

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I der
Technischen Universität München

**Bedeutung rohstoffbedingter Inhaltsstoffe und
produktionstechnologischer Einflüsse auf die
Trübungsproblematik im Bier**

Klaus Hartmann

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

**Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

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

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Werner Back
2. apl. Prof. Dr. rer. nat., Dr.-Ing. habil. Angelika Görg

Die Dissertation wurde am 02. 08. 2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11. 10. 2006 angenommen.

Danksagung

Die Arbeit wurde von Mitte 2001 bis Mitte 2006 am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I unter der Betreuung meines Doktorvaters Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Back ausgearbeitet. Ihm gilt mein besonderer Dank für das Vertrauen, mit dem er mir dieses interessante Thema überlassen hat.

Für die finanzielle Förderung der Arbeit bedanke ich mich bei der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München e. V.

Bei Frau Prof. Görg und Herrn Prof. Langowski bedanke ich mich dafür, dass sie sich als Prüfer und Vorsitzenden zur Verfügung gestellt haben.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Dipl.-Ing. (FH) Martin Zarnkow und Dr.-Ing. Stefan Kreis für die fachliche Unterstützung, ohne die das Gelingen der Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Lehrstuhls, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Besonders erwähnen möchte ich hier meine Mitarbeiter im Malzlabor Daria Kraus und Saskia Marks, die mich durch ihre selbständige Arbeit bei der Laborroutine entlastet haben.

Meinen Korrekturlesern Georg Hartmann, Beate Scheipl, Julia Bader und Martin Zarnkow sei nochmals gedankt.

Natürlich darf meine Familie nicht unerwähnt bleiben. Ohne ihre Unterstützung wäre das Studium und diese Arbeit gar nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
2 Grundlagen und Kenntnisstand	3
2.1 Definition Filtrierbarkeit.....	3
2.2 Definition Trübung, kolloidale Trübung und Partikeln	4
2.3 Trübungsmessung.....	5
2.4 Trübungsursachen	7
2.5 Identifizierung der Trübungen.....	17
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Trübungsmessung.....	18
3.2 Gepufferter photometrischer Jodwert	18
3.3 Modifizierter photometrischer Jodwert.....	18
3.4 Gelpermeationschromatographie	19
3.5 Maischverfahren.....	20
3.5.1 Eyben-Verfahren	20
3.5.2 Hoch-Kurz-Verfahren	20
3.6 Gelelektrophorese	20
3.7 Hefezellaufschluss	21
3.8 Enzymatische Trübungsidentifizierung.....	21
3.8.1 Enzyme	21
3.8.2 Methodenbeschreibung.....	22
3.9 Mikroskopische Trübungsidentifizierung.....	22
3.9.1 Mikroskopische Verfahren.....	22
3.9.1.1 Durchlicht	22
3.9.1.2 Auflicht	23
3.9.1.3 Polarisierung	23
3.9.1.4 Fluoreszenz.....	23
3.9.1.5 Stereomikroskopie	23
3.9.2 Probenaufbereitung für die mikroskopische Identifizierung	23

3.9.2.1	Zentrifugieren	23
3.9.2.2	Membranfiltration	24
3.9.3	Färbeverfahren.....	24
4	Ergebnisse und Diskussion	26
4.1	Enzymatische Trübungsidentifizierung.....	26
4.1.1	Zumischversuche im Labormaßstab	26
4.1.1.1	α-Glucane	26
4.1.1.1.1	Stärke	26
4.1.1.1.2	Amylose	27
4.1.1.1.3	Amylopectin	28
4.1.1.1.4	Glycogen.....	28
4.1.1.2	Eiweiß	29
4.1.1.3	β-Glucan	30
4.1.1.4	Arabinoxylan	30
4.1.1.5	Mannan	31
4.1.2	Untersuchung von Praxisproben	31
4.1.2.1	β-Glucantrübung	32
4.1.2.2	α-Glucantrübung	33
4.1.2.3	Eiweißtrübung.....	34
4.1.2.4	Arabinoxylan- und Mannantrübung.....	35
4.2	Ursachenfindung in der Praxis	35
4.2.1	α-Glucantrübung	35
4.2.1.1	Modifizierter photometrischer Jodwert	35
4.2.1.1.1	Amylose	36
4.2.1.1.2	Amylopectin	37
4.2.1.1.3	Glycogen.....	38
4.2.1.1.4	Gewinnung von Hefeglycogen durch Hefezellaufschluss	39
4.2.1.1.5	Würze mit α-Glucantrübung.....	40
4.2.1.1.6	Bier mit α-Glucantrübung.....	42
4.2.1.1.7	Bier mit Glycogentrübung.....	43
4.2.1.2	Gelpermeationschromatographie.....	44
4.2.1.2.1	Hefezellaufschluss.....	45
4.2.1.2.2	Laborwürzen und -biere	46
4.2.1.2.3	Praxisproben.....	52

4.2.1.2.4	Standardbier ohne Trübung	52
4.2.1.2.5	Bier mit α -Glucantrübung	53
4.2.1.2.6	Bier mit Glycogentrübung.....	55
4.2.1.3	Stufenkontrolle bei α -Glucantrübungen.....	56
4.2.2	Eiweißtrübungen	60
4.2.2.1	Proteine aus dem Malz	62
4.2.2.2	Proteine aus der Hefe	69
4.2.3	β -Glucan.....	72
4.3	Mikroskopische Trübungsidentifizierung.....	72
4.3.1	Direktes Mikroskopieren der Probe	73
4.3.1.1	Organische Stoffe	73
4.3.1.1.1	Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen.....	74
4.3.1.1.2	Stärke	78
4.3.1.1.3	Hopfenharze	82
4.3.1.1.4	Kalziumoxalatkristalle	84
4.3.1.1.5	β -Glucangel	88
4.3.1.1.6	Partikeln in eingefrorenem Bier.....	93
4.3.1.1.7	Partikeln in alkoholfreiem Bier.....	94
4.3.1.2	Technische Hilfsmittel	94
4.3.1.2.1	Kieselgur.....	95
4.3.1.2.2	Perlite.....	96
4.3.1.2.3	Kieselgel	97
4.3.1.2.4	PVPP	98
4.3.1.2.5	Fasern aus Filterschichten.....	102
4.3.1.3	Fremdstoffe.....	105
4.3.1.3.1	Etikettenreste.....	105
4.3.1.3.2	Aluminiumreste	107
4.3.1.3.3	Rost	108
4.3.2	Möglichkeiten der Membranfiltrationsmethode.....	109
4.3.2.1	Stufenkontrolle der einzelnen Filtrationsschritte.....	110
4.3.2.1.1	Kieselgurfilter	113
4.3.2.1.2	PVPP-Filter	114
4.3.2.1.3	Trap-Filter	114
4.3.2.1.4	Schichtenfilter	115

4.3.2.2	Kontrolle der Flaschenwaschmaschine.....	118
4.3.2.3	Kontrolle des abgefüllten Bieres.....	118
5	Zusammenfassung.....	119
6	Literaturverzeichnis	121
7	Anhang.....	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abbau einer β -Glucantrübung.....	32
Abbildung 2: Abbau einer α -Glucantrübung.....	33
Abbildung 3: Abbau einer Eiweißtrübung.....	34
Abbildung 4: Jodfärbung von Amylose	37
Abbildung 5: Jodfärbung von Amylopectin.....	38
Abbildung 6: Jodfärbung von Glycogen aus Austern.....	39
Abbildung 7: Jodfärbung von Glycogen aus dem Hefezellaufschluss.....	40
Abbildung 8: Jodfärbung einer Würze mit α -Glucantrübung	41
Abbildung 9: Jodfärbung eines Bieres mit α -Glucantrübung.....	42
Abbildung 10: Jodfärbung eines Bieres mit Glycogentrübung	43
Abbildung 11: Jodfärbung der GPC-Fractionen des Glycogens aus dem Hefezellaufschluss.....	45
Abbildung 12: Jodfärbung der GPC-Fraktion 4 und 5 des Glycogens aus dem Hefezellaufschluss.....	46
Abbildung 13: Modifizierte Jodwerte des Glycogenversuches.....	48
Abbildung 14: Jodfärbung der GPC-Fractionen der Würze	49
Abbildung 15: Jodfärbung der GPC-Fractionen des Bieres der 1. Führung.....	49
Abbildung 16: Jodfärbung der GPC-Fractionen des Bieres der 2. Führung.....	50
Abbildung 17: Jodfärbung der GPC-Fractionen des Bieres der 3. Führung.....	50
Abbildung 18: Modifizierter Jodwert der 4. und 16. Fraktion des Bieres der 2. Führung	51
Abbildung 19: Jodfärbung der GPC-Fractionen eines Bieres ohne Trübung	52
Abbildung 20: Jodfärbung der GPC-Fractionen 2, 12 und 16	53
Abbildung 21: Jodfärbung der GPC-Fractionen eines Bieres mit α -Glucantrübung..	54
Abbildung 22: Jodfärbung der GPC-Fractionen 4 und 20	54
Abbildung 23: Jodfärbung der GPC-Fractionen eines Bieres mit Glycogentrübung .	55
Abbildung 24: Jodfärbung der GPC-Fractionen 4 und 19	56
Abbildung 25: Heißtrub, gefärbt mit Jod	59
Abbildung 26: Auftrennungen der verwendeten Proteinstandards 1 (ST1) und 2 (ST2)	62
Abbildung 27: Molekülgrößenverteilung der Gerstensorten A und B aus den Kaltauszügen der Gersten (1 und 2) und der Malze (3 und 4).....	63

Abbildung 28: Molekülgrößenverteilung der Gerstensorte A nach dem Maischen (Probe 1: Eybenverfahren; Probe 2: Hoch-Kurz-Verfahren) und Kochen (Probe 3: Eyben; Probe 4: Hoch-Kurz-Verfahren).....	64
Abbildung 29: Molekülgrößenverteilung der Gerstensorte B nach dem Maischen (Probe 1: Eybenverfahren; Probe 2: Hoch-Kurz-Verfahren) und Kochen (Probe 3: Eybenverfahren; Probe 4: Hoch-Kurz-Verfahren).....	65
Abbildung 30: Molekülgrößenverteilung mit Ethanol und Säure versetzter Würzen (Probe 1: Eybenverfahren; Probe 2: Hoch-Kurz-Verfahren) und der Biere (Probe 3: Eybenverfahren; Probe 4: Hoch-Kurz-Verfahren) der Gerstensorte A.....	66
Abbildung 31: Molekülgrößenverteilung mit Ethanol und Säure versetzter Würzen (Probe 1: Eybenverfahren; Probe 2: Hoch-Kurz-Verfahren) und der Biere (Probe 3: Eybenverfahren; Probe 4: Hoch-Kurz-Verfahren) der Gerstensorte B.....	66
Abbildung 32: Molekülgrößenverteilung eines Bieres ohne Trübung (Probe 1).....	67
Abbildung 33: Molekülgrößenverteilung zweier Biere mit Eiweißtrübung (Probe 1 und 2)	68
Abbildung 34: Änderung der Molekülgrößen nach der enzymatischen Trübungsidentifizierung; Nullprobe (Probe 1), Nullprobe temperiert auf 40 °C (Probe 2), nach Pepsinabbau (Probe 3)	69
Abbildung 35: Molekülgrößenverteilung eines Hefebieres (Probe 1) im Vergleich zu einem nicht trüben Bier (Probe 2).....	70
Abbildung 36: Molekülgrößenverteilung eines Heferestebieres (Probe 1) im Vergleich zu einem Hefelysat (Probe 2)	71
Abbildung 37: Vergleich der Enzymreaktionen auf Hefelysat	71
Abbildung 38: Verschieden große Eiweiß-Gerbstoff-Partikeln.....	74
Abbildung 39: Eiweißpartikeln (1) durch KOH aufgelöst (2).....	75
Abbildung 40: Eiweißpartikel gefärbt mit Eosin Yellow	76
Abbildung 41: Eiweiß-Gerbstoff-Polysaccharid-Teilchen gefärbt mit Thionin	77
Abbildung 42: Eiweiß-Gerbstoff-Partikel gefärbt mit Methylenblau	77
Abbildung 43: Stärkekorn im Durchlichtverfahren (links), Stärkekorn im polarisierten Licht (rechts).....	78
Abbildung 44: Gequollenes Stärkekorn im Durchlicht.....	79
Abbildung 45: Gequollenes Stärkekorn, gefärbt mit Jod.....	79
Abbildung 46: Stärkekörner, gekocht in dest. Wasser, ungefärbt	80
Abbildung 47: Stärkekörner, gekocht in dest. Wasser, gefärbt mit Jod.....	81

Abbildung 48: Stärkekörner, gekocht in Würze, ungefärbt.....	81
Abbildung 49: Stärkekörner, gekocht in Würze, gefärbt mit Jod	82
Abbildung 50: Partikeln mit Hopfenharzen aus einer Praxisprobe	83
Abbildung 51: Kristallartige Hopfenharze in Hopfenextrakt.....	83
Abbildung 52: Kalziumoxalatdihydratkristalle neben Hefezellen	85
Abbildung 53: Kalziumoxalatmonohydratkristall in Sternform (links), Kalziumoxalatmonohydratkristall in Rechteckform (rechts)	86
Abbildung 54: Kalziumoxalatmonohydratkristalle im polarisierten Licht.....	86
Abbildung 55: Untypische Form von Kalziumoxalatkristallen.....	87
Abbildung 56: Untypische Form von Kalziumoxalatkristallen.....	88
Abbildung 57: Schrotpartikeln angefärbt mit Calcofluor unter UV-Licht	89
Abbildung 58: β -Glucangel, ungefärbt mit Durchlicht mikroskopiert	90
Abbildung 59: β -Glucangel, gefärbt mit Calcoluor mit UV-Licht mikroskopiert.....	90
Abbildung 60: Zellwandbestandteil, gefärbt mit Konorot unter UV-Licht	91
Abbildung 61: β -Glucangel, gefärbt mit Kongorot mit Durchlicht	92
Abbildung 62: β -Glucangel, gefärbt mit Kongorot unter UV-Licht	92
Abbildung 63: Partikeln in eingefrorenem Bier; 1: Stärkekorn, 2: Kalziumoxalat, 3: nicht identifiziert, 4: β -Glucangel.....	93
Abbildung 64: Beispiele von verschiedenen Kieselgurformen	95
Abbildung 65: Perliteteilchen, durchzogen mit der charakteristischen Ader	96
Abbildung 66: Kieselgelpartikeln in verschiedenen Größen und Formen	97
Abbildung 67: Große PVPP-Partikeln	98
Abbildung 68: PVPP-Partikeln ungefärbt, aufgenommen mit einem Stereomikroskop	99
Abbildung 69: PVPP-Partikeln gefärbt mit Jod, aufgenommen mit einem Stereomikroskop.....	99
Abbildung 70: PVPP-Partikeln, gefärbt mit Jod	100
Abbildung 71: Kleines PVPP-Teilchen, gefärbt mit Jod	101
Abbildung 72: PVPP-Partikeln, gefärbt mit einer Jod-Immersionsoil-Lösung	102
Abbildung 73: Cellulosefaser in Durchlicht (links) und mit polarisiertem Licht (rechts)	103
Abbildung 74: Faser im Durchlichtverfahren (links), mit Fluoreszenz (rechts)	104
Abbildung 75: Intakte Faser aus einem Etikett	105
Abbildung 76: Lackreste von Etiketten in verschiedenen Farben	106

Abbildung 77: Lackrest ohne Farblackierung.....	107
Abbildung 78: Aluminiumteilchen, links mit Durchlicht, rechts mit Auflicht.....	108
Abbildung 79: Rostpartikeln	109
Abbildung 80: Ausschnitt aus einer Membran, durchsichtig durch Immersionsöl ...	110
Abbildung 81: Trübung verursacht durch Kieselgur in dest. Wasser, Messwinkel 25° im Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mg.....	111
Abbildung 82: Trübung verursacht durch Kieselgur in dest. Wasser, Messwinkel 25° im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mg.....	111
Abbildung 83: Trübung verursacht durch PVPP in dest. Wasser, Messwinkel 25°im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mg.....	112
Abbildung 84 (links): Klarsichtflasche versetzt mit 4 mg/l Kieselgur in dest. Wasser (Bodensatz und weiße Partikeln in Schwebe)	112
Abbildung 85 (rechts): Klarsichtflasche gefüllt mit dest. Wasser (keine Partikeln sichtbar).....	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentrationen der Farbstoffe.....	25
Tabelle 2: Trübungszunahme durch verkleisterte Stärke.....	27
Tabelle 3: Trübungsabbau von verkleisterter Stärke	27
Tabelle 4: Trübungszunahme durch Amylose	27
Tabelle 5: Trübungszunahme durch Amylopectin.....	28
Tabelle 6: Trübungszunahme durch Glycogen	28
Tabelle 7: Trübungszunahme durch Casein	29
Tabelle 8: Trübungszunahme durch Albumin	29
Tabelle 9: Trübungsabnahme von Casein durch das Enzym Pepsin.....	29
Tabelle 10: Trübungsabnahme von Albumin durch das Enzym Pepsin.....	30
Tabelle 11: Trübungszunahme durch β -Glucan.....	30
Tabelle 12: Trübungszunahme durch Mannan	31
Tabelle 13: Ausgewählte Enzyme für den Praxiseinsatz	31
Tabelle 14: Trübungsabnahmen durch Amyloglucosidase in Würze und Bier.....	47
Tabelle 15: Photometrische Jodwerte der Würze und der Biere.....	47
Tabelle 16: Photometrische Jodwerte der Proben der Stufenkontrolle.....	60
Tabelle 17: Molekülgrößen der verwendeten Proteinstandards.....	61
Tabelle 18: Veränderung der Trübung von Heferestbier versetzt mit Stabilisierungsmitteln vor und nach Erhitzung.....	70
Tabelle 19: Löslichkeitsprodukte gemessen in verschiedenen Biersorten.....	84
Tabelle 20: Anzahl an Filterhilfsmittelpartikeln nach den einzelnen Filtrationsschritten	116
Tabelle 21: Maximaler Partikelndurchmesser der Filterhilfsmittel nach den einzelnen Filtrationsschritten	117

Abkürzungsverzeichnis

dest.: destilliert

GPC: Gelpermeationschromatographie

KG: Kieselgur

PVPP: Polyvinylpolypyrrolidon

SDS-PAGE: Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

1 Einleitung

Bier kommt normalerweise als filtriertes Getränk auf den Markt. Es gibt nur einen gewissen Anteil an nicht filtrierten Bieren, wie Weißbier oder Kellerbier. Aus diesem Grund ist die Glanzfeinheit des Bieres ein wichtiger Qualitätsparameter. Trübungen können verschiedene Formen annehmen, von Opaleszenz bis zu einzelnen schwimmenden Partikeln und Bodensatz. Große, mit dem Auge sichtbare Partikeln sehen wie Verunreinigungen aus. Bei Opaleszenz wird meist eine mikrobielle Kontamination vermutet. Dies bedeutet aber, dass Biere mit Opaleszenzen oder sichtbaren Partikeln für den Verbraucher als verdorben gelten und reklamiert werden. Durch die zahlreichen Lebensmittelskandale ist der Verbraucher vorsichtiger geworden, auch wenn es sich hier eigentlich nur um „Schönheitsfehler“ handelt, die durch Inhaltsstoffe des Bieres verursacht werden und nicht gesundheitsschädlich sind. Die betroffene Brauerei verliert dadurch sehr schnell das Ansehen. Ein einmaliges Auftreten wird eventuell noch hingegenommen. Hält das Problem jedoch an, wird das Bier keinen Absatz mehr finden. Für die verantwortlichen Personen in der Brauerei bedeutet dies in vielen Fällen den Verlust des Arbeitsplatzes.

Trübungen können verschiedene Ursachen haben: Bierschädliche Mikroorganismen können sich in Bier vermehren und zu Opaleszenz führen, wobei zusätzlich Geschmacksfehler auftreten können. Durch unsachgemäße Lagerung des Bieres, wie zum Beispiel abwechselndes Erwärmen und Abkühlen, fallen Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen aus und bilden nebelartigen Bodensatz. Diese Probleme können in der Brauerei vor der Auslieferung meist nicht erkannt werden, da sich die Trübung und der Bodensatz erst später ausbilden.

Es gibt aber auch Produktionschargen, die durch die Filtration nicht glanzfein werden. Die trübungsverursachenden Stoffe sind so klein, dass sie durch den Filter hindurchgehen.

In wenigen Fällen ist es möglich, dass bereits einzelne Partikeln in der Flasche sichtbar sind, bevor das Bier die Brauerei verlässt.

Für die Qualitätssicherung ist die Ursachenfindung nicht sehr einfach. Die Ursachen der Trübungen liegen meist in der Beschaffenheit der Rohstoffe kombiniert mit der angewandten Technologie. Die Trübungen werden aber erst am Ende der Produktionskette, der Filtration festgestellt. Der Beginn der Produktion liegt aber

mehrere Wochen zurück, wodurch die Nachvollziehbarkeit erschwert wird. Da während des gesamten Bierbereitungsprozesses die Inhaltsstoffe komplexen Veränderungen unterworfen sind, gibt es keinen Test für die Trübungsneigung des Bieres vor der Filtration. Hinzu kommt, dass bereits weitere Chargen eingebracht sind, die ebenso die Trübung aufweisen können. Es wäre sogar möglich, dass die Brauerei in Lieferschwierigkeiten gerät, wenn das Problem nicht schnellstens behoben wird.

Es ist notwendig, den trübungsverursachenden Stoff zu identifizieren. Erst mit diesem Wissen wird es möglich, an richtiger Stelle in den Produktionsprozess einzugreifen und technologische Einflussgrößen zu finden, die die Trübung im Vorfeld nicht entstehen lassen.

Diese Arbeit befasst sich sowohl mit Methoden zur Identifizierung von Trübungen, die direkt nach der Filtration gemessen werden können als auch mit Trübungen, die noch bis zur Auslieferung des Bieres in der Brauerei entstehen können. Zusätzlich werden analytische Möglichkeiten beschrieben, die aufzeigen, durch welche Produktionsfehler die Trübungen entstehen können.

2 Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Definition Filtrierbarkeit

Die Filtration hat die Aufgabe, das trübe Lagerbier klar zu machen. Je nach Beschaffenheit des Unfiltrates ist die Effizienz der Filtration besser oder schlechter. Wird von Problemen in der Filtration oder von der Filtrierbarkeit des Bieres gesprochen, ist normalerweise der Druckanstieg am Filtereinlauf gemeint. Das eigentliche Ziel, die Glanzfeinheit des Bieres sicherzustellen, wird hierbei meist nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde die Definition Filtrierbarkeit um das Problem Trübung erweitert:

„Die Filtrierbarkeit von Bier ist die Eigenschaft des Bieres, auf Grund seiner stofflichen Zusammensetzung die Qualität der Filtration zu beeinflussen. Als Qualitätsparameter gelten dabei der Druckanstieg am Filtereinlauf sowie die Trübung am Filterauslauf.“¹

Die Trübung ist der zentrale Qualitätsparameter der Filtration, der über die Freigabe des Produktes an den Kunden entscheidet. Für die Freigabe werden Grenzwerte festgelegt, die je nach Brauerei verschieden sein können. Ungefähre Richtwerte liegen bei der 90°-Seitwärtsstreuung zwischen 0,5 und 1,0 EBC und bei der Vorwärtsstreuung bei 0,2 EBC. Es wird versucht, diese Werte durch die Bedingungen bei der Filtration (Mischung der Kieselguranschwemmung, -dosage und Einsatz von Filterhilfsmitteln) zu erreichen. Um die Trübung am Filterauslauf zu verringern, kann feinere Kieselgur in der Voranschwemmung und Dosage verwendet werden. Dadurch kommt es jedoch zu einem schnelleren Druckanstieg am Filtereinlauf, und die Filterstandzeit wird verringert. Dies bedeutet also, dass die Trübung am Filterauslauf und der Druckanstieg am Filtereinlauf stark miteinander verknüpft sind.

Eine Vorhersagbarkeit für die Höhe der Trübungswerte nach der Filtration, wie sie für den Druckanstieg am Filtereinlauf möglich ist, gibt es nicht. Während des

¹ Kreis, S.: *Der Einfluss von Polysacchariden aus Malz, Hefe und Bakterien auf die Filtrierbarkeit von Würze und Bier*. Freising, Technische Universität München, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Doktorarbeit, 2003

Bierbereitungsprozesses (zum Beispiel Würzekochung, Gärung und Lagerung) verändert sich das Produkt sehr stark. Die trübungsrelevanten Stoffe werden zum Teil ausgeschieden oder erst gebildet, wodurch eine Vorhersage der Trübungswerte nicht möglich ist. Die endgültige Trübung wird erst bei der Filtration festgestellt. Ein Gegensteuern ist zu diesem Zeitpunkt kaum möglich, da sich einige Trübungen durch die Filtration nicht beseitigen lassen oder die Filterstandzeit und damit die Filtrationskosten schlechter werden. Eine schnelle Identifizierung der Trübungsursache ist daher zwingend notwendig.

2.2 Definition Trübung, kolloidale Trübung und Partikeln

Die Trübung ist eine optische Wahrnehmung. Das Licht wird beim Durchgang durch das Medium Bier an verschiedenen Partikeln oder Molekülen abgelenkt und kann vom menschlichen Auge als Streulicht wahrgenommen werden. Je nach Intensität des Streulichtes wird zwischen glanzfein, blank, opal oder trüb unterschieden.²

Im Produktionsprozess und bei der Alterung des Bieres können verschiedene Arten von Trübungen auftreten (zum Beispiel Trübung bei der Läuterung, nach dem Whirlpool, bei der Lagerung usw.).

Diese Arbeit beschränkt sich, bis auf wenige Ausnahmen, auf Trübungen, die direkt nach der Filtration gemessen werden können und auf solche, die bis zum Verlassen des Bieres aus der Brauerei auftreten können. Es wird unterschieden zwischen Partikeln, wie z. B. Filterhilfsmittel, und kolloidalen Trübungen. Die kolloidalen Trübungen sind Stoffe, die durch den Produktionsprozess, meist vor der Filtration, nicht abgebaut oder ausgeschieden werden. Die Partikeltrübungen gelangen meist während oder nach der Filtration ins Bier. Kolloidal ist chemisch-physikalisch definiert und meint Moleküle, die so groß sind, dass sie nicht richtig in Lösung gehen, aber durch die Hydrathülle wie gelöste Stoffe erscheinen.³ Hier muss eine begriffliche Abgrenzung zum Fachausdruck „kolloidale Stabilität“ gemacht werden. Die kolloidale Stabilität (oder Trübung) beschreibt Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen, die nach der Abfüllung durch die Alterung des Bieres als Partikeln ausfallen. Solche Trübungen werden in dieser Arbeit unter dem Begriff Partikeln eingeordnet. Unter dem Begriff

² Miedaner, H.: *Brautechnische Analysenmethoden Band II*. Freising: 2002, S. 93

³ Falbe, J.; Regitz, M.: *Römpf- Chemie Lexikon*. Stuttgart: 1990, S. 2299

Partikeln werden in dieser Arbeit Teilchen eingeordnet, die mit dem Mikroskop (bei 400 bis 1000-facher Vergrößerung) sichtbar gemacht werden können.

2.3 Trübungsmessung

Zur Kontrolle der Filtration wird normalerweise die Zweiwinkelstreulichtmessung verwendet. Eine weitere Möglichkeit ist ein Partikelzählgerät. Diese Methode hat sich in der Praxis aber noch nicht durchgesetzt.

Die Messung des Streulichtes soll den Eindruck der menschlichen Trübungswahrnehmung widerspiegeln. Allerdings wird die Trübung vom menschlichen Auge als Gesamteindruck verschiedener Einflüsse wahrgenommen. Dieser Eindruck kann aber nicht allein durch die Streulichtmessung vollständig erfasst werden. Bei der Streulichtmessung wird das von den Partikeln gestreute Licht bei verschiedenen Messwinkeln gemessen. Die Lichtstreuung an Partikeln ist hauptsächlich abhängig von der Wellenlänge, der Intensität des Lichtes und der Partikelgröße. Zur Standardisierung und Vergleichbarkeit der Streulichtmessung werden folgende Verfahren herangezogen: Zur Kompensierung der Bierfarbe wird nur bei einer Wellenlänge gemessen. Die Kalibrierung der Messgeräte erfolgt mit einer Standard-Formazin-Lösung, die der Trübung 1 EBC bzw. 4 FTU zugeordnet werden. Die Formazinlösung besteht aus kugelförmigen Partikeln, die aber den Biertrübungen in Form und Größe nicht immer gleichzusetzen sind. Eine gleichförmige Trübung wird durch die Kalibrierung immer einen konstanten Wert ausgeben, umgekehrt kann aber von einem Messwert nicht auf die Form der Trübung geschlossen werden. Ebenso muss beachtet werden, dass Messgeräte verschiedener Hersteller unterschiedliche Messwerte ausgeben können, da die Messanordnung und die Baugruppen nicht identisch sein müssen. Durch die Abhängigkeit der Streuintensität von der Partikelgröße ist es jedoch möglich, eine grobe Unterscheidung zwischen kleinen und großen Teilchen zu treffen. Die Trenngrenze liegt bei ungefähr 1 μm . Kleine Partikeln oder kolloidal gelöste Stoffe werden mit der 90°-Seitwärtsmessung, größere wie zum Beispiel Hefen oder

Kieselgur mit der 11° bzw. 25°-Vorwärtsmessung erfasst.^{4 5 6 7 8 9} Erhöhte Werte nach der Filtration bei der 90°-Messung deuten auf eine schlechte Filtrierbarkeit des Bieres hin. Die Vorwärtsstreuung dagegen erfasst hauptsächlich Filterhilfsmitteldurchbrüche. Die Messung wird zur Kontrolle der Filtration bei Druckstößen verwendet, um bei einem sprunghaften Anstieg des Trübungswertes den Filter im Kreislauf zu fahren. Eine Verschleppung von Kieselgur oder Hefezellen in den Drucktank kann auf diesem Wege minimiert werden. Zur Ursachenforschung kann die Streulichtmessung aber nicht herangezogen werden. Es ist nicht möglich, eine qualitative Aussage über den Stoff, der die Trübung verursacht, zu treffen.

Als Ersatz für die Vorwärtsstreulichtmessung kann die Partikelgrößenmessung herangezogen werden. Die Messung erfolgt nach dem Lichtblockadeprinzip. Die Partikeln werden zweidimensional vermessen. Erfasst werden Partikeln ungefähr größer als 1 µm. Diese Methode kann für die Beurteilung der Abscheiderate von Filtern herangezogen werden, da sowohl die Anzahl als auch die Größe der Partikeln gemessen werden. Aber auch dieses Messsystem beschreibt den Stoff, der die Trübung verursacht, nicht qualitativ. Es ist nicht klar, ob die Trübung durch Mikroorganismen, Eiweißpartikeln oder Filterhilfsmitteln verursacht wird.^{10 11}

Zur Erfassung kleinerer Partikelgrößen kann ein Labormessgerät mit Laserbeugung eingesetzt werden. Die gemessene Partikelgröße reicht von wenigen Nanometern

⁴ Thorne, R. S. W.: Instrument for the Objective Measurement of Haze in Bottled Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 64 (1958), Nr. S. 38–46

⁵ Huber, E.: Die Trübungsmessung: Grundlagen, Anwendung und Grenzen. In: Ennetbürgen: Sigrist-Photometer AG

⁶ Siebert, K. J.: Relationship of Particle Size to Light Scattering. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (2000), Nr. 3, S. 97–100

⁷ Gales, P. W.: A Comparison of Visual Turbidity with Turbidity Measured by Commercially Available Instruments. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (2000), Nr. 3, S. 1011–07

⁸ Morris, T. M.: The Relationship between Haze and the Size of Particles in Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 93 (1987), S. 13–17

⁹ Wackerbauer, K.; Evers, H.; Kaufmann, B.: Die Trübungsmessung während der Bierfiltration. In: *Brauwelt* 46 (1992), S. 2378–2386

¹⁰ Kolczyk, M.; Oechsle, D.: Ein neues Partikelmeßsystem zur Beurteilung von Filtraten und zur Qualitätssicherung. In: *Brauwelt* 28/29 (1998), S. 1288–1292

¹¹ Annemüller, G.; Marx, R.; Gottkehasch, L.: Überprüfung der Filtrationsqualität mit einem Partikelmeßgerät. In: *Brauwelt* 39/40 (2000), S. 1573–1578

bis 3 µm. Aber auch hier gibt es keine Informationen über den stofflichen Hintergrund der Trübung.¹²

2.4 Trübungsursachen

In der Literatur werden verschiedene Stoffe für Trübungen verantwortlich gemacht. Zurückzuführen sind die Ursachen demnach auf die Rohstoffe wie Malz, Hopfen, Wasser und Hefe, sowie Hilfsmittel und Fremdstoffe.

Beim Malz werden die Stoffgruppen Zellwandpolysaccharide, Stärke, Proteine und Oxalsäure als Trübungsverursacher beschrieben.

Bei den Zellwandpolysacchariden werden zwei Stoffe unterschieden: Arabinoxylane (Pentosane) und β-Glucane. Je nach Getreide und Ort der Einlagerung unterscheiden sich die Gehalte und die Molekülstrukturen. Während des Mälzens wird versucht, diese Stoffe weitgehend abzubauen. Durch eine Unterlösung kann der Gehalt in der Würze und somit die Filtrierbarkeit beeinflusst werden.¹³

Arabinoxylane sind Zellwandbestandteile, die hauptsächlich in den äußeren Zellwänden bei der Gerste vorkommen. Die technologische Relevanz in Bezug auf die Filtrierbarkeit wurde öfters diskutiert. Ein Druckanstieg am Filtereinlauf konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der Einfluss auf die Trübung wird nur in einer Literaturstelle erwähnt.¹⁴ Ansonsten scheinen die Arabinoxylane aus Gerstenmalz keine technologische Rolle zu spielen.¹⁵ Im Roggen sind sehr viel mehr Arabinoxylane enthalten als in Gerste. Hier ist das Problem der Verarbeitbarkeit bereits im Sudhaus gegeben. Bei Sauerstoffeintrag während des Maischens können die Arabinoxylamoleküle über die Seitenketten quervernetzt werden und eine gelartige Struktur ausbilden. Die Filtrierbarkeit dieser Biere ist schwierig. Das

¹² Illberg, V.; Machauer, P.; Sommer, K.: Partikelgrößenmessung zur Filtrierbarkeitsbeurteilung von Bieren. In: *Brauwelt* 35 (1993), S. 1503–1505

¹³ Narziß, L.: *Die Technologie der Malzbereitung*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1999

¹⁴ Coote, N.; Kirsop, B. H.: A Haze consisting largely of Pentosan. In: *Journal of the Institute of Brewing* 82 (1975), S. 34

¹⁵ Cach, N. C.; Annemüller, G.: Ein Beitrag über die Pentosane im Prozeß der Bierherstellung - sind sie wichtig oder technologisch unbedeutend? In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 7/8 (1995), S. 232–241

Hauptproblem ist der Druckanstieg am Filtereinlauf, so dass auf die Trübung weniger Wert gelegt wird und höhere Trübungswerte toleriert werden, ohne dass der Trübungsgrund identifiziert wird. Beim Weizen sind die Arabinoxylane der Hauptbestandteil der Zellwände. Interessant ist hier die Frage, ob es beim filtrierten Weißbier zu Trübungsproblemen kommen kann. Aber auch hier liegt das Augenmerk auf dem Druckanstieg und nicht auf der Trübung. In der Literatur ist hierzu kein Hinweis zu finden. Ein Problem war bisher auch die quantitative Erfassung der Arabinoxylane, die die Forschungsarbeiten erschwert hatte.

β -Glucane werden hauptsächlich für Filtrationsschwierigkeiten von Gerstenmalzbieren verantwortlich gemacht. β -Glucane können durch Scherkräfte Gelkluster ausbilden, die den Filter verblocken.¹⁶ Das Gel ist so hochmolekular, dass es vom Filter nahezu vollständig zurückgehalten wird und dadurch für Trübungen nicht relevant ist. Bekannt ist (hierzu erfolgte bisher aber noch keine Veröffentlichung), dass beim Auflösen des Gels durch Kurzzeiterhitzung die Trübungswerte nach der Filtration erhöht sind. Die Identifizierung der Trübung ist bisher aber nicht erfolgt. In einer Arbeit¹⁷ wurde versucht zu klären, ob β -Glucane erhöhte Trübungswerte hervorrufen können. Dem Bier wurden β -Glucane verschiedener Molekülgrößen zugesetzt und die Proben zusätzlich einer Scherung ausgesetzt. Hierbei wurde festgestellt, dass Molekülgrößen des β -Glucans um 300 kDa die Trübung nach einer Membranfiltration erhöhen können. Kleinere oder größere Moleküle trüben nicht oder werden vom Filter zurückgehalten. Werden die Proben nicht geschert, ergibt sich keine relevante Trübungserhöhung. Dies bedeutet aber, dass die Gefahr der Gelbildung höher ist als eine Trübungserhöhung nach der Filtration. Um Trübungsprobleme durch β -Glucane zu erhalten, müssen bestimmte Molekülgrößen durch den Maischprozess gebildet werden und es müssen Scherkräfte einwirken. Wie die Untersuchungen in dieser Arbeit auch gezeigt haben, ist diese Kombination eher unwahrscheinlich.

¹⁶ Clasen, C.; Kulicke, W.-M.: Zum Gelbildungsprozeß von (1->3)(1->4)- β -D-Glucanen. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* (2003), Nr. 9/10, S. 161–171

¹⁷ Speers, R. A.; Jin, Y.; Paulson, A.; Stewart, R.: Effects of β -Glucan, Shearing and Environmental Factors on the Turbidity of Wort and Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 109 (2003), Nr. 3, S. 236–244

Die Stärke ist der Hauptbestandteil des durch den Produktionsprozess gelösten Extraktes. Da die Stärkemoleküle bei ungenügendem Abbau zu Trübungen neigen, werden sie in dieser Arbeit besonderes berücksichtigt. Entscheidend für den Abbau sind folgende Produktionsschritte: Mälzen, Schroten, Maischen, Läutern und die Kochung.

In der Gerste ist die Stärke in den Zellen des Endosperms in Form von kleinen und großen Stärkekörnern eingelagert¹⁸. Die Stärke selbst besteht aus zwei unterschiedlich aufgebauten Molekülen, der Amylose und dem Amylopektin. Die Amylose ist in Wasser löslich. Die Glucosemoleküle sind $\alpha 1 \rightarrow 4$ verknüpft und bilden eine geradlinige Helix aus. Das Amylopektin ist nicht in Wasser löslich. Es bildet bei Temperaturen über 60 °C einen Stärkekleister. Das Amylopektin ist aus Glucose mit $\alpha 1 \rightarrow 4$ und $\alpha 1 \rightarrow 6$ Bindungen aufgebaut. Durch die $\alpha 1 \rightarrow 6$ Bindungen kann sich keine geradlinige Helix ausbilden. Das Molekül ist verzweigt und hat eine verästelte Struktur.

Ein wichtiger Grund für die Vermälzung der Gerste ist die Bildung von Enzymen. Die Enzyme sind entweder bereits bei der Mälzung oder später beim Maischen notwendig. Für den Stärkeabbau müssen die Stärke-abbauenden Enzyme beim Mälzen in ausreichenden Mengen aktiviert (β -Amylase) oder gebildet (α -Amylase) werden. Aber auch die Enzyme für die Zytolyse und Proteolyse sind notwendig. Während der Mälzung müssen die Zellwände des Endosperms möglichst vollständig aufgelöst werden, damit die Stärkekörner im späteren Sudprozess von den Enzymen angegriffen werden können. Um den Schwand in der Mälzerei gering zu halten, wird jedoch versucht, den Abbau der Stärke während der Mälzung einzuschränken. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann der Fortschritt des Abbaues anhand der Löcher in den Stärkekörnern gesehen werden.¹⁹ Die Löcher fördern die Quellung der Stärkekörner im Maischprozess. Dies bedeutet, je mehr Löcher in den Körnern, umso schneller quillt die Stärke durch Wassereinlagerung und kann von den Enzymen angegriffen werden. Für den späteren Maischprozess ist es wichtig, dass das Malz für das angewandte Maischverfahren entsprechend gelöst ist und die notwendigen Enzyme, besonders die α -Amylase, in ausreichenden Mengen gebildet sind. Dies bedeutet, je kürzer das Maischverfahren ist, umso besser muss das Malz

¹⁸ Bathgate, G. N.; Clapperton, J. F.; Palmer, G. H.: The Significance of Small Starch Granules. In: *Journal of the Institute of Brewing* 79 (1973), S. 183–196

¹⁹ Narziß, L.: *Die Technologie der Malzbereitung*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1999

gelöst sein. Die Zellwände des Endosperms müssen abgebaut sein und es dürfen keine ungelösten Körner in der Charge sein.²⁰

Die Schrotmühle muss die Malzkörner fein vermahlen. Besonders die unterlösten Kornspitzen müssen aus der Spelze vollständig ausgemahlen werden. Zu Problemen kann es bei der Nassschrotung kommen, wenn die Körner überweicht werden. Die Körner werden nicht zerrieben, sondern sie passen sich dem Walzenpaar elastisch an und werden nicht aufgerissen.²¹ Sichtbar wird dies an ganzen Körnern in der Maische oder an den an der Spelze anhaftenden Grobgrießen.

Bei modernen Maischverfahren wird bei ungefähr 62 °C eingemaischt. Dies ist bereits die Temperaturrest für die β -Amylase. Während dieser Rast muss die Stärke quellen und verkleistern, so dass die β -Amylase schnell angreifen kann. Zusätzlich sind die zellwandabbauenden Enzyme bei dieser Temperatur schon inaktiviert, so dass die intakten Zellwände der Grobgrieße nicht mehr aufgelöst werden. Der Angriff der Enzyme an die Stärkekörner ist erschwert oder nicht möglich. Die nächste Temperaturrest berücksichtigt die α -Amylase. Diese Rast ist mitentscheidend für spätere Trübungen im Bier. Die α -Amylase baut die hochmolekularen Stärkemoleküle zu niederen Dextrinen ab, die auf Grund der geringen Molekülgröße nicht trüben können.²²

Durch biologische Säuerung kann der pH-Wert der Maische eingestellt werden. Hierbei ist zu beachten, dass der pH-Wert nicht zu weit abgesenkt wird. Die α -Amylase hat das pH-Optimum bei 5,8. Durch zu starke Säuerung kann die Wirkung eingeschränkt werden, so dass hochmolekulare Stärkemoleküle in der Würze enthalten sein können.²³ Um die Abläuterung der Vorderwürze zu erleichtern, wird oftmals eine Abmaischtemperatur zwischen 75 und 78 °C gewählt. Zu beachten ist, dass die Temperatur nicht über 78 °C hinausgeht, da die α -Amylase, die für eine Nachverzuckerung während des Läuterns benötigt wird, inaktiviert werden würde.²⁴

Beim Abläutern der Vorderwürze ist zu beachten, dass keine unaufgeschlossenen Grieße in die Würze mitgerissen werden. Dies kann bei Beginn des Läuterns, durch

²⁰ Back, W.: *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2005

²¹ Narziß, L.: Der derzeitige Stand der Schrotetechnologie. In: *Brauwelt* 120 (1980), S. 828–832

²² Enevoldsen, B. S.; Schmidt, F.: Dextrines in Brewing. In: *EBC*. 1973, S. 135–148

²³ Kolbach, P.; Zastrow, K.: Über den Einfluß des Maischens auf die Schaumhaltbarkeit des Bieres. In: *Monatsschrift für Brauerei* 16 (1963), Nr. 2, S. 21–33

²⁴ Steiner, K.; Bürgin, D.: Abmaischen und Abläutern bei 70 °C. In: *Brauerei Rundschau* 94 (1983), Nr. 2, S. 25–28

zu kurzes Trübwürzepumpen, oder nach einem Tiefschnitt der Fall sein. Eine weitere Fehlerquelle ist die Anschwänzwassertemperatur. Auch hier gilt die Temperaturgrenze von 78 °C, da andernfalls die α -Amylase inaktiviert und Stärkemoleküle aus den Trebern herausgelöst werden würde, die dann nicht mehr abgebaut werden könnten.

Die Kochung erhöht die Trübungsneigung der Würze nur, wenn nicht abgebaute Stärkekörner beim Läutern mitgerissen werden.^{25 26} Durch die Kochtemperatur werden die Stärkekörner verkleistert und gehen in Lösung. Ein Abbau ist nicht mehr möglich. Ein Teil kann während der Whirlpoolrast mit dem Trub ausgeschieden werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Temperatur wiederum unter 78 °C liegt, wenn der Trub zur Würzerückgewinnung auf den Läuterbottich gegeben wird. Sind in dem Trub Stärkepartikeln enthalten, werden diese mit ausgewaschen und gelangen somit in die Würze, wo sie zu Trübungen führen können (wenn die Restaktivität der α -Amylase im Läuterbottich die Stärkemoleküle nicht abbaut).

²⁵ Narziß, L.: Der Stand der technologischen Entwicklung in westeuropäischen Brauereien unter besonderer Berücksichtigung Deutschlands. In: *Der Weihenstephaner* 2 (1977), S. 69–82

²⁶ Narziß, L.; Weigt, K.: Über Trübung und Trubstoffgehalt der Würze. In: *Brauwelt* 120 (1980), S. 409–416

Die Proteine der Gerste sind in mehrere Fraktionen unterteilt: Albumine (wasserlöslich), Globuline (löslich in verdünnten Salzlösungen), Prolamine (löslich in Ethanol) und Gluteline (löslich in Natronlauge).²⁷ Während des Mälzungs- und Bierbereitungsprozesses unterliegen die Proteine starken Veränderungen zwischen Stoffabbau, -aufbau und Denaturierung. Die Veränderungen bei den Gerstenproteinen sind im Rahmen der Bierbereitung in der Literatur bisher nur wenig beschrieben.^{28 29 30 31} Dies liegt vermutlich daran, dass die analytischen Möglichkeiten in den einzelnen Laboren, die sich mit der Bierbereitung befassen, oft begrenzt sind. Das Interesse lag bisher hauptsächlich auf den schaumpositiven Fraktionen oder den durch Alterung Partikeln-bildenden Proteinen.^{32 33 34 35} Die schaumpositiven Proteinfractionen haben ein Molekulargewicht zwischen 30 und 50 kDa.³⁶ Die Proteine, die bei der Alterung Partikeln ausbilden, sind noch niedermolekularer als die Schaumfraktionen. Es wird vermutet, dass die

²⁷ Narziß, L.: *Die Technologie der Malzbereitung*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1999

²⁸ Weiss, W.; Postel, W.; Görg, A.: Qualitative and quantitative changes in barley seed protein patterns during the malting process analysed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with respect to malting quality. In: *Electrophoresis* 13 (1992), S. 787–797

²⁹ Osman, A. M.; Coverdale, S. M.; Onley-Watson, K.; Bell, D.; Healy, P.: The Gel Filtration Chromatographic-Profiles of Proteins and Peptides of Wort and Beer: Effects of Processing - Malting, Mashing, Kettle Boiling, Fermentation and Filtering. In: *Journal of the Institute of Brewing* 109 (2003), Nr. 1, S. 41–50

³⁰ Boivin, P.; Martel, C.: Proteolysis During Malting. In: *Ferment* 4 (1991), S. 182–186

³¹ Sheehan, M. C.; Skerritt, J. H.: Identification and Characterisation of Beer Polypeptides derived from Barley Hordeins. In: *Journal of the Institute of Brewing* 103 (1997), S. 297–306

³² Evans, D. E.; Hejgaard, J.: The Impact of Malt Derived Proteins on Beer Foam Quality. Part I. The Effect of Germination and Kilning on the Level of Protein Z4, Protein Z7 and LTP1. In: *Journal of the Institute of Brewing* 105 (1999), Nr. 3, S. 159–169

³³ Kano, Y.; Kamimura, M.: Simple Methods for Determination of the Molecular Weight Distribution of Beer Proteins and Their Application to Foam and Haze Studies. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 51 (1993), Nr. 1, S. 21–28

³⁴ Evans, D. E.; Robinson, L. H.; Sheehan, M. C.; Hill, A.; Skerritt, J. H.; Barr, A. R.: Application of Immunological Methods to Differentiate Between Foam-Positive and Haze-Active Proteins Originating from Malt. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 62 (2003), Nr. 2, S. 55–62

³⁵ Slack, P. T.; Bamforth, C. W.: The Fractionation of Polypeptides from Barley and Beer by Hydrophobic Interaction Chromatography: the Influence of their Hydrophobicity on Foam Stability. In: *Journal of the Institute of Brewing* 89 (1983), S. 397–401

³⁶ Back, W.: *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2005

Molekülgröße größer 50 kDa betragen muss, damit die Proteine kolloidale Trübungen auslösen können, da die schaumpositiven Fraktionen selbst nicht trüben. Offen bleibt die Frage, was mit den hochmolekularen Proteinen der Gerste passiert, die ein Molekulargewicht von über 100 kDa aufweisen. Es gibt keine Aussagen, ob solche Proteine in Lösung gehen und den Produktionsprozess überstehen.

Trübungen können auch durch Oxalsäure ausgelöst werden. Die Oxalsäure wird durch das Malz eingebracht. Der Gehalt in der Gerste oder dem Weizen ist jahrgangsbedingt. Wie weiter unten in der Arbeit beschrieben, reagiert die Oxalsäure mit Kalzium zu Kalziumoxalat, welches im Bier das geringste Löslichkeitsprodukt hat und somit als erstes als Kristall ausfällt.

Die Hopfeninhaltsstoffe werden kaum als Auslöser für Trübungen beschrieben. Durch eine Forschungsarbeit ist bekannt, dass Hopfenharze durch falsche Behandlung nach der Filtration in der Flasche ausfallen können. Ansonsten sind die Mengen, die durch den Hopfen z. B. an Protein eingebracht werden, sehr gering. Die Gerbstoffe haben eine fällende Wirkung auf die Proteine. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass diese Stoffe als Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen die Filtration passieren können.

Das Wasser als Hauptbestandteil und Lösungsmittel kann durch seine gelösten Ionen indirekt Einfluss auf die Beschaffenheit und Löslichkeit der Stoffgruppen nehmen. Besonders entscheidend dürfte die Restalkalität sein, die die Enzymaktivität durch den pH-Wert verändern kann. Die Abbauvorgänge der Stoffgruppen können dadurch unvollständig ablaufen, so dass hochmolekulare Stoffe in die Würze gelangen können. Dies wird aber durch Wasserenthärtung und Maischesäuerung behoben.³⁷

Für Trübungen kann der Kalziumgehalt des Wassers eine Rolle spielen. Die Kalziumionen reagieren mit der Oxalsäure des Malzes zu Kalziumoxalat. Das Kalziumoxalat hat das geringste Löslichkeitsprodukt im Vergleich zu den anderen Ionen in Würze und Bier. Durch die relativ hohen Gehalte dieser Ionen wird das Löslichkeitsprodukt normalerweise während des Bierbereitungsprozesses überschritten, und Kalziumoxalat fällt in Form von Kristallen aus. Ziel ist es, die

³⁷ Narziß, L.: *Die Technologie der Würzebereitung*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1992

Kristallbildung bereits während der Lagerung vollständig abzuschließen. Durch zu warme oder zu kurze Lagerung fallen Kalziumoxalatkristalle oft erst in der abgefüllten Flasche aus und führen dort zu Trübungen. Die bekannte Kristallform ist der Oktaeder. Die Kristalle können aber auch andere Gestalten annehmen. Die Problematik von Kalziumoxalat wird selten mit Trübung verbunden, jedoch häufig mit der Auslösung von Gushing. Dies ist für die Brauerei das größere Problem. Die Trübung tritt in diesem Fall in den Hintergrund. Es gibt aber auch Fälle, bei denen die Kristalle Bodensatz bilden können, ohne dass Gushing auftritt.^{38 39 40 41}

Die Hefe verursacht bei sachgerechter Verarbeitung keine Trübungsprobleme. Sie bewirkt durch die Reifung und Lagerung des Bieres sogar eine zusätzliche Ausscheidung von Trubstoffen und eine Verbesserung der Filtrierbarkeit. Die Hefe nimmt beim Absetzen Proteine aus dem Bier heraus. Der Mechanismus ist hierbei jedoch noch nicht geklärt. Vermutet wird, dass die Proteine an der Hefeoberfläche angelagert werden und dadurch aus dem Bier entfernt werden. Setzt die Hefe sich nicht ab, können diese Proteine auch nicht entfernt werden. Diese Problematik wird bei Reinzuchthefen öfters beobachtet. Die Filtrierbarkeit des Bieres verschlechtert sich. Dieser Effekt kann auch von einer vor die Filtration geschalteten Zentrifuge nicht verbessert werden. Die Proteinmoleküle sind so klein, dass sie von der Zentrifuge nicht abgetrennt werden.

In mehreren Publikationen^{42 43 44} wird beschrieben, dass die Hefe durch Scherbeanspruchung, wie es zum Beispiel beim Zentrifugieren passieren kann, erhöhte Trübungen im Bier verursacht. Bei den Trübungen handelte es sich um

³⁸ Zepf, M.; Geiger, E.: Gushingproblematik durch Calciumoxalat Teil 1. In: *Brauwelt* 48 (1999) S. 2302–2304

³⁹ Zepf, M.; Geiger, E.: Gushingproblematik durch Calciumoxalat Teil 2. In: *Brauwelt* 6/7 (2000) S.222–223

⁴⁰ Burger, M.; Becker, K.: Oxalat Studies on Beer. In: *ASBC Proceedings* 7 (1949), S. 102–114

⁴¹ Staatl. Brautechnische Prüf- und Versuchsanstalt (Hrsg.): *Calcium - Oxalsäure - Technologische Relevanz*.

⁴² Siebert, K. J.; Stenroos, L. E.; Reid, D. S.; Grabowski, D.: Filtration Difficulties Resulting from Damage to Yeast During Centifugation. In: *Technical Quarterly* 24 (1987), S. 1–8

⁴³ Stoupis, T.; Stewart, G. G.; Staffort, R. A.: Mechanical Agitation and Rheological Considerations of Ale Yeast Slurry. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 60 (2002), Nr. 2, S. 58–62

⁴⁴ Lewis, M. J.; Poerwantaro, W. M.: Release of Haze Material from the Cell Walls of Agitated Yeast. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49 (1991), Nr. 2, S. 43–46

Gemische von Mannan, Proteinen und Glucanen, die von der Hefezellwand abgesondert wurden. Auch Mannoproteine wurden in diesen Arbeiten nicht ausgeschlossen, sind aber nur über Berechnungen aus den einzelnen nasschemischen Ergebnissen zugeordnet worden.

In einer neueren Arbeit werden Mannoproteine direkt mit SDS-PAGE und besonderer Färbung bestimmt. Die Molekülgrößen 57, 120 und 360 kDa werden besonders hervorgehoben. Ebenso wird ein Mannoprotein bei der Weinherstellung erwähnt, das eine Molekülgröße von 420 kDa aufweist. Diese Proteine werden für Trübungen verantwortlich gemacht.⁴⁵

Eine weitere Ursache kann das Speicherpolysaccharid der Hefe, das Glycogen sein. Das Glycogen ist ähnlich aufgebaut wie das Amylopektin des Malzes. Der Verzweigungsgrad, also die Anzahl der $\alpha 1 \rightarrow 6$ -Bindungen, ist jedoch höher. Laut Literatur⁴⁶ wird das Glycogen durch High-Gravity-Verfahren, bei hohen Gärtemperaturen und abhängig vom Hefestamm von der Hefe ausgeschieden. Die Trübung soll nicht sichtbar sein, aber Werte von bis zu 1,2 EBC verursachen. Die Identifizierung des Glycogens in Bier war bisher mit einem hohen analytischen Aufwand verbunden. In dieser Arbeit wird ein einfacheres Verfahren vorgestellt.

Filterhilfsmittel werden als Trübungsverursacher nur am Rande erwähnt. Aufgefallen sind sie bei der Auslösung von Gushing, wo sie ab einer bestimmten Konzentration das Übersäumen auslösen können.⁴⁷

Zur Vermeidung von Kieselgurdurchbrüchen wird die Vorwärtsstreulichtmessung eingesetzt. Leichte Schwankungen der Werte während der Filtration werden aber meist nicht auf Filterhilfsmittel bezogen oder sie werden toleriert. Laut Vorläufigem Biergesetz⁴⁸ darf allerdings nur eine technisch unvermeidbare Menge an technischen Hilfsstoffen in das Bier gelangen. Eine definierte Grenze gibt es jedoch nicht und es ist oft fraglich, ob die Mengen, die gefunden werden, wirklich technisch unvermeidbar sind. Zum Beispiel ist bei den PVPP-Filtern bekannt, dass PVPP-Partikeln durch den

⁴⁵ Omura, F.; Fujita, A.; Maruhashi, T.; Watanabe, R.; Kondo, H.: The influence of yeast cell wall mannoproteins on beer haze stability. In: *EBC Congress*. Prague, 2005, S. 591–598

⁴⁶ Malcorps, P.; Haselaars, P.; Dupire, S.; Van den Eynde, E.: Glycogen released by the yeast as a cause of unfiltrable haze in the beer. In: *EBC Congress*. 1999, S. 831–838

⁴⁷ Zarnkow, M.; Back, W.: Neue Erkenntnisse über gushingauslösende Substanzen. In: *Brauwelt* 9/10 (2001), S. 363–370

⁴⁸ Zipfel, W.; Rathke, K.-D.: A410 §9 - *Lebensmittelrecht*. München: 2003

Filter hindurch gehen. Zur Verringerung der Partikeln werden aus diesem Grund Trapfilter eingesetzt.⁴⁹ Die Effektivität der Partikelabtrennung dieser Filter ist jedoch sehr unterschiedlich und wird normalerweise nicht überprüft, obwohl das Problem bekannt ist. Oft wird nicht zwischen der nominellen und der absoluten Abscheiderate unterschieden. Diese Problematik hat besonderes Interesse gefunden, da Kieselgur als krebserregend eingestuft wurde. Allerdings gilt dies nur für die Kieselgur, die über die Atmung aufgenommen wird.^{50 51} Es ist aber dennoch für das Image des Bieres nicht förderlich, wenn in der Presse dargestellt wird, dass krebserregende Stoffe im Bier nachzuweisen sind.

Bei Fremdpartikeln verhält es sich ähnlich wie mit den Hilfsstoffen. Die Fremdpartikeln kommen normalerweise erst nach der Filtration in das Bier. Eine Überprüfung erfolgt aber nur mit der Streulichtmessung der abgefüllten Flaschen im Labor. Die Messung ist aber für diese Art der Verunreinigung nicht genau genug. Die Überprüfung der Effektivität der Flaschenreinigungsmaschine erfolgt nur über einen mikrobiologischen Test. Rückstände von Etiketten zum Beispiel können so nicht erfasst werden.

⁴⁹ Conner, D. E.: Trap Filters. In: *The Brewers Digest* (1976), S. 65–66

⁵⁰ Ruß, W.; Meyer-Pittroff, R.: Rechtliche Vorschriften für Kieselgur. In: *Brauwelt* 9/10 (2001), S. 343–346

⁵¹ EFT: Kieselgur. In: *Brauwelt* 9/10 (2001), S. 356–357

2.5 Identifizierung der Trübungen

Die Literaturrecherche ergab Hinweise auf einzelne Probleme bezüglich der Identifizierung und eventuell auch der Herkunft der Trübung. Die Identifizierung erfolgte enzymatisch⁵², mikroskopisch^{53 54 55} oder nasschemisch⁵⁶. Eine genaue Beschreibung der Methoden, besonders bei den enzymatischen Untersuchungen, fehlt oft. Die Methoden sind meist mit einem erheblichen analytischen Aufwand verbunden, so dass sie oft nur in einem Forschungslabor durchgeführt werden können. Eine Zusammenstellung der verschiedenen Identifizierungsmöglichkeiten für die Qualitätskontrolle in der Praxis ist bisher nicht veröffentlicht worden.

⁵² Whitear, T.: Dealing with Persistent Hazes in Freshly Filtered Beer. In: *Ferment* (1997), S. 186–190

⁵³ Glenister, P. R.: Some Useful Staining Techniques for the Study of Yeast, Beer, and Beer Sediments. In: *ASBC Proceedings* (1970), S. 163–167

⁵⁴ Glenister, P. R.: Applications of Optical Staining in the Examination of Beer Sediment. In: *ASBC Proceedings* (1971), S. 192–199

⁵⁵ Fincher, G. B.: Ferulic Acid in Barley Cell Walls: A Fluorescence Study. In: *Journal of the Institute of Brewing* 82 (1976), S. 347–349

⁵⁶ Siebert, K. J.; Stenroos, L. E.; Reid, D. S.: Characterisation of Amorphous-Particle Haze. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 39 (1981), Nr. 1, S. 1–11

3 Material und Methoden

3.1 Trübungsmessung

Trübungsmessung: LabScat, Sigrist, Ennetbürgen

Die Trübung wird gemäß MEBAK⁵⁷ gemessen. Zum Einsatz kommt ein Zweiwinkel-Streulichtmessgerät. Die Messwinkel betragen 90° und 25° (Vorwärtsstreuung).

Es hat sich gezeigt, dass es sinnvoll ist, die Proben sowohl ungeschüttelt (nach MEBAK) als auch geschüttelt zu messen, da sich größere Partikeln relativ schnell absetzen. Diese Partikeln würden ungeschüttelt nicht mit gemessen werden. Nach dem Schütteln muss 30–60 s mit der Messung gewartet werden, bis die CO₂-Bläschen vollständig aufgestiegen sind, damit die Messung nicht beeinflusst wird.

Zur Kontrolle der Trübungsmessung auf Filterhilfsmitteldurchbrüche, wurde Kieselgur und PVPP dest. Wasser in verschiedenen Konzentrationen zugemischt und die Trübung gemessen.

3.2 Gepuffertes photometrischer Jodwert

Der gepufferte photometrische Jodwert wird nach MEBAK⁵⁸ durchgeführt. Der Grenzwert in Würze liegt bei 0,45.

3.3 Modifizierter photometrischer Jodwert

Photometer: Cadas 200, Dr. Lange, Berlin

Chemikalien: siehe MEBAK Band II 2.3.2⁵⁹

Der modifizierte photometrische Jodwert ist angelehnt an die MEBAK Vorschrift für den gepufferten photometrischen Jodwert (MEBAK Band II, 2.3.2). Die

⁵⁷ Miedaner, H.: *Brautechnische Analysenmethoden Band II*. Freising: 2002

⁵⁸ Miedaner, H.: *Brautechnische Analysenmethoden Band II*. Freising: 2002

⁵⁹ Miedaner, H.: *Brautechnische Analysenmethoden Band II*. Freising: 2002

Probenvorbereitung ist identisch. Die Messung mit dem Photometer ist jedoch verändert. Der Abgleich erfolgt gegen 10 ml Puffer gemischt mit 0,5 ml Jodlösung. Gemessen wird die 8 ml Probe gemischt mit 0,5 ml verdünnter Jodlösung im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm. Nach der Jodzugabe werden 30 s bis zur Messung gewartet. Die Daten werden mit MS Excel graphisch, in Form des Kurvenverlaufes (siehe Kapitel Ergebnisse), ausgewertet.

3.4 Gelpermeationschromatographie

GPC: Äktaprime, Amersham Biosciences, Freiburg

Säule: Superdex 200, Amersham Biosciences, Freiburg

Puffer: 0,05 M dinatriumhydrogenphosphat gemischt mit 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphat auf pH 7,0

Die Probenvorbereitung ist an die des photometrischen Jodwertes (MEBAK Band II, 2.3.2) angelehnt. Die Alkoholfällung (5 ml Probe, 20 ml Ethanol) wird zur Aufkonzentrierung achtmal wiederholt und in 10 ml Puffer gelöst. Gegenüber dem Probevolumen ist die gewonnene Lösung vierfach konzentriert. Die so gewonnene Lösung wird direkt in die GPC eingespritzt.

Als Fließmittel für die GPC wird ein Phosphatpuffer mit pH 7,0 verwendet. Die Flussrate beträgt 2,2 ml/min. Die erste Fraktion wird nach 90 ml gesammelt. Die Fraktionengröße beträgt 11 ml. Insgesamt werden 31 Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen werden ähnlich wie bei dem modifizierten Jodwert gemessen. Das Photometer wird mit 6 ml Puffer (pH 4,5), 4 ml Puffer (pH 7,0) und 0,5 ml verdünnter Jodlösung auf Null abgeglichen. Gemessen wird 6 ml Puffer (pH 4,5), 4 ml Probe und 0,5 ml verdünnte Jodlösung. Nach der Jodzugabe werden 30 s bis zur Messung gewartet. Die Messung erfolgt über den Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm. Die Messdaten werden mit MS Excel graphisch ausgewertet.

3.5 Maischverfahren

Die Probenverarbeitung entspricht dem Kongressverfahren nach MEBAK (Band I, 4.1.4.2.2)⁶⁰. Geändert sind die Temperaturstufen und –rasten, wie sie in den Unterkapiteln beschrieben sind.

3.5.1 Eyben-Verfahren

Temperaturreast 45 °C für 30 min

Temperaturreast 62 °C für 30 min

Temperaturreast 70 °C für 30 min

3.5.2 Hoch-Kurz-Verfahren

Temperaturreast 62 °C für 30 min

Temperaturreast 70 °C für 30 min

3.6 Gelelektrophorese

Elektrophoresekammer: Multiphor II, Pharmacia, Uppsala

Power Supply: EPS 3500, Pharmacia, Uppsala

Gel: ExcelGel SDS Homogeneous 7,5, Amersham Biosciences, Uppsala

Pufferstreifen: ExcelGel SDS Buffer Strips, Amersham Biosciences, Uppsala

Proteinstandard 1: Protein molecular weight standards MW 6500-205000, Amersham Biosciences, Uppsala

Proteinstandard 2: Precision Plus Protein Kaleidoskope Standard, BioRad, München

Silberfärbung: Protein Staining Kit, Amersham Biosciences, Uppsala

Zentrifuge: Centrifuge 5410, Eppendorf, Hamburg

Die Proben werden zentrifugiert (15.000 U/min, 5 min) und 10 µl Überstand nativ aufgetragen. Das Elektrophoreseprogramm wird gemäß Vorschrift für das entsprechende Gel ausgeführt (30 A, 80 min, Spannung variabel). Die Banden werden mit Silber angefärbt.

⁶⁰ Pfenninger, H.: *Brautechnische Analysenmethoden Band I*. Freising: 1997

3.7 Hefezellaufschluss

Ultraschallsonde: Dr. Hielscher UP UP 200s; Cycle 0,5, Amplitude 100 %

Zentrifuge: Laborzentrifuge 6K15, Sigma, Osterode

Die Hefe wird vor dem Aufschluss mehrfach mit dest. Wasser gewaschen, indem sie aufgeschlemmt wird und anschließend mit 1000 U/min abzentrifugiert wird, damit Bierreste, besonders Proteine und Glucane, entfernt werden. Zur Gewinnung von Hefeproteinen und Hefeglycogen werden die Hefezellen mit einer Ultraschallsonde aufgeschlossen. Die Abtrennung der Zellwände wird mittels Zentrifugation (9000 U/min, 10 min) durchgeführt. Der Überstand wird für die GPC und für die Gelelektrophorese verwendet.

3.8 Enzymatische Trübungsidentifizierung

3.8.1 Enzyme⁶¹

Pepsin (EC 3.4.23.1), Merck (1.07185), Darmstadt

Temperaturoptimum: 37 °C, pH-Optimum: 2 bis 3

Amyloglucosidase (EC 3.2.1.3), Megazyme (3200 U/ml), Bray

Brewers Diase, DSM, Seclin Cedex

Hauptaktivität: Amyloglucosidase (EC 3.2.1.3)

Lichenase (EC 3.2.1.73), Megazyme, Bray

Temperaturoptimum: 60 °C, pH-Optimum: 6,5

Ultraflo L, Novozyme, Bagsvaerd

Hauptaktivität: Lichenase (EC 3.2.1.73)

Mannanase (EC 3.2.1.78), Megazyme, Bray

Temperaturoptimum: 40 °C, pH-Optimum: 4,0

⁶¹ Brenda. <http://www.brenda.uni-koeln.de>.

Xylanase (EC 3.2.1.8), Megazyme, Bray
Temperaturoptimum: 40 °C, pH-Optimum: 4,5

3.8.2 Methodenbeschreibung

Das Probenvolumen beträgt 100 ml pro 180-ml-Klarglas-Bügelverschlussflasche. Die Probe wird auf Raumtemperatur temperiert und in die 180-ml-Bügelverschlussflaschen probegeteilt: eine Nullprobe und für jedes Enzym eine Flasche. Zur Überprüfung der Probenteilung wird die Trübung in jeder Flasche gemessen. Die Enzymmenge beträgt 25 µl (um die Eigentrübung des Enzyms möglichst gering zu halten). Die Enzymreaktion erfolgt (bis auf Pepsin) bei Raumtemperatur. Im Fall von Pepsin wird die Probe zusammen mit einer Nullprobe auf 40 °C temperiert. Die Reaktionszeit beträgt etwa 24 Stunden. Es wird die Trübungsabnahme über die Zeit verfolgt. Die Trübungsabnahme wird definiert als Ausgangstrübung minus Endtrübung nach 24 Stunden.

3.9 Mikroskopische Trübungsidentifizierung

3.9.1 Mikroskopische Verfahren

Mikroskop: Axioskop 50, Zeiss, Göttingen

Kamera: DSC-S75, Sony, Tokyo

Das verwendete Mikroskop hat verschiedene Verfahren zur Darstellung des mikroskopischen Bildes.

3.9.1.1 Durchlicht

Bei dem Durchlichtverfahren geht der Lichtstrahl von unten durch das Objekt hindurch in das Objektiv zum Okular. Zur besseren Darstellung wird bei Durchlicht mit Interferenzkontrast gearbeitet. Hierbei erscheint das Bild dreidimensional.

3.9.1.2 Auflicht

Bei dem Auflichtverfahren geht der Lichtstrahl durch das Objektiv auf das Objekt. Das abgestrahlte Licht geht zurück über das Objektiv in das Okular.

3.9.1.3 Polarisierung

Das Mikroskop ist mit einem Polarisationsverfahren ausgestattet. Durch zwei Polarisationsfilter wird der Lichtstrahl vollständig ausgelöscht. Kristalline Objekte können die Ebene des polarisierten Lichtes drehen und erscheinen weiß vor schwarzem Hintergrund.

3.9.1.4 Fluoreszenz

Filter: G365, Zeiss, Göttingen

Bei dem Fluoreszenzverfahren wird UV-Licht durch einen Anregungsfilter auf einen entsprechenden Wellenlängenbereich begrenzt. Das Licht geht durch das Objektiv auf das Objekt. Moleküle des Objektes werden angeregt und strahlen in einem anderen Wellenlängenbereich Licht zurück in das Objektiv. Der Lichtstrahl wird noch mal über einen Filter auf einen entsprechenden Wellenlängenbereich begrenzt und gelangt so in das Okular.

3.9.1.5 Stereomikroskopie

Mikroskop: Stemi 2000-C, Zeiss, Göttingen

Bei der Stereomikroskopie wird über zwei bewegliche Lampen auf dem Objekt eine Licht-Schatten-Struktur gebildet. Dadurch erscheint das Bild dreidimensional.

3.9.2 Probenaufbereitung für die mikroskopische Identifizierung

3.9.2.1 Zentrifugieren

Zentrifuge: Centrifuge 5410, Eppendorf, Hamburg

Die Probe wird stehend gelagert, so dass sich die Partikeln absetzen können. Der Überstand wird mit einer Wasserstrahlpumpe und einer Pasteurpipette abgesaugt bis etwa 30 ml verbleiben. Der Bodensatz wird aufgeschüttelt, in ein 2,0 ml

Eppendorfggefäß gefüllt und bei 15.000 U/min abzentrifugiert. Der Vorgang wird so oft wiederholt, bis genügend Partikeln zum Mikroskopieren abzentrifugiert sind.

3.9.2.2 Membranfiltration

Membran: Cellulose Nitrate Filter 50 mm 1,2 µm, Sartorius, Göttingen

Immersionsöl: Immersol 518 N, Zeiss, Göttingen

Die Probe wird über eine Cellulose-Nitrat-Membran filtriert. Die Porenweite der Membran beträgt 1,2 µm, der Durchmesser 50 mm. Der Durchmesser der effektiven Filterfläche beträgt 47 mm. Die Membran wird bei etwa 40 °C 5 h getrocknet. Entsprechend der Größe des Objektträgers und des Deckglases wird ein Teil der Membran herausgeschnitten und mit Immersionsöl auf den Objektträger gelegt. Da die Membran und das Immersionsöl den gleichen Lichtbrechungsindex haben, wird die getrocknete Membran durchsichtig und kann dadurch mittels Durchlichtverfahren mikroskopiert werden.

Zur Bestimmung der Anzahl der Partikeln, werden die entsprechenden Partikeln pro Gesichtsfeld ausgezählt und dann auf die gesamte Membranfläche bzw. das Probevolumen wie folgt umgerechnet:

$$\text{Konzentration [Partikeln/ml]} = (\text{Anzahl pro Gesichtsfeld} \times \text{Fläche der Membran [mm}^2\text{]} / \text{Fläche des Gesichtsfeldes [mm}^2\text{]}) / \text{Probevolumen [ml]}$$

$$\text{Fläche des Gesichtsfeldes [mm]} = (\text{Sehfeldzahl} / \text{Vergrößerungsfaktor Objektiv})^2 \times \pi$$

3.9.3 Färbeverfahren

Für die Färbeverfahren wurden folgende Farbstoffe verwendet:

Eosin Yellow, ICN, Aurora

Thionin, ICN, Aurora

Methylenblau, Merck, Darmstadt

Jodlösung 1N, J. T. Backer, Deventer

Fluorescent Brightener (Calcofluor), Sigma, Steinheim

Kongorot, Merck, Darmstadt

Die Farbstoffe werden in den Konzentrationen nach Tabelle 1 kurz vor der Färbung in dest. Wasser gelöst. Die Jodlösung wird 50-fach verdünnt. Die Färbung erfolgt direkt auf dem Objektträger durch Mischen der Probe mit dem Farbstoff. Das Objekt wird sofort mikroskopiert.

Farbstoff	Konzentration [mg/l]
Eosin	200
Thionin	2000
Methylenblau	200
Calcofluor	100
Kongorot	100

Tabelle 1: Konzentrationen der Farbstoffe

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Enzymatische Trübungsidentifizierung

Die enzymatische Trübungsidentifizierung wird bei kolloidalen Trübungen eingesetzt. Die kolloidal gelösten Moleküle lassen sich nur schwer von der flüssigen Phase abtrennen. Mit Hilfe von spezifischen Enzymen ist dies nicht notwendig, da diese direkt der Probe zugesetzt werden können.

4.1.1 Zumischversuche im Labormaßstab

Einzelne Reinsubstanzen, die im Kapitel Grundlagen und Kenntnisstand beschrieben sind und unter dem Verdacht stehen, dass sie zu Trübungen neigen, werden einem Standardbier in verschiedenen Konzentrationen zugemischt und auf ihre Trübungszunahme hin untersucht. Das verwendete Standardbier hat eine Trübung von 0,24 EBC (Messwinkel 90°).

Als Medium wurde Bier gewählt, da die eingesetzten Enzyme in diesem Medium ihre Wirkung zeigen sollen. Die Temperatur und der pH-Wert des Bieres entsprechen nicht immer den Optima der Enzyme. Ziel war es, Enzyme zu finden, die die Trübung möglichst schnell in der Probe und unter Laborbedingungen abbauen können.

4.1.1.1 α -Glucane

Die α -Glucane wurden nach ihrer Herkunft und Aufbau unterschieden und untersucht. Aus dem Malz kommen als Trübungsbildner Amylose, Amylopectin und Stärke in Betracht. Aus der Hefe kann der Speicherstoff Glycogen freigesetzt werden.

4.1.1.1.1 Stärke

Gerstenstärke wurde in einer Konzentration von 20 g/l in dest. Wasser aufgekocht. Die Stärkekörner nehmen Wasser auf, quellen und gehen in „Lösung“. Diese vorgelöste Stärkelösung wird dem Bier zugegeben und die Trübung gemessen

(siehe Tabelle 2). Der Trübungsabbau erfolgt über die Enzyme Amyloglucosidase und Diase (siehe Tabelle 3).

Konzentration [mg/l]	2	10	100	200
Trübung [EBC]	0,26	0,36	2,00	4,42

Tabelle 2: Trübungszunahme durch verkleisterte Stärke

Die Trübung wird bereits durch einen relativ geringen Gehalt an Stärke erhöht. In einem nicht trüben Bier sind ungefähr 40 g/l niedermolekulare Dextrine enthalten. Es genügt ein Bruchteil (0,1 g/l) davon, eine sichtbare Opaleszenz zu erzeugen.

Zeit [h]	0	1	3	24
	Trübung [EBC]			
Nullprobe	5,80	6,84	7,11	8,16
Diase	5,69	1,22	0,61	0,42
Amyloglucosidase	5,84	2,54	1,24	0,49

Tabelle 3: Trübungsabbau von verkleisterter Stärke

4.1.1.1.2 Amylose

Amylose aus Gerste (20 g/l) wird in dest. Wasser mit einem Tropfen konz. Natronlauge durch Kochen gelöst und dem Bier zugegeben (siehe Tabelle 4).

Konzentration [mg/l]	2	10	200	400
Trübung [EBC]	0,25	0,27	0,65	1,03

Tabelle 4: Trübungszunahme durch Amylose

Die reine Amylose hat einen geringeren Einfluss auf die Trübung als die Stärke. Es wird ungefähr die 10-fache Menge an Amylose benötigt, um den gleichen Trübungswert zu erhalten.

4.1.1.1.3 Amylopectin

Amylopectin aus Mais (10 g/l) wird in dest. Wasser mit einigen Tropfen Natronlauge vorgelöst und dem Bier zugegeben (siehe Tabelle 5).

Konzentration [mg/l]	2	10	100	200
Trübung [EBC]	0,31	0,38	1,11	2,40

Tabelle 5: Trübungszunahme durch Amylopectin

Amylopectin erhöht die Trübung etwa halb so stark wie reine Stärke aber stärker als Amylose. Amylopectin ist also für die Trübungsbildung stärker verantwortlich als Amylose.

4.1.1.1.4 Glycogen

Glycogen aus Austern (10 g/l) wird in dest. Wasser gelöst und dem Bier zugegeben (siehe Tabelle 6).

Konzentration [mg/l]	2	20	100	400
Trübung [EBC]	0,29	0,39	0,60	1,41

Tabelle 6: Trübungszunahme durch Glycogen

Die Trübung wird durch Glycogen nicht so stark erhöht, wie durch das ähnlich aufgebaute Amylopectin. Es fällt auch auf, dass der optische Eindruck der Trübe (bei gleichem Trübungswert) bei Glycogen nicht so trüb erscheint, wie bei Amylopectin.

4.1.1.2 Eiweiß

Die Proteine Casein (20 g/l) und Albumin (extrahiert aus Gerste) (5 g/l) werden durch Erhitzen auf 60 °C in dest. Wasser gelöst und dem Bier zugegeben (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8).

Konzentration [mg/l]	2	4	10	20
Trübung [EBC]	0,58	1,00	1,58	3,63

Tabelle 7: Trübungszunahme durch Casein

Casein erhöht die Trübung im Vergleich zur Stärke sehr stark. Albumin ist nicht so trübungsintensiv wie Casein. Das Molekulargewicht wird auch als geringer angegeben.

Konzentration [mg/l]	1	5	25	100
Trübung [EBC]	0,29	0,35	0,92	1,27

Tabelle 8: Trübungszunahme durch Albumin

Der Trübungsabbau durch die Enzyme Pepsin ist bei Casin fast vollständig erfolgt (siehe Tabelle 9). Bei Albumin wird die Trübung nur halbiert. Dies könne daran liegen, dass die Erhitzung auf 60 °C (um Albumin in Lösung zu bringen), die Molekülstruktur verändert hat, so dass die Enzyme teilweise nicht angreifen können (siehe Tabelle 10).

Zeit [h]	0 (20 °C)	3 (40 °C)	24 (40 °C)	25 (20 °C)
	Trübung [EBC]			
Nullprobe	4,42	4,24	4,93	5,24
Pepsin	3,93	0,47	0,43	0,54

Tabelle 9: Trübungsabnahme von Casein durch das Enzym Pepsin

Zeit [h]	0 (20 °C)	3 (40 °C)	24 (40 °C)	25 (20 °C)
	Trübung [EBC]			
Nullprobe	1,33	1,11	1,33	1,59
Pepsin	1,35	0,83	0,87	1,01

Tabelle 10: Trübungsabnahme von Albumin durch das Enzym Pepsin

4.1.1.3 β -Glucan

Gersten- β -Glucan (10 g/l) wird in dest. Wasser durch Erhitzen gelöst und dem Bier zugegeben (siehe Tabelle 11).

Konzentration [mg/l]	1	10	100	200
Trübung [EBC]	0,27	0,41	0,42	0,51

Tabelle 11: Trübungszunahme durch β -Glucan

β -Glucan hat fast keinen Einfluss auf die Trübung. Dies kann daran liegen, dass das verwendete β -Glucan in Wasser löslich ist. Von anderen Herstellern wird erwähnt, dass die geringe Trübung durch Verunreinigungen an Proteinen verursacht wird. Der Trübungsabbau durch die Enzyme Ultraflo und Lichenase war erfolglos und ist nicht dargestellt.

4.1.1.4 Arabinoxylan

Hochmolekulares Arabinoxylan löst sich in dest. Wasser nicht. Auch eine Zugabe von konz. Lauge bewirkte nichts. Der Versuch konnte somit nicht durchgeführt werden. Ebenso konnte das Enzym Xylanase nicht getestet werden.

4.1.1.5 Mannan

Mannan aus Hefe (10 g/l) wird in dest. Wasser gelöst und dem Bier zugegeben (siehe Tabelle 12).

Konzentration [mg/l]	10	50	100	500
Trübung [EBC]	0,29	0,32	0,43	0,46

Tabelle 12: Trübungszunahme durch Mannan

Mannan zeigt in Bier fast keine Trübungserhöhung. Mannan selbst scheint für die Trübungsbildung keine Relevanz zu haben. Es wird aber vermutet, dass Mannan in Verbindung mit Proteinen Trübungen verursachen kann.

Durch die geringe Trübung ist es nicht möglich, das Enzym Mannanase auf seine Wirksamkeit zu testen.

Aus diesen Vorversuchen werden für den Praxiseinsatz die in der Tabelle 13 aufgelisteten Enzyme verwendet.

Trübungsbildner	Enzym
α -Glucan	Diase
Protein	Pepsin
Arabinoxylan	Xylanase
β -Glucan	Ultraflo

Tabelle 13: Ausgewählte Enzyme für den Praxiseinsatz

4.1.2 Untersuchung von Praxisproben

Im Laufe der Arbeit wurden 60 Praxisproben mit erhöhten Trübungswerten auf ihre trübungsverursachenden Stoffe hin enzymatisch untersucht. Die aus dem Vorversuch ausgewählten Enzyme wurden so auf ihre Tauglichkeit überprüft, d. h. ob sie mit dem Substrat, wie es unter Praxisbedingungen vorliegt, reagieren können.

4.1.2.1 β -Glucantrübung

Die vorliegende Bierprobe hat einen erhöhten Trübungswert von etwa 0,9 EBC. Der Trübungsachweis erfolgte mit den Enzymen Ultraflo und Diase.

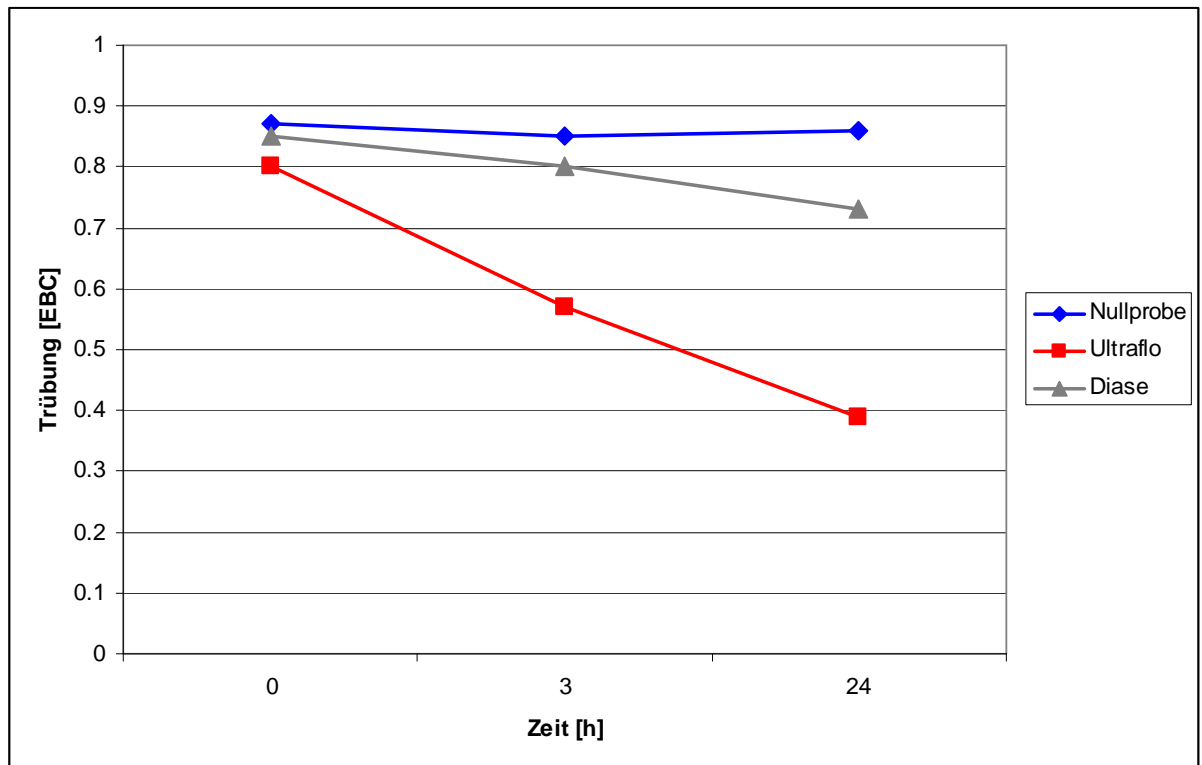
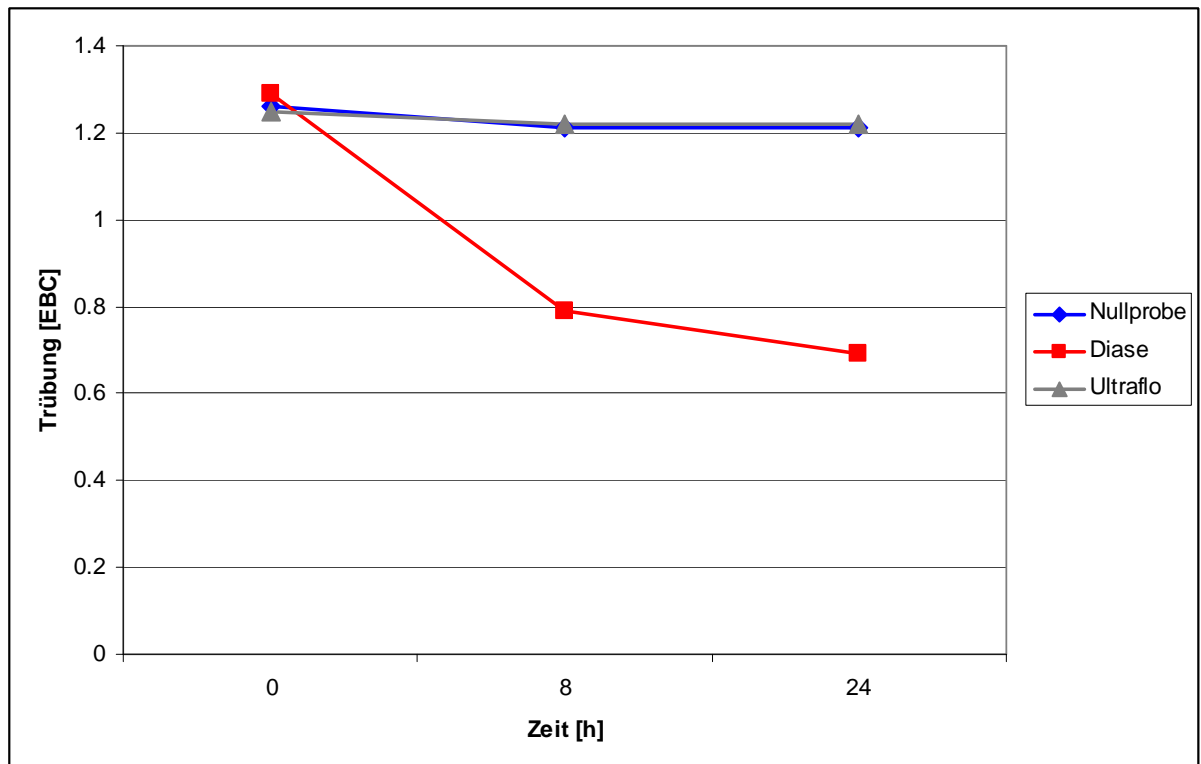


Abbildung 1: Abbau einer β -Glucantrübung

Die Abbildung 1 zeigt Verlauf des Trübungsabbaus in der Probe durch die Enzyme. Ultraflo halbiert den Trübungswert, Diase verringert ihn leicht. Diese Trübung besteht in diesem Fall aus zwei Stoffgruppen, wobei β -Glucan den höheren Anteil an der Trübung hat. Ein Erklärungsversuch für den erhöhten Trübungswert kann sein, dass die schlecht abgebauten Zellwände des Malzes zu hohe β -Glucane in die Würze einbringen, die das Bier trüben. Zum anderen ist der Stärkeangriff durch die intakten Zellwände schwieriger und Stärkemoleküle werden so schlechter abgebaut, was ebenso zur Trübung führt. Die Nullprobe bleibt wie erwartet unverändert.

4.1.2.2 α -GlucantrübungAbbildung 2: Abbau einer α -Glucantrübung

In der Abbildung 2 ist der Trübungabbau der α -Glucantrübung dargestellt. Das Enzym Diase spaltet die hochmolekularen α -Glucane, wodurch die Trübung verringert wird. Zum Vergleich ist das Enzym Ultraflo zugegeben. Das β -Glucan abbauende Enzym verändert die Trübung nicht. Auch die Nullprobe bleibt gleich. Durch dieses Beispiel konnte nachgewiesen werden, dass die Enzyme spezifisch angreifen und eine genaue Identifizierung der Trübungsursache möglich ist.

4.1.2.3 Eiweißtrübung

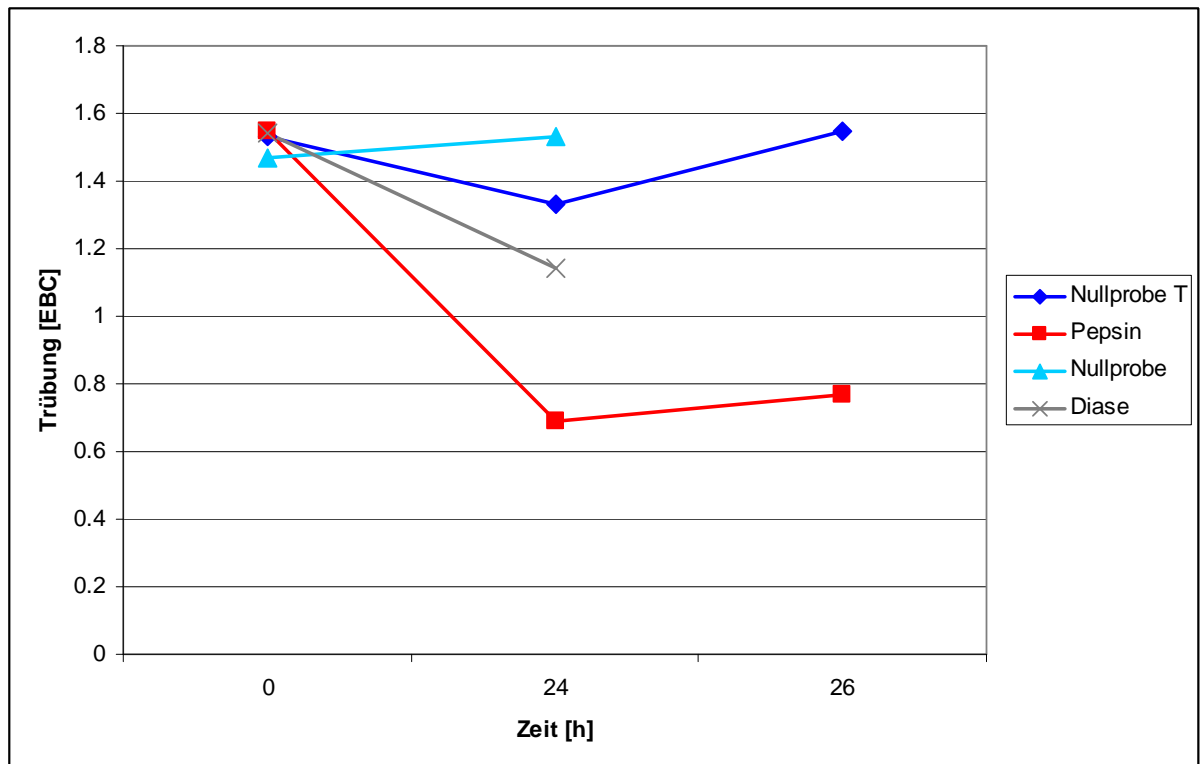


Abbildung 3: Abbau einer Eiweißtrübung

Die Identifizierung von Eiweißtrübungen verläuft etwas anders als bei den anderen Trübungen. Die Probe und die Nullprobe T als Vergleich müssen auf 40 °C erwärmt werden, damit Pepsin wirken kann. Die Trübung sinkt durch die Erwärmung normalerweise ab. Durch das Abkühlen auf 20 °C sollte die Nullprobe aber wieder auf den Ursprungswert zurückgehen. Der Vergleich mit anderen Enzymen läuft aber bei Raumtemperatur ab. Auch hier ist zusätzlich eine Nullprobe zu messen (siehe Abbildung 3).

In diesem Beispiel wird der Trübungswert durch Pepsin halbiert. Die erwärmte Nullprobe T nimmt nach dem Abkühlen (Messwert bei Zeit 26 h) den Ausgangswert wieder an. Das Enzym Diase verringert die Trübung leicht. Die Trübung wird auch hier durch zwei verschiedene Stoffgruppen verursacht.

Die Versuche haben gezeigt, dass die enzymatische Trübungsidentifizierung ein geeignetes Mittel ist, die trübungsverursachenden Stoffgruppen zu identifizieren. Die Enzyme bauen die Trübung spezifisch ab und diese kann dadurch einer Stoffgruppe zugeordnet werden. Die Trübung verringert sich nur bei dem entsprechenden

Enzym, bei den anderen Enzymen bleibt die Trübung konstant. Es ist aber auch möglich verschiedene Trübungsursachen in einer Probe zu erfassen.

4.1.2.4 Arabinoxylan- und Mannantrübung

Es konnten aus den eingesandten Proben kein Arabinoxylan und Mannan als Trübungsbildner festgestellt werden.

4.2 Ursachenfindung in der Praxis

Die enzymatische Trübungsidentifizierung erbringt den Nachweis, welche Stoffgruppen die Trübung verursachen. Als nächster Schritt muss die Stelle im Produktionsverlauf gefunden werden, bei der die Trübung entsteht. Erst dann kann mit der richtigen Technologie dem Problem entgegengewirkt werden.

4.2.1 α -Glucantrübung

Bisher wurde versucht, die Probleme mit α -Glucanen mit dem photometrischen Jodwert zu erfassen. In Würze ist dies meist möglich, da die Ursache nur ein ungenügender Stärkeabbau sein kann. In Bier ist die Quelle jedoch nicht mehr eindeutig zu identifizieren, da die Hefe Glycogen ausscheiden kann. Der photometrische Jodwert kann die Unterschiede zwischen den Molekülen nicht erfassen. Es werden zur genaueren Unterscheidung weitere Informationen, wie sie im Folgenden beschrieben werden, benötigt.

4.2.1.1 Modifizierter photometrischer Jodwert

Die Farbe der Jodfärbung der α -Glucane und somit die Wellenlänge, bei der das Maximum der Extinktion liegt, ist abhängig von der Kettenlänge der geradlinigen Helix⁶². Bei dem photometrischen Jodwert wird nur bei der Wellenlänge 578 nm die Extinktion gemessen. Es können damit keine Unterschiede in der Molekülstruktur

⁶² Bailey, J. M.; Whelan, W. J.: Physical Properties of Starch. In: *The Journal of Biological Chemistry* 236 (1961), Nr. 4, S. 969–973

sichtbar gemacht werden. Es gibt Praxisproben, bei denen der Grenzwert von 0,45 in Würze und Bier nicht überschritten wird, es aber dennoch zu α -Glucantrübungen kommt. Dies bedeutet, dass diese Methode für diese Fälle nicht ausreichend aussagekräftig ist. Aus diesem Grund wird versucht, über einen modifizierten photometrischen Jodwert nähere Informationen zu erhalten. Hierbei wird die Jodfärbung nicht nur bei der Wellenlänge 578 nm, sondern über den sichtbaren Bereich des Lichtes im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm gemessen. Die Auswertung der Messungen erfolgt qualitativ über eine graphische Darstellung der Messergebnisse (zum Beispiel über MS Excel). Eine quantitative Auswertung ist nicht möglich. Im Folgenden wird anhand der Reinsubstanzen gelöst in dest. Wasser die Verschiebung des Extinktionsmaximums der Jodfärbung in Abhängigkeit der Kettenlänge der Helix über den Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm beschrieben.

4.2.1.1.1 Amylose

Die durchgehende Helixstruktur der Amylose ermöglicht den Jodmolekülen eine vollständige Einlagerung. Die Elektronen der Jodmoleküle werden so angeregt, dass das abgestrahlte Licht blau erscheint. Das Maximum der Extinktion der Jodfärbung von Amylose liegt aus diesem Grund bei größer 600 nm bei 645 nm (siehe Abbildung 4).

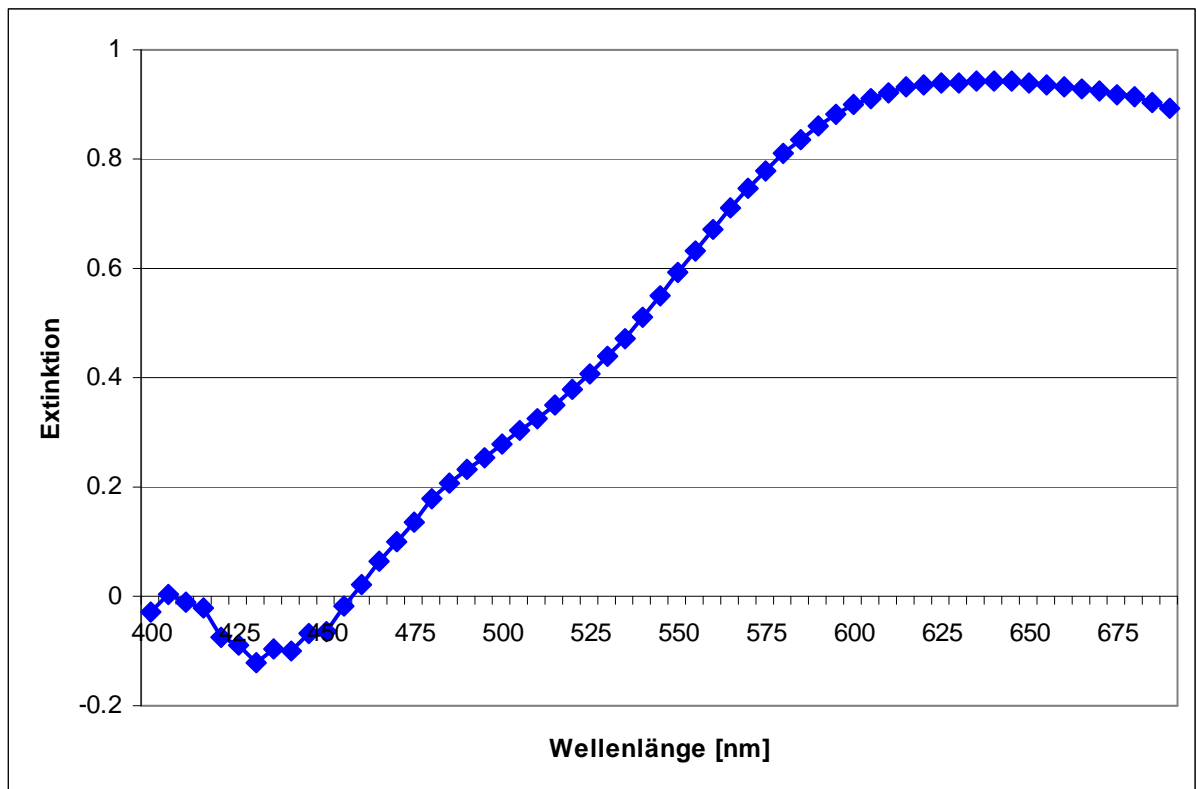


Abbildung 4: Jodfärbung von Amylose

4.2.1.1.2 Amylopectin

Amylopectin ist im Gegensatz zu Amylose verzweigt. Durch die Verzweigung sind die Helixabschnitte für eine vollständige Einlagerung der Jodmoleküle zu kurz. Dadurch liegt das Maximum der Extinktion der Jodfärbung von Amylopectin bei 545 nm (siehe Abbildung 5), also im violetten bis bräunlichen Bereich.

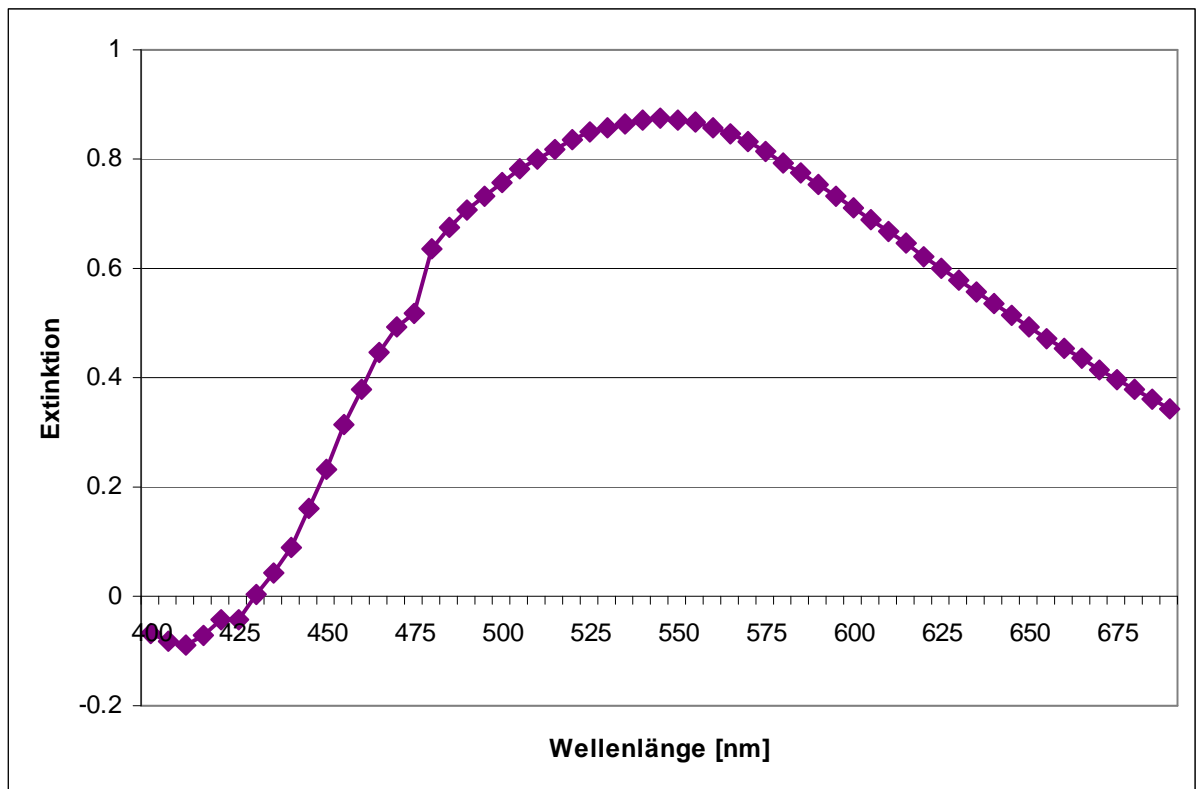


Abbildung 5: Jodfärbung von Amylopectin

4.2.1.1.3 Glycogen

Die hier verwendete Reinsubstanz ist aus Austern gewonnen, da Hefeglycogen im Handel nicht zu erhalten war. Das Glycogen ist ähnlich aufgebaut wie Amylopectin, jedoch stärker verzweigt. Die Helixabschnitte sind noch kürzer und die Jodmoleküle werden noch schlechter eingelagert. Das Maximum der Extinktion der Jodfärbung von Glycogen liegt bei 495 nm (siehe Abbildung 6), also im rötlichen Bereich.

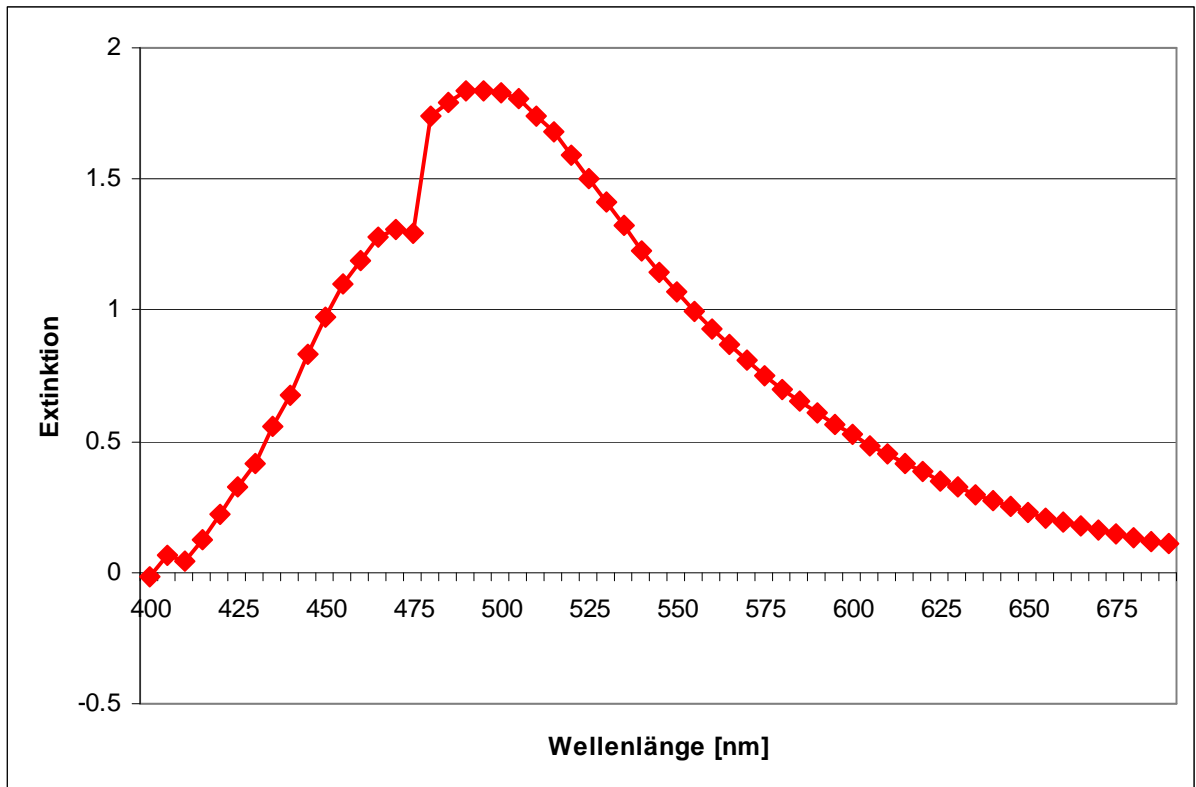


Abbildung 6: Jodfärbung von Glycogen aus Austern

4.2.1.1.4 Gewinnung von Hefeglycogen durch Hefezellaufschluss

Da Hefeglycogen als Reinsubstanz nicht erhältlich ist, wird Glycogen direkt aus Hefen durch Zerstören der Hefezellen mit Ultraschall gewonnen. Es wird angenommen, dass dieses Glycogen in Molekülgröße und Jodfärbung dem in Bier entspricht oder zumindest ähnlicher ist als die aus Austern gewonnene Reinsubstanz.

Der modifizierte Jodwert des Zellaufschlusses ist in der Abbildung 7 graphisch dargestellt. Der Verlauf ähnelt dem von Glycogen aus Austern. Das Maximum der Extinktion liegt bei 485 nm.

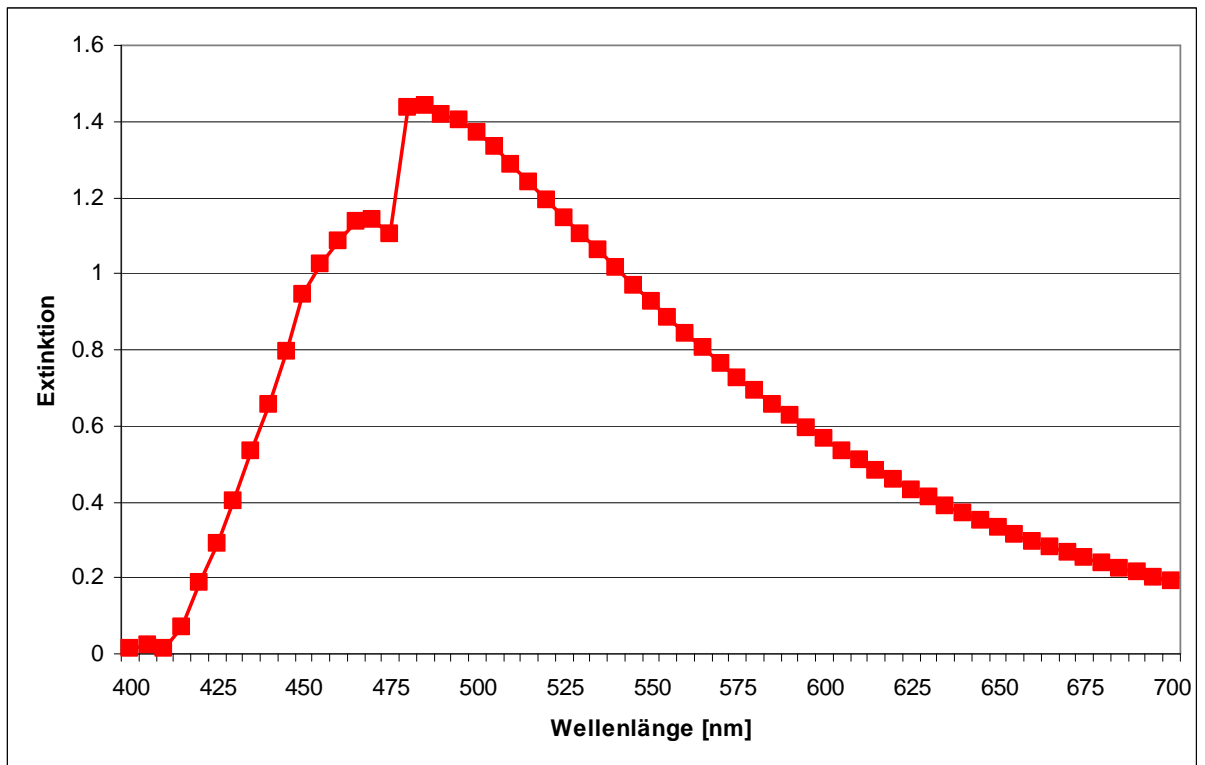


Abbildung 7: Jodfärbung von Glycogen aus dem Hefezellaufschluss

Die Messungen der Reinsubstanzen zeigen deutliche Unterschiede. Das Maximum der Extinktion der Jodfärbung wird mit zunehmendem Verzweigungsgrad zu kleineren Wellenlängen hin verschoben. Die modifizierte Methode kann somit mehr Aufschluss über die Trübungsursache geben als der normale Jodwert. Dies bedeutet aber nicht, dass mit der MEBAK-Methode diese Moleküle nicht erfasst werden. Im Fall von stark verzweigten Molekülen kann es aber passieren, dass die Extinktion bei Wellenlänge 578 nm (durch die Verschiebung des Maximums zu niedrigeren Wellenlängen) zu niedrig ist, um den Grenzwert zu überschreiten. Die daraus entstehenden Trübungsprobleme würden dadurch nicht erfasst werden.

4.2.1.1.5 Würze mit α -Glucantrübung

Die folgenden Messungen in Würze und Bier haben einen anderen Kurvenverlauf als die Reinsubstanzen. Es ist auffällig, dass das Maximum der Extinktion bei etwa 460 nm liegt (siehe zum Beispiel Abbildung 8). Dieser Peak ist in den Reinsubstanzen einschließlich des Hefezellaufschlusses nicht enthalten. Es kann nicht geklärt werden, wodurch dieser Peak entsteht. Anzunehmen ist, dass weitere Bierinhaltsstoffe mit Jod eine Färbung eingehen. Dieses Maximum ergibt keine

Aussage über das Vorhandensein von α -Glucanen. Der Peak erschwert jedoch die Interpretation besonders von Glycogen, da dort das Maximum bei etwa 500 nm sehr nahe liegt. Von entscheidender Bedeutung ist also erst der Bereich ab 480 nm. Ab diesem Bereich gibt es aber in den meisten Fällen kein Maximum der Extinktion mehr. Im mathematischen Sinne sind aber Wendepunkte im Kurvenverlauf zu sehen. Bei der dargestellten Würze in Abbildung 8 sind diese bei den Wellenlängen 530 und 605 nm. In dem Bereich dazwischen liegt nach den oben beschriebenen Ergebnissen das Maximum von Amylopectin.

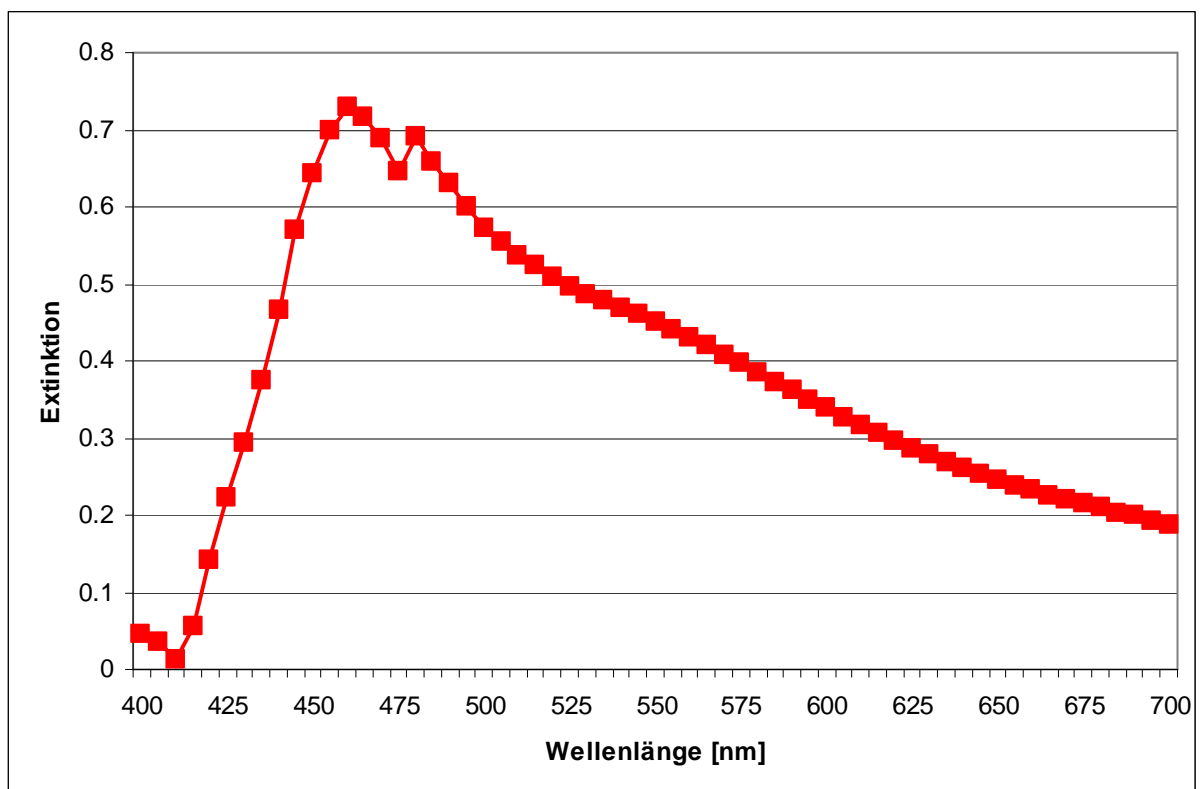


Abbildung 8: Jodfärbung einer Würze mit α -Glucantrübung

4.2.1.1.6 Bier mit α -Glucantrübung

Das im Folgenden beschriebene Bier weist eine α -Glucantrübung, verursacht durch unvollständigen Stärkeabbau, auf. Die graphische Auswertung zeigt, dass die Wendepunkte im Bereich von 515 bis 605 nm liegen (siehe Abbildung 9). Dies deutet darauf hin, dass die Jodfärbung durch Amylopectin ausgelöst wird.

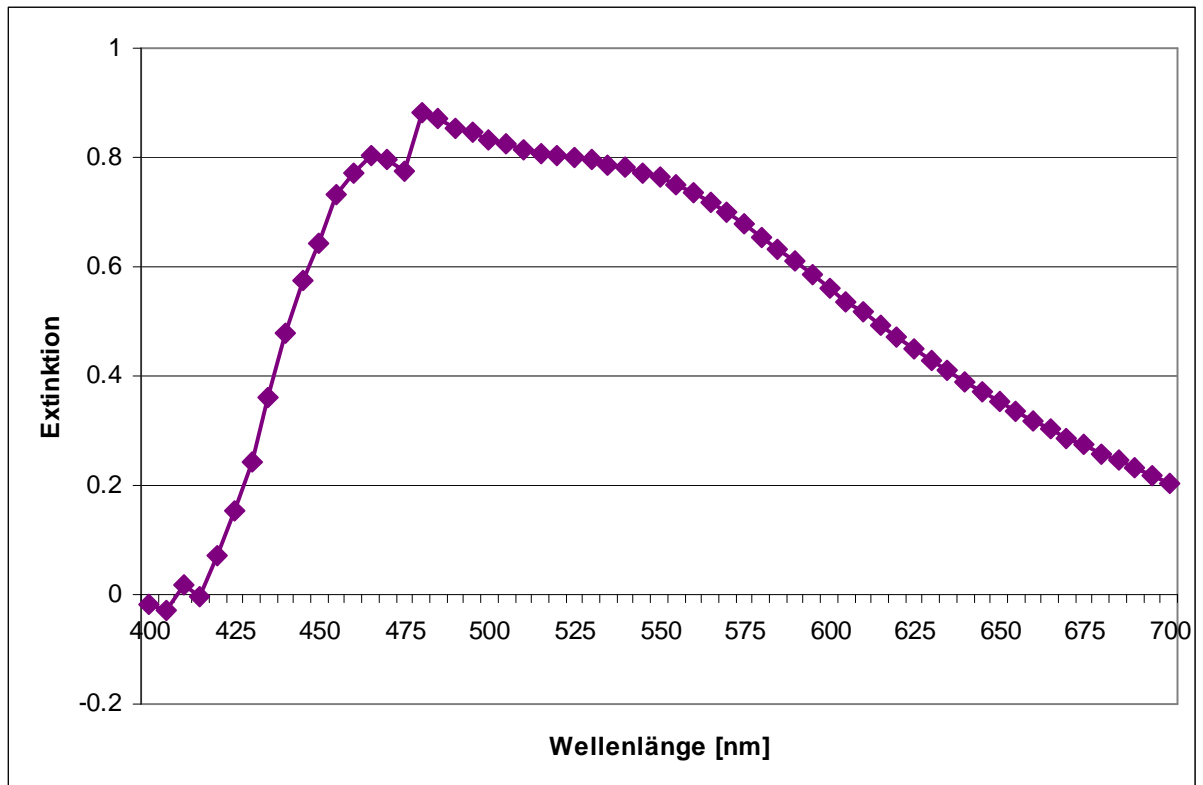


Abbildung 9: Jodfärbung eines Bieres mit α -Glucantrübung

4.2.1.1.7 Bier mit Glycogentrübung

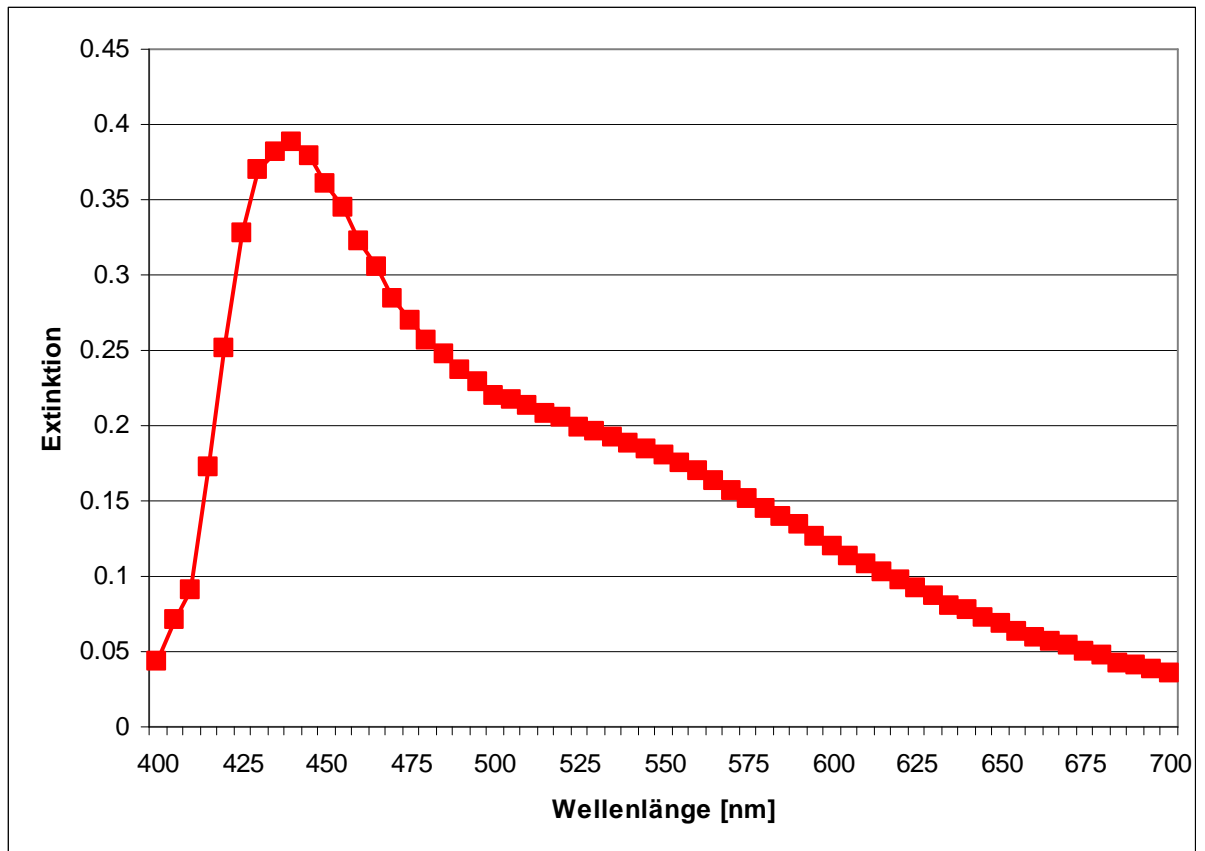


Abbildung 10: Jodfärbung eines Bieres mit Glycogentrübung

Das dargestellte Bier enthält Glycogen, das durch die Gärführung mit hohen Temperaturen von der Hefe freigesetzt wurde. Der Kurvenverlauf hat die Wendepunkte im Bereich von 500 bis 595 nm (siehe Abbildung 10). Der eingeschlossene Bereich ist im Vergleich zu den vorigen dargestellten Proben in Abbildung 8 und Abbildung 9 leicht zu niedrigeren Wellenlängen hin verschoben. Ob diese geringe Verschiebung ausreicht, um zu erklären, dass in dieser Probe Glycogen enthalten ist, wird aus den Versuchen nicht deutlich genug. Dies bedeutet, dass es mit dem modifizierten Jodwert allein auch noch nicht gelingt, Glycogen von Amylopectin zu unterscheiden. Hierzu ist ein weiterer Aufbereitungsschritt notwendig, wie er in den nächsten Kapiteln erläutert wird.

Eine Verschiebung des Spektrums hin in Richtung Amylose konnte in den gemessenen Proben nicht festgestellt werden. Amylose scheint als Trübungsbildner nicht in Frage zu kommen.

Die modifizierte Methode stellt eine zusätzliche Information zur normalen Methode dar. Durch die normale Methode erhält man „quantitativ“ eine Aussage über den Gehalt an hochmolekularen α -Glucanen. Die modifizierte Methode kann zusätzlich eine Aussage über die Molekülstruktur der α -Glucane geben. In Würze kann die modifizierte Methode die Problematik erklären, warum es passieren kann, dass der Grenzwert des normalen Jodwertes nicht überschritten wird, es aber doch zu Trübungen kommt. Bei stark verzweigten Amylopectinmolekülen kann der Kurvenverlauf zu kleineren Wellenlängen hin verschoben sein und mit dieser Methode erkannt werden. In Bier ist es schwieriger, einen Unterschied zwischen Glycogen und Amylopectin anhand einer Messung zu erkennen. Hier müssen innerbetrieblich mehrere Kurven vorliegen, um die Veränderungen, falls es zur Glycogenausscheidung kommt, zu erkennen.

4.2.1.2 Gelpermeationschromatographie

Da der modifizierte Jodwert nicht ausreicht, um Glycogen von den Stärkeabbauprodukten zu unterscheiden, wird die Gelpermeationschromatographie zur Größenaufftrennung eingesetzt. Die gesammelten Fraktionen werden mit dem modifizierten Jodwert gemessen und graphisch ausgewertet.

4.2.1.2.1 Hefezellaufschluss

Die Abbildung 11 zeigt die modifizierten photometrischen Jodwerte der einzelnen GPC-Fractionen. Es hat sich gezeigt, dass die Darstellung der Messwerte bei der Wellenlänge 580 nm für die Auswertung und Übersichtlichkeit sinnvoll ist. Bei der GPC werden die hochmolekularen Stoffe zuerst eluiert. Das bedeutet, dass in dieser Darstellung die Fractionen mit der niedrigen Zahl die hochmolekularen α -Glucane sind. Bei den Fractionen 4 und 5 zeigt sich eindeutig eine Jodfärbung. Zur qualitativen Beurteilung sind die Jodfärbungen der Fractionen 4 und 5 in der Abbildung 12 einzeln über den ganzen Wellenlängenbereich dargestellt. Der Kurvenverlauf ähnelt der Reinsubstanz in Abbildung 6 und dem Glycogen aus dem Hefezellaufschluss in Abbildung 7. Das Maximum der Extinktion liegt bei 490 nm. Das Glycogen aus der Hefe ist sehr hochmolekular und wird sofort eluiert.

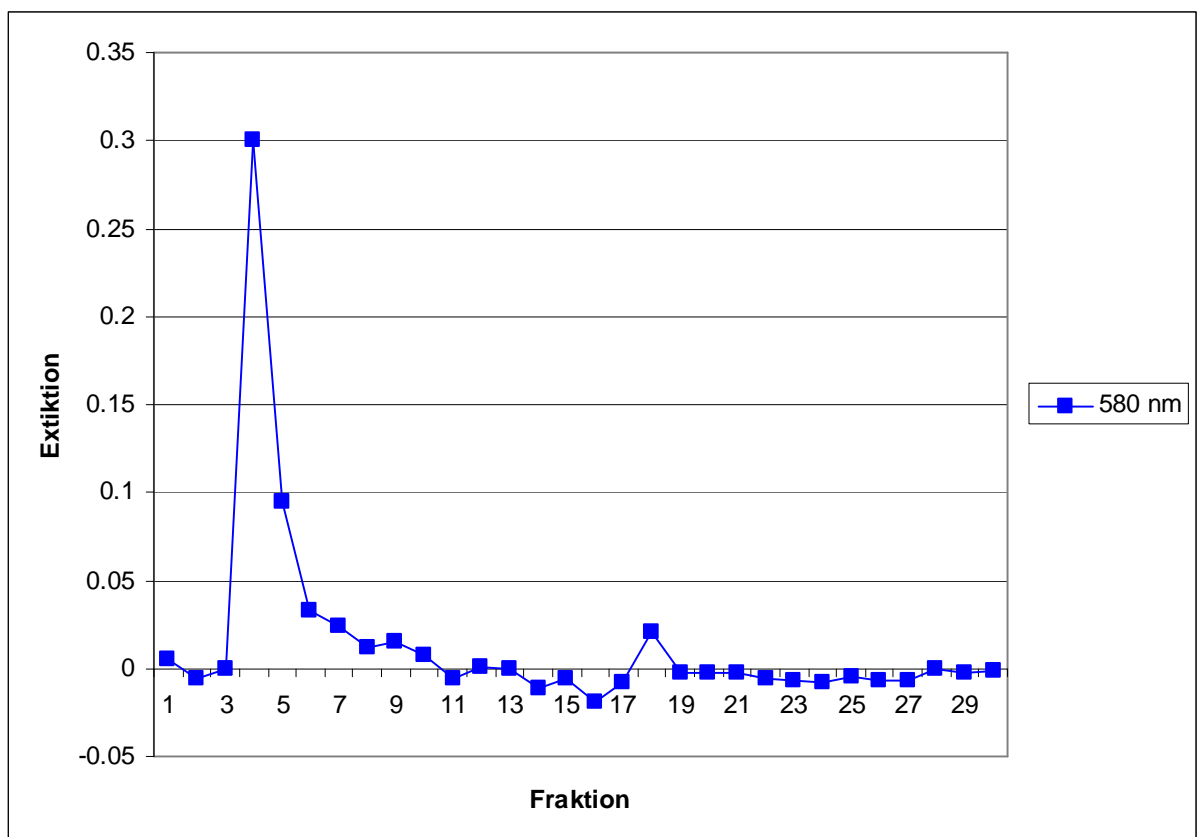


Abbildung 11: Jodfärbung der GPC-Fractionen des Glycogens aus dem Hefezellaufschluss

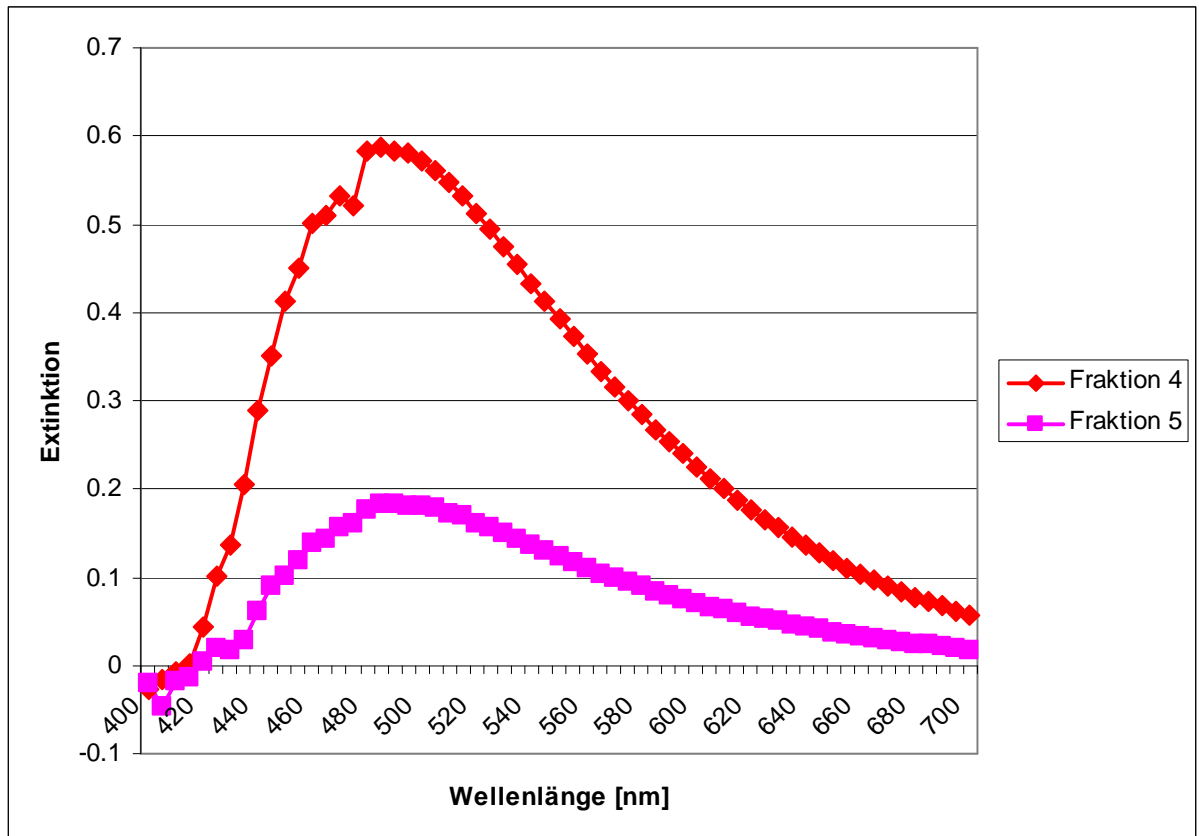


Abbildung 12: Jodfärbung der GPC-Fraktion 4 und 5 des Glycogens aus dem Hefezellaufschluss

4.2.1.2.2 Laborwürzen und -biere

In Anlehnung an die Veröffentlichung von MALCORPS⁶³ wurden im Labormaßstab Würzen und Biere hergestellt, die Glycogen aus der Hefe enthalten sollen. Hierzu wurde aus Würzekonzentrat eine 20 GG-%ige ungehopfte Würze ausgemischt und diese bei 22 °C vergoren. Das Jungbier wurde vier Tage bei 0 °C gelagert. Die Hefe wurde mit einer Zentrifuge geerntet und noch zweimal auf die gleiche Weise geführt, um zu überprüfen, ob die Glycogenabgabe sich verändert. Die Gärung der 3. Führung ist jedoch hängen geblieben und wurde nach sechs Tagen abgebrochen. Die Würze und die drei Biere wurden mit dem modifizierten photometrischen Jodwert und der GPC analysiert.

⁶³ Malcorps, P.; Haselaars, P.; Dupire, S.; Van den Eynde, E.: Glycogen released by the yeast as a cause of unfiltrable haze in the beer. In: *EBC Congress*. 1999, S. 831–838

Die enzymatische Trübungsidentifizierung ist in der Tabelle 14 dargestellt.

Probe	Trübungsabnahme [EBC]
Würze	0,46
1. Führung	0,59
2. Führung	1,66
3. Führung	0,53

Tabelle 14: Trübungsabnahmen durch Amyloglucosidase in Würze und Bier

Es zeigt sich eine geringe α -Glucantrübung bereits in der Würze. Die 1. Führung zeigt im Vergleich zur Würze nur eine minimale Erhöhung der Trübung. In der 2. Führung hingegen wird die Trübung durch Glycogen stark erhöht. Die weitere Führung hat allerdings wieder einen ähnlichen Wert wie die 1. Führung bzw. wie die Würze. In der Tabelle 15 sind die photometrischen Jodwerte der Proben aufgelistet. Auch hier zeigt sich ein ähnlicher Verlauf zwischen den einzelnen Führungen.

Probe	Photometrischer Jodwert
Würze	0,912
1. Führung	0,919
2. Führung	1,349
3. Führung	1,039

Tabelle 15: Photometrische Jodwerte der Würze und der Biere

Die modifizierten photometrischen Jodwerte der Würze und der Biere (siehe Abbildung 13) zeigen eine Jodreaktion der Würze im Bereich von 580 nm, bei Bier der 1. Führung im gleichen Bereich, bei Bier der 2. Führung eine Verschiebung hin zu 490 nm und bei Bier der 3. Führung wieder hin zu 580 nm. Dies deutet darauf hin, dass die Hefe bei der 2. Führung Glycogen während der Gärung an das Bier abgibt. Bei der 1. und bei der 3. Führung scheint dies noch nicht oder nicht mehr der Fall zu sein. Wie aber oben erwähnt, ist die qualitative Auswertung nur eindeutig möglich, wenn Vergleichswürzen oder -biere vorliegen.

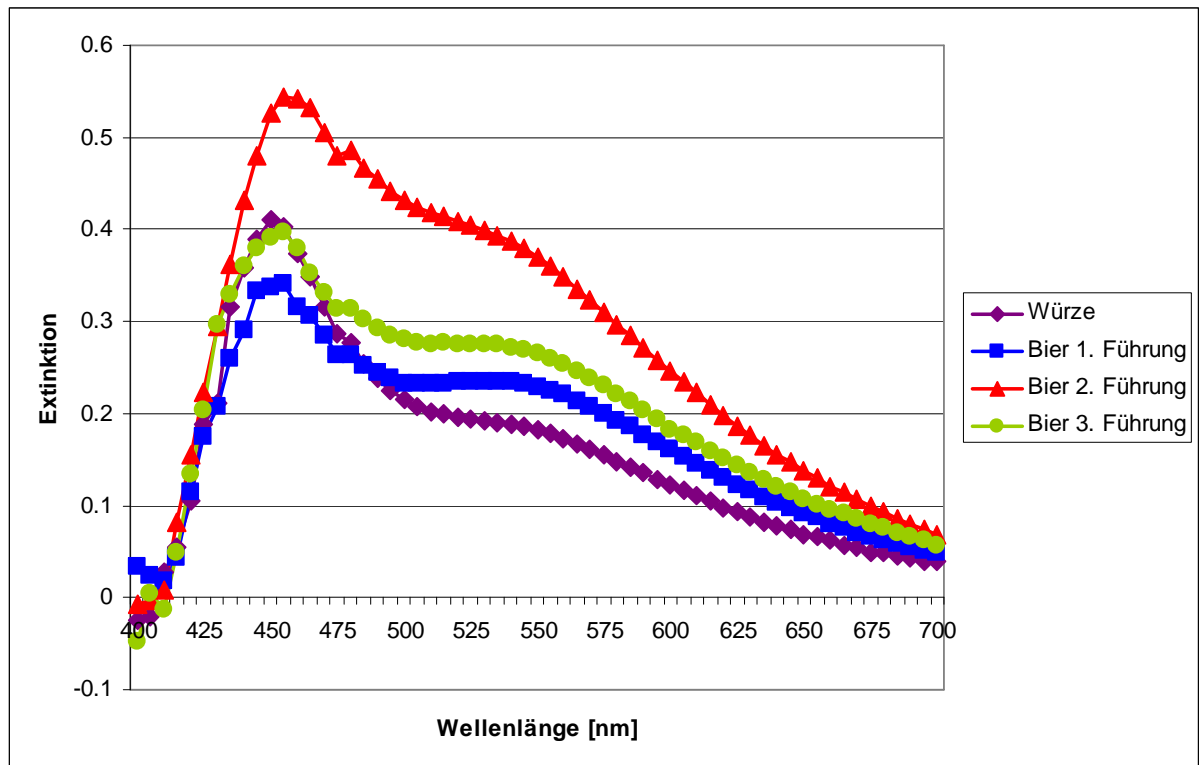


Abbildung 13: Modifizierte Jodwerte des Glycogenversuches

Die Würze und die Biere wurden mit der GPC aufgetrennt und mit dem modifizierten Jodwert gemessen. Die modifizierten Jodwerte der GPC-Fractionen (es sind nur die Messwerte der Wellenlänge 580 nm ausgewertet) sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

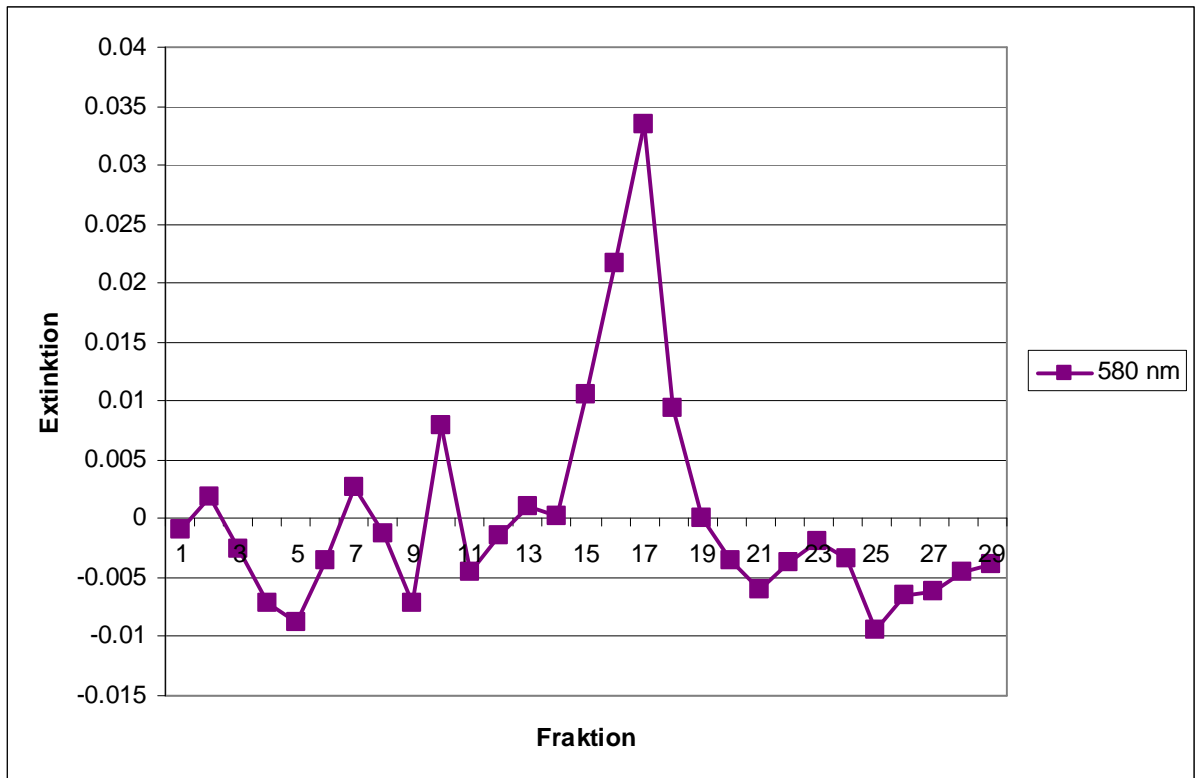


Abbildung 14: Jodfärbung der GPC-Fraktionen der Würze

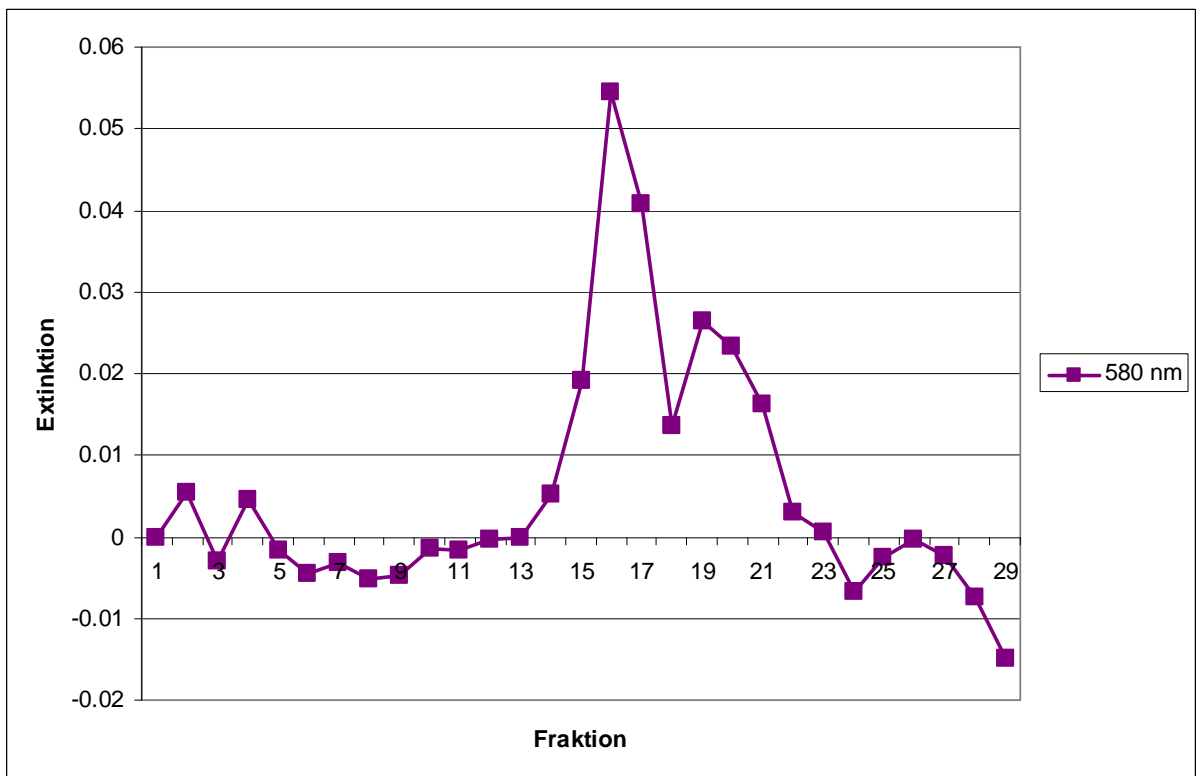


Abbildung 15: Jodfärbung der GPC-Fraktionen des Bieres der 1. Führung

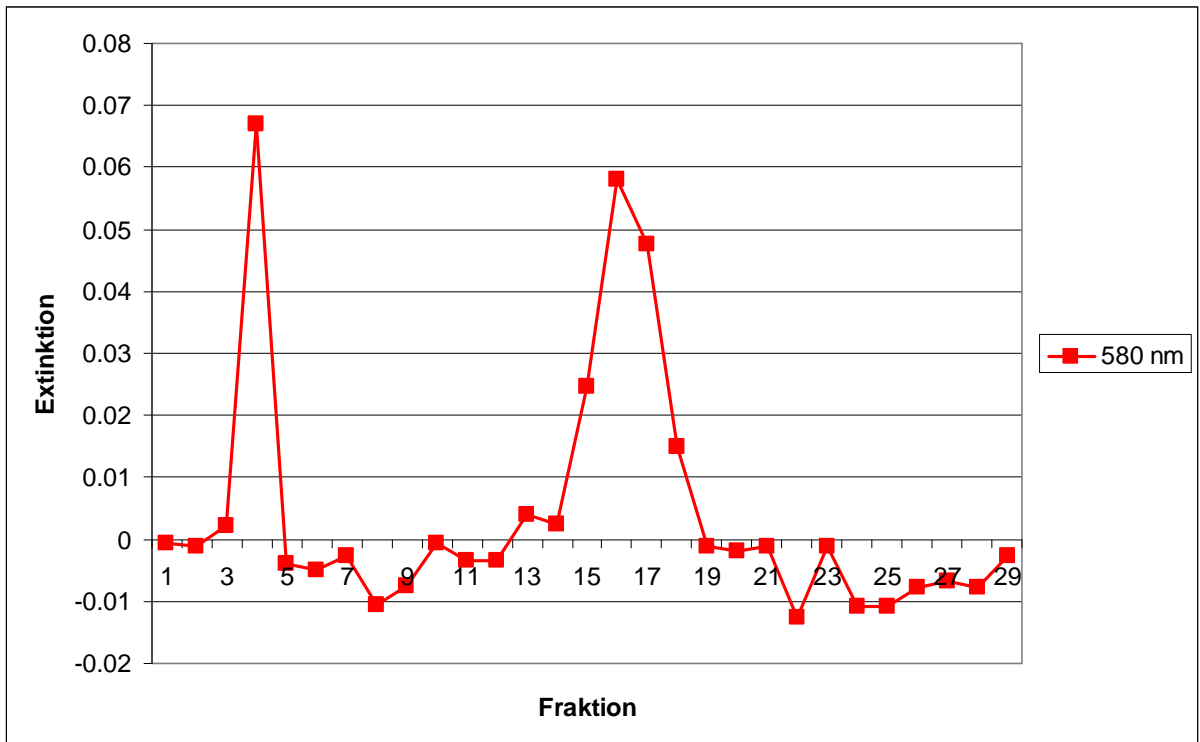


Abbildung 16: Jodfärbung der GPC-Fractionen des Bieres der 2. Führung

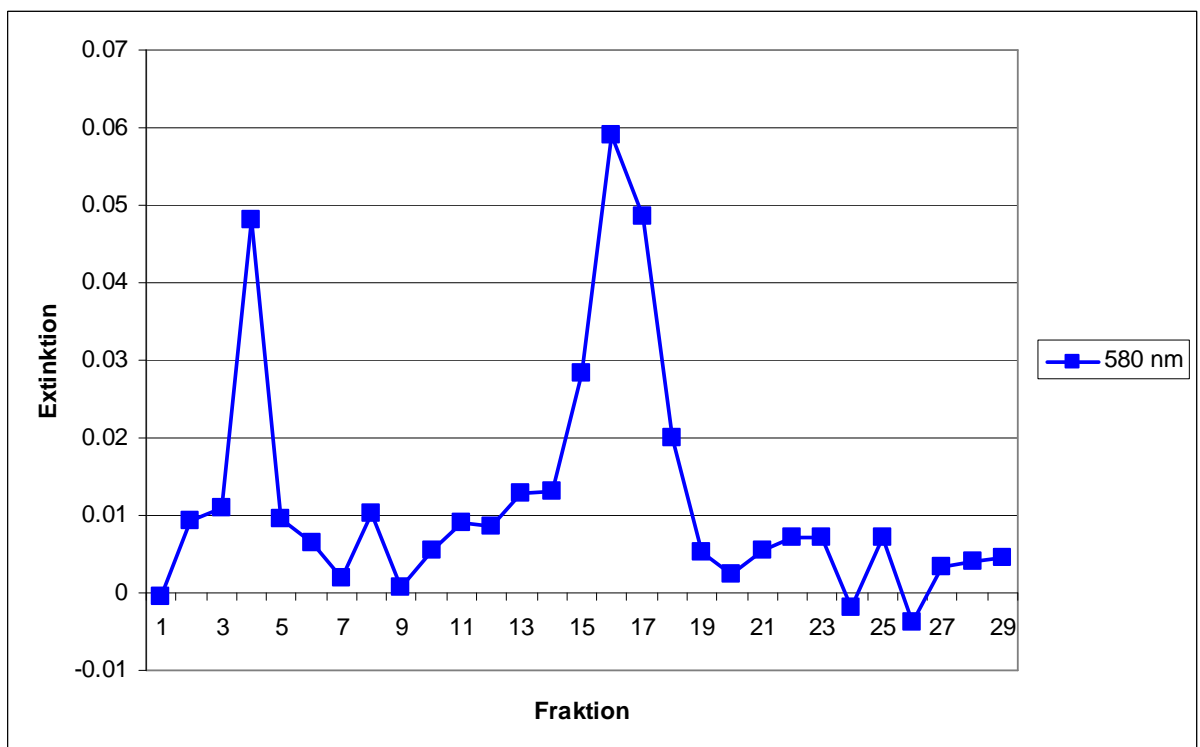


Abbildung 17: Jodfärbung der GPC-Fractionen des Bieres der 3. Führung

Die Würze (als Vergleich) zeigt eine starke Jodreaktion bei den Fraktionen 15, 16 und 17, also im Gegensatz zu den Messungen aus dem Hefezellaufschluss in einem

relativ niedermolekularen Bereich, obwohl die Würze selbst einen erhöhten photometrischen Jodwert aufweist. Die Biere der 1. und 3. Führung haben ebenso bei niedermolekularen Fraktionen eine Jodreaktion. Die Biere der 2. und 3. Führung zeigen aber eine starke Jodfärbung bei der Fraktion 4. Es zeigen sich also Veränderungen in den Molekülgrößen, die durch die Gärführung verursacht werden. Die Abbildung 18 zeigt die qualitative Auswertung der Fraktionen 4 und 16 aus der 2. Führung. Die Fraktion 4 hat einen ähnlichen Kurvenverlauf wie in der Abbildung 12 die Fraktion 4. Dies bedeutet, dass in der 2. Führung durch die Hefe Glycogen ausgeschieden wird. Anhand des Kurvenverlaufes der Fraktion 16 wird deutlich, dass hier Stärkeabbauprodukte enthalten sind.

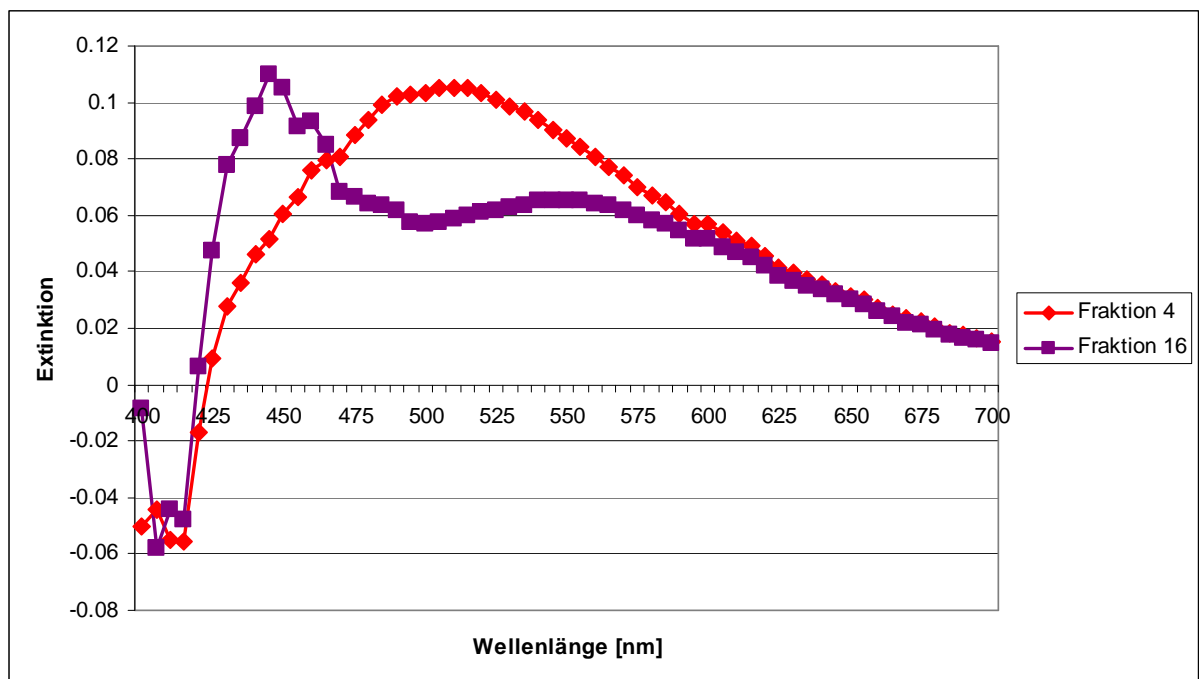


Abbildung 18: Modifizierter Jodwert der 4. und 16. Fraktion des Bieres der 2. Führung

Dieser Versuch hat gezeigt, dass es möglich ist, in Bier Glycogen von Stärkeabbauprodukten mit Hilfe der GPC und des modifizierten Jodwertes zu unterscheiden.

4.2.1.2.3 Praxisproben

Anhand von Praxisproben soll abgesichert werden, dass die Unterscheidung von Glycogen und Stärkeabbauprodukten in Bieren, die unter Betriebsbedingungen hergestellt sind, möglich ist. Hierzu werden drei verschiedene Biere untersucht, von denen der Ursprung der Trübung bekannt ist. Zum Vergleich wird zusätzlich ein nicht trübes Bier untersucht.

4.2.1.2.4 Standardbier ohne Trübung

In der Abbildung 19 ist die Jodfärbung bei der Wellenlänge 580 nm der einzelnen GPC-Fractionen eines Bieres ohne Trübung dargestellt. Die Messwerte zeigen bei den Fraktionen 2, 12 und 16 einen leichten Ausschlag. Zur qualitativen Beurteilung sind in der Abbildung 20 die Extinktionsverläufe über den gesamten Wellenlängenbereich dargestellt.

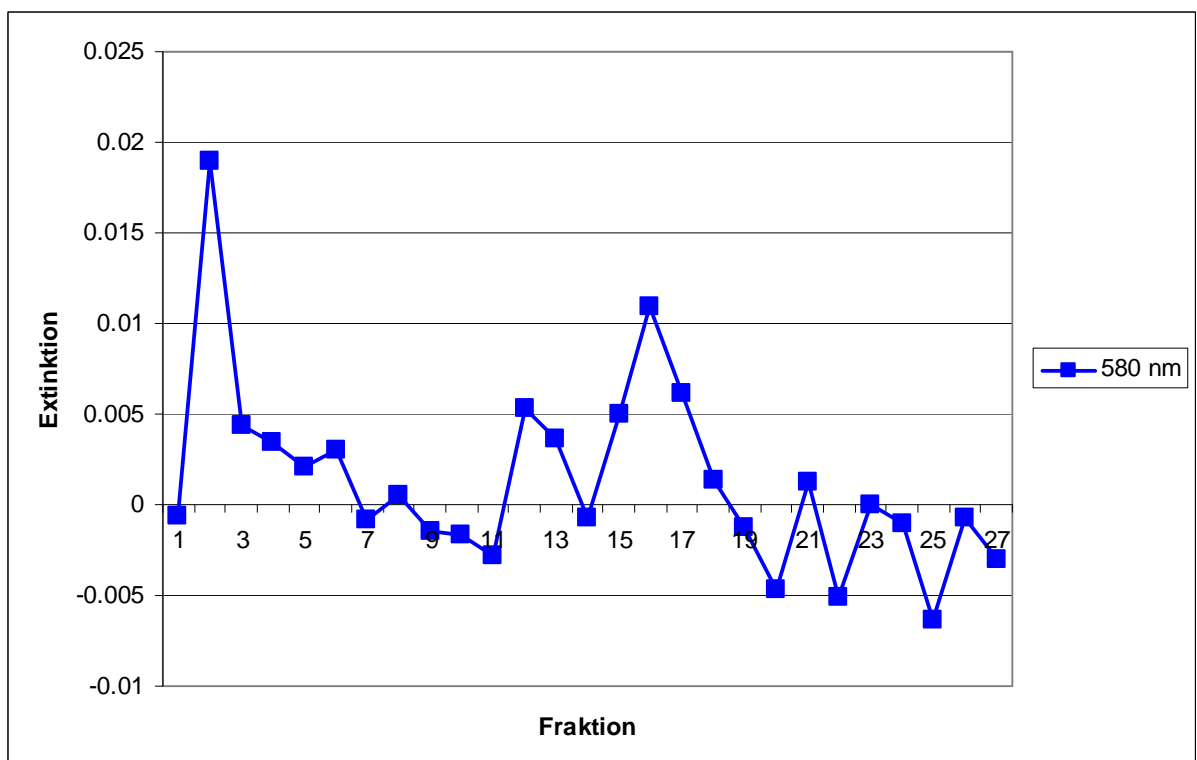


Abbildung 19: Jodfärbung der GPC-Fractionen eines Bieres ohne Trübung

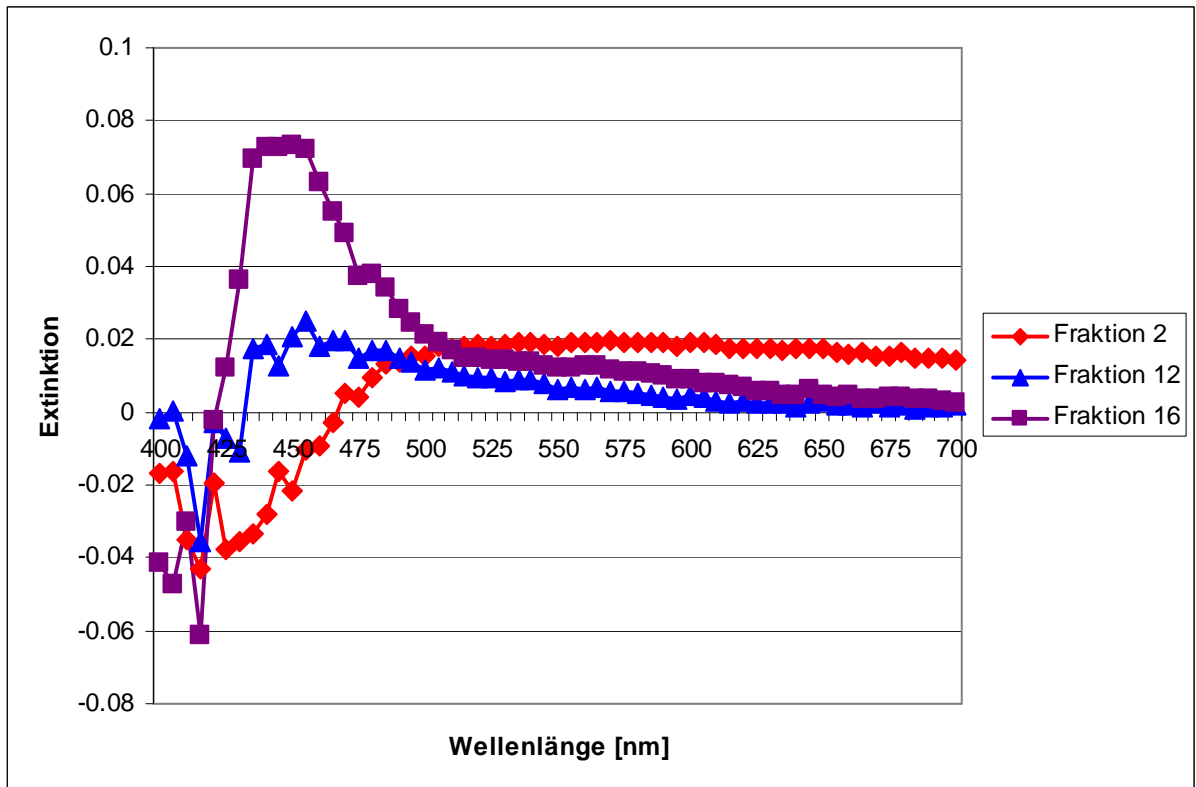


Abbildung 20: Jodfärbung der GPC-Fraktionen 2, 12 und 16

Der Verdacht, dass sich in der Fraktion 2 Glycogen befindet, bestätigt sich nicht. Der Kurvenverlauf entspricht nicht dem der Reinsubstanzen aus Abbildung 6 und Abbildung 7. Die Fraktion 16 könnte eventuell Amylopectin enthalten. Der Kurvenverlauf hat ein Plateau bei 550 nm. Der Extinktionswert ist jedoch sehr niedrig.

Wie aus den Messungen hervorgeht, ergibt ein nicht trübes Bier bei der GPC-Auftrennung mit modifizierter Jodwertmessung auch keine Hinweise auf α -Glucane und kann dadurch als Vergleich für andere Biere herangezogen werden.

4.2.1.2.5 Bier mit α -Glucantrübung

Die Trübung des Bieres wurde durch eine falsche Einstellung des Walzenpaares der Nassschrotmühle verursacht. Die modifizierten Jodwerte der GPC-Fraktionen ergibt Jodreaktionen bei der Fraktion 4 und im Bereich von den Fraktionen 16 bis 26 (siehe Abbildung 21). Zur qualitativen Beurteilung sind in der Abbildung 22 die Extinktionen über den gesamten Wellenlängenbereich der Fraktionen 4 und 20 graphisch dargestellt.

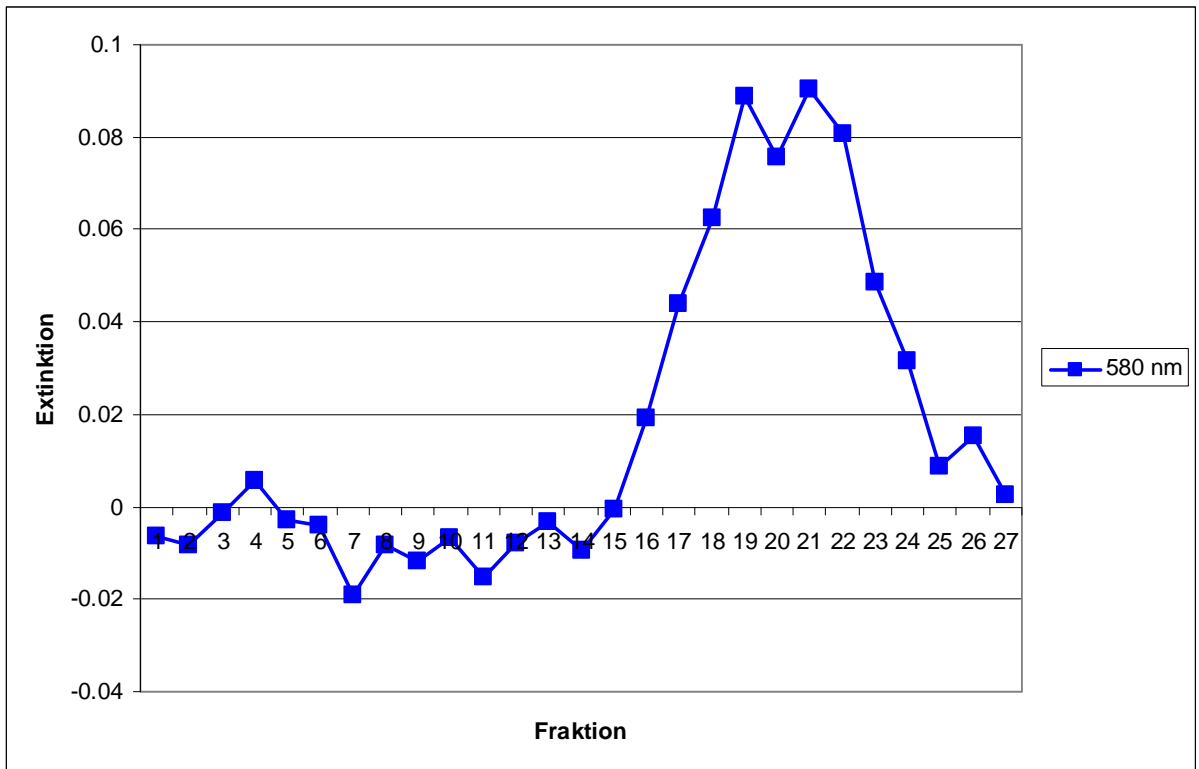


Abbildung 21: Jodfärbung der GPC-Fractionen eines Bieres mit α -Glucantrübung

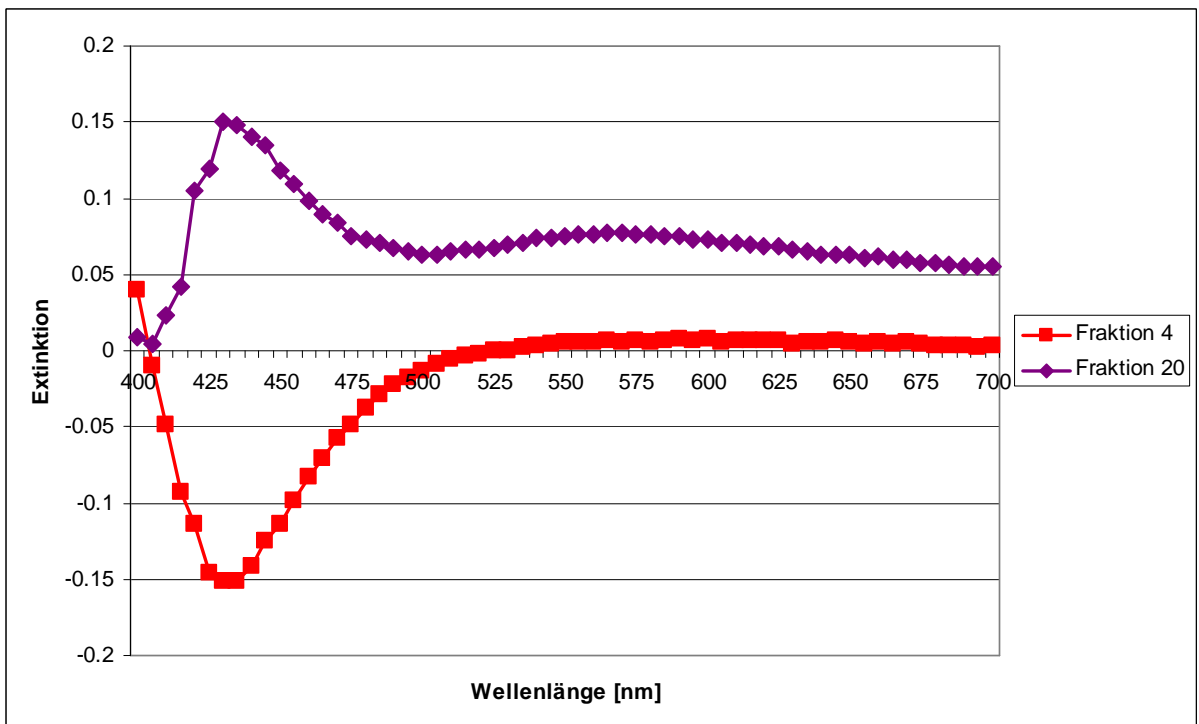


Abbildung 22: Jodfärbung der GPC-Fractionen 4 und 20

Die Fraktion 4 steht unter dem Verdacht, α -Glucane zu enthalten. Der Kurvenverlauf bestätigt dies nicht. Die Fraktion 20 zeigt einen eindeutigen Verlauf, der dem von Amylopectin ähnelt. Auch im Vergleich zu dem Verlauf aus dem Bier ohne Trübung (siehe Abbildung 20) zeigt sich in diesem Fall eine eindeutige Reaktion und somit ein Nachweis für einen ungenügenden Stärkeabbau.

4.2.1.2.6 Bier mit Glycogentrübung

Das Bier wurde mit High-Gravity-Verfahren eingebraut und erst bei der Filtration verdünnt. Die Gärtemperaturen lagen bei 18 °C. Dies sind Voraussetzungen für die Glycogenausscheidung der Hefe, wie sie im Kapitel Grundlagen und Kenntnisstand erläutert sind. Das Bier wies eine Trübung von etwa 0,8 EBC auf, die als α -Glucantrübung identifiziert wurde. Die GPC-Auftrennung des Bieres zeigt eine starke Jodreaktion im hochmolekularen Bereich (Fraktion 4), aber auch bei den Fraktionen 17 bis 23 (siehe Abbildung 23). Die Kurvenverläufe der Extinktionen über den gesamten Wellenlängenbereich der Fraktion 4 und 19 sind in der Abbildung 24 dargestellt.

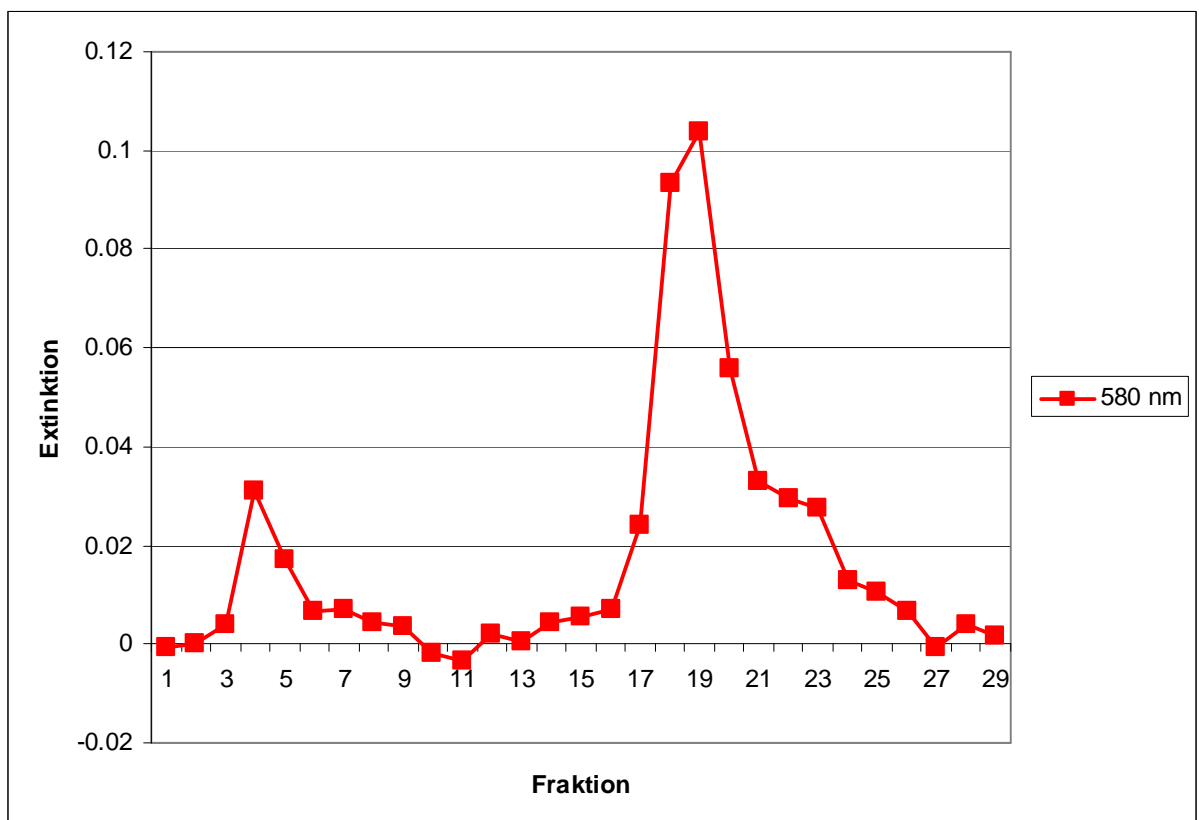


Abbildung 23: Jodfärbung der GPC-Fractionen eines Bieres mit Glycogentrübung

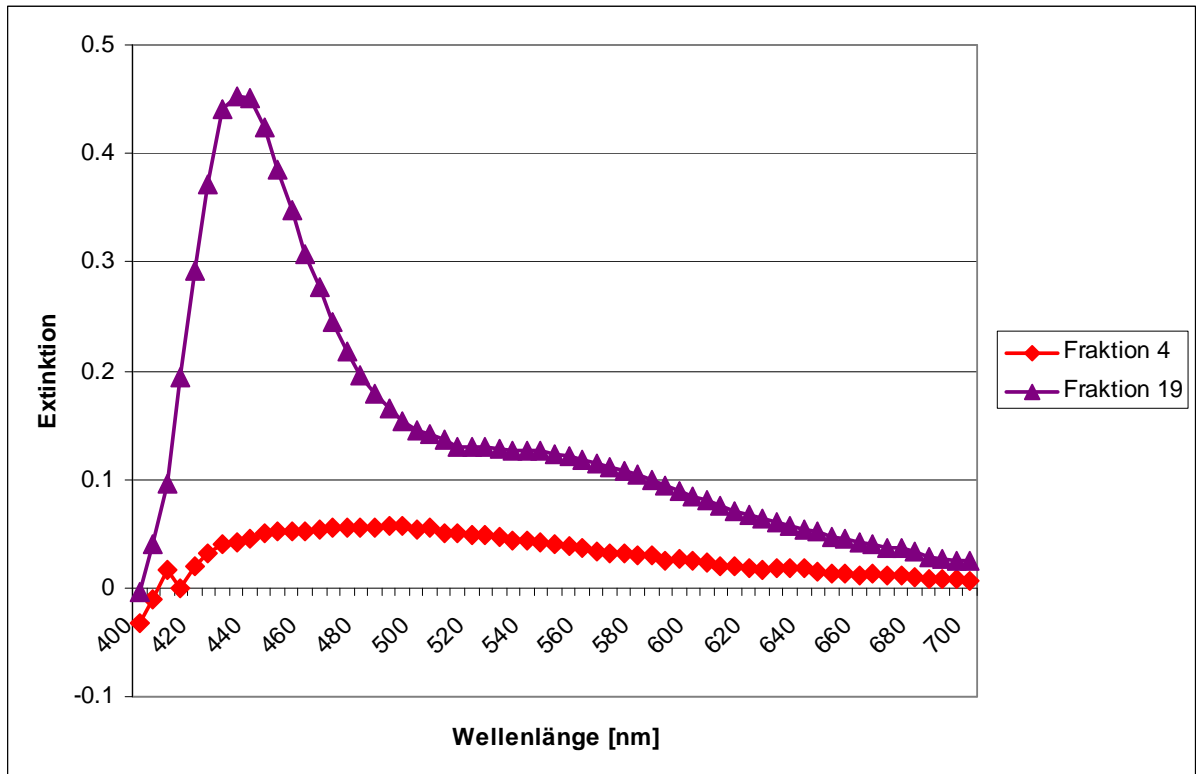


Abbildung 24: Jodfärbung der GPC-Fraktionen 4 und 19

Der Kurvenverlauf der Fraktion 4 hat eine Ähnlichkeit mit dem des Glycogens. Das Maximum der Extinktion liegt bei etwa 500 nm. Dies ist ein klarer Nachweis, dass die Hefe Glycogen an das Bier abgegeben hat. Der andere Verlauf zeigt ein Maximum der Extinktion bei etwa 560 nm. Hierbei handelt es sich um Abbauprodukte aus der Stärke.

Die hier vorgestellten Methoden, die GPC-Auftrennung von Würze und Bier zusammen mit dem modifizierten Jodwert, ermöglichen, den Ursprung der α -Glucantrübungen eindeutig zu identifizieren. Mit dieser Methode kann Glycogen von Amylopectin unterschieden werden. Es hat sich gezeigt, dass das Glycogen der Hefe hochmolekularer ist als die Abbauprodukte der Stärke. Das Glycogen ist in den Fraktionen 3 bis 5 der GPC, die Stärkeabbauprodukte frühestens ab den Fraktionen 13 enthalten.

4.2.1.3 Stufenkontrolle bei α -Glucantrübungen

Aus den vorher dargestellten Ergebnissen ist es möglich, eine Stufenkontrolle zur Klärung der Herkunft der hochmolekularen α -Glucane für die Betriebskontrolle zu

beschreiben. Anhand der Ergebnisse der Stufenkontrolle kann das Problem der Trübung schnell eingegrenzt und technologisch behoben werden. Festgestellt wird die Trübung erst bei der Filtration. Zu diesem Zeitpunkt ist die Quelle der α -Glucane (Glycogen oder Stärkeabbauprodukte) nicht bekannt. Der erste Schritt (nach der enzymatischen Identifizierung α -Glucantrübung) ist der Nachweis auf Glycogen mit der Messung der modifizierten Jodwerte der GPC-Fractionen. Im Falle einer Glycogen-trübung ist das Hefemanagement zu überprüfen. Aus den Laborversuchen (Kapitel 4.2.1.2.2) hat sich gezeigt, dass die 1. Führung noch kein oder nur wenig Glycogen freigesetzt hat. Die Hefe sollte also nur einmal verwendet werden. Alternativ könnte vorübergehend die Gärtemperatur herabgesetzt werden.

Ist kein Glycogen in der Probe enthalten, liegt das Problem in einem mangelnden Stärkeabbau. Hierzu ist das verwendete Malz auf seine Lösungsmerkmale zu überprüfen. Die zytolytische Lösung muss mit dem Maischverfahren abgestimmt sein, damit der Angriff an die Stärkekörner erfolgen kann. Ein weiterer Punkt sind die enzymatischen Aktivitäten des Malzes, besonders die der α -Amylase.

Eine gute Schrotsortierung ist für den Stärkeabbau notwendig. Trockenschrot kann mit der Schrotsortierung überprüft werden. Es ist auf eine vollständige Ausmahlung der Spelzen zu achten. Bei Nassschrot ist die Überprüfung des Schrotes sehr schwierig, da keine Sortierung möglich ist. Die einzige Möglichkeit besteht darin, die Maischeprobe direkt beim Einmaischen visuell zu begutachten. Es dürfen keine ganzen Körner in der Maische enthalten sein. Die Grobgrieße müssen aus den Spelzen vollständig herausgequetscht sein. Eine Probenahme während des Maischens macht keinen Sinn. Erst wieder beim Läutern ist es möglich, aussagekräftige Proben zu nehmen. Die Probenahmestellen sind folgende:

- Vorderwürze
- Nachgüsse
- Würze nach der Heißtrubgabe
- Pfannevollwürze
- Ausschlagwürze und
- Heißtrubprobe.

Die Proben werden mit dem photometrischen und (falls notwendig) zusätzlich mit dem modifizierten Jodwert überprüft. Es ist zu beachten, dass die Proben von

Vorderwürze bis Pfannevollwürze normalerweise noch Enzymaktivitäten aufweisen. Die Proben sind sofort zu kühlen und zu analysieren, da sonst durch die enzymatische Restaktivität die α -Glucane abgebaut werden und der Jodwert sich verringert.

Aus den Ergebnissen der Analysen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Ist der Jodwert in der Vorderwürze erhöht, entsteht das Problem vor dem Abläutern. Hier kommen eine Kombination aus Malzqualität und Maischverfahren in Frage. Die Schrotmühle ist auf die richtigen Einstellungen zu überprüfen. Die Temperaturfühler sind auf ihre Tauglichkeit hin zu testen. Die Abmaischtemperatur darf nicht über 78 °C liegen.

Wird der Jodwert durch die Nachgüsse erhöht, ist die Wassertemperatur des Anschwänzwassers zu hoch (über 78 °C). Hier ist besonders auf die Wassermischung zu achten. Langsam reagierende Wassermischer können Temperaturspitzen von über 80 °C auslösen, die die α -Amylase inaktivieren oder Stärke aus den Trebern herauslösen.

Wird der Heißtrub zur Würzerückgewinnung auf den Läuterbottich gegeben, sind hierbei die Temperatur (auch hier gilt nicht über 78 °C) und eventuell der Gehalt an Stärkepartikeln aus der Kochung zu beachten. Die Heißtrubprobe wird mikroskopisch untersucht. Dazu werden die Stärkepartikeln mit Jod angefärbt. Sie erscheinen unter dem Mikroskop in einer violetten Farbe (siehe Abbildung 25).



Abbildung 25: Heißtrub, gefärbt mit Jod

Ein Anstieg des Jodwertes von der Pfannevoll- zur Ausschlagwürze deutet darauf hin, dass während des Läuterns Stärkekörner in die Läuterwürze gelangen, die durch das Kochen gelöst werden. Sollte die Probennahme der Pfannevollwürze erst bei Kochbeginn genommen werden, ist zu beachten, dass der Stärkeaufschluss bereits vollzogen ist und dadurch der Jodwert der Pfannevollwürze erhöht wird. Ein Anstieg zur Ausschlagwürze ist dann nicht mehr zu erwarten.

Als Beispiel für den Ablauf der Stufenkontrolle wird ein Trübungsproblem aus der Praxis dargestellt:

Die Eingangstrübung der filtrierten Probe betrug 0,83 EBC (Messwinkel 90°). Die Trübungsidentifizierung auf α -Glucane ergab eine Trübungsabnahme um 0,60 EBC. Das Bier wurde mit der GPC aufgetrennt und die Fraktionen mit dem modifizierten Jodwert analysiert.

Aus den Fraktionen der GPC ließ sich kein Hinweis auf Glycogen erkennen. Dies bedeutet, dass die Hefe als Ursache ausgeschlossen werden konnte und das Problem im Sudhaus liegen musste. Als nächstes schloss sich die Kontrolle der

Würze nach dem oben beschriebenen Probenplan an. In der Tabelle 16 sind die photometrischen Jodwerte angegeben.

Probe	Photometrischer Jodwert
Vorderwürze	0,531
Anschwänzwürze	0,465
Heißtrubwürze	0,283
Pfannevollwürze	0,354
Ausschlagwürze	0,262

Tabelle 16: Photometrische Jodwerte der Proben der Stufenkontrolle

Auf die Messung der modifizierten Jodwerte konnte verzichtet werden, da die Ergebnisse der normalen Jodwerte aussagekräftig genug waren.

Hieraus ließ sich eindeutig zeigen, dass das Problem vor dem Läutern entstanden war, da der Jodwert der Vorderwürze am höchsten war und danach die Werte (bis auf die Pfannevollwürze) wieder abnahmen. Der Wert der Pfannevollwürze stieg leicht an, da hier eine Mischung aus der Vorderwürze und den Nachgüssen vorliegt. Die Ursache ist also beim Malz, Schrotten oder Maischen zu suchen. Die Malzanalyse hat keine abweichenden Werte von der geforderten Spezifikation ergeben. Die Schrotprobe (Maischeprobe) der Nassschrotmühle hat bei der visuellen Begutachtung keine Auffälligkeiten gezeigt. Die Maischbedingungen und die Abmaischtemperatur waren in Ordnung. Eine Überprüfung der Einstellungen der Schrotmühle hat jedoch von den Normwerten Abweichungen ergeben. Nach Veränderung des Walzenabstandes war das Problem der hohen Jodwerte und der Trübung behoben.

4.2.2 Eiweißtrübungen

Die Ursachenfindung für Eiweißtrübungen ist schwieriger als bei den α -Glucantrübungen. Der Eiweißabbau von der Gerste bis zum Malz und während des Bierbereitungsprozesses ist sehr vielschichtig. Es finden sowohl Stoffabbau, Aufbau als auch durch Denaturierung nicht spezifizierbare Vergrößerung statt. In dieser Arbeit wird zur Identifizierung der Proteine die Gelelektrophorese zur Hilfe genommen. Die Proben werden nativ aufgetragen, da versucht werden soll, die

trübungsrelevanten Molekülgrößen zu erfassen. Es wird ein Gel verwendet, das möglichst im hochmolekularen Bereich die Proteine auftrennt. Zur Größenbestimmung wurden zwei verschiedene Proteinstandards verwendet. Die Abbildung 26 zeigt die Auftrennungen der beiden Standards. Die Proteine des Standards 2 sind eingefärbt (sichtbar, bevor die Färbung mit Silber erfolgt) und lassen sich dadurch leichter zuordnen. Die Molekülgrößen der Standards sind in der Tabelle 17 aufgelistet.

Standard 1		Standard 2	
Molekülgröße [kDa]	Protein	Molekülgröße [kDa]	Protein
205	Myosin	250	keine Angaben des Herstellers
116	β -Galactosidase	150	
97	Phosphorylase b	100	
80	Transferrin	75	
66	BSA	50	
55	Glutamate dehydrogenase	37	
45	Ovalbumin	25	
30	Carbonic anhydrase	20	
21	Trypsin inhibitor	15	
14	Lysozyme	10	
6	Aprotinin		

Tabelle 17: Molekülgrößen der verwendeten Proteinstandards

Bei dem verwendeten Gel wandern die Proteine mit der geringeren Größe schneller durch das Gel als die hochmolekularen (in allen Abbildungen in dieser Arbeit rechts nach links). Das Gel trennt in der Abbildung 26 die Proteine des Standards 2 mit den Molekülgrößen 25 bis 250 kDa auf. Kleinere Moleküle wandern durch das Gel hindurch. Das Protein mit 250 kDa wandert ein gutes Stück in das Gel hinein. Es ist dadurch anzunehmen, dass auch noch größere Proteine mit diesem Gel aufgetrennt werden können.

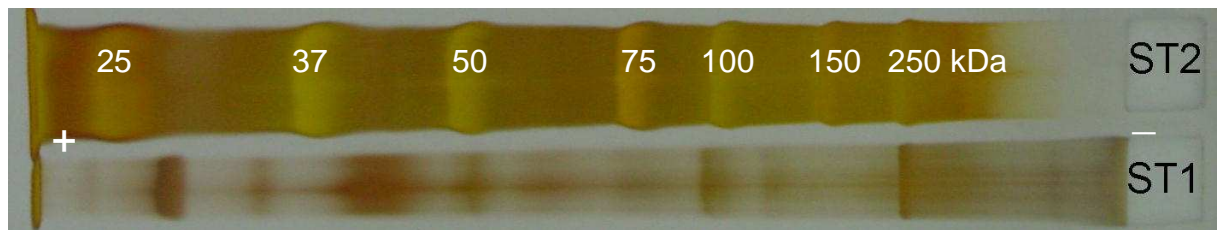


Abbildung 26: Auftrennungen der verwendeten Proteinstandards 1 (ST1) und 2 (ST2)

Es wird davon ausgegangen, dass die schaumpositiven Proteine (Molekülgröße 30 bis 50 kDa) keine Trübungen verursachen. Aus diesem Grund sind die Molekülgrößen über 50 kDa von besonderem Interesse und werden bei dieser Untersuchung besonders berücksichtigt. Der Hauptanteil der Proteine in der Würze oder im Bier kommt aus dem Malz. Es scheint ein ungenügender Eiweißabbau für Trübungen verantwortlich zu sein. Es ist aber auch möglich, dass die Hefe unter bestimmten Voraussetzungen als Quelle für Eiweißtrübungen in Frage kommt.

4.2.2.1 Proteine aus dem Malz

Der nachfolgende Versuch soll zeigen, ob es möglich ist, hochmolekulare Proteine von der Gerste bis zum Bier im Labormaßstab mit der angewandten Methode nachzuweisen. Verglichen werden sowohl zwei Gerstensorten als auch zwei aus diesen Gersten hergestellte Malze. Die Malze wurden im Kongressmaßstab mit zwei Maischprogrammen (Eyben- und Hoch-Kurz-Maischverfahren) verarbeitet. Das Eybenverfahren berücksichtigt den Proteinabbau durch eine Rast bei 45 °C. Beim Hoch-Kurz-Maischverfahren wird diese Rast nicht eingehalten. Die Kochung erfolgte mit 180 mg Hopfenpellets eine Stunde mit Rückflusskühler. Die Würzen wurden geteilt. Eine Hälfte wurde mit Milchsäure auf pH 4,4 und mit Ethanol auf 5 Vol.-% versetzt und zwei Wochen bei 0 °C gelagert. Die andere Hälfte mit Hefe eine Woche bei 12 °C vergoren und eine Woche bei 0 °C gelagert.

In Abbildung 27 sind die Kaltauszüge (10 g Gersten- bzw. Malzfeinschrot auf 100 ml Brauwasser, 0,5 h bei 20 °C geschüttelt) der Gersten (Probe 1 und 2) und der daraus hergestellten Malze (Probe 3 und 4) dargestellt. In den Gersten sind eindeutige Banden im nieder- bis mittelmolekularen Bereich bis zu einer Molekülgröße von 100 kDa sichtbar. Durch den Mälzungsprozess verschwinden und verschwimmen einige Banden, was auf einen Abbau der Proteine hindeutet. Zusätzlich sind im höhermolekularen Bereich des Gels leichte Färbungen im Bereich um 250 kDa zu

erkennen. Dies bedeutet, dass durch den Mälzungsprozess Proteine freigesetzt werden können, die eine Molekülgröße haben, die für Trübungen verantwortlich gemacht werden kann.

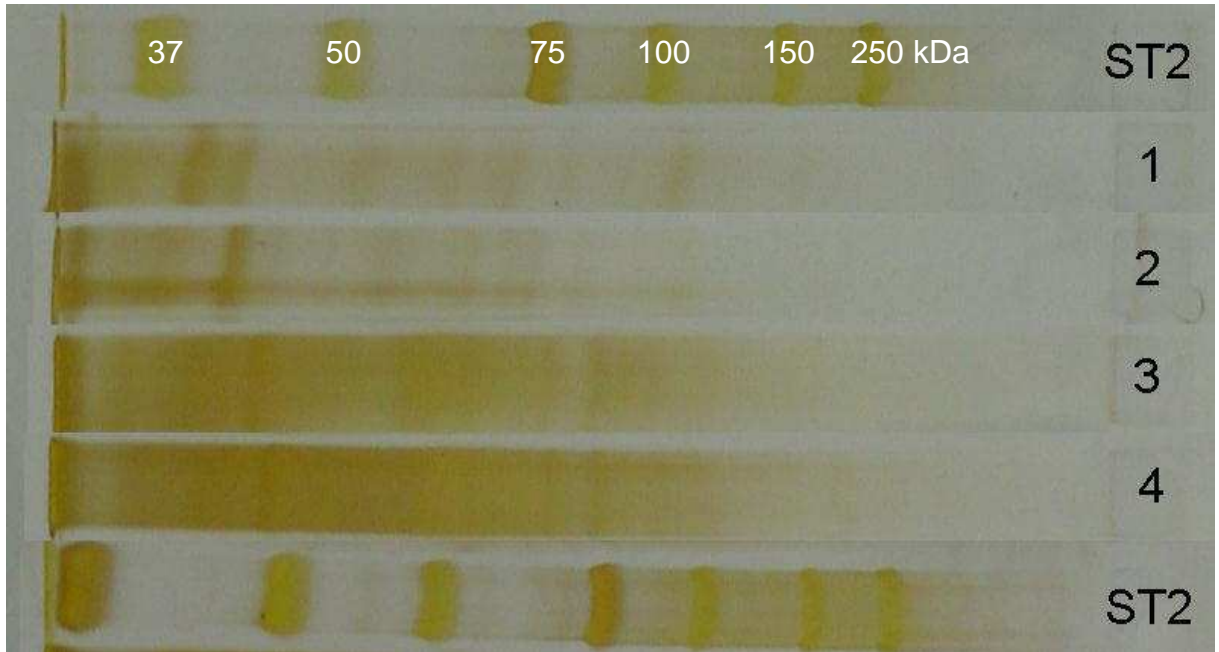


Abbildung 27: Molekülgrößenverteilung der Gerstensorten A und B aus den Kaltauszügen der Gersten (1 und 2) und der Malze (3 und 4)

Durch den Maischprozess verschwimmen die Banden noch mehr (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29). Bei der Gerstensorte A (Probe 1 und 2 in Abbildung 28) bleibt die Bande bei etwa 75 kDa jedoch deutlich bestehen. Die Verfärbung bei etwa 250 kDa aus dem Malz der vorherigen Abbildung tritt durch das Maischen stärker hervor und wird fast als Bande sichtbar. Bei der Gerstensorte B (Probe 1 und 2 in Abbildung 29) treten die Banden nicht so deutlich hervor. Es muss aber berücksichtigt werden, dass das Gel in der Abbildung 29 nicht so stark eingefärbt ist. Es kann mit dieser Methode kein Unterschied zwischen den beiden Maischverfahren festgestellt werden, obwohl das Eybenverfahren im Gegensatz zum Hoch-Kurz-Maischverfahren die Wirkung der Proteasen berücksichtigt und dadurch eine Veränderung zu erwarten gewesen wäre. Es zeigt sich aber auch hier wieder, wie bei den Kaltauszügen, dass hochmolekulare Proteine entweder den Maischprozess überstehen oder während dessen gebildet werden.

Die einstündige Kochung mit Hopfung verändert die Proteinverteilung sehr stark (siehe jeweils Proben 3 und 4 in Abbildung 28 und Abbildung 29). Eine Aufgabe der

Kochung ist die Koagulation von Eiweiß. Wie zu erwarten, werden hochmolekulare Proteine denaturiert und in Form von Flocken beim Abfiltrieren ausgeschieden. Die Banden (oder Färbungen) größer 75 kDa verschwinden oder sind nur noch sehr schwach erkennbar. Einzelne Banden im niedermolekularen Bereich können mit diesem Gel nicht mehr voneinander getrennt werden. Bei den Würzen aus dem Hoch-Kurz-Maischverfahren scheinen Proteine im Bereich von 50 bis 75 kDa etwas stärker vorhanden zu sein. Insgesamt betrachtet kann die Kochung ein entscheidender Punkt sein, bei dem trübungsrelevante Proteine beeinflusst werden.

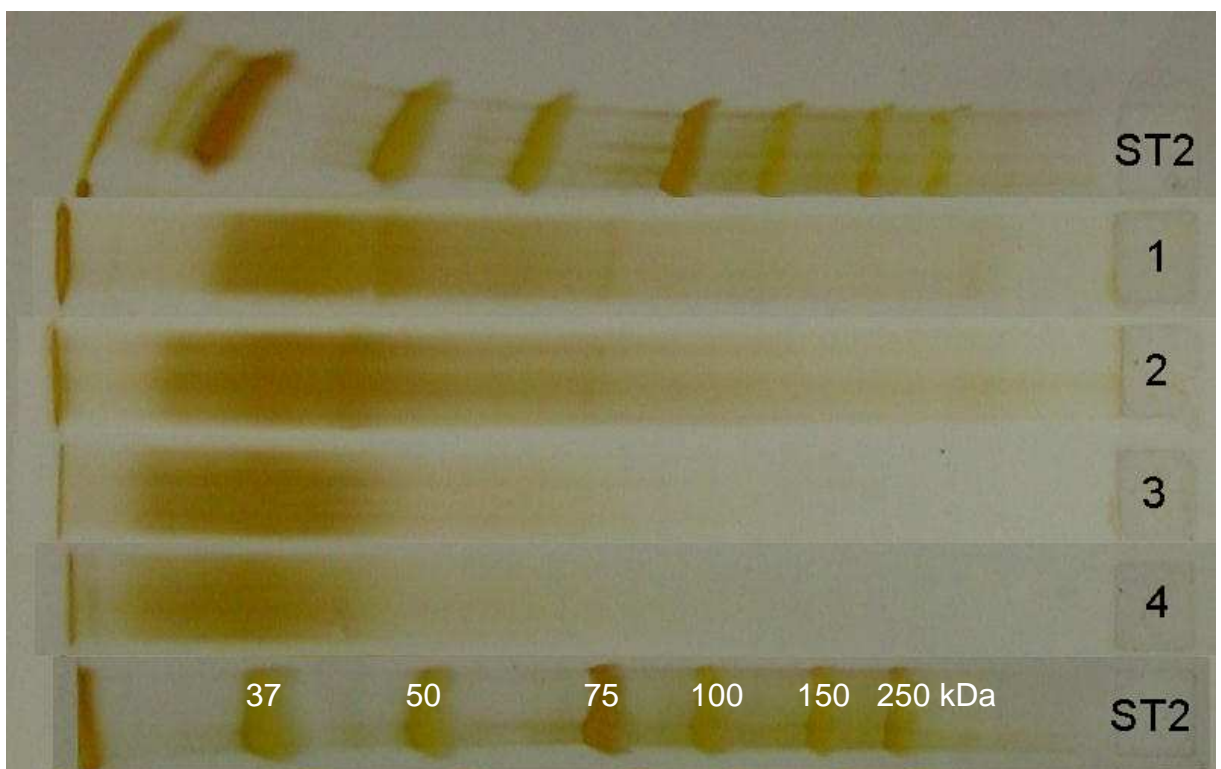


Abbildung 28: Molekülgrößenverteilung der Gerstensorte A nach dem Maischen (Probe 1: Eybenverfahren; Probe 2: Hoch-Kurz-Verfahren) und Kochen (Probe 3: Eyben; Probe 4: Hoch-Kurz-Verfahren)

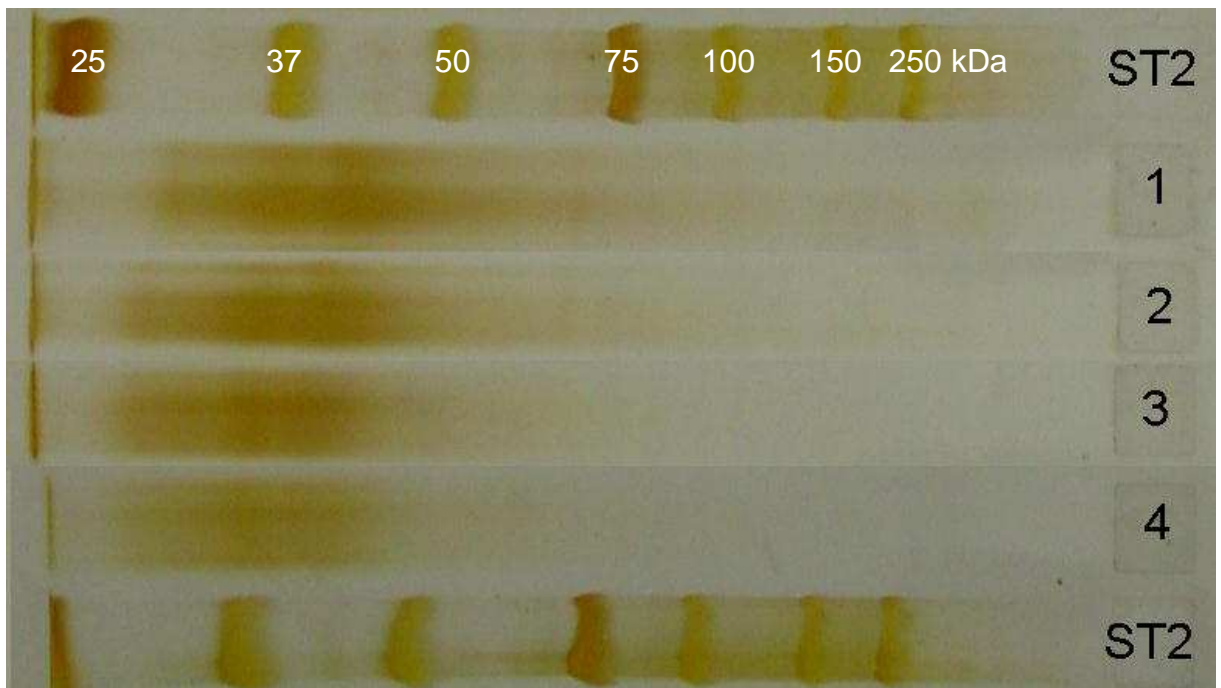


Abbildung 29: Molekülgrößenverteilung der Gerstensorte B nach dem Maischen (Probe 1: Eybenverfahren; Probe 2: Hoch-Kurz-Verfahren) und Kochen (Probe 3: Eybenverfahren; Probe 4: Hoch-Kurz-Verfahren)

Durch das Ansäuern und Versetzen mit Ethanol sollte eine Gärung und Lagerung der Würze ohne den Einfluss der Hefe simuliert werden. Durch die Verschiebung des pH-Wertes, des Alkohols und durch die tiefen Temperaturen werden einzelne Proteine unlöslich und ausgeschieden. Ein Vergleich der Molekülgrößenverteilung zeigt hier aber von der Würze (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29 jeweils Proben 3 und 4) zur versetzten Würze kaum eine Veränderung (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31 jeweils Proben 1 und 2; bei diesen beiden Abbildungen muss berücksichtigt werden, dass das Gel nicht gleichmäßig gegossen war und so die Auftrennung verschieden ist, sichtbar ist dies jeweils an den beiden Standards, die aus diesem Grund mit abgebildet sind). Auch die Hefegärung hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Molekülgrößenverteilung (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31 jeweils Proben 3 und 4). Die Färbung durch Silber scheint jedoch etwas geringer zu sein, was durch die Ausfällung von Proteinen zu erklären ist.

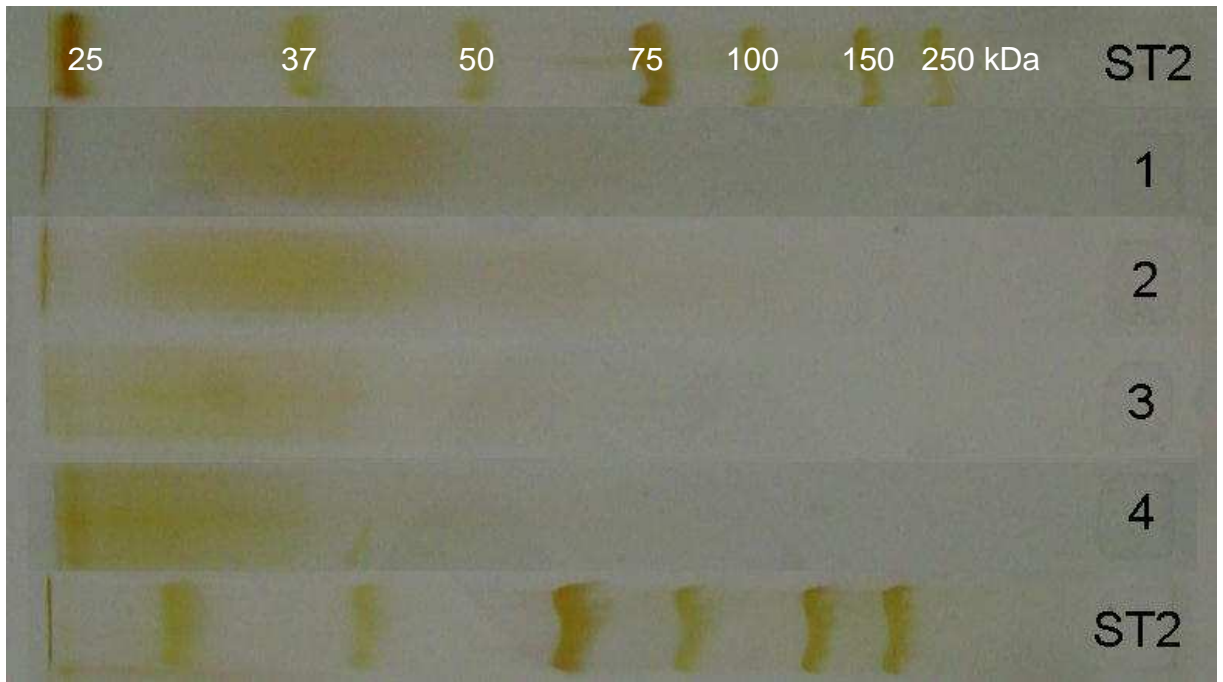


Abbildung 30: Molekülgrößenverteilung mit Ethanol und Säure versetzter Würzen (Probe 1: Eybenverfahren; Probe 2: Hoch-Kurz-Verfahren) und der Biere (Probe 3: Eybenverfahren; Probe 4: Hoch-Kurz-Verfahren) der Gerstensorte A

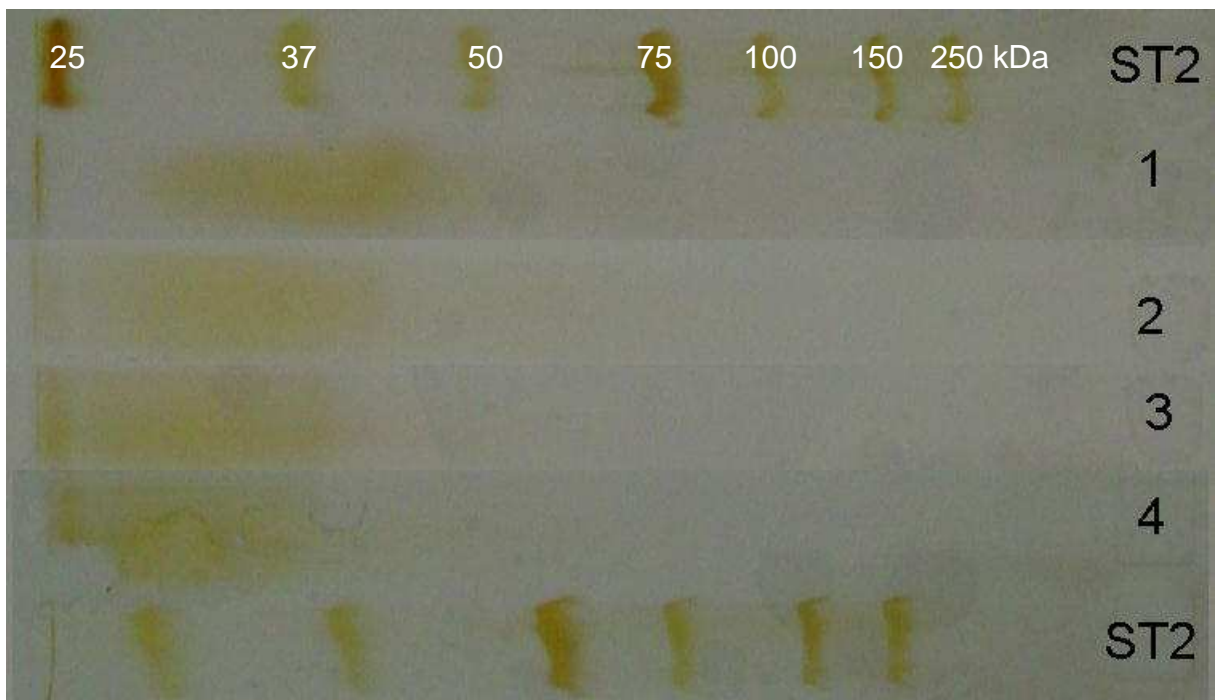


Abbildung 31: Molekülgrößenverteilung mit Ethanol und Säure versetzter Würzen (Probe 1: Eybenverfahren; Probe 2: Hoch-Kurz-Verfahren) und der Biere (Probe 3: Eybenverfahren; Probe 4: Hoch-Kurz-Verfahren) der Gerstensorte B

Der Versuch zeigt, dass es aus der Gerste bzw. dem Malz ein Potential an hochmolekularen Proteinen gibt, die beim Maischen in Lösung gehen und mit der Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Diese Proteine werden in diesem Fall bei der Kochung ausgeschieden. Es lässt sich eventuell aus diesem Versuch ableiten, dass das Maischen und das Kochen entscheidenden Einfluss auf die trübungsverursachenden Proteine haben. Es wäre dann mit dieser Methode möglich, Probleme mit Eiweißtrübungen auf diesem Weg nachzuweisen. Während der Gärung und Lagerung dieser Würzen und Biere treten unter den Versuchsbedingungen keine neu gebildeten, hochmolekularen Proteine auf. Diese könnten aber mit dieser Methode nachgewiesen werden.

Im Folgenden werden drei verschiedene Praxisbiere mit der Gelelektrophorese untersucht:

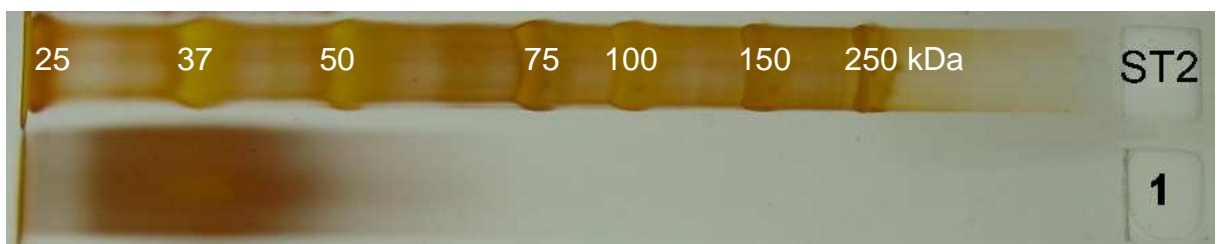


Abbildung 32: Molekülgrößenverteilung eines Bieres ohne Trübung (Probe 1)

Die Abbildung 32 zeigt die Auftrennung eines Bieres ohne Eiweißtrübung. Typisch für Biere ohne Trübungen ist, dass bei dem verwendeten Gel keine scharfen Banden erkennbar sind. Vielmehr liegt im Bereich von 20 bis 50 kDa ein Gemisch an Proteinen vor. Banden mit Molekulargewichten größer als 50 kDa sind in diesem Bier nicht vorhanden.

Die Abbildung 33 zeigt zwei verschiedene Biere mit Eiweißtrübung. Die zwei Biere unterscheiden sich stark voneinander. Die Verteilung der meisten Proteine bei Bier 1 ist in den höhermolekularen Bereich verschoben, anders als bei Bier 2. Es sind Proteine enthalten, die ein Molekulargewicht größer als 50 kDa aufweisen. Bei Bier 1 sind zusätzlich Färbungen im Bereich von 250 kDa erkennbar. Bier 2 hingegen hat keine Färbung im Bereich von größer als 50 kDa. Es gibt aber eine starke Färbung außerhalb des Trennbereiches des Gels, in der Geltasche, also vermutlich größer als 300 kDa. Wenn der vorherige Laborversuch als Vergleich herangezogen wird, könnte bei Bier 1 die Möglichkeit bestehen, dass die Proteine bereits durch das Maischen in

die Würze gelangt sind und bei der Kochung nicht wieder ausgefällt wurden. Bei Bier 2 sieht es eher nach einer Vergrößerung der Proteine nach dem Kochprozess, zum Beispiel bei der Gärung und Lagerung, aus.

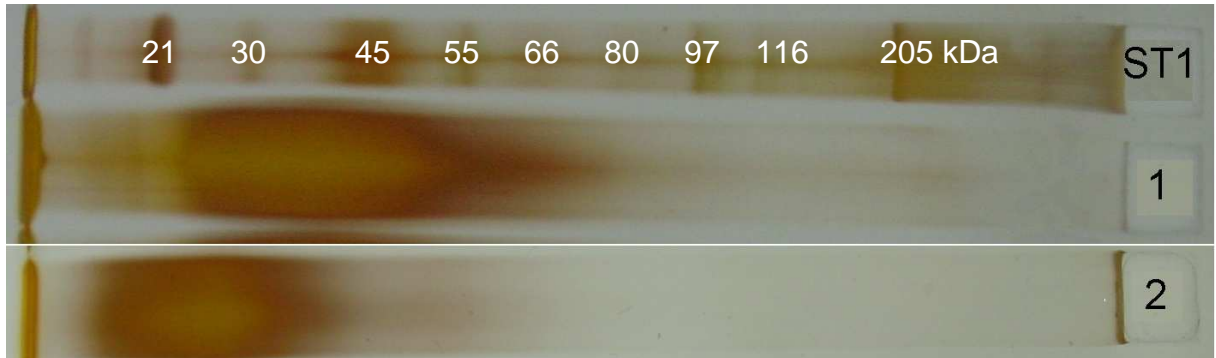


Abbildung 33: Molekülgrößenverteilung zweier Biere mit Eiweißtrübung (Probe 1 und 2)

Die Methode könnte nach diesen Versuchen eine Möglichkeit darstellen, die Ursache für malzseitige Proteinprobleme zu erklären. Dieser Ansatz ist aber durch weitere Untersuchungen zu bestätigen.

Der nächste Versuch soll noch einmal deutlich machen, welche Proteingrößen für Trübungen verantwortlich gemacht werden können.

Die Identifizierung der Trübung erfolgt nach Abschnitt 4.1 mit proteolytischen Enzymen. In der Abbildung 34 sind die Veränderungen der Proteingrößen während des enzymatischen Nachweises dargestellt. Durch das Temperieren der Probe auf 40 °C verändert sich die Proteingrößenverteilung nicht. Pepsin baut die trübenden Proteine ab. Es ist nur noch eine Silberfärbung unterhalb 50 kDa sichtbar. Auch hier bestätigt sich wieder, dass Proteine kleiner als 50 kDa für die Trübung nicht in Frage kommen. Die schwache Bande bei einer Molekülgröße oberhalb von 250 kDa liegt ungefähr im Bereich, wie sie in Abbildung 28 nach dem Maischen vorhanden ist. Diese verschwindet nach dem Enzymabbau. Ebenso ist die Färbung in den Taschen des Gels nicht mehr vorhanden. Dieser Versuch deutet darauf hin, dass gerade diese Molekülgrößen einen entscheidenden Einfluss auf die nicht filtrierbaren Eiweißtrübungen haben.

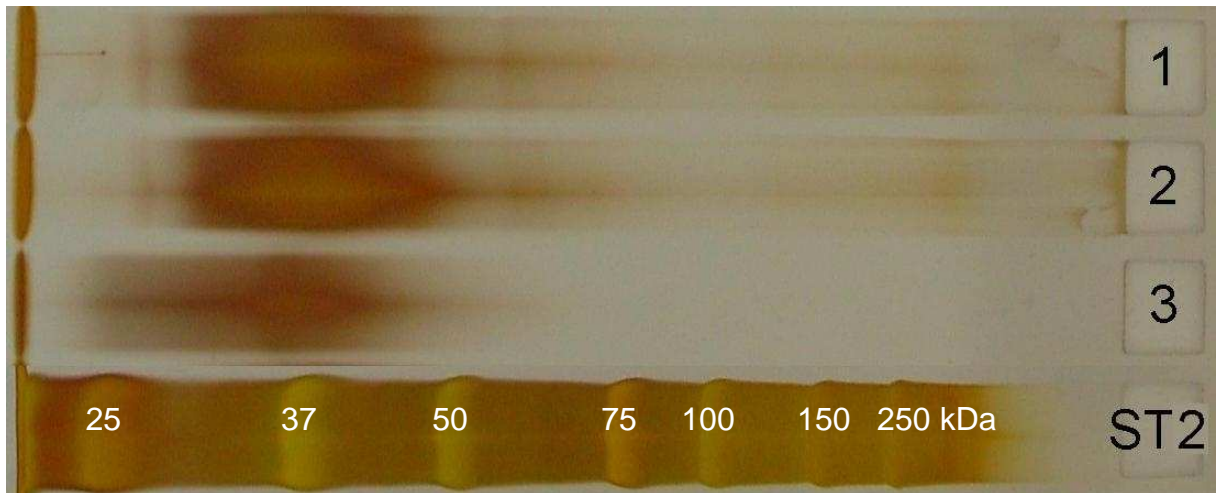


Abbildung 34: Änderung der Molekülgrößen nach der enzymatischen Trübungsidentifizierung; Nullprobe (Probe 1), Nullprobe temperiert auf 40 °C (Probe 2), nach Pepsinabbau (Probe 3)

4.2.2.2 Proteine aus der Hefe

Die Hefe kann unter schlechten Gär- und Lagerbedingungen Proteine an das Bier abgeben. Besonders problematisch kann dieses Problem bei Heferestebieren sein, die lange auf der Hefe liegen. Ebenso problematisch kann die Verwendung von Gelägerhefe sein⁶⁴. Bei der Kurzzeiterhitzung des Restebieres fällt auf, dass die Trübung durch diese Proteine stark erhöht wird und weder durch Separation noch durch Filtration entfernt werden kann (siehe Tabelle 18 Heferestbier). Diese Proteine haben ein anderes Bindevormögen an Kieselgel und lassen sich auf diesem Wege nicht aus dem Bier entfernen. Das Stabilisierungsmittel Kieselsol ist, was das Bindungsvermögen betrifft, unspezifischer. Der Trübungsanstieg wird vermieden (siehe Tabelle 18 Kieselgel und Kieselsol). Selbst bei dem Verschneiden des Heferestebieres kann sich die Trübung bis ins Endprodukt durchschlagen. Die Trübung nach der Kurzzeiterhitzung lässt sich durch Pepsin nicht nachweisen. Die Proteine werden so verändert, dass ein Trübungsabbau nicht möglich wird. Nachgewiesen werden konnte es nur durch die Enzymbehandlung vor der Erhitzung. Die erhöhten Trübungswerte entstehen durch den enzymatischen Abbau der Proteine dann nicht mehr (siehe Tabelle 18 Pepsin). Verursacht wurde dieses

⁶⁴ Back, W.: *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2005

Problem durch zu lange Lagerzeiten des Heferestbieres auf der Hefe bei ungünstigen Temperaturen.

Probe	Trübung Messwinkel 90° [EBC]	
	vor Erhitzung	nach Erhitzung
Heferestbier	1,91	7,59
Kieselgel	2,01	6,15
Kieselgel	0,93	1,80
Pepsin	1,91	1,72

Tabelle 18: Veränderung der Trübung von Heferestbier versetzt mit Stabilisierungsmitteln vor und nach Erhitzung

Nachgewiesen werden können die Proteine allerdings mit der Gelelektrophorese. Im Vergleich zum „normalen“ Bier sind in diesem Fall scharfe Banden sichtbar. Die Abbildung 35 zeigt den Vergleich eines nicht trüben Bieres mit dem eines durch Hefeproteine belasteten Heferestbieres.



Abbildung 35: Molekülgrößenverteilung eines Hefebieres (Probe 1) im Vergleich zu einem nicht trüben Bier (Probe 2)

Ob diese Banden direkt für die Trübung verantwortlich sind, ist nicht geklärt. Sicher ist jedoch, dass Banden sichtbar werden, die so in Bier nicht vorhanden sind. Die Abbildung 36 zeigt, dass die Banden von Inhaltsstoffen der Hefe verursacht werden. Die meisten Banden des Bieres (Probe 1) sind identisch mit Banden aus einem Hefelysat (Probe 2), hergestellt durch Ultraschallaufschluss der Hefe.

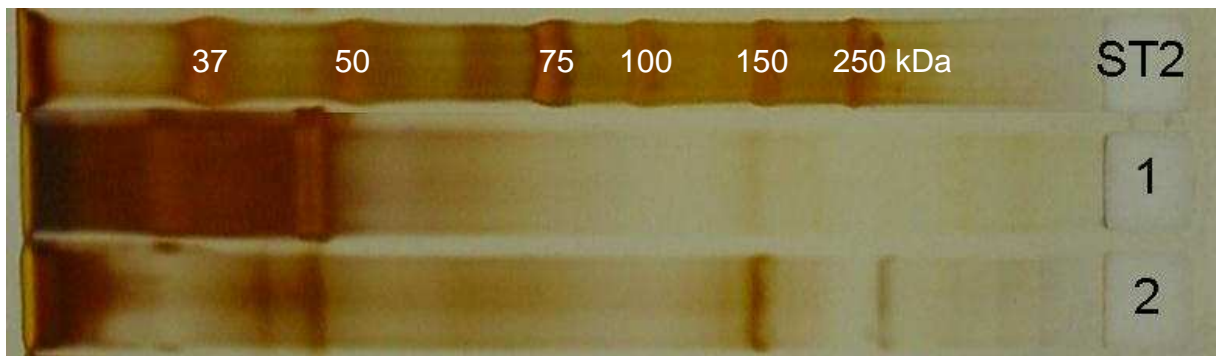


Abbildung 36: Molekülgrößenverteilung eines Heferestebieres (Probe 1) im Vergleich zu einem Hefelysat (Probe 2)

Durch den Einsatz der proteolytischen Enzyme Proteinase K (Probe 3) und Thermolysin (Probe 4) ist der Nachweis möglich, dass es sich um Proteine aus der Hefe handelt (siehe Abbildung 37). Die Banden werden fast vollständig abgebaut. Die DNase (Probe 2) zeigt in diesem Fall keine Wirkung, was bedeutet, dass es sich bei den Banden nicht um DNA-Fragmente handelt.

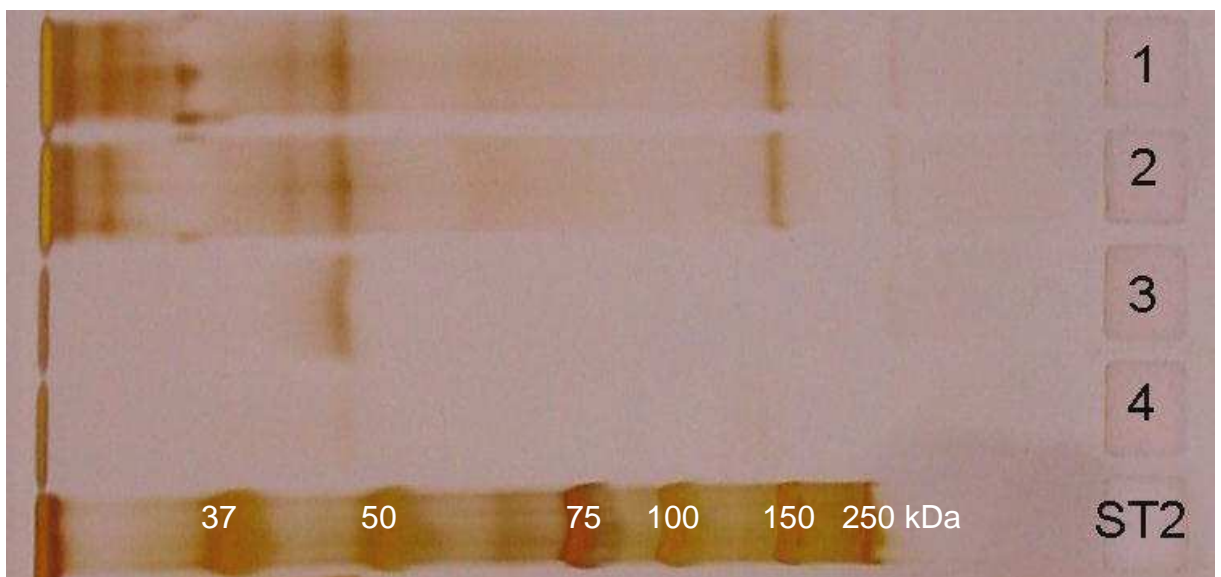


Abbildung 37: Vergleich der Enzymreaktionen auf Hefelysat

Der Trübungsnachweis durch Pepsin versagt bei Hefeproteinen. Pepsin kann die Proteine der Hefe nicht angreifen, die Banden bleiben unverändert (Ergebnisse nicht dargestellt). Durch die Enzyme Proteinase K (Probe 3) und Thermolysin (Probe 4) kann der Nachweis erfolgen. Die Banden werden durch Hefeproteine verursacht. Es

wäre möglich, dass es sich bei den Proteinen um die in der Literatur⁶⁵ beschriebenen Mannoproteine handelt, die ungefähr die gleiche Molekülgröße haben. Es könnte sich aber auch um die zahlreichen anderen Hefeproteine handeln.⁶⁶

Der Versuch mit dem Heferestbier hat gezeigt, dass die Gelelektrophorese eine Methode darstellt, die Probleme mit der Hefe nachzuweisen.

Insgesamt ist es möglich, die Ursachen von Eiweißtrübungen mit dieser Methode einzugrenzen und diese zu beseitigen.

4.2.3 β -Glucan

Die Ursachen für β -Glucantrübungen sind hauptsächlich in der Malzlösung zu suchen, oder besser in der Kombination aus Malzlösung und Maischverfahren. Die Malzspezifikation muss so gewählt werden, dass sie zum Maischverfahren passt. Dies bedeutet bei Hoch-Kurz-Maischverfahren, dass die Zellwände des Malzes vollständig abgebaut sein müssen. Durch zytolytisch unterlöste Malze steigt der β -Glucangehalt in der Würze an. Es ist in diesem Fall auch möglich, dass Molekülgrößen entstehen, die von der Filtration nicht zurückgehalten werden, aber groß genug sind, um zu trüben. In so einem Fall muss das Maischverfahren angepasst werden und eine Temperaturrast bei den zytolytischen Enzymen eingehalten werden, um den Gehalt an β -Glucan zu verringern.⁶⁷

4.3 Mikroskopische Trübungsidentifizierung

Die mikroskopische Identifizierung kann bei einer 400-fachen Vergrößerung erst ab einer Partikelgröße von etwa 2 μm durchgeführt werden. Kleinere Partikel sind nur als Punkte sichtbar und können auf Grund ihrer Form nicht erkannt werden. Ebenso sind Färbeverfahren nicht anwendbar, da eine farbliche Unterscheidung zwischen

⁶⁵ Omura, F.; Fujita, A.; Maruhashi, T.; Watanabe, R.; Kondo, H.: The influence of yeast cell wall mannoproteins on beer haze stability. In: *EBC Congress*. Prague, 2005, S. 591–598

⁶⁶ Wildgruber, R.; Harder, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Weiss, W.; Fey, S. J.; Larsen, P.; Görg, A.: Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. In: *Electrophoresis* 21 (2000), S. 2610–2616

⁶⁷ Back, W.: *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2005

Hintergrund und Partikeln kaum möglich ist. Größere Partikeln lassen sich dagegen leichter allein auf Grund ihrer Gestalt identifizieren und auch leichter für das Mikroskopieren vorbereiten.

Die folgenden Ergebnisse und Abbildungen sind aus Praxisproben von 83 verschiedenen Brauereien aufgenommen. Die Identifizierung erfolgte über einen Vergleich mit Reinsubstanzen.

4.3.1 Direktes Mikroskopieren der Probe

Viele Partikeln lassen sich, wenn die Konzentrationen hoch genug sind, direkt ohne Probenvorbereitung mikroskopieren. Ansonsten können die Partikeln abzentrifugiert werden. In beiden Fällen ist auch eine Färbung der Partikeln direkt auf dem Objektträger möglich. Im Folgenden wird die Identifizierung verschiedenartiger Trübungspartikeln beschrieben.

4.3.1.1 Organische Stoffe

Zu den organischen Stoffen werden in diesem Fall die Partikeln gezählt, die durch die Inhaltsstoffe des Bieres gebildet werden.

4.3.1.1.1 Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen

Die Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen werden in dieser Arbeit nicht näher betrachtet. Sie werden aber kurz dargestellt, um sie von anderen Partikeln unterscheiden zu können. Diese Verbindungen können sehr verschiedenartige Formen und Größen annehmen (siehe Abbildung 38). Da die Bestandteile dieser Partikeln nicht näher identifiziert werden müssen, genügt es normalerweise, die Partikeln ohne Färbung direkt zu mikroskopieren. Die Struktur der Teilchen ist zwar sehr vielfältig, aber als organisches Material eindeutig zu erkennen. Zu Problemen kann es bei kleinen Eiweißpartikeln kommen, da diese mit Mikroorganismen verwechselt werden könnten.



Abbildung 38: Verschieden große Eiweiß-Gerbstoff-Partikeln

Zur sicheren Identifizierung können die Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen mit 5%iger Kalilauge unter dem Mikroskop aufgelöst werden (siehe Abbildung 39).



Abbildung 39: Eiweißpartikeln (1) durch KOH aufgelöst (2)

Eine weitergehende, aber nicht genaue Bestimmung der Bestandteile der Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen erfolgt mit Farbstoffen. Hierbei färbt Eosin Yellow die Proteine rosa, Thionin die Polysaccharide je nach ihrer Ladung blau bis rötlich und Methylenblau die Gerbstoffe tiefblau (siehe Abbildung 40, Abbildung 41 und Abbildung 42).



Abbildung 40: Eiweißpartikel gefärbt mit Eosin Yellow

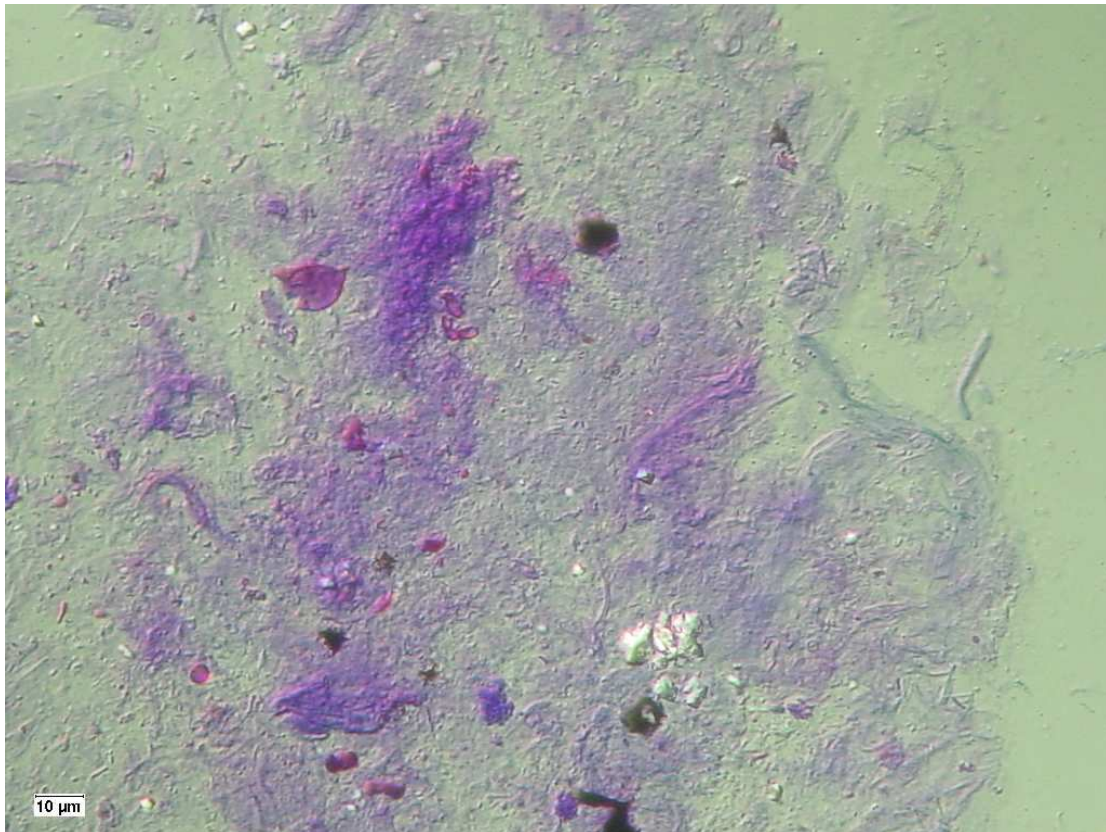


Abbildung 41: Eiweiß-Gerbstoff-Polysaccharid-Teilchen gefärbt mit Thionin



Abbildung 42: Eiweiß-Gerbstoff-Partikel gefärbt mit Methylenblau

4.3.1.1.2 Stärke

Stärke bzw. Dextrine können verschiedene Formen in Würze und Bier annehmen. In Bier kommen in vielen Fällen einzelne, ungelöste Stärkekörner vor (siehe Abbildung 43, linke Seite). Die Identifizierung erfolgt mit polarisiertem Durchlicht. Die Kristallstruktur des Stärkekornes dreht die Ebene des polarisierten Lichtes und es erscheint spezifisch ein schwarzes Kreuz auf dem leuchtenden Stärkekorn (siehe Abbildung 43, rechte Seite).

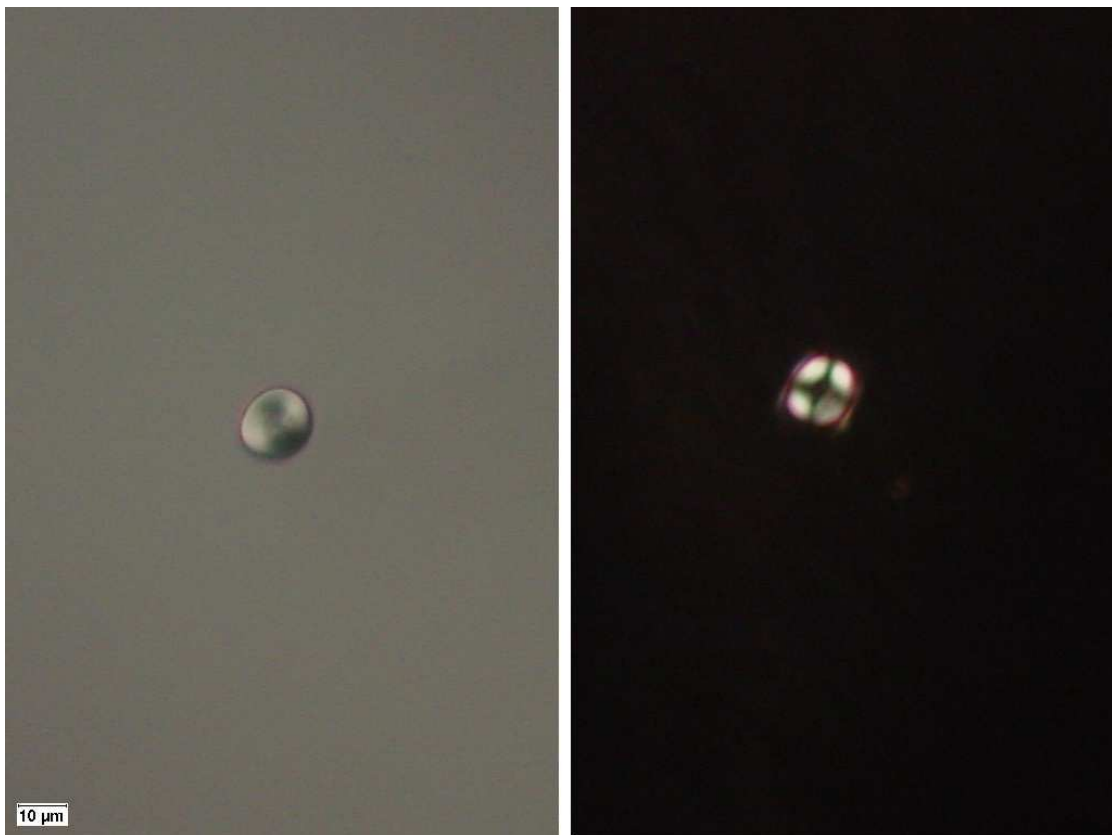


Abbildung 43: Stärkekorn im Durchlichtverfahren (links), Stärkekorn im polarisierten Licht (rechts)

Bei gequollenen Stärkekörnern (siehe Abbildung 44) ist dieser Nachweis nicht mehr möglich, da die Kristallstruktur aufgelöst ist. Diese Körner lassen sich, wie andere Stärke- bzw. Dextrinpartikeln, mit Jodlösung blau bis violett anfärben (siehe Abbildung 45).



Abbildung 44: Gequollenes Stärkekorn im Durchlicht



Abbildung 45: Gequollenes Stärkekorn, gefärbt mit Jod

Werden Stärkekörner in dest. Wasser gekocht, quellen diese zuerst und lösen sich dann in schlangenähnlicher Form auf (siehe Abbildung 46 und Abbildung 47). Werden Stärkekörner jedoch in Würze gekocht, wie es im Sudprozess erfolgt, ist eine Struktur nicht mehr festzustellen. Die Stärkepartikeln ähneln Eiweißteilchen (siehe Abbildung 48). Ein Nachweis ist nur mit Jodlösung möglich (siehe Abbildung 49).

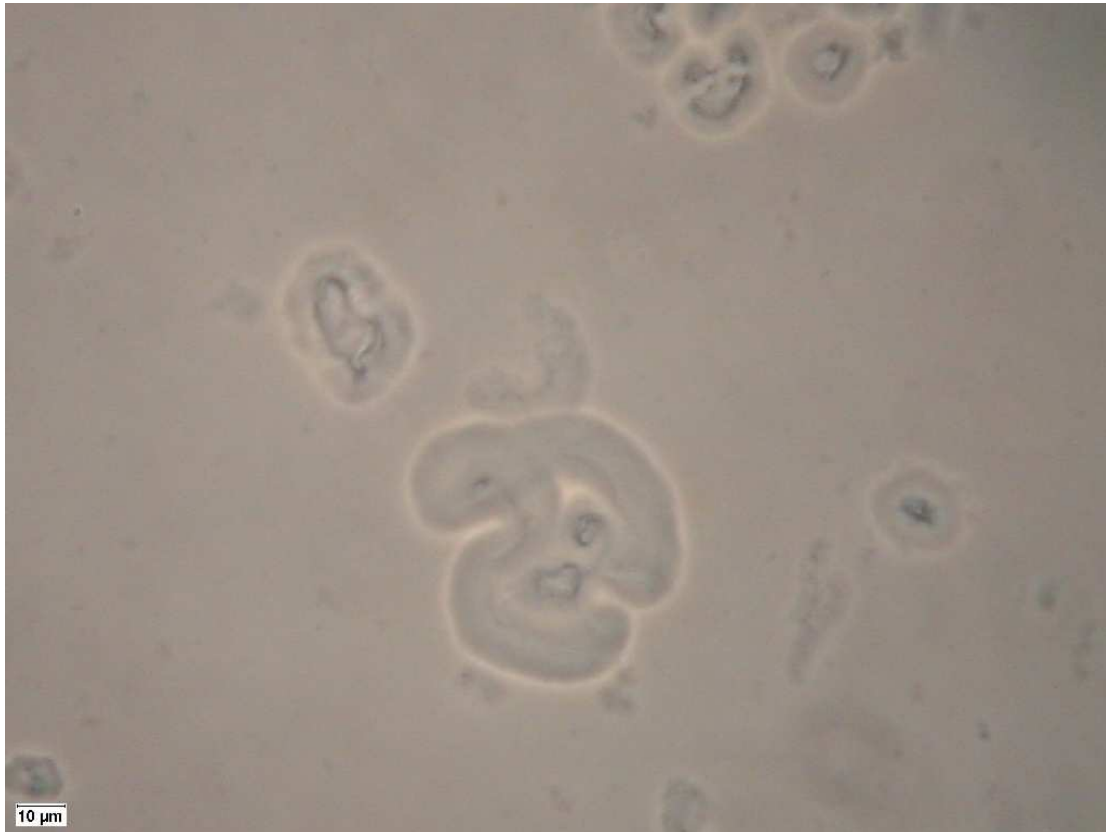


Abbildung 46: Stärkekörner, gekocht in dest. Wasser, ungefärbt



Abbildung 47: Stärkekörner, gekocht in dest. Wasser, gefärbt mit Jod



Abbildung 48: Stärkekörner, gekocht in Würze, ungefärbt

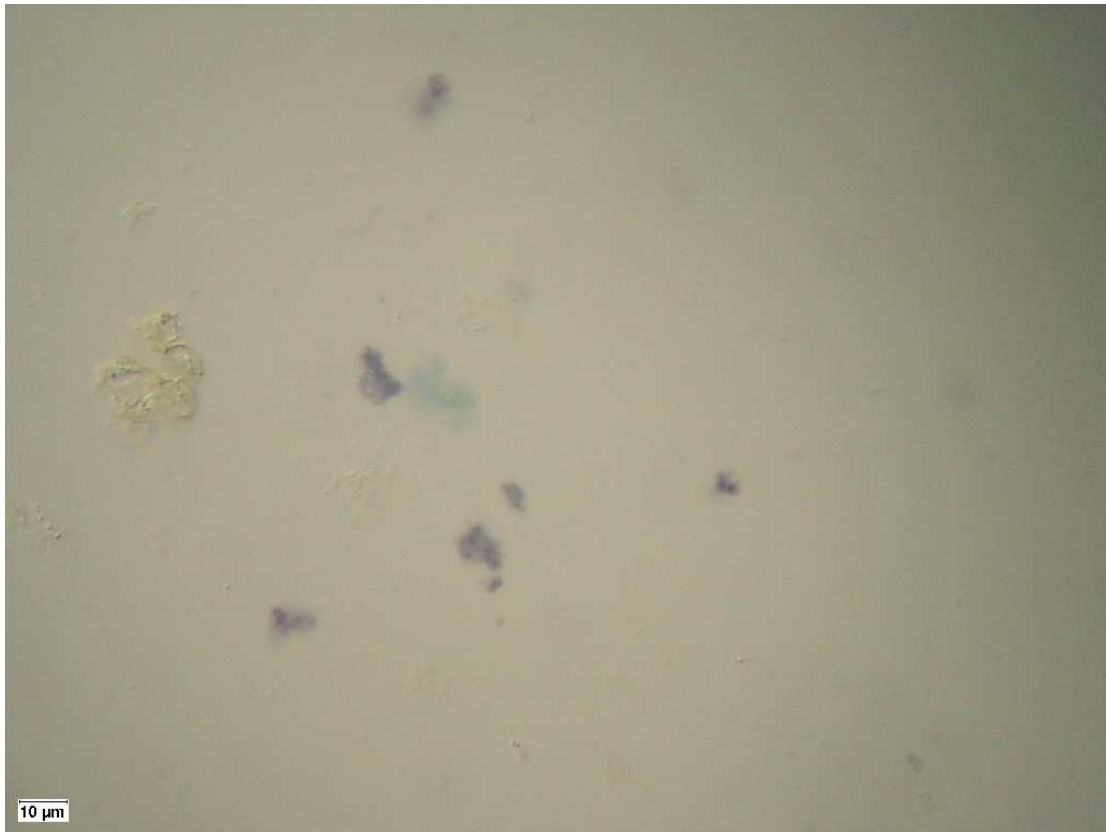


Abbildung 49: Stärkekörner, gekocht in Würze, gefärbt mit Jod

4.3.1.1.3 Hopfenharze

Hopfenharze können durch plötzlichen, starken Druckabfall zum Beispiel bei der Karbonisierung als sichtbare schwarze Flocken ausfallen. Die Harze selbst sind in Eiweiß-Gerbstoff-Partikeln eingebettet. Die Abbildung 50 zeigt die mikroskopische Aufnahme solcher Partikeln. Die Hopfenharze sehen kristallin aus. Sie lassen sich jedoch im Gegensatz zu echten Kristallen mit Lauge auflösen und können dadurch nachgewiesen werden. In der Abbildung 51 wird ein Vergleich zu purem Hopfenextrakt gezeigt. Die Harze haben verschiedenartige Formen und schimmern in vielen Farben.

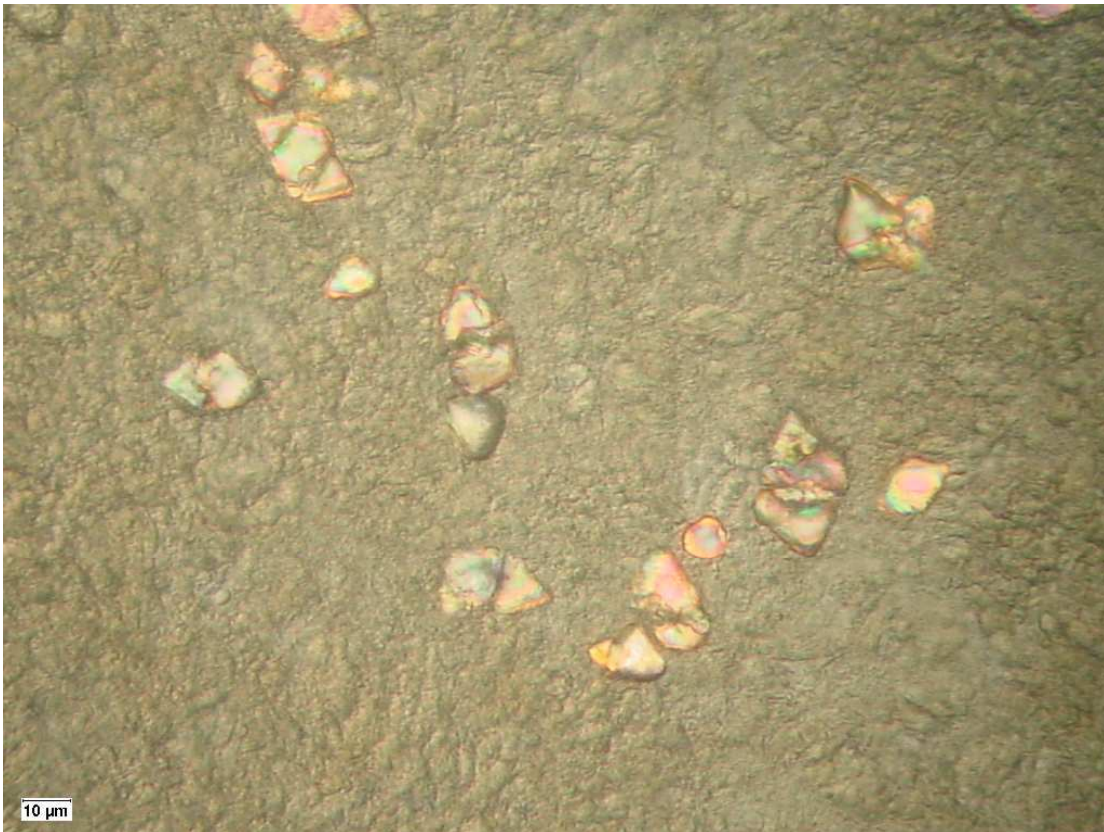


Abbildung 50: Partikeln mit Hopfenharzen aus einer Praxisprobe

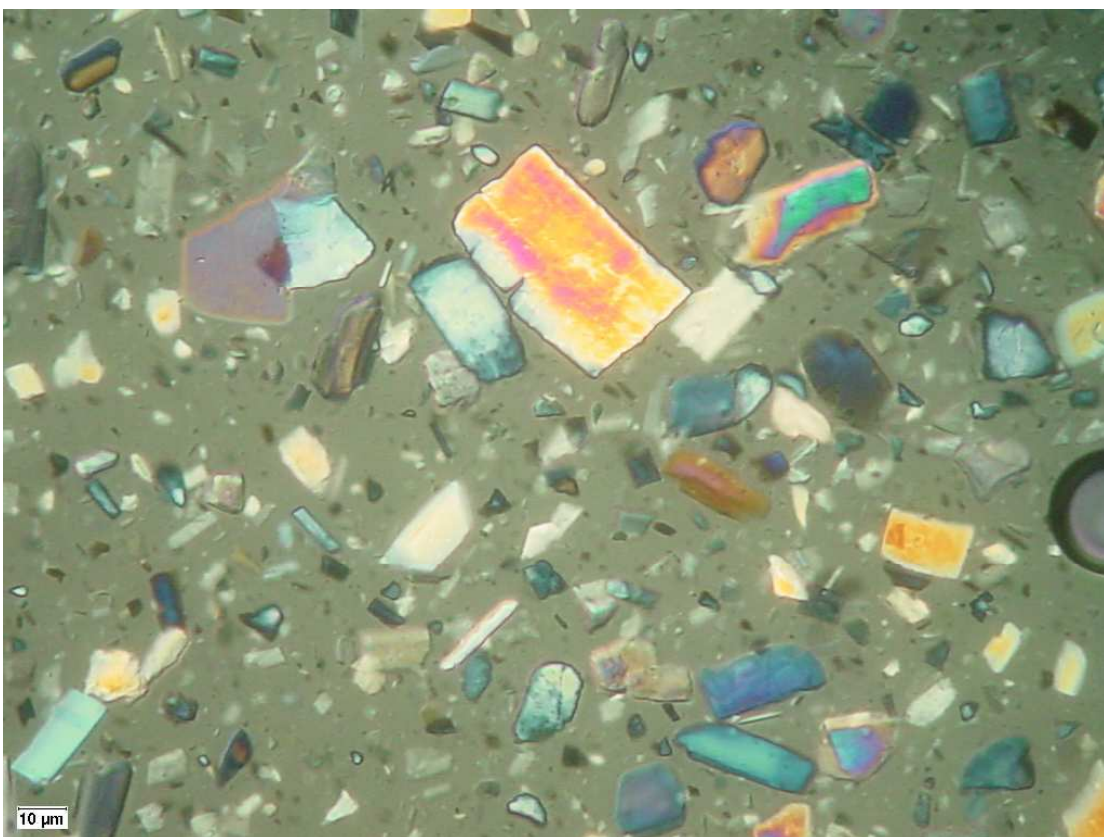


Abbildung 51: Kristallartige Hopfenharze in Hopfenextrakt

4.3.1.1.4 Kalziumoxalatkristalle

Kalziumoxalatkristalle werden aus der Oxalsäure (Malz) und Kalziumionen (Wasser und Malz) gebildet. Wie viel Oxalsäure und Kalziumionen im Bier gelöst sind, ist durch das Löslichkeitsprodukt festgelegt. Das Löslichkeitsprodukt ist von vielen Parametern abhängig (zum Beispiel Temperatur, pH-Wert, andere gelöste Ionen, Matrix und Zeit). In jeder Biersorte und Brauerei ist deswegen das Löslichkeitsprodukt verschieden (siehe Tabelle 19) und es kann kein allgemeingültiger Wert angegeben werden.

Biersorte	Löslichkeitsprodukt [$10^{-7} \text{ mol}^2/\text{l}^2$]
Hell	1,068
Weissbier	1,582
Pils	1,448

Tabelle 19: Löslichkeitsprodukte gemessen in verschiedenen Biersorten

Während der Lagerung muss das Lösungsgleichgewicht erreicht werden, damit später in der abgefüllten Flasche keine Kristalle ausfallen. Erreicht werden kann dies durch tiefere Temperaturen bei der Lagerung, als sie in der abgefüllten Flasche erreicht werden.

Zur Vermeidung des Problems wird empfohlen, den Kalziumgehalt der Würze zu erhöhen, um die Oxalsäure auszufällen. Es ist aber nicht möglich, die gesamte Oxalsäure aus dem Bier durch Kalziumgaben auszufällen. Es bleibt immer ein über das Löslichkeitsprodukt errechenbarer Gehalt in Lösung. Dies bedeutet, dass eine Veränderung des Kalziumgehaltes, besonders nach der Filtration, zur Ausfällung von Kristallen führt. Zu beachten ist hier der Kalziumgehalt der Kieselgur, der mit der Anschwemmung in das Bier eingetragen wird. Die Feineinstellung der Stammwürze muss mit enthärtetem Wasser erfolgen. Besonders problematisch kann der Zusatz von Röstmalzbier zur Farbeeinstellung nach der Filtration sein. Die Röstmalzbier können durch die Aufkonzentrierung selbst sehr viele Kalziumoxalatkristalle enthalten und bringen zusätzlich Kalziumionen und Oxalsäure mit ein.

Im Bier können verschiedene Kristallstrukturen vorkommen. Die Identifizierung erfolgt anhand der Struktur. In den meisten Fällen liegt der Kristall als

Kalziumoxalatdihydrat vor (bekannt als Oktaeder oder Briefkuvertform) (siehe Abbildung 52).

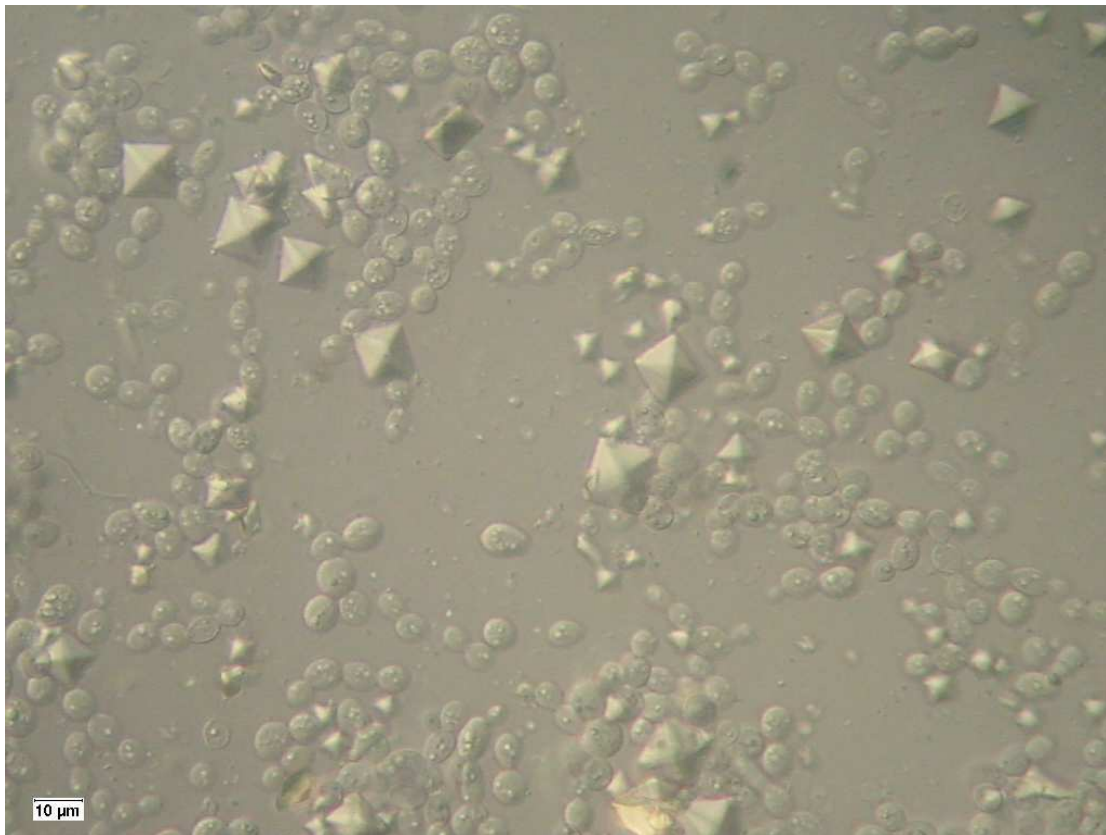


Abbildung 52: Kalziumoxalatdihydratkristalle neben Hefezellen

Die Identifizierung ist hier eindeutig. Die Kristalle sind groß genug, um bestimmt werden zu können. Die Eigenheit von Kristallen, die Ebene des polarisierten Lichtes zu drehen, hat Kalziumoxalatdihydrat nicht.

Nicht so häufig und bekannt ist das Kalziumoxalatmonohydrat. Diese Kristalle sind kleiner als Kalziumoxalatdihydrat und nehmen verschiedene Formen an, zum Beispiel rechteckig oder sternförmig (siehe Abbildung 53). Kalziumoxalatmonohydrat dreht die Ebene des polarisierten Lichtes und lässt sich dadurch leichter identifizieren (siehe Abbildung 54).



Abbildung 53: Kalziumoxalatmonohydratkristall in Sternform (links), Kalziumoxalatmonohydratkristall in Rechteckform (rechts)



Abbildung 54: Kalziumoxalatmonohydratkristalle im polarisierten Licht

Untypischerweise kann es aus bisher noch ungeklärter Ursache, zu einem Zusammenlagern von Kristallen kommen (siehe Abbildung 55 und Abbildung 56). Die Kristalle lagern sich am Flaschenboden ab und bilden einen Ring entlang der Flaschenwandung. Durch das Zerschneiden des Ringes können sich Nadeln von bis zu 2 cm Länge bilden.

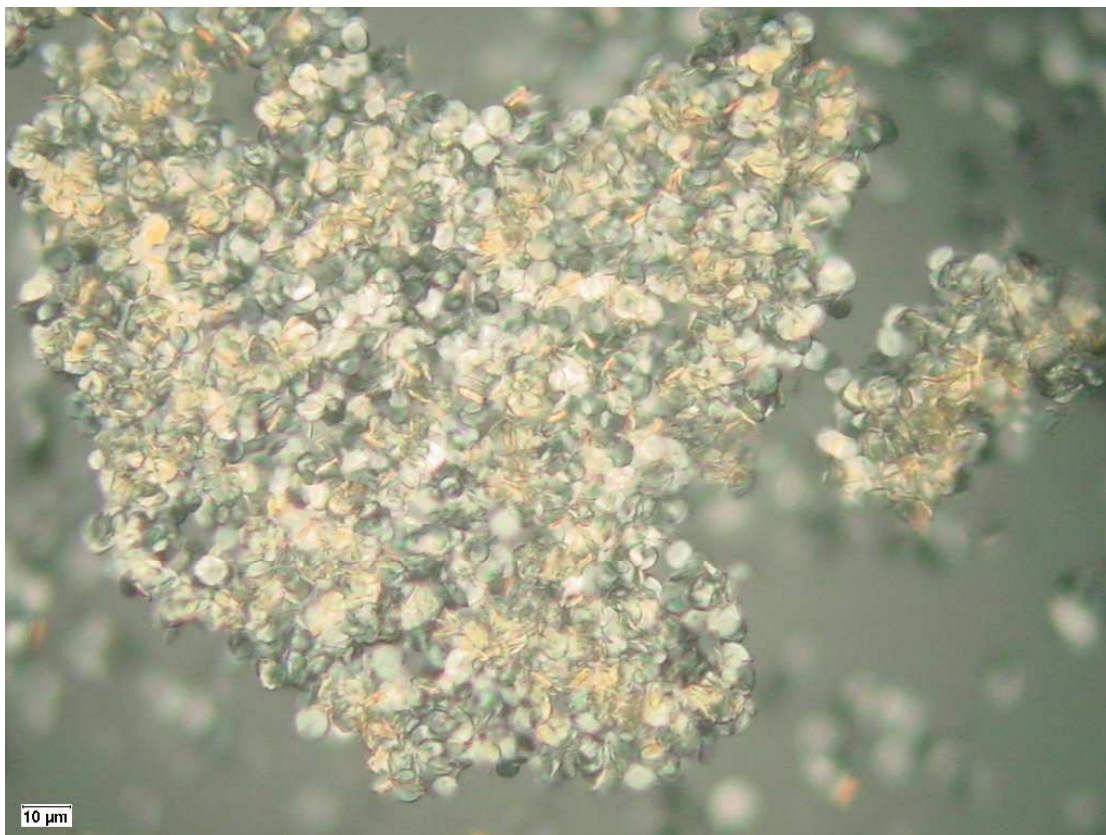


Abbildung 55: Untypische Form von Kalziumoxalatkristallen

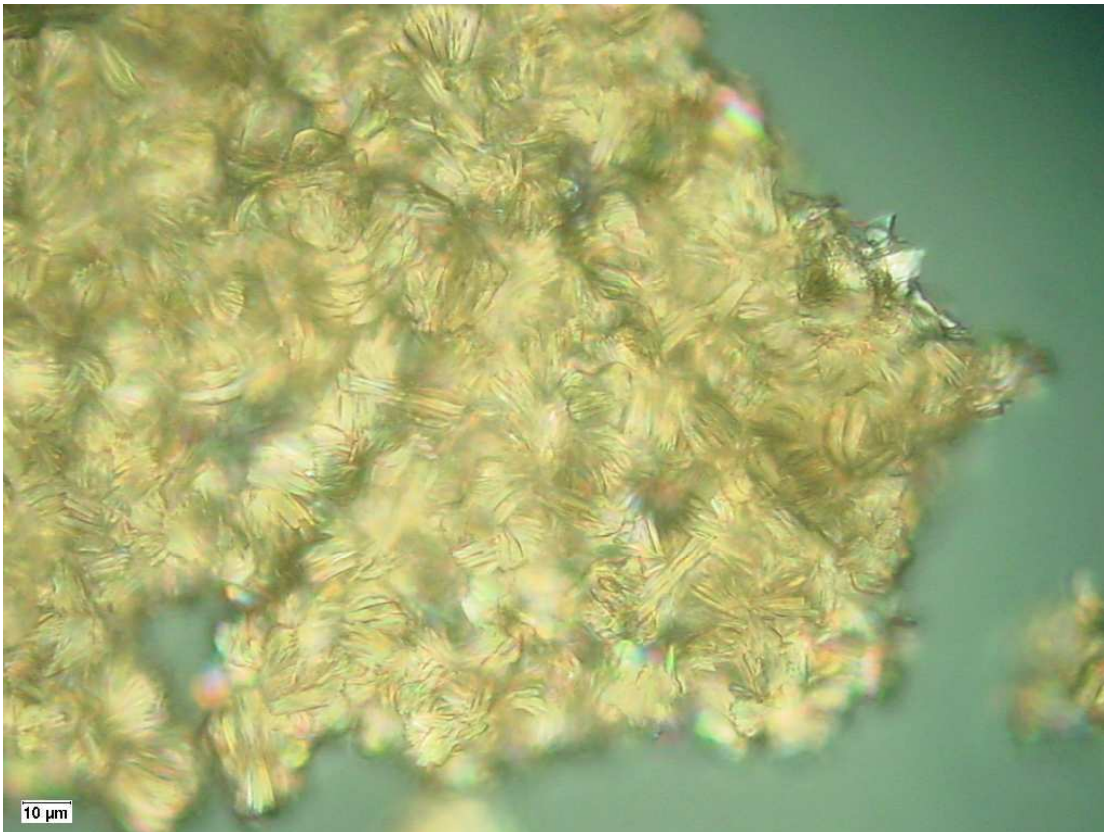


Abbildung 56: Untypische Form von Kalziumoxalatkrystallen

4.3.1.1.5 β -Glucangel

Der Nachweis von β -Glucan bzw. -gel erfolgt in der MEBAK-Vorschrift⁶⁸ mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor. Die Anwendung wurde auf die mikroskopische Analyse übertragen. Verschiedene Partikeln, bei denen sichergestellt ist, dass sie β -Glucan enthalten, wurden mit Calcofluor angefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In der Abbildung 57 zeigt sich eindeutig, dass Zellwände (bestehend aus β -Glucan) durch Calcofluor eine blaue Fluoreszenz aufweisen. Es ist also auch mikroskopisch möglich, β -Glucan sichtbar zu machen.

⁶⁸ Miedaner, H.: *Brautechnische Analysenmethoden Band II*. Freising: 2002

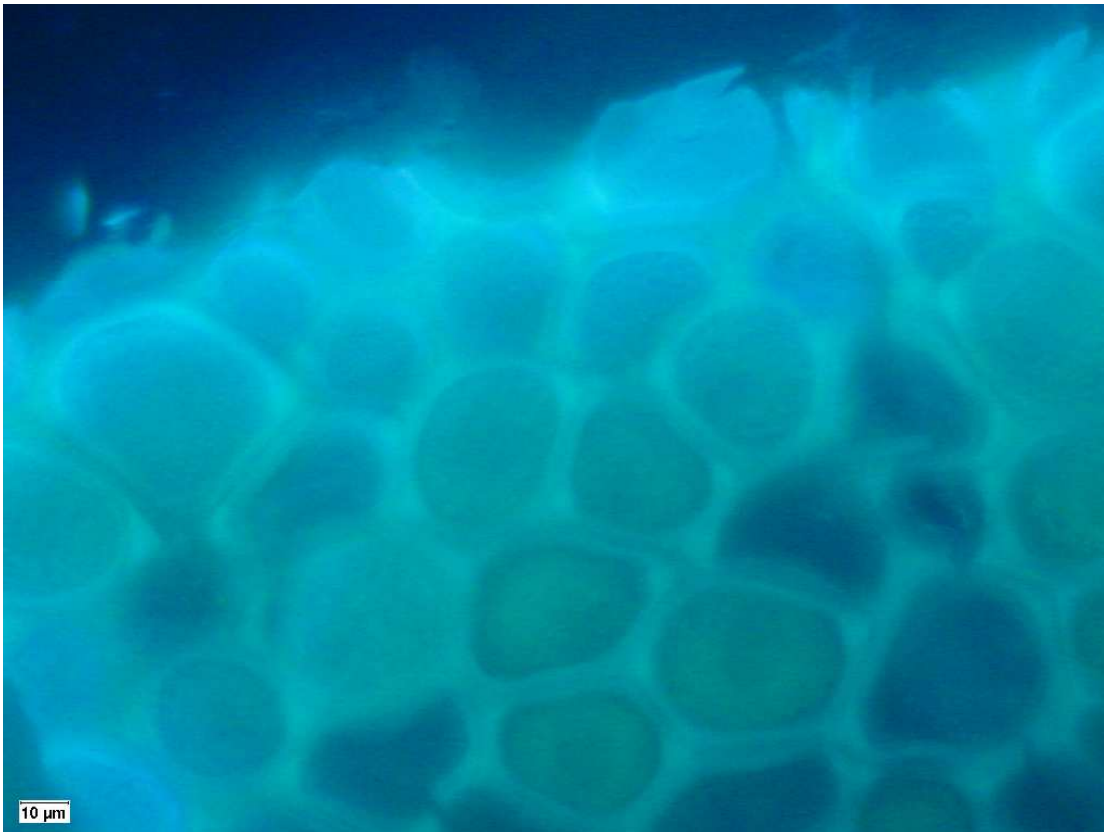


Abbildung 57: Schrotpartikeln angefärbt mit Calcofluor unter UV-Licht

Es ist bekannt, dass β -Glucan durch Einfrieren des Bieres als Gel ausfallen kann. Mit Calcofluor soll geprüft werden, ob so ein entstandenes Gel anfärbbar ist. In der Abbildung 58 sind ungefärbte Gelpartikeln im Durchlichtverfahren dargestellt. In der Abbildung 59 sind Gelpartikeln mit Calcofluor gefärbt und unter UV-Licht dargestellt.



Abbildung 58: β -Glucangel, ungefärbt mit Durchlicht mikroskopiert

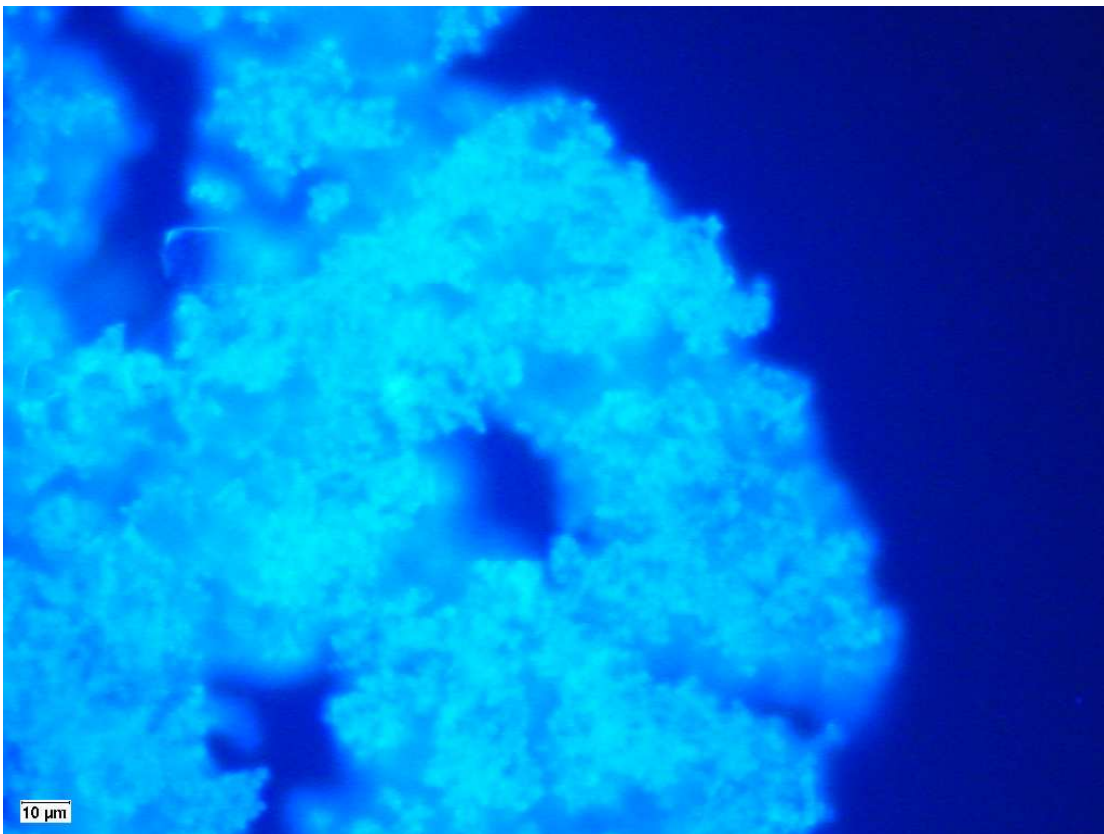


Abbildung 59: β -Glucangel, gefärbt mit Calcoluor mit UV-Licht mikroskopiert

Es zeigt sich eine eindeutige intensiv blaue Fluoreszenz. Zur Überprüfung, ob es sich bei diesen Partikeln wirklich um β -Glucangel handelt, wurden ca. 100 mg Gel in 100 ml dest. Wasser durch Hitze gelöst. Die Lösung wurde nach MEBAK-Vorschrift gemessen und es wurden ca. 1000 mg/l β -Glucan wiedergefunden. Es ist also möglich, hochmolekulares β -Glucan und somit auch Gel mit dieser Methode zu identifizieren.

Zusätzlich kann β -Glucan mit dem Fluoreszenzfarbstoff Kongorot angefärbt werden. Die Abbildung 60 zeigt ein Gerstenschrotpartikel, das mit Kongorot gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurde. Die Zellwand fluoresziert rötlich durch das Kongorot. Dies bedeutet, dass β -Glucane mit Kongorot nachweisbar sind.



Abbildung 60: Zellwandbestandteil, gefärbt mit Kongorot unter UV-Licht

In den beiden nächsten Abbildungen sind dieselben β -Glucangelpartikel dargestellt, in der Abbildung 61 mit Durchlichtverfahren und in der Abbildung 62 mit UV-Licht.

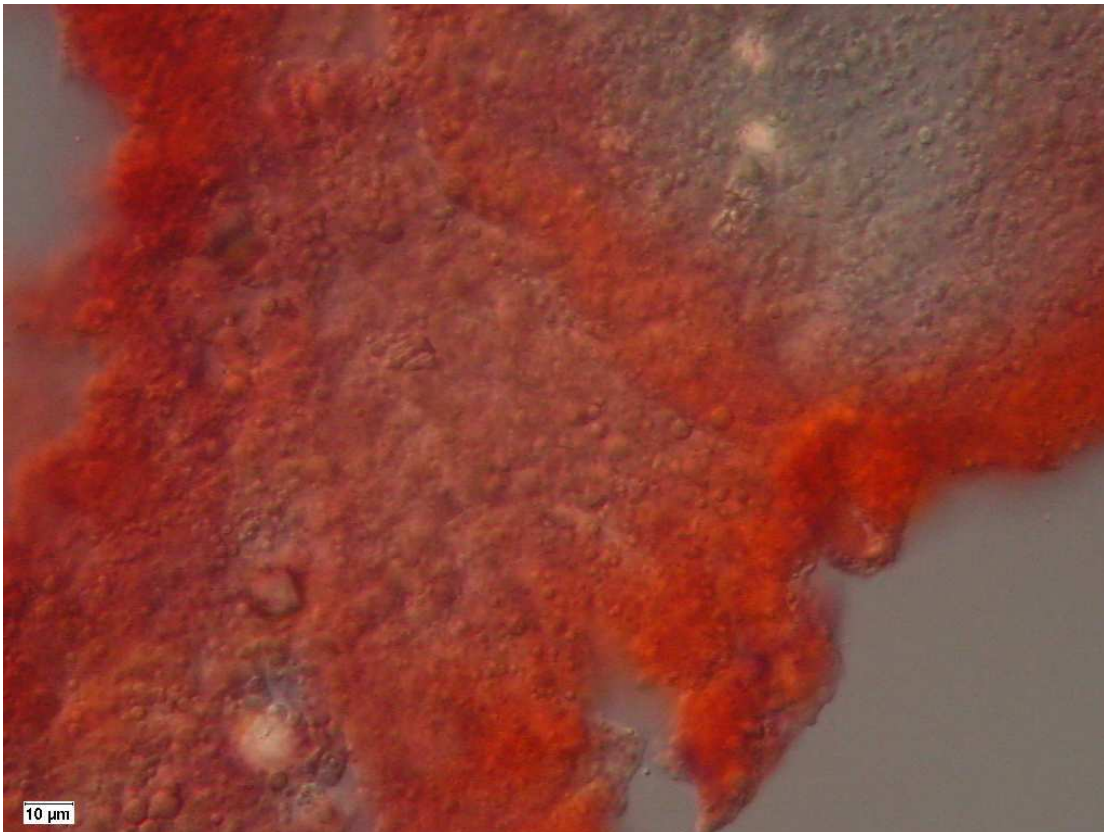


Abbildung 61: β -Glucangel, gefärbt mit Kongorot mit Durchlicht

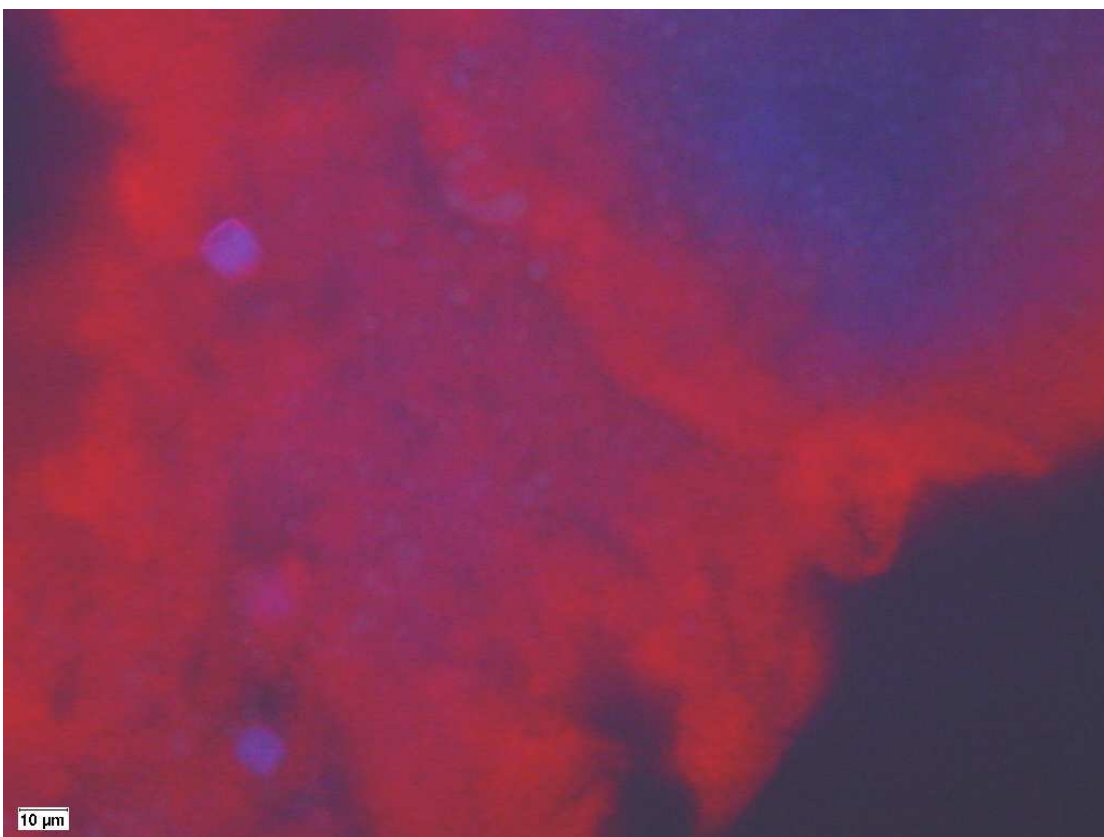


Abbildung 62: β -Glucangel, gefärbt mit Kongorot unter UV-Licht

4.3.1.1.6 Partikeln in eingefrorenem Bier

Eingefrorenes Bier weist sehr oft nach dem Auftauen Bodensatz mit teilweise sehr großen Flocken auf.⁶⁹ In diesem Bodensatz sind sehr viele verschiedene, aber typische Partikeln zu finden (siehe Abbildung 63). Ein Großteil der Flocken besteht aus Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen. Wie oben nachgewiesen, bildet sich β -Glucangel, das unter dem Deckglas durch die Erwärmung der Mikroskoplampe zu fließen beginnt. Durch die niedrigen Temperaturen fällt Kalziumoxalat meist in Form des Dihydrates aus. Auch Stärkekörner befinden sich in diesem Bodensatz. Neben diesen Partikeln bilden sich rundliche, bisher nicht identifizierte Tropfen. Eventuell handelt es sich um Fett- oder Ölsubstanzen.

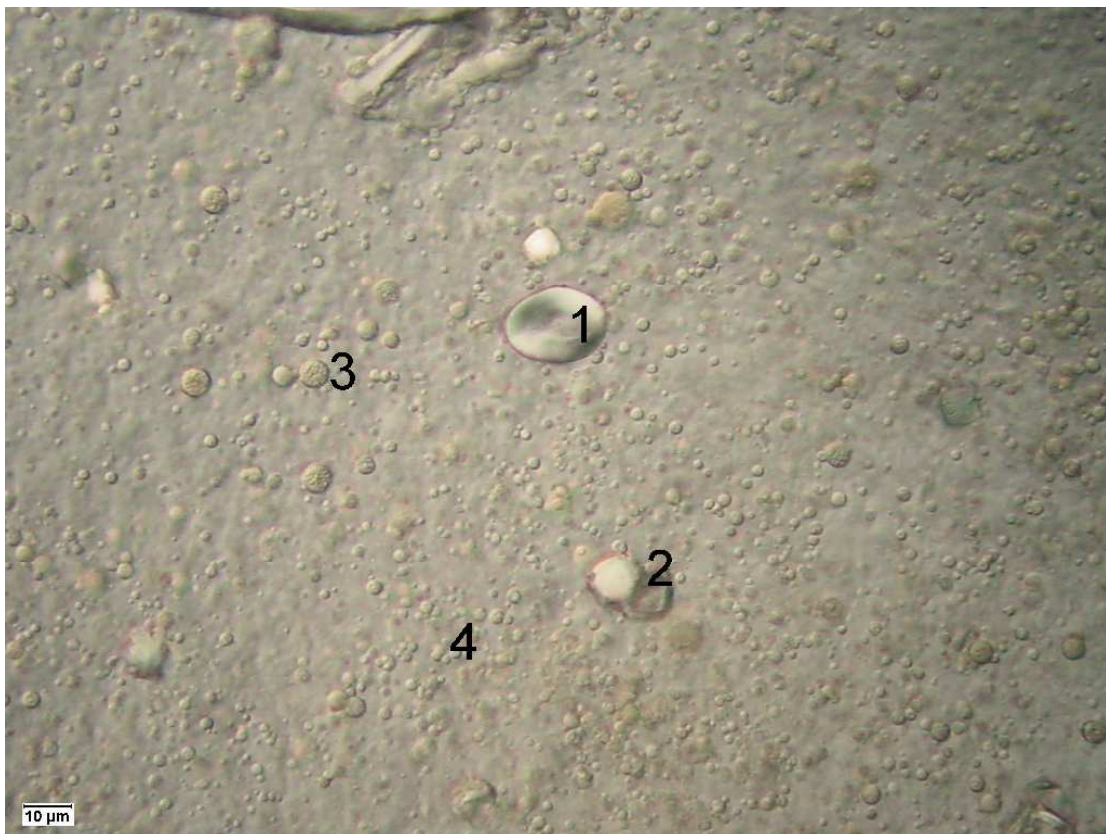


Abbildung 63: Partikeln in eingefrorenem Bier; 1: Stärkekorn, 2: Kalziumoxalat, 3: nicht identifiziert, 4: β -Glucangel

⁶⁹ Tanaka, M.; Sakuma, S.: Prediction of the Formation of Frozen Beer Precipitates. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57 (1999), Nr. 3, S. 104–108

4.3.1.1.7 Partikeln in alkoholfreiem Bier

Alkoholfreie Biere, die mit gestoppten Gärverfahren hergestellt werden, weisen bereits kurz nach der Flaschenpasteurisation Bodensatz auf. Der Bodensatz besteht oft aus einzelnen fadenförmigen, bis zu 5 mm großen Partikeln. Die Partikeln bestehen aus Eiweiß-Gerbstoff-Polysaccharid-Verbindungen. Die Biere aus gestoppten Gärverfahren haben höhere Gehalte an Inhaltsstoffen, in einem Fall besonders an Anthocyanogenen. Es hat sich gezeigt, dass es ungünstig ist, wenn das Bier bei der Abfüllung in den Flaschen zum Aufschäumen, zum Beispiel durch Hochdruckeinspritzung, gebracht wird. In dem Schaum reichern sich vermehrt Inhaltsstoffe, zum Beispiel Eiweiße und Gerbstoffe, an, die bei der Pasteurisation miteinander zu Partikeln reagieren können.

4.3.1.2 Technische Hilfsmittel

Technische Hilfsmittel werden für die Filtration benötigt. Kieselguren, Perlite und Cellulose werden zur Filteranschwemmung eingesetzt. Die eiweißseitige Stabilisierung erfolgt mit Kieselgelen bei der Kieselgurfiltration. PVPP wird zur gerbstoffseitigen Stabilisierung entweder verloren oder als eigene Filtration nach der Kieselgurfiltration verwendet. Die Filterhilfsmittel haben alle eine besondere Struktur, an der sie meist ohne Färbungen identifiziert werden können.

4.3.1.2.1 Kieselgur

Kieselguren haben eine charakteristische Struktur, da sie aus den Kieselpanzern der abgestorbenen Kieselalgen hergestellt werden. Die Kieselguren können deshalb ohne Färbeverfahren identifiziert werden. Bei den Kieselguren werden verschiedene Größen verwendet, von Feingur bis Grobgur. Die Grobguren werden durch Fluxkalzinieren verklebt und nehmen so eine größere Struktur an. Die anderen Guren werden vermahlen und bestehen aus einzelnen Kieselpanzern oder Bruchstücken davon. In der folgenden Abbildung 64 sind die verschiedenen Guren dargestellt.

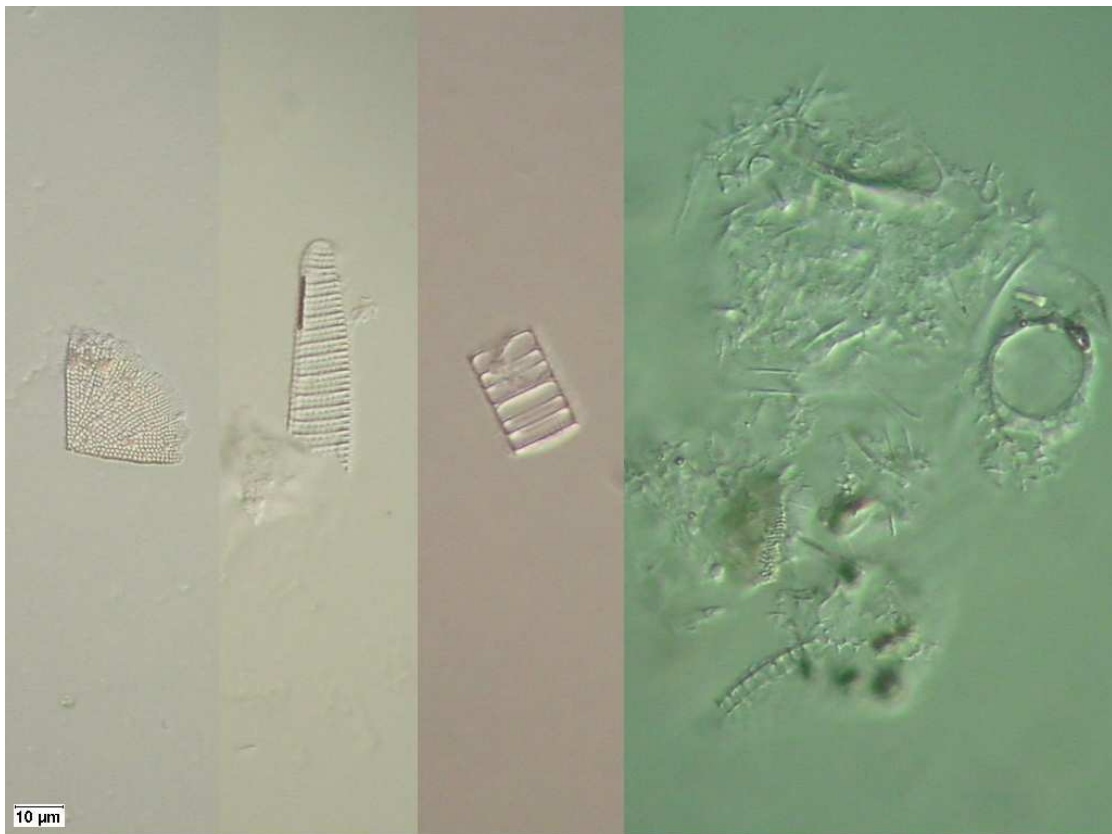


Abbildung 64: Beispiele von verschiedenen Kieselgurformen

4.3.1.2.2 Perlite

Perlite werden als Ersatzstoff für die Grobgur verwendet. Perlite werden aus aufgeblähten Silikaten gemahlen. Die Teilchen sind glasartig mit Adern durchzogen. Auch hier ist die Identifizierung ohne Färbung möglich (siehe Abbildung 65).



Abbildung 65: Perliteteilchen, durchzogen mit der charakteristischen Ader

4.3.1.2.3 Kieselgel

Kieselgele lassen sich nur schwer identifizieren. Sie besitzen keine eigene Struktur, zerbrechen leicht oder werden abgerieben (siehe Abbildung 66).

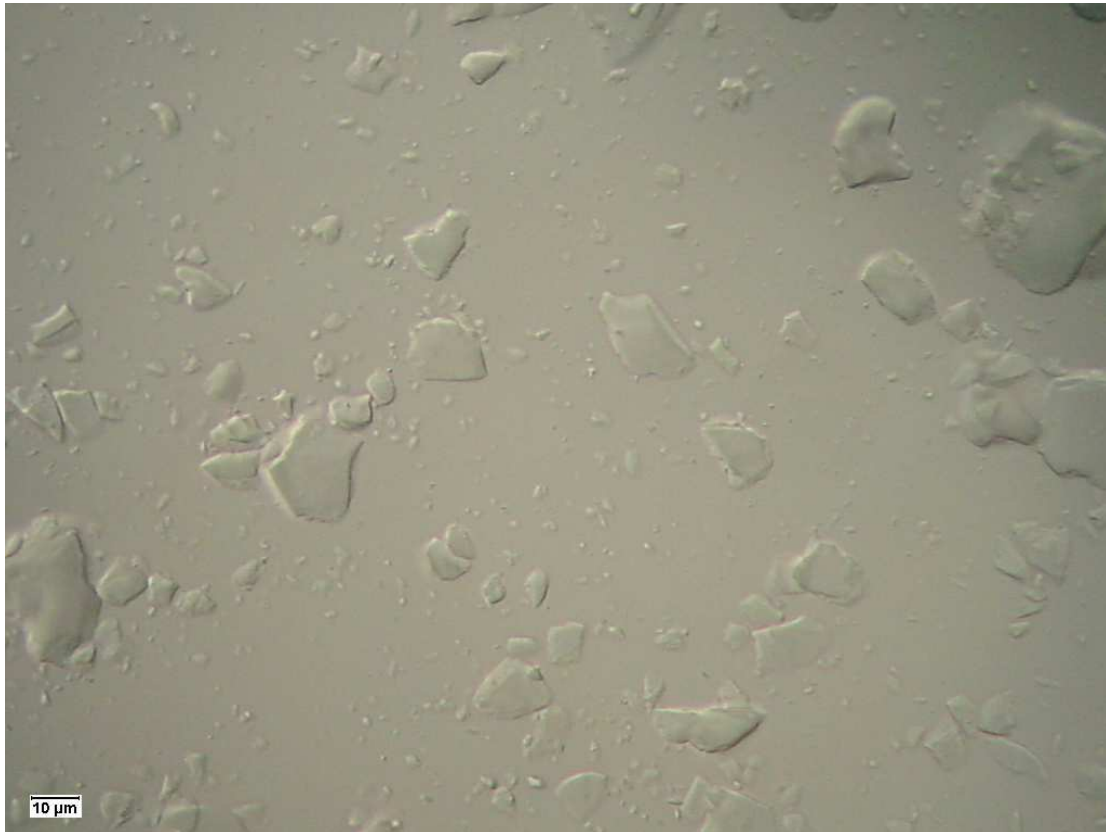


Abbildung 66: Kieselgelpartikeln in verschiedenen Größen und Formen

4.3.1.2.4 PVPP

Das PVPP kann verschiedene Partikelgrößen haben, da je nach Aufbereitung Abrieb entstehen kann. Große Partikeln lassen sich durch ihre charakteristische Knöllchenstruktur mit dem Mikroskop identifizieren (siehe Abbildung 67).

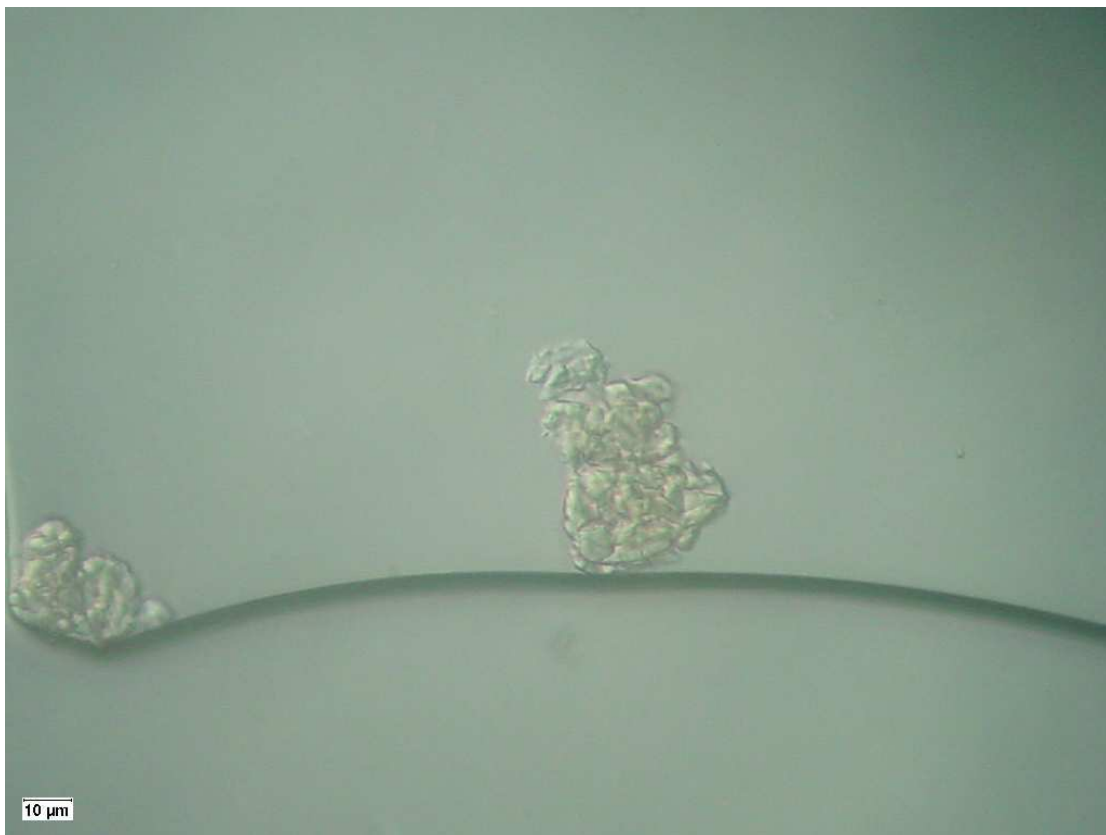


Abbildung 67: Große PVPP-Partikeln

Kleinere Partikeln sind dagegen nur schwer als PVPP zu erkennen. PVPP kann mit Jod spezifisch angefärbt werden. In der Abbildung 68 und Abbildung 69 sind dieselben Partikeln vor und nach der Färbung mit einem Stereomikroskop aufgenommen.



Abbildung 68: PVPP-Partikeln ungefärbt, aufgenommen mit einem Stereomikroskop

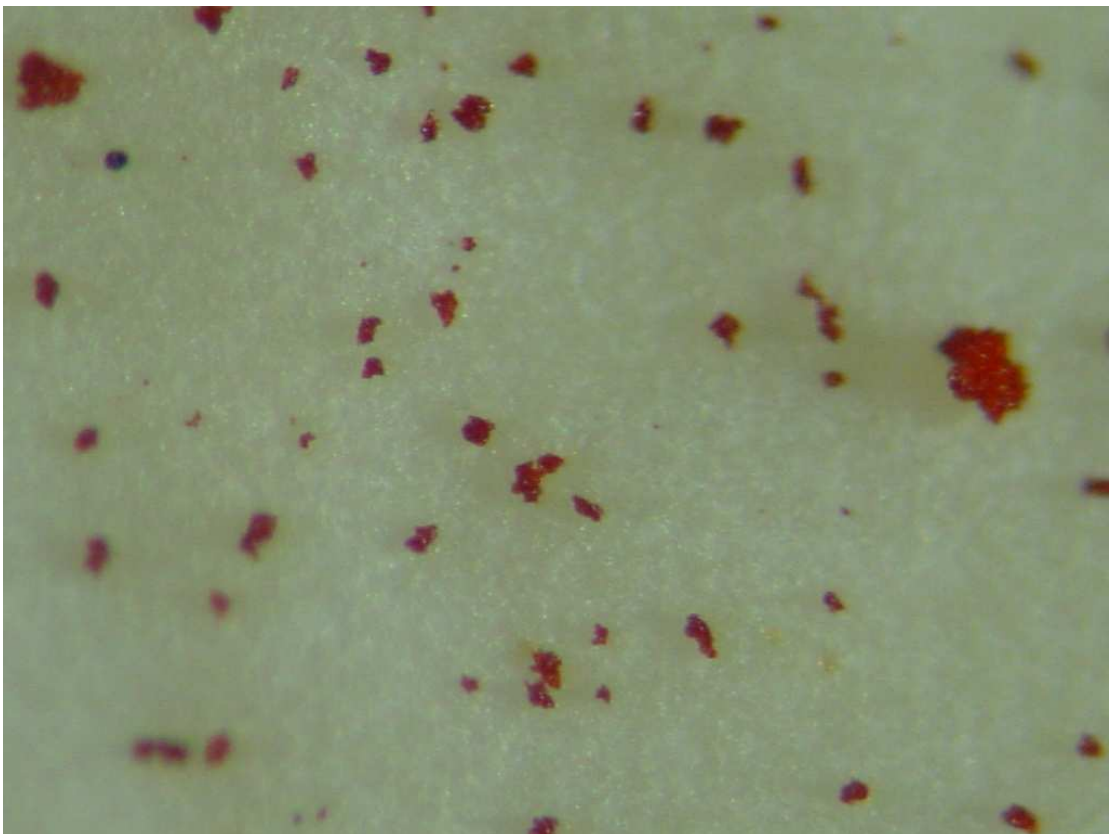


Abbildung 69: PVPP-Partikeln gefärbt mit Jod, aufgenommen mit einem Stereomikroskop

In wässriger Lösung oder Bier kann PVPP ebenso mit Jod gefärbt werden. Dadurch ist es auch möglich, kleinere Partikeln zu identifizieren, die durch die Struktur nicht mehr erkennbar sind (siehe Abbildung 70 und Abbildung 71). Andere Partikeln, wie zum Beispiel Eiweiße, werden nicht so intensiv rot angefärbt.

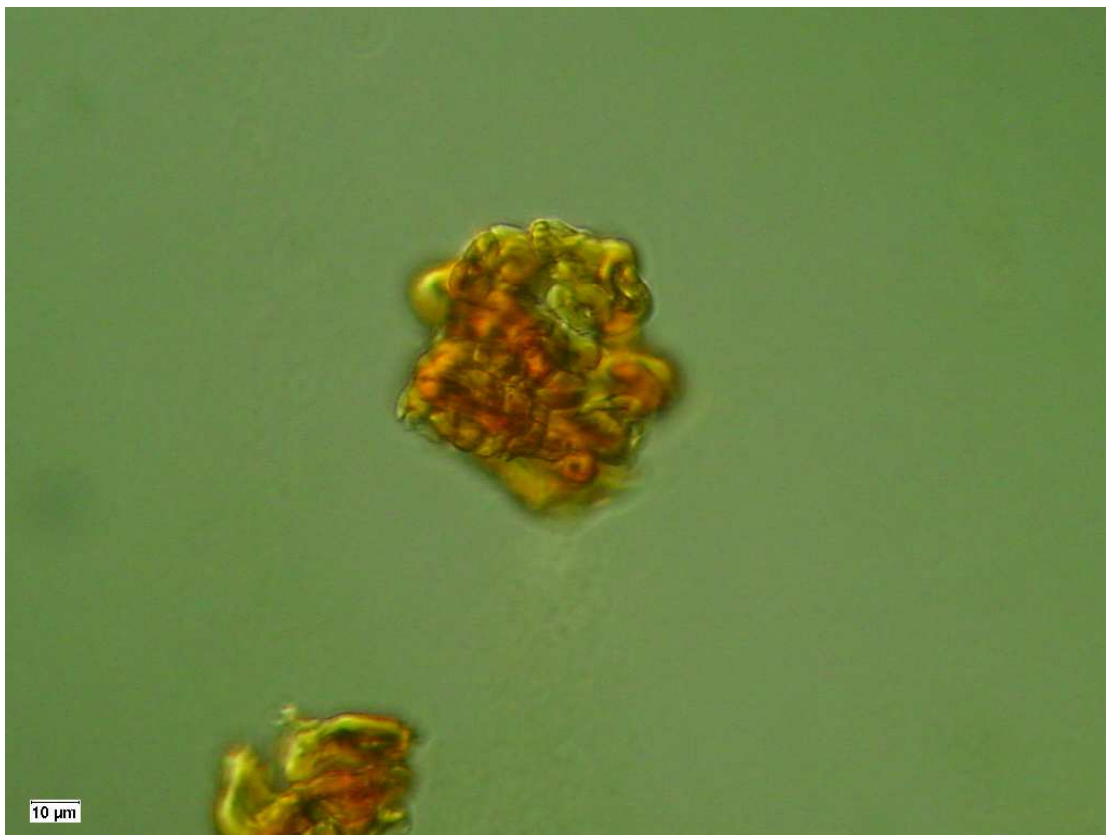


Abbildung 70: PVPP-Partikeln, gefärbt mit Jod



Abbildung 71: Kleines PVPP-Teilchen, gefärbt mit Jod

Es ist auch möglich, Jod in Immersionsöl zu lösen. Damit können PVPP-Teilchen bei der Membranfiltrationsmethode angefärbt werden. Die getrocknete Membran wird durchsichtig und nach einer Einwirkzeit von etwa einer halben Stunde wird das PVPP rötlich angefärbt (siehe Abbildung 72).

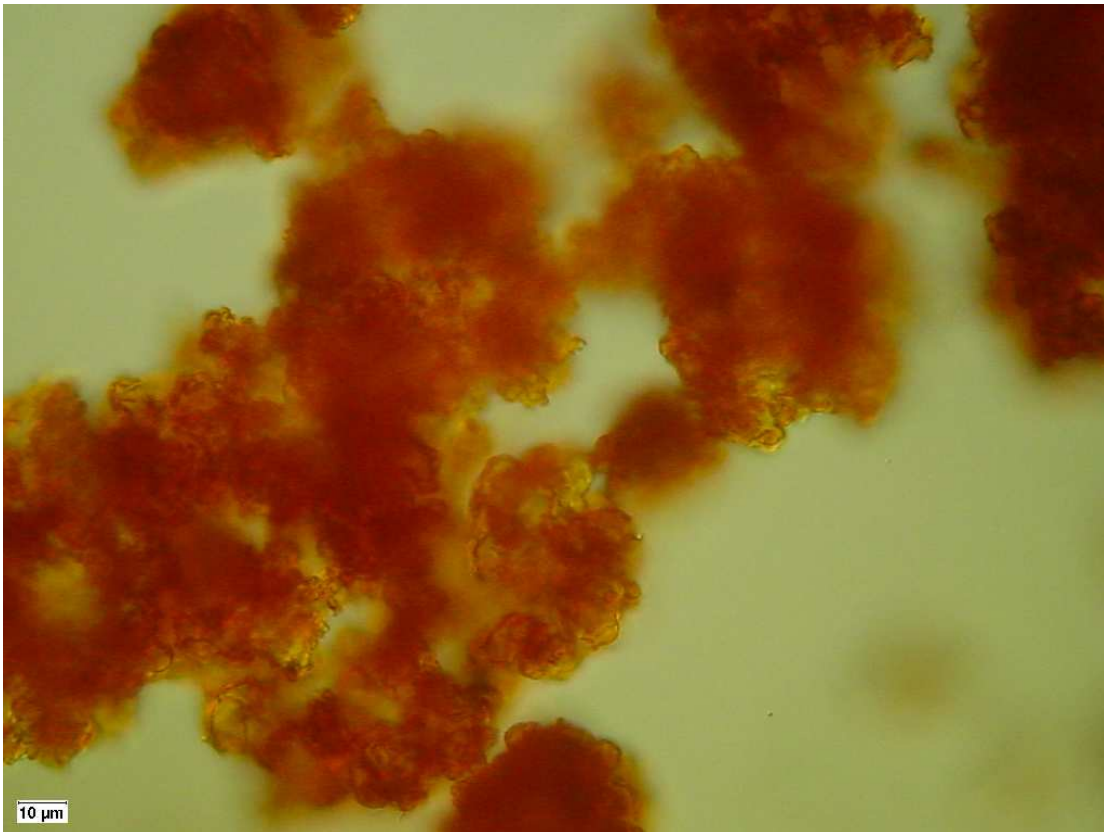


Abbildung 72: PVPP-Partikeln, gefärbt mit einer Jod-Immersionöl-Lösung

4.3.1.2.5 Fasern aus Filterschichten

Die verwendeten Filterschichten für die Fein- oder Entkeimungfiltration sind aus Cellulosefasern, gemischt mit Kieselgur, aufgebaut. Die Filterschichten stehen im Verdacht, wenn sie neu eingelegt werden oder wenn sie zu lange Standzeiten haben, Fasern an das Bier abzugeben. Da diese Filter als letzte Filtrationsstufe eingesetzt werden, gelangen diese Fasern in das abgefüllte Bier.

Der Bodensatz von Bier kann faserförmige Partikeln enthalten. Es wird oftmals vermutet, dass es sich hierbei um Fasern aus den Schichten handelt. Eine Unterscheidung zwischen faserförmigen Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen und Cellulosefasern ist mikroskopisch möglich. Die Cellulosefasern liegen selten als intakte Fasern vor. Beim Herstellungsprozess wird die Cellulose gemahlen und die Fasern werden zerrissen und zerkleinert. Die Cellulose ist kristallin aufgebaut und kann die Ebene des polarisierten Lichtes drehen (siehe Abbildung 73).

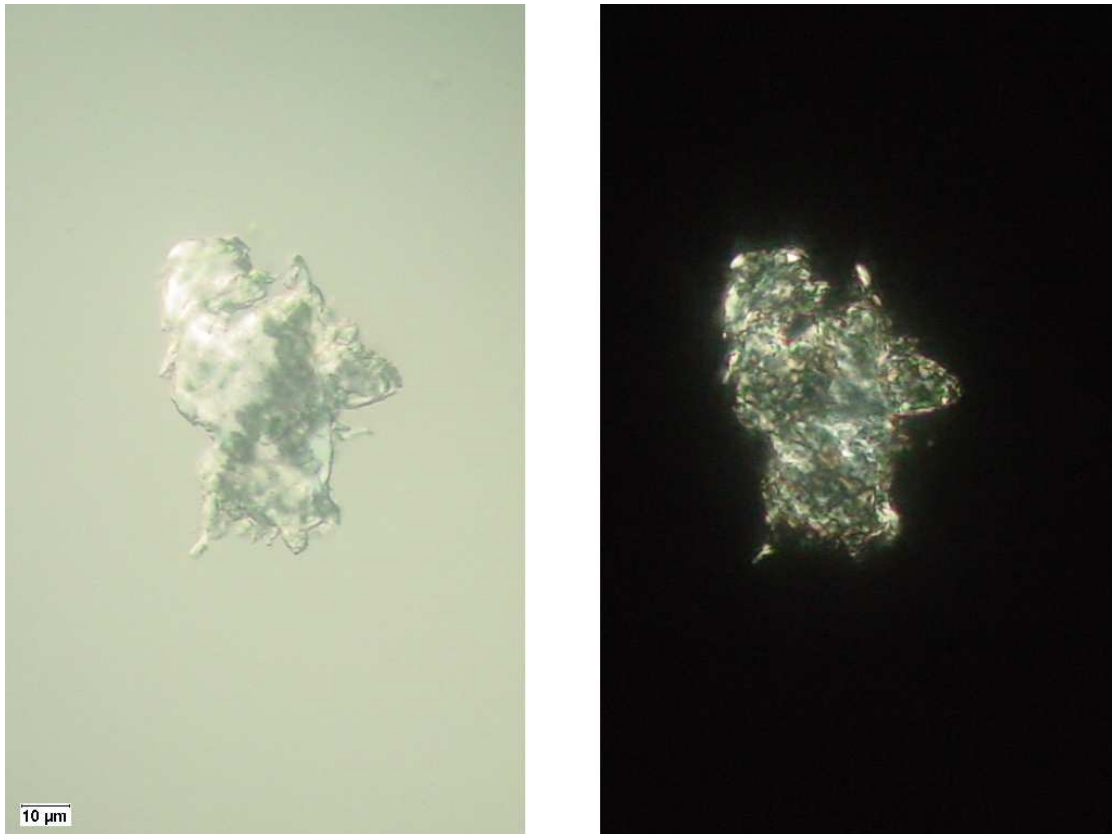


Abbildung 73: Cellulosefaser in Durchlicht (links) und mit polarisiertem Licht (rechts)

Es ist auch möglich, die Cellulose mittels Fluoreszenzmikroskopie zu identifizieren. Die Cellulose hat eine starke Autofluoreszenz (siehe Abbildung 74).



Abbildung 74: Faser im Durchlichtverfahren (links), mit Fluoreszenz (rechts)

4.3.1.3 Fremdstoffe

Fremdstoffe gelangen hauptsächlich über schlecht gereinigte Flaschen in das Bier. Einige Beispiele für Fremdstoffe werden nachfolgend beschrieben.

4.3.1.3.1 Etikettenreste

Etiketten werden so hergestellt, dass sie in der Flaschenwaschmaschine nicht zerfasert werden sollten. Durch das Umpumpen und die mechanische Belastung werden die Etiketten allerdings stark angegriffen. Die Lackschicht wird teilweise abgerieben und einige Etiketten zerreißen. Die Lackteilchen und Fasern werden in der Lauge aufgeschlemmt und gelangen so in die Flasche. Durch Frischwasserspritzungen sollten alle Reste ausgespült werden. Bei verstopften Düsen ist dies aber nicht immer der Fall und die Flasche wird nicht richtig gereinigt. Die Fasern der Etiketten sind im Gegensatz zu den Fasern in den Filterschichten nicht so stark gemahlen. Es können also intakte Fasern gefunden werden (siehe Abbildung 75).



Abbildung 75: Intakte Faser aus einem Etikett

Die Lackreste erscheinen in allen möglichen Farben und sind auch daran zu erkennen (siehe Abbildung 76).



Abbildung 76: Lackreste von Etiketten in verschiedenen Farben

Nicht farbige Lackreste sind oft an dem stufenartigen Aufbau der Lackschichten zu identifizieren (siehe Abbildung 77).



Abbildung 77: Lackrest ohne Farblackierung

4.3.1.3.2 Aluminiumreste

In einigen Brauereien werden als Flaschenausstattung Aluminiumkapseln auf den Flaschenhals geklebt. In der Flaschenwaschmaschine wird das Aluminium durch die Lauge aufgelöst. Die Auflösung geschieht aber nicht immer vollständig. Kleinere Aluminiumteilchen können durch mangelnde Reinigung der Flaschen im Bier gefunden werden. Im mikroskopischen Bild erscheinen die Teilchen im Durchlichtverfahren schwarz. Erst bei der Verwendung von Auflicht wird die silberglänzende Oberfläche sichtbar (siehe Abbildung 78).

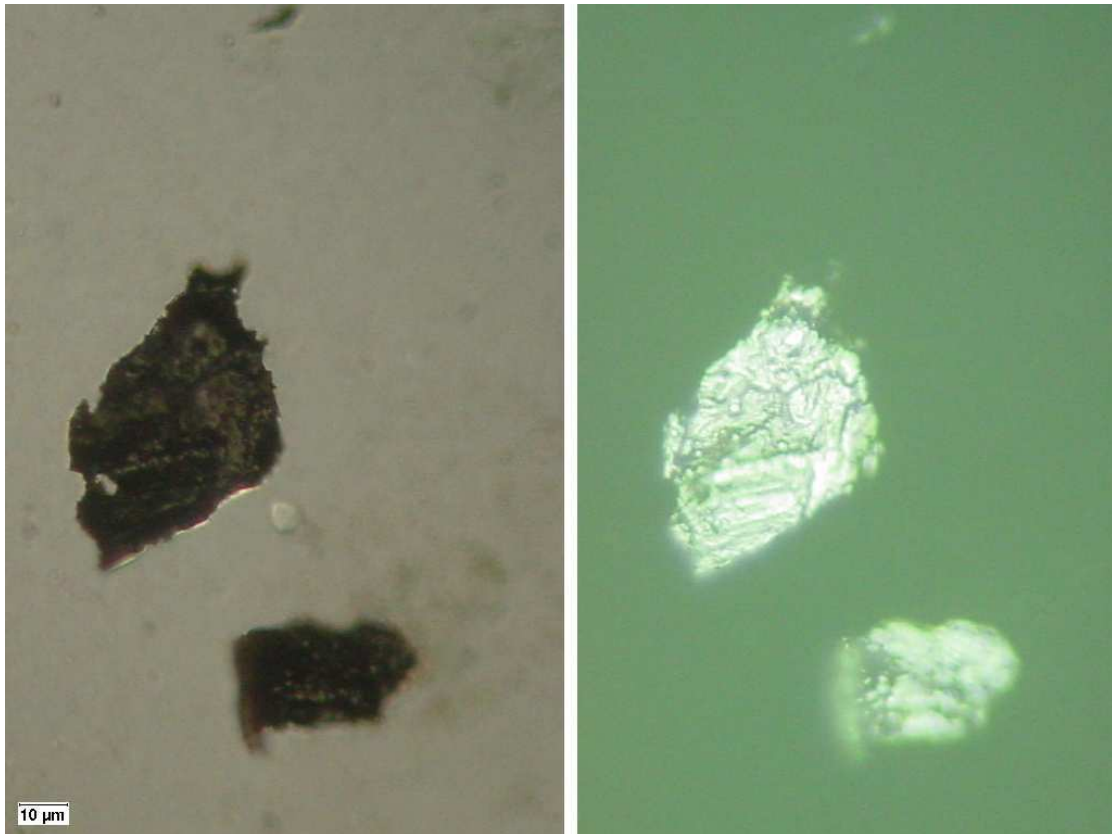


Abbildung 78: Aluminiumteilchen, links mit Durchlicht, rechts mit Auflicht

4.3.1.3.3 Rost

In einigen Fällen sind Rostpartikeln in Bier zu finden. Eisenteile, mit denen das Produkt Bier in Kontakt kommt, werden nur noch wenig in der Brauerei eingesetzt. Flaschenwaschmaschinen, die aus Eisen gefertigt wurden, sind noch im Einsatz. Durch Rostansatz können solche Teilchen in die Lauge oder in Wasserspritzungen und dadurch in die Flasche gelangen. Die Röstpartikeln sind an der gelblich-bräunlichen Farbe zu erkennen (siehe Abbildung 79).

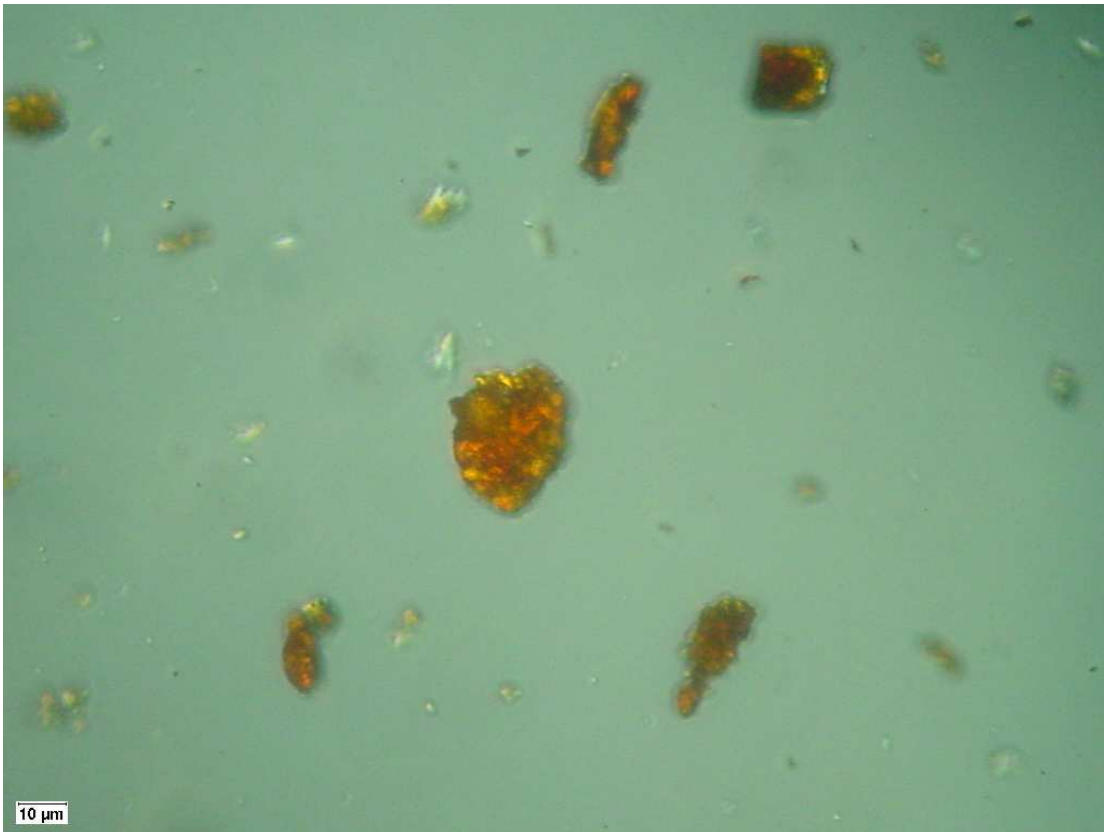


Abbildung 79: Rostpartikeln

4.3.2 Möglichkeiten der Membranfiltrationsmethode

Mit dieser Methode lassen sich verschiedene Schritte im Produktionsablauf, wie sie in den Unterkapiteln dargestellt sind, kontrollieren. Die Membranfiltrationsmethode hat den Vorteil, dass alle Partikeln, die größer sind als der Porendurchmesser, auf der Membran zurückgehalten werden. Auch geringe Mengen an Partikeln können so identifiziert und eventuell auch quantifiziert werden. Ein Nachteil ist, dass Färbemethoden nicht angewendet werden können, da die Farbstoffe nur in wässriger Lösung funktionieren und die Membran sich nur mit Öl durchsichtig machen lässt. Jedoch lassen sich die meisten relevanten Partikeln (wie zum Beispiel Filterhilfsmittel) allerdings ohne Färbung eindeutig identifizieren, wie es in den vorigen Kapiteln in den Abbildungen dargestellt ist. Die Abbildung 80 zeigt einen Ausschnitt aus einer Membran. Die Kieselgurpartikeln lassen sich eindeutig identifizieren und von den großen, gelblichen Eiweißgerbstoffpartikeln unterscheiden.



Abbildung 80: Ausschnitt aus einer Membran, durchsichtig durch Immersionsöl

4.3.2.1 Stufenkontrolle der einzelnen Filtrationsschritte

Filterhilfsmitteldurchbrüche werden normalerweise mit der Streulichtmessung überwacht. Bei einem sprunghaften Anstieg der 25°-Trübung um 0,5 EBC wird die Filtration in Kreislauf geschaltet. Es sind ca. 4 mg/l Kieselgur notwendig, um diesen Trübungsanstieg zu erreichen (siehe Abbildung 82). Die Abbildung 84 und die Abbildung 85 zeigen den optischen Unterschied in einer Klarsichtflasche. Durch diese Mengen Kieselgur wird eindeutig sichtbarer Bodensatz erzeugt. Das Bier wäre in diesem Fall in der Qualität stark beeinträchtigt und es stellt sich die Frage, ob es in diesem Fall überhaupt noch nach dem Lebensmittelgesetz produziert ist. Die Messungen, dargestellt in der Abbildung 81, Abbildung 82 und Abbildung 83, haben jedoch gezeigt, dass geringe Mengen an Partikeln zwar mit dieser Methode messbar sind, aber im Grundrauschen der Trübungsmessung in Bier nicht wirklich wahrgenommen werden können.

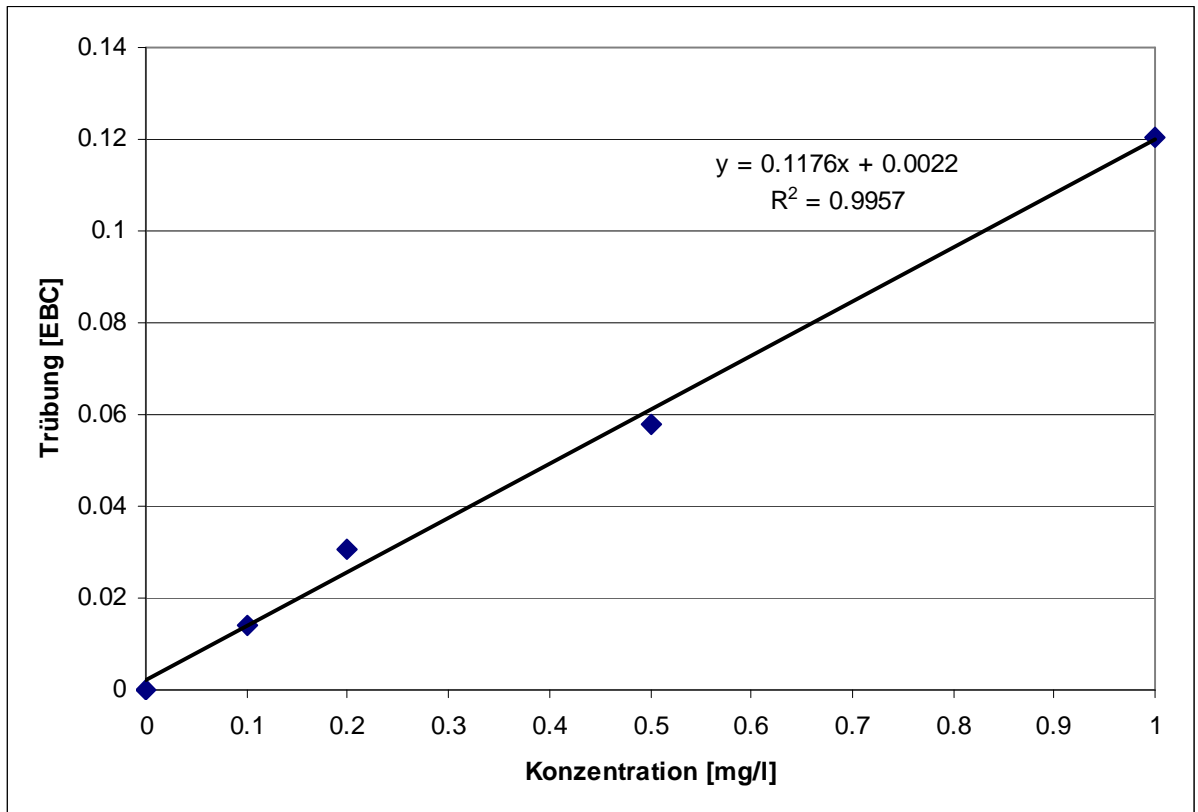


Abbildung 81: Trübung verursacht durch Kieselgur in dest. Wasser, Messwinkel 25° im Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mg

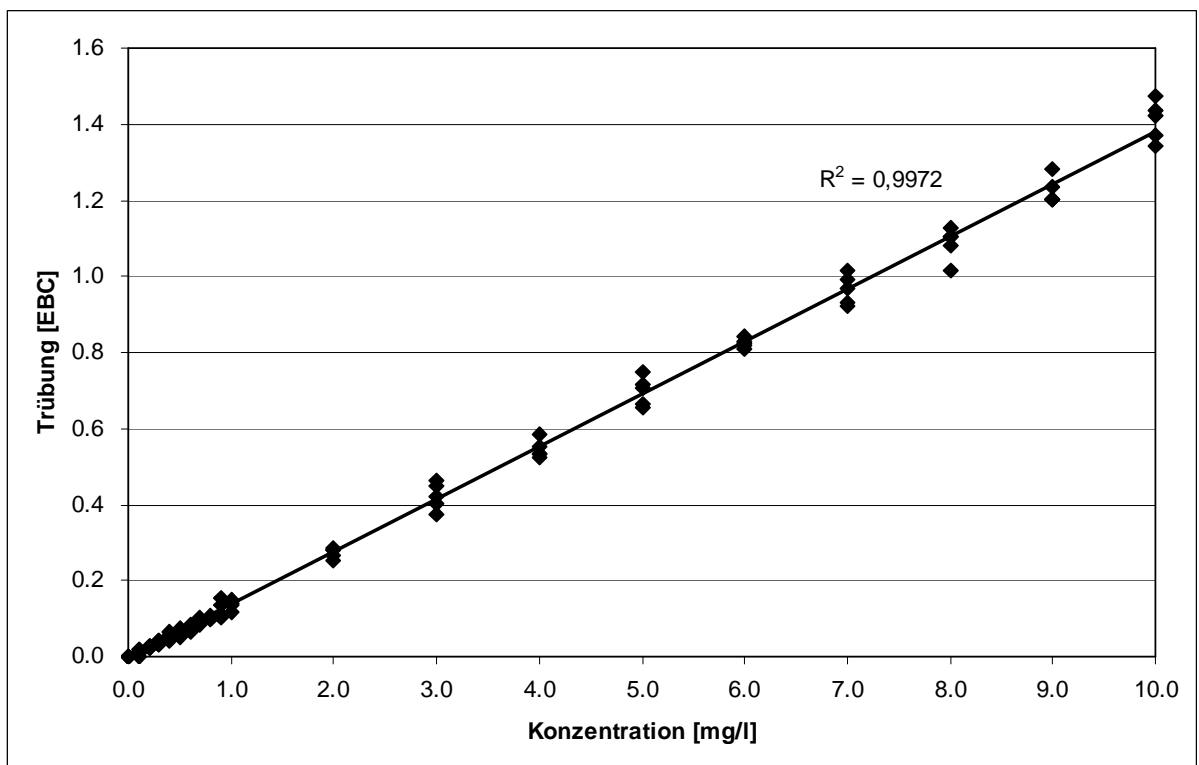


Abbildung 82: Trübung verursacht durch Kieselgur in dest. Wasser, Messwinkel 25° im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mg

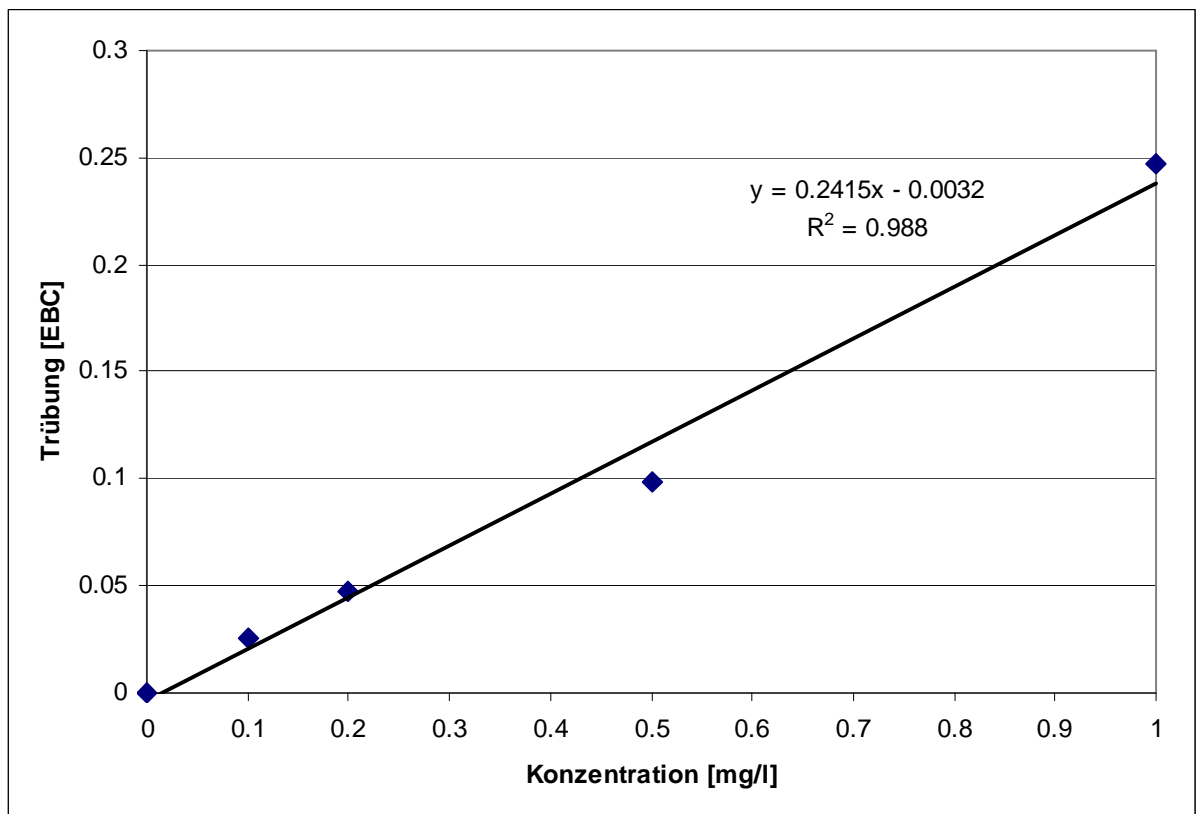


Abbildung 83: Trübung verursacht durch PVPP in dest. Wasser, Messwinkel 25° im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mg



Abbildung 84 (links): Klarsichtflasche versetzt mit 4 mg/l Kieselgur in dest. Wasser (Bodensatz und weiße Partikeln in Schweben)



Abbildung 85 (rechts): Klarsichtflasche gefüllt mit dest. Wasser (keine Partikeln sichtbar)

4.3.2.1.1 Kieselgurfilter

Die Kieselguranschwemmfilter unterscheiden sich in drei Bauarten: Horizontal-, Kerzen- und Rahmenfilter. Von entscheidendem Einfluss ist hier die Art der Anschwemmunterlage. Je nach Alter und Bauart ist die Größe der Spaltweite unterschiedlich, wodurch verschieden große Kieselgurpartikeln die Stützschrift passieren können. Ebenso ist es möglich, dass sich die Stützschriften verbiegen und dadurch den Durchlass vergrößern. Die Stützschrift des Rahmenfilters unterscheidet sich von den vorher genannten Typen, indem sie schon selbst Filtrationsfunktion übernimmt. Die Kieselgurabgabe an das Filtrat ist abhängig von der verwendeten Voranschwemmung, Druckstößen und der Filtrierbarkeit der Biersorte. Die Tabelle 20 zeigt die verschiedenen Praxisfiltrationen aufgetrennt nach Bauart des Filters. Der Vergleich der Mittelwerte zeigt, dass der Horizontalfilter die höchste Partikelanzahl durchlässt. Zu beachten ist jedoch hierbei, dass es sich bei den Horizontalfiltern meist um Filter älteren Baujahres handelt, die mit einem Drahtgewebe als Stützschrift ausgestattet sind. Es ist davon auszugehen, dass hier die Spaltweiten größer sind, und dadurch auch die gefundenen maximalen Partikelndurchmesser am größten sind. Somit passieren mehr Partikeln den Filter. Die untersuchten Kerzenfilter erzielten die besten Ergebnisse, wobei der Unterschied zu den Rahmenfiltern nicht sehr groß war. Auffällig bei den Rahmenfiltern war der kleinere maximale Partikelndurchmesser (siehe Mittelwerte Tabelle 21). Die Untersuchung hat aber auch gezeigt, dass mit derselben Filterlinie bei verschiedenen Läufen sehr große Unterschiede auftreten können (Kerzenfilter Brauerei D: 108 Partikeln/ml bei Lauf 1 und 1400 Partikeln/ml bei Lauf 2, Horizontalfilter Brauerei I: 778 Partikeln/ml Lauf 2 und 4000 Partikeln/ml Lauf 1). Wie die Tabelle 20 zeigt, werden durch den PVPP-Filter nicht alle Kieselgurpartikeln zurückgehalten. Eine höhere Kieselgurfracht erzwingt jedoch nach dem PVPP-Filter keineswegs eine höhere Anzahl an Kieselgur. Dies bedeutet aber, dass die Kieselgurpartikeln vom PVPP zurückgehalten werden. Falls sie bei der Regeneration des PVPPs nicht entfernt werden, reichern sie sich dort an und können zu einem späteren Zeitpunkt an das Filtrat abgegeben werden.

4.3.2.1.2 PVPP-Filter

Für die PVPP-Stabilisierung mit Regeneration werden Horizontal- und Kerzenfilter eingesetzt. Die PVPP-Partikeln sind normalerweise relativ groß ($> 100 \mu\text{m}$) und sollten von der Stützschrift zurückgehalten werden können. Durch die Regeneration des PVPPs werden die Partikeln jedoch teilweise zerkleinert, so dass Teilchen entstehen, deren Größe zwischen 5 und $10 \mu\text{m}$ liegt. Diese Teilchen sind klein genug, um die Stützschrift zu passieren. Aus der Tabelle 20 wird ersichtlich, dass die Durchlässigkeit der Filter sehr unterschiedlich sein kann und sehr hohe Werte gefunden wurden (bis 2200 Partikeln/ml). Auch der maximale Durchmesser der Partikeln (siehe Tabelle 21) ist verschieden und kann sogar Werte bis $200 \mu\text{m}$ erreichen. Der Großteil der Teilchen hat aber einen Durchmesser zwischen 5 und $10 \mu\text{m}$. Sollten vermehrt sehr große Partikeln von dem Filter nicht zurückgehalten werden, ist davon auszugehen, dass die Stützschrift einen Defekt hat.

4.3.2.1.3 Trap-Filter

Die Aufgabe der Trap-Filter ist das Zurückhalten der Partikeln, die durch den PVPP-Filter hindurchgehen. Unterschieden wird bei den Trap-Filtern unter anderem zwischen der nominellen und der absoluten Abscheidegrenze. Wie oben gezeigt, liegen die Partikelndurchmesser, die den PVPP-Filter passieren, meistens zwischen 5 und $10 \mu\text{m}$. Dies bedeutet wiederum, dass der Trap-Filter geeignet sein muss, die Partikeln möglichst vollständig zu entfernen. Die Praxis (siehe Tabelle 20) zeigt aber oft ein anderes Bild. Zwar wird die Anzahl der Partikeln reduziert, aber von einer vollständigen Entfernung kann nicht gesprochen werden (Brauerei E3: 2200 ankommende und 508 durchgehende Partikeln/ml oder Brauerei L2: 79 ankommende und 74 durchgehende Partikeln/ml). Die gefundenen Partikelndurchmesser liegen in den meisten Fällen über $10 \mu\text{m}$. Dies bedeutet, dass die untersuchten Trap-Filter höchstens die Anzahl der Partikeln reduziert haben, jedoch keine Abtrennsicherheit geben.

Um sicher gehen zu können, dass diese Partikeln entfernt werden, sind Filter notwendig, die eine kleinere absolute Abscheidegrenze haben. Die Standzeit dieser Filter ist geringer als bei Filtern mit größeren Abscheidegrenzen. Um den Filter nicht so stark zu belasten, kann mit einer zweistufigen Trap-Filtration mit verschiedenen

Abscheideraten gearbeitet werden (siehe Tabelle 20, Brauerei M). Es ist aber auch möglich, nur mit einem Filter die Partikeln nahezu vollständig zu entfernen (siehe Tabelle 20, Brauereien G, H und O). Es ist davon auszugehen, dass diese Brauereien mit Trap-Filtern arbeiten, die eine kleine absolute Abscheidegrenze haben. Dies zeigt sich auch an den maximalen Partikelndurchmessern von etwa 5 μm (siehe Tabelle 21).

4.3.2.1.4 Schichtenfilter

Die vier untersuchten Schichtenfilter zeigten eine hohe Sicherheit in Bezug auf Filterhilfsmittel. Nach dem Schichtenfilter lassen sich bei drei von den vier Filtern weder Kieselgur- noch PVPP-Teilchen finden. In einem Fall liegt die ermittelte Konzentration bei 1 Partikel/ml. Möglicherweise wurde diese Kieselgur aus der Filterschicht herausgelöst, da die Schichten größtenteils aus Cellulosefasern und Kieselgur hergestellt werden. Es wurden allerdings keine Cellulosefasern auf der Membran gefunden. Nach diesen Untersuchungen ist der Schichtenfilter offensichtlich sehr gut geeignet, Filterhilfsmittel aus dem Bier zu entfernen.

	Kieselgurfilter			PVPP-Filter		Schichtenfilter		Trap-Filter	
	H	Kerze	Rahmen	KG	PVPP	KG	PVPP	1. Stufe (2. Stufe)	
Brauerei	KG	KG	KG	KG	PVPP	KG	PVPP	KG	PVPP
A	665								
B 1			37						
B 2			521	30	36	0	0		
C 1	613							100	
C 2	914							192	
D 1		108							
D 2		1478		12	588			19	43
E 1		68							
E 2		152		4	476			0	16
E 3		280		20	2200			4	508
F 1		250							
F 2	230								
G 1			560					48	
G 2			210	67	117			0	14
H 1	470								
H 2	848			0	37			0	12
I 1	4000								
I 2	778								
J 1			341						
J 2			428			0	0		
K		23				1			
L 1		180		13	193			27	86
L 2	99			2	79			5	74
M		266		10	500			3 (0)	32 (0)
N	875					0	0		
O		185		10	7			2	2
P 1		60		15	336			3	5
P 2		136		77	972			77	12
Mittelwert	949	266	350						

Tabelle 20: Anzahl an Filterhilfsmittelpartikeln nach den einzelnen Filtrationsschritten

	Kieselgurfilter			PVPP-Filter		Schichtenfilter		Trap-Filter	
	H	Kerze	Rahmen	KG	PVPP	KG	PVPP	1. Stufe	
Brauerei	KG	KG	KG	KG	PVPP	KG	PVPP	KG	PVPP
A	70								
B 1			10						
B 2			15	10	20				
C 1	100							10	
C 2	20							10	
D 1									
D 2		40		10	80			8	30
E 1		30							
E 2		25		10	70				35
E 3		50		5	60			5	10
F 1		40							
F 2	40								
G 1			10						
G 2			15	10	100				5
H 1	40								
H 2	60				10				5
I 1	60								
I 2	25								
J 1			15						
J 2			10						
K		15				10			
L 1		25		10	200			10	20
L 2	30			5	100			15	15
M		25		10	150			5	70
N	25								
O		70		5	80			10	5
P 1		20		10	50			5	15
P 2		25		15	100			15	15
Mittelwert	47	33	13						

Tabelle 21: Maximaler Partikelndurchmesser der Filterhilfsmittel nach den einzelnen Filtrationsschritten

4.3.2.2 Kontrolle der Flaschenwaschmaschine

Die Kontrolle der gereinigten Flaschen erfolgt normalerweise durch Flascheninspektoren. Es werden zum Beispiel beschädigte Flaschen, Metallteilchen und Laugenreste damit erkannt und die Flaschen ausgeschleust. Kleinere Partikeln können aber nicht erfasst werden. Die Membranfiltermethode ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung von Schmutzpartikeln und ist somit eine geeignete Methode für die Kontrolle der Flaschenwaschmaschine. Hierzu werden die gereinigten Flaschen aus der Flaschenwaschmaschine mit dest. Wasser aufgefüllt. Die anhaftenden Schmutzpartikeln werden gelöst und können so über die Membran aufgefangen werden.

4.3.2.3 Kontrolle des abgefüllten Bieres

Für die Qualitätssicherung stellt die Membranfiltermethode ein wichtiges Instrument dar. Durch Reklamationen der Kunden kommen einzelne Flaschen mit Trübungspartikeln zurück. Die Ursache der Partikeln muss schnellst möglich geklärt werden, um eventuell andere Chargen zu sperren.

Durch die Identifizierung der Partikeln kann entschieden werden, ob die Partikeln aus dem Bier selbst entstanden sind oder durch den Produktionsprozess hinzugefügt wurden. Die weitere Ursachenergründung kann daraufhin eingeleitet werden. Es kann zum Beispiel eindeutig erkannt werden, ob es sich bei faserartigen Partikeln wirklich um Fasern oder um Eiweißgerbstoffpartikeln handelt.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasste sich mit der Identifizierung von Trübungen, die direkt nach der Filtration messbar sind. Die Trübungsmessung bei der Filtration zeigt zwar an, dass das Bier trüb ist, eine nähere Aussage, welcher Stoff die Trübung verursacht, kann sie jedoch nicht geben. Die Trübungen können verschiedenartig ausgeprägt sein. In dieser Arbeit wird, auch im Hinblick auf die Identifizierungsmöglichkeiten, unterschieden zwischen kolloidal gelösten Trübungen und Partikeln. Die kolloidal gelösten Stoffe führen in Bier zu einer dauerhaften Opaleszenz, die sich normalerweise nicht absetzt. Die Partikeln hingegen setzen sich mit der Zeit ab, führen zu Bodensatz und sind meist mit dem Auge erkennbar.

Kolloidale Trübungen werden mit der enzymatischen Methode identifiziert. Die Methodik ist so gewählt, dass sie in einem Betriebslabor durchgeführt werden kann. Es werden spezifische Enzyme zum Abbau der Trübung eingesetzt. Anhand der spezifischen Reaktion kann die Stoffgruppe erkannt werden, die die Trübung auslöst. Es hat sich gezeigt, dass vor allem α -Glucane und Proteine die meisten Probleme hervorrufen können. β -Glucan hingegen ist für Trübungen sehr selten verantwortlich. Es gibt zwei Quellen für α -Glucane, die Hefe und das Malz. Das Speicherpolysaccharid Glycogen der Hefe ist ähnlich aufgebaut wie das Amylopectin des Malzes. Die Unterscheidung dieser beiden Polysaccharide in Bier war bisher mit sehr großem analytischen Aufwand verbunden. In dieser Arbeit wird eine einfachere Bestimmungsmethode mittels Größenauftrennung der Moleküle (GPC) vorgestellt, die eine sichere Aussage zulässt, ob die Hefe Glycogen an das Bier abgegeben hat. Zur Eingrenzung der genauen Ursache für α -Glucantrübungen wird eine Stufenkontrolle eingeführt. Die Ergebnisse erlauben, den Produktionsschritt zu finden, bei dem die Trübung entsteht. Hier kann dann technologisch eingegriffen werden, um die Trübung zu entfernen.

Der Nachweis der Ursache von Eiweißtrübungen ist analytisch schwierig oder mit großem Aufwand verbunden. In dieser Arbeit wird mittels Gelelektrophorese versucht, nähere Informationen über die Größe der Eiweißmoleküle zu bekommen, die für die Trübung verantwortlich sind. Es hat sich gezeigt, dass aus der Gerste über das Mälzen und in der Maische Molekülgrößen vorhanden sind, die Trübungen verursachen können. Ob diese Moleküle die weiteren Produktionsschritte

überstehen, konnte nicht geklärt werden. Allerdings können mit dieser Methode Proteine der Hefe nachgewiesen werden. In einem nicht trüben Bier sind diese Proteinbanden nicht vorhanden. Wird die Hefe jedoch strapazierten Bedingungen ausgesetzt, wie es bei der Restbierverarbeitung vorkommen kann, setzt die Hefe sehr hochmolekulare Proteine frei. Es ist also auch hier gelungen, die Ursache für Eiweißtrübungen einzugrenzen, um sie technologisch zu beeinflussen.

Für β -Glucantrübungen ist die zytolytische Lösung des Malzes in Kombination mit dem Maischverfahren verantwortlich. Diese Trübung scheint jedoch nur in sehr wenigen Fällen vorzukommen.

Die Partikeln, die in dieser Arbeit betrachtet werden, gelangen erst bei der Filtration oder danach in das Bier. Dabei handelt es sich zum Beispiel um Kieselsäuren, PVPP, Perlite, Kalziumoxalatkristalle, Fasern, Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen und Aluminiumteilchen. Die Identifizierung erfolgt mit Hilfe des Mikroskops. Die Partikeln können meist auf Grund ihrer Form unterschieden werden. In manchen Fällen kann jedoch auch über Färbemittel der Nachweis erleichtert werden. Es werden viele Beispiele und Färbemethoden in Form von Mikroskopaufnahmen gezeigt.

Es wird eine Membranfiltermethode vorgestellt, mit der es möglich ist, die Partikeln zu identifizieren und zugleich zu quantifizieren.

Bei der Bierfiltration werden Filterhilfsmittel eingesetzt. Diese Hilfsmittel werden von den Filtern nicht immer vollständig zurückgehalten. Die Trübungsmessung kann diese geringen Mengen jedoch nicht erfassen. Mit der Membranfiltermethode lassen sich alle Filtrationsschritte auf Filterhilfsmitteldurchbrüche, auch in nur geringen Mengen, überprüfen. Ebenso ist es möglich, die Flaschenwaschmaschine auf den Reinigungseffekt zu kontrollieren. Gefunden wurden in den Praxisproben Etikettenreste, Aluminiumteilchen und Rostpartikeln.

Auch das fertig abgefüllte Bier kann mit dieser Methode auf Partikeln hin untersucht werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden und Ergebnisse geben der Qualitätssicherung in der Brauerei die Möglichkeit, die Ursache der Trübungen zu identifizieren und die Ursache schnell technologisch zu beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

- Brenda. <http://www.brenda.uni-koeln.de>.
- Annemüller, G.; Marx, R.; Gottkehaskamp, L.: Überprüfung der Filtrationsqualität mit einem Partikelmeßgerät. In: *Brauwelt* 39/40 (2000), S. 1573–1578
- Back, W.: *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2005
- Bailey, J. M.; Whelan, W. J.: Physical Properties of Starch. In: *The Journal of Biological Chemistry* 236 (1961), Nr. 4, S. 969–973
- Bathgate, G. N.; Clapperton, J. F.; Palmer, G. H.: The Significance of Small Starch Granules. In: *Journal of the Institute of Brewing* 79 (1973), S. 183–196
- Boivin, P.; Martel, C.: Proteolysis During Malting. In: *Ferment* 4 (1991), S. 182–186
- Burger, M.; Becker, K.: Oxalat Studies on Beer. In: *ASBC Proceedings* 7 (1949), S. 102–114
- Cach, N. C.; Annemüller, G.: Ein Beitrag über die Pentosane im Prozeß der Bierherstellung - sind sie wichtig oder technologisch unbedeutend? In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 7/8 (1995), S. 232–241
- Clasen, C.; Kulicke, W.-M.: Zum Gelbildungsprozeß von (1->3)(1->4)- β -D-Glucanen. In: *Monatsschrift für Brauwissenschaft* (2003), Nr. 9/10, S. 161–171
- Conner, D. E.: Trap Filters. In: *The Brewers Digest* (1976), S. 65–66
- Coote, N.; Kirsop, B. H.: A Haze consisting largely of Pentosan. In: *Journal of the Institute of Brewing* 82 (1975), S. 34
- EFT: Kieselgur. In: *Brauwelt* 9/10 (2001), S. 356–357
- Enevoldsen, B. S.; Schmidt, F.: Dextrines in Brewing. In: *EBC*. 1973, S. 135–148
- Evans, D. E.; Hejgaard, J.: The Impact of Malt Derived Proteins on Beer Foam Quality. Part I. The Effect of Germination and Kilning on the Level of Protein Z4, Protein Z7 and LTP1. In: *Journal of the Institute of Brewing* 105 (1999), Nr. 3, S. 159–169
- Evans, D. E.; Robinson, L. H.; Sheehan, M. C.; Hill, A.; Skerritt, J. H.; Barr, A. R.: Application of Immunological Methods to Differentiate Between Foam-Positive and Haze-Active Proteins Originating from Malt. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 62 (2003), Nr. 2, S. 55–62
- Falbe, J.; Regitz, M.: *Römmp- Chemie Lexikon*. Stuttgart: 1990
- Fincher, G. B.: Ferulic Acid in Barley Cell Walls: A Fluorescence Study. In: *Journal of the Institute of Brewing* 82 (1976), S. 347–349
- Gales, P. W.: A Comparison of Visual Turbidity with Turbidity Measured by Commercially Available Instruments. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (2000), Nr. 3, S. 101–107
- Glenister, P. R.: Some Useful Staining Techniques for the Study of Yeast, Beer, and Beer Sediments. In: *ASBC Proceedings* (1970), S. 163–167
- Glenister, P. R.: Applications of Optical Staining in the Examination of Beer Sediment. In: *ASBC Proceedings* (1971), S. 192–199
- Huber, E.: Die Trübungsmessung: Grundlagen, Anwendung und Grenzen. In: Ennetbürgen: Sigrist-Photometer AG
- Illberg, V.; Machauer, P.; Sommer, K.: Partikelgrößenmessung zur Filtrierbarkeitsbeurteilung von Bieren. In: *Brauwelt* 35 (1993), S. 1503–1505
- Staatl. Brautechnische Prüf- und Versuchsanstalt (Hrsg.): *Calcium - Oxalsäure - Technologische Relevanz*.

- Kano, Y.; Kamimura, M.: Simple Methods for Determination of the Molecular Weight Distribution of Beer Proteins and Their Application to Foam and Haze Studies. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 51 (1993), Nr. 1, S. 21–28
- Kolbach, P.; Zastrow, K.: Über den Einfluß des Maischens auf die Schaumhaltbarkeit des Bieres. In: *Monatsschrift für Brauerei* 16 (1963), Nr. 2, S. 21–33
- Kolczyk, M.; Oechsle, D.: Ein neues Partikelmeßsystem zur Beurteilung von Filtraten und zur Qualitätssicherung. In: *Brauwelt* 28/29 (1998), S. 1288–1292
- Kreis, S.: *Der Einfluss von Polysacchariden aus Malz, Hefe und Bakterien auf die Filtrierbarkeit von Würze und Bier*. Freising, Technische Universität München, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Doktorarbeit, 2003
- Lewis, M. J.; Poerwantoro, W. M.: Release of Haze Material from the Cell Walls of Agitated Yeast. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49 (1991), Nr. 2, S. 43–46
- Malcorps, P.; Haselaars, P.; Dupire, S.; Van den Eynde, E.: Glycogen released by the yeast as a cause of unfilterable haze in the beer. In: *EBC Congress*. 1999, S. 831–838
- Miedaner, H.: *Brautechnische Analysenmethoden Band II*. Freising: 2002
- Morris, T. M.: The Relationship between Haze and the Size of Particles in Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 93 (1987), S. 13–17
- Narziß, L.: Der Stand der technologischen Entwicklung in westeuropäischen Brauereien unter besonderer Berücksichtigung Deutschlands. In: *Der Weihenstephaner* 2 (1977), S. 69–82
- Narziß, L.: Der derzeitige Stand der Schrotertechnologie. In: *Brauwelt* 120 (1980), S. 828–832
- Narziß, L.: *Die Technologie der Würzebereitung*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1992
- Narziß, L.: *Die Technologie der Malzbereitung*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1999
- Narziß, L.; Weigt, K.: Über Trübung und Trubstoffgehalt der Würze. In: *Brauwelt* 120 (1980), S. 409–416
- Omura, F.; Fujita, A.; Maruhashi, T.; Watanabe, R.; Kondo, H.: The influence of yeast cell wall mannoproteins on beer haze stability. In: *EBC Congress*. Prague, 2005, S. 591–598
- Osman, A. M.; Coverdale, S. M.; Onley-Watson, K.; Bell, D.; Healy, P.: The Gel Filtration Chromatographic-Profiles of Proteins and Peptides of Wort and Beer: Effects of Processing - Malting, Mashing, Kettle Boiling, Fermentation and Filtering. In: *Journal of the Institute of Brewing* 109 (2003), Nr. 1, S. 41–50
- Pfenninger, H.: *Brautechnische Analysenmethoden Band I*. Freising: 1997
- Ruß, W.; Meyer-Pittroff, R.: Rechtliche Vorschriften für Kieselgur. In: *Brauwelt* 9/10 (2001), S. 343–346
- Sheehan, M. C.; Skerritt, J. H.: Identification and Characterisation of Beer Polypeptides derived from Barley Hordeins. In: *Journal of the Institute of Brewing* 103 (1997), S. 297–306
- Siebert, K. J.: Relationship of Particle Size to Light Scattering. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (2000), Nr. 3, S. 97–100
- Siebert, K. J.; Stenroos, L. E.; Reid, D. S.: Characterisation of Amorphous-Particle Haze. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 39 (1981), Nr. 1, S. 1–11

- Siebert, K. J.; Stenroos, L. E.; Reid, D. S.; Grabowski, D.: Filtration Difficulties Resulting from Damage to Yeast During Centrifugation. In: *Technical Quarterly* 24 (1987), S. 1–8
- Slack, P. T.; Bamforth, C. W.: The Fractionation of Polypeptides from Barley and Beer by Hydrophobic Interaction Chromatography: the Influence of their Hydrophobicity on Foam Stability. In: *Journal of the Institute of Brewing* 89 (1983), S. 397–401
- Speers, R. A.; Jin, Y.; Paulson, A.; Stewart, R.: Effects of β -Glucan, Shearing and Environmental Factors on the Turbidity of Wort and Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 109 (2003), Nr. 3, S. 236–244
- Steiner, K.; Bürgin, D.: Abmaischen und Abläutern bei 70 °C. In: *Brauerei Rundschau* 94 (1983), Nr. 2, S. 25–28
- Stoupis, T.; Stewart, G. G.; Staffort, R. A.: Mechanical Agitation and Rheological Considerations of Ale Yeast Slurry. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 60 (2002), Nr. 2, S. 58–62
- Tanaka, M.; Sakuma, S.: Prediction of the Formation of Frozen Beer Precipitates. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57 (1999), Nr. 3, S. 104–108
- Thorne, R. S. W.: Instrument for the Objective Measurement of Haze in Bottled Beer. In: *Journal of the Institute of Brewing* 64 (1958), S. 38–46
- Wackerbauer, K.; Evers, H.; Kaufmann, B.: Die Trübungsmessung während der Bierfiltration. In: *Brauwelt* 46 (1992), S. 2378–2386
- Weiss, W.; Postel, W.; Görg, A.: Qualitative and quantitative changes in barley seed protein patterns during the malting process analysed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with respect to malting quality. In: *Electrophoresis* 13 (1992), S. 787–797
- Whitear, T.: Dealing with Persistent Hazes in Freshly Filtered Beer. In: *Ferment* (1997), S. 186–190
- Wildgruber, R.; Harder, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Weiss, W.; Fey, S. J.; Larsen, P.; Görg, A.: Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. In: *Electrophoresis* 21 (2000), S. 2610–2616
- Zarnkow, M.; Back, W.: Neue Erkenntnisse über gushingauslösende Substanzen. In: *Brauwelt* 9/10 (2001), S. 363–370
- Zepf, M.; Geiger, E.: Gushingproblematik durch Calciumoxalat Teil 1. In: *Brauwelt* 48 (1999). S. 2303–2304
- Zepf, M.; Geiger, E.: Gushingproblematik durch Calciumoxalat Teil 2. In: *Brauwelt* 6/7 (2000) S. 222–223
- Zipfel, W.; Rathke, K.-D.: A410 §9 - *Lebensmittelrecht*. München: 2003

7 Anhang

Tabellen enzymatische Trübungsidentifizierung der Praxisproben:

Zeit [h]	Trübung (Messwinkel 90°) [EBC]	
	0	24
P1 OPT	1,02	1,18
P1 Pepsin	1,03	0,60
P2 OPT	1,66	1,37
P2 Pepsin	1,64	1,01
P3 OPT	13,0	13,0
P3 Pepsin	12,8	10,4
P4 OPT	2,40	4,55
P4 Pepsin	2,39	2,69
P5 OPT	0,42	0,46
P5 Pepsin	0,42	0,38
P5 OP	0,44	0,45
P5 Diase	0,43	0,34
P6 OPT	0,30	0,32
P6 Pepsin	0,31	0,25
P6 OP	0,32	0,41
P6 Diase	0,33	0,24
P7 OPT	0,32	0,32
P7 Pepsin	0,30	0,29
P7 OP	0,32	0,37
P7 Diase	0,31	0,32
P8 OPT	0,33	0,42
P8 Pepsin	0,36	0,34
P8 OP	0,33	0,42
P8 Diase	0,33	0,30
P9 OPT	1,28	1,37
P9 Pepsin	1,31	1,23
P9 OP	1,29	1,48
P9 Diase	1,31	0,98
P10 OP	1,12	1,17
P10 Papain	1,76	2,57
P10 OPT	1,08	1,03
P10 PapainT	1,65	1,52

	Trübung (Messwinkel 90°) [EBC]	
Zeit [h]	0	24
P11 OPT	1,22	1,16
P11 Tannase	1,25	1,18
P11 OP	1,19	1,36
P11 Ultraflo	1,25	1,69
P12 OPT	0,86	0,88
P12 Pepsin	0,84	0,58
P12 OP	0,91	0,98
P12 Diase	0,97	0,88
P13 OPT	0,73	0,74
P13 Pepsin	0,80	0,66
P14 OPT	0,55	0,74
P14 Pepsin	0,61	0,51
P15 OPT	49,8	46,7
P15 Pepsin	57,3	9,24
P15 OP	55,4	50,0
P15 Diase	51,5	44,7
P16 OPT	4,20	3,33
P16 Pepsin	5,20	1,50
P16 OP	4,53	4,44
P16 Diase	4,26	4,00
P17 OPT	3,00	2,94
P17 Pepsin	3,20	0,47
P17 OP	3,10	3,11
P17 Diase	3,14	2,80
P18 OPT	1,67	1,77
P18 Pepsin	1,67	1,08
P18 OP	1,69	1,72
P18 Diase	1,75	1,67
P19 OPT	0,59	0,49
P19 Pepsin	0,64	0,37
P20 OPT	8,88	8,67
P20 Pepsin	8,87	4,12
P21 OPT	1,94	7,59
P21 Pepsin	2,01	1,72
P22 OPT	2,26	2,30
P22 Pepsin	2,39	0,70

	Trübung (Messwinkel 90°) [EBC]	
Zeit [h]	0	24
P23 OPT	0,77	0,67
P23 Pepsin	0,73	0,50
P23 OP	0,78	0,77
P23 Diase	0,89	0,90
P24 OPT	0,89	0,70
P24 Pepsin	0,89	0,64
P24 OP	0,93	0,89
P24 Diase	0,91	0,18
P24 Ultraflo	0,86	0,87
P25 OP	0,82	0,84
P25 Lichenase	0,84	0,84
P26 OPT	1,64	3,16
P26 Pepsin	1,65	1,79
P26 OP	1,81	1,51
P26 Diase	1,95	1,80
P27 OPT	0,39	0,41
P27 Pepsin	0,37	0,38
P27 OP	0,36	0,42
P27 Diase	0,43	0,42
P28 OPT	0,40	0,51
P28 Pepsin	0,42	0,40
P28 OP	0,41	0,49
P28 Diase	0,45	0,49
P29 OP	0,42	0,70
P29 Lichenase	0,43	0,62
P29 Ultraflo	0,42	0,57
P30 OPT	2,83	3,07
P30 Pepsin	2,92	1,93
P30 OP	2,88	2,81
P30 Diase	2,90	1,70
P31 OPT	2,63	2,43
P31 Pepsin	2,63	1,76
P31 OP	2,57	2,59
P31 Diase	2,74	2,18

	Trübung (Messwinkel 90°) [EBC]	
Zeit [h]	0	24
P32 OPT	2,61	3,12
P32 Pepsin	2,76	0,88
P32 OP	2,73	2,79
P32 Diase	2,72	2,87
P33 OPT	26,8	27,4
P33 Pepsin	26,7	10,7
P33 OP	26,7	26,2
P33 Diase	26,7	25,8
P34 OPT	4,39	4,00
P34 Pepsin	4,74	2,68
P34 OP	4,43	4,44
P34 Diase	4,51	1,99
P35 OPT	1,36	1,09
P35 Pepsin	1,36	0,56
P35 OP	1,53	1,45
P35 Diase	1,46	1,05
P36 OPT	1,53	1,55
P36 Pepsin	1,55	0,77
P36 OP	1,47	1,53
P36 Diase	1,54	1,14
P37 OPT	1,23	1,02
P37 Pepsin	1,24	0,43
P37 OP	1,19	1,24
P37 Diase	1,26	0,89
P38 OPT	1,56	1,93
P38 Pepsin	1,64	0,30
P39 OPT	1,06	1,01
P39 Pepsin	1,09	0,54
P40 OPT	1,21	1,18
P40 Pepsin	1,24	0,75
P41 OPT	6,21	5,93
P41 Pepsin	6,24	0,63
P42 OPT	0,36	0,36
P42 Pepsin	0,38	0,29

	Trübung (Messwinkel 90°) [EBC]	
Zeit [h]	0	24
P43 OPT	6,88	6,20
P43 Pepsin	6,75	3,03
P43 OP	6,90	9,94
P43 Diase	7,01	8,84
P43 Ultraflo	7,24	10,8
P44 OPT	0,73	0,62
P44 Pepsin	0,75	0,49
P45 OP	1,26	1,21
P45 Diase	1,29	0,69
P45 Mannanase	1,29	1,24
P45 Lichenase	1,25	1,22
P46 OP	0,90	0,91
P46 Diase	0,95	0,54
P47 OPT	2,03	1,67
P47 Pepsin	2,14	1,12
P47 OP	2,03	1,97
P47 Diase	2,07	0,50
P48 OPT	2,07	1,65
P48 Pepsin	2,16	1,19
P48 OP	2,09	1,98
P48 Diase	2,22	0,93
P49 OPT	1,29	2,65
P49 Pepsin	1,36	0,19
P49 OP	1,25	1,64
P49 Diase	1,31	1,41
P50 OPT	4,77	4,53
P50 Pepsin	4,49	0,61
P51 OPT	2,12	3,01
P51 Pepsin	2,21	0,20
P52 OPT	1,06	1,10
P52 Pepsin	1,06	0,78
P52 OP	1,12	1,16
P52 Diase	1,18	0,41
P53 OP	1,21	1,23
P53 Diase	1,20	0,80

	Trübung (Messwinkel 90°) [EBC]	
Zeit [h]	0	24
P54 OPT	1,56	1,41
P54 Pepsin	1,50	0,90
P54 OP	1,44	1,48
P54 Diase	1,58	0,61
P55 OPT	2,90	2,29
P55 Pepsin	3,07	1,65
P55 OP	2,97	2,96
P55 Diase	2,97	0,86
P56 OPT	0,92	0,85
P56 Pepsin	0,86	0,27
P56 OP	0,79	0,84
P56 Diase	0,87	0,86
P57 OPT	1,09	0,87
P57 Pepsin	1,04	0,53
P57 OP	1,04	1,05
P57 Diase	1,07	0,85
P58 OPT	0,57	0,87
P58 Pepsin	0,56	0,25
P59 OPT	3,38	4,09
P59 Pepsin	3,58	1,78
P59 OP	3,45	3,27
P59 Diase	3,50	3,94
P60 OPT	1,31	1,05
P60 Pepsin	1,33	0,73
P60 OP	1,35	1,37
P60 Diase	1,34	0,57
P61 OPT	0,79	0,63
P61 Pepsin	0,86	0,59
P61 OP	0,81	0,79
P61 Diase	0,87	0,24

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Klaus Hartmann
Geburtsdatum/-ort	26.09.1972 in München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

09.1979–08.1983	Grundschule Vaterstetten
09.1983–08.1984	Hauptschule Vaterstetten
09.1984–06.1993	Gymnasium Vaterstetten
06.1993	allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

07.1993–06.1994	Gebirgsjäger in Mittenwald
-----------------	----------------------------

Berufsausbildung

09.1994–04.1996	Ausbildung zum Brauer und Mälzer in der Bayerischen Versuchs- und Lehrbrauerei Weihenstephan
11.1996–05.2001	Studium zum Diplomingenieur für Brauwesen und Getränketechnologie an der Technischen Universität München
ab 06.2001	Promotion am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I der TU München

Berufspraxis

05.1996–10.1996	Brauer im Herzoglichen bayerischen Brauhaus in Tegernsee
06.2001–07.2002	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I der TU München
ab 08.2002	Laborleiter des Malzlabors am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I der TU München