten lässt (Abbildung 49).

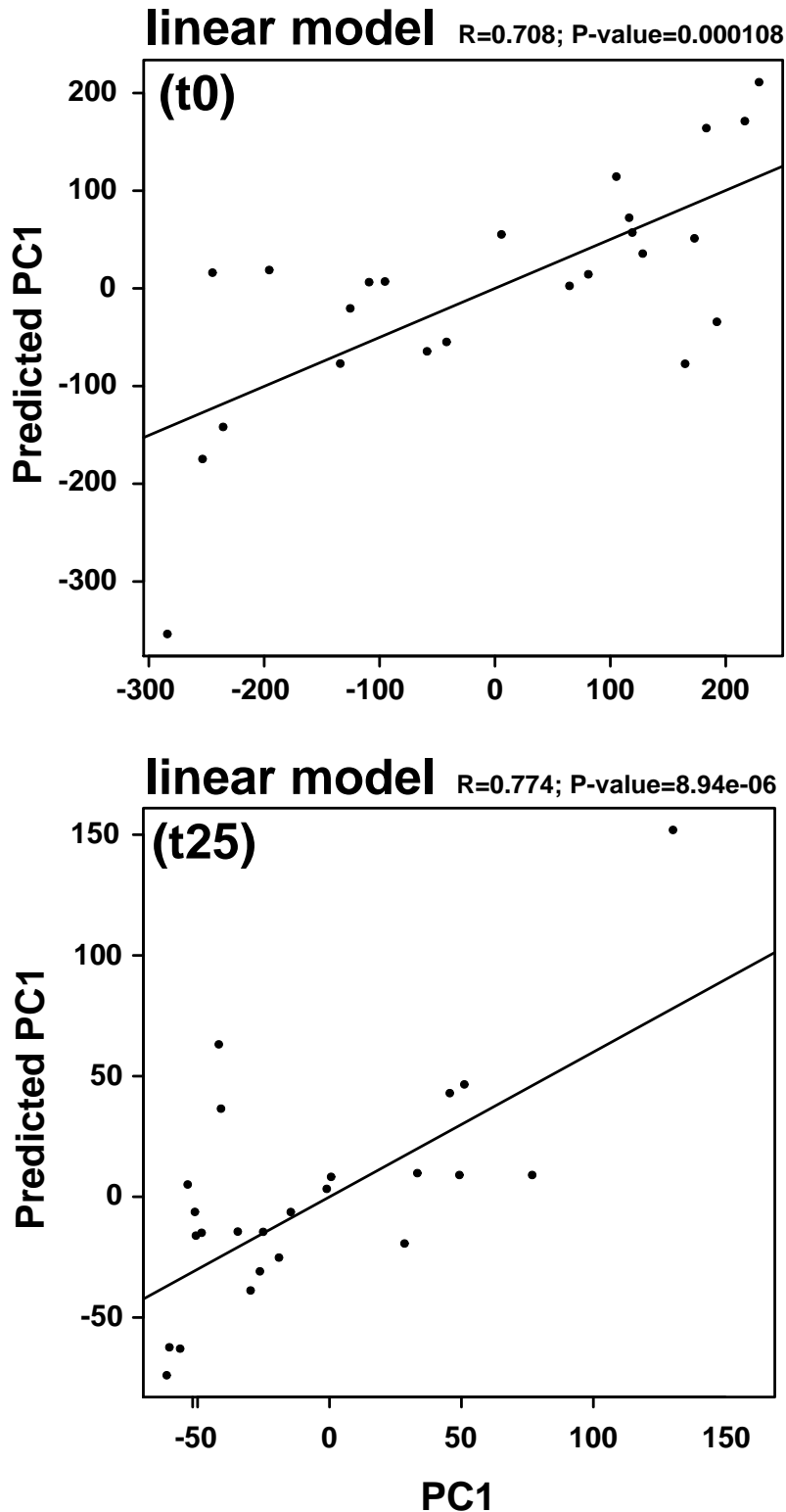


Abbildung 49: *Pearson*-Korrelationsmodell aus dem Eisengehalt (Fe), dem Oxalsäuregehalt (Oxal), der Oxalatoxidaseaktivität (OxOx) und der Trübungsstabilität der kommerziellen Biere 1-24 (PC1). Oben: Trübungsdaten der Gesamtrübung (t_0 = Trübungsmessung bei 0 °C). Unten: Trübungsdaten der Dauertrübung (t_{25} = Trübungsmessung bei 25 °C).

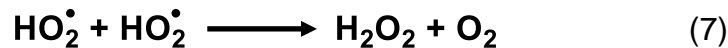
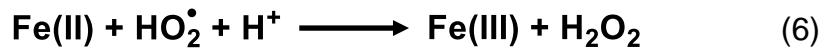
Erst unter Einbeziehung aller drei Parameter (**Fe**, **Oxal** und **OxOx**), zeigten sich Korrelationen mit der kolloidalen Stabilität der untersuchten **Biere 1-24**. Die Regressionskoeffizienten von $R_{t_0} = 0,708$ ($R^2(t_0) = 0,501$) und $R_{t_{25}} = 0,774$ ($R^2(t_{25}) = 0,599$) zeigten, dass sich bis zu 50 % (Gesamttrübung; t_0) bzw. 60 % (Dauertrübung; t_{25}) der Varianz bezogen auf das jeweilige Trübungsverhalten anhand der 3 analysierten Parameter **Fe**, **Oxal** und **OxOx** erklären lässt.

3.4. Diskussion

Durch umfassende Quantifizierungen der Komponenten alterungsbedingter Biertrübungen aus unterschiedlichen Bieren, gezielten Dotierungsexperimenten mit Bier und der hochmolekularen Bierfraktion, der Rekombination der als trübungsrelevant identifizierten Bierinhaltsstoffe in einem Modellsystem und der Korrelation ebendieser Parameter im Zuge einer Warenkorbanalyse konnte eine fundierte Hypothese eines Zusammenspiels mehrerer Bierinhaltsstoffe, welches maßgeblich zur Trübungsbildung beiträgt, konstruiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Oxalsäure (**Oxal**) in höheren Konzentrationen keinen verstärkenden Einfluss auf die Trübungsneigung von Bier hat, wohingegen den in Bier vorkommenden Mengen eine wichtige stabilisierende Funktion zukommt. So wird trübungsauslösendes Eisen (**Fe**), vermutlich als Oxalatoferat, in Lösung gehalten und dessen trübungsaktives Potential durch ionische Komplexierung unterdrückt. Oxalatoxidase (**OxOx**) kann dieses Gleichgewicht durch den Abbau der **Oxal** und die damit einhergehende Freisetzung des **Fe** aus dem Chelatkomplex stören, wobei im Zuge der enzymatischen Umsetzung von **Oxal** zudem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht. Dieses könnte die Oxidation von nicht trübungsaktivem **Fe(II)** zu trübungsaktivem **Fe(III)** zusätzlich beschleunigen. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die selektive Entfernung von H_2O_2 aus Bier mittels Katalase einen positiven Einfluss auf die Trübungsstabilität hat. Folglich kann nur aus der Wechselwirkung aller drei Faktoren, dem **Fe**-Gehalt, dem **Oxal**-Gehalt und der **OxOx**-Aktivität, ein kolloidal stabiles Bier resultieren.

Rolle des Eisens und der Hopfenphenole

Während Bier durch den Entzug von Eisenionen mittels EDTA weitreichend kolloidal stabilisiert wurde, führten bereits geringe Erhöhungen der Eisenkonzentration im nativen Bier zu signifikant schlechteren Stabilitätswerten (siehe 3.3.3.). **Fe** könnte dabei auf unterschiedliche Weise trübungsaktiv wirken. Als redoxaktives Übergangsmetall ist es in der Lage, Peroxide im Zuge der *Fenton*-Reaktion reduktiv zu spalten, wobei im Falle der Spaltung von H_2O_2 das Hydroxidion und das Hydroxylradikal entstehen und **Fe(II)** zu **Fe(III)** oxidiert wird, wie durch Gleichung 1 beschrieben (Fenton, 1894). Die dabei entstehenden Hydroxylradikale sind entscheidend für die Bedeutung dieser Reaktion, da sie hochreaktiv sind und eine radikalische Kettenreaktion, den sogenannten *Haber-Weiss*-Zyklus, auslösen können, der durch die Gleichungen 2 – 7 beschrieben wird (Haber & Weiss, 1934).



Gleichungen 1-7: Reaktionsgleichungen der *Fenton-Reaktion* (1) und des *Haber-Weiss-Zyklus* (2-7) (Koppenol, 2001; Pignatello *et al.*, 2006; Walling, 1975; Wiegand *et al.*, 2017).

Die im Zuge der *Fenton/Haber-Weiss-Reaktion* entstehenden Radikale, insbesondere das hochreaktive Hydroxylradikal, sind starke Oxidantien und können biologische Matrices zerstören, indem sie beispielsweise Sekundärmetaboliten oder Proteine oxidieren (Enami *et al.*, 2014; Georgi *et al.*, 2007; Pignatello *et al.*, 2006). Außerdem kann die Radikalbildung im Zuge der sogenannten *photo-Fenton-Reaktion* bei Wellenlängen im UV-Bereich massiv verstärkt werden (Ruppert *et al.*, 1993). Dies kann die Lichtempfindlichkeit von Bier erklären, welches unter Sonneneinstrahlung ebenfalls trüb wird und daher vorzugsweise in Braunglasflaschen oder anderen UV-Licht-undurchlässige Materialien gelagert werden sollte. *Fenton-Reaktionen* laufen in saurem Milieu und am schnellsten bei pH-Werten um pH 3 ab (Fischbacher *et al.*, 2017).

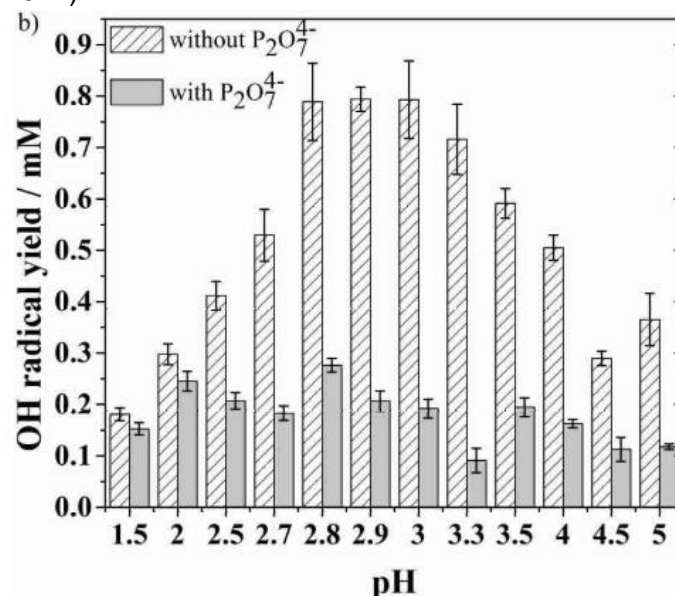


Abbildung 50: Ausbeute an Hydroxylradikalen im Zuge der *Fenton-Reaktion* bei unterschiedlichen pH-Werten mit und ohne Zugabe von Pyrophosphat, welches durch Komplexierung von Fe(III) den Abbruch der *Fenton-Reaktion* auf einem gewissen Hydroxylradikal-Level induziert (Fischbacher *et al.*, 2017).

Dennoch kann die radikalische Kettenreaktion, wie von Fischbacher gezeigt, ebenso bei Bier-typischen pH-Werten um pH 4,5 ablaufen (Fischbacher *et al.*, 2017). Hierbei ist eine verlangsamte Reaktionsgeschwindigkeit zu erwarten, die dann maßgeblich von der **Fe**- und der Peroxid-Konzentration abhängt.

Die spezifische Anreicherung von Ionen in Biertrübung wurde in der Vergangenheit bereits beobachtet, konnte bislang aber noch nicht hinreichend erklärt werden. Wie unter 3.2.4. dargestellt, konnte in dieser Arbeit auch eine starke Anreicherung von Hopfenmetaboliten in der Biertrübung beobachtet werden. Diese Ergebnisse können in Zusammenhang mit einer Studie von Wietstock *et al.* gebracht werden, in der sie zeigten, dass α -, β - und *iso*- α -Säuren stark mit Eisen- und Kupferionen wechselwirken und in höheren Konzentrationen auch Niederschläge von dunkler Farbe auftraten (Wietstock *et al.*, 2016). Die Tatsache, dass bei den hier durchgeführten ein unmittelbarer trübungsauslösender Effekt nur für **Fe(III)**, nicht aber für **Fe(II)** festgestellt wurde, stünde ebenfalls im Einklang mit diesen Beobachtungen. Da die Hopfenbitterstoffe nur mit **Fe(III)** präzipitierten, nicht aber mit **Fe(II)**, postulierten Wietstock *et al.* einen Mechanismus, in dem **Fe(III)** als Zentralatom dreifach koordiniert von α -Säuren vorliegt (Wietstock *et al.*, 2016).

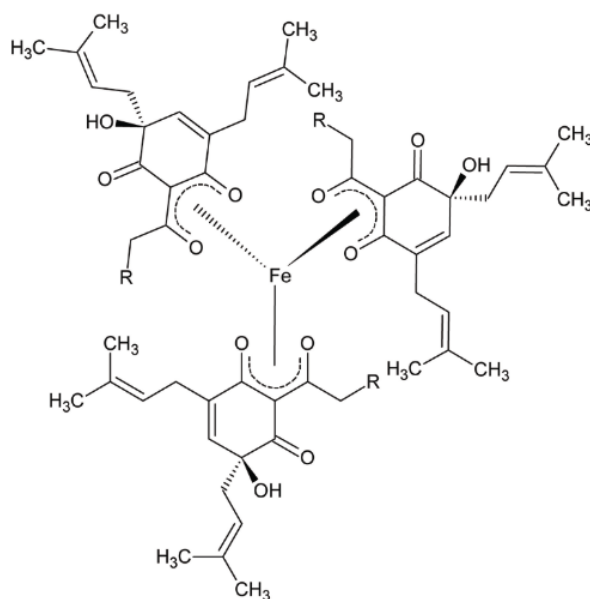


Abbildung 51: Von Wietstock *et al.* postulierter Eisen(III)- α -Säure-Komplex (Wietstock *et al.*, 2016).

Darauf basierend sind zwei Mechanismen der Trübungsbildung unter Einwirkung von **Fe**-Ionen in Kombination mit Hopfensäuren denkbar. Zum einen könnten die **Fe**-Humulon-Komplexe präzipitieren und dabei weitere Bierinhaltsstoffe mitreißen. Zum anderen könnten die via **Fe(III)** ionisch verbrückten Hopfenbittersäuren, vergleichbar mit kondensierten Polyphenolen, noch

bessere Adhäsionseigenschaften an Proteine aufweisen als die entsprechenden Monomere, deren Interaktionen mit Bierproteinen bereits detailliert beschrieben wurden (Evans & Sheehan, 2018; Hughes, 2000). Bei einer Präzipitation der Proteinfraction würden die Hopfensäure-Komplexe ebenfalls ausfallen. Beide Mechanismen würden unmittelbar zu einer selektiven Anreicherung von Hopfenbittersäuren und **Fe** im Trübungsmaterial führen, was im Rahmen dieser Arbeit beides eindeutig nachgewiesen werden konnte (siehe 3.2.4. und 3.2.5.).

Da allerdings, wie anhand des Rekombinats gezeigt wurde (siehe 3.4.7.), Hopfenbittersäuren nicht zwingend notwendig sind, um einen Trübungseintritt initial hervorzurufen, könnte außerdem auch eine Präzipitation freigesetzter **Fe**-Ionen in Form schwerlöslicher Hydroxide stattfinden, wodurch andere Bierinhaltsstoffe mitgerissen werden könnten. Dies würde, ebenso wie die Präzipitation von **Fe**-Humulon-Komplexen, gestützt durch die Beobachtung, dass die HMW isoliert nicht präzipitiert, die LMW hingegen in begrenztem Umfang schon (siehe 3.3.1.). $\text{Fe}(\text{OH})_3$ weist, ebenso wie alle isolierten Biertrübungen, eine dunkelbraune bis schwarze Farbe auf. Auch dies könnte die starke Anreicherung von **Fe** in der Biertrübung erklären.

Die unterschiedlichen Qualitäten von **Fe(II)** und **Fe(III)** hinsichtlich deren Effekte auf die Intensität der Trübungsbildung, welcher im Falle der **Fe(II)**-Dotierung nicht initial, aber absolut betrachtet deutlich ausgeprägter war (siehe 3.3.3.), könnten ebenfalls durch die erläuterten Reaktionswege erklärt werden. Während **Fe(III)** als trübungsaktive Ionenspezies entweder in Hopfensäure-Komplexen oder als **Fe(III)**-Hydroxid präzipitiert und damit der *Fenton/Haber-Weiss*-Kaskade entzogen wird, könnte **Fe(II)** entsprechend der Gleichungen 1, 3, 4 und 6 trotzdem noch ohne Beteiligung von **Fe(III)** zu reaktiven Radikalen und weiteren Mol **Fe(III)** reagieren. Dadurch würde sich freies **Fe(II)** im Gegensatz zu **Fe(III)** in zweifacher Hinsicht negativ auf die Trübungsstabilität auswirken, was die Beobachtung der insgesamt stärkeren Trübungsbildung bei Dotierung von **Fe(II)** abbildet.

Zusammenfassend war demnach anzunehmend, dass insbesondere **Fe** den initialen Faktor für die Trübungsbildung darstellt, wobei die Basis, um die Kolloidbildung in Gang zu setzen, wohl die Freisetzung komplexierter **Fe**-Ionen darstellt. Diesbezüglich konnte auch gezeigt werden, dass bereits minimale Konzentrationsveränderungen zu einer höheren Trübungsneigung des Bieres führten (siehe 3.3.3.). Beeinflussungen derart niedriger Konzentrationsniveaus wie den hier analysierten, in Größenordnungen einiger hundert nmol/l, wären durch **Fe**-Einträge über das Brauwasser oder im Zuge der Hopfung durchaus möglich (Wietstock *et al.*, 2018). Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass dotiertes **Fe** das Equilibrium eines gelagerten Bieres vermutlich nicht in einem so kurzen Zeitraum, wie der beobachteten Forcierungszeit

erreichen kann und extrinsisch zugesetzte **Fe**-Ionen deshalb einen vergleichsweise stärkeren Effekt auf die Trübungsbildung haben dürften, als das intrinsisch in Bier vorliegende **Fe**.

Im Gegensatz zur Dotierung von Übergangsmetallen, zeigten Zugaben von Polyphenolen und Hopfenbitterstoffen in Form von Hopfenextrakten keine Auswirkungen auf die Trübungsneigung (siehe 3.3.2.). Dies steht, zumindest im Hinblick auf die Polyphenolfraktion, im Widerspruch zur bislang vorherrschenden Literaturmeinung, nach der Polyphenole und insbesondere deren Kondensationsprodukte maßgeblich für die Trübungsbildung verantwortlich sind (Asano *et al.*, 1982; Asano *et al.*, 1984; Delcour *et al.*, 1984a; Delcour *et al.*, 1984b). Hierbei wurde häufig argumentiert, dass eine Behandlung mit PVPP Biere kolloidal stabilisiert, da Wechselwirkungen zwischen trübungsaktiven Polyphenolen und dem Stabilisierungsmittel zum Entzug ebendieser Polyphenole führt (McMurrough *et al.*, 1992; McMurrough *et al.*, 1996; Mikyška *et al.*, 2002; Mikyška *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wird bei einer PVPP-Stabilisierung auch von einer *polyphenolseitigen Stabilisierung* gesprochen (Narziß *et al.*, 2017). Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch berechtigte Zweifel an dieser Theorie zu, wie sie auch bereits in anderen Arbeiten angedeutet wurden (Loch-Ahring *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2016). Die erhöhte kolloidale Stabilität von Bier nach einer Behandlung mit PVPP und die dadurch hervorgerufenen Veränderungen der Polyphenolfraktion wurden zwar vielfach belegt und sind aufgrund der zielführenden Umsetzung in der Braupraxis zweifelsfrei zutreffend, allerdings könnten die zugrundeliegenden Mechanismen, die letztlich zur Stabilisierung des Bieres beitragen, womöglich andere sein, als die Filtration der Polyphenole. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass auch Metallionen stark mit *N*-Vinyl-2-pyrrolidon- (NVP) bzw. Poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidon)- (PVP) basierten Materialien wechselwirken (Abd El-Mohdy *et al.*, 2013; Çaykara & İnam, 2003; Essawy & Ibrahim, 2004; Lu *et al.*, 2011; Mira *et al.*, 2007; Yetimoğlu *et al.*, 2007; Yildiz *et al.*, 2010). Stabilisierungsmaßnahmen mittels PVPP könnten also neben Einflüssen auf die Polyphenolfraktion auch maßgebliche Auswirkungen auf die anorganische Fraktion des Bieres haben, was insbesondere die Gehalte der Metallionen betreffen könnte. Damit würde letztlich das angestrebte Ziel, nämlich die kolloidale Stabilisierung des Bieres, erreicht, allerdings mit einer von der bisherigen Meinung abweichenden chemischen Begründung. Dies könnte von Bedeutung für die Untersuchung von Rohstoffen und den dabei angelegten Qualitätskriterien und damit auch den künftigen Umgang mit evtl. verzichtbaren oder ersetzbaren Stabilisierungsmitteln sein.

Rolle der Oxalsäure und des pH-Wertes

Aufbauend auf den Erkenntnissen der durchgeführten Experimente konnte angenommen werden, dass Oxalsäure (**Oxal**) in Bier als wichtiger Stabilisator für trübungsaktive Eisenionen fungiert. Während ein Zusatz von **Oxal** keine merklichen Effekte bzgl. der kolloidalen Bierstabilität zeigte, führte ein selektiver Entzug zu deutlich schlechteren Stabilitätswerten (siehe 3.3.4.). Oxalsäure ist ein organischer Komplexbildner und bindet Eisenionen in einem Chelatkomplex als Oxalatoferrat (Daugherty *et al.*, 2017; Fischbacher *et al.*, 2017; Panias *et al.*, 1996). Sie wird als starke organische Säure eingestuft und weist als einfachste Dicarbonsäure zwei pK_S -Werte auf.

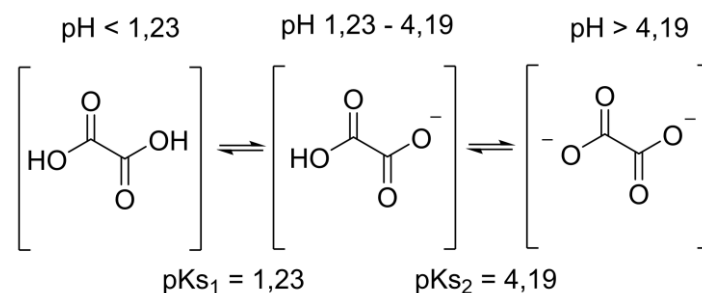


Abbildung 52: Protonierungszustände der zweibasigen Oxalsäure bei unterschiedlichen pH-Werten.

Damit läge **Oxal** bei Bier-typischen pH-Werten um pH 4,5 zweifach deprotoniert vor. Das chemische Gleichgewicht der **Fe**-Komplexierung ist demnach stark pH-Wert-abhängig, wie Abbildung 53 zeigt.

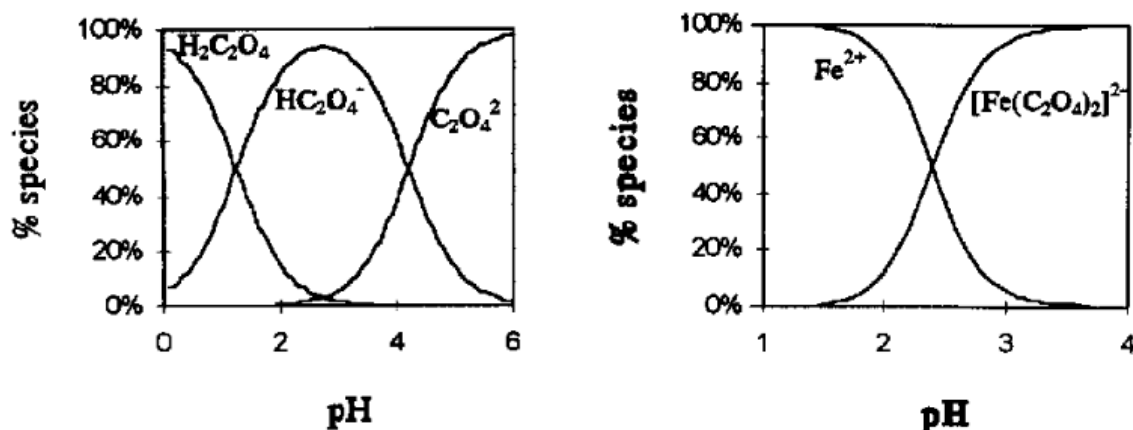


Abbildung 53: Links: pH-Wert-Abhängigkeit des Protonierungs-Gleichgewichts zwischen Oxalsäure und Oxalat. Rechts: pH-Wert-Abhängigkeit der Komplexbildung von freien $\text{Fe}(\text{II})$ -Ionen als Oxalatoferrat (Panias *et al.*, 1996).

Das Säure-Base-Gleichgewicht von **Oxal** liegt bei pH 3 praktisch vollständig auf Seiten des einfach geladenen Oxalats. Des Weiteren liegt das Gleichgewicht zwischen freien und komplexierten **Fe(II)**-Ionen bei ebendiesem pH-Wert annähernd vollständig auf Seiten des Oxalatoferrats (Paniás *et al.*, 1996). Dies bedeutet, dass **Fe** bei pH 3 optimal von **Oxal** komplexiert wird und die trübungsaktiven Eigenschaften demnach bei diesem pH-Wert am stärksten unterdrückt werden sollten. Daraus ließ sich ableiten, dass Bier theoretisch bei einem pH-Wert von pH 3 am stabilsten sein sollte, insofern es sich bei der **Fe**-Komplexierung tatsächlich um einen der maßgeblichen Faktoren für die Trübungsbildung handelt. Dies konnte durch ein Forcierungsexperiment untermauert werden, bei dem Bier **B:B** vor der forcierten Alterung auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt wurde (Abbildung 54).

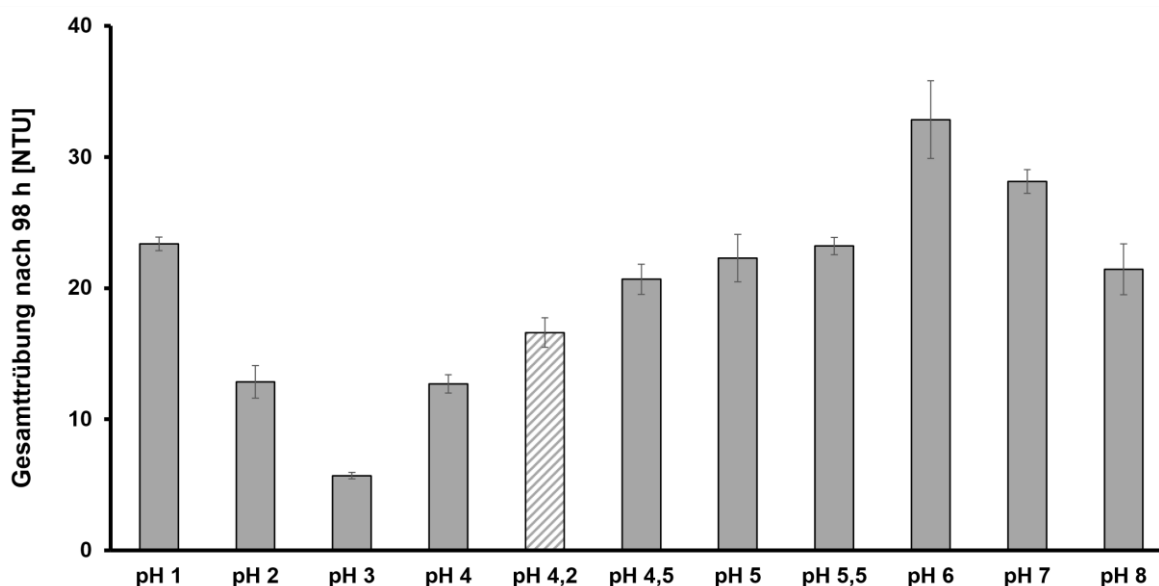


Abbildung 54: Trübungsintensität der Gesamttrübung von Bier B.B (Trübungsmessung bei 0 °C) bei unterschiedlichen pH-Werten nach 98 h Forcierungszeit (natives Bier B.B hervorgehoben). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n = 3).

Während insbesondere basische pH-Werte zu einer raschen Destabilisierung des Bieres führten, was unter anderem durch die begünstigte Bildung von Eisenhydroxid bedingt sein könnte, erhöhte sich die kolloidale Stabilität des Bieres mit abnehmendem pH-Wert. Bei pH 3 wurde ein Optimum der Trübungsstabilität erreicht, was im Einklang mit der erläuterten Hypothese zur Komplexierung von **Fe**-Ionen durch **Oxal** stand. Damit konnte die Theorie gestützt werden, dass die Stabilisierung von **Fe** in Bier ein entscheidendes Kriterium für die kolloidale Bierstabilität darstellt.

Rollen von Oxalatoxidase, H₂O₂ und Pflanzenstress

Wurde die Oxalatoxidase-Aktivität (**OxOx**) von Bier durch Dotierung des Enzyms, oder durch Dotierung eines Enzym-Aktivators, erhöht, verschlechterte sich die kolloidale Stabilität des Bieres. Bei der Dotierung eines Enzym-Inhibitors hingegen war eine verbesserte Trübungsstabilität zu beobachten (siehe 3.3.5.). Da **OxOx** hier erstmalig in Zusammenhang mit bierqualitätsverändernden Eigenschaften gebracht wurde, liegen bislang keine Erkenntnisse über die **OxOx**-Aktivität in Bier oder zum Verhalten des Enzyms über den Herstellungsprozess vor. Jedoch handelt es sich bei **OxOx** um ein in der Pflanzenwelt weit verbreitetes und daher umfassend charakterisiertes Enzym. Dies ist zum einen darin begründet, dass bei der katalysierten Umsetzung von **Oxal** Wasserstoffperoxid (H₂O₂) entsteht und zum anderen darin, dass es sich bei **OxOx** um ein stressreguliertes Enzym handelt (Berna & Bernier, 1999; Çalışkan & Cuming, 2000; Livingstone *et al.*, 2005; Nowakowska, 1998; Singh *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 1995).

Dass das im Zuge der **OxOx**-katalysierten enzymatischen Umsetzung von **Oxal** gebildete H₂O₂ einen Einfluss auf die Trübungsbildung nehmen kann, konnte durch den Einsatz von Katalase gezeigt werden. Wurde das antioxidative Enzym dem Bier vor der forcierten Alterung zugesetzt, konnte die Trübungsintensität im beobachteten Zeitraum im Vergleich zum nativen Bier verringert werden. Eine weitere Zugabe von H₂O₂ führte indes nicht zu einer ausgeprägteren Trübungsneigung (siehe 3.3.6.). Diese Beobachtungen könnten dadurch erklärt werden, dass für die Auslösung der Trübungsbildung **Fe** den limitierenden Faktor darstellt und eine Erhöhung der H₂O₂-Konzentration ohne eine gleichzeitige Erhöhung der **Fe**-Konzentration daher keinen verstärkenden Einfluss auf die Trübungsneigung hat. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Zusatz des Radikalfängers α -Phenyl-N-*tert*-butyl-Nitron (PBN) zu einer Abnahme der Trübungsintensität führt (Kaneda *et al.*, 1990). Dies deckt sich im Hinblick auf die zwischen H₂O₂ und **Fe** ablaufende *Fenton/Haber-Weiss*-Reaktion mit den Erkenntnissen der durchgeführten Experimente und der Hypothese dieser Arbeit.

Wie erwähnt, handelt es sich bei der aus Gerste stammenden **OxOx** um ein Stress-reguliertes Enzym, wobei die codierenden Gene im Falle von biotischem Stress, wie beispielsweise Pilzbefall, hochreguliert werden (Dumas *et al.*, 1995; Nowakowska, 1998; Zhang *et al.*, 1995). Pilze können beim Pflanzenbefall Oxalsäure ausschütten, infolgedessen es zur Abwehrreaktion der Pflanze in Form einer Hochregulierung der OxOx-Expriemierung kommt (Kim *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 1998). Neben diesem Aspekt gelten auch andere, in der Trübung stark vertretene Proteine als Stress-reguliert. Gestresste Gerste weist unter anderem vermehrt die in Biertrübung dominierenden Proteine Serpin Z4 und Z7, LTP1 sowie BDAI-1 auf. Ebenso

wurden in Pflanzen unter Stressbedingungen Peroxidasen verstärkt nachgewiesen, beziehungsweise die jeweils codierenden Gene als hochreguliert identifiziert (Marion *et al.*, 2007; Perrocheau *et al.*, 2006; Schulte *et al.*, 2016; Stanislava, 2010). Schulz *et al.* fanden außerdem in Bieren aus niedriggelöstem (KI 34) und hochgelöstem Malz (KI 45) deutliche Unterschiede in den Gehalten an Superoxid-Dismutase (uniprot Q96123), was den Einfluss der Rohstoffverarbeitung auf die spätere Enzymaktivität und in diesem Fall die antioxidative Kapazität eines Bieres unterstreicht (Schulz *et al.*, 2018). Allerdings sind die meisten antioxidativ wirksamen Enzyme temperaturempfindlich und werden bereits beim Darren oder spätestens bei der Würzekochung größtenteils denaturiert, wodurch sie ihre Aktivität verlieren (Bamforth, 1983; Bamforth *et al.*, 1993; Matsuyama, 1933). Es schiene demnach wenig aussichtsreich, diese Enzyme quasi als Gegenspieler der trübungsaktiven Proteine aus der Gerste über den Brauprozess hinweg bis in das fertige Bier zu überführen. Allerdings werden die antioxidativ und damit mutmaßlich trübungsstabilisierend wirkenden Enzyme auch von *Saccharomyces cerevisiae* gebildet, was einen Anhaltspunkt für weitere Studien, betreffend die Verbesserung der kolloidalen Stabilität eines Bieres, darstellt (Izawa *et al.*, 1996; Maté *et al.*, 1999; Matsuyama, 1933).

Die als trübungsbeeinflussend charakterisierten Proteine LTP1, Z4, Z7 und BDAI-1 sowie **OxOx** gelten hingegen als thermisch, oxidations- und gegenüber Proteasen sehr stabil, weswegen sie den Brauprozess überdauern und vom Rohstoff bis ins fertige Produkt gelangen können (Dumas *et al.*, 1993; Lindorff-Larsen & Winther, 2001; Perrocheau *et al.*, 2005; Perrocheau *et al.*, 2006; Sorensen *et al.*, 1993). In Kombination mit erhöhten Oxalsäuregehalten in den Rohstoffen, z.B. infolge eines Pilzbefalls, könnte Pflanzenstress demnach insgesamt eine wichtige Rolle für die kolloidale Stabilität des daraus hergestellten Bieres einnehmen, da zahlreiche trübungsrelevante Faktoren beeinflusst werden können.

Reaktionskaskade trübungsbeeinflussender Parameter

Basierend auf den erhobenen Daten konnte die nachfolgend abgebildete Reaktionskaskade zu trübungsbeeinflussenden Vorgängen in Bier und den eingesetzten Rohstoffen aufgestellt werden, welche die Interaktionen unterschiedlicher Faktoren, wie Pflanzenstress, Komplexbildungsreaktionen, Enzymaktivität und Redoxreaktionen umfasst (Abbildung 55).

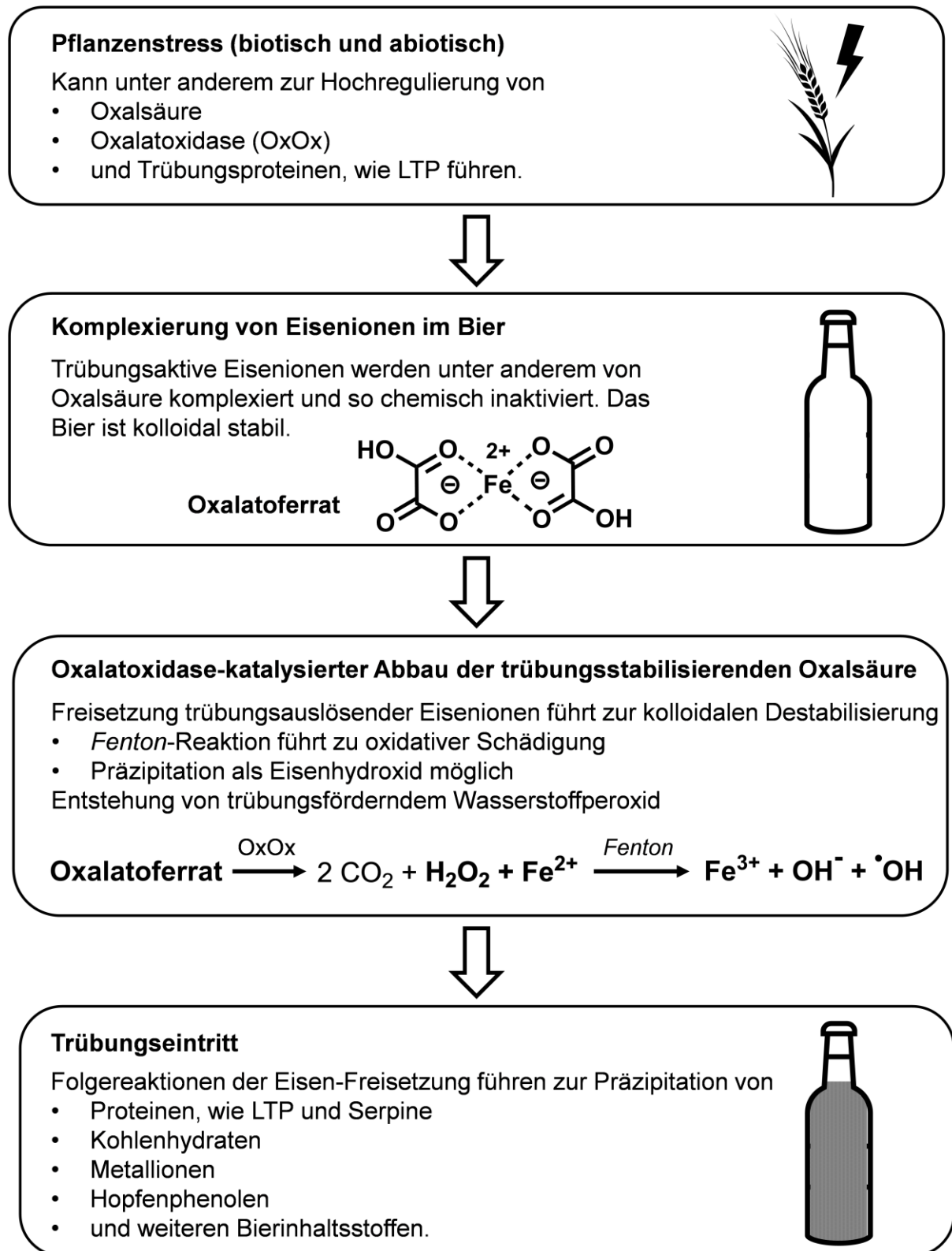


Abbildung 55: Hypothetische Kaskade Stress-induzierter Faktoren für die Biertrübungsbildung. (Quelle Bild Gerste: [www. http://www.ultracoloringpages.com/](http://www.ultracoloringpages.com/))

Wird Gerste biotischem oder abiotischem Stress ausgesetzt, werden Stoffwechselwege reguliert, deren Folgen unter anderem die erhöhte Ausschüttung von Oxalsäure (**Oxal**) und trübungsrelevanten Proteinen wie Serpin Z4, Z7 und LTP1 sowie die Hochregulierung der Oxalatoxidase (**OxOx**) sein können (Berna & Bernier, 1999; García-Olmedo *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2004). Dies könnte bedeuten, dass über den Brauvorgang hinweg, bedingt durch höhere **Oxal**-Konzentrationen, auch größere Mengen an Eisen (**Fe**) als Oxalatoferrat solubilisiert und so ins Bier transportiert werden könnten. Eine höhere **OxOx**-Aktivität im fertigen Produkt könnte demnach zur Freisetzung größerer Mengen an **Fe** führen, wodurch wiederum vermehrt H_2O_2 aus der enzymatischen Umsetzung der **Oxal** entsteht. Unter diesen Umständen würde letztlich ein kolloidal weniger stabiles Produkt resultieren. Anhand dieser Kaskade könnte auch eine von Bamforth formulierte Frage beantwortet werden, weshalb es in fertigen Bieren auch unter vollständig anaeroben Bedingungen zu den von Asano als sauerstoffabhängig beschriebenen Polymerisierungsreaktionen von Polyphenol-Monomeren kommt (Asano *et al.*, 1984; Bamforth, 2000). Zum einen reichen bereits minimale und in der brautechnologischen Praxis unvermeidbare Mengen von $< 0,1$ ppb O_2 im Bier aus, um den Fortgang von Radikalkettenreaktionen aufrechtzuerhalten (Kuchel *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2004). Zum anderen könnten diese Kettenreaktionen durch die intrinsische Entstehung von H_2O_2 bei der enzymatischen Umsetzung von **Oxal** deutlich beschleunigt werden. In Kombination mit dem vorliegenden **Fe** wäre kein weiterer extrinsischer Sauerstoff notwendig, um radikalische Kettenreaktionen und damit oxidative Schädigungen im Bier hervorzurufen.

Die Hypothese, dass es im Bier zunächst zu sehr spezifischen Wechselwirkungen mehrerer Inhaltsstoffe kommt, welche zur initialen Bildung von Trübungspartikeln führt und diese als eine Art Impfkristall wirken, infolgedessen es zu unspezifischen Präzipitationen anderer Bierinhaltsstoffen kommt, deckt sich auch mit den Ergebnissen der durchgeführten Proteom-Studien. Die Proteomik-Daten wiesen auf unspezifische Präzipitationsvorgänge hin, da ein Großteil aller im nativen Bier vorliegenden Proteine über den Lagerungszeitraum hinweg abgereichert werden und sich diese als abgereichert klassifizierten Proteine in der Trübung in vergleichbaren Abundanzen wie im Bier wiederfanden (siehe 3.2.1.3.). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Trübungsbildung von der LMW-Fraktion des Bieres ausgeht und die HMW-Komponenten vermutlich nicht initial beteiligt sind, sondern einen Beitrag zur absoluten Trübungsintensität leisten (siehe 3.3.1.).

Korrelation der als trübungsrelevant identifizierten Parameter mit der Trübungsneigung von Handelsproben

Um die anhand von Quantifizierungsdaten, Dotierungs- und Forcierungsexperimenten erarbeitete Hypothese über die Interaktion mehrerer Komponenten bei der Trübungsbildung (Abbildung 42, S. 105) zu verifizieren und auf ihre Praxisrelevanz hin zu prüfen, mussten entsprechende Untersuchungen an Realproben durchgeführt werden. Nur so konnte sichergestellt werden, dass die teils unter artifiziellen Bedingungen erworbenen Erkenntnisse auch auf die Komplexität realer Bierproben übertragbar sind.

Zur Überprüfung der Hypothese wurden daher die diskutierten Parameter Eisengehalt (**Fe**), Oxalsäuregehalt (**Oxal**) und Oxalatoxidase-Aktivität (**OxOx**) mit der Trübungsstabilität der kommerziellen **Biere 1 - 24** korreliert (siehe 3.3.8.). Unter Einbeziehung dieser Parameter konnten rund 60 % der Varianz der Korrelationsanalyse erklärt werden. Dies zeigte, dass trotz der Komplexität der realen Biermatrix diejenigen Faktoren, welche die Trübungsbildung maßgeblich beeinflussen, identifiziert werden konnten. Die aufgestellte Hypothese spiegelt damit die Kernfaktoren wider, wobei darüber hinaus noch eine Reihe weiterer Parameter die Trübungsbildung direkt oder indirekt auf unterschiedlichen Ebenen beeinflussen könnten. Dies könnte vor allen Dingen das ebenfalls als trübungsaktiv identifizierte Kupfer (**Cu**), sowie weitere potentielle Komplexbildner, die neben **Oxal** noch in Bier vorhanden sind, wie z.B. Citronensäure und Äpfelsäure, betreffen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass redoxchemische Vorgänge eine zentrale Rolle bei der Trübungsbildung einnehmen, weshalb angenommen werden kann, dass die antioxidative Kapazität des Bieres im Gesamten über diverse Reaktionswege ebenfalls Einfluss auf die Trübungsneigung hat. Antioxidative Eigenschaften sind nicht nur abhängig von Metaboliten wie Polyphenole und Hordatine, sondern auch von der Aktivität antioxidativer Enzyme, wie Superoxid-Dismutasen und Katalasen (Izawa *et al.*, 1996; McClung, 1997; Morgulis, 1921; Spreng & Hofmann, 2018; Takemura *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde in die Auswertung auch nicht die quantitative Proteinzusammensetzung der untersuchten Handelsproben miteinbezogen, welche für das quantitative Ausmaß der Trübungsbildung ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen könnte.

4. Experimenteller Teil

4.1. Reagenzien, Materialien und Untersuchungsmaterial

4.1.1. Reagenzien

1,4-Dithiothreitol, proteomics grade, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2-Chloroacetamid, proteomics grade, Merck, Darmstadt, Deutschland

Acetonitril, MS grade, J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Aluminiumchlorid, 99,99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Ameisensäure >98 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Ammoniumacetat, 5 mol/l in Wasser, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Bovines Serumalbumin (BSA), 2 mg/ml in einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung mit NaN_3 , Thermo Scientific, Rockford, USA

Calciumchlorid, wasserfrei, $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

CombiMethanol für volumetrische Karl-Fischer-Titration, Merck, Darmstadt, Deutschland

Coomassie Blau G-250-Reagenz, Coomassie Protein Assay Reagent, Thermo Scientific, Rockford, USA

D-(+)-Glucose, Merck, Darmstadt, Deutschland

Eisen(II)-chlorid, wasserfrei, 99,9 %, zur Analyse, Merck, Darmstadt, Deutschland

Eisen(III)-chlorid, wasserfrei, 99,9 % zur Analyse, Merck, Darmstadt, Deutschland

Essigsäure, 100 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol, >99,95 %, VWR, Ismaning, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), ≥ 99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumiodid, $\geq 99,5$ %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumoxalat Monohydrat, 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Katalase, Catalase from bovine liver (EC 1.11.1.6), aqueous suspension, 10,000-40,000 units/mg protein, 24 mg protein/ml, 11895 units/mg protein, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat, zur Analyse, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Kupfer(I)-chlorid, wasserfrei, $\geq 99,99$ %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Magnesiumsulfat, wasserfrei, puriss. p.a., Fluka, Steinheim, Deutschland

Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Methanol, HPLC grade, J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Natronlauge, 1 mol/l, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

o-Phenylendiamin, 99,5 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Oxalatoxidase, Oxalate Oxidase from barley seedlings (EC 1.2.3.4), lyophilized powder, 0.5-1.5 units/mg solid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Precision Plus Protein Standard Unstained, 10 – 250 kDa, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen)

Roti Blue 5x Konzentrat, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Salzsäure, 1 mol/l, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Schwefelsäure 95,0 – 98,0 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

SDS-PAGE Laufpuffer, NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer 20x, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

SDS-PAGE Probenpuffer, NuPAGE™ LDS Sample Buffer 4x, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Triethylammoniumbicarbonat (TEAB), proteomics grade, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Trypsin, modifiziert, sequencing grade, Promega, Fitchburg, USA

Wasser, Reinstwasser aus Wasseraufbereitungssystem Elix 3 (UV), Milli-Q Advantage A10 Water Purification System, Millipore S.A.S., Molsheim, Frankreich

Wasserstandard 5 mg/ml für Karl-Fischer-Titration, Merck, Darmstadt, Deutschland

Wasserstoffperoxid, 30 % H₂O₂ (w/w), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Zinksulfat Heptahydrat, puriss. p.a., Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland

4.1.2. Materialien

Mikrotiterplatte, 96 well plate, BRANDplates, pure grade, Brand, Wertheim, Deutschland

SDS-PAGE-Gel, Novex NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Gel, 1.5 mm x 10 well, life technologies, Carlsbad, USA

SepPAK tC18 1cc Vac 50 mg, Partikelgröße 37-55 µm, Waters, Milford, USA

Spritzenvorsatzfilter, Minisart RC 15, 0,45 µm, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Ultrafiltrationsfilter, PLAC, Ultracel regenerated cellulose, 1 kDa NMWL, 76 mm Durchmesser, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

4.1.3. Untersuchungsmaterial

4.1.3.1. Handelsproben und Versuchsbiere

Alle Biere werden bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Bei den Bieren A und B handelt es sich um kommerziell erhältliche Biere.

Tabelle 7: Probenbeschreibungen Handelsproben

Bezeichnung	Kürzel	Brauerei	Biename	Biertyp
Bier A	B.A	Bitburger	Bitburger Pilsener	Pils
Bier B	B.B	Augustiner	Augustiner Hell	Lagerbier

Das entsprechende gealterte und geklärte Bier (siehe 4.3. und 4.4.) wird mit dem Suffix „g“ gekennzeichnet (z.B. gealtertes Bitburger Pilsener = Bier Ag bzw. B.Ag).

Bei den Bieren C, D und E handelt es sich um zu Forschungszwecken gebraute Versuchsbiere, welche von M.Sc. Christina Cotterchio und Dipl. LM-Chem. Julia Wannemacher, beide Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, Technische Universität München (TUM), hergestellt wurden. Die Biere wurden im automatisierten Pilotsudwerk (bis 60 l Ausschlagwürze) des Lehrstuhls für Brau- und Getränketechnologie (TUM) gebraut und die Rohstoffe ebenfalls am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie (TUM) charakterisiert.

Tabelle 8: Probenbeschreibungen Versuchsbiere

Bezeichnung	Kürzel	Brauerei	Eigenschaften
Bier C	B.C	Forschungsbrauerei Weihenstephan (TUM)	Niedrig gelöstes Malz, Pellets Typ-90
Bier D	B.D		Hoch gelöstes Malz, CO ₂ -Extrakt und Pellets
Bier E	B.E		Hoch gelöstes Malz, Pellets Typ-90

Für die drei Biere C, D und E wurde Gerste der Sorte *Marthe* mit einem mittleren Proteingehalt von 10,2 % verwendet. Für das Forschungsvorhaben wurden unterschiedliche Weichgrade der Malzlösungen eingestellt, wobei die Weichzeit und -temperatur für alle drei Biere identisch war (15 °C, 6 Tage). Für Bier C wurde niedrig gelöstes Malz verwendet (Weichgrad der Malzlösung 40,5 %), für die Biere D und E hoch gelöstes Malz (Weichgrad der Malzlösung 45,0 %). Es wurde Hopfen der Sorte *Hallertauer Mittelfrüh* verwendet, wobei ein CO₂-Extrakt mit einem α -Säure-Gehalt von 42,3 % und Pellets Typ-90 mit einem α -Säure-Gehalt von

13,6 % Verwendung fanden. Erfolgte die Hopfengabe zu Kochbeginn, wurde die Menge auf 25 Bittereinheiten (BE) berechnet, für die Whirlpoolhopfung wurden 5 g/l eingesetzt. Bier C und E wurden mit Pellets zu Kochbeginn versetzt, Bier D mit CO₂-Extrakt zu Kochbeginn und 5 g/l Pellets Typ-90 zur Whirlpoolhopfung. Für die Vergärung wurde Trockenhefe eingesetzt (Typ Saflager W-34/70, Fermentis/Lesaffre, Marcq-en-Barœul, Frankreich). Das Bier wurde durch Rahmenfilter filtriert aber ansonsten keinerlei chemisch-physikalischen Stabilisierungen unterzogen.

Neben den Versuchsbieren wird eine Auswahl kommerzieller Bierproben analysiert, welche 12 Pilsener Biere (Biere 1-12) und 12 Lagerbiere (Biere 13-24) aus kleinen mittelständischen sowie Großbrauereien umfasst.

Tabelle 9: Beschreibungen der untersuchten kommerziellen Bierproben

Bezeichnung	Kürzel	Brauerei	Biename	Biertyp
Bier 1	B.1	Schlossbrauerei Au/Hallertau	Ecco	Pils
Bier 2	B.2	Schlossbrauerei Au/Hallertau	Auer Pilsner	Pils
Bier 3	B.3	Krombacher	Krombacher Pils	Pils
Bier 4	B.4	Plzeňský Prazdroj a. s.	Pilsner Urquell	Pils
Bier 5	B.5	Bayerische Staatsbrauerei Weihenstephan	Weihenstephaner Pils	Pils
Bier 6*	B.6	Bitburger	Bitburger Premium Pils	Pils
Bier 7	B.7	Herzoglich Bayerisches Brauhaus Tegernsee	Tegernsee Pils	Pils
Bier 8	B.8	Private Landbrauerei Schönram	Schönramer Pils	Pils
Bier 9	B.9	Warsteiner	Warsteiner Pilsener	Pils
Bier 10	B.10	Riedenburger Brauhaus	Riedenburger Pilsner	Pils
Bier 11	B.11	Badische Staatsbrauerei Rothaus	Tannenzäpfle	Pils
Bier 12	B.12	Gräfliches Hofbrauhaus Freising	Graf Ignaz Pilsner	Pils
Bier 13	B.13	Bayerische Staatsbrauerei Weihenstephan	Weihenstephaner Original Helles	Lagerbier
Bier 14	B.14	Gräfliches Hofbrauhaus Freising	Urhell	Lagerbier
Bier 15**	B.15	Augustiner-Bräu München	Lagerbier Hell	Lagerbier
Bier 16	B.16	Urban Chestnut Brewing Company	Hallertauer Zwickel	Lagerbier
Bier 17	B.17	Hacker-Pschorr Bräu	Münchner Hell	Lagerbier
Bier 18	B.18	Herzoglich Bayerisches Brauhaus Tegernsee	Tegernseer Spezial	Lagerbier
Bier 19	B.19	Bayreuther Brauhaus	Bayreuther Hell	Lagerbier

Experimenteller Teil

Bier 20	B.20	Herzoglich Bayerisches Brauhaus Tegernsee	Tegernseer Hell	Lagerbier
Bier 21	B.21	Spaten-Bräu	Münchner Hell	Lagerbier
Bier 22	B.22	Klosterbrauerei Weltenburg	Urtyp Hell	Lagerbier
Bier 23	B.23	Brauerei Hacklberg	Urhell	Lagerbier
Bier 24	B.24	Private Landbrauerei Schönram	Schönramer Hell	Lagerbier

*entspricht Bier A; **entspricht Bier B

4.1.3.2. Biertrübungen

Biertrübungen werden wie unter 4.4. beschrieben aus gealterten Bieren isoliert und nach Lyophilisation bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Sie werden wie in Tabelle 10 angegeben mit dem Kürzel „T“ bezeichnet.

Tabelle 10: Probenbezeichnungen der untersuchten Biertrübungen

Beschreibung	Bezeichnung	Kürzel
Biertrübung aus Bier A	Trübung A	T.A
Biertrübung aus Bier B	Trübung B	T.B
Biertrübung aus Bier C	Trübung C	T.C
Biertrübung aus Bier D	Trübung D	T.D
Biertrübung aus Bier E	Trübung E	T.E

4.2. Trübungsaktivitätsorientierte Fraktionierung (Ultrafiltration)

Um die Einflüsse der hoch- und niedermolekularen Bierinhaltsstoffe auf die Trübungsbildung isoliert bzw. rekonstituiert untersuchen zu können, wird ein kommerzielles Lagerbier (**Bier B**) mittels Ultrafiltration in seine hochmolekulare (**B.HMW**) und niedermolekulare (**B.LMW**) Fraktion separiert. Hierfür werden 500 ml Bier für 10 min im Ultraschallbad entgast und mittels einer Ultrafiltrationsüberdruckrührzelle (Amicon® stirred cell, Modell 8400, 400 ml, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur und 4 bar unter Verwendung eines Filters mit 1 kDa Trenngröße (Ultrafiltration Discs, PLAC, Ultracel regenerated cellulose, 1 kDa NMWL, 76 mm, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bis zu einem verbleibenden Volumen von ca. 50 ml filtriert. Das Filtrat wird in einer eisgekühlten Vorlage aufgefangen. Das Retentat wird mit ca. 100 ml Reinstwasser gewaschen und wiederum auf 50 mL eingeengt. Der Waschvorgang wird insgesamt fünfmal durchgeführt. Das Retentat wird abschließend ad 100 ml mit Reinstwasser aufgefüllt, woraus eine im Vergleich zum nativen Bier **B.B** fünfmal konzentrierte hochmolekulare Bierfraktion (**B.HMW5x**) resultiert. Das Filtrat wird zunächst am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 5 mbar auf ca. 100 mL eingeengt und anschließend lyophilisiert. Der trockene Rückstand wird in 100 ml Reinstwasser mit 5 Vol.-% Ethanol gelöst, woraus eine im Vergleich zum nativen Bier **B.B** fünfmal konzentrierte niedermolekulare Bierfraktion (**B.LMW5x**) resultiert. Beide Fraktionen werden bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert.

4.3. Forcierte Bieralterung

Um die alterungsbedingte Trübungsbildung bei Bieren in einem praxis- und labortauglichen Zeitrahmen zu simulieren, werden Proben (Biere oder Fraktionen dieser) mittels HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt und anschließend einem iterativen Warm-Kalt-Zyklus unterworfen. Hierzu werden die Proben für 10 min im Ultraschallbad entgast, membranfiltriert, in Küvetten für die Turbidimetrie gefüllt (siehe 4.6.), luftdicht verschlossen und für insgesamt 506 h (3 Wochen) im Dunkeln einem sich regelmäßig wiederholenden Temperaturwechsel (16-18 h bei 40 °C; 6-8 h bei 0 °C) unterzogen, um deren Trübungsneigung zu ermitteln. Dabei werden in regelmäßigen Abständen von jeder Probe je zwei Messpunkte non-destruktiv mit dem Nephelometer wie unter 4.6. beschrieben aufgenommen. Nach der Warmphase und dem Abkühlen von 40 °C auf Raumtemperatur wird die irreversible Dauertrübung (*age-related haze*) bei 25 °C erfasst. Im Anschluss werden die Proben für mindestens 6 h eisgekühlt und danach die Gesamttrübung, welche sich aus der Dauertrübung und der Kältetrübung (*chill haze*) zusammensetzt, bei 0 °C bestimmt. Anschließend werden die Proben wieder bei 40 °C inkubiert. Anhand von

Lagerungsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Kinetiken der Trübungsbildung bei forcierten und nicht forcierten Bieralterungen vergleichbar sind (Titze *et al.*, 2010).

4.4. Isolierung der Biertrübung

Da die Fachliteratur insbesondere zwei unterschiedliche Trübungsarten beschreibt, muss bei der Trübungsabtrennung darauf geachtet werden, dass die bei Raumtemperatur lösliche Kältetrübung (*chill haze*) miterfasst wird. Daher erfolgt die Isolierung der kolloidalen Trübungspartikel unter permanenter Eiskühlung, was zur Abtrennung der **Gesamtrübung** (= Dauertrübung + Kältetrübung) und einem **geklärten Bier** führt. Hierfür werden die bis zur Aufarbeitung bei 4 °C gelagerten, trüben Bierproben im eisgekühlten Ultraschallbad für 10 min entgast und anschließend ultrazentrifugiert (12 000 rpm, 15 min, 0 °C). Der klare Überstand wird dekantiert (= geklärtes Bier) und der Rückstand dreimal mit eisgekühltem 5 Vol.-% Ethanol gewaschen, wobei ebenfalls weiterhin unter Eiskühlung gearbeitet wird und die Waschlösungen verworfen werden. Der verbleibende Rückstand, die isolierte Biertrübung, wird lyophilisiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

4.5. Extraktion der Biertrübung

Um die isolierte Biertrübung auf molekularer Ebene untersuchen zu können, wird diese mit einem Methanol/Wasser 70/30-Gemisch erschöpfend extrahiert und so niedermolekulare Bestandteile abgetrennt. Hierzu werden 20 mg Biertrübung exakt in Homogenisator-Gefäße (Precellys® CK28 Hard Tissue Homogenizing Kit, 2 ml, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) eingewogen und mit 2 ml Extraktionsmittel versetzt. Die Suspension wird für 1 min mit dem Vortex-Mixer homogenisiert, anschließend für 5 min im Ultraschallbad behandelt und nach weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur mit einem Homogenisator (Precellys® Evolution Homogenizer, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) bearbeitet.

Tabelle 11: Homogenisations-Parameter zur Extraktion der Trübungspartikel

Tube	Precellys® CK28, 2 ml
Speed	6200 rpm
Cycle	3 x 60 s
Pause	60 s

Nach Zentrifugation (13 000 rpm, 5 min) wird der klare Überstand abgenommen. Das beschriebene Vorgehen wird mit dem im Gefäß verbleibenden Rückstand noch viermal wiederholt, um eine erschöpfende Extraktion zu gewährleisten. Die Überstände werden vereinigt und im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Die so gewonnenen Extrakt-Rückstände werden in einer definierten Menge Methanol/Acetonitril/Wasser 40/30/30 (v/v/v) aufgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

4.6. Nephelometrische Trübungsmessung

Die Trübung wird mit Hilfe eines Nephelometers (TL2360 Labortrübungsmessgerät, Hach Lange, Berlin, Deutschland) in der Einheit NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*) erfasst. Es werden Küvetten mit einem Volumen von 5 ml verwendet (Rundküvetten für die Turbidimetrie LCW906 mit EYG044A Lyostopfen Chlorbutyl, Hach Lange, Berlin, Deutschland).

Das Nephelometer wird in regelmäßigen Abständen mit einer wässrigen Formazinlösung kalibriert (Kalibrierungs-Kit, StablCal®, verschlossene Probenküvetten; <0,1, 20, 200, 1000, 4000 und 7500 NTU, Hach Lange, Berlin, Deutschland) und zu Beginn jeder Messreihe eine Ein-Punkt-Kontroll-Kalibration mit der 20 NTU-Formazin-Standardlösung durchgeführt. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Trübungsmenge und der Trübungsintensität von Bier konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Benítez *et al.*, 2013; Carrasco & Siebert, 1999; Delvaux *et al.*, 2000; Siebert *et al.*, 1981;).

Die Messungen werden unter Belüftung mit Labordruckluft im Ratio-Modus durchgeführt, um den Einfluss lichtabsorbierender Partikel, Färbungen der Proben und Extinktionen bzw. Interferenzen durch hohe Trübungen zu verringern.

Alle nephelometrischen Bestimmungen werden, sofern im Einzelnen nicht anders angegeben, mindestens in Triplikaten durchgeführt. Die Messparameter des Nephelometers sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Messparameter des zur Trübungsmessung verwendeten Nephelometers

Reading	Single ($\bar{x} = 5$)
Bubble reject	On
Unit	NTU
Ratio	On
Air purge	On (Instrument grade air)

Zur graphischen Darstellung der Daten aus den Trübungsmessungen als **Trübungsverlaufskurven** wird die Software OriginPro® 2018b Version b9.5.5.409 bzw. OriginPro® 2020b Version 9.7.5.184 (beide OriginLab Corporation, Northampton, USA) verwendet. Der Prozess der Trübungsbildung kann kinetisch betrachtet als Wachstumsprozess verstanden werden (Titze *et al.*, 2010). An die Anlaufphase (*lag*-Phase) schließt sich eine Wachstumsphase an, die letztlich eine Sättigung erfährt, bei unendlicher Reaktionsdauer also ein Plateau erreicht. Dieses biologische Phänomen wird am besten durch logistische sigmoidale Kurven beschrieben, welche sich einer unteren und oberen Asymptote annähern. Die Graphen werden daher mithilfe der in OriginPro® implementierten App *simple fit* als sigmoidale, logistische Kurvenanpassung mit 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Hierbei wird die Forcierungszeit in Stunden [h] auf der Abszisse gegen die Wurzel der Trübungsintensität [$\sqrt{\text{NTU}}$] auf der Ordinate aufgetragen. Da die Trübungsmessung physikalisch abhängig von der Fläche ist, die der Lichtstrahl durch die Probe in der Küvette durchläuft, fließt der Faktor $\{r^2\pi\}$ in die Berechnung der Trübungsintensität ein. Durch die Einführung der Quadratwurzel wird im Vergleich zur Berechnung der Trübungsintensität ohne Wurzeltransformation die Genauigkeit der logistischen Kurvenanpassung insbesondere für spätere Zeitpunkte bzw. höhere Trübungsintensitäten verbessert, was sich auch in deutlich niedrigeren *p*-Werten äußert. Dies führt letztlich dazu, dass Unterschiede zwischen zwei Proben besser identifiziert werden können.

4.7. Quantifizierung niedermolekularer Bierinhaltsstoffe

4.7.1. Hopfenbitterstoffe und Polyphenole mittels ECHO-LC-MS/MS

Biere werden für 10 min im Ultraschallbad entgast und nach Membranfiltration direkt zur Analyse eingesetzt. LMW und HMW werden wie unter 4.2. beschrieben vorbereitet und nach Membranfiltration in fünffacher bzw. originärer Bierkonzentration nach Verdünnung mit 5 Vol.-% EtOH zur Analyse eingesetzt. Trübungen werden wie unter 4.5. beschrieben extrahiert und die Extrakte nach Membranfiltration zur Analyse eingesetzt. Die Hopfenbittersäuren und Hopfenphenole werden mittels ECHO-UHPLC-ESI-MS/MS_{MRM} quantifiziert, die Methodenparameter sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Die Quantifizierung der Analyten erfolgt in Doppelbestimmung anhand von ECHO-Standards (Dietz, 2019; Dresel *et al.*, 2015; Haseleu *et al.*, 2009a; Haseleu *et al.*, 2010; Intelmann *et al.*, 2009; Spreng, 2018; Vogt, 2015). Hierzu werden nach der Probeninjektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten ECHO-Standard-Lösungen (je 1 µl) in den chromatographischen Lauf injiziert. Nach 3,2 min wird eine Lösung von *co*-Multifidolglucopyranosid (16,0 µmol/l) injiziert. Nach 8,5 min wird eine Mischung aus Isoxanthohumol (9,3 µmol/l) und Xanthohumol (1,9 µmol/l) injiziert. Nach 18,5 min wird eine Mischung aus *cis*-Isocohumulon (39,1 µmol/l), Humulon (3,3 µmol/l) und Colupulon (0,5 µmol/l) injiziert. Alle Standardsubstanzen wurden aus Hopfen bzw. Hopfenprodukten isoliert und die Reinheiten mittels qNMR bestimmt (Intelmann, 2011; Dresel, 2013; Frank *et al.*, 2014).

Tabelle 13: LC-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von Hopfenmetaboliten

System:	UHPLC-MS/MS-System (siehe 4.12.)
Injektionsvolumen:	1 µl
Temperatur des Autosamplers:	10 °C
Ofentemperatur:	40 °C
Stationäre Phase:	Kinetex® 1,7 µm Phenyl-Hexyl 100 Å, 150x2,1 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
Mobile Phase:	A: 1 % Ameisensäure in Wasser B: 1 % Ameisensäure in Acetonitril
Flussrate:	0,5 ml/min
Gradient:	Für 1 min auf 15% B halten, innerhalb von 2 min auf 25% B, innerhalb von 6 min auf 43% B und für 7 min halten, innerhalb von 4,5 min auf 90% B, innerhalb von 0,5 min auf 100% B und für 2 min halten. Innerhalb von 1 min umspülen auf 15% B und für 2 min halten. Laufzeit = 26 min.

Detektion:	MRM mode
Ionisierung:	ESI negativ
Quellentemperatur:	550 °C

Die zur Analyse herangezogenen MRM-Übergänge inklusive der optimierten MS-Parameter sind in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14: Ausgewählte MRM-Übergänge in [Dalton] zur Analyse von Hopfenmetaboliten und der zugehörigen optimierten Potentiale in [Volt], dwell time = 10 ms.

Q1	Q3	Analyt	DP	EP	CE	CXP
353,1	118,8	Xanthohumol und Isoxanthohumol* (1,2)	-110	-10	-34	-7
353,1	232,9	Xanthohumol und Isoxanthohumol	-110	-10	-26	-15
347,3	278,0	Cohumulon* (3)	-85	-10	-26	-17
347,3	235,0	Cohumulon	-85	-10	-40	-15
361,2	292,0	Adhumulon und Humulon* (4,5)	-100	-10	-26	-19
361,2	249,1	Adhumulon und Humulon	-100	-10	-40	-15
399,2	287,1	Colupulon* (6)	-65	-10	-38	-17
399,2	219,1	Colupulon	-65	-10	-42	-1
413,3	301,1	Adlupulon und Lupulon* (7,8)	-105	-10	-40	-19
413,3	232,8	Adlupulon und Lupulon	-105	-10	-44	-13
347,1	251,1	<i>trans/cis</i> -Isocohumulon* (t9,c10)	-65	-10	-22	-15
347,1	110,9	<i>trans/cis</i> -Isocohumulon	-65	-10	-64	-5
361,2	265,1	<i>trans/cis</i> -Isoadhumulon (t11,c12) und <i>trans/cis</i> -Isohumulon* (t13,c14)	-95	-10	-24	-7
361,2	195,8	<i>trans/cis</i> -Isohumulon und <i>trans/cis</i> -Isoadhumulon	-105	-10	-32	-13
357,1	194,8	<i>co</i> -Multifidolglucopyranosid* (15)	-100	-10	-24	-11
357,1	150,9	<i>co</i> -Multifidolglucopyranosid	-100	-10	-48	-9

*zur Quantifizierung herangezogener MRM-Übergang

4.7.2. Gesamtkohlenhydratgehalt mittels HPIC nach saurer Vollhydrolyse

Um ein Maß für den Kohlenhydratgehalt der untersuchten Biere und Biertrübungen zu ermitteln, werden die Oligo- und Polysaccharide durch Vollhydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure nach Schäfer *et al.* in die Monomere gespalten (Schäfer & Bunzel, 2018). Der maßgebliche Anteil an Kohlenhydrat nach Hydrolyse entfällt auf Glucose, weswegen diese im Anschluss mittels Ionenchromatographie quantifiziert wird. Alle Proben werden in Doppelbestimmungen aufgearbeitet. Trübungspartikel werden wie unter 4.4. beschrieben isoliert und lyophilisiert. Biere werden nach Entgasung im Ultraschallbad für 10 min direkt zur Hydrolyse eingesetzt.

2 mg der homogenisierten Biertrübung bzw. 20 µl Bier werden exakt eingewogen, ad 100 µl mit Reinstwasser versetzt und 2 min im Ultraschallbad homogenisiert. Unter Eiskühlung erfolgt die Zugabe von 200 µl H₂SO₄ konz. und es wird weiter verfahren wie von Schäfer beschrieben (Schäfer & Bunzel, 2018). Die erhaltenen, klaren Hydrolysate werden vor der Messung um den Faktor 10 mit Wasser verdünnt und der Kohlenhydratgehalt mittels Ionenchromatographie (HPIC; *high performance ion chromatography*) bestimmt.

Tabelle 15: HPIC-Parameter zur Quantifizierung von Kohlenhydraten

System:	HPIC-System (siehe 4.10.)
Injektionsvolumen:	10 µl
Autosampler-Temperatur:	4 °C
Ofentemperatur:	30 °C
Stationäre Phase:	CarboPac® MA1, 7.5 µm, 4x150mm with guard 4x50 mm (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
Mobile Phase:	A: Wasser B: 1 mol/l Natronlauge
Flussrate:	0,38 ml/min
Gradient:	Isokratisch 40% B. Laufzeit = 70 min.
Detektion:	Amperometrisch; Arbeitselektrode Au, Referenzelektrode Ag/AgCl

Die Quantifizierung des Glucosegehalts erfolgt mittels externer Kalibration. Hierzu wird eine Stammlösung von 1,226 mg/ml Glucose in Wasser sukzessive verdünnt und zur Analyse eingesetzt. Die Kalibration erfolgt durch Auftragen der Konzentration gegen die Signalfäche.

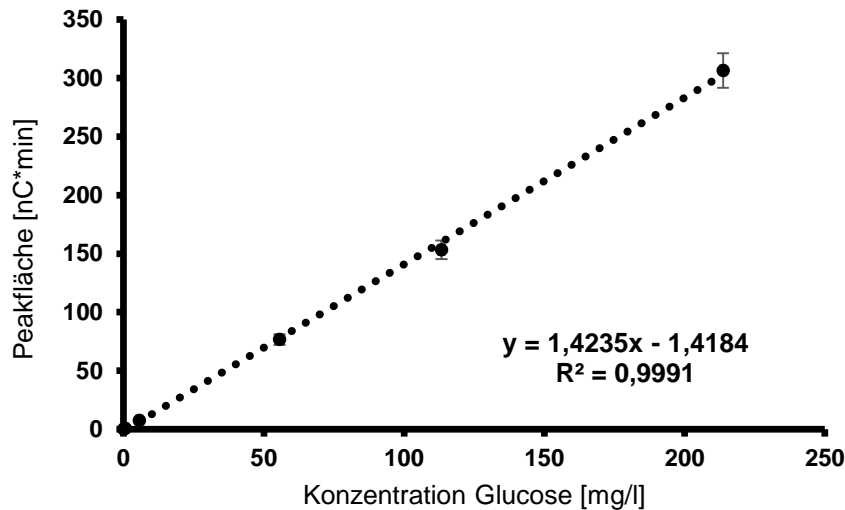


Abbildung 56: Externe Kalibrationsgerade zur Quantifizierung des Glucosegehalts mittels HPIC in Bier und Biertrübung nach Vollhydrolyse. Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Dreifachbestimmungen dar.

4.7.3. Wassergehaltsbestimmung mittels Karl-Fischer-Titration

Für die Bestimmung des Wassergehalts der isolierten Biertrübungspartikel wird eine Karl-Fischer-Titration durchgeführt (Schott Instruments/SI Analytics, Titrator TitroLine KF, Weilheim, Deutschland). Es wird zunächst eine Titerbestimmung der Titrierlösung durch Titration einer genau eingewogenen Menge des Wasserstandards durchgeführt (siehe 4.1.1.). Anschließend werden die Trübungsproben in unabhängigen Triplikaten exakt eingewogen und die automatische Titration zur Bestimmung des Wassergehalts den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

4.7.4. Ionenbestimmung mittels ICP-MS nach oxidativem Aufschluss

Die Bestimmung der Ionengehalte der Biere A und B sowie der Biertrübungen mittels ICP-MS (Induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometrie) wurde durchgeführt von:

Helmholtz Zentrum München

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)

Prof. Dr. Bernhard Michalke, Research Unit Analytical BioGeoChemistry

Ingolstädter Landstraße 1

D-85764 Neuherberg

Die Bestimmung der Eisengehalte der kommerziellen Biere 1 – 24 mittels ICP-MS (Induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometrie) wurde durchgeführt von:

Kalb Analytik AG

Wässerfeld 5

A-6800 Feldkirch

Die entgasten Biere wurden im Verhältnis 1:10 mit Königswasser versetzt und der Eisengehalt mittels externer Kalibration bestimmt.

4.7.5. Enzymatische Bestimmung des Oxalsäuregehaltes

Für die enzymatische Bestimmung des Oxalsäuregehaltes in 24 kommerziellen Bierproben (**Biere 1-24**, siehe 4.1.3.1.) wird das *Oxalic Acid Colorimetric Assay Kit* der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet und die Analyse nach Vorschrift des Herstellers in 96-Well-Platten durchgeführt. Die Standards zur Kalibration werden in Duplikaten, die Proben in biologischen Triplikaten aufbereitet und nach Entgasung im Ultraschallbad für 10 min direkt zur Analyse eingesetzt. Nach Zugabe aller Reagenzien und Inkubation bei 37 °C im Dunkeln über insgesamt 120 min erfolgt die photometrische Messung des entstandenen Farbstoffes bei 450 nm (Endpunktbestimmung). Verwendet wird hierfür ein Plate reader des Typs Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Schweiz). Pro Well und Messung werden vier Messpunkte aufgezeichnet (Kreuzsystem). Zur Auswertung wird die blindwertkorrigierte Absorption bei 450 nm herangezogen. Der Blindwert entspricht der Absorption einer Mischung aller verwendeten Puffer und Reagenzien des Kits, ohne Zugabe der Oxalsäure-Maßlösung. Abbildung 57 zeigt die Kalibriergerade nach Umsetzung unterschiedlich konzentrierter Oxalsäure-Standardlösungen mit dem im Kit enthaltenen Oxalatoxidase-Reagenz.

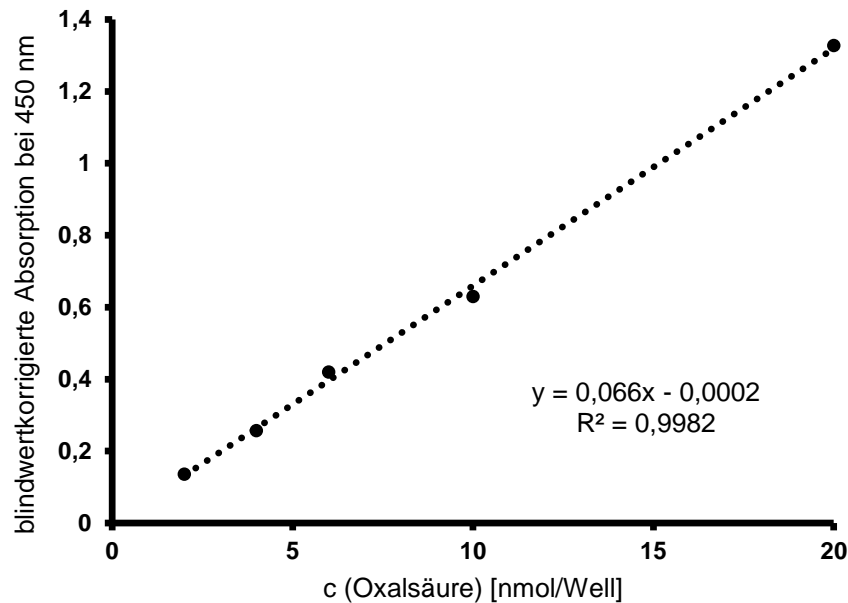


Abbildung 57: Anhand der Absorption bei 450 nm nach enzymatischer Umsetzung und Farbreaktion verschiedener Oxalsäure-Standardlösungen (2, 4, 6, 8, 10 und 20 nmol/Well) in Doppelbestimmung aufgenommene Kalibriergerade zur Quantifizierung des Oxalsäuregehalts.

4.8. Proteomanalysen

Zur Aufklärung des Proteoms werden zunächst die Gesamtproteingehalte von frischen und gealterten Bieren sowie der Biertrübungen ermittelt und im Anschluss die Proteome der Proben in einem holistischen Ansatz nach tryptischem in-Gel-Verdau mittels nano-LC-ESI-Orbitrap-MS analysiert.

4.8.1. Bestimmung der Gesamtproteingehalte von Bier und Biertrübung

Während der Proteingehalt von Bieren nach Entgasung ohne weitere Probenvorbereitung direkt mittels Bradfordassay bestimmt werden kann, wird für die Proteingehaltsbestimmung der Trübungsproben aufgrund von Löslichkeitsproblemen eine Verbrennungsanalyse durchgeführt, um den Gesamtstickstoffgehalt zu ermitteln und daraus die Proteingehalte der Proben zu berechnen.

4.8.1.1. Bradford-Assay (Biere)

Um die Proteingehalte eines frischen Pilsener Bieres (Bier **B.A**) mit dem Proteingehalt des korrespondierenden gealterten und geklärten Bieres (Bier **B.Ag**) zu vergleichen, wird der

Bradford-Assay angewandt (Bradford, 1976). Hierbei wird mittels photometrischer Detektion die Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brillant Blau G250 an Proteine erfasst. Die Kalibration erfolgt extern über unterschiedlich konzentrierte Standard-Lösungen von bovinem Serumalbumin (BSA).

5 μl von jeder Proben- oder Kalibrier-Lösung werden in technischen Vierfachbestimmungen auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen, mit 250 μl der Lösung von Coomassie Blau versetzt und für 30 s im Dunkeln geschüttelt. Anschließend werden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und danach die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt (FLUOstar OPTIMA, MG Labtech, Offenburg, Deutschland). Die in Abbildung 58 dargestellte Kalibriergerade ergibt sich aus den blindwertkorrigierten arithmetischen Mitteln der Absorptionswerte der BSA-Lösungen, welche gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen werden.

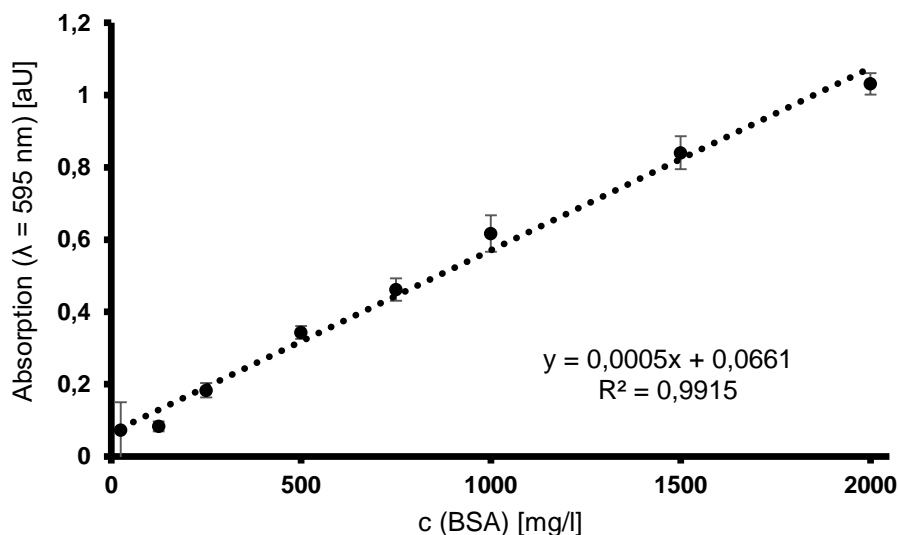


Abbildung 58: Anhand der Absorption bei 595 nm nach Farbreaktion unterschiedlich konzentrierter BSA-Standardlösungen (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 mg/l) mit Coomassie Blau ermittelte Kalibriergerade zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts nach Bradford (Bradford, 1976). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Vierfachbestimmungen.

4.8.1.2. Elementaranalyse (Biertrübungen)

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts der Biertrübungsproben mittels Elementaranalyse (Verbrennungsanalyse) wurde durchgeführt von:

Technische Universität München (TUM)

Fakultät für Chemie, Zentralanalytik

Lichtenbergstraße 4

D-85748 Garching

Die Analyse erfolgt mittels CHNS-Analysator (Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Stickstoff (N) und Schwefel (S)). Hierbei findet ein vollständiger Substanzauflschluss durch oxidative Verbrennung bei hohen Temperaturen (ca. 1000 °C) statt. Die entstehende Gasmischung aus CO₂, H₂O, N₂ und SO₂ wird mittels Helium nach gaschromatographischen Prinzipien aufgetrennt und mittels Wärmeleitfähigkeitsmesszelle (GC-WLD) detektiert. Unter Anwendung des Kjeldahl-Faktors von 6,25 auf den Gesamtstickstoffgehalt wird der Proteingehalt der Probe berechnet (Kjeldahl, 1883).

4.8.2. Holistische Proteomik

4.8.2.1. Probenvorbereitung mittels SDS-PAGE und In-Gel-Verdau

Für die holistische Proteomanalyse werden die Biere **B.A** und **B.B** in biologischen Duplikaten vorbereitet (je 2 Flaschen einer unterschiedlichen Charge pro Bier) und für den in-Gel-Verdau jeweils ein technisches Duplikat eingesetzt (zwei Einwaagen pro Flasche). Für die Biertrübungen **T.A** und **T.B** werden je zweimal 10 l alterungsgetrübtes Bier einer unterschiedlichen Charge verwendet und die Gesamttrübung daraus separat isoliert (= biologisches Duplikat). Von den isolierten Trübungen werden je zwei Einwaagen für den In-Gel-Verdau verwendet (= technisches Duplikat). Die alterungsbedingten Biertrübungen **T.C**, **T.D** und **T.E** stammen aus Versuchsbieren der TUM-Forschungsbrauerei (siehe 4.1.3.1.). Als technische Duplikate werden Trübungsisolierungen betrachtet, die an zwei unterschiedlichen Tagen aus je 10 l Bier durchgeführt wurden. Als technisches Duplikat werden wiederum zwei Einwaagen pro Aufarbeitung verwendet. Von den Bieren und Biertrübungen liegen für die Proteomanalyse demnach je 4 Bestimmungen pro Probe vor.

Zur Vorbereitung für die Proteomanalyse werden Bierproben für 10 min im Ultraschallbad entgast, das enthaltene Ethanol am Rotationsverdampfer unter milden Bedingungen entfernt

(30 °C, 10 mbar) und die Proben anschließend lyophilisiert. Biertrübungsproben werden wie unter 4.4. beschrieben isoliert und liegen ebenfalls lyophilisiert vor. Der Gesamtproteingehalt der Biere wird nach 4.8.1.1. mittels *Bradford*-Assay bestimmt und auf die Trockenmasse umgerechnet. Der Gesamtproteingehalt der Biertrübungen wird wie unter 4.8.1.2. beschrieben mittels Verbrennungsanalyse im CHNS-Analysator über den Gesamtstickstoffgehalt unter Anwendung des Kjeldahlfaktors berechnet. Die Einwaagen für die Proteomanalyse werden so gewählt, dass insgesamt 140 µg Protein eingewogen werden.

Die Proben werden in 70 µl 1 x LDS Puffer (NuPAGE™, Thermofisher Scientific) aufgenommen. Anschließend werden die Proben mit 10 mM DTT bei 70 °C für 10 min reduziert und mit 55 mM CAA bei Raumtemperatur (RT) für 30 min im Dunkeln alkyliert. Folgend werden die Taschen zweier NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gele (Thermofisher Scientific) mit je 35 µg Protein beladen. Die Laufzeit beträgt entweder 6 min (kurzes Gel, 200 V, 500 mA) oder 45 min (langes Gel, 200 V, 500 mA). Für das kurze Gel wird jede Probe doppelt in zwei unterschiedliche Geltaschen aufgegeben. Die Proben werden für 30 min fixiert (40 % Methanol, 2% Essigsäure), markiert (1x RotiBlue, Carl Roth) und anschließend entfärbt (25 % Ethanol, 1% Essigsäure). Die Gelbanden von Interesse werden ausgeschnitten, in eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt, mit einem Skalpel zerkleinert und mit 100 µl Entfärbelösung (50 % 5 mM Triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB), 50 % Ethanol) für 45 min bei 55 °C entfärbt. Der Überstand wird verworfen und der Entfärbeschritt wiederholt. Das trockene Gel wird für 10 min mit 100 % Ethanol dehydriert.

Der Überstand wird wiederum verworfen und der Proben werden mit 100 µl 5 mM TEAB für 20 min bei RT gewaschen. Die Schritte Dehydrierung und Waschen werden bei Bedarf so lange wiederholt, bis das Gel vollständig vom Coomassie Blau befreit ist. Anschließend wird das Gelfragment mit 20 µl Trypsin (10 ng/µl Trypsin, 5 mM TEAB) für 15 min bei 4 °C versetzt. Der Überstand wird verworfen und erneut 20 µl Trypsin zugegeben (10 ng/µl Trypsin, 5 mM TEAB) und die Probe für 16 h bei 37 °C verdaut. Der Überstand wird erneut verworfen und das Gel mit 5 µl 5 % Ameisensäure (FA) angesäuert. Die Peptide werden nun sukzessive aus dem Gel herausgelöst und hierfür die Überstände gesammelt: 20 µl 1 % FA (30 min bei RT), 20 µl 1 % FA (30 min bei RT), 20 µl 60 % ACN/0,1 % FA (30 min bei RT), 20 µl 60 % ACN/0,1% FA (30 min bei RT), 30 µl ACN (15 min bei RT) und 20 µl ACN (15 min bei RT).

Die gesammelten Überständen (130 µl) werden in einem Zentrifugalverdampfer (Labconco) vollständig getrocknet. Für die MS-Analyse werden die Peptide aus dem Duplikat einer Probe im kurzen Gel (siehe oben, 2 Geltaschen pro Probe) wieder vereint. Alle Proben werden in

25 µl 2 % ACN/0,1 % FA aufgenommen und pro Injektion 5 µl für die Bestimmung mittels nano-LC-ESI-Orbitrap-MS eingesetzt.

4.8.2.2. Analyse der Peptide mittels nano-LC-ESI-Orbitrap-MS

Die generierten Peptide werden auf einem Dionex Ultimate 3000 RSLCnano-System gekoppelt mit einem Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen) analysiert. Die injizierten Peptide werden auf eine selbstgepackte Trap Säule transportiert (ReproSil-pur C18-AQ, 5 µm, Dr. Maisch, 20 mm × 75 µm) mit einem Fluss von 5 µL/min in 100 % Fließmittel A (0,1 % FA in HPLC grade Wasser). Nach 10 min Beladung werden die Peptide auf eine analytische Trennsäule transferiert (ReproSil Gold C18-AQ, 3 µm, Dr. Maisch, 400 mm × 75 µm) und mit einem 50 min Gradienten von 4 % zu 32 % Fließmittel B (0,1 % FA in ACN mit 5 % (v/v) DMSO) bei 300 nL/min separiert. Beide Fließmittel für die nanoLC enthalten 5 % (v/v) DMSO. Das MS wird im DDA (data dependent acquisition) und ESI positiv Modus betrieben. MS¹-Spektren (m/z 360 - 1300) werden mit einer Auflösung von 60.000 und einem AGC target value (automatic gain control) von $4e^5$ und einer maximalen Injektionszeit (maxIT) von 50 ms aufgezeichnet. MS²-Spektren mit bis zu 20 Vorläufer-Peptiden werden mit einer Auflösung von 15.000 und einem AGC target value von $5e^4$ und einer maximalen Injektionszeit (maxIT) von 22 ms aufgezeichnet. Das Fenster für die Isolierung der Mutterionen wurde auf m/z 1,3 gesetzt und die Fragmentierung wurde unter Einsatz der HCD (higher energy collision induced dissociation) und einer normalisierten Kollisionsenergie von 30 % durchgeführt. Der dynamische Ausschluss wurde auf 20 s Ausschlusszeit gesetzt mit einer Massentoleranz von ± 10 ppm. Einfach geladene, unbestimmt geladene und mehr als sechsfach geladene Vorläufer-Ionen wurden für die Fragmentierung ausgeschlossen.

4.8.2.3. Statistische Analyse der Proteomdaten

Für die Peptididentifizierung und -quantifizierung wird die Software MaxQuant (v1.6.3.4) (Tyanova *et al.*, 2016) mit der integrierten Suchmaschine Andromeda verwendet (Cox *et al.*, 2011). MS²-Spektren werden mit den Proteinsequenzen von Hefe und Gerste abgeglichen (*Hordeum vulgare subsp vulgare domesticated*, *Saccharomyces pastorianus* und *Saccharomyces cerevisiae*) unter Verwendung der entsprechenden UniProt Referenzdatenbanken (UP000011116 download 28.10.2019, UP000002311 download 28.10.2019). Weiters wird in die MaxQuant-Suche gängige Kontaminanten integriert

(integrierte Option). Trypsin/P wird als proteolytisches Enzym hinterlegt. Die Massentoleranz für Vorläufer-Ionen wird auf 4,5 ppm gesetzt und die Toleranz für Fragmentionen auf 20 ppm. Die Ergebnisse wurden auf 1 % FDR (false discovery rate) auf PSM-Ebene (peptide spectrum match) und Protein-Ebene unter Verwendung eines Target-Decoy-Ansatzes mit umgekehrten Proteinsequenzen angepasst. Die minimale Peptidlänge wird als 7 Aminosäuren definiert, die Funktion "match-between-run" ausgeschaltet. Carbamidomethyliertes Cystein wird als fixe Modifizierung gesetzt und die Oxidation von Methionin sowie N-terminale Acetylierungen als variable Modifizierungen. Die Proteinquantifizierung erfolgt unter Anwendung des iBAQ-Algorithmus (intensity-based absolute quantification) (integrierte Option in MaxQuant) (Schwanhäusser *et al.*, 2011). Bei diesem Algorithmus werden die Intensitäten aller Peptid-Vorläufer-Ionen eines Proteins in einer Probe summiert und durch die Anzahl der theoretisch möglichen tryptischen Peptide (zwischen 6 und 30 Aminosäuren) geteilt. iBAQ-Werte sind proportional zur molaren Proteinmenge in einer Probe und können daher dazu verwendet werden, um Proteinkonzentrationen innerhalb einer Probe oder zwischen unterschiedlichen Proben zu vergleichen.

Für die Downstream-Analyse wurden die Summen der iBAQ-Intensitäten normalisiert und log₁₀-transformiert. Beim Vergleich von frischen und gealterten Bieren wurden maximal die Proteine in weniger als zwei Proben pro Gruppe ausgeschlossen. *Missing values* wurden durch den Wert 5 ersetzt (*original scale* 10.000), was niedriger als die detektierten Protein-Intensitäten war. Die Prüfung auf Signifikanz quantitativer Unterschiede von Proteinen erfolgte anhand des Limma-Modells, wobei die Bierprobe den Hauptfaktor darstellte (**Biere 1-24**), und Replikate (biologische und technische) den Nebenfaktor (Ritchie *et al.*, 2015). Die resultierenden *p*-Werte wurden zur Kontrolle der Falscherkennungsrate (*false discovery rate*, FDR) nach der Methode von Benjamini und Hochberg (BH) korrigiert (Benjamini & Hochberg, 1995). Alle statistischen Analysen wurden mit der Software *R* durchgeführt (Version 3.6.1; <https://cran.r-project.org/>).

Falls nötig, wurden manuelle Annotationen von detektierten Proteinen durch einen Abgleich der Daten der Proteomanalyse mit einer Proteindatenbank (www.uniprot.org, zuletzt aktualisiert am 19.09.2020) vorgenommen. Hierfür wurden die Kriterien "≥99 % identity" bzw. "≥99 % similarity" als zutreffend für eine korrekte Identifizierung des Proteins angenommen.

4.8.3. Enzymatische Bestimmung der Oxalatoxidase-Aktivität

Zur fluorometrischen Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Oxalatoxidase (OxOx) in 24 kommerziellen Bierproben (**Biere 1-24**, siehe 4.1.3.1.) wird das *Oxalate Oxidase Activity Assay Kit* der Firma BioVision (Milpitas, USA) verwendet und die Analyse nach Vorschrift des Herstellers in 96-Well-Platten durchgeführt. Die Standards zur Kalibration werden in Duplikaten, die Proben in biologischen Triplikaten aufbereitet und nach Entgasung im Ultraschallbad für 10 min direkt zur Analyse eingesetzt. Die Proben werden aufgrund der zeitabhängigen Reaktion randomisiert auf die 96-Well-Platte aufgegeben. Nach Zugabe aller Reagenzien erfolgt nach Anregung (Ex) bei 535 nm die photometrische Messung der Emission (Em) des entstandenen fluoreszenzaktiven Farbstoffes bei 587 nm (Ex/Em = 535/587 nm). Es werden im kinetischen Modus bei 25 °C über einen Zeitraum von insgesamt 70 min 2 Messreihen durchgeführt (Zeitpunkte t_1 und t_2), wobei jeweils pro Well und Messung 12 Messpunkte (Kreuzsystem) aufgezeichnet werden. Verwendet wird hierfür ein Plate reader des Typs Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Schweiz). Zur Auswertung wird jeweils das blindwertkorrigierte arithmetische Mittel der 12 Einzelmessungen verwendet. Der Blindwert entspricht der Ex/Em einer Mischung aller verwendeten Puffer und Reagenzien des Kits, ohne Zugabe der OxOx-Standardlösung.

Abbildung 59 zeigt die Kalibriergerade nach Umsetzung unterschiedlich konzentrierter Wasserstoffperoxid-Standardlösungen mit dem im Kit enthaltenen Farbreagenz. Die in der zu analysierenden Probe aktive OxOx setzt das zugegebene oxalsäurehaltige Reagenz zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoffperoxid um, was in der Folge zur Bildung eines fluoreszierenden Farbstoffes aus der ebenfalls im Reagenz enthaltenen inaktiven Vorläuferstufe führt. Aus der Intensität der in der Probe resultierenden Emission wird unter Anwendung der parallel aufgezeichneten Wasserstoffperoxid-Kalibrierkurve die Menge entstandenen Wasserstoffperoxids in der Probe über einen gewissen Zeitraum berechnet. Hieraus kann die OxOx-Aktivität der untersuchten Probe bestimmt werden.

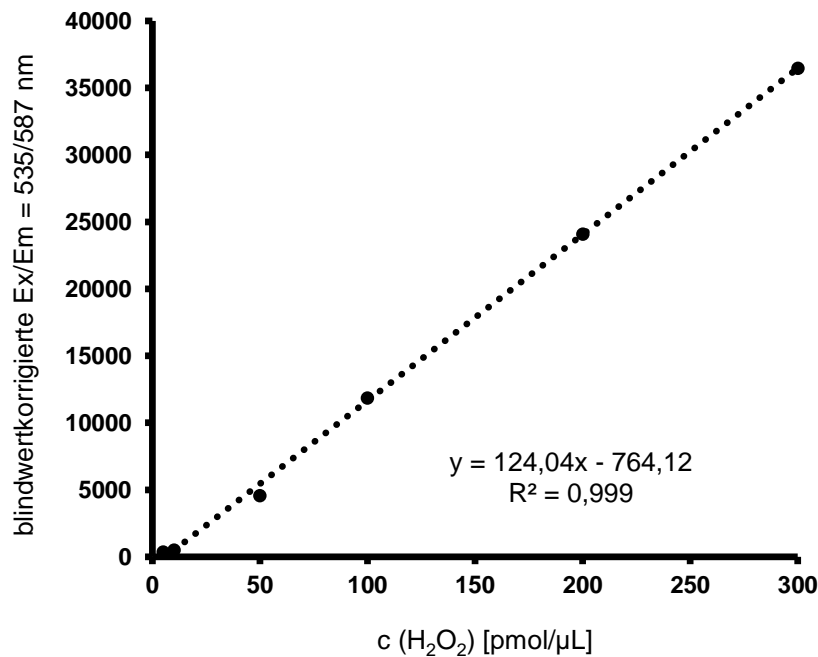


Abbildung 59: Anhand der Anregung/Emission bei 535/587 nm nach enzymatischer Umsetzung und Farbreaktion verschiedener Wasserstoffperoxidlösungen (5, 10, 50, 100, 200 und 300 pmol/ μL) in Doppelbestimmung aufgezeichnete Kalibrierkurve zur fluoreszenzspektroskopischen Ermittlung der Oxalatoxidase-Aktivität.

Zur Bestimmung der OxOx-Aktivität wird die gebildete Menge an H_2O_2 über einen definierten Zeitraum ermittelt. Anhand der aufgezeichneten H_2O_2 -Kalibriergerade kann die im Zeitintervall $\Delta t = (t_2 - t_1)$ in der Probe gebildete Menge an H_2O_2 berechnet und daraus nach Herstellerangabe die OxOx-Aktivität des Bieres bestimmt werden. Beispielhaft zeigt Abbildung 60 den Verlauf der H_2O_2 -Bildung in **Bier 8** (Triplikat).

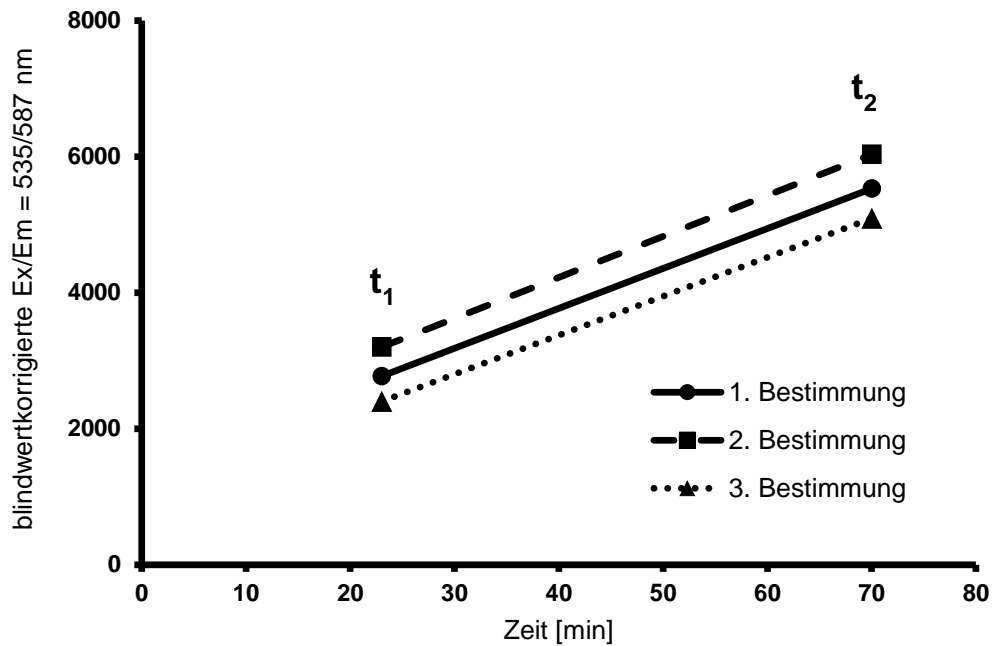


Abbildung 60: Beispielhafter Verlauf der H_2O_2 -Bildung über die Zeit in Bier 8 (Triplikate). Die Messpunkte t_1 und t_2 dienen zur Bestimmung der Oxalatoxidase-Aktivität.

4.9. Untersuchung des Trübungseinflusses ausgewählter physikochemischer Parameter sowie der Trübungsaktivität ausgewählter Fraktionen und Bierinhaltsstoffe

Anhand von Forcierungsexperimenten werden physikochemische Parameter ebenso wie isolierte Bierfraktionen, Metabolite, Komplexbildner und Enzyme auf deren Einfluss auf die Trübungsneigung von Bier hin analysiert. Insofern im Einzelfall nicht anders beschrieben, werden alle Proben über einen Zeitraum von 506 h (3 Wochen) einer forcierten Bieralterung unterzogen (siehe 4.3.) und dabei in regelmäßigen Abständen die Trübungsintensität bei 0° C (Gesamtrübung) und bei 25 °C (Dauertrübung) nephelometrisch bestimmt (siehe 4.6.).

4.9.1. Trübungsaktivität der Ultrafiltrationsfraktionen LMW und HMW

Zur Untersuchung des Einflusses der hochmolekularen (HMW) und niedermolekularen (LMW) Bierfraktion auf die Trübungsneigung werden diese wie unter 4.2. beschrieben aus Bier B mittels Ultrafiltration isoliert, wonach sie im Vergleich zur ursprünglichen Bierkonzentration fünffach konzentriert vorliegen (**B.HMW5x**; **B.LMW5x**).

Um den Einfluss der jeweiligen Bierfraktion auf die Trübungsbildung zu untersuchen, werden diese in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen rekombiniert, wobei jeweils die Konzentration einer Fraktion auf Bierkonzentration eingestellt und konstant gehalten und die Konzentration der anderen Fraktion dagegen erhöht wird. So resultieren, wie in Abbildung 61 graphisch dargestellt, Probelösungen, in denen die HMW (Abbildung 61 links) bzw. LMW (Abbildung 61 rechts) in Bierkonzentration und die jeweils andere Fraktion in null-, ein-, zwei-, drei- bzw. vierfacher Bierkonzentration vorliegen.

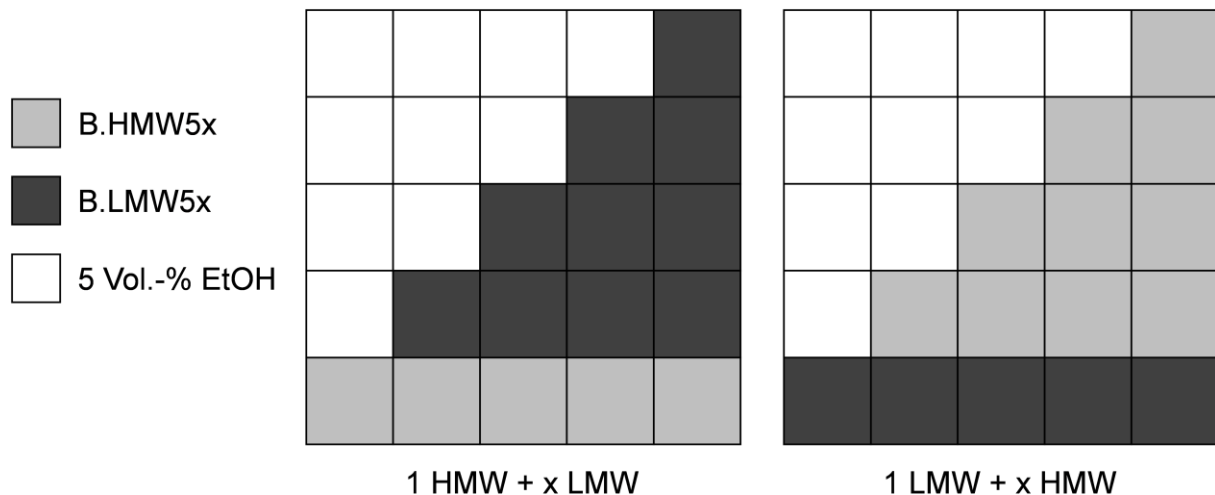


Abbildung 61: Konzentrationsschema für die Dotierung der HMW (links) bzw. der LMW (rechts) in originärer Bierkonzentration mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweils anderen Bierfraktion. 1 Kästchen = 1 Volumenanteil. B.HMW5x: gegenüber der Bierkonzentration fünffach konzentrierte hochmolekulare Bierfraktion aus Bier B.B; B.LMW5x: gegenüber der Bierkonzentration fünffach konzentrierte niedermolekulare Bierfraktion aus Bier B.B.

Die Probelösungen werden in Triplikaten vorbereitet und der pH-Wert mit HCl bzw. NaOH auf pH 4,5 eingestellt. Nach Membranfiltration werden Aliquote von genau 5 ml in Küvetten für die Turbidimetrie gefüllt und luftdicht verschlossen. Alle Proben werden unter identischen Bedingungen wie unter 4.3. beschrieben zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.2. Trübungsaktivität von Hopfeninhaltsstoffen

Um bei der Dotierung von Bier eine möglichst große Bandbreite an Hopfeninhaltsstoffen, wie Hopfenbittersäuren und in Hopfen vorkommenden Polyphenolen, abzudecken, wird Bier **B.B** vor der forcierten Alterung mit unterschiedlichen Hopfenprodukten versetzt. Zum Einsatz kommen von der Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft mbH (Mainburg, Deutschland) zur Verfügung gestellte Hopfenextrakte (α -Säure-Extrakt, β -acid oil und Iso-Extrakt 30 %) mit bekannten Konzentrationen der namensgebenden Bestandteile. Alle Extrakte wurden bis zur Verwendung bei -24 °C luftdicht gelagert. Die Isolierung von Xanthohumol (**1**) erfolgt nach Vogt (2015) aus einem kommerziell erhältlichen Hopfenextrakt (Xantho-Flav[®], Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft mbH, Mainburg, Deutschland). Die kommerziellen Hopfenextrakte und Xanthohumol (**1**) werden für die Verwendung als Dotierungsagens exakt eingewogen und in Methanol gelöst. Es wird die Menge an methanolischer Lösung des jeweiligen Hopfenproduktes bzw. Xanthohumol (**1**) zu Bier B gegeben, dass die finale Konzentration der namensgebenden Bestandteile (beim α -Säure-Extrakt Humulone (**3-5**), beim β -acid oil Lupulone (**6-8**) und beim Iso-Extrakt 30 % Isohumulone (**9-14**)) im dotierten Bier B der 20-fachen Konzentration des jeweiligen Stoffes bzw. der jeweiligen Stoffgruppe im nativen Bier B entspricht. Außerdem wird darauf geachtet, dass die Gesamtmenge an dotierter methanolischer Lösung 1,0 Vol.-% nicht übersteigt (es wurde durch Forcierungsexperimente sichergestellt, dass ein Zusatz von bis zu 1 Vol.-% Methanol zu Bier B keine signifikante Änderung der Trübungsneigung bewirkt).

Bier B (Triplikat) wird für 10 min im Ultraschallbad entgast und anschließend membranfiltriert. Für die Untersuchung des Trübungseinflusses von Xanthohumol (**1**) werden genau 100 ml Bier unter Rühren mit 20 μ l einer methanolischen Lösung von 2 mmol/l Xanthohumol (**1**) versetzt. Die Dotierung der methanolischen Hopfenextrakt-Lösungen unter ständigem Rühren erfolgt nach Tabelle 16.

Tabelle 16: Dotierung methanolischer Hopfenextrakt-Lösungen zu Bier B

Hopfenprodukt	Gehalt an namensgebendem Bestandteil [%]	Einwaage in Methanol [g/l]	Dotierung der methanolischen Extraktlösung zu 100 ml Bier B [μ l]
α -Säuren-Extrakt	24	62,5	100
β -acid oil	18	0,9	100
Iso-Extrakt 30%	30	180	1000

Nach Zugabe der methanolischen Lösungen und Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bialterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier B (Triplikate) entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.3. Trübungsaktivität von Metallionen

4.9.3.1. Dotierung von EDTA zu Bier

Um den Einfluss von Ionen auf die Trübungsneigung von Bier zu untersuchen, wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast. 10 ml Bier werden mit 100 µl einer frisch zubereiteten, 0,2 M wässrigen Lösung von EDTA versetzt, was einem leichten molaren Überschuss bezogen auf die Summe der in Bier B quantifizierten Ionen (1,7 mmol/l) entspricht, um sicherzustellen, dass freie Ionen vollständig komplexiert werden. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH und Membranfiltration werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bialterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier B (Triplikate) entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.3.2. Trübungsaktivität einzelner Ionen und Ionenspezies

Um gezielt den Einfluss einzelner Ionenspezies auf die Trübungsneigung von Bier zu untersuchen, wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast. 1 l Bier wird mit 10 ml einer frisch zubereiteten, 0,2 M wässrigen Lösung von EDTA versetzt, was einem leichten molaren Überschuss bezogen auf die Summe der in Bier B quantifizierten Ionen (1,7 mmol/l) entspricht, um sicherzustellen, dass freie Ionen vollständig komplexiert werden. Das EDTA-behandelte Bier wird membranfiltriert und zu 100 ml aliquotiert. Ein Aliquot wird unter ständigem Rühren mit 1 ml der jeweiligen frisch zubereiteten, 0,1 M wässrigen Lösung von FeCl₂, FeCl₃, CuCl, CuSO₄ x 5 H₂O, AlCl₃, ZnSO₄ x 7 H₂O, MnCl₂, CaCl₂ bzw. MgSO₄ versetzt. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bialterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Die Forcierungen der Mg-, Ca- und Zn-haltigen Proben mussten aus praktischen Gründen auf 434 h verkürzt werden, was aber keinen

Einfluss auf die Aussage des Experiments hatte. Als Referenz (REF) dient das EDTA-behandelte Bier **B.B** nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 und Membranfiltration (Triplikate). Genau 5 ml der REF-Probe werden unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.3.3. Verdünnungsreihen von Eisen (Fe) und Kupfer (Cu)

Um den Einfluss von Eisen- und Kupferionen auf die Trübungsneigung von Bier zu untersuchen, wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast, membranfiltriert und unter ständigem Rühren mit frisch zubereiteten, wässrigen Lösungen von FeCl₂, FeCl₃, CuCl bzw. CuSO₄ x 5 H₂O versetzt. Die Konzentrationen der zu dotierenden Lösungen der Metallsalze (Salzlösungen) werden so gewählt, dass für das Erreichen der erwünschten Zielkonzentration in der Bierprobe (1, 10, 100, 500 oder 1000 µmol/l) jeweils identische Volumina einer jeden Salzlösung eingesetzt werden. Tabelle 17 zeigt das Dotierungsschema.

Tabelle 17: Dotierungsschema für die Verdünnungsreihen von Eisen und Kupfer in Bier (Salzlösung = wässrige Lösung von FeCl₂, FeCl₃, CuCl bzw. CuSO₄ x 5 H₂O).

Zielkonzentration des jeweiligen Ions in der Bierprobe [µmol/l]	c (Salzlösung) [mmol/l]	Dotierung Salzlösung zu 10 ml Bier [µl]
1	0,1	100
10	1,0	100
100	10	100
500	50	100
1000	100	100

Auf eine vorherige EDTA-Behandlung wird bei diesem Experiment verzichtet, sodass Wirkungen kleiner Konzentrationsunterscheide auf die Trübungsneigung sehr genau untersucht werden können. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml einer Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier **B.B** (Triplikate) entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.4. Trübungsaktivität von Oxalsäure

Um den Einfluss von Oxalsäure auf die Trübungsneigung von Bier zu untersuchen, wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast, membranfiltriert und 10 ml Bier unter ständigem Rühren mit 100 µl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von 30 mmol/l *d*-Kaliumoxalat versetzt. Dies entspricht einer Oxalat-Dotierung von 0,3 mmol/l und damit der Zugabe der dreifachen nativen Oxalsäurekonzentration des Bieres. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier **B.B** (Triplikate) entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.5. Trübungsaktivität von Oxalatoxidase (OxOx)

4.9.5.1. Dotierung von OxOx zu Bier

Um den Einfluss eines gezielten Entzugs von Oxalsäure aus dem Bier auf dessen Trübungsneigung zu untersuchen, wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast, membranfiltriert und mit einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von Oxalatoxidase (OxOx) versetzt. Hierzu werden 10 mg des lyophilisierten Enzyms (Aktivität = 2 U/mg) in 50 ml Reinstwasser zu $c = 400$ U/l gelöst und 100 µl dieser Lösung unter ständigem Rühren zu 10 ml Bier **B.B** gegeben, sodass die Enzymaktivität in der Probe $6 \mu\text{U}/\mu\text{l}$ und damit dem Dreifachen der im nativen Bier B gemessenen OxOx-Aktivität ($2,1 \mu\text{U}/\mu\text{l}$) entspricht. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier **B.B** (Triplikate) entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.5.2. Dotierung von OxOx-Modulatoren zu Bier

Um den Einfluss von OxOx-Modulatoren auf die Trübungsneigung von Bier zu untersuchen, wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast, membranfiltriert und 10 ml Bier mit 100 µl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von 10 mmol/l *o*-Phenylendiamin (OxOx-Aktivator) bzw. 100 µl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von 100 mmol/l Kaliumiodid (OxOx-Inhibitor) versetzt. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw.

NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier **B.B** (Triplikate) entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.6. Einfluss des antioxidativen Potentials auf die Trübungsneigung

4.9.6.1. Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Trübungsstabilität

Um den Einfluss eines erhöhten Oxidationsniveaus auf die Trübungsneigung von Bier zu untersuchen, wird Bier **B.B** mit 500 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 versetzt. Diese Konzentration ergibt sich aus der theoretischen Überlegung, wie viel H_2O_2 aus der in Bier **B.B** (= Bier 15) ermittelten Menge an Oxalsäure bei deren vollständiger Umsetzung durch OxOx maximal entstehen würde. Der Oxalsäuregehalt von Bier **B.B** wurde zu 0,14 mmol/l bestimmt, nach Gleichung 8 (Seite 96) wird 1 Mol Oxalsäure zu 1 Mol H_2O_2 umgesetzt, wonach im Bier unter Vernachlässigung etwaiger Folge- und Nebenreaktionen von OxOx bis zu 0,14 mmol/l H_2O_2 gebildet werden können. Hinzu kommt ein Faktor von 3, um eventuelle Unterschiede bei der Trübungsneigung deutlicher sichtbar zu machen. Auf Basis dessen wird eine Dotierung von 0,5 mmol/l H_2O_2 gewählt. Hierzu wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast, membranfiltriert und 10 ml Bier unter ständigem Rühren mit 5 μl einer 1 M wässrigen Lösung von H_2O_2 ($\rho_{\text{H}_2\text{O}_2\ 30\%} = 1,11\ \text{g/cm}^3$) versetzt. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier **B.B** (Triplikate) entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.6.2. Einfluss von Katalase auf die Trübungsstabilität

Um den Einfluss eines gezielten Entzugs von Wasserstoffperoxid und damit der antioxidativen Kapazität von Bier auf dessen Trübungsneigung zu untersuchen, wird Bier **B.B** so mit einer wässrigen Lösung von Katalase versetzt, dass die Enzym-Dotierung 10 U/ml entspricht. Diese Konzentration ergibt sich aus der theoretischen Überlegung, wie viel H_2O_2 aus der in Bier **B.B** (= Bier 15) ermittelten Menge an Oxalsäure bei deren vollständiger Umsetzung durch OxOx entstehen würde. Der Oxalsäuregehalt von Bier **B.B** wurde zu 0,14 mmol/l bestimmt, nach Gleichung 8 (Seite 96) wird 1 Mol Oxalsäure zu 1 Mol H_2O_2 umgesetzt, wonach im Bier unter

Vernachlässigung etwaiger Folge- und Nebenreaktionen von OxOx bis zu 0,14 mmol/l H_2O_2 gebildet werden können. Es entstehen unter Berücksichtigung von Messunsicherheiten also maximal 200 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 , was einer Absolutmenge von 1 μmol in der eingesetzten Probenmenge von 5 ml Bier **B.B** entspricht. 1 U entspricht per Definition der Menge an Enzym, die 1 μmol Substrat bei 25 °C innerhalb von 1 min unter strikt definierten Bedingungen umsetzt (Aebi, 1974). Es würde theoretisch also 1 U in 5 ml Bier **B.B** benötigt (= 0,2 U/ml), um die Maximalkonzentration von 0,2 mmol/l H_2O_2 innerhalb von 1 min vollständig umzusetzen. In Anbetracht von Verdünnungseffekten und der Komplexität der Matrix wird ein Faktor von 50 zugerechnet, was letztlich einer Dotierung von 50 U Katalase zu 5 ml Bier **B.B** (= 10 U/ml) entspricht, um sicherzugehen, dass im Zuge der Alterung entstehendes H_2O_2 umgehend abgebaut werden kann. Hierzu wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast, membranfiltriert und 10 ml Bier unter ständigem Rühren mit 5 μl einer wässrigen Lösung von 20 U/ μl Katalase (durch Verdünnung mit Wasser hergestellt aus einer käuflich erworbenen Enzymlösung, welche laut Herstellerangaben 24 mg Protein/ml und 11895 units/mg Protein aufweist und damit 285 U/ μl) versetzt. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier **B.B** (Triplikate) entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.9.7. Rekombination eines Modells zur initialen Trübungsbildung

4.9.7.1. HMW + Fe

Zur Rekombination der als trübungsrelevant identifizierten Bierinhaltsstoffe wird die wie unter 4.2. beschrieben isolierte, proteinhaltige hochmolekulare Bierfraktion aus Bier **B.B** (**B.HMW5x**) im Verhältnis 1:5 mit 5 Vol.-% Ethanol auf die originäre Bierkonzentration verdünnt (**B.HMW**), membranfiltriert und 10 ml **B.HMW** (Triplikate) unter ständigem Rühren mit 100 μl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von 0,1 mmol/l FeCl_2 bzw. FeCl_3 versetzt, sodass die Eisenkonzentration in der Probe 1 $\mu\text{mol/l}$ beträgt und damit leicht über dem im nativen Bier **B.B** nachgewiesenen Eisengehalt (0,6 $\mu\text{mol/l}$) liegt (siehe 3.3.8.). Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz dient eine Probe von genau 5 ml membranfiltrierter und

pH-adjustierter **B.HMW** (Triplikate), welche unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen wird.

4.9.7.2. HMW + Fe + Oxalsäure

Zur Rekombination der als trübungsrelevant identifizierten Bierinhaltsstoffe wird die wie unter 4.2. beschrieben isolierte, proteinhaltige hochmolekulare Bierfraktion aus Bier **B.B** (**B.HMW5x**) im Verhältnis 1:5 mit 5 Vol.-% Ethanol auf die originäre Bierkonzentration verdünnt (**B.HMW**), membranfiltriert und 10 ml **B.HMW** (Triplikate) unter ständigem Rühren mit 100 µl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von 0,1 mmol/l FeCl₂ bzw. FeCl₃ versetzt, sodass die Eisenkonzentration in der Probe 1 µmol/l beträgt und damit leicht über dem im nativen Bier **B.B** nachgewiesenen Eisengehalt (0,6 µmol/l) liegt (siehe 3.3.8.). Des Weiteren werden unter ständigem Rühren 100 µl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von 10 mmol/l *di*-Kaliumoxalat zugefügt, was einer Dotierung von 0,1 mmol/l Oxalsäure und damit der in Bier **B.B** nachgewiesenen nativen Oxalsäurekonzentration entspricht (siehe 3.3.8.). Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz dient eine Probe von genau 5 ml membranfiltrierter und pH-adjustierter **B.HMW** (Triplikate), welche unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen wird.

4.9.7.3. HMW + Fe + Oxalsäure + OxOx

Zur Rekombination der als trübungsrelevant identifizierten Bierinhaltsstoffe wird die wie unter 4.2. beschrieben isolierte, proteinhaltige hochmolekulare Bierfraktion aus Bier **B.B** (**B.HMW5x**) im Verhältnis 1:5 mit 5 Vol.-% Ethanol auf die originäre Bierkonzentration verdünnt (**B.HMW**), membranfiltriert und 10 ml **B.HMW** (Triplikate) unter ständigem Rühren mit 100 µl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von 0,1 mmol/l FeCl₂ bzw. FeCl₃ versetzt, sodass die Eisenkonzentration in der Probe 1 µmol/l beträgt und damit leicht über dem im nativen Bier **B.B** nachgewiesenen Eisengehalt (0,6 µmol/l) liegt (siehe 3.3.8.). Des Weiteren werden unter ständigem Rühren 100 µl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von 10 mmol/l *di*-Kaliumoxalat zugefügt, was einer Dotierung von 0,1 mmol/l Oxalsäure und damit der in Bier **B.B** nachgewiesenen nativen Oxalsäurekonzentration entspricht (siehe 3.3.8.). Außerdem werden unter ständigem Rühren 50 µl einer frisch zubereiteten, wässrigen Lösung von Oxalatoxidase (OxOx) mit $c = 400 \text{ U/l}$ zugegeben (siehe 4.9.5.1.), sodass die Dotierung

einer Enzymaktivität in der Probe von $2 \mu\text{U}/\mu\text{l}$ und damit der im nativen Bier **B.B** gemessenen OxOx-Aktivität ($2,1 \mu\text{U}/\mu\text{l}$) entspricht (siehe 3.3.8.). Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 4,5 mit HCl bzw. NaOH werden genau 5 ml der Probe in eine Küvette gefüllt und einer forcierten Bieralterung unterzogen, um ihre Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz dient eine Probe von genau 5 ml membranfiltrierter und pH-adjustierter **B.HMW** (Triplikate), welche unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen wird.

4.9.8. Einfluss des pH-Werts auf die Trübungsstabilität

Um den Einfluss des pH-Werts auf die Trübungsbildung zu untersuchen, wird Bier **B.B** (Triplikate) für 10 min im Ultraschallbad entgast, mit HCl bzw. NaOH auf unterschiedliche pH-Werte (pH 1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 7; 8) eingestellt und membranfiltriert. Aliquote von genau 5 ml werden unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen, um die Trübungseigenschaften zu analysieren. Als Referenz wird Bier **B.B** (Triplikate) mit einem pH-Wert von pH 4,2 entgast, membranfiltriert und genau 5 ml unter identischen Bedingungen zeitlich parallel forciert gealtert und gemessen.

4.10. Ionenchromatographie (HPIC)

HPIC-System

LC-System:	ICS 5000 Analytical (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
Autosampler:	ICS 5000 AS-AP (Dionex)
Pumpe:	ICS 5000 DP-5 Dual Pump (Dionex)
Säulenofen:	ICS 50000 DC-5 Detector/Chromatography Module (Dionex)
Detektor:	ICS 5000 Electrochemical Detector Cell (Dionex)
Software:	Chromleon v7.2 (Dionex)

4.11. Tandem-Massenspektrometrie (UHPLC-MS/MS)

Die Erfassung der massenspektrometrischen Parameter einzelner Substanzen für die MS/MS-Analyse erfolgt mittels Direktinjektion (*tuning*). Die Analyten werden kontinuierlich in das System infundiert und in Full-Scan-Experimenten im Bereich $m/z = 50-1200$ analysiert. Dabei werden die Spektren bei variablem Declusteringpotential (DP) zwischen 0 und 100 V (ESI⁺) bzw. 0 und -100 V (ESI⁻) aufgenommen. Die Fragmentierungsmuster ausgewählter Analytionen werden bei variabler Kollisionsenergie (CE) zwischen 5 und 120 V (ESI⁺) bzw. -5 und -120 V (ESI⁻) erfasst.

Die softwaregestützte Optimierung der MS-Parameter *declustering potential* (DP), *collision energy* (CE) und *collision cell exit potential* (CXP) für die jeweiligen Zielanalyten erfolgt bei kontinuierlicher Infundierung über eine Spritzenpumpe mit Hilfe der Funktion „Compound Optimization“ der Software Analyst (Version 1.6.2., AB Sciex, Framingham, USA). Die hierbei verwendeten Parameter sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die ermittelten, substanzspezifischen Werte werden verwendet, um eine UHPLC-MS/MS-Methode im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus aufzusetzen.

Tabelle 18: Tuningparameter zur Optimierung der MRM-Detektion im UHPLC-MS/MS-System

Flussrate Spritzenpumpe	7 µl/min
Ion Spray Voltage	5500 V (ESI ⁺) bzw. -4500 V (ESI ⁻)
Curtain Gas	20 psi
Quadrupol-Auflösung	unit
Stoßgas	N ₂ , p = 4,5 × 10 ⁻⁵ Torr

UHPLC-MS/MS System

LC-System:	Nexera X2 (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)
Pumpe:	LC-30AD (Shimadzu)
Degaser:	DGU-20A5R (Shimadzu)
Autosampler:	SIL-30AC (Shimadzu)
Säulenofen:	CTO-30A (Shimadzu)
Controller:	CBM-20A (Shimadzu)

Massenspektrometer:	API 5500 QTRAP® LC-MS/MS System (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)
Quellentyp:	Turbo Spray
Quellentemperatur:	550 °C
Ionisation:	Electrospray ionization (ESI ⁺ /ESI ⁻)
Detektionsmodus:	MRM
Curtain gas:	N ₂ , 35 psi
Nebulizer gas:	N ₂ , 55 psi
Turbo Gas:	N ₂ , 65 psi
Collision Gas:	N ₂ , p = 1,9 × 10 ⁻⁵ Torr
Ion Spray Voltage:	-4500 V (ESI ⁻) oder 5500V (ESI ⁺)
Auflösung:	unit
Software:	Analyst v1.6.2 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland); Chromeleon Xpress (Dionex, Sunnyvale, CA, USA); Dionex Chromatography MS Link 2.8.0.2633 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

5. Zusammenfassung

Die kolloidale Stabilität von Bier ist ein entscheidender Qualitätsparameter hinsichtlich der Mindesthaltbarkeit und der sensorischen Akzeptanz der Konsumenten. Trübungsverursachende Interaktionen auf molekularer Ebene konnten bislang allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Identifizierung und Charakterisierung trübungsaktiver Bierinhaltsstoffe stellt einen grundlegenden Baustein für das Verständnis der chemisch-physikalischen Mechanismen der Bieralterung und der damit verbundenen Trübungsbildung dar. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung, Charakterisierung und Quantifizierung trübungsaktiver Verbindungen in Bier und Biertrübung und damit die Analyse der zur Trübungsbildung führenden Mechanismen auf molekularer Ebene.

Zunächst wurden die Trübungseigenschaften einer Auswahl an kommerziellen Bierproben untersucht. Nach Entwicklung eines Vorgehens zur forcierten Bieralterung und von Methoden zur Trübungsisolierung und -extraktion wurden durch den Vergleich einer Auswahl von frischen mit den korrespondierenden gealterten und geklärten Bieren und anhand der daraus isolierten Trübungspartikel die Majorkomponenten der Trübungen identifiziert und quantifiziert. Hierdurch konnten zwischen 50 Gew.-% und 90 Gew.-% der Trübungsinhaltsstoffe charakterisiert werden.

Es wurde gezeigt, dass sich die Proteinfraction im Verlauf der Alterung im Bier deutlich anreichert, was auf die Präzipitation als Trübungsbestandteile zurückzuführen war. Den mengenmäßig dominierenden Anteil der Biertrübung stellten proteinische Komponenten mit Anteilen zwischen 30 % und 60 % dar, wobei sich Serpin Z4 als abundantestes Trübungsprotein zeigte. Die Daten der holistischen Proteomanalysen von Bier und Biertrübung zeigten anhand von absoluten iBAQ-Werten erstmals, dass Proteine vorrangig entsprechend ihrer Abundanzen im Bier präzipitierten und sich in ebendieser Rangordnung auch in der korrespondierenden Trübung wiederfanden. Darauf basierend konnte eine fundierte Annahme darüber getroffen werden, dass Proteine im Verlauf der Trübungsbildung eher infolge unspezifischer Wechselwirkungen präzipitieren, was durch Daten der Metabolomanalysen und Modellstudien untermauert werden konnte. Den zweiten Hauptbestandteil der untersuchten Trübungspartikel stellten Kohlenhydrate mit Mengenanteilen von rund 20% dar.

Auf niedermolekularer Ebene konnten erstmals sekundäre Hopfeninhaltsstoffe absolut in Biertrübung quantifiziert und deren spezifische Anreicherung bei der Trübungsbildung entsprechend ihrer Hydrophobizität gezeigt werden. Insbesondere die unpolaren

Hopfenphenole Xanthohumol (1) und Lupulone (6-8) wiesen starke Anreicherungseffekte in der Biertrübung im Vergleich zum nativen Bier auf, wobei für Xanthohumol (1) und Isoxanthohumol (2) zudem eine Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse um den Faktor 3 zugunsten des hydrophoberen Xanthohumols (1) in der Biertrübung gezeigt werden konnte. Neben der spezifischen Anreicherung der Hopfenphenole wurden auch ausgeprägte Konzentrationseffekte für Calcium und die Übergangsmetalle Kupfer, Eisen, Nickel und Zink in der Biertrübung ermittelt. Durch die Kombination der umfassenden Quantifizierungsdaten konnten begründete Annahmen über die chemischen Ursachen für spezifische Anreicherungen der beschriebenen niedermolekularen Bierinhaltsstoffe in den Trübungspartikeln getroffen werden.

Auf Basis der Erkenntnisse über die Trübungszusammensetzung wurde ein Lagerbier mittels Ultrafiltration in seine hoch- und niedermolekulare Bierbestandteile fraktioniert. Durch Forcierungsexperimente mit den beiden Fraktionen konnte erstmalig gezeigt werden, dass die niedermolekulare Fraktion (LMW) ausschlaggebend für die Trübungsstabilität eines Bieres ist, wohingegen die hochmolekulare Fraktion (HMW) isoliert vollkommen trübungsstabil vorlag und erst durch Zugabe von LMW-Komponenten präzipitierte. Hieraus konnte mit der HMW zudem eine biernahe Matrix abgeleitet werden, die sich für Modellsysteme eignete, auf Basis derer sich die Trübungsaktivität einzelner Komponenten gezielt testen ließ.

Die Übergangsmetalle Eisen und Kupfer konnten als besonders trübungsaktiv identifiziert werden, wobei Eisen bereits in geringsten Konzentrationen als trübungsfördernd einzustufen war. Auf Basis der erarbeiteten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass Eisen(III) gegenüber Eisen(II) die trübungsaktive Ionenspezies darstellt und in Bier unter anderem komplexiert als Oxalatoferrat vorliegt. Oxalsäure konnte diesbezüglich als trübungsstabilisierender Komplexbildner charakterisiert werden, welcher im Zuge einer enzymatischen Umsetzung von Oxalatoxidase abgebaut wird. Hierdurch werden zum einen trübungsaktive Eisenionen freigesetzt und zum anderen oxidativ schädigendes und daher trübungsförderndes Wasserstoffperoxid gebildet. Der negative Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Trübungsstabilität konnte durch den Einsatz von Katalase belegt werden.

In einem biernahen Modellsystem, bestehend aus der Bier-HMW, Eisen(II) bzw. Eisen(III), Oxalsäure und Oxalatoxidase konnte im Zuge von Forcierungsexperimenten die Interaktion dieser Parameter und deren Beitrag zur kolloidalen Stabilisierung bzw. Destabilisierung bestätigt werden. Aus diesen Daten ließ sich eine Kaskade trübungsrelevanter Parameter ableiten, welche den möglichen Einfluss von Pflanzenstress auf den Oxalsäuregehalt, den Eisengehalt sowie die Oxalatoxidase-Aktivität und damit auf die kolloidale Stabilität des Bieres

beschreibt. Die trianguläre Beziehung zwischen Oxalsäure, Eisenionen und der Oxalatoxidase-Aktivität im Bezug auf die Trübungsstabilität wurden ebenso wie die Rolle der Oxalatoxidase für die Trübungsbildung im Speziellen im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Zudem wurde mit der Oxalatoxidase eine neue Quelle für Peroxide im fertigen Bier aufgezeigt.

Mittels multivariater Datenanalyse und Korrelation der erarbeiteten Parameter mit der Trübungsneigung von 24 kommerziellen Bieren konnte außerdem an Realproben gezeigt werden, dass die Parameter isoliert betrachtet nicht in linearem Zusammenhang mit der Trübungsstabilität der Biere standen. Erst durch eine Kombination konnte ein Korrelationsmodell abgeleitet werden, dessen Varianz ($R^2 = 0,60$) anhand dieser drei Parameter erklärt werden konnte. Dies ließ die Annahme zu, dass im Rahmen der durchgeführten Arbeit die maßgeblichen trübungsauslösenden Bierinhaltsstoffe identifiziert werden konnten.

Die erarbeiteten molekularen Einblicke in das komplexe, multifaktorielle Zusammenspiel, das zur Biertrübungsbildung führt, ließen zudem vermuten, dass Pflanzenstress ein entscheidender Faktor für die Trübungsstabilität sein könnte. Abwehrreaktionen auf biotische und abiotische Stressoren könnten im Hinblick auf Enzymaktivitäten, den Oxalsäuregehalt der Rohstoffe und damit auch die im Produkt resultierenden Metallgehalte maßgeblich für die kolloidale Stabilität von Bier sein. Dahingehend können auf Basis der durchgeführten Experimente weiterführende Studien angestellt werden, die sich gezielt mit der Auswirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf die hier erarbeiteten, trübungsrelevanten Parameter befassen und außerdem das Verhalten trübungsverursachender Substanzen über den Brauprozess hinweg untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- Abd El-Mohdy, H.; Hegazy, E.; El-Nesr, E.; El-Wahab, M.: Metal sorption behavior of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/(acrylic acid-co-styrene) hydrogels synthesized by gamma radiation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2013**, 1 (3), 328–338.
- Aebi, H.: Catalase. In: Hans Ulrich Bergmeyer und Karlfried Gawehn (Hg.): *Methods of enzymatic analysis*. Volume 2. 2nd English ed. Weinheim, New York: Academic Press (Methods of enzymatic analysis, v. 2), 673–684, **1974**.
- Aguié-Béghin, V.; Sausse, P.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Douillard, R.: Polyphenol-beta-casein complexes at the air/water interface and in solution: effects of polyphenol structure. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56 (20), 9600–9611.
- Alekseev, Y.; Garnovskii, A.; Zhdanov, Y.: Complexes of natural carbohydrates with metal cations. *Russ. Chem. Rev.*, **1998**, 67 (8), 649–669.
- Alfonso-Prieto, M.; Biarnés, X.; Vidossich, P.; Rovira, C.: The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, **2009**, 131 (33), 11751–11761.
- Apperson, K.; Leiper, K.; McKeown, I.; Birch, D.: Beer Fluorescence and the Isolation, Characterisation and Silica Adsorption of Haze-Active Beer Proteins. *Journal of the Institute of Brewing*, **2002**, 108 (2), 193–199.
- Aron, P.; Shellhammer, T.: A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, **2010**, 116 (4), 369–380.
- Asano, K.; Hashimoto, N.: Isolation and Characterization of Foaming Proteins of Beer. *ASBC*, **1980**, 38 (4), 129–137.
- Asano, K.; Ohtsu, K.; Shinagawa, K.; Hashimoto, N.: Affinity of proanthocyanidins and their oxidation products for haze-forming proteins of beer and the formation of chill haze. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1984**, 48 (5), 1139–1146.
- Asano, K.; Shinagawa, K.; Hashimoto, N.: Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **1982**, 40, 147.
- Bamdad, F.; Chen, L.: Antioxidant capacities of fractionated barley hordein hydrolysates in relation to peptide structures. *Molecular nutrition & food research*, **2013**, 57 (3), 493–503.
- Bamforth, C.: Superoxide dismutase in barley. *J. Inst. Brew.*, **1983**, 89 (6), 420–423.
- Bamforth, C.: Enzymic and Non-Enzymic Oxidation in the Brewhouse: A Theoretical Consideration. *J. Inst. Brew.*, **1999**, 105 (4), 237–242.
- Bamforth, C.: Brewing and brewing research: past, present and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**, 80, 1371–1378.
- Bamforth, C.: Beer, Carbohydrates and Diet. *J. Inst. Brew.*, **2005**, 111 (3), 259–264.
- Bamforth, C.: Haze Measurement. In: *Brewing Materials and Processes*: Elsevier, 251–256, **2016**.
- Bamforth, C.; Muller, R.; Walker, M.: Oxygen and Oxygen Radicals in Malting and Brewing: A Review. *ASBC*, **1993**, 51 (3), 79–88.
- Bart-Haas-Group: Anteil der Brauereien aus Deutschland am weltweiten Bierausstoß in den Jahren 2014 bis 2018. Statista GmbH, **2019**. Online verfügbar unter

<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/690893/umfrage/anteil-deutscher-brauereien-am-weltweiten-bierausstoss/>, zuletzt aktualisiert am 07.02.2020.

Belitz, H.-D., Grosch, W. und Schieberle, P.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6., vollst. überarb. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer, **2012**.

Belleau, G.; Dadić, M.: Beer Hazes. II. Further Analyses of Basic Components by High Performance Liquid Chromatography. *ASBC*, **1981**, 39 (4), 142–146.

Bengough, W.; Harris, G.: General composition of non-biological hazes of beers and some factors in their formation. Part I. *J. Inst. Brew.*, **1955**, 61 (2), 134–145.

Benítez, E.; Amezága, N.; Sosa, G.; Peruchena, N.; Lozano, J.: Turbidimetric Behavior of Colloidal Particles in Beer Before Filtration Process. *Food Bioprocess Technol*, **2013**, 6 (4), 1082–1090.

Benjamini, Y.; Hochberg, Y.: Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, **1995**, 57 (1), 289–300.

Berna, A.; Bernier, F.: Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. *Plant Molecular Biology*, **1999**, 39, 539–549.

Bernier, F.; Berna, A.: Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry*, **2001**, 39 (7), 545–554.

Binns, F.; Ensor, R.; Macpherson, A.: Metal content of United Kingdom and overseas lager beers. *J. Sci. Food Agric.*, **1978**, 29 (1), 71–74.

Borowski, T.; Bassan, A.; Richards, N.; Siegbahn, P.: Catalytic Reaction Mechanism of Oxalate Oxidase (Germin). A Hybrid DFT Study. *Journal of chemical theory and computation*, **2005**, 1 (4), 686–693.

Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **1976**, 72, 248–254.

Bruice, P.: Organic Chemistry. 4th Edition: Pearson Education Inc., **2004**.

Brune, M.; Hallberg, L.; Skanberg, A.-B.: Determination of Iron-Binding Phenolic Groups in Foods. *J Food Science*, **1991**, 56 (1), 128–131.

Buckee, G.; Hargitt, R.: Measurement of residual carbohydrate in beer. *J. Inst. Brew.*, **1977**, 83, 275–278.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Bundesrepublik Deutschland (05.07.2017): Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken: Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV), vom 29.01.1998 (BGBl. I S. 230, 231), die zuletzt durch Artikel 23 der Verordnung vom 05.07.2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist, Anlage 4 (zu § 5 Abs. 1 und § 7), Begrenzt zugelassene Zusatzstoffe, Teil B, Calciumdinatrium-EDTA.

Çalışkan, M.; Cuming, A.: Germin-Like Oxalate Oxidase Activity Increase in Auxin-Treated Wheat Coleoptiles. *Turk J Bot*, **2000**, 24 (6), 329–335.

Callemien, D.; Collin, S.: Use of RP-HPLC-ESI(–)-MS/MS to Differentiate Various Proanthocyanidin Isomers in Lager Beer Extracts. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **2008**, 66 (2), 109–115.

Callemien, D.; Guyot, S.; Collin, S.: Use of thiolysis hyphenated to RP-HPLC-ESI(–)-MS/MS for the analysis of flavanoids in fresh lager beers. *Food Chemistry*, **2008**, 110 (4), 1012–1018.

Carrasco, A.; Siebert, K.: Human visual perception of haze and relationships with instrumental measurements of turbidity. Thresholds, magnitude estimation and sensory descriptive analysis of haze in model systems. *Food Quality and Preference*, **1999**, 10 (6), 421–436.

- Carter, C.; Thornburg, R.: Germin-like proteins: structure, phylogeny, and function. *J. Plant Biol.*, **1999**, *42* (2), 97–108.
- Cattoor, K.; Dresel, M.; de Bock, L.; Boussey, K.; van Bocxlaer, J.; Remon, J.-P.; de Keukeleire, D.; Deforce, D.; Hofmann, T.; Heyerick, A.: Metabolism of hop-derived bitter acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2013**, *61* (33), 7916–7924.
- Çaykara, T.; İnam, R.: Determination of the competitive adsorption of heavy metal ions on poly(n -vinyl-2-pyrrolidone/acrylic acid) hydrogels by differential pulse polarography. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2003**, *89* (8), 2013–2018.
- Chapon, L.: The mineral composition of chill haze preparations. *J. Inst. Brew.*, **1965**, *71* (4), 299–304.
- Cheng, C.-S.; Samuel, D.; Liu, Y.-J.; Shyu, J.-C.; Lai, S.-M.; Lin, K.-F.; Lyu, P.-C.: Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. *Biochemistry*, **2004**, *43* (43), 13628–13636.
- Cheng, T.; Zhao, Y.; Li, X.; Lin, F.; Xu, Y.; Zhang, X.; Li, Y.; Wang, R.; Lai, L.: Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *Journal of chemical information and modeling*, **2007**, *47* (6), 2140–2148.
- Costa, S.; Tzanov, T.; Filipa Carneiro, A.; Paar, A.; Gübitz, G.; Cavaco-Paulo, A.: Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, *30* (3), 387–391.
- Cox, J.; Neuhauser, N.; Michalski, A.; Scheltema, R.; Olsen, J.; Mann, M.: Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research*, **2011**, *10* (4), 1794–1805.
- Curioni, A.; Pressi, G.; Furegon, L.; Peruffo, A.: Major Proteins of Beer and their Precursors in Barley: Electrophoretic and Immunological Studies. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, *43* (10), 2620–2626.
- Dadic, M.; Belleau, G.: Beer Hazes. I. Isolation and Preliminary Analysis of Phenolic and Carbohydrate Components. *ASBC*, **1980**, *38* (4), 154–158.
- Daugherty, E.; Gilbert, B.; Nico, P.; Borch, T.: Complexation and Redox Buffering of Iron(II) by Dissolved Organic Matter. *Environmental science & technology*, **2017**, *51* (19), 11096–11104.
- Delcour, J.; Schoeters, M.; Meysman, E.; Dondeyne, P.; Moerman, E.: The intrinsic influence of catechins and procyanidins on beer haze formation. *Journal of the Institute of Brewing*, **1984a**, *90*, 381–384.
- Delcour, J.; Vandenberghe, M.; Dondeyne, P.; Schrevens, E.; Wijnhoven, J.; Moerman, E.: Flavour and haze stability differences in unhopped and hopped all-malt pilsener beers brewed with proanthocyanidin-free and with regular malt. *Journal of the Institute of Brewing*, **1984b**, *90* (2), 67–72.
- Delius, J.; Médard, G.; Kuster, B.; Hofmann, T.: Effect of Astringent Stimuli on Salivary Protein Interactions Elucidated by Complementary Proteomics Approaches. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2017**, *65* (10), 2147–2154.
- Delvaux, F.; Delvaux, F.; Delcour, J.: Characterisation of the Colloidal Haze in Commercial and Pilot Scale Belgian White Beers. *Journal of the Institute of Brewing*, **2000**, *106* (4), 221–228.
- Deutscher Brauer-Bund: Deutsche Brauwirtschaft in Zahlen. Deutscher Brauer-Bund. Berlin, **2019**. Online verfügbar unter <https://www.brauerbund.de/download/Archiv/PDF/statistiken/STATIST%202018.pdf>, zuletzt aktualisiert am 07.02.2020.
- Dietz, M.: Strukturaufklärung und Charakterisierung schaumaktiver Bierinhaltsstoffe und Untersuchungen zum Einfluss des Schaumes auf die Aromaentfaltung, Dissertation. TU München, München, **2019**.

- Dresel, M.: Struktur und sensorischer Beitrag von Hopfenhartharzen zum Bittergeschmack von Bier sowie zellbasierte Studien zu deren Resorption und Metabolismus, Dissertation. TU München, München, **2013**.
- Dresel, M.; Dunkel, A.; Hofmann, T.: Sensomics analysis of key bitter compounds in the hard resin of hops (*Humulus lupulus* L.) and their contribution to the bitter profile of Pilsner-type beer. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2015**, 63 (13), 3402–3418.
- Dufrechou, M.; Doco, T.; Poncet-Legrand, C.; Sauvage, F.-X.; Vernhet, A.: Protein/Polysaccharide Interactions and Their Impact on Haze Formation in White Wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2015**.
- Dumas, B.; Freyssinet, G.; Pallett, K.: Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. *Plant Physiol.*, **1995** (107), 1091–1096.
- Dumas, B.; Sailland, A.; Cheviet, J.; Freyssinet, G.; Pallett, K.: Identification of barley oxalate oxidase as a germin-like protein. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, **1993**, 316 (8), 793–798.
- Dunwell, J.; Gibbings, J.; Mahmood, T.; Saqlan Naqvi, S.: Germin and Germin-like Proteins: Evolution, Structure, and Function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **2008**, 27 (5), 342–375.
- Eagles, W.P.; Wakeman, R.J.: Interactions between dissolved material and the fouling layer during microfiltration of a model beer solution. *Journal of Membrane Science*, **2002**, 206 (1), 253–264.
- Eckert, E.; Bamdad, F.; Chen, L.: Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chem*, **2014**, 159, 498–506.
- Enami, S.; Sakamoto, Y.; Colussi, A.: Fenton chemistry at aqueous interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2014**, 111 (2), 623–628.
- Essawy, H.; Ibrahim, H.: Synthesis and characterization of poly(vinylpyrrolidone-co-methylacrylate) hydrogel for removal and recovery of heavy metal ions from wastewater. *Reactive and Functional Polymers*, **2004**, 61 (3), 421–432.
- Evans, D.; Finn, J.; Robinson, L.; Eglinton, J.; Sheehy, M.; Stewart, D.: The Effects of Hop- α -Acids and Proline-Specific Endoprotease (PSEP) Treatments on the Foam Quality of Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, **2011**, 117 (3), 335–342.
- Evans, D.; Robinson, L.; Sheehan, M.; Tolhurst, R.; Hill, A.; Skerritt, J.; Barr, A.: Application of Immunological Methods to Differentiate between Foam-Positive and Haze-Active Proteins Originating from Malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **2003**, 61 (2), 55–62.
- Evans, D.; Sheehan, M.: Don't Be Fobbed Off: The Substance of Beer Foam—A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **2018**, 60 (2), 47–57.
- Evans, D.; Surrel, A.; Sheehy, M.; Stewart, D.; Robinson, L.: Comparison of Foam Quality and the Influence of Hop α -Acids and Proteins Using Five Foam Analysis Methods. *ASBC*, **2008**, 66 (1), 1–10.
- Fasoli, E.; Aldini, G.; Regazzoni, L.; Kravchuk, A.; Citterio, A.; Righetti, P.: Les Maîtres de l'Orge: the proteome content of your beer mug. *Journal of proteome research*, **2010**, 9 (10), 5262–5269.
- Fenton, H.: LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, **1894**, 65 (0), 899–910.
- Ferstl, W.: Physikalisch-chemische Charakterisierung von Kolloiden in Wasser/Retstoff-Systemen: Kolloidgetragene Schwermetallmobilisierung in Schlacken, Dissertation. Universität Regensburg, Regensburg, **2002**.

- Fischbacher, A.; Sonntag, C. von; Schmidt, T.: Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen peroxide/Fe(II) ratios. *Chemosphere*, **2017**, *182*, 738–744.
- Fischer, K.: Neues Verfahren zur maßanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern. *Angew. Chem.*, **1935**, *48* (26), 394–396.
- Frank, O.; Kreissl, J.; Daschner, A.; Hofmann, T.: Accurate determination of reference materials and natural isolates by means of quantitative (1)h NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2014**, *62* (12), 2506–2515.
- García-Estévez, I.; Cruz, L.; Oliveira, J.; Mateus, N.; Freitas, V. de; Soares, S.: First evidences of interaction between pyranoanthocyanins and salivary proline-rich proteins. *Food Chemistry*, **2017**, *228*, 574–581.
- García-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A.; Moreno, M.: The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology*, **1995**, *3* (2), 72–74.
- Gazzola, D.; van Sluyter, S.; Curioni, A.; Waters, E.; Marangon, M.: Roles of proteins, polysaccharides, and phenolics in haze formation in white wine via reconstitution experiments. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2012**, *60* (42), 10666–10673.
- Geng, S.; Jiang, Z.; Ma, H.; Wang, Y.; Liu, B.; Liang, G.: Interaction mechanism of flavonoids and bovine β -lactoglobulin: Experimental and molecular modelling studies. *Food Chemistry*, **2020**, *312*, 126066.
- Georgi, A.; Schierz, A.; Trommler, U.; Horwitz, C.; Collins, T.; Kopinke, F.-D.: Humic acid modified Fenton reagent for enhancement of the working pH range. *Applied Catalysis B: Environmental*, **2007**, *72* (1-2), 26–36.
- Gorjanović, S.; Sužnjević, D.; Beljanski, M.; Hranisavljević, J.: Barley lipid-transfer protein as heavy metal scavenger. *Environ Chem Lett*, **2004**, *2* (3), 113–116.
- Grasso, D.; Subramaniam, K.; Butkus, M.; Strevett, K.; Bergendahl, J.: A review of non-DLVO interactions in environmental colloidal systems. *Rev Environ Sci Biotechnol*, **2002**, *1* (1), 17–38.
- Gyurcsik, B.; Nagy, L.: Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, **2000**, *203* (1), 81–149.
- Haber, F.; Weiss, J.: The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond. A*, **1934**, *147* (861), 332–351.
- Hamberg, M.: Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: qualitative and quantitative analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, *39*, 1568–1572.
- Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T.: Identification and RP-HPLC-ESI-MS/MS quantitation of bitter-tasting beta-acid transformation products in beer. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2009a**, *57* (16), 7480–7489.
- Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T.: Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chemistry*, **2009b**, *116* (1), 71–81.
- Haseleu, G.; Lagemann, A.; Stephan, A.; Intelmann, D.; Dunkel, A.; Hofmann, T.: Quantitative sensomics profiling of hop-derived bitter compounds throughout a full-scale beer manufacturing process. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2010**, *58* (13), 7930–7939.
- Hashimoto, N.: Oxidation of higher alcohols by melanoidins in beer. *J. Inst. Brew.*, **1972**, *78* (1), 43–51.
- Hejgaard, J.; Kaersgaard, P.: Purification and properties of the major antigenic beer protein of barley origin. *J. Inst. Brew.*, **1983**, *89* (6), 402–410.

- Hofmann, T.: Kolloide: Die Welt der vernachlässigten Dimensionen. *Chemie in unserer Zeit*, **2004**, *38* (1), 24–35.
- Hofmann, T.; Baumann, T.; Bundschuh, T.; v. d. Kammer, F.; Leis, A.; Schmitt, D.; Schäfer, T.; Thieme, J.; Totsche, K.-U.; Zänker, H.: Aquatische Kolloide II: Eine Übersichtsarbeit zur Probenahme, Probenaufbereitung und Charakterisierung. *Grundwasser*, **2003**, *8* (4), 213–223.
- Hughes, P.: The Significance of Iso- α -Acids for Beer Quality Cambridge Prize Paper. *J. Inst. Brew.*, **2000**, *106* (5), 271–276.
- Hurkman, W.; Tanaka, C.: Effect of Salt Stress on Germin Gene Expression in Barley Roots. *Plant Physiol.*, **1996**, *110* (3), 971–977.
- Limure, T.; Nankaku, N.; Hirota, N.; Tiansu, Z.; Hoki, T.; Kihara, M.; Hayashi, K.; Ito, K.; Sato, K.: Construction of a novel beer proteome map and its use in beer quality control. *Food Chemistry*, **2010**, *118* (3), 566–574.
- Limure, T.; Nankaku, N.; Watanabe-Sugimoto, M.; Hirota, N.; Tiansu, Z.; Kihara, M.; Hayashi, K.; Ito, K.; Sato, K.: Identification of novel haze-active beer proteins by proteome analysis. *Journal of Cereal Science*, **2009**, *49* (1), 141–147.
- Limure, T.; Sato, K.: Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International*, **2013**, *54* (1), 1013–1020.
- Limure, T.; Takoi, K.; Kaneko, T.; Kihara, M.; Hayashi, K.; Ito, K.; Sato, K.; Takeda, K.: Novel prediction method of beer foam stability using protein Z, barley dimeric alpha-amylase inhibitor-1 (BDAI-1) and yeast thioredoxin. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2008**, *56* (18), 8664–8671.
- Intelmann, D.: Molekulare, psychophysikalische und rezeptorbasierte Studien zum Bittergeschmack von Bier, Dissertation. TU München, München, **2011**.
- Intelmann, D.; Haseleu, G.; Dunkel, A.; Lagemann, A.; Stephan, A.; Hofmann, T.: Comprehensive sensomics analysis of hop-derived bitter compounds during storage of beer. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2011**, *59* (5), 1939–1953.
- Intelmann, D.; Haseleu, G.; Hofmann, T.: LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2009**, *57* (4), 1172–1182.
- Intelmann, D.; Hofmann, T.: On the autoxidation of bitter-tasting iso-alpha-acids in beer. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2010**, *58* (8), 5059–5067.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 23.07.1971: Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units. Appendix II. Online verfügbar unter http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t/manual_of_s_and_t.html.
- Internationale Organisation für Normung (ISO) DIN EN ISO 7027-1:2016-11: Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Trübung - Teil 1.
- Izawa, S.; Inoue, Y.; Kimura, A.: Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, **1996**, *320* (Pt 1), 61–67.
- Jaeckels, N.; Meier, M.; Dietrich, H.; Will, F.; Decker, H.; Fronk, P.: Influence of polysaccharides on wine protein aggregation. *Food Chemistry*, **2016**, *200*, 38–45.
- Jin, B.; Li, L.; Feng, Z.-C.; Li, B.; Liu, G.-Q.; Zhu, Y.-K.: Investigation of hordeins during brewing and their influence on beer haze by proteome analysis. *Journal of Food Biochemistry*, **2011**, *35* (5), 1522–1527.

- Jin, B.; Li, L.; Feng, Z.-C.; Li, B.; Liu, G.-Q.; Zhu, Y.-K.: Investigation of the relationship of malt protein and beer haze by proteome analysis. *Journal of Food Processing and Preservation*, **2012**, 36 (2), 169–175.
- Jongberg, S.; Andersen, M.; Lund, M.: Covalent Protein-Polyphenol Bonding as Initial Steps of Haze Formation in Beer. *ASBC*, **2020**, 39, 1–12.
- Kanauchi, M.; Milet, J.; Bamforth, C.: Oxalate and Oxalate Oxidase in Malt. *J. Inst. Brew.*, **2009**, 115 (3), 232–237.
- Kaneda, H.; Kano, Y.; Koshino, S.; Ohya-Nishiguchi, H.: Behavior and role of iron ions in beer deterioration. *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 2102–2107.
- Kaneda, H.; Kano, Y.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Kamada, K.: The Role of Free Radicals in Beer Oxidation. *ASBC*, **1989**, 47 (2), 49–53.
- Kaneda, H.; Kano, Y.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Kamimura, M.: Effect of free radicals on haze formation in beer. *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, 1909–1912.
- Kato, S.; Ueno, T.; Fukuzumi, S.; Watanabe, Y.: Catalase reaction by myoglobin mutants and native catalase: mechanistic investigation by kinetic isotope effect. *The Journal of biological chemistry*, **2004**, 279 (50), 52376–52381.
- Kim, K.; Min, J.-Y.; Dickman, M.: Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **2008**, 21 (5), 605–612.
- Kjeldahl, J.: Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius, Zeitschrift f. anal. Chemie*, **1883**, 22 (1), 366–382.
- Koyama, H.: Purification and characterization of oxalate oxidase from *Pseudomonas* sp. OX-53. *Agric. Biol. Chem.*, **1988**, 52 (3), 743–748.
- Krey, J.; Wilmarth, P.; Shin, J.-B.; Klimek, J.; Sherman, N.; Jeffery, E.; Choi, D.; David, L.; Barr-Gillespie, P.: Accurate Label-Free Protein Quantitation with High- and Low-Resolution Mass Spectrometers. *Journal of proteome research*, **2014**, 13 (2), 1034–1044.
- Kuchel, L.; Brody, A.; Wicker, L.: Oxygen and its reactions in beer. *Packag. Technol. Sci.*, **2006**, 19 (1), 25–32.
- Kunze, U. und Schwedt, G.: Grundlagen der quantitativen Analyse. 6., aktualisierte und erg. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, **2009**.
- Kusche, M.; Geiger, E.: Kinetics of haze formation in beer – turbidity and flavan-3-ols. *BrewingScience - Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **2007**.
- Lane, B.: Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **1994**, 8 (3), 294–301.
- Lardinois, O.; Mestdagh, M.; Rouxhet, P.: Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1996**, 1295 (2), 222–238.
- Leiper, K.; Stewart, G.; McKeown, I.: Beer Polypeptides and Silica Gel Part I. Polypeptides Involved in Haze Formation. *Journal of the Institute of Brewing*, **2003**, 109 (1), 57–72.
- Lindorff-Larsen, K.; Winther, J.: Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Letters*, **2001**, 488 (3), 145–148.
- Livingstone, D.; Hampton, J.; Phipps, P.; Grabau, E.: Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. *Plant Physiol.*, **2005**, 137 (4), 1354–1362.

- Loch-Ahring, S.; Decker, F.; Robbert, S.; Andersson, J.: Chill-haze – Identification and Determination of Haze-active Constituents by HPLC and Mass Spectrometry. *BrewingScience - Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **2008** (Mar./Apr.), 32–48.
- Lopez, M.; Edens, L.: Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2005**, 53 (20), 7944–7949.
- Lu, Q.; Yu, J.; Gao, J.; Yang, W.; Li, Y.: Glow-discharge Electrolysis Plasma Induced Synthesis of Polyvinylpyrrolidone/Acrylic Acid Hydrogel and its Adsorption Properties for Heavy-metal Ions. *Plasma Processes Polym.*, **2011**, 8 (9), 803–814.
- Luck, G.; Liao, H.; Murray, N.; Grimmer, H.; Warminski, E.; Williamson, M.; Lilley, T.; Haslam, E.: Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, **1994**, 37 (2), 357–371.
- Madigan, D.; Byrne, H.; Matthews, S.; Kelly, R.; McEnroe, C.; Harmey, D.: Studies on the Effects of Common Process Variables on the Colloidal Stability of Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **2000**, 58 (4), 160–164.
- Marion, D.; Bakan, B.; Elmorjani, K.: Plant lipid binding proteins: properties and applications. *Biotechnology advances*, **2007**, 25 (2), 195–197.
- Marković, R.; Grujić, O.; Pejin, J.: Conventional and alternative principles for stabilization of protein and polyphenol fractions in beer. *Acta Periodica Technologica (Serbia and Montenegro)*, **2003**, 34, 3–12.
- Maté, M.; Zamocky, M.; Nykyri, L.; Herzog, C.; Alzari, P.; Betzel, C.; Koller, F.; Fita, I.: Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology*, **1999**, 286 (1), 135–149.
- Matsui, T.; Ozaki, S.-i.; Watanabe, Y.: Formation and Catalytic Roles of Compound I in the Hydrogen Peroxide-Dependent Oxidations by His64 Myoglobin Mutants. *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, 121 (43), 9952–9957.
- Matsuyama, M.: Untersuchungen über die Hefekatalase. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University*, **1933**, 32 (4), 109–199.
- Maya, F.; Estela, J.; Cerdà, V.: Multisyringe ion chromatography with chemiluminescence detection for the determination of oxalate in beer and urine samples. *Microchim Acta*, **2011**, 173 (1-2), 33–41.
- McClung, C.R.: Regulation of Catalases in Arabidopsis. *Free Radical Biology and Medicine*, **1997**, 23 (3), 489–496.
- McManus, J.; Davis, K.; Beart, J.; Gaffney, S.; Lilley, T.; Haslam, E.: Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1985** (9), 1429.
- McMurrough, I.; Hennigan, G.: Tanning properties of flavanols in barley and hops measured by reaction with cinchonine sulphate in relation to haze formation in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, **1984**, 90, 24–32.
- McMurrough, I.; Kelly, R.; Byrne, J.; O'Brien, M.: Effect of the Removal of Sensitive Proteins and Proanthocyanidins on the Colloidal Stability of Lager Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **1992**, 50 (2), 67–76.
- McMurrough, I.; Madigan, D.; Kelly, R.: Evaluation of Rapid Colloidal Stabilization with Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **2018**, 55 (2), 38–43.
- McMurrough, I.; Madigan, D.; Kelly, R.; Smyth, M.: The Role of Flavanoid Polyphenols in Beer Stability. *ASBC*, **1996**, 54 (3), 141–148.

- Michael, A.: Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren. *J. Prakt. Chem.*, **1887**, 35 (1), 349–356.
- Miedl, M.; Garcia, M.; Bamforth, C.: Haze formation in model beer systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2005**, 53 (26), 10161–10165.
- Mikyška, A.; Dušek, M.; Slabý, M.: How does fermentation, filtration and stabilization of beer affect polyphenols with health benefits. *KP*, **2019**, 65 (4).
- Mikyška, A.; Hrabák, M.; Hašková, D.; Šrogl, J.: The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability. *Journal of the Institute of Brewing*, **2002**, 108 (1), 78–85.
- Mira, H.; Leite, P.; Catarino, S.; Ricardo-da-Silva, J.; Curvelo-Garcia, A.: Metal reduction in wine using PVI-PVP copolymer and its effects on chemical and sensory characters. *Vitis*, **2007**, 46 (3), 138–147.
- Morales, F.: Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chemistry*, **2005**, 90 (4), 821–827.
- Morgulis, S.: A study of the catalase reaction. *J. Biol. Chem.*, **1921** (47), 341–375.
- Nadzeyka, A.; Altenhofen, U.; Zahn, H.: Zur Bedeutung der Bierproteine für die Kälte- und Dauertrübung. *Brauwissenschaft*, **1979**, 32 (6), 167–172.
- Nagaraj, N.; Wisniewski, J.; Geiger, T.; Cox, J.; Kircher, M.; Kelso, J.; Pääbo, S.; Mann, M.: Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Molecular systems biology*, **2011**, 7, 548.
- Narziß, L., Back, W., Gastl, M. und Zarnkow, M.: Abriss der Bierbrauerei. 8., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2017**.
- Nogueira, L.; Silva, F.; Ferreira, I.; Trugo, L.: Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of chromatography. A*, **2005**, 1065 (2), 207–210.
- Nowakowska, J.: Gene expression and oxalate oxidase activity of two germin isoforms induced by stress. *Acta Physiol Plant*, **1998**, 20 (1), 19–33.
- Okada, Y.; Imure, T.; Takoi, K.; Kaneko, T.; Kihara, M.; Hayashi, K.; Ito, K.; Sato, K.; Takeda, K.: The influence of barley malt protein modification on beer foam stability and their relationship to the barley dimeric alpha-amylase inhibitor-I (BDAl-I) as a possible foam-promoting protein. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56 (4), 1458–1464.
- Oñate-jaén, A.; Bellido-milla, D.; Hernández-artiga, M.: Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. *Food Chemistry*, **2006**, 97 (2), 361–369.
- Pang, Y.; Lan, W.; Huang, X.; Zuo, G.; Liu, H.; Zhang, J.: Inhibition of ferric ion to oxalate oxidase shed light on the substrate binding site. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, **2015**, 28 (5), 861–868.
- Panias, D.; Taxiarchou, M.; Paspaliaris, I.; Kontopoulos, A.: Mechanisms of dissolution of iron oxides in aqueous oxalic acid solutions. *Hydrometallurgy*, **1996**, 42 (2), 257–265.
- Papp, A.; Winnewisser, W.; Geiger, E.; Briem, F.: Influence of (+)-Catechin and Ferulic Acid on Formation of Beer Haze and Their Removal through different Polyvinylpyrrolidone-Types. *J. Inst. Brew.*, **2001**, 107 (1), 55–60.
- Perrocheau, L.; Bakan, B.; Boivin, P.; Marion, D.: Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: relationships with the brewing process. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54 (8), 3108–3113.

- Perrocheau, L.; Rogniaux, H.; Boivin, P.; Marion, D.: Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. *Proteomics*, **2005**, 5 (11), 2849–2858.
- Pignatello, J.; Oliveros, E.; MacKay, A.: Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **2006**, 36 (1), 1–84.
- Pires, E. und Brányik, T.: *Biochemistry of Beer Fermentation*. Heidelberg: Springer-Verlag, **2015**.
- Pöschl, M.: Die kolloidale Stabilität untergäriger Biere - Einflussmöglichkeiten und Vorhersagbarkeit, Dissertation. TU München, München, **2009**.
- PubChem: Chemical and Physical Properties of Hop Bitter Acids: LogP values, XLogP3-AA, computed by XLogP3 (3.0), **2019a**. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, zuletzt aktualisiert am 03.04.2020.
- PubChem: Chemical and Physical Properties of Isoxanthohumol: LogP values, XLogP3-AA (4.1), computed by XLogP3 (3.0), **2019b**. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/513197#section=Computed-Properties>, zuletzt aktualisiert am 03.04.2020.
- PubChem: Chemical and Physical Properties of Xanthohumol: LogP values, XLogP3-AA (5.1), computed by XLogP3 (3.0), **2019c**. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/639665#section=Chemical-and-Physical-Properties>, zuletzt aktualisiert am 03.04.2020.
- Raducan, A.; Cantemir, A.; Puiu, M.; Oancea, D.: Kinetics of hydrogen peroxide decomposition by catalase: hydroxylic solvent effects. *Bioprocess Biosyst Eng*, **2012**, 35 (9), 1523–1530.
- Rakete, S.; Glomb, M.: A novel approach for the quantitation of carbohydrates in mash, wort, and beer with RP-HPLC using 1-naphthylamine for precolumn derivatization. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2013**, 61 (16), 3828–3833.
- Remane, Y.; Reschetilowski, W.: Meilensteine der Chemie 2020. *Nachrichten aus der Chemie*, **2020**, 68 (1), 21.
- Ritchie, M.; Phipson, B.; Di Wu; Hu, Y.; Law, C.; Shi, W.; Smyth, G.: limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research*, **2015**, 43 (7), e47.
- Robinson, L.; Evans, D.; Kaukovirta-Norja, A.; Vilpola, A.; Aldred, P.; Home, S.: The Interaction Between Malt Protein Quality and Brewing Conditions and Their Impact on Beer Colloidal Stability. *MBAA TQ*, **2004**, 41 (4), 353–362.
- Robinson, L.; Juttner, J.; Milligan, A.; Lahnstein, J.; Eglinton, J.; Evans, D.: The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability: Cloning and characterisation of the barley SE protein as a barley trypsin inhibitor of the chloroform/methanol type. *Journal of Cereal Science*, **2007**, 45 (3), 343–352.
- Ruppert, G.; Bauer, R.; Heisler, G.: The photo-Fenton reaction — an effective photochemical wastewater treatment process. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **1993**, 73 (1), 75–78.
- Salamon, A.; Baca, E.; Baranowski, K.; Michałowska, D.: Ocena zawartości składników antyodżywczych w piwie na przykładzie kwasu szczawiowego: The evaluation of anti-nutritive components in beer on the example of oxalic acid. *Rocz Panstw Zakl Hig*, **2012**, 63 (1), 37–42.
- Schäfer, J.; Bunzel, M.: Maturation-related modifications of cell wall structures of kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongyloides*). *Eur Food Res Technol*, **2018**, 244 (5), 893–902.

- Schmidt, C.: Studien zum Einfluss von Proteinzusätzen auf die Geschmacksstoffe von Schwarzteegetränken, Dissertation. TU München, München, **2012**.
- Schulte, F.; Flaschel, E.; Niehaus, K.: Proteome-Based Analysis of Colloidal Instability Enables the Detection of Haze-Active Proteins in Beer. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2016**, *64* (35), 6752–6761.
- Schulz, B.; Phung, T.; Bruschi, M.; Janusz, A.; Stewart, J.; Meehan, J.; Healy, P.; Nouwens, A.; Fox, G.; Vickers, C.: Process Proteomics of Beer Reveals a Dynamic Proteome with Extensive Modifications. *Journal of proteome research*, **2018**, *17* (4), 1647–1653.
- Schwahnhäuser, B.; Busse, D.; Li, N.; Dittmar, G.; Schuchhardt, J.; Wolf, J.; Chen, W.; Selbach, M.: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, **2011**, *473* (7347), 337–342.
- Siebert, K.: Effects of Protein–Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47* (2), 353–362.
- Siebert, K.: Haze formation in beverages. *LWT - Food Science and Technology*, **2006**, *39* (9), 987–994.
- Siebert, K.; Carrasco, A.; Lynn, P.: Formation of Protein–Polyphenol Haze in Beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **1996a**, *44* (8), 1997–2005.
- Siebert, K.; Lynn, P.: Mechanisms of Beer Colloidal Stabilization. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **1997**, *55* (2), 73–78.
- Siebert, K.; Lynn, P.: Comparison of Polyphenol Interactions with Polyvinylpyrrolidone and Haze-Active Protein. *ASBC*, **1998**, *56* (1), 24–31.
- Siebert, K.; Lynn, P.: Effect of Protein-Polyphenol Ratio on the Size of Haze Particles. *ASBC*, **2000**, *58* (3), 117–123.
- Siebert, K.; Lynn, P.: Effects of Alcohol and pH on Protein–Polyphenol Haze Intensity and Particle Size. *ASBC*, **2003**, *61* (2), 88–98.
- Siebert, K.; Stenroos, L.; Reid, D.: Characterization of Amorphous-Particle Haze. *ASBC*, **1981**, *39* (1), 1–11.
- Siebert, K.; Troukhanova, N.; Lynn, P.: Nature of Polyphenol–Protein Interactions. *J. Agric. Food Chem.*, **1996b**, *44* (1), 80–85.
- Simpson, W.: Cambridge prize lecture. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Inst. Brew.*, **1993**, *99* (5), 405–411.
- Simpson, W.; Smith, A.: Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *The Journal of applied bacteriology*, **1992**, *72* (4), 327–334.
- Singh, S.; Mishra, S.; Pundir, C.: Purification and Properties of Oxalate Oxidase from NaCl Stressed Grain Sorghum Seedlings. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, **2006**, *15* (1), 55–57.
- Sommer, S.; Weber, F.; Harbertson, J.: Polyphenol-Protein-Polysaccharide Interactions in the Presence of Carboxymethyl Cellulose (CMC) in Wine-Like Model Systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2019**, *67* (26), 7428–7434.
- Sorensen, S.; Bech, L.; Muldbjerg, M.; Beenfeldt, T.; Breddam, K.: Barley lipid transfer protein1 is involved in beer foam formation. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, **1993**, *30*, 136–145.
- Souci, S., Fachmann, W. und Kraut, H.: Food Composition and Nutrition Tables. 7., revised and completed edition. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **2008**.
- Spreng, S.: Aktivitätsorientierte Identifizierung antioxidativer Schlüsselinhaltsstoffe und deren Wirkung auf die oxidative Stabilität von Bier, Dissertation. TU München, München, **2018**.

- Spreng, S.; Hofmann, T.: Activity-Guided Identification of in Vitro Antioxidants in Beer. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2018**, 66 (3), 720–731.
- Stanislava, G.: A Review: The Role of Barley Seed Pathogenesis-Related Proteins (PRs) in Beer Production. *Journal of the Institute of Brewing*, **2010**, 116 (2), 111–124.
- Steiner, E.; Becker, T.; Gastl, M.: Turbidity and Haze Formation in Beer - Insights and Overview. *Journal of the Institute of Brewing*, **2010**, 116 (4), 360–368.
- Stevens, J.; Taylor, A.; Clawson, J.; Deinzer, M.: Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47 (6), 2421–2428.
- Sugiura, M.; Yamamura, H.; Hirano, K.; Sasaki, M.; Morikawa, M.; Tsuboi, M.: Purification and properties of oxalate oxidase from barley seedlings. *Chem. Pharm. Bull.*, **1979**, 27 (9), 2003–2007.
- Sun, Z.; Yu, X.; Zhang, Y.; Xu, J.; Li, X.: Construction of a comprehensive beer proteome map using sequential filter-aided sample preparation coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of separation science*, **2019**, 42 (17), 2835–2841.
- Takemura, T.; Hanagata, N.; Dubinsky, Z.; Karube, I.: Molecular characterization and response to salt stress of mRNAs encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and catalase from *Bruguiera gymnorhiza*. *Trees*, **2002**, 16 (2-3), 94–99.
- Tapparo, A.; Di Marco, V.; Badocco, D.; D'Aronco, S.; Soldà, L.; Pastore, P.; Mahon, B.; Kalberer, M.; Giorio, C.: Formation of metal-organic ligand complexes affects solubility of metals in airborne particles at an urban site in the Po valley. *Chemosphere*, **2020**, 241, 125025.
- The Brewers of Europe: European Beer Trends: Statistics Report, 2019 Edition. The Brewers of Europe. Brüssel, **2019**. Online verfügbar unter <https://www.brauerbund.de/download/Archiv/PDF/statistiken/191205%20BoE%20-%20EU-beer-statistics-2019.pdf>, zuletzt aktualisiert am 07.02.2020.
- Titze, J.; Christian, M.; Jacob, F.; Parlar, H.; Ilberg, V.: The Possibilities of Particle Analysis Demonstrated by the Measurement of the Colloidal Stability of Filtered Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, **2010**, 116 (4), 405–412.
- Trommler, U.: Einfluss von Huminstoffen auf chemische Reaktionen bei der Reinigung von kontaminierten Wässern, Dissertation. Universität Leipzig, Leipzig, **2007**.
- Tyanova, S.; Temu, T.; Cox, J.: The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols*, **2016**, 11, 2301–2319.
- Uchida, M.; Ono, M.: Determination of Hydrogen Peroxide in Beer and its Role in Beer Oxidation. *ASBC*, **1999**, 57 (4), 145–150.
- Vasquez-Medrano, R.; Prato-Garcia, D.; Vedrenne, M.: Ferrioxalate-Mediated Processes. In: Suresh C. Ameta und Rakshit Ameta (Hg.): *Advanced oxidation processes for wastewater treatment. Emerging green chemical technology*. London, San Diego, CA, Cambridge, MA: AP Academic Press an imprint of Elsevier, 89–113, **2018**.
- Verzele, M. und de Keukeleire, D.: *Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids: Volume 27*. 1st Edition. Burlington: Elsevier Science, **1991**.
- Verzele, M.; Stockx, J.; Fontijn, F.; Anteunis, M.: Xanthohumol, a New Natural Chalkone. *Bull. Soc. Chim. Belges*, **1957**, 66 (1), 452–475.
- Vogt, C.: *Strukturanalytische Studien zu bitteren, antimikrobiellen und schaumstabilisierenden Hopfeninhaltsstoffen und Oxidationsprodukten in Bier*, Dissertation. TU München, München, **2015**.

- VuMA: Ranking der beliebtesten Biersorten in Deutschland (Konsum mindestens mehrmals im Monat) in Deutschland in den Jahren 2016 bis 2019. Statista GmbH, **2019**. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/171623/umfrage/mehrmals-im-monat-konsumierte-biersorten/>, zuletzt aktualisiert am 07.02.2020.
- Walling, C.: Fenton's reagent revisited. *Acc. Chem. Res.*, **1975**, 8 (4), 125–131.
- Weymouth-Wilson, A.: The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Natural product reports*, **1997**, 14 (2), 99–110.
- Wiegand, H.; Orths, C.; Kerpen, K.; Lutze, H.; Schmidt, T.: Investigation of the Iron-Peroxo Complex in the Fenton Reaction: Kinetic Indication, Decay Kinetics, and Hydroxyl Radical Yields. *Environmental science & technology*, **2017**, 51 (24), 14321–14329.
- Wietstock, P.; Kunz, T.; Perreira, F.; Methner, F.-J.: Metal chelation behavior of hop acids in buffered model systems. *BrewingScience - Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **2016**, 69, 56–63.
- Wietstock, P.; Kunz, T.; Waterkamp, H.; Methner, F.-J.: Uptake and Release of Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn during Beer Production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **2018**, 73 (2), 179–184.
- Williams, K.; Fox, P.; Marshall, T.: A comparison of protein assays for the determination of the protein concentration of beer. *J. Inst. Brew.*, **1995**, 101 (5), 365–369.
- Wu, M.; Rogers, P.; Clarke, F.: 125 th Anniversary Review: The role of proteins in beer redox stability. *J. Inst. Brew.*, **2012**, 118 (1), 1–11.
- Yang, J.-I.; Siebert, K.: Development of a Method for Assessing Haze-Active Protein in Beer by Dye Binding. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **2001**, 59 (4), 172–182.
- Ye, L.; Dai, F.; Qiu, L.; Sun, D.; Zhang, G.: Allelic diversity of a beer haze active protein gene in cultivated and Tibetan wild barley and development of allelic specific markers. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2011**, 59 (13), 7218–7223.
- Ye, L.; Huang, L.; Huang, Y.; Wu, D.; Hu, H.; Li, C.; Zhang, G.: Haze activity of different barley trypsin inhibitors of the chloroform/methanol type (BTI-CMe). *Food Chemistry*, **2014**, 165, 175–180.
- Ye, L.; Huang, Y.; Li, M.; Li, C.; Zhang, G.: The chemical components in malt associated with haze formation in beer. *J. Inst. Brew.*, **2016**, 122 (3), 524–529.
- Yetimoğlu, E.; Kahraman, M.; Ercan, Ö.; Akdemir, Z.; Apohan, N.: N-vinylpyrrolidone/acrylic acid/2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid based hydrogels: Synthesis, characterization and their application in the removal of heavy metals. *Reactive and Functional Polymers*, **2007**, 67 (5), 451–460.
- Yildiz, U.; Kemik, O.; Hazer, B.: The removal of heavy metal ions from aqueous solutions by novel pH-sensitive hydrogels. *Journal of hazardous materials*, **2010**, 183 (1-3), 521–532.
- Zhang, Z.; Collinge, D.; Thordal-Christensen, H.: Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *The Plant Journal*, **1995**, 8 (1), 139–145.
- Zhou, F.; Zhang, Z.; Gregersen, P.; Mikkelsen, J.; Neergaard, E. de; Collinge, D.; Thordal-Christensen, H.: Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol.*, **1998**, 117 (1), 33–41.
- Zimmermann, R.; Delius, J.; Friedrichs, J.; Stehl, S.; Hofmann, T.; Hannig, C.; Rehage, M.; Werner, C.; Hannig, M.: Impact of oral astringent stimuli on surface charge and morphology of the protein-rich pellicle at the tooth-saliva interphase. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **2019**, 174, 451–458.
- Zufall, C.; Tyrell, T.: The Influence of Heavy Metal Ions on Beer Flavour Stability. *J. Inst. Brew.*, **2008**, 114 (2), 134–142.

7. Anhang

Die nachfolgende Tabelle umfasst die zur Korrelationsberechnung (siehe 3.3.8.) herangezogenen quantitativen Daten der untersuchten Handelsproben (**Biere 1-24**, siehe 4.1.3.1.). Es wurden Dreifachbestimmungen des Eisengehalts, des Oxalsäuregehalts und der Oxalatoxidaseaktivität (OxOx-Aktivität) durchgeführt (siehe 4.7.4., 4.7.5. und 4.8.3.).

Tabelle 19: Quantitative Daten zur Korrelationsberechnung (siehe 3.3.8.)

Bestimmung:	Eisengehalt [µg/l]			Oxalsäuregehalt [mg/l]			OxOx-Aktivität [µU/µl]		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Bier 1	85	83	87	19,2	18,4	19,0	1,968	1,994	1,812
Bier 2	104	115	113	24,1	21,8	21,9	2,205	2,295	2,276
Bier 3	31	35	33	11,2	12,6	16,6	1,985	1,717	1,804
Bier 4	14	13	14	45,4	46,3	45,6	1,867	1,850	1,863
Bier 5	54	51	57	39,6	41,3	42,4	2,194	2,313	2,164
Bier 6*	20	17	19	28,1	31,7	30,0	1,703	1,732	1,598
Bier 7	81	82	78	19,2	20,7	22,2	1,853	1,664	1,834
Bier 8	38	40	39	22,1	22,5	22,0	2,416	2,468	2,372
Bier 9	48	49	31	19,8	20,2	19,0	2,191	1,893	1,856
Bier 10	18	71	15	27,5	28,3	22,4	1,303	1,253	1,279
Bier 11	42	39	33	6,7	8,1	6,6	2,212	2,227	2,348
Bier 12	92	85	94	27,8	19,4	25,7	2,154	2,517	2,435
Bier 13	67	68	65	40,2	40,5	29,5	2,139	2,284	2,085
Bier 14	42	40	39	19,2	13,8	15,2	1,999	2,313	2,023
Bier 15**	35	35	35	9,0	11,5	18,2	2,023	2,109	2,201
Bier 16	81	74	60	30,1	29,6	23,4	2,396	2,382	2,348
Bier 17	18	18	17	21,5	19,3	20,4	1,561	1,639	1,552
Bier 18	100	101	107	25,3	24,8	19,9	2,245	0,485	2,244
Bier 19	30	36	31	10,0	12,3	11,9	1,937	2,020	1,935
Bier 20	72	73	83	31,1	30,7	33,0	1,968	1,992	1,956
Bier 21	208	47	43	17,8	16,7	17,2	2,070	2,155	2,240
Bier 22	111	111	108	23,3	22,7	22,2	1,890	1,920	2,031
Bier 23	43	43	45	11,2	22,6	24,4	1,780	1,633	1,628
Bier 24	43	175	32	16,6	20,6	21,1	2,676	2,716	2,591

*entspricht Bier **B.A.**; **entspricht Bier **B.B**

Die nachfolgenden Tabellen 20 und 21 umfassen die Trübungsdaten der mittels forcierter Alterung (siehe 4.3.) auf ihre Trübungsstabilität hin untersuchten Handelsproben (**Biere 1-24**, siehe 4.1.3.1.). Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Trübungsverlaufskurven sind in den Abbildungen 9 und 10 unter 3.1. (Seite 30-31) dargestellt.

Tabelle 20: Trübungsdaten der Gesamttrübung über den Forcierungszeitraum der Biere 1-24

Intensität der Gesamttrübung (Trübungsmessung bei 0 °C) zum jeweiligen Zeitpunkt [NTU]											
Forcierungszeit [h]		4	50	98	170	218	266	338	386	434	506
Probe	Bestimmung										
Bier 1	1	2,61	3,35	4,24	7,72	9,93	17,4	22	21	28,7	34,3
	2	2,8	3,42	4,2	7,06	10,7	13,3	20,2	19,4	26,5	33,5
	3	3,15	3,42	4,03	6,76	9,04	11,3	19,4	19,9	25,8	29,6
Bier 2	1	4,06	5,6	6,21	16	22,1	29,2	34,5	36,8	46,1	55,3
	2	4,17	5,94	7,5	17,5	21,1	30,4	39,2	39,4	49	57,5
	3	3,68	5,42	7,39	15,8	19,8	29,9	36	40,4	48,8	57,1
Bier 3	1	1,25	2,4	4,37	14,1	17,3	25,9	41,1	53,7	60,7	69,8
	2	1,63	2,8	4,97	14,9	18,1	23,2	43	49,6	57,2	64,8
	3	1,89	2,91	4,28	13,6	16,8	22,3	42,4	50	60,4	70,8
Bier 4	1	1,02	1,12	1,2	1,38	1,88	2,25	3,89	3,63	4,91	6,46
	2	0,925	1,13	1,13	1,59	1,81	2,11	3,47	3,72	5,27	6,81
	3	1,18	1,08	1,14	1,43	1,85	2,19	3,64	3,61	5,16	6,1
Bier 5	1	2	2,18	2,87	7,02	9,67	13,9	20,7	20,1	24,2	28,3
	2	2,34	2,53	2,91	7,21	10,6	13,2	18,7	18,8	24,2	29,6
	3	1,88	2,16	2,88	6,39	9,35	13,4	17,5	20,6	25	27,4
Bier 6*	1	1,05	1,01	1,27	2,92	3,75	4,72	7,16	7,6	8,97	12,1
	2	1,27	1,09	1,18	2,44	3,16	4,02	6,08	7,25	9,7	11,4
	3	1,45	1,17	1,24	2,32	3,62	3,85	6,6	6,93	9,17	11,4
Bier 7	1	2,89	10,9	20,9	98,4	108	104	129	143	152	164
	2	3,37	9,12	20,1	80,3	90,3	99	125	123	137	152
	3	3,29	11,4	19,8	85,4	99,7	103	135	136	157	164
Bier 8	1	2,47	17	26,2	73,9	102	105	137	151	158	162
	2	3	17,9	27,6	78,1	99,9	106	148	149	158	172
	3	3,68	21,1	31,4	83,5	96,4	110	141	148	164	181
Bier 9	1	2,09	1,81	2,14	4,22	5,69	7,8	13,1	14,5	19	23,3
	2	2,32	2,04	2,41	4,13	6,16	8,04	13	14,9	18,7	22,9
	3	2	1,96	2	3,98	4,92	6,59	11,8	12,2	20,3	23,2
Bier 10	1	5,24	73,6	66,5	84,4	88,9	105	134	136	155	172
	2	5,38	58,2	73,1	91,2	89,9	104	131	137	143	156
	3	7,84	72,2	64,7	84,1	86,9	102	132	137	149	160
Bier 11	1	1,45	7,82	11,3	27,1	34,2	39,3	60,9	75	83,9	92,8
	2	1,44	5,82	10,2	24,3	32,2	38,9	65,4	73,6	84,2	94,8
	3	1,21	8,05	10,9	25,9	35,6	38,2	65,3	74,8	88,2	97,5
Bier 12	1	3,19	3,83	4,37	10,1	15,1	23,2	31,9	34	40,9	50,3
	2	2,34	4,33	4,61	12,5	20,4	24	35,6	48,9	56	65,7
	3	3,5	4,52	5,13	11,1	15,7	23,1	33,9	39,3	52,1	58,8
Bier 13	1	1,38	1,93	1,82	8,29	15,1	20,5	30,2	37,3	45	53,7
	2	1,29	1,68	1,51	8,07	13,6	18,4	33,4	40,3	51,8	63,3
	3	1,11	1,32	1,42	8,28	13	19,3	33,9	38,9	44,9	53
Bier 14	1	1,2	7,64	15,3	44,9	55,9	69,3	84,6	86	96	106
	2	1,47	7,29	13,3	38,6	47,8	58,3	87	84	104	125
	3	2,14	8,5	13,7	36,3	57,5	65,1	85,3	95,4	99,7	103

Bier 15**	1	1,21	2,13	7,78	29,4	39,4	46,8	85,8	89,9	101	114
	2	1,15	2,63	8,64	27,5	37,9	48	72,8	83,1	92,8	106
	3	1,05	2,77	9,55	29,7	45,2	49,1	81,6	82,1	99,9	117
Bier 16	1	3,4	49,7	53,8	72,9	85,5	86	93,5	92	103	107
	2	3,26	58,2	60,4	75,3	81,1	84,2	103	90,7	98,7	102
	3	3,11	48,4	48,8	76,6	86	102	97,3	96,6	101	107
Bier 17	1	1,6	1,7	2,05	5,52	8,01	9,87	15,1	19,1	22,8	26,6
	2	1,79	1,59	2,21	5,05	8,34	10,8	15,1	15,2	18,8	22,5
	3	1,5	2,06	2,43	6,22	8,99	10,5	14,9	16,5	19,3	23,8
Bier 18	1	1,3	1,34	9,52	61,8	90,1	97,8	154	178	183	193
	2	1,22	1,66	10,4	49,4	91,9	107	148	155	170	182
	3	1,24	4,36	18,7	75,5	103	126	136	144	160	173
Bier 19	1	1,56	2,74	4,57	14,1	20,3	28,8	45,2	55	67,9	78,2
	2	1,3	2,59	4,26	12,8	18	25,7	39,9	52,2	63,1	78,3
	3	1,1	2,85	4,71	13,3	20,7	25,9	45,5	53,1	70,2	83,8
Bier 20	1	1	1,45	7,62	46,9	64	81,8	97,5	94,8	110	126
	2	1,55	1,55	7,77	37,6	54,2	61,3	102	99	110	127
	3	1,11	2,94	10,3	43	52	69,4	92,9	89,9	108	127
Bier 21	1	1,27	2,7	4,62	11,9	14,5	17,5	29,3	36	45,8	56,3
	2	1,35	2,61	4,54	9,81	14	17,2	25,6	30,9	37,1	43,3
	3	1,69	2,77	4,3	10,6	13,1	18,9	23,3	30,2	34,4	38,6
Bier 22	1	1,22	3,32	9,4	34	60	73,3	104	111	126	137
	2	1,23	3,78	11,3	39	68,4	74,9	111	114	124	136
	3	1,13	4,16	13,9	49,1	73,2	86	119	123	146	166
Bier 23	1	1,99	19,5	23	52,2	70,7	76,9	109	110	120	132
	2	1,89	17,1	20,8	48,5	60,2	69,7	103	112	126	134
	3	2,03	16,3	22,7	51,2	54,6	68,1	97,5	101	111	129
Bier 24	1	1,24	3,77	10,1	27,3	57,3	91,9	120	126	148	169
	2	2,43	4,53	12,1	43,9	94,7	105	145	146	165	179
	3	1,36	4,22	10,2	34	76	95,3	134	134	150	164

*entspricht Bier **B.A**; **entspricht Bier **B.B**

Tabelle 21: Trübungsdaten der Dauertrübung über den Forcierungszeitraum der Biere 1-24

Intensität der Dauertrübung (Trübungsmessung bei 25 °C) zum jeweiligen Zeitpunkt [NTU]											
Forcierungszeit [h]		2	48	96	168	216	264	336	384	432	504
Probe	Bestimmung										
Bier 1	1	2,38	2,98	3,13	3,81	4,41	5,25	6,6	7,38	8,79	10,2
	2	2,61	2,8	2,99	3,77	4,32	4,94	6,33	7,5	8,13	9,17
	3	3,02	2,67	2,95	3,62	4,32	4,7	6,06	6,87	7,74	9,02
Bier 2	1	3,6	4,21	4,4	5,78	7,19	8,08	10,9	12,1	13,2	15,6
	2	4	4,12	4,4	5,93	7,42	8,24	10,7	12,8	13,1	14,5
	3	3,8	4	4,34	5,82	7,02	7,97	9,88	12,2	13,2	14,9
Bier 3	1	1,26	1,36	1,51	1,63	2,13	2,59	5,47	11	11,1	16,4
	2	1,49	1,62	1,59	1,86	2,52	2,48	5,09	9,45	8,37	15,6
	3	1,71	1,41	1,27	1,58	2,21	2,45	4,75	9,04	8,72	14,5
Bier 4	1	1,04	1,08	1,1	1,08	1,46	1,18	1,23	1,3	1,3	1,28
	2	1,08	1,11	1,04	1,07	1,15	1,16	1,05	1,32	1,29	1,38
	3	1,08	1,13	1,03	1,02	1,23	1,2	1,27	1,53	1,31	1,67
Bier 5	1	1,83	1,97	2,12	2,52	3,27	3,63	4,24	5	5,27	5,45
	2	2,13	1,98	2,36	2,82	3,25	3,39	3,92	4,83	5,32	4,79
	3	1,8	1,94	1,97	2,48	2,89	3,29	4,06	4,77	4,98	5,58
Bier 6*	1	0,958	0,939	1,04	1,24	1,25	1,26	1,47	1,72	1,8	1,82
	2	1,03	1,06	1,03	1,12	1,21	1,33	1,38	1,65	1,76	1,96
	3	1,39	1,14	1,06	1,16	1,19	1,24	1,33	1,44	1,59	1,66
Bier 7	1	1,05	1,21	1,01	20,6	34,5	44,7	60,5	73,7	86,4	83,8
	2	0,924	1	1,15	16,2	27,1	35,3	55,6	67,9	66,5	82,4
	3	0,927	1,11	1,25	20,6	29,5	37,6	54,7	72,1	82,1	90,2
Bier 8	1	1,05	1,13	1,19	2,93	8,01	8,65	25,6	37,5	37,5	44,6
	2	0,885	0,994	1,11	3,28	7,11	8,62	24,6	39,8	39,4	47,7
	3	0,95	0,928	1,22	5,38	10,3	11,8	32,9	45,2	50,9	60,2
Bier 9	1	2,09	1,77	1,71	1,85	2,25	2,23	2,69	3,71	4,28	5,11
	2	2,11	1,91	1,82	1,95	2,22	2,46	2,95	3,82	4,79	5,34
	3	1,91	1,81	1,61	1,77	1,91	2,14	2,53	3,34	3,76	4,48
Bier 10	1	4,23	4,35	4,7	6,56	8,77	8,72	15,6	23,4	22,3	28,3
	2	4,89	4,64	4,61	6,08	7,96	8,42	13,2	20,5	21,6	27,7
	3	4,22	4,17	4,69	6,42	8,1	9,44	15,9	24,3	21,7	29,2
Bier 11	1	1,32	1,19	1,32	1,76	2,6	3,36	7,55	12,6	12,6	17
	2	1,31	1,27	1,37	1,65	2,48	3,33	7,58	10,6	9,57	18,4
	3	1,29	1,28	1,35	1,79	2,78	3,19	6,61	12	11,7	17,3
Bier 12	1	2,89	3,21	3,68	5,47	7,47	9,33	11,8	14,6	15,3	18,1
	2	2,95	3,23	3,85	5,94	7,98	9,26	13,2	16	17,7	21,1
	3	3,16	3,53	3,86	5,19	7,42	9,12	12	12,9	15,7	18,6
Bier 13	1	1,17	1,17	1,27	1,4	1,54	2,12	3,24	6,24	5,44	9,02
	2	1,17	1,22	1,26	1,45	1,74	2,19	2,8	6,08	5,16	8,02
	3	1,01	1,27	1,17	1,27	1,59	1,71	2,91	5,57	5,45	7,52
Bier 14	1	1,07	1,26	1,31	3,71	8,46	11	25,2	37	37,7	40,4
	2	1,34	1,14	1,27	2,11	5,29	7,74	21,3	34,4	34,4	45,7
	3	1,2	1,32	1,28	2,55	5,36	7,77	22,9	27,5	27	41,7
Bier 15**	1	1,15	1,18	1,11	1,6	3	3,82	12,6	23,8	23,2	33,3
	2	1,01	1,13	1,23	1,6	2,94	3,75	9,39	19,4	17,2	27,2
	3	1,06	1,16	1,16	1,63	2,77	3,75	12,2	23	21,2	32,4
Bier 16	1	2,51	2,57	2,93	6,06	7,3	6,19	12,5	18,3	17,2	18,8
	2	2,51	2,53	2,88	6,01	8,14	6,9	14,4	20,5	17,3	20,6
	3	2,47	2,75	3,26	6,18	7,67	7,54	13,6	19,5	17,5	21,7
Bier 17	1	1,5	1,57	1,74	1,73	3,29	2,03	2,15	2,76	3,03	3,49
	2	1,63	1,52	1,58	1,74	1,89	2,17	2,42	2,76	3	3,25
	3	1,77	2,19	1,81	2,06	2,19	2,41	2,74	2,98	3,21	3,67

Bier 18	1	1,15	1,07	1,1	4,13	14,6	20,2	50,3	70,3	73,3	82,9
	2	1,11	1,13	1,18	2,73	9,74	17	41,2	65,7	60,4	74,9
	3	1,13	1,26	1,32	10,5	21,1	30,3	52,5	68,3	66,1	77,8
Bier 19	1	1,38	1,31	1,38	1,91	2,91	3,83	7,63	13,4	14,3	21,2
	2	1,15	1,14	1,37	1,67	2,56	3,54	6,34	11	13	20
	3	1,14	1,14	1,12	1,5	2,22	2,94	6,1	11,5	13,5	21,3
Bier 20	1	1,05	1,16	1,39	7,84	16,5	20,1	38,5	47,2	49,8	60,8
	2	1,33	1,03	1,06	3,46	8,93	14,1	32,1	45,2	45,3	57,8
	3	1,01	1,78	1,13	7,62	14,7	18	36,3	46,1	47,4	62,4
Bier 21	1	1,16	1,06	1,15	1,37	1,66	1,76	2,95	5,35	4,62	8,64
	2	1,23	1,06	1,18	1,21	1,77	1,59	2,01	3,69	3,57	6,05
	3	1,37	2,28	1,16	1,21	1,46	1,65	2,2	3,89	3,55	6,68
Bier 22	1	1,1	1,38	1,11	2,37	8,08	10,5	24	35,4	38,9	47,5
	2	1,12	1,21	1,25	3,69	9,81	14,1	29,9	42,3	43,3	55,4
	3	1,06	2,58	1,42	6,32	14,9	20,6	38,7	51,3	50,4	62,5
Bier 23	1	1,42	1,27	1,45	5,55	11,9	14,4	32,3	42,5	44,7	45,7
	2	1,32	1,59	1,53	3,15	6,05	9,35	23,5	35,8	36,3	49,2
	3	1,41	1,18	1,43	2,48	4,94	8,34	21,7	32,6	35,8	48,7
Bier 24	1	1,13	1,03	1,01	1,83	3,38	5,96	16,9	27,7	29,3	44,1
	2	1,22	1,53	1,2	2,24	6,6	11,2	28,2	42,5	44,2	60,5
	3	1,05	1,04	1,14	1,71	4,26	6,96	18,1	30,5	33,2	46,5

*entspricht Bier **B.A.**; **entspricht Bier **B.B**