

## Optimierung technologischer Parameter zur Minimierung der Bildung von 4-Vinylbenzol (Styrol) beim Brauprozess unter Erhaltung des typischen Aromas von Weizenbier

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität Berlin Institut für Biotechnologie Fachgebiet Brauwesen Prof. Dr. F.-J. Methner/Dipl.-LM-Chem. K. Schwarz/Dipl.-Ing. T. Kunz
<b>Forschungsstelle II:</b>	Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Dr. P. Schieberle/Dr. M. Granvogel
<b>Industriegruppe:</b>	Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V., Berlin  Projektkoordinator: A. Hartwig Flensburger Brauerei Emil Peterson GmbH & Co. KG, Flensburg
<b>Laufzeit:</b>	2010 - 2012
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 495.650,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Styrol (Vinylbenzol) ist eine süßlich riechende Flüssigkeit und dient als Ausgangsprodukt zur Herstellung von Polystyrol, das u. a. als Verpackungsmaterial für Milchprodukte, wie z.B. Joghurts, verwendet wird. Aus toxikologischer Sicht handelt es sich bei Styrol um eine gesundheitsschädliche Komponente mit geringem kancerogenem Potential, die daher von der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) in die Gruppe 2B als „possibly carcinogenic to humans“ eingestuft worden ist. Die US-Umweltbehörde EPA hat darauf für die USA einen Trinkwassergrenzwert von 0,1 mg/L festgelegt. Von der Weltgesundheitsorganisation WHO wurde im Rahmen der Bewertung von Trinkwasser ein TDI-Wert (tolerierbare tägliche Aufnahme) von 7,7 µg/kg Körpergewicht und ein vorläufiger ADI-Wert (annehmbare tägliche Aufnahme) mit 4 µg/kg Körpergewicht abgeleitet. Die derzeit gültige maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) liegt bei 86 mg/m<sup>3</sup>. Das deutsche Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat zudem in einer Pressemitteilung vom 31.08.2006 erstmals über Hinweise auf eine

tumorauslösende Wirkung von Styrol beim Menschen berichtet und folgerte daraus, dass diese Erkenntnisse zu einer Neubewertung des Risikos führen werden. Daher sollte nach Wegen gesucht werden, den Gehalt an Styrol in Lebensmitteln, u.a. auch in Weizenbieren, zu minimieren.

Die Styrol-Gehalte sowie der eigentliche Bildungsmechanismus von Styrol bedurften allerdings einer eingehenden Untersuchung, da bisher über die Vorstufen und den Bildungsmechanismus keine belastbaren Daten vorlagen. Diese werden aber für gezielte Minimierungsstrategien im Mälz- und Brauprozess benötigt. Es lag im Interesse der Industrie, sowohl den rohstoff- als auch den brauprozessseitigen Einfluss auf die Styrol-Bildung zu untersuchen. Dadurch gewonnene Erkenntnisse erlauben gezielte Minimierungsstrategien durch eine Modifikation der Rezepturen und der Prozesstechnik.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, den Gehalt von Vinylaromaten durch gezielte brautechnische Maßnahmen zu beeinflussen, um einerseits das Aroma von Weißbier zu erhalten,

andererseits aber die Produktsicherheit durch Minimierungsstrategien für Styrol zu gewährleisten bzw. zu erhöhen.

### Forschungsergebnis:

#### Forschungsstelle 1:

Aus den Ergebnissen der Forschungsarbeiten lässt sich die Erkenntnis gewinnen, dass eine höhere Fermentationstemperatur die Austreibung des gebildeten Styrols fördert und somit die Endkonzentration im fertigen Bier vermindert und die Ausbildung von 2-Methoxy-4-vinylphenol als weizenbiertypische Aromakomponente unterstützt. Beim Vergleich von offener und geschlossener Fermentationsführung konnte bestätigt werden, dass ein Großteil des gebildeten Styrols mit dem gebildeten CO<sub>2</sub> ausgetrieben wird und eine geschlossene Fermentationsführung zu einer Erhöhung des Styrolgehalts im Bier führt, vor allem in der Anwendung der Flaschengärung mit Speisegabe und Verwendung eines obergärigen POF<sup>+</sup>-Hefestammes (Phenolic off-flavour positive). Für die Freisetzung der Aroma beeinflussenden Prekursoren, namentlich Ferulasäure und p-Cumarsäure für 2-Methoxy-4-vinylphenol und 4-Vinylphenol, haben sich Maischtemperaturen von 45 - 50 °C als positiv herausgestellt. Ebenfalls empfiehlt sich eine biologische Maischesäuerung auf einen pH-Wert von 5,2 - 5,4. Bei diesem erniedrigten pH-Wert erweist sich die Herauslösung der Aminosäuren als optimal, das zu einem abgerundeten Aroma durch sensorisch aktive Ester und höhere Alkohole führt. Gleichzeitig hat diese Absenkung keinen negativen Einfluss auf die Freisetzung der p-Cumarsäure und der Ferulasäure und erweist sich als positiv für eine minimierte Zimtsäurefreisetzung. Insbesondere in Hinblick auf eine geringe Freisetzung der Zimtsäure aus der Kornmatrix während des Maischens sind Malzsorten und Maischebedingungen so zu wählen, dass im folgenden Fermentationsverlauf eine enzymatische Umsetzung so minimal wie möglich ausfällt, da die Freisetzung der Zimtsäure nicht gänzlich zu unterbinden ist.

Über die Anstellzellzahl in der Brauerei kann die Zimtsäurekonzentration durch die Fermentation zusätzlich beeinflusst werden. Eine Erhöhung der Anstellzellzahl bedeutet einen Konzentrationsanstieg von Styrol. Daher sollte die Anstellzellzahl in der Brauerei bei einer offenen Fermentation möglichst hoch gewählt werden, um eine schnellere Umsetzung der Zimtsäure zu fördern und somit mehr Zeit für die folgende Austrei-

bung von Styrol zu ermöglichen, damit in der Nachgärung kein weiteres Styrol mehr gebildet werden kann. Bei einer geschlossenen Fermentation sollte demzufolge die Anstellzahl möglichst gering gehalten werden. Ergänzend können Brauereien durch Auswahl zimtsäurearmer Rohstoffe sowie durch Beimischung nur geringfügiger Mengen notwendiger, thermisch belasteter Röst- und Spezialmalze bereits im Vorfeld Einfluss ausüben.

#### Forschungsstelle 2:

Mittels neu entwickelter Stabilisotopenverdünnungsassays auf Basis der HPLC-MS/MS wurden die Konzentrationen der freien Phenolcarbonsäuren in verschiedenen Weizen- (Sorte Herrmann) und Gerstendarrmalzen (Marthe) analysiert, wobei ein besonderer Fokus auf die Mälzungsparameter Weichgrad, Keimtemperatur und Keimdauer gelegt wurde. Dabei zeigte sich, dass sich durch die Wahl der Mälzungsparameter die Konzentrationen der freien Phenolcarbonsäuren (Prekursoren der Vinylaromaten) in den Darrmalzen (vor allem im Gerstendarrmalz) gezielt steuern lassen. So stiegen z.B. die Gehalte der freien Phenolcarbonsäuren bei gleichzeitig steigenden Weichgraden, Keimtemperaturen und Keimdauern. Eine Veränderung nur einer dieser Parameter hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der freien Phenolcarbonsäuren in den Darrmalzen.

Ebenso wurden die Konzentrationen der freien Phenolcarbonsäuren (p-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, Sinapinsäure, Vanillinsäure und Zimtsäure) in zehn kommerziell erhältlichen Weizenbieren bestimmt. Dabei gab es zum Teil große Unterschiede zwischen den einzelnen Bieren. So konnten beispielsweise nur in zwei Bieren alle Phenolcarbonsäuren analysiert werden, wobei nur Kaffee-, Sinapin- und Vanillinsäure in allen Bieren enthalten waren. Es wurde außerdem bewiesen, dass niedrige Konzentrationen von freien Phenolcarbonsäuren im Bier mit hohen Konzentrationen der entsprechenden Vinylaromaten korreliert waren, wobei das Aroma von Bieren mit höheren Konzentrationen an Vinylaromaten als stärker ausgeprägt bewertet wurde.

Die Analyse der Prozessintermediate (Pfanne-Voll-Würze, Ausschlagwürze, Jungbier und trinkfertiges Bier) zeigte, dass die zur Fermentation verwendete Hefe einen großen Einfluss auf die Konzentration der Vinylaromaten im trinkfertigen Bier hatte. Dabei wurden hohe Konzentrationen dieser Verbindungen nur in Bieren, die mit

obergärigen Hefen mit POF<sup>+</sup>-Aktivität hergestellt wurden, analysiert. Jedoch waren höhere Konzentrationen der gewünschten Vinylaromaten 2-Methoxy-4-vinylphenol und 4-Vinylphenol auch mit höheren Styrolkonzentrationen verbunden. Eine Reduktion der Styrolgehalte bei gleich bleibender Aromaqualität könnte somit durch die Verwendung einer Hefe mit selektiverer Enzymaktivität erfolgen. Allerdings konnten die Styrolgehalte auch durch Verwendung von Darmmalzen, hergestellt mit niedrigen Mälzungsparametern, gesenkt werden. Dabei werden durch diese Malze zuerst weniger freie Phenolcarbonsäuren (Prekursoren) in die Pfanne-Voll-Würze eingebracht, was bei der anschließenden Gärung mit obergäriger Weizenbierhefe mit POF<sup>+</sup>-Aktivität zu verminderten Styrolkonzentrationen führt. Eine dritte Möglichkeit zur Styrolreduktion war die Verwendung obergäriger Hefen mit sehr geringer POF<sup>+</sup>-Aktivität. Jedoch führte diese Art von Hefen auch zu verringerten Konzentrationen der gewünschten aromaaktiven Vinylaromaten.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

In Deutschland hatten Weizenbiere 2010 mit 7,9 % den größten Marktanteil nach Pilsner- und Exportbieren und zwar mit steigender Tendenz. Dabei belief sich der Gesamtkonsum an Weizenbier auf ca. 430 Mio L. Die Absatzmenge der 36 größten deutschen Braustätten belief sich im Jahr 2007 auf 7,8 Mio hL, wobei die kleinste davon einen Anteil von 25.000 hL hatte. Neben diesen großen Braustätten gibt es in Deutschland allerdings auch ca. 1.300 kleinere Betriebe, von denen zwei Drittel einen Jahresausstoß von weniger als 5.000 hL aufweisen. Der größte inländische Absatzmarkt für Weizenbier findet sich in Bayern, wo ca. ein Viertel des jährlichen Gesamtausstoßes konsumiert wird. Daneben besitzt der Brauereisektor in Bayern insgesamt eine große regionale Bedeutung, was sich auch an der großen Anzahl kleiner und mittelständischer Unternehmen beziffern lässt.

Die Ergebnisse des Projektes tragen zu einer sachgemäßen Diskussion sowohl in den Medien als auch beim Verbraucher bei und verhindern damit verbundene eventuelle wirtschaftliche Verluste für Weizenbierbrauereien. Da Styrol außerdem als mögliches Karzinogen gilt, ist auch aus gesundheitlicher Sicht eine Minimierungsstrategie sinnvoll. Mit den im Projekt erzielten Ergebnissen konnten über eine gezielte Rohstoffauswahl und Prozessführung erfolverspre-

chende Minimierungsansätze für Styrol unter Aufrechterhaltung des typischen Aromas erarbeitet werden. Die Charakterisierung des Weizenbieraromas macht es außerdem möglich, das Aroma styrolreduzierter Biere zu bewerten und negative Veränderungen aufzuzeigen.

#### Publikationen (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht 2012.
2. Schwarz, K. und Methner, F.-J.: Styrene concentration during wheat beer production. *Brew. Sci.* 64, 156-160 (2011).
3. Schwarz, K., Stübner, R. und Methner, F.-J.: Formation of styrene dependet on fermentation magement during wheat beer production. *Food Chem.* 134 (4), 2121-2125 (2012).
4. Schwarz, K. und Methner, F.-J.: Zusammenhang zwischen der Bildung von Styrol und den Aromastoffen 4-Vinylguajakol und 4-Vinylphenol durch obergärige Weizenbierhefen. *Lebensmittelchem.* 66 (1), 4 (2012).
5. Langos, D., Granvogl, M. und Schieberle, P.: Entwicklung von Stabilisotopenassays zur Quantifizierung möglicher Prekursoren von 4-Vinylbenzol (Styrol) und strukturanaloger Verbindungen (Vinylaromaten) in Weizenbier. (Development of stable isotope dilution assays for quantitation of possible precursors of 4-vinylbenzene (styrene) and other vinyl constituents in wheat beer). *Jahresbericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie* 170, 84-87 (ISBN 978-3-938896-35-8) (2010).
6. Langos, D., Granvogl, M. und Schieberle, P.: Charakterisierung wichtiger Aromastoffe in Weißbier und Studien zur Bildung aus Phenolcarbonsäuren: Korrelation zur Bildung von Styrol. *Lebensmittelchem.* 65, 58-59 (2011).
7. Langos, D., Granvogl, M. und Schieberle, P.: Identifizierung von Schlüsselaromastoffen in Weizenbier. (Identification of key aroma compounds in wheat beer). *Jahresbericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie* 149, 48-51 (ISBN 978-3-938896-49-5) (2011).

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

**Weiteres Informationsmaterial:**

Technische Universität Berlin  
Institut für Biotechnologie  
Fachgebiet Brauwesen  
Seestrasse 13, 13353 Berlin  
Tel.: 030/314-27504, Fax: 030/314-27503  
E-Mail: frank-juergen.methner@tu-berlin.de

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittel-  
chemie (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:

