

# Mikrobiologisch bedeutsame Inhaltsstoffe in hopfenintensiven Bieren (Teil 2)

**PRAXISTEST** | In Teil 1 dieses Beitrags (vgl. BRAUWELT Nr. 11, 2017, S. 310-313) wurde allgemein über die mikrobiologische Aktivität von Hopfeninhaltsstoffen berichtet und die Ermittlung einer hopfenbasierten Hemmkraft von Bier vorgestellt. In Teil 2 werden nun Relevanz und Aussagekraft dieser Hemmkraft auf Basis von Praxisuntersuchungen diskutiert.

**DAZU WURDEN** 15 unterschiedlich gehopfte Biere sowohl mikrobiologisch als auch analytisch untersucht. Darunter waren drei Versuchsbiere und zwölf im Handel erhältliche Sorten. Neben fünf Pils- und drei Weißbieren wurde noch je ein IPA und ein Stout berücksichtigt sowie zwei alkoholfreie Biere. Sofern bekannt, sind der Zeitpunkt

der Hopfengabe und die jeweilige Dosagemenge in Tabelle 1 angegeben. Mehr als die Hälfte der untersuchten Biere waren kaltgehopft.

## Hopfenspezifische analytische Kennzahlen im Bier

Zur hopfenspezifischen Analyse dieser Biere diente die Methode Analytica-EBC 9.47. Lediglich die UV-Detektion wurde abgeändert und erfolgte mittels Diodenarray-Detektor nicht nur bei 270 nm, sondern je nach Analyten auch noch bei anderen Wellenlängen.

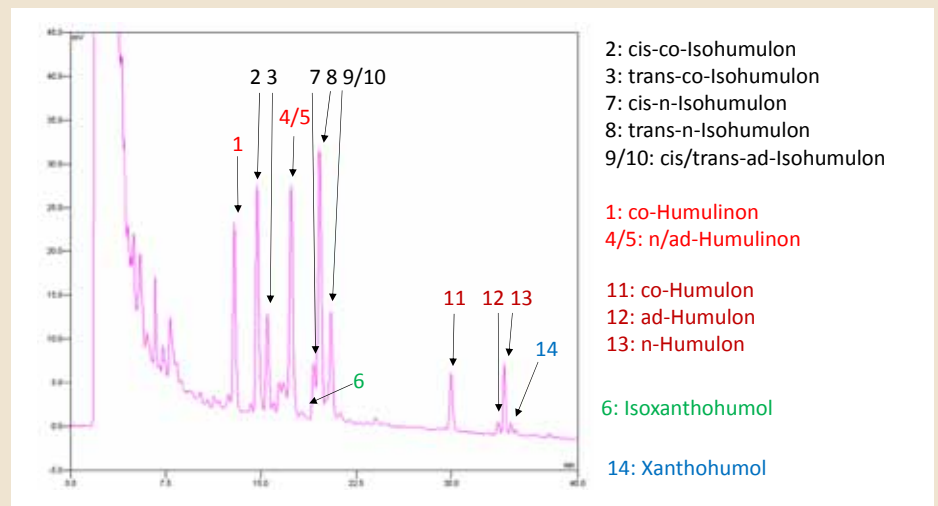
Zur externen Kalibrierung dienten die HPLC-Standards ICE-3 (International Calibration Extract Nr. 3 for Alpha and Beta-Acids), ICS-I3 (International Calibration Standard for Iso-Alpha-Acids Nr. 3), sowie Dicyclohexylamin-Humulon-Komplex, reines Xanthohumol und reines Isoxanthohumol.

Die durchgeführte HPLC-Methode ermöglichte eine effiziente Auftrennung aller mikrobiologisch relevanten Hopfenkomponenten (Abb. 1). Hier ist beispielhaft das HPLC-Chromatogramm des Stout-Biers bei einer Detektionswellenlänge von 270 nm dargestellt, bei der cis-/trans-co-/n-/ad-Isohumulon (Iso-Alpha-Säuren) und co-/n-/ad-Humulon kalibriert wurden. In Abhängigkeit vom jeweiligen Parameter erfolgten weitere Detektionen bei 290 nm für Isoxanthohumol, bei 314 nm für co-/n-/ad-Humulon und bei 370 nm für Xanthohumol (siehe Material und Methoden).

Die Bestimmung der EBC-Bittereinheiten (EBCBE) erfolgte nach der Methode EBC-Analytica-EBC 9.8.



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



**Abb. 1** HPLC-Chromatogramm von Bier (Stout) nach Methode Analytica-EBC 9.47 (Detektionswellenlänge: 270 nm)

Die untersuchten Biere weisen sehr unterschiedliche Analysenwerte auf (Tab. 2), wobei hier besonderes Augenmerk auf die Kalthopfung gerichtet werden soll. Während in kaltgehopften Bieren die Iso-Alpha-Säuren-Konzentrationen oft deutlich niedriger sind als die EBC-Bittereinheiten, liegen die Alpha-Säuren auffällig hoch. Die Humulinon- und teilweise auch die Xanthohumol-Gehalte sind nach einer Kalthopfung ebenfalls relativ hoch.

Weißbier 2 mit etwa gleich hohen Iso-Alpha- und Alpha-Säuren-Gehalten ist stark kaltgehopft. Noch extremer ist das Verhältnis beim Stout mit doppelt so vielen Alpha-Säuren wie Iso-Alpha-Säuren sowie mit sehr hohen Werten an Humulinonen und Xanthohumol. Wegen der Trägerfunktion bestimmter vom Röstmalz stammender Melanoidine, können in dunklen Bieren deutlich erhöhte Xanthohumol-Gehalte vorliegen [1]. Diesem Prenylflavonoid werden seit längerem gesundheitlich positive Wirkungen zugeschrieben, die sich nun in ersten Humanstudien bestätigen [2].

### Auswirkung auf die mikrobiologische Hemmkraft

Aus den analytischen Kennzahlen wurde für jedes untersuchte Bier die mikrobiologische Hemmkraft hergeleitet (Tab. 2), wobei für jeden Inhaltsstoff die in Teil 1 vorgestellten relativen Hemmfaktoren zu Grunde liegen (Hemmfaktor 100 % = 1 mg/l Xanthohumol).

Bei schwächer gehopften Bieren mit Bittereinheiten unter 30 werden entsprechend niedrige Hemmkräfte von etwa 450-700 Prozent erreicht. Eine zusätzliche Hopfengabe im Whirlpool führt zu etwas erhöhten Alpha-Säuren-Werten, die sich bereits positiv auf die Hemmkraft auswirken können (z. B. Pils 3 im Vergleich zu Pils 2). Kaltgehopfte Biere profitieren aufgrund erhöhter Alpha-Säuren- und Humulinon-Gehalte deutlich in der mikrobiologischen Hemmkraft. Nur kaltgehopfte Biere erreichen aufgrund hoher Alpha-Säuren-, Xanthohumol- und Humulinon-Konzentrationen Hemmkräfte über 1200 Prozent. Der Höchstwert von 2780 Prozent resultierte bei dem kaltgehopften Stout. Wie oben bereits erwähnt, können in dunklen Bieren die Xanthohumol-Gehalte deutlich höher liegen und somit zusätzlich zur Hemmkraft beitragen. Auch bei alkoholfreiem Bier führt eine Kalthopfung zu erhöhten Wer-

## ZUGRUNDELIEGENDE HOPFENGABE FÜR DIE HERSTELLUNG DIVERSER BIERE

Biersorte	Zeitpunkt der Hopfengabe: x bzw. g/hl, Mengenanteil in % (soweit bekannt)		
	vor/während der Würzekochung	Whirlpool (WP)	Kalthopfung (KH)
Versuchsbier 1	9,1 g Alpha		
Versuchsbier 2 WP		9,1 g Alpha	
Versuchsbier 3 KH			9,1 g Alpha
Pils 1	x		
Pils 2	x		
Pils 3 WP	8,5 g Alpha	x	
Pils 4 KH	8,5 g Alpha		250 g
Pils 5 WP, KH	14 g Alpha	x	250 g
Alkoholfreies 1	x		
Alkoholfreies 2 KH	x		x
Weißbier 1 WP	50 %	50 %	
Weißbier 2 KH	18 %	82 %	
Weißbier 3 KH	30 %	70 %	
IPA WP, KH	32 %	30 %	38 %
Stout WP, KH	36 %	12 %	51 %

Tab. 1

## ANALYTISCHE ZUSAMMENSETZUNG UND DARAUSS ABGELEITETE MIKROBIOLOGISCHE HEMMKRAFT ...

... diverser Biere, hergestellt mit unterschiedlicher Hopfengabe (siehe Tabelle 1)

Biersorte	EBC BE	Iso-Alpha mg/l	Alpha mg/l	XN mg/l	IX mg/l	HUM mg/l	Mikrobiologische Hemmkraft (%)
Versuchsbier 1	25,4	22,1	1,1	<0,1	0,9	1,3	684
Versuchsbier 2 WP	16,3	10,2	2,1	<0,1	0,6	1,7	448
Versuchsbier 3 KH	12,2	1,7	5,1	0,1	0,1	2,7	464
Pils 1	26,4	23,3	0,2	n.n.	0,3	1,9	627
Pils 2	33,3	29,4	0,7	n.n.	0,4	2,5	794
Pils 3 WP	34,4	29,3	4,7	0,2	0,9	1,3	1126
Pils 4 KH	41,7	25,9	5,6	0,2	0,5	7,6	1222
Pils 5 WP, KH	53,3	34,9	5,5	0,3	0,9	10,3	1512
Alkoholfreies 1	27,6	27,7	1,1	<0,1	0,1	n.n.	772
Alkoholfreies 2 KH	30,7	25,4	3,6	<0,1	0,2	2,7	980
Weißbier 1 WP	24,2	15,8	2,3	0,1	0,5	3,0	636
Weißbier 2 KH	22,8	9,2	8,9	0,6	0,3	2,9	977
Weißbier 3 KH	36,8	17,2	11,6	0,7	0,8	4,6	1404
IPA WP, KH	60,7	36,3	14,1	0,5	1,1	11,0	2172
Stout WP, KH	45,8	12,5	24,0	6,1	1,1	7,8	2780

Tab. 2

### WACHSTUM VON OBLIGATEN BIERSCHÄDLINGEN IN BIEREN UNTERSCHIEDLICHER MIKROBIOLOGISCHER HEMMKRAFT

Biersorte	EBC BE	% Mikrobiologische Hemmkraft	Wachstum*			Anmerkung	
			<i>L.brevis</i> 986	<i>P.damnosus</i> 60	<i>L.lindneri</i> 2	pH	Alkohol %
Versuchsbier 1	25,4	684	++	+	+		
Versuchsbier 2 WP	16,3	448	+	+	+		
Versuchsbier 3 KH	12,2	464	++	++	+		
Pils 1	26,4	627	++	–	s	4,2	5,6
Pils 2	33,3	794	s	–	s	4,2	5,6
Pils 3 WP	34,4	1126	–	–	–		
Pils 4 KH	41,7	1222	–	–	–		
Pils 5 WP, KH	53,3	1512	–	–	–		
Alkoholfreies 1	27,6	772	++	s	s	4,1	< 0,5
Alkoholfreies 2 KH	30,7	980	s	–	s	4,1	< 0,5
Weißbier 1 WP	24,2	636	s	s	s		5,2
Weißbier 2 KH	22,8	977	+	–	–		4,6
Weißbier 3 KH	36,8	1404	–	–	–		8,2
IPA WP, KH	60,7	2172	–	–	–		8,2
Stout WP, KH	45,8	2780	–	–	–		6,5

\* ++ sehr starkes, + starkes, s schwaches/langsames, – kein Wachstum

Tab. 3

ten an Alpha-Säuren sowie Humulinonen und damit auch zu hohen Hemmkraften. Interessant ist noch ein Vergleich der Versuchsbiere 1 - 3. Diese sind mit identischen Hopfenmengen hergestellt, die lediglich zu unterschiedlichen Zeitpunkten dosiert wurden (Tabelle 1). Bei einer Hopfengabe von 9,1 g Alpha pro hl ergeben sich Hemmkraften zwischen 448 bis 684 Prozent, die durch den Zeitpunkt der Hopfengabe nicht entscheidend beeinflusst werden. Letztlich dominiert jedoch die bessere Ausbeute mit höheren Gehalten an Iso-Alpha-Säuren infolge einer frühen Hopfengabe in der Pfanne gegenüber einer Whirlpool- oder Kalthopfung.

#### Wachstum von obligaten Bierschädlingen

Die Wachstumstests erfolgten in Anlehnung an die bereits in Teil 1 beschriebene Methodik. Von den obligat bierschädlichen Bakterien wurden repräsentative Stämme der drei besonders häufig auftretenden Ar-

ten *Lactobacillus brevis* (L 986), *Pediococcus damnosus* (P 60) und *Lactobacillus lindneri* (L 2) ausgewählt. Es handelt sich dabei um Originalisolate aus verdorbenen Bieren. Die Stämme wurden zur Erhaltung der Bierschädlichkeit und der Hopfentoleranz in ständiger „Bierkultur“ (EBC Bittereinheiten = 23) gehalten.

Die Auswertung erfolgte nach den Kriterien „sehr starkes“, „starkes“, „schwaches/langsames“ bzw. „kein Wachstum“ dieser Bakterien innerhalb von 30 Tagen bei 25 °C in den 15 ausgewählten Bieren.

Die drei obligaten Bierschädlinge zeigten in Abhängigkeit der für die Originalbiere ermittelten Hemmkraften unterschiedliches Wachstum (Tab. 3). So bewirkte bei den Pilsbieren 1 und 2 derselben Brauerei die erhöhte Hopfengabe eine deutliche Hemmung von *L. brevis*. Die mikrobiologische Stabilität ließ sich durch Whirlpool-Hopfung weiter verbessern (siehe Vergleich zwischen den Pilsbieren 2 und 3 mit ähnlichen Bittereinheiten). Die beiden alkoholfreien Biere unterschieden sich durch zusätzli-

che Kalthopfung, was zu einer höheren Hemmkraft führte und zu einem deutlich geringeren Wachstum von *L. brevis* und *P. damnosus*. Hier ist noch anzumerken, dass der niedrige pH-Wert sicherlich zusätzlich zur Hemmung beigetragen hat.

Im Vergleich zu Weißbier 1 mit 24,2 Bittereinheiten und 636 Prozent Hemmkraft weist Weißbier 2 bei lediglich 22,8 Bittereinheiten eine deutlich höhere Hemmkraft von 977 Prozent auf, was die komplette Hemmung des Wachstums von *P. damnosus* und *L. lindneri* erklärt. Das liegt an der überwiegenden Kalthopfung und den dadurch stark erhöhten Werten an Alpha-Säuren, die eine deutlich höhere Hemmwirkung aufweisen als die Iso-Alpha-Säuren. Dies zeigt auch, dass die EBC-Bittereinheiten nicht unbedingt mit der tatsächlichen mikrobiologischen Inhibierung übereinstimmen. Weißbier 3 mit relativ hoher Hopfengabe kombiniert mit Kalthopfung und einer Hemmkraft von 1404 Prozent zeigte eine komplette Hemmung von *L. brevis*, *P. damnosus* und *L. lindneri*.

Bei hohen Bittereinheiten in Kombination mit Kalthopfung resultierten stets Hemmkraften deutlich über 1000 Prozent, was jeweils die komplette Hemmung aller drei Teststämme bewirkte. Dagegen war bei Hemmkraften unter 700 Prozent meist ein starkes Wachstum der Keime zu beobachten, das sich erst ab ca. 30 Bittereinheiten abschwächte.

#### Rückschlüsse aus den mikrobiologischen Tests

Zur Beeinträchtigung von obligaten Bierschädlingen ist eine berechnete Hemmkraft von über 700 Prozent erforderlich. Bei einer Hemmkraft zwischen 700 bis 1000 Prozent ist deren Wachstum stark abgeschwächt und der Einfluss weiterer bierspezifischer Hemmstoffe (pH, Alkohol) spielt hier eine besonders wichtige Rolle. Liegt die Hemmkraft über 1000 Prozent, z. B. durch zusätzliche Whirlpool-Hopfung, ist nur noch mit einem Wachstum besonders hopfenresistenter Bierschädlinge zu rechnen. Bei alkoholfreien Bieren ist daher eine Hemmkraft von mindestens 1000 Prozent anzustreben, sowie ein pH bis maximal 4,1. Durch Kalthopfung lassen sich sogar Hemmkraften weit über 1500 Prozent erzielen, die keinerlei Vermehrung mehr erwarten lassen. In dunklen mit Röstmalz hergestellten Bieren, haben Melonoidine eine Trägerfunktion für

das schlecht wasserlösliche Xanthohumol. Dadurch ist hier die Hemmkraft am höchsten.

### ■ Zusammenfassung

Für einzelne Hopfenkomponenten wurde die jeweilige Hemmwirkung gegenüber obligaten Bierschädlingen ermittelt und daraus die hopfenbezogene Hemmkraft definiert. Diese lässt sich berechnen und ermöglicht somit eine Aussage über die Infektionsanfälligkeit von Bieren. Durch mikrobiologische Untersuchungen diverser Biere unterschiedlicher Zusammensetzung wurde die Aussagekraft der berechneten

Hemmkraft verifiziert. Es wurde festgestellt, dass die mikrobiologische Hemmwirkung nicht immer mit den EBC-Bittereinheiten korreliert. Hopfeninhaltsstoffe sind unterschiedlich wirksam und können durch die Brautechnologie beeinflusst werden. Kaltgehopfte Biere weisen einen höheren Anteil an Alpha-Säuren, Humulinonen und teilweise auch Xanthohumol auf, was zu einer signifikant verbesserten mikrobiologischen Stabilität führt. ■

### ■ Literatur

1. Wunderlich, S.; Zürcher, A.; Back, W.: „Xanthohumol in Brewing – Impact of Malt, Xanthohumol Dosage, Wort and Storage Temperature“, *BrewingScience*, Vol. 65, 2012, S. 7.
2. Ferk, E.; Mišik, M.; Nersesyan, A.; Pichler, C.; Jager, W.; Szekeres, T.; Marculescu, R.; Poulsen, H.; Henriksen, T.; Bono, R.; Romanazzi, H.; Al-Serori, H.; Biendl, M.; Wagner, K.; Kundi, M.; Knasmüller, S.: „Impact of xanthohumol (a prenylated flavonoid from hops) on DNA stability and other health-related biochemical parameters: results of human intervention trials“, *Molecular Nutrition and Food Research*, Vol. 60, 2016, S. 773.