

## Präparative Proteinfractionierung zur Analyse und Technologie- optimierung bezüglich der Vollmundigkeit und Trübungsstabilität in Bier

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie Prof. Dr. Thomas Becker/Dr. Martina Gastl
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Technologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Ulrich Kulozik
<b>Industriegruppen:</b>	Versuchs- u. Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V., Berlin Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö)
	Projektkoordinator: Walter Bauer Brauerei C.& A. VELTINS GmbH & Co., Meschede
<b>Laufzeit:</b>	2011 – 2013
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 420.100,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Proteine nehmen als Struktur gebende und sensorisch relevante Komponenten bei Bier eine wichtige Rolle ein. Dabei existieren solche, die z. T. erwünscht und notwendig sind, z. B. für die später angestrebte Schaumstabilität und die Vollmundigkeit, und solche, die ausgefällt und abgeschieden werden müssen, insbesondere um eine ausreichende Trübungsstabilität zu gewährleisten. Über den Brauprozess hinweg unterliegen die proteinischen Fraktionen bzw. die Proteinzusammensetzung in den einzelnen Prozessschritten vom Rohstoff bis hin zum fertigen Bier fortlaufenden Veränderungen. In Verbindung mit anderen Stoffen beeinflussen Proteine den gesamten Brauprozess ganz maßgeblich. Sie stabilisieren als Protein-Protein-Verbindungen Bierschäume und sind in Protein-Polyphenol-Verbindungen für die Trübungsbildung verantwortlich. Die Festlegung des proteinischen Ausgangspotentials beginnt bei der Auswahl der Braugerste und wird bei der Mälzung und später im Maischprozess über die jeweiligen enzymatischen Umsatzraten beeinflusst. Der Fokus bisheriger Untersuchungen richtete sich vor allem auf die Beeinträchtigung der chemisch-physikalischen

Stabilität durch proteinische Substanzen im fertigen Bier.

Proteinkomponenten sehr selektiv über die fortlaufende Prozessierung zu betrachten, ist bei speziellen Lebensmittelgruppen seit Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. In der Herstellung von Milchprodukten oder bei Emulsionen und Schäumen wird das daraus gewonnene Wissen gezielt genutzt, um mittels einer definierten vorgelagerten Erhitzung bestimmte Denaturierungsreaktionen auszulösen, welche wiederum bestimmte Zieleigenschaften festlegen (z. B. Serumhaltevermögen und Festigkeit des entstehenden Joghurtgels, Emulsionsfähigkeit von Eigelbproteinen oder Schaumfähigkeit von Eiklarproteinen).

Trotz ihrer substantiellen Bedeutung in Bier und trotz zahlreicher Untersuchungen der letzten Jahre ist die Kenntnislage über die für die Vollmundigkeit und Trübungsstabilität verantwortlichen Proteinfractionen bisher lückenhaft. Wären diese Fraktionen bekannt, könnten die brauereispezifische Eiweißanalytik und die Rohstoffauswahl darauf angepasst werden oder es könnte eine gezielte Einstellung der Technologie bzw.

der Verfahrenstechnik erfolgen. Insbesondere für den Einfluss der Proteinzusammensetzung auf die Vollmundigkeit des Bieres und den Geschmack sind trotz zahlreicher empirischer Studien die Zusammenhänge wissenschaftlich bisher nur wenig belastbar.

Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, mittels präparativer Trenntechniken und konzentrationsabhängiger Rekombinationsversuche die für die Vollmundigkeit, den Geschmack und die Trübungsstabilität relevanten Proteinfractionen in der Bierherstellung zu identifizieren, zu charakterisieren und daraus Maßnahmen zur Technologieverbesserung abzuleiten.

#### Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Projekts wurde angestrebt, Kenntnisse über proteinische Fraktionen zu erlangen, die zur Verbesserung des sensorischen Profils (Vollmundigkeit) führen, vor allem bei oft als wenig vollmundig empfundenen Bieren, z. B. Light-Bieren, alkoholfreien Bieren, die derzeit einen zunehmenden Absatzmarkt darstellen. Des Weiteren wurden verbesserte proteolytische Spezifikationen angestrebt, die eine geeignete Rohstoffauswahl ermöglichen.

Um dies zu erreichen und die chemisch-physikalische Stabilität zu evaluieren, wurden Filtrationen von stark proteinhaltiger Vorderwürze an einer Crossflow-Filtrationseinheit durchgeführt und der Einfluss von Prozessbedingungen auf die Filtrations- und Fraktionierungsleistung ermittelt.

**Verfahrensinnovation:** Im ersten Schritt wurde der Transmembrandruck im Bereich von 1 bis 2 bar variiert. Eine Druckerhöhung von 1 auf 1,5 bar resultierte dabei in einer Steigerung des Fluxes der 70 kDa-Membran. Bei weiterer Steigerung auf 2 bar konnte keine Fluxerhöhung mehr beobachtet werden. Es fand eine Kompensation der Drucksteigerung durch eine verstärkte Deckschichtbildung statt. Im Anschluss wurde der Einfluss der Wandschubspannung in Form des Druckabfalls entlang der Membran untersucht. Eine Variation des Druckabfalls entlang der Membran im Bereich von 0,5 bis 1,5 bar ergab ein Fluxmaximum im mittleren Druckbereich. Dies kann durch eine Verschiebung des abgelagerten Partikelgrößenspektrums und einer dadurch veränderten Deckschichtstruktur mit steigender Wandschubspannung erklärt werden. Das Fraktionierungsergebnis wurde von den untersuchten Prozessbedingungen nicht beeinflusst. Bei allen Filtrationen findet eine Abreicherung

der 40 kDa-Fraktion im Permeat statt. Aufgrund des von den untersuchten Prozessparametern weitgehend unabhängigen Trennergebnisses erfolgte die Auswahl der optimalen Fraktionierungsbedingungen anhand der stationären Fluxwerte. Da eine Steigerung des Transmembrandruckes von 1,5 auf 2 bar keine Fluxerhöhung bewirkte, wurde 1,5 bar als optimaler Filtrationsdruck festgelegt. Des Weiteren wurde ein Druckabfall entlang der Membran von 1 bar ausgewählt, da hier der Flux maximal war. Nachdem mittels Membranfiltration ein Permeat gewonnen wurde, bei dem die 40 kDa-Fraktion stark abgereichert wurde, sollten die weiteren Proteinfractionen chromatographisch separiert werden. Dabei handelt es sich um zwei Fraktionen im Molekulargewichtsbereich von ca. 6-20 kDa. Dafür wurden verschiedene Ionenaustauschliganden sowie verschiedene pH-Werte zur Adsorption untersucht. Bei den stationären Phasen handelt es sich um einen starken Kationen- und Anionentauscher (Q und S) sowie um einen salztoleranten Anionentauscher (PA). Die Liganden sind an eine poröse Celluloseacetat-Membran gebunden, welche in Form von 96-well plates als Einwegadsorber im Labormaßstab zur Verfügung standen. Es wurde die Bindung und die Elution der Zielproteine bei drei pH-Werten zwischen 5,5 und 7,7 untersucht. Bei diesen pH-Werten waren die drei Hauptproteinfractionen der Bierwürze unterschiedlich geladen. Bei Verwendung eines Kationentauschers konnte keine Adsorption von positiv geladenen Proteinen festgestellt werden. Auch bei dem starken Anionentauscher wurde entweder nur wenig Protein gebunden, was an den sehr schwachen Banden der Eluate auf den SDS-PAGE-Gelen zu erkennen war oder es adsorbieren alle Fraktionen. Damit ist eine Trennung nicht möglich. Bei der Verwendung eines salztoleranten Anionentauschers bei pH 5,5 wurde eine signifikante Menge an Zielprotein gebunden. Das war an den tiefschwarzen Banden der Eluate mittels SDS-PAGE-Analysen ersichtlich. Das LTP befand sich nach der Beladung noch in der Bierwürze, während die Hordeinfraktion vollständig adsorbiert wurde. Bei den höheren pH-Werten 6,5 und 7,7 wurde wiederum nahezu kein Protein gebunden. Für eine Anwendung der membranbasierten Ionenaustauschchromatographie bedeuten die Ergebnisse, dass die trübungsrelevante Hordeinfraktion mit PA-Liganden aus dem Bierwürzepermeat entfernt werden kann. Dieses kann nach der Bindung durch einen Puffer mit saurem pH-Wert oder hohem Salzgehalt von 1 M NaCl wieder abgetrennt werden. Die erwünschten Würze-proteine bleiben im Würze-

permeat unverändert enthalten.

**Produktinnovation:** Um den Einfluss der Rohstoffe auf die Proteinzusammensetzung und die spätere Verarbeitung im Brauprozess zu ermitteln, wurden zwei Malze aus zwei Gerstensorten mit unterschiedlichen Rohproteingehalten sowie unterschiedlichen Lösungsseigenschaften (hochlösend bzw. moderat lösend, bezogen auf die proteolytischen und cytolytischen Lösungsseigenschaften) hergestellt. Zur Auswahl der Mälzungsparameter wurde zuerst der Einfluss der Temperatur, der Zeit und des Weichgrades auf die proteolytische, amylolytische und cytolytische Lösung beurteilt. Durch Variation der Mälzungsparameter wurden unterschiedliche Malzlösungsgrade bei möglichst gleichwertiger cytolytischer und amylolytischer Lösung erzielt. Aus den erhaltenen Malzen wurden Würzen hergestellt, welche mittels der Crossflow-Membranfiltration in Proteinfractionen getrennt wurden. Die Untersuchung der erhaltenden Proteinfractionen, Retentat und Permeat, mittels Bioanalyser führte zu folgender Einteilung der Proteingrößenbereiche: niedermolekulare Proteine < 5 kDa, mittelmolekulare Proteine 5-30 kDa und hochmolekulare Proteine > 30 kDa. Die erhaltenen Proteinfractionen wurden im flüssigen Zustand vergoren und analysiert. Die Ergebnisse zeigen die unterschiedlichen Auswirkungen der Fractionen auf die Produktmatrix. Hier sind besonders die sehr hohen Viskositätswerte und  $\beta$ -Glucan-Gehalte sowie die höheren Farbwerte für das Retentat zu erwähnen. Dadurch ergaben sich für die weiteren Dosageversuche gewisse Einschränkungen, da sich zu hohe Anteile der Fraction möglicherweise negativ auf die Verarbeitung und die Produktqualität auswirken können, die jedoch nicht auf die Proteine zurückgeführt werden kann, wie z. B. bei der Filtration, oder ein stark verändertes Mundgefühl des fertigen Biers. Um dies zu prüfen, wurden beide Fractionen (< 40 kDa und > 40 kDa angereichert) nach der Gärung zusätzlich getrennt verkostet. Die Fractionen wurden sehr unterschiedlich bewertet, auffallend waren die starke Wahrnehmung von Diacetyl sowie der süßliche Geschmackseindruck trotz geringerem Restextraktgehalt im Permeat.

Durch Dosageversuche zu einer Standardwürze wurden Matrixeffekte erfasst und die Auswirkungen verschiedener Proteinfractionen über den Prozess und auf das Bier evaluiert. Den größten Einfluss auf die Zusammensetzung der Biere besaß erwartungsgemäß der Lösungsgrad des Malzes. Bemerkenswert ist, dass der Anteil der hochmolekularen Proteine mit zunehmender Lö-

sung anstieg. Die Trübungen stiegen ebenfalls mit zunehmenden Protein- und Polyphenolgehalt. Protein- und Polyphenolgehalt nahmen wiederum mit dem Lösungsgrad des Malzes zu. Tendenziell erhöhten sich mit steigendem Anteil der hochmolekularen Proteine die Trübungen im Bier. Die Unterschiede zwischen den Bieren mit Fraction und den Vergleichsbieren waren verhältnismäßig gering. Die Schaumhaltbarkeit sank mit steigender Lösung des Malzes aufgrund der abnehmenden  $\beta$ -Glucangehalte und Viskositäts-Werte. Die Proteinanalytik zeigte einen Verlust an Proteinen mit einem Molekulargewicht von 9,5 kDa. Dabei handelte es sich vermutlich um LTP1, ein Substrat von Proteinase A, das an der Schaumstabilisierung beteiligt ist.

Letztendlich wurden mittels Zugabe verschiedener Enzyme die proteinseitigen Trübungskomponenten identifiziert. Dafür wurde einem untergärigen Vollbier unterschiedliche Konzentrationen an Fractionen zugesetzt und anschließend mit den Enzymen Papain, Pepsin und dem Enzymgemisch Ultraflo Max ( $\beta$ -Glucanase/Xylanase) versetzt. Durch Zugabe der proteolytischen Enzyme konnten die Trübungswerte in den Proben erheblich gesenkt werden. Somit konnte eindeutig festgestellt werden, dass Trübungen sowohl im Permeat als auch im Retentat proteinischer Natur sind. Trotzdem wurde die Trübung mittels proteolytische Enzyme nicht komplett abgebaut. Zusätzlich wurde der Gehalt an Fettsäuren in den Fractionen untersucht, wobei im stark trübenden Retentat wesentlich höhere Gehalte an Gesamtfettsäuren sowie Palmitin- und der Linolensäure nachgewiesen wurden. Die sensorische Evaluierung der mit den Fractionen versetzten Biere zeigte eine Zunahme der Vollmundigkeit bei steigender Konzentration beider Fractionen. Das Retentat weist eine allgemein höhere Vollmundigkeit auf als das Permeat bei direkter Dosage in Bier. Trotzdem weisen die Biere nach Zugabe der Fractionen eine deutlich süße und nach Vorderwürze schmeckende Note auf.

Aufgrund des bisherigen Wissens über Proteinstrukturen und deren Funktionen ist deutlich erkennbar, dass sich die Eigenschaften der Proteine über den Bierbereitungsprozess ändern, ebenso die Proteinzusammensetzung und deren Konformation. Die Festlegung des proteinischen Ausgangspotentials beginnt bei der Auswahl der Braugerste und der anschließenden Vermälzung. Letztendlich lag der Fokus im Rahmen dieser Forschungsarbeit auf der Charakterisierung der Proteinfractionen in Würze, um die Trenntechnik bzw. -leistung zu beurteilen. Eine Charakterisierung von angestrebten Proteinunterfractionen

und deren Anreicherung im Bier zur Beurteilung der resultierenden Trübung und Vollmundigkeit konnte nur bedingt umgesetzt werden.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Von den Ergebnissen profitieren über 1.000 kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) der Malz- und Brauwirtschaft. Seit Jahrzehnten stellt die chemisch-physikalische Stabilität ein bedeutendes Kriterium der Produktqualität dar, das in hohem Maße die Marktakzeptanz von Bier festlegt. Die Verbesserung der Trübungsstabilität und des sensorischen Eindrucks auch über längere Distributionswege, bei langen Lagerzeiten und bei ungünstigen Lagerbedingungen stellen insbesondere für KMU einen wirtschaftlichen Vorteil dar, da Geschmacksfehler beim Kunden nicht akzeptiert und umgehend reklamiert werden. Eine unzureichende chemisch-physikalische Stabilität führt daher sowohl zu wirtschaftlichen Schäden als auch zu Imageverlusten. Insbesondere in Erntejahrgängen mit erhöhten Eiweißgehalten sind vermehrt auftretende Probleme in der Trübungsstabilität ein bekanntes Phänomen in der Brauindustrie. Da der Exportmarkt in der Getränkeindustrie steigt, gewinnt die Thematik zunehmend an Aktualität. Die Ergebnisse erlauben der Malz- und Getränkeindustrie, vor allem der Brauwirtschaft, über die Rohstoffauswahl gezielt Einfluss auf die chemisch-physikalische Stabilität zu nehmen und diese zu steigern.

Durch die Variation der Mälzungsparameter und der Sorteneigenschaften mit dem Ziel der quantitativen Anreicherung einzelner funktioneller Proteinfractionen konnte das proteolytische Lösungsverhalten analytisch besser charakterisiert werden. Die Ergebnisse erlauben eine Charakterisierung der Malzproteine in Abhängigkeit vom Lösungsgrad und dem Rohproteingehalt des Malzes und liefern die Basis zur Präzisierung der proteolytischen Malzanalytik.

Letztendlich konnte aufgrund der komplexen Matrix mit der gewählten Trenntechnik (Membranadsorptionschromatographie) jedoch nur eine Abreicherung der 40 kDa-Fraktion im Permeat erzielt werden, eine weitere Fraktionierung der Proteinfractionen < 40 kDa war mit den membrantechnischen Methoden nicht möglich. Diese stellt jedoch den im Bier vornehmlich vor-

handenen Größenbereich dar; zu diesem Aspekt bedarf es folglich weiterer Forschungsaktivitäten. Im Rahmen des Projektes konnten jedoch erfolgversprechende chromatographischen Methoden (Ionenaustauscherchromatographie) angewandt werden. Die im Kleinmaßstab erprobte Trenntechnik muss weiter präzisiert werden, um sie auf den industriellen Maßstab übertragen zu können. Hier bedarf es weiterer Unterstützung von Seiten der Membranadsorberhersteller und des Anlagenbaus.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei der Forschungsstelle abzurufen.

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW  
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie  
Weihenstephaner Steig 20,  
85354 Freising-Weihenstephan  
Tel.: +49 8161 71-0  
Fax: +49 8161 71-3883  
E-Mail: tbecker@wzw.tum.de

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und  
Lebensmittelforschung  
Abt. Technologie  
Weihenstephaner Berg 1  
85354 Freising-Weihenstephan  
Tel.: +49 8161 71-4205  
Fax: +49 8161 71-4384  
E-Mail: ulrich.kulozik@tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 3079699-9  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via:

