

# Zinkgenerierung im Rahmen des Reinheitsgebots

**EFFEKTIV LÖSEN** | Mangelnder Zinkgehalt in der Bierwürze ist in vielen Brauereien ein bekanntes Problem. Dies führt mitunter zu schleppender Gärung sowie unzureichendem Diacetylabbau und stellt den Brauer vor große technologische Schwierigkeiten. Da vor allem das bayerische Reinheitsgebot von 1516 es nicht erlaubt, den Zinkmangel durch Präparate wie Zinkchlorid auszugleichen, beschäftigte sich eine Masterarbeit am Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität mit der Entwicklung einer reinheitsgebotskonformen Methode zur Generierung höherer Zinkkonzentrationen in Bierwürze.

**DAS SPURENELEMENT** Zink ist an vielen Stoffwechselforgängen in der Hefe beteiligt und essentiell für die Zelle. Einerseits tritt Zink als Cofaktor und Bestandteil von Metalloenzymen auf, andererseits beeinflusst es zahlreiche biologische Funktionen der Hefezelle, wie die Bildung von DNA und RNA. Zink ist als Cofaktor somit an über 300 katalytischen Reaktionen beteiligt. Dabei liegt Zink in Form von  $Zn^{2+}$  vor. Die Zinkionen sind zumeist im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisiert und bilden O-, N- oder S-Liganden über die Aminosäuren Histidin, Glutamin, Asparagin und Cystein [1, 2]. Das wohl wichtigste und bekannteste dieser Enzyme, das auf Zink angewiesen ist, ist die Alkoholdehydrogenase, die unter Verbrauch von NADH/H<sup>+</sup> Acetaldehyd zu

Ethanol reduziert und umgekehrt durch den Einsatz von NAD Ethanol zu Acetaldehyd abbaut [3].

Neben enzymatisch ablaufenden Stoffwechselforgängen, bei denen Zink vonnöten ist, laufen in der Hefezelle zusätzliche Reaktionen ab, in denen das Vorhandensein von Zink unabdingbar ist. Eine für die DNA und RNA-Synthese wichtige Proteingruppe stellen die sogenannten Zinkfingerproteine dar. Auf den Zinkfingern befinden sich Proteine, die sowohl DNA-bindend als auch RNA-bindend sind. Die Zinkfingerproteine wirken als positive Transkriptionsfaktoren,

da sie an einer bestimmten Startstelle der DNA binden und die Transkription starten [4]. Zink hat außerdem Einfluss auf die Phospholipidsynthese und reguliert diese. Phospholipide sind die Hauptkomponente der Lipiddoppelschicht und somit der Plasmamembran. Die Zinkionen reagieren mit den Kopfgruppen der Lipide und bilden stabile Komplexe. Dadurch wird eine oxidative Schädigung der Lipidmembran verhindert [5]. Die Zinkaufnahme in die Hefezelle ist durch Transportproteine geregelt, die auf den Genen Zrt1p und Zrt2p kodiert sind. Zrt1p ist hauptsächlich in mit Zink unterversorgten Zellen tätig. In mit Zink gesättigten Zellen ist das Zrt2p aktiv [6, 7].

Ein Mangel an Zink in der Bierwürze kann sich auf vielseitige Weise bemerkbar machen. So kann eine schleppende Hauptgärung neben einer schlechten Hefevermehrung ebenso auf eine mangelnde Zinkversorgung der Würze zurückzuführen sein wie ein langsamer bzw. nicht vollständiger Abbau von Diacetyl [8, 9].

## Woher kommt das Zink?

Das Zink in der Bierwürze stammt zum größten Teil aus dem Malz und somit aus dem Getreide (Gerste, Weizen, etc.). Möglich ist zwar auch die Aufnahme von Zink

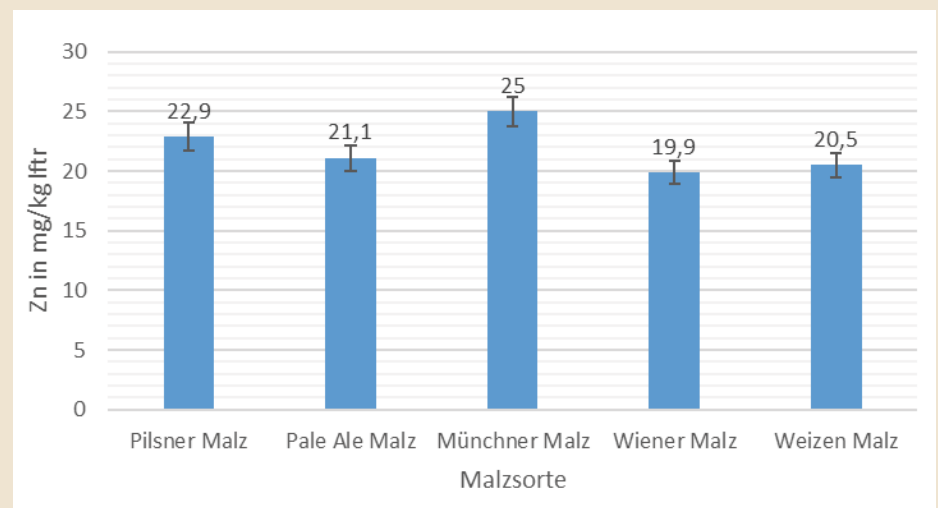


Abb. 1 Zinkgehalte verschiedener Malzsorten

**Autoren:** Dr. Hubertus Schneiderbanger, Matthias Knöpfle, Dr. Martin Zarnkow, Prof. Fritz Jacob, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, Freising

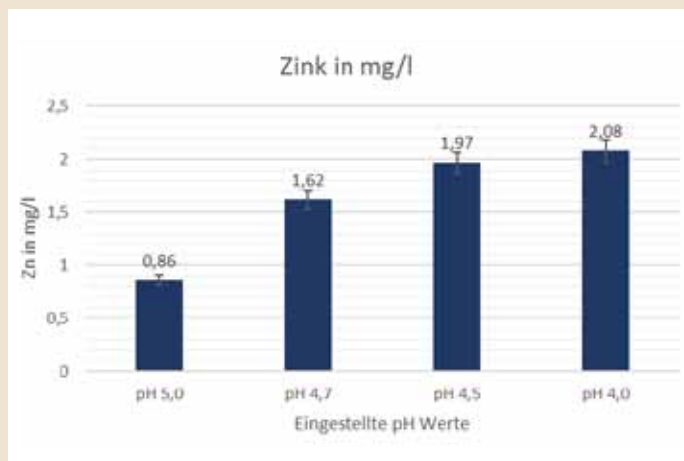


Abb. 2 a Zinkgehalte der Kongressmaischnen bei unterschiedlich starker Maischesäuerung

über das Brauwasser, allerdings ist der Zinkgehalt im Brauwasser mit durchschnittlich 0,02 mg/l sehr gering und kann somit nicht entscheidend zu einer ausreichenden Zinkversorgung der Hefe beitragen [10]. Ebenso erfolgt über die Hopfengabe nur ein geringfügiger Zinkeintrag. So besitzt Aromahopfen einen mittleren Zinkgehalt von 93,9 µg/kg und Bitterhopfen einen Zinkgehalt von 82,7 µg/kg [11]. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Menge an Hopfen, die zur Bierherstellung verwendet wird, ist der Eintrag an Zink vernachlässigbar.

Somit bleibt dem Brauer in Deutschland nur das Malz als relevante Zinkquelle. Hierbei gibt es jedoch bereits Unterschiede im Malz selbst. Die Malzsorte spielt dabei z.T. ebenso eine Rolle wie auch agronomische Faktoren und Gerstensorten. Exemplarisch wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, die eine ungefähre Vorstellung von der Schwankungsbreite der Zinkkonzentration im Malz widerspiegeln sollen (s. Abb. 1).

Die Schwankungsbreite der in dieser Arbeit untersuchten Zinkkonzentrationen liegt zwischen 19,9 mg/kg lfr. und 25 mg/kg lfr. Die Hefe benötigt eine Mindestkonzentration von ca. 0,15 mg/l Zink in der Ausschlagwürze, um die Gärung ohne Mangelerscheinungen zur Zufriedenheit des Brauers zu gewährleisten. Aus 20 mg/kg lfr. Zink, das im Malz vorliegt, könnten somit bei einer 100%igen Ausbeute 2,27 mg/l in der Ausschlagwürze generiert werden. Hieraus wird ersichtlich, dass aus allen untersuchten Malzen mehr als genügend Zink generiert werden könnte und die Sorte vernachlässigbar ist. Es wird demnach deutlich, dass zwar genügend Zink im Malz vorhanden ist, jedoch der Großteil davon

in den Trebern verbleibt und während des Würzeherstellungsprozesses nicht in Lösung gebracht werden kann [9].

### Versuche zum Lösungsverhalten von Zink aus Malz

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Zinklösung beeinflussen lässt, wurden zunächst Parameter, die eine hohe Zinklösung während der Maischarbeit bewirken könnten, genauer betrachtet:

- der Maische-pH-Wert;
- den Faktor Zeit;
- die Maischetemperatur.

Um zunächst den Einfluss des pH-Wertes näher zu untersuchen, wurden Kongressmaischnen mit verschiedenen pH-Werten produziert. Der Maische-pH-Wert hat, wie in diversen Literaturangaben angegeben wird, einen deutlichen Einfluss auf die Zinklösung aus dem Malz während der

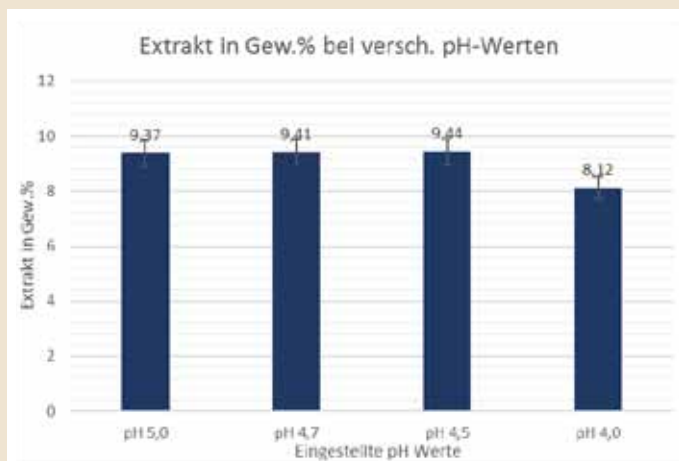


Abb. 2 b Extraktgehalte verschieden stark angesäuerter Kongressmaischnen

Maischarbeit. Vorversuche zeigten, dass die höchsten Zinkkonzentrationen in den Grobgrießen sowie in den Spelzen verschiedener Schrotfraktionen vorhanden sind. Da es Ziel dieser Arbeit war, ein einfaches und praktikables Verfahren zur Generierung höherer Zinkkonzentrationen zu entwickeln, wurde davon abgesehen, Schrotfraktionen zu trennen und daraus Zink zu gewinnen. Deshalb wurde handelsübliches Pilsener Malz normal geschrotet und untersucht. Wie Abbildung 2a zeigt, werden durch eine starke pH-Absenkung während der Maischarbeit deutlich höhere Zinkgehalte erzielt. Ungesäuerte Kongressmaischnen mit dem gleichen Malz erbrachten bei einem pH-Wert von 5,9 eine Zinkkonzentration von 0,21 mg/l. Hieraus wird deutlich, welchen enormen Einfluss der pH-Wert auf das Lösungsverhalten dieses Spurenelements hat.

Neben dem Einfluss des Maische-pH auf die Zinklösung wurde auch der Einfluss

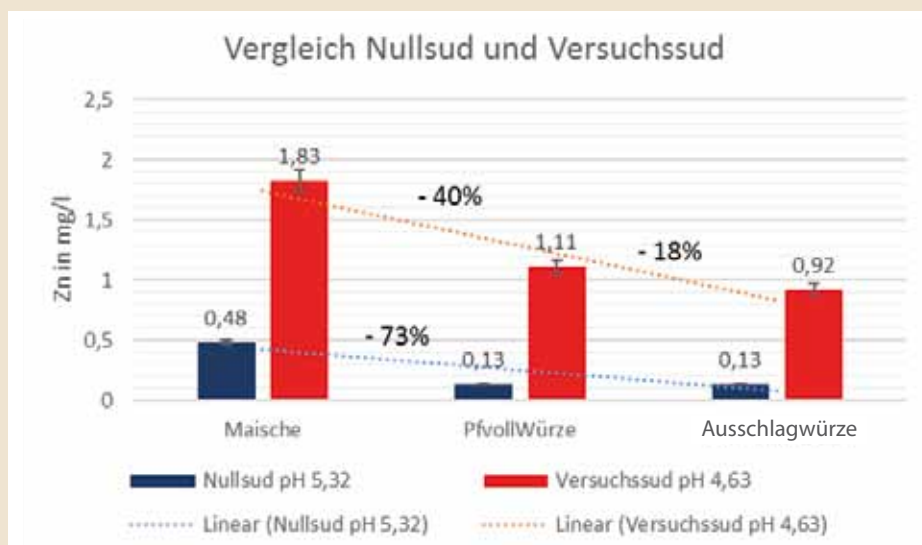


Abb. 3 Zinkverluste während der Würzebereitung

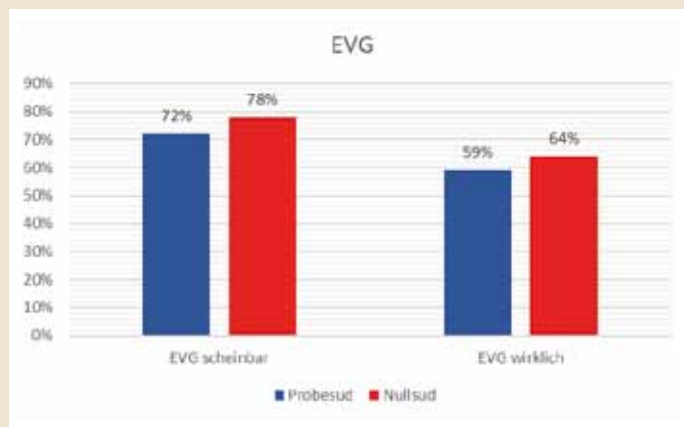


Abb. 4 Endvergärungsgrade des Versuchs- und Nullsudes



Abb.5 Zinkgehalte in der Hefe – vor und nach der Gärung

von Temperatur und Zeit untersucht, indem isotherme Maischen mit verschiedenen Temperaturen und unterschiedlicher Maischdauer durchgeführt wurden. Hierbei konnten jedoch beide Parameter als vernachlässigbar im Vergleich zum pH-Wert eingestuft werden. Deshalb konzentrierten sich die weiteren Versuche hauptsächlich auf die pH-Regulierung der Maische.

Aufgrund des niedrigen pH-Werts der Maische ergab sich jedoch das Problem, dass die während des Maischens aktiven Enzyme, vor allem die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase, gehemmt wurden. Deshalb musste ein Kompromiss gefunden werden, der eine ausreichende Extraktausbeute sowie hohe Zinkkonzentrationen gewährleistete. Mit höchsten Extraktwerten von 9,44 Gew.-% und einem Zinkgehalt von 1,97 mg/l zeigte sich, dass eine Maischesäuerung auf einen pH von 4,5 die besten Bedingungen liefert, um den Zinkgehalt in der Ausschlagwürze zu erhöhen.

### Scale-up vom Labor in die Praxis

Um diese Ergebnisse der Kongressmaischen in die Praxis zu übertragen, wurden in der Folge zunächst Versuche auf einer 50-l-Pilotanlage durchgeführt. Dabei wurden zwei identische Sude eingebracht und im Anschluss mit obergäriger Hefe vergoren. Der Unterschied lag darin, dass bei einem der Sude der Maische-pH auf einen Wert von 4,5 eingestellt war, der andere einen pH-Wert von 5,32 aufwies (Malzmischungsverhältnis 60 % Weizenmalz, 40 % Gerstenmalz). Im Laufe der Würzproduktion wurden in verschiedenen Prozessschritten Proben entnommen und auf ihren Zinkgehalt untersucht. Hier bestätigten sich die Ergebnisse der Laborversuche. So lagen in der pH-regulierten Ausschlagwürze 0,92 mg/l Zink vor, im ungesäuerten Sud hingegen nur 0,13 mg/l (Abb. 3).

Durch die starke Maischesäuerung mit biologischer Milchsäure ist jedoch die Amylaseaktivität gehemmt, weshalb es uner-

lässlich ist, den photometrischen Jodwert sowie den Endvergärungsgrad im Auge zu behalten. In den hier durchgeführten Versuchen lag der Endvergärungsgrad im angesäuerten Sud um sechs Prozent niedriger als im Referenzsud (Abb. 4).

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Versuche untersucht und dargestellt werden, wie sich Hefen in zinkarmen und zinkreichen Würzen verhalten. Hierzu wurde zunächst der Zinkgehalt der Anstellhefe gemessen und nach der Gärung der Zinkgehalt der Erntehefen erneut ermittelt.

Die Ausgangshefe wies bereits eine gute Zinkausstattung auf (Sollwert bei ca. >40 mg/kg Trs.). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Hefen in zinkreichen Würzen weiter mit Zink anreichern, wohingegen sie in zinkarmen Würzen von dem Zink zehren, das sich in den Hefezellen befindet (Abb. 5). Der Zinkpool in der Hefezelle ist der Grund, warum Hefen auch zinkarme Würzen bei der ersten Führung noch ohne Schwierigkeiten vergären, es jedoch bei mehrmaligem Anstellen und dauerhafter Unterversorgung zu Gärungs- und Reifungsproblem kommt.

Diese Versuchsreihen wurden unter sonst identischen Bedingungen auch im Großmaßstab verifiziert. Dabei ergaben sich bei den Zinkwerten ähnlich hohe Werte wie in den Versuchen auf der 50-l-Pilotanlage. Es wurden hierbei 0,85 mg/l Zink in der Ausschlagwürze generiert (Abb. 6).

### Fazit

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, dass durch eine Maischesäuerung auf pH-Werte von ca. 4,5 Zinkkonzentrationen von bis zu 0,9 mg/l in der Ausschlagwürze erreicht werden können. Durch den niedrigen pH-Wert sollte jedoch der photometrische Jodwert und der

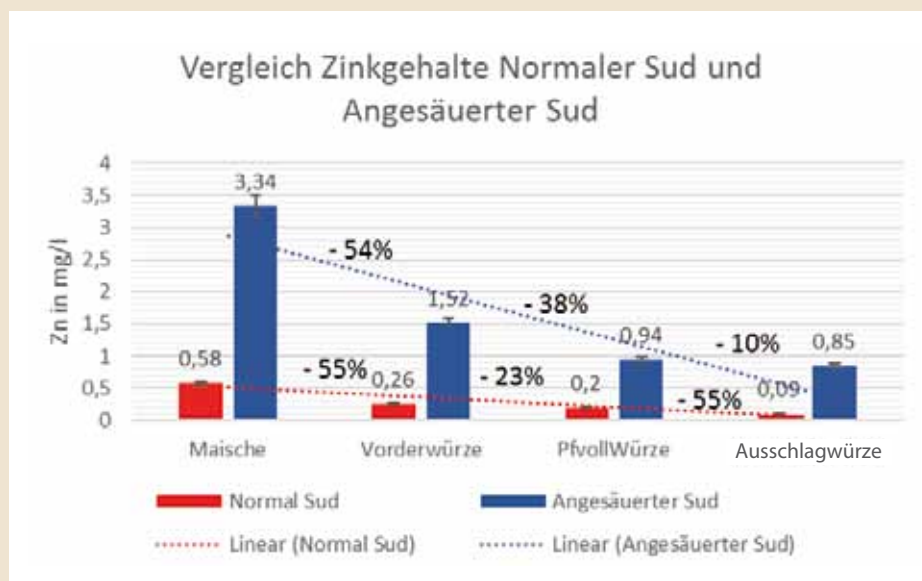


Abb. 6 Zinkverluste während der Würzbereitung im Großmaßstab

Endvergärungsgrad stets im Auge behalten werden. Deshalb ist zu überlegen, den Maische-pH-Wert erst kurz vor dem Läutern stark abzusenken. Dadurch würden die während des Maischens wirkenden Enzyme nicht geschädigt.

Ein weiterer und vielversprechender Ansatz wäre, extra Sude mit hohem Zinkgehalt durch Maischesäuerung herzustellen, die anschließend ausschließlich der Hefepropagation zugeführt werden. Idee dieser Methode ist, dass sich die Hefen während der Propagation mit Zink soweit anreichern, dass sie auf Zink aus der Würze nicht mehr angewiesen sind. Somit könnten die mit Zink angereicherten Hefen, Würzen mit niedrigen Zinkgehalten problemlos vergären. ■

### ■ Literatur

1. Parkin, G.: „The bioinorganic chemistry of zinc: synthetic analogues of zinc enzymes that feature tripodal ligands“, in: *Chemical Communications*, Nr. 20, 2000, S. 1971-1985.
2. Vallee, B. L.; Auld, D. S.: „Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins“, *Biochemistry*, 29 (24), 1990, S. 5647-5659.
3. Berg, J. M.; Stryer, L.; Tymoczko, J. L.: „Stryer Biochemie“, Springer-Verlag, 2015.
4. Estruch, F.; Carlson, M.: „Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*“, in: *Molecular and Cellular Biology*, 13 (7), 1993, S. 3872-3881.
5. Binder, H.; et al.: „Interaction of  $Zn^{2+}$  with phospholipid membranes“, in: *Biophysical chemistry*, 90 (1), 2001, S. 57-74.
6. Zhao, H.; Eide, D.: „The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation“, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (6), 1996, S. 2454-2458.
7. Zhao, H.; Eide, D.: „The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*“, in: *Journal of Biological Chemistry*, 271 (38), 1996, S. 23203-23210.
8. Auld, D. S.: „The ins and outs of biological zinc sites“, in: *Biometals*, 22 (1), 2009, S. 141-148.
9. Narziss, L.; Back, W.: *Die Bierbrauerei: Band 2 – Die Technologie der Würzebereitung*, John Wiley & Sons, 2012.
10. Zinkwerte in Wasser aus den Jahren 2015 und 2016; Forschungszentrum Weihenstephan Brau- und Lebensmittelqualität (BLQ), 2016.
11. Passaghe, P.; et al.: „Monitoring of some selected heavy metals throughout the brewing process of craft beers by inductively coupled plasma mass spectrometry“, in: *European Food Research and Technology*, 241 (2), 2015, S. 199-215.