

Optimierung von Rezeptur und Herstellungsverfahren zur Vermeidung qualitätsmindernder Aromastoffe in hopfenhaltigen Getränken

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie Prof. Dr. T. Becker/Dr. M. Gastl
Forschungsstelle II:	Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Dr. P. Schieberle
Industriegruppen:	Deutscher Hopfenwirtschaftsverband e.V., Pfaffenhofen/Ilm Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB), e.V.
	Projektkoordinator: W. Mitter, Simon H. Steiner Hopfen GmbH, Mainburg
Laufzeit:	2009 - 2011
Zuwendungssumme:	€ 385.500,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Hopfen besitzt sowohl für Aroma und Geschmack als auch für die Lagerstabilität von Bier große Bedeutung. Das aus dem Hopfen stammende Prenylflavonoid Xanthohumol wurde zudem kürzlich als chemopräventiv wirksamer Inhaltsstoff erkannt.

Der durch Licht katalysierte Abbau bestimmter Hopfenkomponenten ist ein lange bekannter, potentiell qualitätsmindernder Faktor in der Brauwirtschaft, der mit dem Entstehen des sog. Lichtgeschmacks von Bier in Zusammenhang gebracht wird. Aufgrund von Literaturdaten ist anzunehmen, dass daran u.a. das sehr geruchsaktive 3-Methyl-2-buten-1-thiol beteiligt ist, dessen Bildung aus geruchlosen Vorstufen im Hopfen durch Lichteinfluss diskutiert wird. Um neuen Produkten einen hohen Wiedererkennungswert zu geben, wird eine Reihe von Bieren bevorzugt in Weißglasflaschen vermarktet, da Repräsentativ-Umfragen der Gesellschaft für Rationelle Psychologie bestätigen, dass Bier in Weißglasflaschen bevorzugt gekauft wird. Aufgrund der o.g. Empfindlichkeit von Bierinhaltsstoffen gegenüber Licht ist die Abfüllung von Bier bzw. Getränken in Weißglasflaschen aller-

dings als problematisch anzusehen. Um dennoch dem Trend zur Weißglasflasche folgen zu können, wurden in den letzten Jahren eine Reihe von speziellen Bieren mit weniger hopfenbetontem Geschmack vermarktet, da mit einer Reduzierung des Hopfeneinsatzes auf die Minimierung des Lichtgeschmacks Einfluss genommen werden kann. Dieser Trend ist allerdings für die überwiegend mittelständische Hopfenbranche nicht positiv, denn auch alkoholfreie Erfrischungsgetränke auf Getreidebasis werden aus o.g. Grund heute überwiegend ohne Hopfeneinsatz hergestellt.

Neue Hopfenprodukte, in denen gezielt bestimmte Vorstufen der Fehl aromabildung reduziert wurden, oder die bestimmte natürliche Inhibitoren der Photoreaktion enthalten, könnten eine Basis für neue Anwendungen im Bereich von Bier bzw. Getränken sein.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Klärung der molekularen Strukturen aller Fehl aromastoffe und ihrer Vorstufen in Malz/Hopfen sowie deren Bildungswege im Verlauf des Herstellungsprozesses. Damit sollte die Möglichkeit geschaffen werden, gezielt über die Anreicherung bzw. Abreicherung bestimmter Hopfen-Inhaltsstoffe in

die Fehlromabildung einzugreifen. Gleichzeitig sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, lichtstabile, nicht-alkoholische, gehopfte Getränke mit funktionellem Zusatznutzen zu entwickeln.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Projektes wurden geruchsaktive Verbindungen, die das Fehlroma „Lichtgeschmack“ verursachen, sowie deren geruchlose Vorstufen strukturell charakterisiert und Bedingungen (Lichteinfluss, Hopfengabe), unter denen der Lichtgeschmack entsteht bzw. vermindert werden kann, auf molekularer Ebene untersucht.

Darauf basierend wurden Strategien zur Vermeidung des Fremdaromas während der Produktion hopfenhaltiger Getränke auf Cerealienbasis entwickelt. Dies umfasste vor allem die gezielte Anreicherung von Photoinhibitoren (Tryptophan, phenolische Substanzen, wie z. B. Quercetin, Ascorbinsäure) und eine Minimierung von Photoinitiatoren (Riboflavin, Cystein, Methionin) über die Rohstoffauswahl sowie den Mälzungs- und Brau-/Extraktionsprozess (Hopfengabe).

Lichtgeschmack äußert sich sensorisch in einem deutlichen Anstieg der „fuchsig/schwefligen“ und „kartoffeligen“ Note. Belichtungsversuche an Bier zeigen, dass dieses Fehlroma unter Lichtungseinfluss sowohl bei gehopftem als auch beim ungehopftem Bier auftritt. In den belichteten Bieren wurde zudem ein „käsiger“ Geruchseindruck stärker wahrgenommen als bei den unbelichteten Referenzbier, während weitere Geruchsattribute, wie „Honig/blumig“, „würzig“ und „malzig“, in allen Bieren gleich bewertet wurden.

Mit Hilfe des FD-Faktors (Flavour Dilution Faktor) konnte auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass 3-Methylbutanal (Durchbruchschwelle 50 µg/L), 3-Methyl-2-butene-1-thiol/3-MBT (0,1 µg/L), 3-(Methylthio)-propanal (1,9 µg/L), Phenylacetaldehyd (30 µg/L) und 3-Methylbuttersäure in belichteten Bieren höhere FD-Faktoren als in unbelichteten Bieren aufwiesen und somit vermeintlich verantwortlich für das veränderte und unangenehm empfundene Aroma sind. Dies bestätigte sich mit Ausnahme der 3-Methylbuttersäure auch in einer Quantifizierung dieser Aromastoffe. Durch Zudosage dieser identifizierten Verbindungen in Bier konnte der typische Lichtgeschmack des gehopften und ungehopften Bieres simuliert werden. Dabei wurde ein möglicher Unterschied nur in geringem Maße (α -Risiko lt. § 64 LFGB 5 % für gehopftes, 10 % für ungehopftes Bier) wahrgenommen.

Eine Aufklärung der Bildungswege zur Entstehung von Lichtgeschmack wurde anhand weiterer Modellversuche vorgenommen. Modellversuche mit einer wässrigen Methioninlösung in Gegenwart von Riboflavin und α -Dicarbonylen zeigten, dass bis dato lediglich 3-(Methylthio)-propanal (kurz Methional) als zum Lichtgeschmack in Bier beitragend lokalisiert werden konnte. Methionin konnte hierbei zwar als Vorstufe von 3-(Methylthio)-propanal auch auf molekularer Ebene eindeutig identifiziert werden, jedoch sind weitere Vorstufen zu vermuten. Eine Erklärung wäre, dass sog. Streckeraldehyde auch aus peptidisch gebundenen Aromastoffen entstehen können.

Der Einsatz von Hopfenprodukten in diesem Projekt verfolgt das Ziel Hopfeninhaltsstoffe, v. a. phenolische Substanzen, welche als Photoinhibitoren agieren könnten, anzureichern und somit den Lichtgeschmack zu minimieren. Als analytische Leitkomponente wurde die Bildung von 3-MBT verfolgt. Aufgrund von Dimethylallylstrukturen in einigen Hopfeninhaltsstoffen, wie Xanthohumol, Humulonen und Lupulonen, ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Verbindungen ebenfalls Vorstufen des 3-MBT sein könnten. Um dies zu belegen, wurden Modelllösungen, in ihrer Alkohol-, Riboflavin- und Cysteinkonzentration und im pH-Wert dem Bier nachempfunden, belichtet und auf Lichtgeschmack untersucht. In dieser Versuchsreihe wurden weiterhin Verbindungen, die durch chemische Veränderungen von Isohumulon gebildet werden, untersucht. Die Ergebnisse dieser Modelllösungen besagen, dass allein Isohumulon und Humulon in wässriger Lösung MBT bildeten.

Um die Anwendbarkeit der Ergebnisse aus diesen Modellversuchen in die Praxis zu übertragen und lichtstabile Hopfenprodukte zu lokalisieren, wurden aus der Produktpalette von verfügbaren Hopfenprodukten Gerbstoffextrakt, CO₂-Extrakt, iso-Extrakt, RHO-Extrakt aufgrund ihrer Inhaltsstoffe ausgewählt und ebenfalls mittels Modelllösungen untersucht. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Studien konnten die Hopfenprodukte Gerbstoffextrakt und RHO-Extrakt auf molekularer Ebene bzgl. 3-MBT als lichtstabil nachgewiesen werden, was jedoch keine Aussage über die Bildung von 3-(Methylthio)-propanal oder Methanthiol zulässt.

In einem weiteren Ansatz wurde über eine gezielte Anreicherung von möglichen Photoinhibitoren (Quercetin, Catechin, Prophylgallat, Ascorbinsäure und Ascorbylpalmitat) in Modelllösungen deren Wirksamkeit überprüft. Der Einsatz von Quercetin als Inhibitor der 3-MBT-Bildung war am wirksamsten. Bei einem Zusatz von 0,5

mg/L Modell war bereits eine Inhibition der 3-MBT-Bildung um 80 % messbar. Catechin, durch seine Lichtabsorption im relevanten Bereich auch als Photoinhibitor denkbar, war mit einer Inhibition um 60 % ebenso wirksam. Die nicht so stark bis gar nicht photoaktiven Substanzen Propylgallat, Ascorbinsäure und Ascorbylpalmitat wiesen bei weitem keine so starken Inhibitorwirkungen auf. Propylgallat senkte die 3-MBT-Bildung nur gering, während Ascorbinsäure und Ascorbylpalmitat in niedrigen Konzentrationen keine Wirkung aufwiesen. Ascorbinsäure senkte interessanterweise die 3-MBT-Bildung ab einer Konzentration von 100 mg/L sehr stark.

Für die Entwicklung lichtstabiler, nicht-alkoholischer, gehopfter Getränke mit funktionellem Zusatznutzen wurden die Erkenntnisse aus den Modellversuchen in die Praxis umgesetzt. Es zeigte sich, dass durch Variation der Mälzungsparameter (Temperatur, Zeit und Wassergehalt) die Gehalte an Photoinhibitoren und Photoinitiatoren deutlich beeinflusst werden konnten. Eine Erhöhung des Weichgrads (Wassergehalt) bewirkte eine Erhöhung der Konzentrationen an Cystein, Methionin und Gesamtpolyphenolen. Der Tryptophangehalt ging mit einer Erhöhung der Keimtemperatur einher. Riboflavin wurde durch eine Intensivierung aller Mälzungsparameter angereichert. Dabei konnten alle Konzentrationen auf die doppelte Ausgangskonzentration des jeweiligen Rohstoffes gesteigert werden.

Eine Optimierung des Mälzungsregimes zur Anreicherung von Photoinhibitoren und einer Minimierung von Photoinitiatoren unter Beibehaltung einer guten Verarbeitbarkeit (angestrebt wurden niedrige Viskositätswerte $< 1,6$ m Pas wie bei Gerstenmalz) erfolgte für Hafer, Dinkel, Triticale und Rispenhirse mittels statistisch geplanten Mälzungsvariationen. Hafer zeigte die angestrebten Bedingungen (Minimierung aller Photoinitiatoren, Maximierung aller Photoinhibitoren, niedrige Viskosität, Maximierung des Extraktes) bei einer Keimtemperatur von 18 °C, einer Keimzeit von 7 Tagen und einem Weichgrad von 48 % (Rispenhirse: Keimtemperatur 19 °C, Keimzeit 5 Tage, Weichgrad 44 %). Die Ergebnisse belegen, dass sehr große Unterschiede innerhalb der eingesetzten Rohstoffe vorliegen; v. a. das Rispenhirsemalz zeigte beispielsweise sehr hohe Gehalte (1.579 mg/l) des Photoinitiators Riboflavin, hingegen weist Triticalemalz nur geringe Konzentrationen (27 mg/l) auf.

Für die angestrebte Herstellung innovativer Getränke wurden die nach einem Extraktionsprozess (Maischen) erhaltenen Substrate mit vier verschiedenen Milchsäurestämmen (*Lactobacil-*

lus amylolyticus, *Lb. casei*, *Lb. brevis* und *Lb. plantarum*) fermentiert und die Fermentationsführung ebenfalls mittels eines statistischen Versuchsaufbaus hinsichtlich pH-Abfall, maximal optische Dichte, Vermehrungsfaktor, Gesamtsäure-Bildung optimiert.

Durch den Einsatz geeigneter Hopfenprodukte mit hohem Anteil an Photoinhibitoren sollte die Lichtstabilität sichergestellt werden. Da die meisten Michsäurestämmen nicht hopfentolerant sind, erfolgte die Hopfengabe nach der Fermentation. Folgende Hopfenprodukte wurden eingesetzt: „Polyphenolreiche“ Hopfenprodukte, wie Treberpellets P45 Hallertau Tradition, Hopfentreber aus CO₂-Herstellung, Gerbstoffextrakt, Pellet 90 Hallertau Tradition und Gerbstoffpulver und „polyphenolarme“ Produkte, wie RHO-Iso-Extrakt, iso-Extrakt und CO₂-Extrakt Hallertauer Tradition. Die Hopfengabe erfolgte standardisiert über Zudosageversuche in eine Gerstenmalz basierte mit *L. plantarum* fermentierte und anschließend mit iso-Extrakt (10 mg/l iso- α -Säure) versetzte Würze. Hinsichtlich der Untersuchung an Photoinhibitoren (erfasst als Gesamtpolyphenolgehalt) wiesen im Vergleich der Hopfenprodukte Treberpellets P45 (ca. 500 mg/L), Pellets Typ 90 (ca. 600 mg/L) und Gerbstoffpulver (> 8.200 mg/L) die höchsten Polyphenolgehalte auf. Die Ergebnisse belegen, dass der Einsatz unterschiedlicher Hopfenprodukte mit höheren Polyphenolgehalten (z. B. Gerbstoffextrakt ca. 700 mg/L) den sensorisch ermittelten Lichtgeschmack um bis zu 50 % vermindern können.

Zur weiteren Beurteilung erfolgten Zudosageversuche mit verschiedenen Photoinhibitoren und Photoinitiatoren (Riboflavin, Cystein, Methionin und Ascorbinsäure) in 6 verschiedenen Konzentrationsschritten (0,25- bis 4-fache Konzentration) ausgehend vom durchschnittlichen Gehalt im Standardbier. Dabei konnte gezeigt werden, dass:

- eine Riboflavinkonzentration > 2 mg/L
- eine Cysteinkonzentration > 100 mg/L
- eine Methioninkonzentration > 5 mg/L

Lichtgeschmack verursachen (sensorisch ermittelt über eine beschreibende Profilprüfung mit Intensitätsbeurteilung 0-5) bzw. verstärken. Ascorbinsäure, eingesetzt als Inhibitor, zeigte keine Inhibition des Lichtgeschmacks. Ebenso konnte eine Inhibition des Lichtgeschmacks bei Zugabe von Tryptophan und Polyphenolen in Gegenwart von Cystein festgestellt werden.

Die Gehalte der Photoinitiatoren und Photoinhibitoren werden letztendlich in der Getränkeherstellung über die Auswahl der Rohstoffe und das Mälzungsverfahren festgelegt. Das Forschungs-

vorhaben bietet Rezepturvorschläge zur Herstellung alkoholfreier, gehopfter und fermentierter (*Lactobacillus amylolyticus*, *Lb. casei*, *Lb. brevis* und *Lb. plantarum*) Erfrischungsgetränke auf Getreidebasis (Gerste, Hafer, Dinkel, Triticale und Rispenhirse) und Möglichkeiten zur Erhöhung der Lichtstabilität über die Auswahl geeigneter Rohstoffe (Getreide und Hopfenprodukte).

Wirtschaftliche Bedeutung:

Das Beispiel des alkoholfreien Erfrischungsgetränks „Bionade“ zeigt, dass besonders für KMU im Bereich biologisch erzeugter Erfrischungsgetränke durch Fermentation natürlicher Rohstoffe mit gesundheitlichem Zusatznutzen enormes Wachstumspotential liegt und jährliche Absatzzuwächse von 50-100 % möglich sind.

Die Ergebnisse erlauben es der Getränkewirtschaft, über eine Optimierung der Rezeptur bzw. eine Anpassung der Technologie qualitätsmindernde Verbindungen in hopfenhaltigen Getränken zu minimieren bzw. zu vermeiden. Sie sind die Basis, um qualitätsoptimierte Biere in Klarflaschen sowie neuartige alkoholfreie Getränke auf der Basis von vermälzten Getreide/Pseudozerealien mit Hopfenzusatz herzustellen bzw. zu vermarkten. Auch wurde die grundsätzliche Eignung verschiedener Zerealien und Pseudozerealien zur Herstellung neuer, aroma- und lichtstabiler Getränke erarbeitet. Die im Kleinmaßstab erfolgte Getränkeherstellung kann nunmehr auf den industriellen Maßstab übertragen werden.

Unternehmen der Hopfen- und Braubranche, die zu 90 % aus kleinen und mittelständischen Unternehmen bestehen, verfügen im Allgemeinen über keine eigenen F&E-Einrichtungen und Kapazitäten. Gerade diese können daher von den neuen Herstellungsverfahren und aus dem Forschungsprojekt resultierenden Getränken profitieren und sich hierdurch neue Absatzmärkte erschließen.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2011
2. Muñoz Insa, A., Gastl, M., Zarnkow, M. und Becker, T.: Optimization of the malting process of oat (*Avena sativa* L.) as a raw material for fermented beverages. Spanish J. Agric. Res. 9 (2), 510-523 (2011).
3. Stingl, S., Kreißl, J. und Schieberle, P.: Zur Rolle von 3-Methyl-2-buten-1-thiol als Auslöser des „sunstruck“ Flavour in Bier. Bericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie 2011, 44-47 (2011).
4. Stingl, S., Kreißl, J. und Schieberle, P.: Lichtinduzierte Bildung von Aromastoffen in gehopftem und ungehopftem Bier. Bericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie 2010, 32-35 (2010).
5. Qian, F., Muñoz Insa, A., Gastl, M. und Becker, T.: Adaption der milchsäuren Fermentation an *Triticale*-Würze am Beispiel von *Lactobacillus casei*. (Posterabstract) Tagungsband FEI-Jahrestagung 2010, 129-130 (2010).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie
Weihenstephaner Steig 20,
85354 Freising-Weihenstephan
Tel.: 08161/71-0, Fax: 08161/71-3883
E-Mail: tbecker@wzw.tum.de

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA)
Lise-Meitner-Straße 34
85354 Freising-Weihenstephan
Tel.: 08161/71-2932, Fax: 08161/71-2970
E-Mail: peter.schieberle@lrz.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via: