

Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die Bildung aromaaktiver Verbindungen aus Ascorbinsäure in Modellwein

Anna Heidrich, Alexandra Endres, Martin Pour Nikfardjam*

Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau
Traubenplatz 5, D-74189 Weinsberg

*Korrespondierender Autor: martin.pourn@lvwo.bwl.de

Zusammenfassung

Der Einfluss der Temperatur, des pH-Wertes, der Ascorbinsäure- und der Schwefeldioxid-Konzentration auf den Abbau von Ascorbinsäure zu aromaaktiven Verbindungen wurde in Modellweinen untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl eine kühle Temperatur (12 °C) als auch hohe Gehalte an freiem SO₂ (Schwefeldioxid) (50 mg/l) zu einer Verlangsamung der Bildung von aromaaktiven Abbauprodukten führt. Darüber hinaus wirkt ein hoher pH-Wert ebenfalls hemmend. Diese Untersuchungen bestätigen damit bereits publizierte Ergebnisse. Da Ascorbinsäure insbesondere bei Weiß- und Roséweinen zum Einsatz kommt und hier die Bildung von aromaaktiven Substanzen offenbar leichter möglich ist als in Rotweinen, können die vorgestellten Ergebnisse als Empfehlungen für önologische Handlungsweisen herangezogen werden.

Schlagwörter: Furfural, 3-Hydroxy-2-pyron, Ethyl-2-furoat, Schwefeldioxid, GC-MS

Abstract

Influence of different parameters on the formation of aroma-active compounds from ascorbic acid in model wines. The influence of temperature, pH value, ascorbic acid, and sulfur dioxide concentration on the degradation of ascorbic acid into aroma-active compounds was examined in model wines. It was found that both cool temperature (12 °C) and high levels of free SO₂ (sulfur dioxide) (50 mg/l) slow down the formation of aroma-active degradation products. Additionally, a high pH value also has an inhibitory effect. These investigations thus confirm previously published results. Since ascorbic acid is particularly used in white and rosé wines where the formation of aroma-active substances appears to be easier than in red wines, the presented results can be used as recommendations for oenological practices.

Keywords: Furfural, 3-Hydroxy-2-pyrone, Ethyl-2-furoate, sulfur dioxide, GC-MS

Resumée

L'influence de la température, de la valeur du pH, de l'acide ascorbique et de la concentration en dioxyde de soufre sur la dégradation de l'acide ascorbique en composés aromatiques a été examinée dans des vins modèles. Il a été constaté que tant une température fraîche (12 °C) que des niveaux élevés de SO₂ (dioxyde de soufre) libre (50 mg/l) ralentissent la formation de produits de dégradation aromatiques. De plus, une valeur élevée du pH a également un effet inhibiteur. Ces investigations confirment donc des résultats précédemment publiés. Étant donné que l'acide ascorbique est particulièrement utilisé dans les vins blancs et rosés, où la formation de substances aromatiques semble être plus facile que dans les vins rouges, les résultats présentés peuvent être utilisés comme recommandations pour les pratiques œnologiques.

Mots clés: Furfural, 3-Hydroxy-2-pyron, Ethyl-2-furoat, dioxyde de soufre, GC-MS

Einleitung

Ascorbinsäure ist ein laut Verordnung (EU) 2019/934 Anhang I A Tabelle 2 Nummer 2.6 für die Weinbereitung zugelassener Behandlungsstoff. Die Höchstmenge im verkehrsfähigen Wein darf nicht mehr als 250 mg/l betragen. Der Zusatz von Ascorbinsäure zu Wein erfolgt dabei aus verschiedenen Gründen.

Zum einen soll der Zusatz eine mögliche Bildung der untypischen Alterungsnote (UTA) verhindern oder zumindest verlangsamen. Zum anderen dient die zugesetzte Ascorbinsäure als Antioxidans gegen etwaig in der Flasche bereits vorhandenen oder permanent durch den Verschluss eindringenden Sauerstoff (Schneider, 2013). Es muss bedacht werden, dass der Zusatz an Ascorbinsäure nicht ganz unkritisch gesehen werden kann. Denn Ascorbinsäure kann neben ihren positiven Wirkungen auch eine ganze Reihe von negativen Auswirkungen auf die Weinqualität haben, die in der Regel nicht direkt mit dem Zusatz von Ascorbinsäure assoziiert werden. Zum Verständnis dieser negativen Auswirkungen ist es notwendig, sich mit den chemischen Prozessen, die durch und mit Ascorbinsäure ausgelöst werden können, zu befassen.

Die Oxidation im Wein ist ein sehr komplexer Mechanismus. Trotzdem können einige kritische Faktoren benannt werden, die für einen Oxidationsvorgang im Wein unerlässlich sind.

Hier sind zu nennen: Sauerstoff, Eisen, Kupfer, Mangan, freies Schwefeldioxid (SO_2) sowie Phenole und Ascorbinsäure. Grundsätzlich ist zu bemerken, dass Sauerstoff, so wie er natürlicherweise in der Umgebungsluft vorliegt, eher als reaktionsträge zu bezeichnen ist (Danilewicz, 2003). Er muss für eine Reaktion erst durch andere Stoffe aktiviert werden. Hierfür sind in erster Linie die Übergangsmetalle Eisen, Kupfer und Mangan verantwortlich, die in jedem Wein natürlich vorkommen oder, wie das Kupfer, zur Bockser-Behandlung und -Vermeidung während der Weinherstellung zugesetzt werden (Funk, 2003; Margalit, 2012).

Generell geht die Oxidation weniger vom Sauerstoff selbst als vom Eisen aus. Das Eisen in seiner dreiwertigen Form übernimmt vom SO_2 ein Elektron, so dass es selbst in die zweiwertige Form übergeht. Das um ein Elektron beraubte SO_2 hingegen bildet ein Radikal, eine äußerst reaktive Zwischenstufe. Und erst dieses Radikal ist es, welches in einem zweiten Schritt mit dem Sauerstoff reagiert und diesen dabei aktiviert (Abb. 1). Man könnte es auch so formulieren, dass ausgerechnet diejenige Substanz, die man eigentlich zum Schutz des Weines vor Oxidation hinzufügt, nämlich das SO_2 , die Oxidation des Weines überhaupt erst ermöglicht. Dies ist ein gedankliches Paradox, das nicht gleich verständlich erscheint.

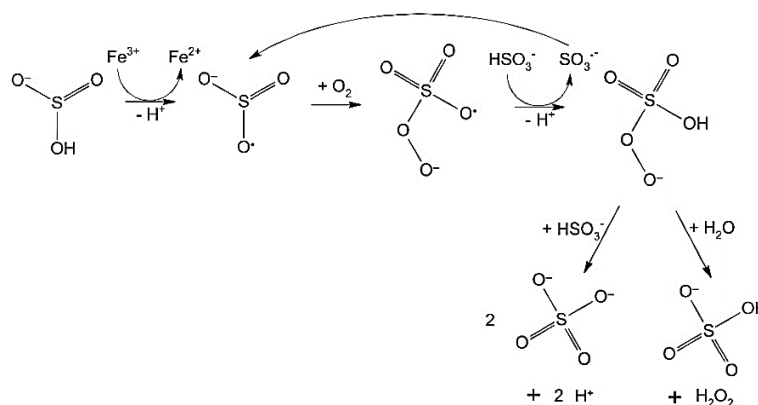


Abb. 1: Reaktion des Sulfits mit Eisen und Sauerstoff (Danilewicz und Wallbridge, 2010)

Das aus SO_2 und Sauerstoff gebildete Radikal ist ebenfalls äußerst reaktiv und sucht sich weitere Reaktionspartner. Es kann nun durch ein weiteres SO_2 -Molekül abgefangen und so entschärft werden oder aber, wenn kein SO_2 mehr im Wein vorliegen sollte, mit Wasser unter Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagieren. H_2O_2 ist ein sehr

starkes Oxidationsmittel und reagiert bevorzugt mit Ethanol zu Acetaldehyd, der Wein wird „luftig“. Mit Aromen oder Phenolen reagiert H_2O_2 zu den jeweiligen oxidierten Verbindungen. Der Wein verliert in der Folge an Frische und zeigt eine mehr oder weniger deutliche Braunfärbung (Pour Nikfardjam, 2010).

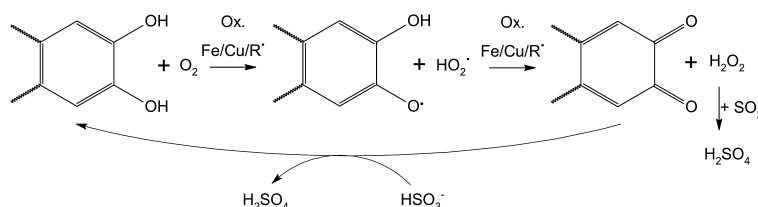


Abb. 2: Oxidation der Phenole (Pour Nikfardjam, 2010)

Während sich die Phenole aus ihrer oxidierten Form, den sogenannten Chinonen, durch den Einsatz von SO_2 wieder in ihre Ausgangsform versetzen lassen (Abb. 2), gelingt dies bei der oxidierten Form der Ascorbinsäure, der Dehydroascorbinsäure (DHA), leider nicht, da diese unter oxidativen Bedingungen zügig weiter oxidiert wird (Matissek, 2019). Der Einsatz von Ascorbinsäure ist daher eine einmalige Angelegenheit; die Substanz steht also nicht wie die Phenole durch eine Rückreaktion über SO_2 nochmals für weitere Einsätze zur Verfügung. Auch muss festgehalten werden, dass Ascorbinsäure nicht ganz so effektiv mit Sauerstoff reagiert, wie dies SO_2 tut (Danilewicz et al., 2008). Dies liegt ursächlich im unterschiedlichen Redoxpotenzial beider Substanzen begründet. Im Falle der Ascorbinsäure liegt das Standard-Elektrodenpotenzial bei +0,490 V (Heimann und Wissner, 1962) und für SO_2 bei +0,16 V (Binnewies et al., 2016).

Darüber hinaus kann Ascorbinsäure zu einer Vielzahl von aromaaktiven Verbindungen abgebaut werden. Hier ist einerseits die Substanz Sotolon zu nennen, ein Aromastoff, der Sherries, Madeira- und Portweinen ihren charakteristischen oxidierten Geruch verleiht. Darüber hinaus ist die Substanz prägend für das Aroma von Liebstöckel („Maggi-Aroma“) und Bockshornklee, aber auch für Karamell, verbrannten Zucker und Ahornsirup.

In Versuchen konnte gezeigt werden, dass Ascorbinsäure unter oxidativen Bedingungen zur 2-Ketobuttersäure (2-Oxobutansäure) abgebaut wird und diese als Vorstufe für die Weiterreaktion mit Ethanol zu Sotolon dient (König et al., 1999; Pons et al., 2010). In weitergehenden Untersuchungen bestätigte sich, dass bereits ein Zusatz von 80 mg/l Ascorbinsäure zu Weinen, die in Flaschen mit Supremcorq, einem synthetischem Korken, gelagert wurden, zu einer Bildung von 1 $\mu\text{g/l}$ Sotolon innerhalb der ersten 18 Monate führen kann und damit den Geruchsschwellenwert von 2 $\mu\text{g/l}$ des Racemats von Sotolon in wässriger Lösung mit 12 %vol. Ethanol wahrscheinlich überschreitet (Pons et al., 2008; Pons et al., 2015).

Zu den weiteren Abbauprodukten gehören Ethyl-2-furoat, Furfural und 3-Hydroxy-2-pyron, deren geruchliche Charakteristika von Vanille, über Karamell und gebackenes Brot bis hin zu Lakritze reichen (Pisarnitskii, 2001; Velíšek et al., 1976). Insgesamt sind sie daher eher für reifere Aromatiken verantwortlich, als dass sie den frischen Eindruck eines Weines verstärken würden. Ihre Bildung ist folglich durchaus kritisch zu sehen, da sie das Potential besitzen, einem Wein die Frische zu rauben oder zumindest zu überdecken, obwohl die Ascorbinsäure eigentlich zum Erhalt des frischen Aromas eingesetzt wird.

Für uns stellte sich im durchgeführten Projekt daher die Frage, welchen Einfluss Temperatur, SO₂ und pH-Wert auf die Bildung der oben genannten aromaaktiven Verbindungen aus unterschiedlichen Ascorbinsäure-Ausgangskonzentrationen haben. Dies wurde in Modelllösungen in einem Design of Experiments (DoE) Screening Design durchgeführt, um ein möglichst einfaches System mit geringen Synergismen vorliegen zu haben. Sotolon wurde aufgrund der erforderlichen komplexen Analytik nicht in die weiteren Betrachtungen einbezogen.

Material und Methoden

L(+)-Ascorbinsäure 99,0-100,5 % und L(+)-Weinsäure 99,7 % stammen von VWR International BV (Leuven, Belgien). Von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) wurden die Substanzen Natriumchlorid (zur Analyse), Kaliumdisulfit (EMSURE zur Analyse, Supelco) und Natronlauge erhalten, und von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) wurde das Ethanol ≥ 99,8 %, p.a. bezogen. Zur Gaschromatographie wurde Helium von Air

Products GmbH (Hattingen, Deutschland) verwendet. Mittels einer Headspace-Solid-Phase-Micro-Extraction-Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Analyse (HS-SPME-GC-MS-Analyse) wurden die Probenlösungen analysiert. Die Geräteeinstellungen sind der Tab. 1 zu entnehmen. Zur Analyse stand der Gaschromatograph Clarus 690 mit dem TurboMatrix MultiPrep+ #1 Autosampler und dem Massenspektrometer Clarus SQ 8T mit EI-Ionisation von PerkinElmer (Shelton, USA) zur Verfügung. Der Quartz Liner for splitless Operation (ID=1 mm, OD=4 mm, Länge=86,2 mm) ist auch von PerkinElmer (Shelton, USA). Die SPME Faser (Carbon Wide Range/PDMS, Faserdicke: 95 µm, Faserlänge: 10 mm) zur Extraktion der Analyten wurde von Restek Pal (Zwingen, Schweiz) bezogen. Zur Trennung der Analyten diente die Elite-WAX Capillary Column (Polyethylenglycol 30 m x 0,32 mm ID x 0,5 µm, 20-250 °C) von PerkinElmer (Shelton, USA). Die Auswertung der Chromatogramme wurde mittels der Software TurboMass Version 6.1.2 von PerkinElmer (Shelton, USA) durchgeführt.

Tab. 1: Einstellungsparameter für die HS-SPME-GC-MS-Analyse

SPME	
Faser	Carbon WR/PDMS - 95/10
Faser Konditionierung	250 °C
Prä-Konditionierung	10.00 min
Post-Konditionierung	1.00 min
Nadelspülfluss	0.8 bar
Proben-Inkubation	5.00 min. 50 °C
HS-Extraktion	45.00 min. 50 °C
Agitator	ein: 5 s, aus: 2 s
Desorption	10.00min. 250 °C
GC	
Säulenfluss	2 ml/min
Trägergas	Helium
Injektor	250 °C
Split	50 ml/min @1.00 min.
Gas Saver	20 ml/min @14.00 min.
Ofen Temperatur-Programm	40 °C/3.00 min. - 5 °C/min/175 °C/0.00 min. - 8 °C/min./200 °C/10.00 min.
MS	
Elektronenenergie	70 eV
Transferline	220 °C
Ionenquelle	200 °C
Solvent Delay	14.00 min.
Scan Modus	14.20 - 40.00 min.
Scan m/z	38-250 amu
Scan Time	0.2 s
Inter-Scan Delay	0.025 s

Modellversuch

Nach einem DoE Screening Design (2^n) (Tab. 2) mit den vier Parametern Temperatur, pH-Wert, SO_2 - und Ascorbinsäure-Konzentration, wurden zur Darstellung der Weiß- und der Rotwein-Modellweinsteinmatrix jeweils 16 Modellweine angesetzt ($2^4=16$). Die Modellweine enthielten 12 %vol. Ethanol. In diesen variieren jeweils zwei ausgewählte Stufen der Parameter, sodass jede mögliche Kombination einmal dargestellt wird. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen mit den mittleren

Werten der Konzentrationsstufen angesetzt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von drei Monaten wöchentlich mit oben genannter Methode (Tab. 1) gemessen. Hierfür wurden 5 ml der Probe in ein 20 ml-Headspace-Vial mit 1 g Natriumchlorid gegeben und vermischt und zur Gleichgewichtseinstellung vor der Messung für acht Stunden bei Raumtemperatur (22 °C) stehen gelassen.

Tab. 2: Design of Experiments Screening Design mit den vier Parametern Temperatur, pH-Wert, SO_2 - und Ascorbinsäure-Konzentration

	pH-Wert	Temperatur [°C]	Schwefeldioxid [mg/l]	Ascorbinsäure [mg/l]
Weiß-/Roséwein-Modellweinsteinmatrix				
1	3,00	12,0	25,0	125,0
2	3,50	12,0	25,0	125,0
3	3,00	30,0	25,0	125,0
4	3,50	30,0	25,0	125,0
5	3,00	12,0	50,0	125,0
6	3,50	12,0	50,0	125,0
7	3,00	30,0	50,0	125,0
8	3,50	30,0	50,0	125,0
9	3,00	12,0	25,0	250,0
10	3,50	12,0	25,0	250,0
11	3,00	30,0	25,0	250,0
12	3,50	30,0	25,0	250,0
13	3,00	12,0	50,0	250,0
14	3,50	12,0	50,0	250,0
15	3,00	30,0	50,0	250,0
16	3,50	30,0	50,0	250,0
17	3,25	21,0	37,5	187,5
18	3,25	21,0	37,5	187,5
Rotwein-Modellweinsteinmatrix				
19	3,50	12,0	25,0	125,0
20	4,20	12,0	25,0	125,0
21	3,50	30,0	25,0	125,0
22	4,20	30,0	25,0	125,0
23	3,50	12,0	50,0	125,0
24	4,20	12,0	50,0	125,0
25	3,50	30,0	50,0	125,0
26	4,20	30,0	50,0	125,0
27	3,50	12,0	25,0	250,0
28	4,20	12,0	25,0	250,0
29	3,50	30,0	25,0	250,0
30	4,20	30,0	25,0	250,0
31	3,50	12,0	50,0	250,0
32	4,20	12,0	50,0	250,0
33	3,50	30,0	50,0	250,0
34	4,20	30,0	50,0	250,0
35	3,85	21,0	37,5	187,5
36	3,85	21,0	37,5	187,5

Mittels der Chromatogramme aus dem Scan-Modus wurden die Ascorbinsäure-Abbauprodukte Ethyl-2-furoat, Furfural und 3-Hydroxy-2-pyron analysiert. Hierfür wurden die in Tab. 3 dargestellten m/z verwendet, die nach den Spektren (NIST Tandem Mass Spectral Library, Version 2.4, 25.03.2020, National Institute of Standards and Technology U.S. Department of Commerce) eindeutig für die Verbindungen sind. Aufgrund fehlender Referenzsubstanzen wurde mit den Peakflächenverhältnissen der Abbauprodukte gerechnet.

Tab. 3: Chromatographische und massenspektrometrische Charakteristika der Degradationsprodukte der Ascorbinsäure in der GC/MS-Analyse

Verbindung	m/z	Kovats-Index (polare Säule, Temperaturprogramm)	Retentionszeit [min]
Furfural	95 + 96	1425-1486	15,3
Ethyl-2-furoat	95 + 112 + 140	1612-1624	19,2
3-Hydroxy-2-pyron	55 + 84 + 112	1965-1997	27,1

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm XLSTAT 2023.1.1.1396 (Addinsoft, Paris, Frankreich).

Ergebnisse

Die Bildungskinetik der drei analysierten Abbauprodukte ist in der Abb. 3 dargestellt. Zunächst fällt auf, dass die Bildung aller drei Substanzen hauptsächlich temperaturabhängig ist. Die Modellweine, die bei der klassischen Wein-Lagertemperatur von 12 °C aufbewahrt wurden, bilden später und in deutlich geringerer Menge die entsprechenden Abbauprodukte. Die Bildungskinetik verläuft für die kühl gelagerten Proben für Ethyl-2-furoat und Furfural näherungsweise linear. Die Proben, die bei einer Temperatur von 30 °C gelagert worden sind und somit Extremsituationen während der Lagerung nachstellen, wie sie zum Beispiel auf Transportwegen erreicht werden könnten, verzeichnen eine deutlich schnellere Bildung der Abbauprodukte. Der Verlauf der Ethyl-2-furoat-Bildung ist exponentiell, die der anderen Verbindungen eher linear. Ab der Woche sieben bzw. für das 3-Hydroxy-2-pyron ab der Woche drei erfolgt nach diesem Zeitpunkt kein nennenswerter Anstieg mehr. Möglicherweise wurde bis zu diesem Zeitpunkt die gesamte Ascorbinsäure als Substrat der Verbindungen bereits vollständig aufgebraucht. Die Kontrollproben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, das heißt die Lagertemperatur, welche meistens im Verkauf und beim Verbraucher zu Hause erreicht wird, liegt im Verlauf zwischen den kalt- und warmgelagerten Proben.

Die Bildungskinetik ist vergleichbar zu den kaltgelagerten Proben, weshalb eine Lagertemperatur, die kleiner oder gleich der Raumtemperatur ist, offensichtlich langsamer zur Bildung von Abbauprodukten führt, als dies bei höheren Temperaturen der Fall ist. Außerdem fällt auf, dass die warmgelagerten Proben stärker verschieden große Mengen an Abbauprodukten bilden als die kühlgelagerten Proben.

Ein weiterer auffälliger Faktor, der einen sichtbaren Einfluss auf die Bildungskinetik der drei Verbindungen hat, ist der pH-Wert. Werden die Modellweinmatrices für Weiß- und Rotwein miteinander verglichen, zeigt sich, dass die Kurvenverläufe der Rotweinmatrix allgemein niedriger als die der Weißweinmatrix liegen. Folglich scheint ein hoher pH-Wert eine hemmende Wirkung auf die Bildung der Abbauprodukte zu haben. Da Ascorbinsäure jedoch eher bei Weinen mit niedrigem pH-Wert eingesetzt wird (Weiß-/Roséweine), kann hier ein deutlich stärkerer Abbau stattfinden.

Der Einfluss der SO₂-Konzentration ist für die Bildung des Ethyl-2-furoats offenbar eher zu vernachlässigen. Jeweils ähnliche Proben mit unterschiedlicher SO₂-Konzentration besitzen auch in ihrer Kinetik ähnliche Kurvenverläufe. Für Furfural

und für 3-Hydroxy-2-pyron gilt dies hingegen nicht. Furfural wird vermehrt bei einem höheren SO_2 -Gehalt gebildet und 3-Hydroxy-2-pyron bei einem niedrigeren Gehalt.

Die Ascorbinsäure selbst hat dabei einen positiven Einfluss auf die Bildung der Abbauprodukte. Dies hängt ursächlich damit zusammen, dass mehr Substrat vorliegt.

Darüber hinaus konnten auch sensorische und visuelle Veränderungen der Proben festgestellt werden. Ab der dritten Lagerwoche wurde bei einigen Proben ein süßlicher, an Karamell erinnernder Geruch wahrgenommen. Der Geruch ist vergleichbar mit der sensorischen Beschreibung der Ascorbinsäure-Abbauprodukte. Ob der Geruch dem Sotolon zuzuordnen ist oder den anderen drei beschriebenen Abbauprodukten, kann nicht

eindeutig bestätigt werden. Der Geruchsschwellenwert des Sotolons liegt bei $2 \mu\text{g/l}$ in wässriger Lösung mit 12 %vol. Ethanol (Pons et al., 2008) und ist deutlich niedriger als die der anderen drei Verbindungen, die mit Ausnahme des Furfural im Milligramm-Bereich liegen (Burdock, 2010; Shaw et al., 1970; Sun et al., 2018). Mit der Zugabe von 125 und 250 mg/l Ascorbinsäure zu den Modellweinproben ist es durchaus möglich, dass die genannten Schwellen erreicht werden können (Pons et al., 2015). Ob eine synergistische Wirkung der Verbindungen untereinander vorliegt, ist nicht bekannt. Weiterhin konnte eine Gelbfärbung der Probenlösungen festgestellt werden. Diese trat vor allem in Proben mit einem hohen pH-Wert und bei einer Lagertemperatur von 30°C auf. Die gelbliche Färbung kann vermutlich auf die Bildung von Furfural (Burdock, 2010) und DHA zurückgeführt werden (Teichmann und Ziebarth, 1966).

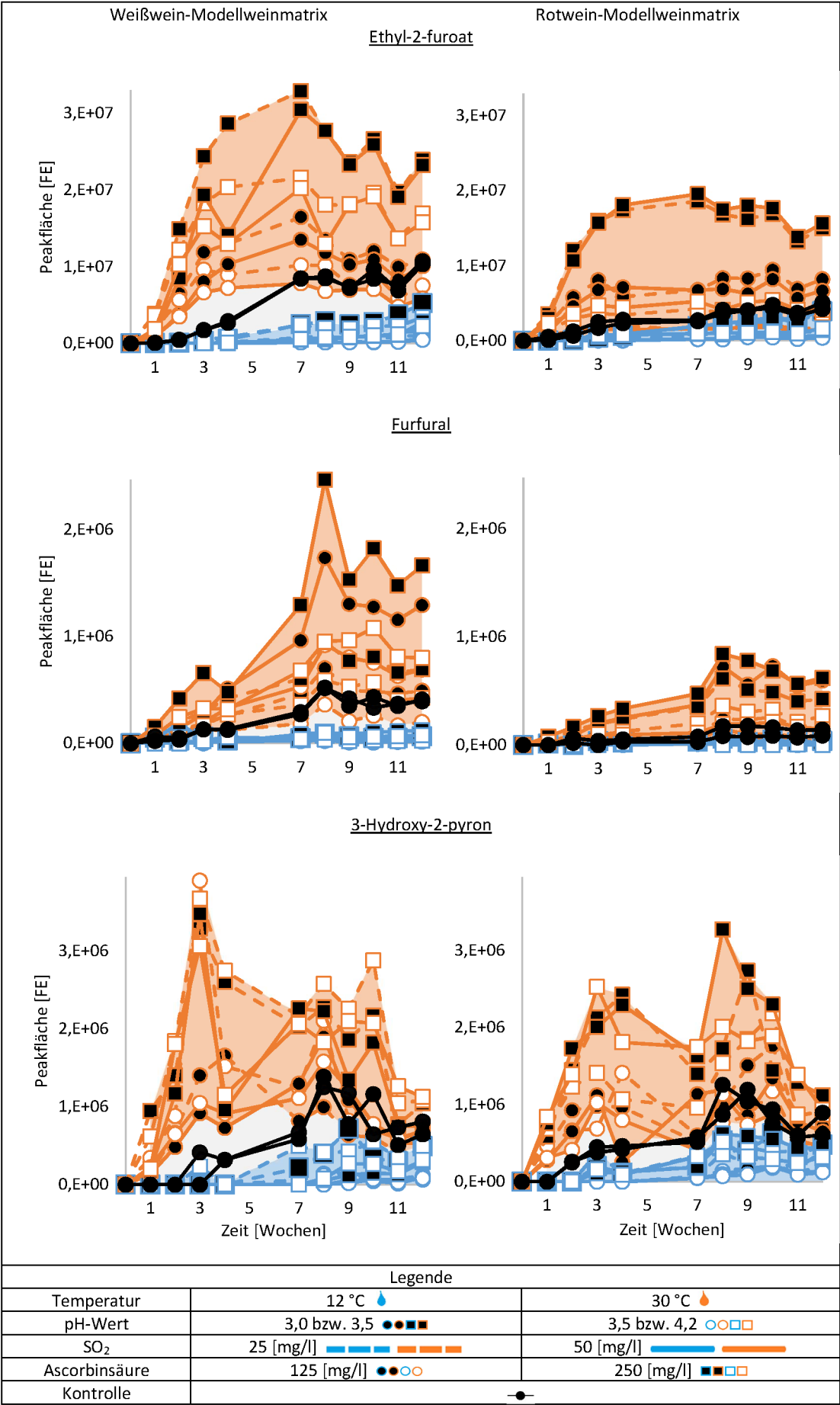


Abb. 3: Bildungskinetik der Ascorbinsäure-Abbauprodukte

In den Tab. 4 und 5 ist die statistische Auswertung aller Daten dargestellt. Ihr ist zu entnehmen, dass signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern und den Verbindungen vorliegen. Es ist hervorzuheben, dass die Temperatur auf alle drei Verbindungen und jeweils in beiden Matrices

den stärksten hochsignifikanten Einfluss hat. Daraus schließt sich der Einfluss des pH-Wertes und der Ascorbinsäure-Konzentration mit ungefähr gleichen Signifikanzniveaus an. Insgesamt weist die SO₂-Konzentration allgemein das geringste Signifikanzniveau auf.

Tab. 4: Statistische Datenauswertung nach einem Screening Design der Relevanz der vier Parameter auf die Bildung der Ascorbinsäure-Degradationsprodukte in den Weißwein-Modellwein-Lösungen nach acht Wochen

Weißwein					
Ethyl-2-furoat					
Source	DF	Sum of squares/Mean squares	F	Pr > F	p-values signification codes
pH	1,000	7,07E+13	16,247	0,010	*
[°C]	1,000	9,09E+14	208,860	<0,0001	***
SO ₂	1,000	1,42E+13	3,256	0,131	°
Ascorbinsäure	1,000	1,46E+14	33,538	0,002	**
Furfural					
pH	1,000	6,14E+11	11,405	0,020	*
[°C]	1,000	4,21E+12	78,233	0,000	***
SO ₂	1,000	7,97E+11	14,817	0,012	*
Ascorbinsäure	1,000	1,24E+11	2,302	0,190	°
3-Hydroxy-2-pyron					
pH	1,000	3,17E+10	0,351	0,579	°
[°C]	1,000	1,28E+13	141,556	<0,0001	***
SO ₂	1,000	1,15E+11	1,277	0,310	°
Ascorbinsäure	1,000	5,66E+11	6,274	0,054	.
Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1					

Tab. 5: Statistische Datenauswertung nach einem Screening Design der Relevanz der vier Parameter auf die Bildung der Ascorbinsäure-Degradationsprodukte in den Rotwein-Modellwein-Lösungen nach acht Wochen

Rotwein					
Ethyl-2-furoat					
Source	DF	Sum of squares/Mean squares	F	Pr > F	p-values signification codes
pH	1,000	1,11E+14	52,781	0,001	***
[°C]	1,000	1,70E+14	81,228	0,000	***
SO ₂	1,000	5,23E+10	0,025	0,881	°
Ascorbinsäure	1,000	4,91E+13	23,428	0,005	**
Furfural					
pH	1,000	2,11E+11	18,918	0,007	**
[°C]	1,000	5,67E+11	50,829	0,001	***
SO ₂	1,000	2,46E+10	2,205	0,198	°
Ascorbinsäure	1,000	5,05E+10	4,525	0,087	.
3-Hydroxy-2-pyron					
pH	1,000	3,26E+11	3,961	0,103	°
[°C]	1,000	6,15E+12	74,651	0,000	***
SO ₂	1,000	3,86E+11	4,684	0,083	.
Ascorbinsäure	1,000	2,11E+12	25,547	0,004	**
Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1					

In der Abb. 4 wird der prozentuale Beitrag der vier Faktoren an der Bildung der Ascorbinsäure-Abbauprodukte dargestellt, und es können die zuvor beschriebenen Abhängigkeiten und Signifikanzen bestätigt werden. Die Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit, die auch schon Velíšek et al., 1976, Yuan und Chen, 1998 und Izquierdo-Cañas et al., 2020 festgestellt haben, konnten ebenfalls beobachtet werden. Allgemein weisen Ethyl-2-furoat und Furfural größere Ähnlichkeiten zueinander auf. Aus der Abb. 4 geht zusätzlich hervor,

dass SO_2 auf die Bildung des 3-Hydroxy-2-pyrone einen deutlichen, wenn auch nicht statistisch signifikanten Einfluss hat (vgl. Tab. 4). Je geringer der SO_2 -Gehalt ist, desto mehr 3-Hydroxy-2-pyrone bildet sich. Hinzu kommt, dass dieser Einfluss nur bei niedrigeren pH-Werten vorliegt und bei höheren pH-Werten weitestgehend in den Hintergrund tritt, da weniger freies SO_2 vorliegt (Belitz et al., 2008). Die Bildung des 3-Hydroxy-2-pyrone ist damit ursächlich mit dem Vorliegen von molekularer SO_2 verbunden.

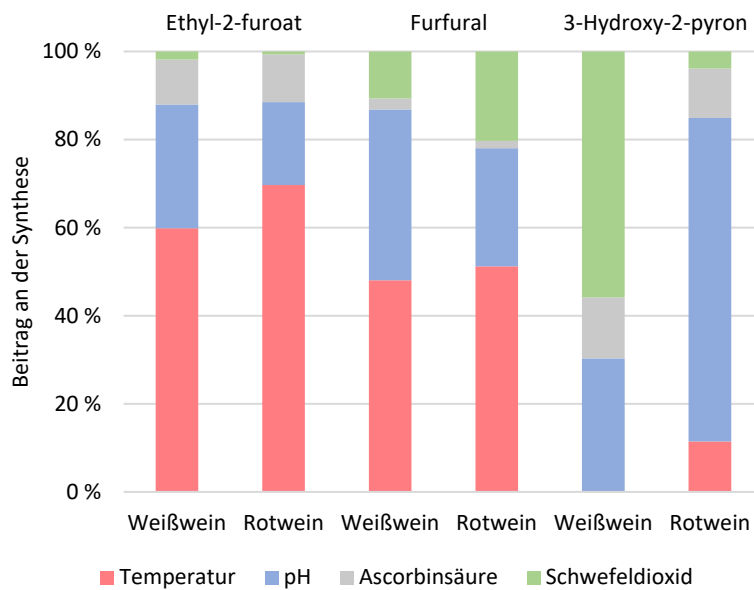


Abb. 4: Prozentualer Beitrag der vier Parameter auf die Bildung der Ascorbinsäure-Degradationsprodukte in den Modellwein-Lösungen für Weiß- und Rotwein-Modellweinmatrix nach acht Wochen, ausgewertet nach einem Screening Design

Diskussion

Die erläuterten Abhängigkeiten können nun in einen Zusammenhang mit den Reaktionsmechanismen gebracht werden. Mit Ausnahme des Furfural bilden sich die Abbauprodukte ausgehend von der DHA. Ihr Bildungsweg (Abb. 5) kann durch Licht, Sauerstoff, Metallionen und Temperatur beeinflusst werden. Die Proben wurden im Dunkeln in Weißglas gelagert, sodass sie nur während der Messzeiten Licht ausgesetzt wurden. Zum Ansetzen der Proben wurde doppelt entmineralisiertes Wasser verwendet, wodurch ein Eintrag von Metallionen nahezu ausgeschlossen ist. Das Schütteln vor jeder Probennahme und die wöchentliche Zunahme des Kopfraums im Probenkolben, sind für alle Proben gleich. Damit können diese Parameter

als Verursacher ziemlich sicher ausgeschlossen werden.

Folglich hat auf die Bildung von DHA insbesondere der Temperaturunterschied einen Einfluss. Die Reaktion zur DHA ist irreversibel, da kein Reagenz zur Regeneration dieser vorliegt (Njus et al., 2023). Weiterhin oxidiert DHA zur 2,3-Diketogulonsäure (Matissek, 2019; Richardson und Finley, 1985). Die von Sheraz et al., 2015 beschriebene katalysierende Wirkung eines pH-Wertes bei 4,0 auf die Bildung der DHA scheint hier keinen Einfluss zu haben, da die Modellweinproben mit einem niedrigeren pH-Wert schneller Abbauprodukte gebildet haben als die mit einem höheren pH-Wert.

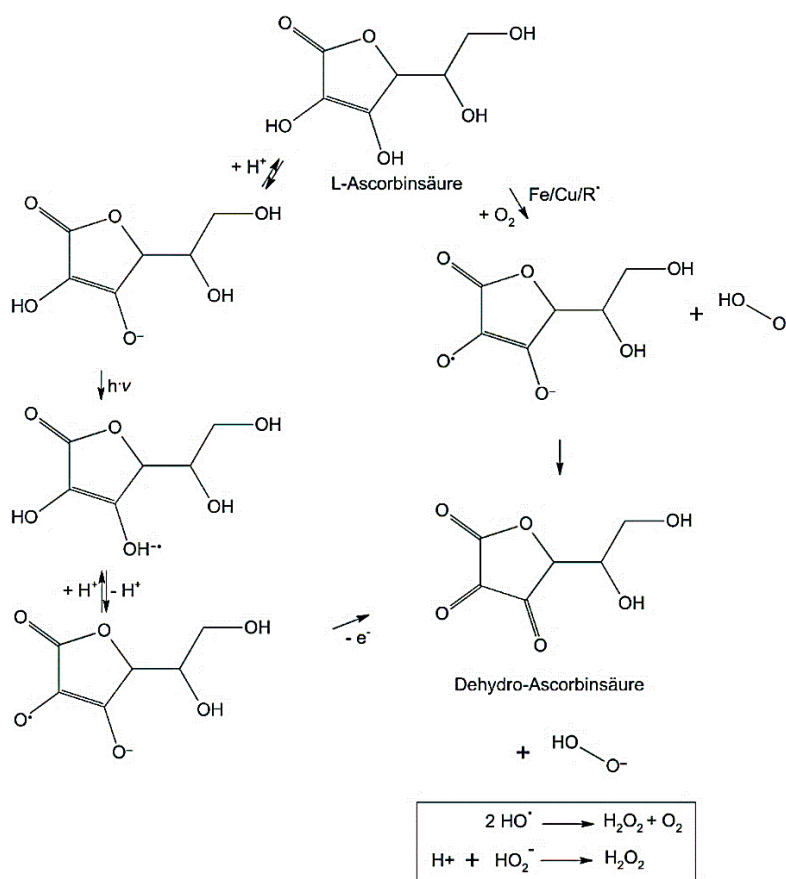


Abb. 5: Reaktionsmechanismus zur Bildung der DHA (Basak et al., 2023)

Ausgehend von der 2,3-Diketogulonsäure findet eine Decarboxylierung, eine Umlagerung und eine Kondensationsreaktion statt. Die gebildete 5-Hydroxy-2-oxo-pent-3-en-carboxylsäure reagiert durch eine 2,5-Cyclisierung und anschließender

Wasserabspaltung zur 2-Furancarboxylsäure oder durch eine 2,6-Cyclisierung, anschließender Wasserabspaltung und Umlagerung zum 3-Hydroxy-2-pyron (Abb. 6) (Basak et al., 2023; Yuan und Chen, 1998).

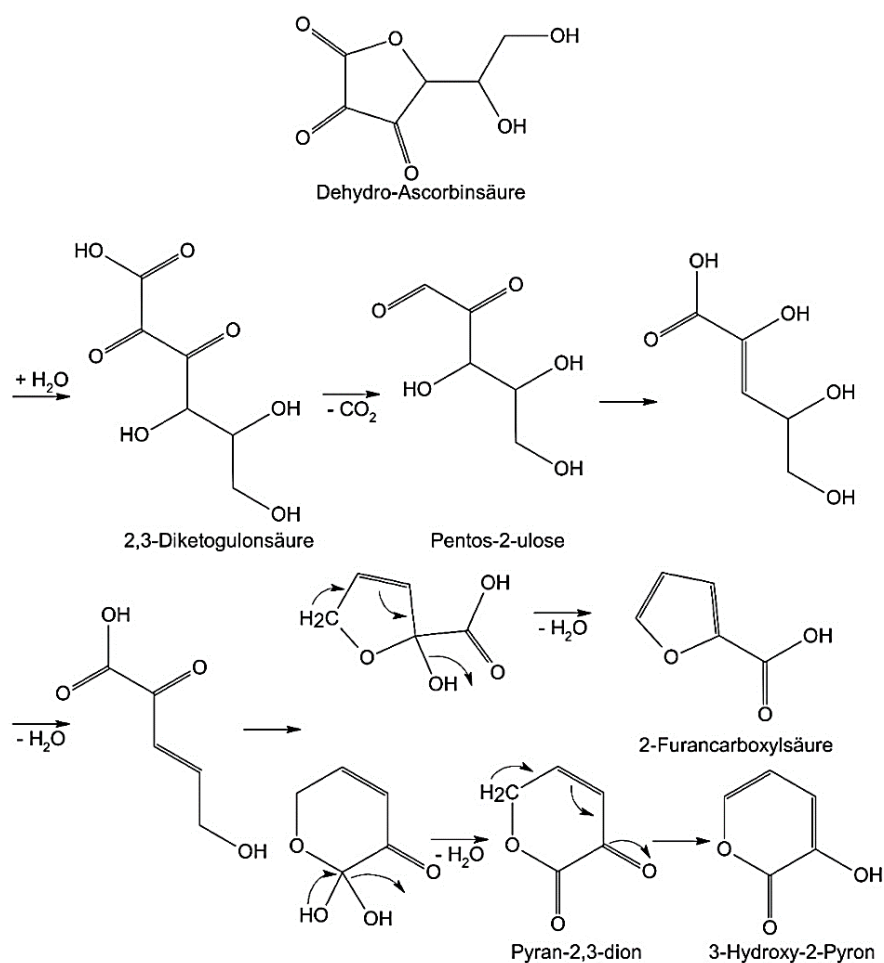


Abb. 6: Reaktionsmechanismus zur Bildung der Abbauprodukte 2-Furancarbonsäure und 3-Hydroxy-2-pyran ausgehend von der DHA (Basak, Shaik, & Chakraborty, 2023; Yuan & Chen, 1998)

Da in Wein Ethanol vorliegt, reagiert die 2-Furancarboxylsäure innerhalb einer säurekatalysierten Fischer-Veresterung weiter zum Ethyl-2-furoat (Abb. 7) (Flavouring Group, 2005; Pisarnitskii, 2001).

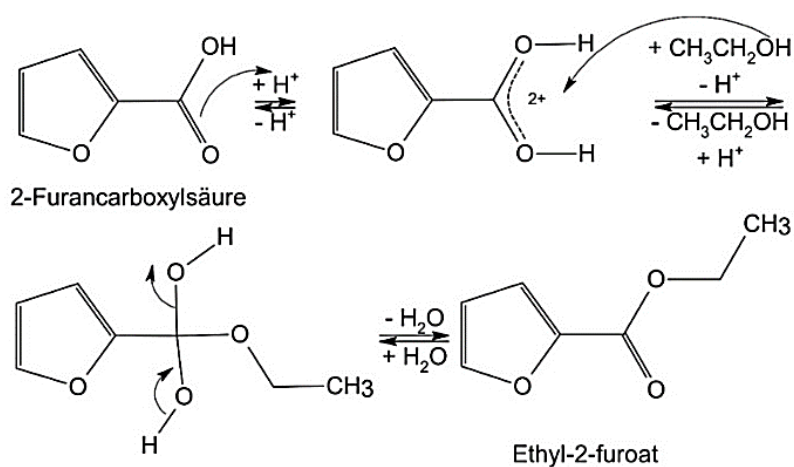


Abb. 7: Säurekatalysierte Fischer-Veresterung der 2-Furancarboxylsäure zu Ethyl-2-furoat mit Ethanol

Wird der Reaktionsmechanismus des Ethyl-2-furoats betrachtet, haben vor allem die Temperatur und der pH-Wert einen großen Einfluss. Beide Parameter verschieben während der Veresterung das Gleichgewicht auf die Seite des Esters. Die SO_2 -Konzentration hat insbesondere einen Einfluss auf den Oxidationsschritt zu Beginn zur DHA und weiter zur 2,3-Diketogulonsäure. Auf diese Reaktionen wirkt sie inhibierend, wodurch sich in den Modellweinproben mit einer niedrigeren SO_2 -Konzentration, aber sonst gleichen Parametern, kleinere Mengen an Abbauprodukten gebildet haben. Da die Veresterung reversibel ist, kann dies zu einem Abbau am Ende der Versuchszeit geführt haben.

Obwohl sich die Bildung des 3-Hydroxy-2-pyrone erst am Ende des Mechanismus von der Bildung des Ethyl-2-furoats unterscheidet, sind die Kurvenverläufe und der Beitrag der Parameter an der Bildung verschieden. Der Abb. 7 ist zu entnehmen, dass bei niedrigeren pH-Werten, die in den Weißwein-Modellweinproben vorlagen, die Temperatur einen kleineren Beitrag an der Bildung des 3-Hydroxy-2-pyrone hat, jedoch der Einfluss des SO_2 verstärkt wird. Bei niedrigeren pH-Werten können weniger Bisulfit-Addukte gebildet werden, wodurch mehr 3-Hydroxy-2-pyron entstehen kann. Besonders die drei Zwischenprodukte, bevor sich 3-Hydroxy-2-pyron bildet, weisen olefinische Doppelbindungen auf, mit denen SO_2

Addukte bilden kann (Nursten, 2005). Zuletzt ist der Pyran-Ring weniger stabil, wodurch der Kurvenverlauf in den letzten vier Wochen weniger stabil ist als der des Ethyl-2-furoats.

Furfural kann als einzige Verbindung anaerob direkt aus der Ascorbinsäure gebildet werden. In der Abb. 8 sind die Bildungswege des Furfural dargestellt. Es wird deutlich, dass eine hohe Temperatur die einzelnen Kondensationsreaktionen katalysiert und ein niedriger pH-Wert sich positiv auswirkt. Auch hier hat SO_2 einen Einfluss auf die Bildung, indem es Addukte mit den Zwischenprodukten bilden kann. Hierbei ist zu unterscheiden, dass sich mit Furfural nur eine reversible Bindung zu SO_2 bilden kann, sich hingegen mit Zwischenprodukten des Bildungsweges durchaus auch irreversible Addukte bilden können (Adams, 1997 zitiert nach Wallington et al., 2013; Wedzicha, 1984 zitiert nach Wallington et al., 2013). Zudem ist das Furfural-Bisulfit-Addukt mit zunehmender Temperatur weniger stabil, wodurch mehr Furfural in erwärmten Proben vorliegt (Makarov et al., 1997; Wallington et al., 2013). Dass Wärme zu mehr Furfural führt, kann bestätigt werden. Zwar zeigt die Auswertung nach dem DoE Screening Design eine SO_2 -Abhängigkeit; werden jedoch die Graphen betrachtet, ergibt sich, dass höhere SO_2 -Konzentrationen nicht hemmender wirken. Diese Wirkung tritt gegenüber des Einflusses der Temperatur und des pH-Werts in den Hintergrund.

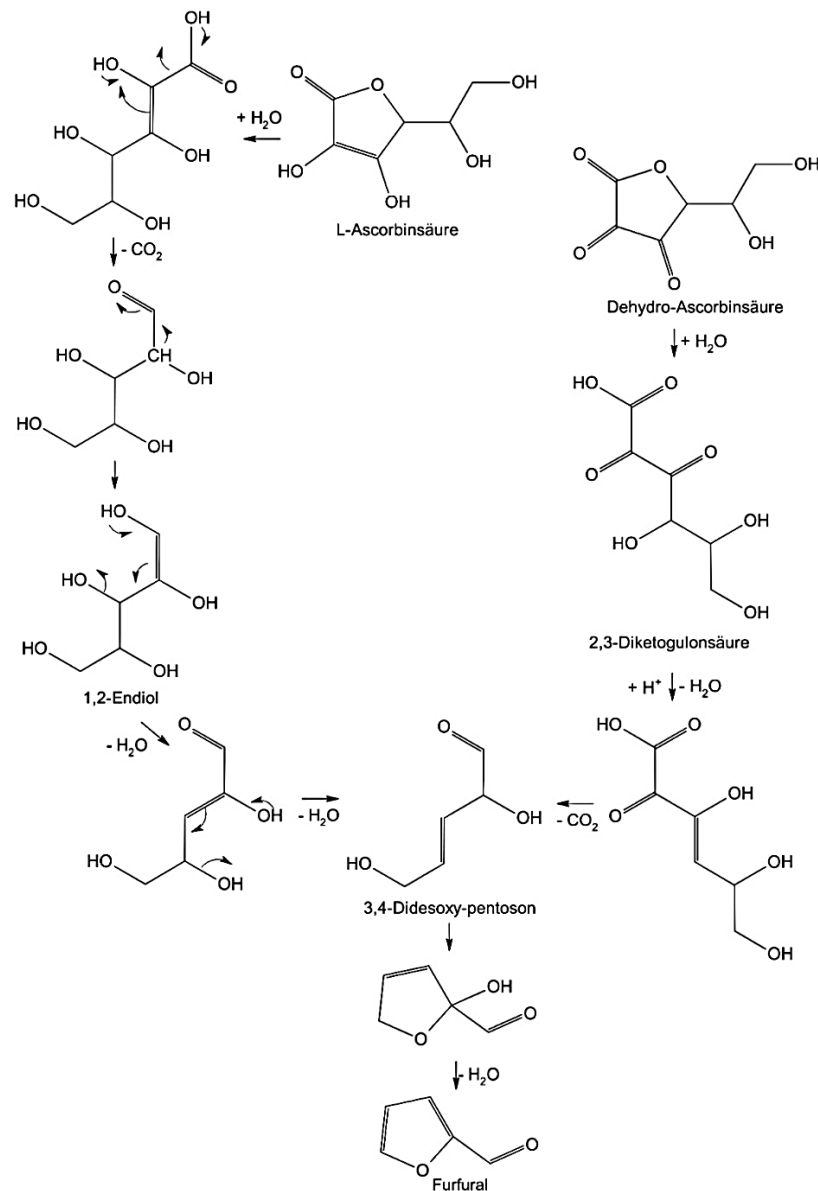


Abb. 8: Ascorbinsäure-Degradationsweg zu Furfural (Basak et al., 2023; Kurata und Sakurai, 1967)

Zusammenfassung

Die vorgestellten Ergebnisse und Betrachtungen zeigen, dass der Einsatz von Ascorbinsäure im Wein nicht ganz unkritisch zu sehen ist. Die drei untersuchten Abbauprodukte weisen in ihrer Bildung eine deutliche Abhängigkeit von verschiedenen Parametern auf. So kann deren Bildung in Modellwein durch eine kühle Lagerung bei 12 °C stark minimiert werden. Ein hoher pH-Wert wirkt ebenfalls hemmend und eine SO₂-Zugabe verhindert die Bildung des 3-Hydroxy-2-pyron zusätzlich. Da Ascorbinsäure jedoch in der Regel bei Weinen mit niedrigem pH-Wert zum Einsatz kommt (Weiß-

/Roséweine), besteht hier offenbar ein größeres Potential für die Bildung der vorgestellten Abbauprodukte. Bei diesen Weinen sollte folglich besonders auf die Einhaltung einer niedrigen Lagertemperatur geachtet werden, um die Bildung der aromaaktiven Abbauprodukte nicht zu forcieren. Zwar handelt es sich bei den vorgestellten Ergebnissen nur um erste Untersuchungen in Modellwein-Lösungen; die Ergebnisse zeigen jedoch erste Problemfelder auf, die bei der Verwendung von Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel im Wein dringend Beachtung finden sollten.

Literatur

- Basak, S., Shaik, L., Chakraborty, S.** 2023: Effect of ultraviolet and pulsed light treatments on ascorbic acid content in fruit juices-A review of the degradation mechanism. *Food Chemistry Advances* 2: 100333.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P.** 2008: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 6. Aufl.
- Binnewies, M., Finze, M., Jäckel, M., Schmidt, P., Willner, H., Rayner-Canham, G.** 2016: *Allgemeine und Anorganische Chemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Burdock, G. A.** 2010: *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. London: CRC Press Taylor & Francis Group, 6th ed.
- Danilewicz, J. C., Seecombe, J. T., Whelan, J.** 2008: Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 59 (2): 128–136.
- Danilewicz, J. C.** 2003: Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper. *Am J Enol Vitic.* 54 (2): 73–85.
- Danilewicz, J. C., Wallbridge, P. J.** 2010: Further Studies on the Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfite in Wine. *Am J Enol Vitic.* 61 (2): 166–175.
- Flavouring Group** 2005: Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Flavouring Group Evaluation 13 (FGE.13); Furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents: Furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14. *EFSA Journal* 3 (7): 215.
- Funk, E. R.** 2003: Der Bockser - ein abstoßender Weinfehler - Ursache, Vermeidung und Beseitigung. <https://lvwo.landwirtschaft-bw.de/Lde/Startseite/Fachinformationen/Der+Boeckser+ein+abstossender+Weinfehler>, (27.02.2024).
- Heimann, W., Wisser, K.** 1962: Über das Redox-Verhalten der Ascorbinsäure. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 653 (1): 23–32.
- Izquierdo-Cañas, P. M., González Viñas, M. A., Mena-Morales, A., Pérez Navarro, J., García-Romero, E., Marchante-Cuevas, L. et al.** 2020: Effect of fermentation temperature on volatile compounds of Petit Verdot red wines from the Spanish region of La Mancha (central-southeastern Spain). *Eur Food Res Technol* 246 (6): 1153–1165.
- König, T., Gutsche, B., Hartl, M., Hübscher, R., Schreier, P., Schwab, W.** 1999: 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (Sotolon) causing an off-flavor: elucidation of its formation pathways during storage of citrus soft drinks. *J. Agric. Food Chem.* 47 (8): 3288–3291.
- Kurata, T., Sakurai, Y.** 1967: Degradation of L-Ascorbic Acid and Mechanism of Nonenzymic Browning Reaction Part II.* Non-oxidative Degradation of L-Ascorbic Acid Including the Formation of 3-Deoxy-L-pentosone. *Agricultural and Biological Chemistry* 31 (2): 170–176.
- Margalit, Y.** 2012: *Concepts in wine chemistry*. San Francisco: Wine Appreciation Guild, 3rd ed.
- Matissek, R.** 2019: *Lebensmittelchemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 9. Aufl.
- Njus, D., Asmaro, K., Li, G., Palomino, E.** 2023: Redox cycling of quinones reduced by ascorbic acid. *Chemico-biological interactions* 373: 110397.
- Nursten, H.** 2005: *The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1st ed.

- Pisarnitskii, A. F.** 2001: Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 37 (6): 552–560.
- Pons, A., Nikolantonaki, M., Lavigne, V., Shinoda, K., Dubourdieu, D., Darriet, P.** 2015: New Insights into Intrinsic and Extrinsic Factors Triggering Premature Aging in White Wines. *Advances in Wine Research* 1203: 229–251.
- Pons, A., Lavigne, V., Landais, Y., Darriet, P., Dubourdieu, D.** 2008: Distribution and Organoleptic Impact of Sotolon Enantiomers in Dry White Wines. *J. Agric. Food Chem.* 56 (5): 1606–1610.
- Pons, A., Lavigne, V., Landais, Y., Darriet, P. und Dubourdieu, D.** 2010: Identification of a sotolon pathway in dry white wines. *J. Agric. Food Chem.* 58 (12): 7273–7279.
- Pour Nikfardjam, M.** 2010: Eisen und Kupfer: Starke Oxidantien im Wein. *Das deutsche Weinmagazin* 25: 32–34.
- Richardson, T., Finley, J. W.** 1985: Chemical Changes in Food during Processing. Basic Symposium Series. Boston, MA: Springer US.
- Schneider, V.** 2013: Bedeutung von Sauerstoff für die Bildung von UTA. *Die Winzer-Zeitschrift* 11: 32–33.
- Shaw, P. E., Tatum, J. H., Kew, T. J., Wagner, C. J., Berry, R. E.** 1970: Taste evaluation of nonenzymic browning compounds from orange powder and use of inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 18 (3): 343–345.
- Sheraz, M. A., Khan, M. F., Ahmed, S., Kazi, S. H., Ahmad, I.** 2015: Stability and Stabilization of Ascorbic Acid A Review. *Household and Personal Care Today* 10 (3): 22–25.
- Sun, J., Li, Q., Luo, S., Zhang, J., Huang, M., Chen, F. et al.** 2018: Characterization of key aroma compounds in Meilanchun sesame flavor style baijiu by application of aroma extract dilution analysis, quantitative measurements, aroma recombination, and omission/addition experiments. *RSC advances* 8 (42): 23757–23767.
- Teichmann, B., Ziebarth, D.** 1966: Zur kryoskopischen Molekulargewichtsbestimmung und Struktur von Dehydroascorbinsäure. *J. Prakt. Chem.* 33 (3-4): 124–129.
- Velí'sek, J., Davídek, J., Kubelka, V., Zelinková, Z., Pokorný, J.** 1976: Volatile degradation products of l-dehydroascorbic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 162 (3): 285–290.
- Wallington, N., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Barril, C., Scollary, G. R.** 2013: The decay of ascorbic acid in a model wine system at low oxygen concentration. *Food Chemistry* 141 (3): 3139–3146.
- Yuan, J.-P., Chen, F.** 1998: Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* 46 (12): 5078–5082.

Sekundärliteratur

- Adams, J. B.** 1997: Food additive-additive interactions involving sulphur dioxide and ascorbic and nitrous acids: a review. *Food Chemistry* 59 (3): 401–409.
- Makarov, S. V., Sarur, I., Budanov, V. V.** 1997: The thermodynamic characteristics of the reaction of furfural with sodium bisulfite in aqueous solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry* 71: 1219–1221.
- Wedzicha, B. L.** 1984: Chemistry of sulphur dioxide in foods. London: Elsevier Applied Science Publ.

Eingelangt am 8. März 2024