

Mikrobiologisch bedeutsame Inhaltsstoffe in hopfenintensiven Bieren (Teil 1)

HOPFENBASIERTE HEMMKRAFT | Der Rohstoff Hopfen trägt wesentlich zur mikrobiologischen Stabilität von Bier bei. Im vorliegenden Beitrag wird die Ermittlung einer sogenannten hopfenbasierten Hemmkraft zur Einschätzung des antimikrobiellen Potentials von Bier beschrieben, die in Teil 2 durch Praxisuntersuchungen verifiziert wird.

DER HOPFEN FAND bereits im 8. Jahrhundert n. Chr. verschiedentlich Verwendung, z. B. in Most, Wein oder Sauerteig. Im Jahr 715 hat der heilige Emmeran die konservierende Wirkung des Hopfens erkannt. Im Jahr 736 wird von einem Hopfengarten in Geisenfeld und 768 vom Hopfenanbau im Hofstift Freising berichtet. Aber erst im Jahr 1030 wird in der Chronik von Spalt nachweislich die Verwendung von Hopfen

in Bier erwähnt, mit der Bemerkung, dass es sich um einen sehr guten und bekömmlichen Trunk gehandelt haben soll.

■ Biologische Stabilität

Bis zur Erfindung der Kühlmaschine durch Linde (1876) hat die Hopfung der Biere für eine längere Haltbarkeit gerade in den Sommermonaten eine wichtige Rolle gespielt. Bis heute kann man die unterschiedliche biologische Haltbarkeit der verschiedenen Biersorten in Abhängigkeit vom Hopfengehalt bzw. Bitterwert beobachten.

Allerdings ist der Hopfen nicht der einzige Schutzfaktor im Bier. Auch der niedrige pH-Wert (ca. 4,5), die anaerobe Atmosphäre (CO₂-Gehalt 4,5 - 6 g/l bei gleichzeitigem Sauerstoffmangel von 0,05-0,5 g/l), der Alkoholgehalt (ca. 5 %) sowie der Mangel an

leicht verwertbaren Nähr- und Wachststoffen (z. B. Monosaccharide, Aminosäuren) infolge vorausgegangener Hefegärung sind dafür verantwortlich, dass im Selektivmedium Bier nur wenige besonders angepasste Mikroorganismen wachsen können [1, 2].

Es soll hier besonders darauf hingewiesen werden, dass im Bier weder pathogene noch hitzeresistente Keime (Endosporenbildner) vermehrungsfähig sind. Letzteres Kriterium ist von großer technologischer und qualitativer Bedeutung, da Bier somit mit moderater, produktschonender Temperatur (65-75 °C) pasteurisiert werden kann. Im Gegensatz dazu ist die Würze ein sogenanntes Kollektivmedium, in dem eine Vielzahl von Mikroorganismen geeignete Voraussetzungen für Ernährung und Wachstum vorfindet [3, 4].

Bei früheren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die fünf selektiven Kriterien im Bier durchschnittlich ungefähr die in Tabelle 1 dargestellten Anteile an der Hemmung potentiell bierschädigender Keime haben. Demnach ist Hopfen also wesentlich an der biologischen Stabilität von Bier beteiligt. Umso interessanter ist die Frage, wie sich die heutzutage oft üblichen hohen Hopfengaben, auch infolge von Hopfung im Whirlpool oder im Kaltbereich (z. B. bei



Autoren: Prof. Werner Back (li.), Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, TU München-Weihenstephan, Dr. Martin Biendl, Hopsteiner HHV GmbH, Mainburg

SELEKTIVE KRITERIEN FÜR DIE ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT VON BIER	
Inhaltsstoff	% Anteil Selektivität
Hopfen	30
Alkohol	10
Anaerobe Atmosphäre	20
Niedriger pH-Wert	25
Mangel an Nähr- und Wachststoffen	15

Tab. 1

hopfengestopften Craft Bieren), auf die biologische Haltbarkeit entsprechender Biere auswirken.

Um hier aussagefähige Ergebnisse zu erzielen, muss eine sinnvolle Auswahl der Teststämme erfolgen. Besonders geeignet sind dabei obligat bierschädliche Bakterien, die auch häufig für biologische Probleme sorgen [4, 5]. Es handelt sich dabei um die in Tabelle 2 dargestellten zehn häufigsten Arten, die sich in üblichen Bieren vermehren können.

Die sogenannten potentiellen Bierschädlinge (z.B. *L. plantarum*) haben eine eingeschränkte Toleranz gegenüber den fünf Selektivmerkmalen des Bieres (meist auch gegenüber Hopfen) und sind für Hopfenresistenz-Tests ungeeignet.

Unabhängig vom Wachstum der obligaten und gelegentlich auch potentiellen Bierschädlinge in mehr oder weniger stark gehopften Bieren soll noch darauf hingewiesen werden, dass sich auf dem geernteten Hopfen und auf verschiedenen Hopfenprodukten (z.B. Pellets) zusätzlich eine vielseitige Keimflora befindet. Es handelt sich hierbei um ubiquitäre Keime, die also überall, z.B. auch auf anderen Brauerei-Rohstoffen, vorkommen können. Sehr häufig vertreten sind Konidiosporen von Schimmelpilzen, diverse Hefearten, Enterobacteriaceae sowie die Endosporen bildenden Bacillus- und Clostridium-Arten, Mikrokokken, Enterokokken u. a. Diese Keime haben keine Bedeutung, solange keine höhere Feuchtigkeit vorliegt. Problematisch ist z.B. ein längeres Stehenlassen (> 6 h) von gehopfter Würze oder Hopfen-Vorlösungen bei Temperaturen unter 55 °C, wie es früher beim Ausschlagen der Würze auf Kühlschiffen gelegentlich vorgekommen ist. Diese meist gramnegativen Bakterien sind oft sehr hopfentolerant, können sich in diesen Substraten schnell vermehren und dann Geschmacksfehler und Toxine bilden. Durch ordnungsgemäße Trocknung bzw. Weiterverarbeitung können solche Probleme aber ausgeschlossen werden.

Mikrobiologisch relevante Inhaltsstoffe in Hopfen und Bier

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass vor allem die Alpha- und Beta-Säuren sowie Xanthohumol zu den mikrobiologisch relevanten Inhaltsstoffen im Hopfen gehören. Aber auch Polyphenole, Humulinone und Hopfenöle haben eine gewisse

OBLIGATE BIERSCHÄDLINGE				
Gattung	<i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Pectinatus</i>	<i>Megasphaera</i>
Art	<i>breviis</i> <i>backi</i> <i>lindneri</i> <i>(para-)collinoides</i> <i>paucivorans</i> <i>(brevisimilis)</i>	<i>damnosus</i>	<i>cerevisiophilus</i> <i>frisingensis</i> <i>haikarae</i>	<i>cerevisiae</i>

Tab. 2

MIKROBIOLOGISCH RELEVANTE INHALTSSTOFFE IN HOPFEN UND BIER*			
*(einschließlich kaltgehopfter Biere)			
	Bitterhopfen (%)	Aromahopfen (%)	Bier (mg/l) **
Alpha-Säuren (Alpha)	10 - 20	2 - 10	0,2 - 20
Beta-Säuren (Beta)	4 - 8	4 - 7	n.n. - 1
Iso-Alpha-Säuren (Iso-Alpha)	< 0,1	< 0,1	15 - 50
Humulinone (HUM)	0,3 - 0,5	0,1 - 0,3	n.n. - 20
Polyphenole (POLY)	3 - 4	4 - 6	150 - 300
Xanthohumol (XN)	0,5 - 1,0	0,3 - 0,5	n.n. - 6
Isoxanthohumol (IX)	< 0,1	< 0,1	n.n. - 2
Etherisches Hopfenöl (EHÖ)	1,5 - 3	0,6 - 1,5	n.n. - 2

Tabelle 3 ** n.n.: nicht nachweisbar

antimikrobielle Wirkung. Tabelle 3 zeigt, dass bei den Alpha-Säuren besonders deutliche Unterschiede zwischen Bitter- und Aromahopfen bestehen. Bei Xanthohumol und den Humulinonen sind die Werte in Bitterhopfen durchschnittlich ebenfalls etwas höher, während die Polyphenole hier niedriger liegen.

Die Iso-Alpha-Säuren sind im Rohhopfen kaum vorhanden. Erst beim Kochprozess im Sudhaus erfolgt die wesentliche Isomerisierung der Alpha-Säuren. Im Bier tragen die Iso-Alpha-Säuren dominant zum Bitterwert (= 100 %) bei. Im Vergleich dazu haben die Humulinone mit 66 Prozent Bitterwert ebenfalls eine gewisse Bedeutung für den Biergeschmack [6], während der Bitterwert der Alpha-Säuren lediglich bei rund zehn Prozent liegt. Aufgrund ihrer hohen Polarität, werden Humulinone beim Brauprozess nahezu quantitativ eingetragen, weshalb die Konzentration durch intensive Kalthopfung am stärksten zunimmt.

Im Bier weisen die mikrobiologisch relevanten Inhaltsstoffe deutliche Unterschiede im Vergleich zum Hopfen auf (Tabelle 3). So sind hier die Iso-Alpha-Säuren mit etwa

15 - 50 mg/l dominant, während die Alpha-Säuren in den meisten Bieren nur in geringer Konzentration vorliegen. Dies gilt in ähnlicher Weise auch für Xanthohumol, da sowohl Alpha-Säuren als auch Xanthohumol während der Würzekochung nicht nur isomerisiert werden, sondern wegen ihrer schlechten Löslichkeit im Brauprozess verstärkt ausgeschieden werden. Bei den unpolaren Beta-Säuren ist dieser Verlust noch deutlicher. Erhöhte Werte an Alpha-Säuren und Xanthohumol werden bei der Whirlpool-Hopfung und insbesondere bei der Kalthopfung (Hopfenstopfen) erzielt. Auch die Humulinone (üblich unter 2 mg/l) können hierbei höhere Konzentrationen (deutlich über 10 mg/l) aufweisen. Dagegen sind die unpolaren Beta-Säuren selbst nach der Kalthopfung im Bier meist nicht nachweisbar.

Die Polyphenole sind mit 150 - 300 mg/l in größerer Menge vertreten, wobei aber die Stabilisierungsmethoden bei der Bierfiltration die Gehalte stark beeinflussen. Außerdem stammt ein großer Anteil der Gesamt-Polyphenole im Bier vom Rohstoff Malz. Das aus dem Xanthohumol des Hop-

RELATIVE HEMMKRÄFTE MIKROBIOLOGISCH RELEVANTER INHALTSSTOFFE IM BIER

	% Mikrobiologische Hemmkraft (XN = 100 %)	Durchschnittliches helles Vollbier (mg/l)	% Hemmkraft pro Liter Bier (1 mg/l XN = 100 %)
Alpha	70	1	70
Beta	ca. 70	< 0,1	< 10
Iso-Alpha	25	20	500
HUM	ca. 20	1	20
POLY	ca. 0,5	150	75
XN	100	0,2	20
IX	20	1	20
EHÖ	20	< 0,05	< 1

Tab. 4

fens während der Würzekochung entstandene Isoxanthohumul liegt mit Werten unter zwei mg/l im Vergleich zum Gehalt an Gesamt-Polyphenolen nur in relativ geringer Menge vor. Noch deutlich niedriger sind die Konzentrationen von Hopfenölkomponenten im Bier, deren Aroma sich bereits in Spurenkonzentrationen entfalten kann.

Ermittlung von relativen mikrobiologischen Hemmkraften

Wie bereits erwähnt, wurde in früheren Arbeiten die Hemmkraft von Iso-Alpha-Säu-

ren, Alpha-Säuren und Xanthohumul im Bier ermittelt. Für diese mikrobiologischen Untersuchungen wurden Originalisolate aus Bier als Testorganismen verwendet, deren Stammhaltung in hellem Standard-Vollbier erfolgte (15 EBC Bittereinheiten, pH 4,6, Alkohol 4,5 Vol.-%, CO₂-Gehalt 4,5 g/l, scheinbarer Vergärungsgrad 78 %) erfolgte (Inoculum ein Tropfen mit Pasteur-Pipette auf ca. 20 ml Testmedium in randvoll gefüllten Reagenzglasern).

Jeweils drei Stämme *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri*, *Pediococcus damnosus*, jeweils ein Stamm *L. casei*, *Pediococcus inopinatus*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus kristinae*, *Pantoea agglomerans*, jeweils ein Stamm *Pectinatus cerevisiophilus*, *Pect. frisingensis*, *Megasphaera cerevisiae*.

Die Tests wurden mit Xanthohumul-Dosierungen von 1, 2,5 und 5 mg/l zum Standard-Vollbier (EBC BE = 15) durchgeführt. Außerdem wurden Alpha-Säuren (2, 4, 10 mg/l) und Iso-Alpha-Säuren (10, 20, 30 mg/l) ebenfalls in drei unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die jeweiligen Stufen von Alpha- und Iso-Alpha-Säuren

werden durch Mischung entsprechender Grundbiere und gegebenenfalls mit ungehopftem Bier eingestellt. Bei der Auswertung wurde zwischen positivem und keinem Wachstum innerhalb von 30 Tagen bei 25 °C differenziert. Nach Auswertung des Wachstumstests wurde die Angabe der durchschnittlichen prozentualen Hemmkraft auf 1 mg/l Xanthohumul bezogen. Demnach war die Hemmkraft von 1 mg Xanthohumul durchschnittlich so stark wie die von ca. 1,5 mg Alpha-Säuren oder wie die von ca. 4 mg Iso-Alpha-Säuren (Testergebnisse vgl. auch Back, Dissertation 1974; Back, Habilitationsschrift 1980; Back, Screening-Test im Rahmen der Entwicklung der NBB-Nachweismedien 1976, hinterlegt bei Firma Döhler, Darmstadt).

Bei vergleichbaren Konzentrationen weist also Xanthohumul die stärkste Hemmkraft auf, die als Bezugsgröße mit 100 Prozent eingestuft wird (Tabelle 4). Die Alpha-Säuren liegen im Vergleich zu Xanthohumul bei 70 Prozent und haben somit ebenfalls eine hohe Hemmkraft, während die Iso-Alpha-Säuren lediglich 25 Prozent Hemmkraft aufweisen. Da diese aber im Bier in deutlich höheren Konzentrationen vorliegen (15 - 50 mg/l), tragen sie dennoch zur mikrobiologischen Stabilität bei. Die Beta-Säuren dürften sich ähnlich wie die Alpha-Säuren verhalten.

Auch für Humulinone, Polyphenole, Isoxanthohumul und die Hopfenöle liegen keine systematischen Testergebnisse vor. Es handelt sich hier um Erfahrungswerte oder auch um Schätzwerte, zumal durch Kombinationseffekte (Enhancer-Wirkung) keine eindeutigen Aussagen getroffen werden können.

Hopfenbasierte mikrobiologische Hemmkraft von Bier

In Tabelle 4 sind beispielhaft die anteiligen Hemmkraften für ein durchschnittliches helles Vollbier hergeleitet. Hier wird durch die Dominanz von 20 mg/l Iso-Alpha-Säuren mit einer entsprechenden Hemmkraft von 500 Prozent die Hauptwirkung vorgegeben. 1 mg/l Alpha-Säuren und 170 mg/l Polyphenole bringen noch zusammen 145 Prozent Hemmkraft. Xanthohumul, Isoxanthohumul und Humulone sind in geringen Mengen vorhanden und bringen jeweils nur 20 Prozent Hemmkraft. Die resultierende gesamte Hemmkraft beträgt

etwa 700 Prozent, was für eine befriedigende hopfenseitige Hemmung von obligaten Bierschädlingen nicht ausreicht. Zur näheren Untersuchung von Relevanz und Aussagekraft dieser auf Basis von analytischen Werten hergeleiteten mikrobiologischen Hemmkraft wurden 15 unterschiedlich gehopfte Biere sowohl mikrobiologisch als auch per HPLC untersucht. Dabei wurde auf die Analytik der Beta-Säuren und der Hopfenöle verzichtet, da diese Hopfeninhaltsstoffe im Bier nur in sehr geringer Konzentration vorliegen. Außerdem sind auch keine Polyphenole berücksichtigt, die nicht nur über den Rohstoff Hopfen ein-

getragen werden, sondern hauptsächlich vom Malz stammen. Über die Ergebnisse der mikrobiologischen und analytischen Untersuchung dieser 15 Biere wird in Teil 2 (BRAUWELT Nr. 12-13, 2017) dieser Veröffentlichung berichtet. ■

■ Literatur

1. Back, W.: Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2008.
2. Narziss, L.: Abriss der Bierbrauerei, 7. aktualisierte und erweiterte Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
3. Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 1994.
4. Back, W.: Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2005.
5. Hutzler, M.; Müller-Auffermann, K.; Kobob, J.; Riedl, R.; Jacob, E.: „Bierschädliche Mikroorganismen – eine aktuelle Übersicht“, BRAUWELT Nr. 3, 2013, S. 68.
6. Algazzali, V.; Shellhammer, T.: „Bitterness Intensity of Oxidized Hop Acids: Humulinones and Hulupones“, Journal of the American Society of Brewing Chemists, Volume 74, 2016, S. 36.