

trans,trans-2,4-Hexadiensäureanhydrid: **Synthese, Reaktionen und mikrobiologische Wirksamkeit**

Vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)
der Bergischen Universität Wuppertal
genehmigte Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
-Doktor der Naturwissenschaften-
(Dr. rer. nat.)



vorgelegt von
Janine Bursa
aus Schwelm

Wuppertal, Juni 2012

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20120713-123326-0

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:468-20120713-123326-0>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit
von Januar 2010 bis Juni 2012
auf Anregung von Herrn Dr. Erasmus Vogl
im Arbeitskreis Organische Chemie
der Bergischen Universität Wuppertal
unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Hans-Josef Altenbach

Die in dieser Arbeit beschriebene Forschung
wurde finanziert von der **LANXESS Deutschland GmbH**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig im Arbeitskreis Organische Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Altenbach durchgeführt und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, Juni 2012

(Janine Bursa)

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Josef Altenbach für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe der organischen Chemie, die Unterstützung bei dem gesamten Projekt und für die stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Frau Dr. Helga Mölleken möchte ich mich herzlich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit bedanken.

Frau Schneidereit danke ich für die Unterstützung bei Anträgen, Rechenspielen und für ein jederzeit freundliches Wort.

Herrn Ingo Broda und Herrn Dr. Erasmus Vogl möchte ich für die interessante Themenstellung und das in mich gesetzte Vertrauen, sowie die finanzielle Unterstützung durch die Firma LANXESS danken.

Bei Herrn Dr. Edwin Ritzer bedanke ich mich sehr für die enge Zusammenarbeit im Projekt, sowie die weitergehende fachliche Betreuung und viele Anregungen im Verlauf der Arbeit.

Dr. Marcus Taupp danke ich herzlich für die fachlichen Diskussionen und das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei Herrn Riaz Musaheb möchte ich mich für die Anmerkungen zum Abstract und Tipps beim Übersetzen herzlich bedanken.

Ein weiterer Dank gilt dem Velcorin-Laborteam, welches durch die fröhliche, engagierte und geduldige Mitarbeit im Labor einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Auch Herrn Dr. Hermann Uhr, Herrn Jürgen Drinda und Frau Elke Büchel möchte ich für die umfassende Unterstützung im Labor, bei den ersten HPLC-Versuchen und der Darstellung der Lagerstabilitätsproben danken.

Herrn Dr. Robert Markert und Herrn Dr. Ralf Krahwinkel danke ich für die Durchführung der Phosgenierversuche.

Herrn Friedrich-Wilhelm Witt und Herrn Raimund Slabon gebührt mein herzlicher Dank für die Vermittlung dieses Projektes und die Unterstützung bei fachlichen Fragen aller Art.

Meinen Eltern und meiner Familie gilt mein größter Dank für alle Unterstützung durch mein gesamtes Studium hindurch und natürlich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Abstract

The work is concerned with the development of trans,trans-2,4-Hexadienoic acid anhydride (Sorbic anhydride) as a preservative for beverages. The studies were divided into three main areas.

The first aim was to develop a synthesis of Sorbic anhydride that could be scaled up to an industrial scale. This could be achieved by various methods with good yields and good purity of Sorbic anhydride. It was produced on a large scale from the synthesis with phosgene, followed by a washing process. After this the phases were separated with the anhydride being distilled to a high degree of purity. Pellets were then produced from the resulting melt.

The second aim was to analyze the most important physical properties and the chemical behaviour of Sorbic anhydride. Due to the hydrolysis time of the anhydride it can only be used in the beverage industry with quarantine periods exceeding 24 hours.

Sorbic anhydride is no longer present in the drink after sufficiently long hydrolysis time. That means, the consumer does not become in contact with the preservative and as a further advantage, the Sorbic acid, which is produced by the hydrolysis, has a persistent effect and protects the beverage against recontamination.

And the third aim was to study the microbiological efficacy in detail. It was shown by the different experiments, that Sorbic acid has an efficacy, up to five times higher than the efficacy of Potassium sorbate. The mode of action has yet to be clarified. Therefore, further microbiological experiments can contribute to a detailed understanding.

In addition to these aims, side reactions were not observed with Sorbic anhydride or Sorbic acid and the ingredients in the non-alcoholic drinks under 'normal' storage conditions. Only, at high temperatures and with large amounts of the reaction partner, that there could be seen the formation of Sorbic amide. This low reactivity of the anhydride is an advantage for the use in the beverage industry as a preservative.

But, a side reaction could be seen in alcoholic beverages with Sorbic acid. These side reaction products (Sorbic acid esters) have to be analyzed for their toxicological hazards before use in such beverages.

Furthermore other applications and formulations were investigated as well as the packaging of Sorbic anhydride. Since both, the water solubility and the low melting point are a challenge for the application of the preservative, research is required in these areas.

The health hazards of the substance and the technological need have to be proved for the authorization process for Sorbic anhydride as a preservative for drinks. Therefore, various toxicological studies and detailed analysis have to be carried out.

In summary, it can be concluded, that Sorbic anhydride can be used as a preservative for drinks, according to the existing results.

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung und theoretische Grundlagen | 1 |
| 1.1 Konservierung von Lebensmitteln | 1 |
| 1.2 Konservierungsmethoden | 2 |
| 1.2.1 Physikalische Konservierungsmethoden | 2 |
| 1.2.2 Biologische Konservierungsmethoden | 5 |
| 1.2.3 Chemische Konservierungsmethoden | 6 |
| 1.3 trans,trans-2,4-Hexadiensäure | 8 |
| 1.4 trans,trans-2,4-Hexadiensäureanhydrid | 10 |
| 1.5 Mikrobieller Verderb in der Getränkeindustrie | 11 |
| 2. Problemstellung und Zielsetzung | 13 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion | 15 |
| 3.1 Synthese von Anhydriden | 15 |
| 3.2 Synthese von trans,trans-2,4-Hexadiensäureanhydrid | 17 |
| 3.2.1 Wasserentzug der Sorbinsäure | 17 |
| 3.2.2 Klassische Synthese mit Hilfe von Säurechlorid | 19 |
| 3.2.3 Synthese mit Dicyclohexylcarbodiimid | 26 |
| 3.2.4 „Up scaling“ für den Produktionsmaßstab | 27 |
| 3.3 Charakterisierung und Stoffeigenschaften von Sorbinsäureanhydrid | 28 |
| 3.3.1 Stoffeigenschaften und Spektren von Sorbinsäureanhydrid | 28 |
| 3.3.2 Formulierung von Sorbinsäureanhydrid | 36 |
| 3.3.3 Stabilität von Sorbinsäureanhydrid | 39 |
| 3.3.4 Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid | 43 |
| 3.3.5 Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid | 46 |
| 3.4 Mikrobiologische Wirksamkeit | 57 |
| 3.4.1 Verderb von Getränken durch Mikroorganismen | 57 |
| 3.4.2 Wirkmechanismus von Sorbinsäure und Sorbinsäureanhydrid | 58 |
| 3.4.3 Wirkung von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Schimmelpilzen im Getränk | 59 |
| 3.4.4 Wirkung von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Hefen im Getränk | 63 |
| 3.4.5 Wirkung von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Bakterien im Getränk | 65 |
| 3.5 Toxizität von Sorbinsäure und Sorbinsäureanhydrid | 68 |
| 3.6 Anwendungsmöglichkeiten | 69 |
| 3.7 Nebenreaktionen mit Getränkeinhaltsstoffen | 70 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.8 | Sensorische Tests | 73 |
| 3.8.1 | Einführung in der Sensorik | 73 |
| 3.8.2 | Sensorische Untersuchungen an Sorbinsäureanhydrid | 74 |
| 4. | Zusammenfassung | 85 |
| 5. | Experimenteller Teil | 87 |
| 5.1 | Synthesen von Sorbinsäureanhydrid | 87 |
| 5.1.1 | Wasserentzug der Sorbinsäure | 87 |
| 5.1.2 | Klassische Synthese über das Sorbinsäurechlorid | 87 |
| 5.1.3 | Synthese mit Diphenylchlorophosphat | 88 |
| 5.1.4 | Synthese mit Dicyclohexylcarbodiimid | 89 |
| 5.2 | Methoden | 90 |
| 5.2.1 | HPLC-Methode, Gerät 1 | 90 |
| 5.2.2 | HPLC-Methode, Gerät 2 | 91 |
| 5.2.3 | HPLC-Methode, Gerät 3 | 92 |
| 5.2.4 | IR-Methode | 93 |
| 5.2.5 | MS-Methode | 93 |
| 5.2.6 | ¹ H-NMR-Methode | 93 |
| 5.2.7 | GC-Methode | 94 |
| 5.2.8 | MALDI-Methode | 95 |
| 5.2.9 | weitere Geräte | 96 |
| 5.3 | Untersuchung der mikrobiologischen Wirksamkeit | 97 |
| 6. | Anhang | 98 |
| 6.1 | Ergänzende Abbildungen und Tabellen | 98 |
| 6.2 | Abkürzungsverzeichnis | 128 |
| 6.3 | Tabellenverzeichnis | 130 |
| 6.4 | Abbildungsverzeichnis | 132 |
| 6.5 | Literaturverzeichnis | 134 |

1. Einleitung und theoretische Grundlagen

1.1 Konservierung von Lebensmitteln

Die Art und Weise der Lebensmittelerzeugung und –Verarbeitung erfuhr in den letzten 150 Jahren einen enormen Wandel. Nahrungsmittel werden durch die Weiterentwicklung der Lebensmittelproduktion großindustriell hergestellt. Die Zahl der verarbeiteten Lebensmittel nimmt zu, die Nachfrage nach unverarbeiteten Produkten sinkt kontinuierlich. Das liegt sowohl an soziokulturellen als auch an demografischen Faktoren. Zu diesen gehören beispielsweise die Zunahme der Einpersonenhaushalte oder die steigende berufliche Belastung. Auch für Lebensmittelproduzenten bedeutet dies eine enorme Veränderung^[1]. Immer weniger Hersteller erzeugen Lebensmittel, Lieferwege werden länger, viele Lebensmittel werden auf Vorrat gehalten, Obst und Gemüse werden saisonunabhängig produziert. Durch die Globalisierung werden Spezialitäten und exotische Nahrungsmittel vergleichsweise preiswert angeboten. Auch die Produktpalette ist vielfältiger geworden^[2].

Anhand der aufgezählten Punkte wird deutlich, dass sich die Anforderungen an ein Lebensmittel und dessen Haltbarkeit, ob verarbeitet oder nicht, verändert haben. Lebensmittel sollen nicht mehr „irgendwie“ haltbar bleiben, sondern es sollen Inhaltsstoffe wie Vitamine erhalten bleiben, Geschmack und Nährwert sich nicht verändern^[3].

Wie maximiert die Lebensmittelindustrie die Haltbarkeit eines Lebensmittels heutzutage und welche Faktoren werden dabei besonders beachtet? Im Wesentlichen gibt es drei Punkte, welche die Haltbarkeit eines Lebensmittels bedingen. Dies sind die An- bzw. Abwesenheit von Mikroorganismen (MIO), die Aktivität von Enzymen und die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff und Wasser. Ziel der Konservierung ist demnach die Kontrolle von Mikroorganismen, die Inaktivität von Enzymen oder die Abwesenheit von Sauerstoff und Wasser zu gewährleisten.

Um Mikroorganismen unschädlich zu machen können vier verschiedene Strategien verfolgt werden. Der Schadorganismus kann vollständig abgetötet werden, das Wachstum kann durch Grundlagenentzug gehemmt werden, der Schadorganismus kann durch ein Konservierungsmittel gehemmt werden oder verschiedene Inhaltsstoffe des Lebensmittels werden aufkonzentriert und dadurch das Wachstum des Schadorganismus verhindert^[4]. Um die Enzymaktivität herabzusetzen und somit verschiedenste Reaktionen zu verlangsamen, ist es am einfachsten das Lebensmittel zu trocknen, zu kühlen oder einzufrieren. Durch Erhitzen werden Enzyme zerstört, allerdings verändern sich dabei ebenfalls meist Geschmack, Konsistenz

und Aussehen der Lebensmittel ^[5]. Um schließlich den Wasser- und Sauerstoffgehalt herabzusetzen, können mehrere Möglichkeiten auch bei der Verpackung, genutzt werden ^[6].

Die verschiedenen Möglichkeiten der Lebensmittelkonservierung werden im folgenden Kapitel besprochen, sie werden unterteilt in physikalische, biologische und chemische Methoden. Aktuell wird jedes der Verfahren industriell angewendet.

1.2 Konservierungsmethoden ^[7]

1.2.1 Physikalische Konservierungsmethoden

Es gibt verschiedene Verfahren zur physikalischen Konservierung von Lebensmitteln, diese lassen sich gut miteinander und mit weiteren Methoden kombinieren ^[4].

Hitze-Behandlung

Das primäre Ziel der Hitzebehandlung ist das Abtöten der Mikroorganismen und die Garantie der Keimfreiheit. Durch Hitzeeinwirkung werden Proteine sowohl in Mikroorganismen als auch in Lebensmitteln denaturiert ^[8]. Dies führt zum Absterben der Mikroorganismen und mancher Sporen bei Temperaturen $> 120\text{ °C}$ und zur Enzym- und Proteindenaturierung ab Temperaturen um 60 °C . Dabei werden die Proteine besser verdaulich. Veränderungen in Farbe, Geschmack und Vitamingehalten der Lebensmittel müssen allerdings in Kauf genommen werden. Zur direkten Hitze-Behandlung werden Pasteurisations- und Sterilisationsmethoden angewendet. Diese unterscheiden sich in Dauer und Temperaturniveau. Aus der folgenden Tabelle 1 geht hervor, welche Bedingungen zum Beispiel für die Hitzebehandlung von Milch gelten.

Tabelle 1: Hitzebehandlung von Milch

| <i> Methode </i> | <i> Temperatur </i> | <i> Zeit </i> |
|-----------------------------|---------------------|---------------|
| Kurzzeiterhitzung | 72 – 75 °C | 30 – 40 s |
| spezielle Kurzzeiterhitzung | 123 – 127 °C | 1 – 5 s |
| Hoherhitzung | 85 °C | mind. 1 min. |
| Ultrahoherhitzung | 135 – 155 °C | 2 – 10 s |
| Sterilisierung | 112 – 120 °C | 20 – 40 min. |
| Dauererhitzung | 62 – 65 °C | 30 min. |

Eine Hitzebehandlung von Säften zur Pasteurisierung wird meist als Hochtemperatur-Kurzzeiterhitzung (82-85 °C, 10-15 s) durchgeführt, um sämtliche Enzymaktivitäten zu unterbinden. Die kurzzeitige Erhitzung schädigt hingegen nicht die aromagebenden Bestandteile eines Saftes.

Kälte-Lagerung

Es gibt zwei Arten der Kältelagerung: die Kühllagerung und die Tiefgefrierlagerung. Beide verlängern die Haltbarkeit eines Lebensmittels, indem biologische und chemische Prozesse verzögert werden. Beide Methoden können nur wenige Mikroorganismen abtöten und noch weniger Enzymreaktionen vollständig hindern.

Bei der Kühllagerung werden Lebensmittel bei 0 – 6 °C aufbewahrt. Die optimale Lagertemperatur ist für jedes Lebensmittel individuell einzustellen, dadurch können Lagerzeiten von einigen Tagen bis zu mehreren Monaten erzielt werden. Die Lagerung beim Tiefgefrieren geschieht unterhalb von -18 °C, wobei das Gefriergut zunächst auf circa 0 °C abgekühlt wird und dann bei bis zu -50 °C gefroren wird. Durch das Gefrieren von Wasser sind nicht alle Lebensmittel zur Tiefkühlung geeignet. Beim Einfrieren können strukturelle Veränderungen irreversibel auftreten. Dies ist etwa bei Käse der Fall, weshalb Käse nicht unterhalb des Gefrierpunktes gelagert werden soll.

Die Kombination von Kälte- und Hitzebehandlung ergibt sich beim Blanchieren von Gemüse, welches sofort nach dem kurzzeitigen Erhitzen mit Eiswasser gekühlt und dann eingefroren wird. Das Blanchieren dient in erster Linie dazu, Enzyme zu deaktivieren. Dadurch werden Veränderungen, wie enzymatische Bräunung oder der Abbau wichtiger Inhalts- und Geschmacksstoffe verhindert. Zusätzlich wird eine Lockerung der Zellstruktur, durch Lösung oder Abbau von Pektinen erzielt. Die Keimbelastung wird reduziert und unerwünschte Geschmacksstoffe können entfernt werden. Das Einfrieren verzögert oder inhibiert weitere Reaktionen. Nach dem Auftauen können blanchierte Gemüsesorten nach vorsichtigem Aufwärmen sofort verzehrt werden.

Wasserentzug, Trocknung

Mikroorganismen und Enzyme benötigen Wasser zum Leben bzw. für verschiedene Reaktionen zum optimalen Reaktionsablauf. Wasserentzug bis auf ca. 65 % tötet fast alle ungeschützten Formen von Mikroorganismen, weitere Trocknung auf eine Gleichgewichtsfeuchte von ungefähr 50 % verringert die Enzymaktivität und erneutes Trocknen auf weniger als 25 % Wassergehalt verhindert nichtenzymatische Bräunungsreaktionen. Somit werden durch Wasserentzug auf max. 25 % Wassergehalt alle Prozesse innerhalb eines Lebensmittels bis auf die Fettoxidation vermieden. Es gibt zur Trocknung verschiedene Verfahren, die drei folgenden Varianten sind relativ schonend: Walzentrocknung, Sprühtrocknung und Gefriertrocknung.

Tabelle 2: Methoden zur Lebensmitteltrocknung

| <i> Methode </i> | <i> Temperatur </i> | <i> Zeit </i> | <i> Beschreibung </i> |
|------------------|---------------------|---------------|---|
| Walzentrocknung | 130 – 160 °C | ca. 30 s | dünnere Film zwischen zwei Walzen, Trockengut wird abgeschabt, das Produkt bis 100 °C erhitzt |
| Sprühtrocknung | 150 – 200 °C | bis zu 30 s | Produkt wird in Heißluft versprüht, Temperaturen des Produkts 40 – 50 °C, gegen Ende bis zu 80 °C |
| Gefriertrocknung | -30 – 50 °C | bis zu 12h | Einfrieren der Lösung, durch Druckminderung Sublimation |

Die Trocknung ist in den meisten Fällen mit Wärmeeinwirkung verbunden, darum treten Effekte auf, die bereits bei der Hitzebehandlung beschrieben wurden: Proteindenaturierung und Abbau von Aminosäuren, Geschmacksveränderungen und/oder Vitaminabbau.

Sauerstoffausschluss, Schutzgas

Schutzgase werden benutzt, um ein Lebensmittel vor Oxidation durch Luftsauerstoff zu schützen. Sie werden insbesondere bei der Verpackung von Lebensmitteln eingesetzt und garantieren für das verpackte Lebensmittel eine Atmosphäre mit stark verringertem Sauerstoffgehalt. Zusätzlich zum Oxidationsschutz können aeroben Mikroorganismen bei Luftausschluss nicht wachsen. Stickstoff, Argon oder Kohlendioxid finden als Schutzgase Verwendung.

Bestrahlung

Energiereiche Strahlung hat eine mikrobiozide Wirkung und wird seit einiger Zeit nicht nur zur Desinfektion von Oberflächen, sondern auch zur Konservierung verwendet. Dabei können UV-Strahlen zur Oberflächenbehandlung eingesetzt und gamma- (γ), beta- (β) und Röntgenstrahlung für die generelle Lebensmittelbestrahlung verwendet werden. Große Moleküle, wie DNA-Bausteine oder Zellen, die für das Wachstum verantwortlich sind, werden durch die Strahlung zerstört. Dies wird zur Verhinderung der Keimung von Kartoffeln und anderen Gemüsesorten verwendet. Höhere Strahlenwerte können vegetative Keime, wie zum Beispiel Salmonellen abtöten. Auch gegen Insekten kann die Lebensmittelbestrahlung bei Getreide oder Müsli angewendet werden.

Nachteil der Bestrahlung ist, dass organische Moleküle zu Radikalen oder Ionen gespalten werden können. In Deutschland sind Bestrahlungen von Lebensmitteln derzeit nur mit UV-Licht für die Desinfektion von Trinkwasser, Käseoberflächen und Obst- bzw. Gemüseproduk-

ten erlaubt, einzige Ausnahme sind bestrahlte Kräuter und/oder Gewürze, die seit dem Jahr 2000 gehandelt werden dürfen.

Druckverfahren

Die Wirkung von hohem Druck (bis zu 10.000 bar) führt zur Inaktivierung von Bakterien, Hefen, Viren und Schimmelpilzen, sowie einigen Sporen. Sollen druckresistente Sporen inaktiviert werden, so werden sie zunächst bei 600 bis 1000 bar zum Auskeimen getrieben und danach mit Hochdruck abgetötet. Die Wirkung ist noch nicht vollständig geklärt, vermutet wird, dass zum einen die Ribosomen der Zellen zerstört werden und so die Zellteilung unterdrückt wird. Zum anderen wird die Zellmembran destabilisiert oder teilweise zerstört, was ebenfalls zum Zelltod führt. Aufgrund der ähnlichen mikrobioziden Wirkung, wird diese Methode oft mit dem klassischen Hitzepasteurisieren verglichen und an deren Stelle eingesetzt.

1.2.2 Biologische Konservierungsmethoden

Bei biologischen Konservierungsmethoden unterbindet der Stoffwechsel von erwünschten Mikroorganismen das Wachstum von unerwünschten Keimen. Dabei wird das Rohprodukt aber immer verändert. Die zwei typischen Verfahren hierfür sind Milchsäuregärung und alkoholische Gärung.

Milchsäuregärung

Es gibt zwei Arten der Milchsäuregärung. Bei der homofermentativen Milchsäuregärung bilden *Streptococcen*, *Lactococcen* oder *Pediococcen* Milchsäure als einziges Produkt. Heterofermentative Mikroorganismen-Stämme wie *Leuconostoc* und einige *Lactobacillen* bilden zusätzlich Ethanol oder Essigsäure. Bei beiden Verfahren verbrauchen die Bakterien den im Lebensmittel vorhandenen Sauerstoff. Die entstehende Milchsäure und die Abwesenheit von Sauerstoff verhindert das Wachstum anderer Mikroorganismen.

Milchsäurebakterien vergären verschiedenste Lebensmittel, wie Kraut, Bohnen oder Milch. Dementsprechend werden sie zur Herstellung von z.B. Sauerkraut, Miso, Joghurt oder Quark verwendet.

Alkoholische Gärung

Hefen bauen Kohlenhydrate, vor allem Glucose, unter anaeroben Bedingungen zu Ethanol und Kohlendioxid ab. Dieser Vorgang heißt alkoholische Gärung. Der so entstehende Alkohol tötet Mikroorganismen und Fäulniskeime ab. Bei der Herstellung alkoholischer Getränke

werden unterschiedliche Hefen verwendet, die aus verschiedenen Substraten, wie Maische oder Fruchtsäften, Bier, Wein, Sekt und andere Getränke herstellen können.

1.2.3 Chemische Konservierungsmethoden

Säuern

Es gibt verschiedene Säuren, die als Konservierungsmittel zugelassen sind. Einerseits beeinflussen sie in den pH-Wert des Lebensmittels, dadurch kann das Wachstum einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgeschlossen werden. Andererseits können Säuren, wenn sie in saurem Milieu eingesetzt werden, Zellwände von Mikroorganismen durchdringen und den pH-Wert in der Zelle senken, wodurch diese abstirbt.

Es werden Ameisensäure, Äpfelsäure, Benzoesäure, Essigsäure, Fumarsäure, Milchsäure, Propionsäure und Sorbinsäure (SS) als ausgewiesene Konservierungsmittel verwendet.

Salzen, Pökeln, Zuckern

Durch Kochsalzzugabe sinkt die Wasseraktivität des Lebensmittels, ab einer Konzentration von 8 % Kochsalz werden Mikroorganismen am Wachstum gehindert. Die Wirkung des Pökelsalzes (NaCl , NaNO_3 , NaNO_2) beruht ebenfalls auf der Senkung der Wasseraktivität. Zusätzlich kann ein Umröten von Fleisch verhindert werden. Der Muskelfarbstoff Myoglobin reagiert mit Stickoxid, welches sich im sauren Milieu aus Nitrit bilden kann. Das sogenannte entstehende Pökelfarbstoff ist licht-, sauerstoff- und hitzestabil, weshalb gepökelttes Fleisch seine rote Farbe behält. Es gibt zwei Arten Einzusalzen bzw. zu Pökeln. Zum einen die Trockenverfahren, bei denen das Lebensmittel mit Salz eingerieben wird und zum anderen die Nassverfahren, bei denen das Lebensmittel in eine Salzlake eingelegt wird. Bei beiden Verfahren kommt es zum Verlust von Proteinen und Mineralstoffen, sowie zu Geschmacksveränderungen.

Auch Zucker kann, wie Salz, zur Herabsetzung der Wasseraktivität verwendet werden. Je nach Art des Zuckers, findet gleichzeitig eine Süßung des Lebensmittels statt.

Schwefeln

Beim Schwefeln werden Lebensmittel mit Schwefeldioxid oder Salzen der schwefligen Säure behandelt. Es gibt nur wenige Lebensmittel, wie Trockenfrüchte, getrocknete Kartoffelerzeugnisse oder Weine, die geschwefelt werden. Schwefeldioxid wird dabei sowohl antimikrobiell, als auch antioxidativ und enzymhemmend eingesetzt. Auch die ursprüngliche Färbung

des Lebensmittels bleibt nach Schwefelung bestehen. Reste des Schwefeldioxids werden nach der Behandlung durch Hitzeeinwirkung entfernt.

Räuchern

Das Räuchern dient zunächst zur Geschmacksgebung und Farbverstärkung von Lebensmitteln. Des Weiteren wird durch im Rauch enthaltene Stoffe, wie Phenole, Formaldehyd, Ameisensäure oder Essigsäure die Haltbarkeit verlängert. Der Rauch wird aus verschwelenden und verglimmenden Harthölzern, wie Buche, Eiche oder Erle gewonnen. Manche Stoffe im Rauch, wie Phenole, besitzen eine antioxidative Wirkung. Zusätzlich finden Trocknungsprozesse und eventuelle Hitzebehandlung statt, so dass erst durch die Kombination dieser Konservierungsverfahren die gewünschten Effekte erzielt werden.

Konservierungsstoffe

„Konservierungsstoffe sind solche Stoffe, die synthetischen oder natürlichen Produkten, insbesondere Lebensmitteln, zugesetzt werden, um deren Haltbarkeit gegenüber Einwirkung von Mikroorganismen, Insekten und anderen Kleinlebewesen zu verlängern.“^[9]

Konservierungsmittel hemmen also über einen längeren Zeitraum das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen; in manchen Fällen werden die Bakterien, Hefen oder Schimmelpilze gänzlich abgetötet. Die meisten Konservierungsmittel wirken fungistatisch, wohingegen nur wenige bekannte Konservierungsmittel bakteriostatisch sind^[8].

Die meisten für Lebensmittel zugelassenen Konservierungsstoffe sind organische Säuren und ihre Salze. Diese können zum Großteil nur in sauren Lebensmitteln verwendet werden, da ihre Wirksamkeit gegenüber Mikroorganismen dadurch bedingt ist, dass nur die neutralen, undissoziierten Moleküle ausreichend hydrophob sind, um durch die Zellmembran in das Innere der MIO gelangen und somit das Wachstum und die Vermehrung hemmen^[6].

Die Zulassung von Konservierungsstoffen für Lebensmittel zu technologischen Zwecken ist in der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV)^[10] geregelt.

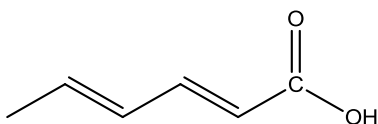
Tabelle 3 zeigt eine Auflistung verschiedener zugelassener Konservierungsmittel, welche in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden^[11]. Unter ihnen sind Sorbinsäure und Benzoesäure vor allem in der Getränkeindustrie die Hauptvertreter. Zusätzlich zu diesen beiden Säuren bzw. ihren Salzen wird in der Getränkekonservierung noch Dimethyldicarbonat eingesetzt. Dimethyldicarbonat wird von LANXESS unter dem eingetragenen Warennamen Velcorin® vertrieben und als Kaltentkeimungsmittel in der Getränkeindustrie eingesetzt.

Tabelle 3: Eingesetzte Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie

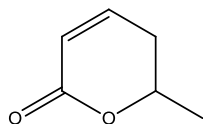
| E-Nummer | Konservierungsstoff –Stoffgruppe | bzw. Höchstmenge [mg/kg] | bestes Wirkungsspektrum gegen: |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 200 – 203 | Sorbinsäure und Sorbate | 300 – 2000 | Hefen, Schimmelpilze |
| 210 – 213 | Benzoessäure und Benzoate | 300 – 2000 | Hefen, Schimmelpilze |
| 214 – 219 | Ester der Hydroxybenzoessäure | 300 – 2000 | Hefen, Schimmelpilze |
| 220 – 224 | Schwefeldioxid | 30 – 200 | Bakterien |
| 226 – 228 | Sulfite | | |
| 235 | Natamycin | 1 mg/L | Hefen, Schimmelpilze |
| 242 | Dimethyldicarbonat | 250 mg/L | Hefen |
| 260 – 263 | Essigsäure und Acetate | – | Bakterien |
| 270 | Milchsäure | – | Bakterien |
| 280 – 283 | Propionsäure und Propionate | 1000 - 3000 | Schimmelpilze |
| 284 – 285 | Borsäure und Borax | 4000 | Hefen |

1.3 trans,trans-2,4-Hexadiensäure

Hofmann und Merck fanden 1859 nach der Umsetzung eines sauren Vogelbeerextraktes mit starker Lauge eine bis dahin unbekannte Säure. Aufgrund des botanischen Namens der Stammpflanze der Vogelbeere (*Sorbus aucuparia*) wurde die Säure als Sorbinsäure bezeichnet ^[12]. Inzwischen ist bekannt, dass nicht Sorbinsäure im Fruchtfleisch der Vogelbeere vorliegt, sondern Parasorbinsäure ^[13]. Dies ist das Lacton der 5-Hydroxy-2-hexensäure ^[14], welches sich zunächst durch saure Extraktion aus dem Fruchtfleisch löst und durch Behandlung mit Alkali zur Sorbinsäure reagiert.



Name: Sorbinsäure, (2E,4E)-Hexadiensäure



Name: Parasorbinsäure, 6-Methyl-5,6-dihydro-2-pyranon

Abbildung 1: Strukturformeln von Sorbinsäure und Parasorbinsäure

Die Strukturen von Säure und Lacton wurden allerdings erst 35 Jahre nach der Entdeckung durch Doebner ^[15] aufgeklärt (1894): es handelt sich demnach bei Sorbinsäure um die trans-trans-2,4-Hexadiensäure, ein stabiles carboxylfunktionalisiertes konjugiertes Dien mit doppelter trans-Konfiguration.

Die 2,4-Hexadiensäure besitzt drei weitere Diastereomere, die cis-trans-Form, trans-cis-Form und cis-cis-Form. Cis-trans Hexadiensäure entsteht unter anderem, wenn racemische Parasor-

binsäure unter milden Bedingungen gespalten wird ^[16]. Der Isomeranteil lässt sich durch gaschromatographische (GC) Methoden bestimmen. Er beträgt in handelsüblicher Sorbinsäure bzw. Kaliumsorbat max. 0,1%. Durch Hitzeeinwirkung erhöht sich der Isomeranteil ^[17].

Die konservierende Wirkung der Sorbinsäure wurde erst im Jahr 1939 von Eugen Müller bei der Badischen Anilin- und Sodafabrik (BASF) entdeckt. Die BASF ließ im gleichen Jahr noch die Verwendung von Sorbinsäure zur Konservierung leicht verderblicher Stoffe patentieren. Ein Jahr später wurde unabhängig davon in den USA ein Patent zur Konservierung von Margarine durch Sorbinsäure eingereicht ^[12].

Seit Mitte der 50er Jahre werden Sorbinsäure und deren Calcium- und Kaliumsalze in der Lebensmittelkonservierung allgemein verwendet. Seitdem stiegen Produktion und Verbrauch kontinuierlich an. Wegen ihrer physiologischen Unbedenklichkeit und ihrer organoleptischen Indifferenz wird die Sorbinsäure vielen anderen Konservierungsstoffen vorgezogen. Heute beträgt der Weltjahresverbrauch an Sorbat zur Lebensmittelkonservierung ca. 40.000 t ^{[18][19]}.

Die freie Säure und ihre Kalium- oder Calciumsalze werden als Pulver oder Granulat in der Lebensmittelindustrie genutzt. Andere Sorbinsäurederivate finden in Lebensmitteln keine Anwendung. Dies liegt im Falle des Natriumsalzes beispielsweise an der schlechten Stabilität. Sorbinsäure wird in diversen Produkten zur Konservierung eingesetzt, dazu gehören Fett- und Milcherzeugnisse ebenso wie Backwaren oder Getränke ^[20]. Die eingesetzten Höchstmengen in der Getränkeindustrie liegen bei 300 mg/L. Bei Trockenfrüchten oder Fruchtzubereitungen dürfen bis zu 1 Gramm Sorbinsäure pro Kilogramm Lebensmittel verwendet werden, bei Käse dürfen bis zu 2 g/kg zugesetzt werden, ebenso wie bei Brot und Teigwaren ^[10].

Durch die konjugierten Doppelbindungen ist Sorbinsäure relativ anfällig gegenüber Hitzeeinwirkung. Dies stellten schon Melnick et al 1954 fest ^[21], welche die Bildung von Hydroperoxiden bei der Autoxidation der Sorbinsäure untersuchten. Direkte Sauerstoffeinwirkung hingegen trägt nicht zur schnelleren Oxidation der Sorbinsäure bei.

Auch in wässrigen Lösungen ist Sorbinsäure nicht gänzlich stabil und kann zum Beispiel zu Acrolein, Crotonaldehyd und Malonaldehyd reagieren. Arya zeigte, dass pH-Wert, Temperatur, Anwesenheit von Salzen, Aminosäuren, Zucker und Glycerol, sowie Spuren von Metallionen, den Abbau von Sorbinsäure in wässrigen Lösungen beeinflussen können ^[22]. Außerdem können Sorbinsäure oder oben genannte Abbauprodukte die Bräunung verschiedener Aminosäurekomponenten sowohl in Modellen als auch in Lebensmitteln beschleunigen ^[23].

Die antimikrobielle Wirkung der Sorbinsäure beruht auf der Hemmung verschiedener Enzyme in der Zelle. Dabei sind die Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels wie zum Beispiel die Lactatdehydrogenase ^[24] oder die Alkoholdehydrogenase ^[25] besonders betroffen. Sorbinsäure

wirkt ebenfalls unspezifisch hemmend auf Enzyme des Citronensäurecyclus ^[26]. Der Grund hierfür ist in den meisten Fällen die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Schwefel der essentiellen Thiolgruppe und den δ - oder β -Kohlenstoffen der Sorbinsäure. Durch die Belegung des Schwefels werden die verschiedenen Enzyme somit inaktiviert ^{[27][28]}. Auch die Zellwand verschiedener Mikroorganismen wie zum Beispiel die Zellwand von *Escherichia coli* kann durch Sorbinsäure zerstört werden ^{[29][30]}. Sorbinsäure und Benzoesäure verringern die pH-Differenz an der Zellmembran, welche den Transport von Stoffen in die Zelle gewährleistet, so dass die Zelle durch Unterversorgung abstirbt ^[25].

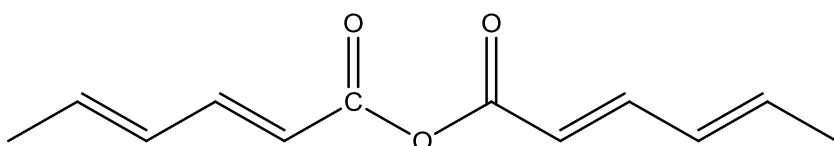
Die generelle pH-abhängige Wirkung der Sorbinsäure erklärt sich dadurch, dass nur der undissoziierte Anteil in die Zellmembran eindringen kann ^[6]. Oka entdeckte 1960, dass bei pH 3,15 ca. vierzig Prozent der vorhandenen Sorbinsäure in das Zellinnere eindringen, wohingegen bei neutralem pH-Wert nur 1 % Sorbinsäure ins Zellinnere gelangt ^[31].

Reine Resistenzen gegenüber Sorbinsäure sind bisher nicht bekannt. Allerdings tritt bei manchen Mikroorganismen eine Adaption der Sorbinsäure auf, so dass höhere Dosen zur Hemmung des Wachstums eingesetzt werden müssen.

Die Wirkweise richtet sich vor allem gegen Schimmelpilze und Hefen. Bakterien werden nur teilweise gehemmt ^[6]. Einige Mikroorganismen können Sorbinsäure sogar verwerten bzw. abbauen. Zu diesen gehören z.B. *Penicillium roqueforti* ^[32], manche Stämme von *Aspergillus niger* ^[33], sowie wenige Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* ^[34]. Dabei wird die Sorbinsäure unter anderem zum 1,3-Pentadien abgebaut.

1.4 trans,trans-2,4-Hexadiensäureanhydrid

Der Einsatz von Sorbinsäureanhydrid (SSA) als Konservierungsstoff für Lebensmittel und Getränke wurde 2006 von der Firma LANXESS vorgeschlagen, nachdem eine überraschend starke mikrobiozide Wirkung beobachtet worden war ^[35]. Im Gegensatz zur bestens untersuchten Sorbinsäure gibt es über Sorbinsäureanhydrid nur wenig Literatur.



Name: Sorbinsäureanhydrid, (2E,4E)-2,4-Hexadiensäureanhydrid

Abbildung 2: Strukturformel von Sorbinsäureanhydrid

Die Firma Hoechst meldete in den 60er Jahren Patente zur Synthese von Sorbinsäurehalogeniden und Sorbinsäureanhydriden an ^[36]. Sie benutzten als Ausgangsstoff einen Polyester,

der aus Umsetzung von Keten und Crotonaldehyd erhalten wurde. Die Farbenfabriken Bayer AG meldete 1963 ein Patent über die Verwendung von Anhydriden von Alkylcarbonsäuren zur Konservierung von Lebensmitteln an ^[37]. Dies war die Grundlage für das Lanxess-Patent von 2006.

Troller und Olsen ^[38] testeten 1967 verschiedene Sorbinsäurederivate, unter anderem auch Sorbinsäureanhydrid, auf ihre Fähigkeit, das Wachstum von Mikroorganismen einzuschränken. Dabei stellte sich heraus, dass Sorbinsäureanhydrid die gleiche Hemmwirkung gegenüber einem *Aspergillus niger* Stamm aufwies wie Sorbinsäure. Gegenüber getesteten Bakterien waren alle Derivate nur kaum bis nicht wirksam. Die akute orale Toxizität von allen Derivaten wurde an Charles River CD Ratten getestet. Sie beträgt für Sorbinsäureanhydrid 2,0 g/kg.

Seit den 90er Jahren gab es Versuche mit Verpackungsmaterialien für Lebensmittel, denen Sorbinsäureanhydrid zugesetzt wurde ^{[39][40]}. Dort wurde durch Hydrolyse Sorbinsäure freigesetzt und somit eine konservierende Wirkung erzielt ^{[41][42]}. Das Anhydrid wurde verwendet, da es besser in unpolare Folien eingearbeitet werden konnte ^[43]. Sorbinsäure selbst löste sich nicht in dem Verpackungsmaterial ^{[44][45][46]}. Auch nach 2000 wurde das Sorbinsäureanhydrid in der Lebensmittelverpackung noch als Novum beschrieben ^{[47][48]}. Allerdings war auch hier die Bildung bzw. Abgabe von Sorbinsäure aus der Verpackung das entscheidende Kriterium, um Sorbinsäureanhydrid zu verwenden. Zwar kann eine gewisse Wirksamkeit von Anhydriden gegenüber manchen Mikroorganismen als bekannt bezeichnet werden. Sorbinsäureanhydrid direkt als chemischer Konservierungsstoff und insbesondere die unerwartet starke Wirkung des Anhydrids selbst war vorher aber noch nicht beschrieben.

1.5 Mikrobieller Verderb in der Getränkeindustrie

In Deutschland wurden im Jahr 2010 ca. 750 L Getränke pro Kopf verzehrt, davon waren 118 l Erfrischungsgetränke (16 %) ^[49]. Die Softdrinks gehören damit neben Kaffee (~20 %), Wasser (~18 %), Bier (~15 %) und Milch (~12 %) zu den fünf beliebtesten Getränkegruppen ^[50]. Getränke, wie Softdrinks, welche vergärbaren Zucker enthalten, sind je nach pH Wert anfällig für mikrobiellen Verderb. Dies umso mehr, als unter den heutigen Marktbedingungen Haltbarkeiten von ca. 12 Monaten gefordert werden.

Um den mikrobiellen Verderb von entsprechenden Getränken zu vermeiden, werden bei der Herstellung die sogenannten „fünf-M-Faktoren der Kontamination“ von Getränkeproduzenten besonders beachtet. Zu diesen Fünf gehören: Material, Methoden, Maschinen, Mensch und

Mitwelt (Umwelt), durch sie können Mikroorganismen in Getränke eingeschleust werden. Dabei wird zwischen Primär- und Sekundärkontamination unterschieden.

Unter Material fallen sowohl die Rohstoffe, wie zum Beispiel Wasser, Saftgrundstoff (Konzentrat) oder Zucker, als auch die Packmaterialien wie Polyethylenterephthalat-Flaschen (PET-Flaschen), Glasflaschen oder Getränkekartons. Bei den Methoden wird zwischen den verschiedenen Produktionsverfahren und zwischen verschiedenen Abfülltechnologien unterschieden. Dies sind zum Beispiel die Heißabfüllung, die Kaltabfüllung mit Konservierungsmittel oder die aseptischen Kaltabfüllung. Mit Maschinen sind die jeweiligen Anlagen und Geräte gemeint, die im Betrieb verwendet werden, hier ist es besonders wichtig auf die Reinigung und/oder Desinfektion zu achten, ebenso auf Verschleiß bzw. Instandhaltung der Anlagen und andere Einflüsse, die sich auf die Leistung der Maschinen auswirken. Für den Mitarbeiter in einem Getränkebetrieb gelten strikte Hygienevorschriften, die bei Einhaltung die Gefahr der Kontamination durch den Menschen minimieren. Kontamination durch Personen kann nur ausgeschlossen werden, wenn die Getränkeanlage aseptisch, also in Reinraumklima betrieben wird, was sehr aufwendig und kostspielig ist. Zu guter Letzt beeinflusst natürlich die Umwelt der Getränkeherstell- und -füllanlage das Produkt. Dies bedeutet, dass ein Hauptaugenmerk auf die Luftqualität einer solchen Anlage gelegt werden muss, weil diese besonders beeinflusst wird.

Zur mikrobiologischen Sicherheit der Getränkeabfüllung sind daher in vielen Fällen Konservierungsstoffe unverzichtbar und das Interesse an neuen, noch sichereren, noch wirksameren chemischen Konservierungsstoffen bleibt groß.

2. Problemstellung und Zielsetzung

In der Getränkeindustrie werden zur Prolongation der Haltbarkeit vor allem Benzoesäure und Sorbinsäure als Konservierungsmittel eingesetzt. Auch Dimethyldicarbonat wird unter dem Markennamen Velcorin® in vielen Getränkebetrieben als Kaltentkeimungsmittel verwendet. Alle drei Zusatzstoffe werden zur Verhinderung des mikrobiellen Verderbs zugegeben. Andere Konservierungsmittel werden kaum zur Getränkekonservierung genutzt, obwohl die drei oben erwähnten Stoffe nicht alle mikrobiologischen Probleme bei der Produktion von Getränken lösen können. So ist es erforderlich, dass für spezielle Herausforderungen spezielle Lösungen entwickelt werden. Dazu gehören die Verbesserung von bestehenden Ansätzen zur Konservierung und die Neuentwicklung von Konservierungsmitteln.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wird untersucht, ob trans,trans-2,4-Hexadiensäureanhydrid als Getränkekonservierungsmittel geeignet ist. Das Anhydrid wurde nach mikrobiologischen Vorversuchen aus einer Reihe verschiedener Substanzen ausgewählt, da sich eine hervorragende Wirkung gegenüber wenigen ausgewählten Mikroorganismen zeigte. Zudem hydrolysieren Anhydride bei Kontakt mit Wasser, deshalb wird angenommen, dass nach einiger Zeit im Getränk durch Zerfall kein Anhydrid, sondern nur Sorbinsäure zurückbleiben sollte.

Ziel der Arbeit ist es, eine großtechnische Synthese von Sorbinsäureanhydrid zu entwickeln, wichtige Stoffeigenschaften bzw. das chemische Verhalten zu analysieren, sowie die mikrobiologische Wirksamkeit im Detail zu untersuchen. Ausbringungsmöglichkeiten, Einsatzgebiete und Formulierungen sollen darüber hinaus untersucht und diskutiert werden. Schließlich sollen auftretende Nebenreaktionen mit Getränkeinhaltsstoffen analysiert und beurteilt werden, sowie die Toxizität des Anhydrids betrachtet und sensorische Tests durchgeführt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese von Anhydriden

Zur Synthese eines Carbonsäureanhydrids sind in der organischen Chemie verschiedenste Synthesewege bekannt^[51]. Formal entstehen Anhydride, wenn bei der Reaktion zweier Carbonsäuren Wasser frei gesetzt wird^[52].

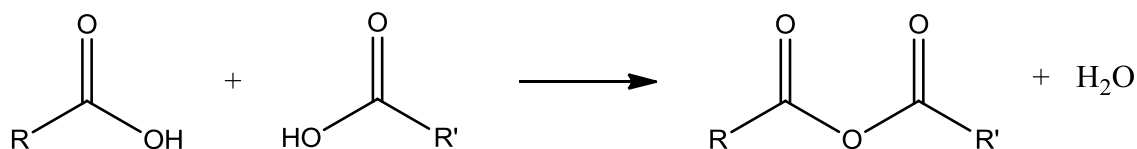


Abbildung 3: formale Anhydridbildung

Der Wasserentzug kann sowohl intermolekular als auch intramolekular bei Dicarbonsäuren stattfinden und durch Erhitzen oder mit Hilfe wasserentziehender Säuren, wie zum Beispiel Schwefelsäure oder Phosphorsäure geschehen.

Horning und Finelli erhitzen α -Phenylglutarsäure und erhielten nach Vakuumdestillation das zugehörige Anhydrid^[53]. Auch der Einsatz anderer dehydrierender Stoffe, wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^{[54][55][56]} oder Essig- bzw. Trifluoressigsäureanhydrid^{[57][58]} kann zur Bildung von Anhydriden aus Carbonsäuren führen.

Bei der Methode nach Holde und Tacke wird die jeweilige Carbonsäure beispielsweise 6 – 8 h mit Essigsäureanhydrid unter Rückfluss erhitzt und nach Vakuumdestillation das Carbonsäureanhydrid in großer Reinheit erhalten^[59].

Als klassische Synthese von Anhydriden wird allerdings die Reaktion über das jeweilige Säurechlorid bezeichnet. Diese kann sowohl einstufig als auch zweistufig stattfinden. Bei der einstufigen Variante werden Chlorierungsgenz und Carbonsäure oder Dicarbonsäure^[60] im Verhältnis 0,5 mol zu 1 mol verwendet. Bei der zweistufigen Variante wird zunächst das Säurechlorid aus der Carbonsäure synthetisiert (1:1) und danach das erhaltene Säurechlorid erneut mit Carbonsäure versetzt.

Die Carbonsäurechloride werden hauptsächlich mit Thionylchlorid^{[61][62]} oder Phosgen^{[63][64][65][66]} hergestellt. Weitere herkömmliche Chlorierungsmittel wie Chlor, Oxalylchlorid^[67] oder Phosphorchloride^[68] werden ebenfalls zur Darstellung von Carbonsäurechloriden als Zwischenprodukte der Anhydridsynthese genutzt.

Zudem gibt es verschiedene Methoden, bei denen Diphenylchlorophosphat (DPCP)^{[69][70]}, Dicyclocarbodiimid^{[71][72]} oder Triazine^[73] als Edukte eingesetzt werden. Auch die Reaktion

von Carbonsäuresalzen mit Schwefel oder Brom führt zum Anhydrid ^[74], ebenso wie die Umsetzung mit Tetrachlorkohlenstoff und tris-(Dimethylamino)-phosphin ^[75].

Eine alternative Methode zur Synthese von Anhydriden beschrieb Baghernejad 2010 über die Verwendung von Diazabicyclooctan (DABCO) ^[76]. Auch Phasentransferreaktionen zur Herstellung von Anhydriden können verwendet werden ^[77], dies beschrieben auch Plusquellec et al. ^[78]. Sie verwendeten 20 %ige Natriumhydroxid-Lösung, organische Lösungsmittel und Säurechloride um mit Hilfe eines Phasentransferkatalysators die entsprechenden Anhydride zu synthetisieren. Eine ebenfalls oft verwendete Methode ist die „Umanhydridisierung“ mit Hilfe von Essigsäureanhydrid ^[79]. Auch durch das BASIL-Verfahren (Biphasic Acid Scavenging Utilizing Ionic Liquids) können mit Hilfe von 1-Methylimidazol unter Bildung von flüssigen Salzen ebenfalls Anhydride synthetisiert werden.

Es gibt weitere Reaktionswege für spezielle Anhydridsynthesen. Zur Darstellung von Maleinsäureanhydrid (MSA) sind zum Beispiel mehrere Synthesewege bekannt, die älteste Methode ist die Teil-Oxidation von Benzol, heutzutage wird MSA allerdings nur noch aus Butan oder Buten hergestellt. Phthalsäureanhydrid (PSA) kann auf herkömmliche Weise durch Wasserabspaltung von Phthalsäure hergestellt werden, aber auch die Oxidation von Naphthalin führt zum PSA, genauso, wie die Oxidation von o-Xylol. So gibt es für eine Vielzahl von Anhydriden eigene Synthesewege, die für die Synthese von Sorbinsäureanhydrid aber nicht genutzt werden können.

Zur Darstellung von Sorbinsäureanhydrid sind verschiedene Synthesewege literaturbekannt. Die Farbwerke Hoechst AG beschäftigte sich, wie oben erwähnt, in den 60er Jahren mit der Herstellung von Sorbinsäurehalogeniden und Anhydriden aus Sorbinsäurechlorid (SSCl) oder einem Polyester mit Sorbinsäurebausteinen. Dabei wurden sowohl gemischte Anhydride, z.B. von Essigsäure und Sorbinsäure oder von Benzoe- und Sorbinsäure hergestellt, als auch das symmetrische Sorbinsäureanhydrid. Eine neuere Synthese von Sorbinsäureanhydrid mittels Diphenylchlorophosphat benutzten Honda et al. 2003 als Vorstufe bei der Herstellung von Securinin. Securinin ist ein Alkaloid, welches sich gegenüber dem wichtigsten inhibitorischen Rezeptor des zentralen Nervensystems antagonistisch verhält. Mit der Hilfe von Securinin ist es möglich, die Form dieses Rezeptors (GABA) und seine Wirkweise besser zu verstehen ^[80].

In den folgenden Unterkapiteln werden die durchgeführten Reaktionen zur Synthese von Sorbinsäureanhydrid erläutert und anschließend miteinander verglichen.

3.2 Synthese von trans,trans-2,4-Hexadiensäureanhydrid

3.2.1 Wasserentzug der Sorbinsäure

Als Entwässerungsverfahren werden Verfahren bezeichnet, bei denen säurekatalysiert aus zwei Molekülen Sorbinsäure ein Mol Wasser abgespalten wird.

Zur Synthese von Sorbinsäureanhydrid durch direkten Wasserentzug wurde konzentrierte Schwefel- bzw. Phosphorsäure eingesetzt und eine Reihe von Versuchen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (Toluol, Ethylacetat, Hexan) und verschiedenen Temperaturen (70 – 110 °C) in zwei Serien durchgeführt.

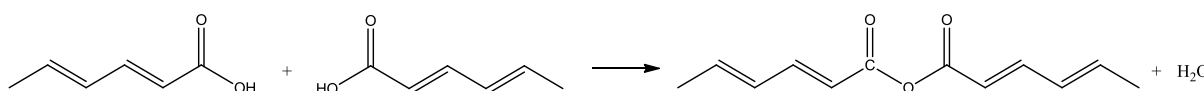


Abbildung 4: Wasserentzug

Alle Reaktionsansätze der ersten Serie mit Schwefelsäure als Reaktionspartner verfärbten sich während des Erhitzens von weiß über gelb-braun nach schwarz. Dabei bildete sich maximal ein Prozent trans,trans-2,4-Hexadiensäureanhydrid. Bei der zweiten Serie mit Phosphorsäure als Reaktionspartner verfärbten sich die Reaktionsansätze weniger stark. Das Reaktionsprodukt aus Versuch 2c war sogar nur leicht gelb gefärbt.

Tabelle 4: Reaktionsausbeuten beim direkten Wasserentzug

| Nummer | Edukt | Säure | Bedingungen | Ausbeute |
|--------|-------------|--------------------------------|--------------------|----------|
| 1a | Sorbinsäure | H ₂ SO ₄ | Toluol, 110 °C | 0,2 % |
| 1b | Sorbinsäure | H ₂ SO ₄ | Hexan, 70 °C | 0,8 % |
| 1c | Sorbinsäure | H ₂ SO ₄ | Ethylacetat, 75 °C | 0,4 % |
| 2a | Sorbinsäure | H ₃ PO ₄ | Toluol, 70 °C | 0,4 % |
| 2b | Sorbinsäure | H ₃ PO ₄ | Toluol, 110 °C | 2,3 % |
| 2c | Sorbinsäure | H ₃ PO ₄ | Hexan, 70 °C | 1,4 % |
| 2d | Sorbinsäure | H ₃ PO ₄ | Ethylacetat, 75 °C | 0,8 % |

Anhand von Tabelle 4 wird deutlich, dass bei den beiden Entwässerungsverfahren nur Spuren Sorbinsäureanhydrid erzeugt wurden. Die Ausbeuten bei den Versuchen betragen zwischen 0,2 und 2,3 % der Theorie. Diese wurden während der Durchführung der Versuche per HPLC ermittelt. Da sich bei Veränderung der Temperatur bzw. des Lösungsmittels nur wenig mehr Sorbinsäureanhydrid bildete, wurden keine weiteren Versuche hinsichtlich der Optimierung der benutzten Synthesevorschriften gemacht.

Als dritte Möglichkeit wurde Phosphorpentoxid als stark hygroskopisches Trockenmittel mit Sorbinsäure versetzt und erhitzt. Dabei entstanden ca. 40 % Sorbinsäureanhydrid, welches

ebenfalls bräunlich gefärbt war. Bei Erwärmung des Reaktionsansatzes auf unter 50 °C verfärbte sich das Produkt weniger stark. Allerdings verringerte sich bei dieser Temperatur die Ausbeute an Sorbinsäureanhydrid auf unter 20 % der Theorie.

Bekannt ist, dass Sorbinsäure durch Hitzeeinwirkung in organischen Lösungsmitteln zu Aldehyden, wie Crotonaldehyd oder Malondialdehyd ^[22] oxidiert. Diese verursachen einen charakteristischen Geruch und polymerisieren bei weiterer Hitzeeinwirkung zu dunkel gefärbten Produkten ^[81].

Nach anhaltender, starker Hitzeeinwirkung bildete sich in den Reaktionsgefäßen langsam ein gelblich-brauner, gummiähnlicher Feststoff. Dieser bestand zum Teil aus den oben beschriebenen Polymeren und zum Teil aus Polymeren, die Sorbinsäureanhydrid-Bausteine enthielten. Sorbinsäure und Sorbinsäureanhydrid konnten per Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) in diesem Polymer bestimmt werden. Crotonaldehyd oder Malondialdehyd konnten in dieser Mischung nicht identifiziert werden.

Durch Veränderung der Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Zeit, Temperatur und Einsatzmenge von Sorbinsäure konnte keine wesentlich höhere Ausbeute erzielt werden. Es war zudem schwierig, den Reaktionsansatz aufzuarbeiten, da sich Sorbinsäure und Sorbinsäureanhydrid weder durch Extraktion, noch durch Kristallisation oder Destillation voneinander trennen ließen.

Bei wässriger Extraktion konnte die Menge an Sorbinsäure auf ca. 10 % im Endprodukt verringert werden. Allerdings hydrolysierten ca. 4 % des Sorbinsäureanhydrids während der Extraktion zu Sorbinsäure, so dass eine geringere Ausbeute erhalten wurde. Bei dem Versuch eine Substanz auszukristallisieren, bildeten sich sowohl nadelförmige Sorbinsäure-Kristalle, als auch kleine Sorbinsäureanhydrid-Kristalle. Zusätzlich lagerte sich ein Teil des Anhydrids auf den Sorbinsäure-Nadeln ab. Eine Destillation führte bei ca. 120 °C zu einer spontanen Zersetzung des Anhydrids, die anschließend durchgeführte Vakuumdestillation führte ebenfalls zu einer Sublimation des Produkts.

Bei dem Versuch der Trennung beider Substanzen über Kieselgel nach Kitamura ^[82] zersetzte sich das Sorbinsäureanhydrid fast vollständig sowohl auf inaktivierten, als auch auf aktivierten Säulen zu Sorbinsäure. Es gelang eine kleine Menge (500 mg) reines Sorbinsäureanhydrid zu erhalten, welches als HPLC-Standard eingesetzt werden konnte.

Aufgrund all dieser Herausforderungen im Hinblick auf die Aufreinigung war es zwingend notwendig, eine Synthese zu finden, bei der die Reaktion vollständig abläuft bzw. bei der die Reaktion besser gesteuert werden kann. Deshalb wurde als nächstes die Synthese von Sorbin-

säureanhydrid mit Hilfe des Sorbinsäurechlorids untersucht, da diese zweistufig durchgeführt werden kann.

3.2.2 Klassische Synthese mit Hilfe von Säurechlorid

Carbonsäuren können mit Hilfe verschiedener Chlorierungsmittel zu Carbonsäurechloriden reagieren. Zu den gängigsten Agenzien gehören Chlor und Chlorwasserstoff, Thionylchlorid, Phosgen (Diphosgen, Triphosgen), Oxalylchlorid und die verschiedenen Phosphorchloride ^{[67][83]}. In einem weiteren Schritt reagiert das Säurechlorid dann mit der gleichen oder einer anderen Carbonsäure zu einem Carbonsäureanhydrid. Im Fall von Sorbinsäureanhydrid wird also zunächst das Sorbinsäurechlorid synthetisiert, welches wiederum mit Sorbinsäure zu Sorbinsäureanhydrid reagiert.

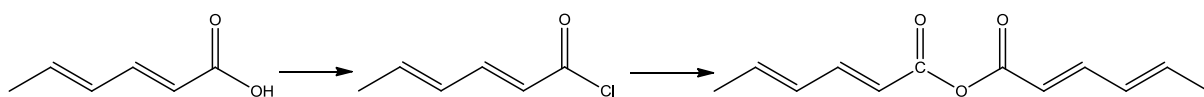


Abbildung 5: allgemeine Reaktionsfolge

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur einige der möglichen Chlorierungsreagenzien eingesetzt: Thionylchlorid, Oxalylchlorid, Phosphorylchlorid, Phosphortrichlorid und Phosgen. Die verschiedenen Möglichkeiten unterscheiden sich neben den unterschiedlichen Einsatzstoffen noch in mehreren Aspekten. Durch die Edukteigenschaften variieren die Versuchapparaturen, die Reaktionsführung (z.B. Reaktionszeit und -temperatur, einstufige/zweistufige Synthese) kann sich deutlich unterscheiden und die Ausbeuten der Reaktionen sind unterschiedlich. Auch die Produkteigenschaften, wie Farbe oder Reinheit des Sorbinsäureanhydrids, sind von der Art der Herstellung abhängig.

Im Folgenden werden die verschiedenen Chlorierungsmethoden und ihre Ergebnisse erläutert und miteinander verglichen. Die genauen Synthesevorschriften sind im experimentellen Teil beschrieben.

Synthese mit Thionylchlorid

In einem zweistufigen Verfahren wurde zunächst Sorbinsäurechlorid hergestellt, welches dann mit Sorbinsäure zum Anhydrid umgesetzt wurde.

Da durch einfaches Erwärmen von Carbonsäuren in Gegenwart von Thionylchlorid Säurechloride entstehen können ^[52], wurde eine Sorbinsäuresuspension mit Thionylchlorid versetzt und erwärmt. Es setzte Gasbildung ein und es bildete sich eine leicht gelbliche Lösung. Durch Vakuumdestillation wurde das entstandene Säurechlorid aufgereinigt. Die Ausbeute

dieses Versuchs betrug 49,2 %. Um die Ausbeute zu steigern, wurde der Versuch bei verschiedenen Temperaturen in unterschiedlichen Lösungsmitteln wiederholt. Die Reaktionsbedingungen mit der besten Ausbeute führten bei der Reaktion in Ethylacetat bei 70 °C und einem leicht überstöchiometrischen Einsatz von Thionylchlorid (1:1,2) zu einer Ausbeute von 54,6 % Sorbinsäurechlorid.

Nach weiteren Versuchsvorschriften von 1969^[36] und 1982^[84] wurde bei einigen Versuchen Sorbinsäure zunächst durch Triethylamin aktiviert. Das als Hilfsbase eingesetzte Triethylamin führte zu einer besseren Löslichkeit der Sorbinsäure im organischen Lösungsmittel, so dass keine Suspension, sondern eine Lösung eingesetzt werden konnte. Dies führte zu den erwarteten höheren Ausbeuten zwischen 77,1 und 85,3 %. Um eine verbesserte Löslichkeit zu Beginn der Reaktion ohne Hilfsbase zu erreichen, wurde bei einigen Versuchen auch Kaliumsorbat anstelle von Sorbinsäure eingesetzt. Hier wurden Ausbeuten zwischen 76,4 und 82,3 % erreicht.

Tabelle 5: Reaktionsausbeuten ausgewählter Versuche mit Thionylchlorid

| <i>Einsatzstoffe</i> | <i>LSM</i> | <i>Temperatur</i> | <i>Ausbeute SSCI</i> |
|----------------------------------|---------------|-------------------|----------------------|
| SS, Thionylchlorid | Dichlormethan | 50 °C | 49,2 % |
| SS, Thionylchlorid | Ethylacetat | 70 °C | 54,6 % |
| SS, Triethylamin, Thionylchlorid | Ethylacetat | 70 °C | 77,1 % |
| SS, Triethylamin, Thionylchlorid | Ethylacetat | 77 °C | 85,3 % |
| KS, Thionylchlorid | Ethylacetat | 70 °C | 76,4 % |
| KS, Thionylchlorid | Ethylacetat | 77 °C | 82,3 % |

Vorteil der Hilfsbase ist also eine etwas höhere Ausbeute, Nachteil ist allerdings das entstehende Triethylammoniumsalz, da es aus dem Reaktionsansatz entfernt werden muss. Für die Versuche, die im Labormaßstab durchgeführt wurden, war dies aber kein Problem.

Da das Sorbinsäurechlorid als Reinstoff weiter eingesetzt werden soll, wurden alle Reaktionsansätze im Vakuum destilliert, so dass das Triethylammoniumsalz im Sumpf verblieb.

Sorbinsäurechlorid ist eine irisierende, farblose Flüssigkeit mit stechendem Geruch. Der Siedepunkt bei 10 mbar liegt zwischen 64 – 66 °C (bei 20 mbar beträgt der Siedepunkt 79 °C).

Die Umsetzung des entstanden Sorbinsäurechlorids mit Sorbinsäure zum Anhydrid erfolgte durch langsames Zutropfen des Chlorids zu einer Sorbinsäure- oder Kaliumsorbat-Suspension. Diese Umsetzung erfolgte nahezu vollständig, die Reinheit des entstandenen Sorbinsäureanhydrids liegt bei ca. 95 %. Trans,trans-2,4-Hexensäureanhydrid ist ein leicht gelb gefärbter Feststoff mit einem Schmelzbereich zwischen 36 – 38 °C.

Das Rohprodukt enthielt nach Destillation des Lösungsmittels zwischen 4 und 7 % Sorbinsäure, Spuren von Sorbinsäurechlorid, sowie bis zu 1 % Isomere. Durch einmaliges Ausschütteln gegen Wasser konnte das Sorbinsäurechlorid aus dem Rohprodukt entfernt werden, allerdings bildete sich dadurch eine etwas größere Menge Sorbinsäure. Die Isomerenbildung hängt von der Reaktionstemperatur ab, bei niedrigen Temperaturen bildeten sich weniger Isomere, als bei höheren Temperaturen. Da die Reaktion aber nur bei hohen Temperaturen mit zufriedenstellender Ausbeute erfolgt, muss abgewogen werden, ob die Reaktion großtechnisch benutzt werden kann. Ziel ist es, das Produkt in der größtmöglichen Reinheit, also ohne Bildung von Isomeren, herzustellen. Dazu muss vermutlich eine Methode benutzt werden, die bei geringerer Temperatur ablaufen kann.

Zunächst aber wurde zum Vergleich zu den zweistufigen Synthesen das Anhydrid auch einstufig mit Thionylchlorid synthetisiert. Dabei wurde Thionylchlorid unterstöchiometrisch (1 : 0,5) eingesetzt. Bei einem ersten Versuch wurden 55 % Ausbeute erzielt. Durch Optimierung der Reaktionszeit konnte die Ausbeute auf 61,5 % erhöht werden. Allerdings enthielt das Rohprodukt in allen Fällen bis zu 15 % Sorbinsäure. Durch den Einsatz von Triethylamin bzw. Kaliumsorbat bildeten sich die Chloride, welche abgetrennt werden mussten. Eine Filtration der Ansätze mit Salzbildung gelang nicht, da Kaliumchlorid oder die TEA-Salze nicht filtrierbar waren. Bei Überführen der Salze in wässrige Lösung, wie bei der Extraktion mit Wasser oder Natriumhydrogencarbonat, kam es zu einer Mulmbildung, weshalb wässrige und organische Phase nicht gut voneinander getrennt werden konnten. Hier kam es durch Verschnitt der Mulmphase und durch die Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid zu Ausbeuteverlust. Pro Waschgang hydrolysierten ca. 3 % Anhydrid zu Sorbinsäure. Allerdings wurden dabei Salze und/oder Hilfsbasen abgetrennt und vorhandenes Säurechlorid zersetzt.

Aufgrund der höheren Ausbeute bei der zweistufigen Synthese mit Isolation des Zwischenproduktes und des geringeren Sorbinsäureanteils wurde trotz der längeren Reaktionszeit und des höheren Energie- und Zeitaufwandes diese Methode bevorzugt zur Herstellung von Sorbinsäureanhydrid im Labormaßstab (bis zu 1.000 g) genutzt. Der Einsatz der Hilfsbase wurde bei weiteren Versuchen nicht mehr verfolgt, da der Einsatz von Kaliumsorbat nahezu gleiche Ausbeuten liefert und das Triethylammoniumsalz nicht abgetrennt werden muss.

Für die großtechnische Synthese ist die Reaktion mit Thionylchlorid aufgrund der Isomerenbildung allerdings nicht geeignet.

Synthese mit Oxalylchlorid

Auch bei der Reaktion mit Oxalylchlorid wurden einstufige und zweistufige Synthesen durchgeführt. Die stöchiometrische Umsetzung von Sorbinsäure mit Oxalylchlorid ergab Sorbinsäurechlorid in Ausbeuten um 40 %.

Die einstufige Synthese nach Vorschrift von Schrecker und Maury ^[66] ergab zunächst nur das Sorbinsäurechlorid in geringer Ausbeute, auch nach verlängerter Reaktionszeit und erhöhter Temperatur fand kaum eine Reaktion zum Sorbinsäureanhydrid statt. In der Synthesevorschrift von Adams et al von 1920 ^[67] ist beschrieben, dass Carbonsäureanhydride bei Behandlung mit Oxalylchlorid zu den jeweiligen Säurechloriden reagieren. Durch Reaktionskontrolle per HPLC wurde deutlich, dass jeweils entstandenes Sorbinsäureanhydrid zum Säurechlorid zurückreagierte.

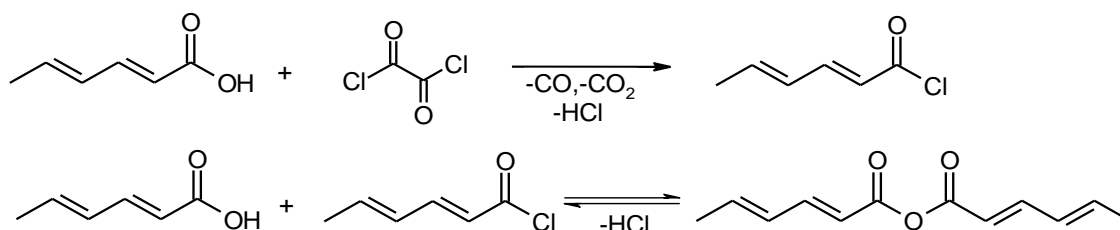


Abbildung 6: Reaktionsgleichung mit Oxalylchlorid

Nach Zugabe von Dimethylformamid (DMF) in Spuren ^[85] bildete sich mehr Anhydrid als zuvor, allerdings waren die Anteile an Sorbinsäureanhydrid in den verschiedenen Reaktionsansätzen nach unterschiedlichen Rührzeiten immer noch sehr gering, so dass eine Optimierung der Methode nicht durchgeführt wurde.

Tabelle 6: Reaktionsausbeuten ausgewählter Versuche mit Oxalylchlorid

| <i>Einsatzstoffe</i> | <i>LSM</i> | <i>Temperatur</i> | <i>Ausbeute SSCI</i> |
|---------------------------------|-------------|-------------------|----------------------|
| Sorbinsäure, Oxalylchlorid | Ethylacetat | 80 °C | 7,4 % |
| Sorbinsäure, Oxalylchlorid, DMF | Ethylacetat | 80 °C | 38,6 % |
| KS, Oxalylchlorid | Ethylacetat | 80 °C | 8,1 % |
| KS, Oxalylchlorid, DMF | Ethylacetat | 80 °C | 39,3 % |

Das entstandene Sorbinsäureanhydrid war heller gefärbt als das Sorbinsäureanhydrid aus den Versuchen mit Thionylchlorid, was an der größeren Verunreinigung mit Sorbinsäure lag. Der Sorbinsäureanteil im Rohprodukt lag über 50 %. Dies änderte sich auch nicht bei Modifikation der stöchiometrischen Faktoren der Edukte. Nebenprodukte und Isomere wurden nicht genau bestimmt, da eine Aufarbeitung bei der geringen Ausbeute nicht sinnvoll erschien.

Für die großtechnische Umsetzung ist diese Methode nicht geeignet, da die Ausbeute zu gering ist, die Reaktionszeiten sehr lang sind und die Synthese von Sorbinsäureanhydrid somit nicht rentabel durchzuführen wäre.

Reaktion mit Phosphorchloriden

Bei der Synthese nach Shriner und Struck ^[63] wird das Phosphorylchlorid (POCl₃) im Unterschuss (1: 0,5) eingesetzt und somit eine einstufige Synthese durchgeführt. Der Reaktionsansatz mit Sorbinsäure und Phosphorylchlorid wurde erhitzt, bis sich kein Chlorwasserstoffgas mehr bildete. Danach wurde die gelbliche Suspension über Nacht bei RT gerührt. Nach kurzer Wasserwäsche, Phasentrennung und Trocknung wurde eine Ausbeute von 27 % Sorbinsäureanhydrid erhalten.

Da die Reaktion nach Shriner und Struck nur eine geringe Ausbeute brachte, wurde eine zweistufige Synthese analog zum Patent „Verfahren zur Herstellung von Sorbinsäurehalogeniden“ ^[86] durchgeführt. Statt des angegebenen Polyesters wurde Sorbinsäure als Edukt eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde nach Destillation Sorbinsäurechlorid in Ausbeuten um 60 % erhalten. Ohne Zugabe von Spuren Pyridin sinkt diese Ausbeute um bis zu 10 % ^[87]. Das Sorbinsäurechlorid wurde danach mit Sorbinsäure versetzt und es entstanden ebenfalls bis zu 60 % Ausbeute, je nach Menge an Säurechlorid. Bei der Umsetzung des Chlorids zum Sorbinsäureanhydrid werden ungefähr 2 % Ausbeuteverluste einkalkuliert.

Tabelle 7: Reaktionsausbeuten ausgewählter Versuche mit Phosphorchloriden

| <i>Einsatzstoffe</i> | <i>LSM</i> | <i>Temperatur</i> | <i>Ausbeute SSCI</i> |
|--|------------|-------------------|----------------------|
| SS, Phosphorylchlorid ^[63] | | 150 °C | 27,3 % |
| SS, Phosphorylchlorid ^[86] | Toluol | 90 – 110 °C | 60,2 % |
| SS, Phosphorpentachlorid ^[86] | Toluol | 90 – 110 °C | 59,3 % |
| KS, Phosphorpentachlorid ^[86] | Toluol | 110 °C | 61,6 % |

Die Reaktion kann sowohl mit Phosphorylchlorid als auch mit Phosphorpentachlorid (PCl₅) als Edukt durchgeführt werden und erzielt vergleichbare Ausbeuten. Allerdings konnten die Ausbeuten, welche im Patent mit dem Polyester als Edukt erzielt werden konnten, mit Sorbinsäure als Edukt nicht erreicht werden.

Bei den verschiedenen Versuchen, die mit Phosphorchloriden durchgeführt wurden, könnten noch die Einsatzmengen der Edukte und des Lösungsmittels etwas verändert werden, um die Ausbeuten zu optimieren. Allerdings kommt es bei diesen Versuchen aufgrund der hohen Temperaturen vermehrt zur Bildung von isomeren Sorbinsäureanhydriden. Da dies vermieden

werden soll, ist auch diese Methode für eine Überführung in technischen Maßstab nicht geeignet.

Reaktion mit Phosgen

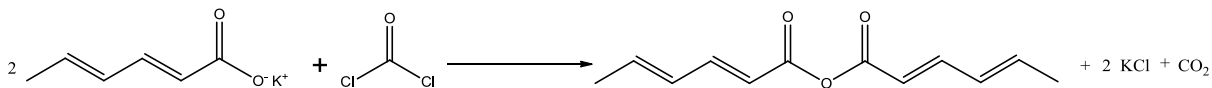


Abbildung 7: Reaktionsgleichung mit Phosgen

In der Literatur zur Herstellung von Anhydriden mit Phosgen ist die Phosgenierung von Carbonsäuren in Gegenwart von Hilfsbasen (z.B. Triethylamin) beschrieben ^[88]. Analog hierzu wurde Sorbinsäure mit Phosgen in Toluol bei Anwesenheit eines Äquivalents TEA bei einer Temperatur von 50 °C umgesetzt. Nach Filtration des gebildeten Triethylaminhydrochlorids und Entfernen des Lösungsmittels wurde ein dunkel gefärbtes Sorbinsäureanhydrid (87 % Ausbeute) erhalten. Dieses Produkt enthielt ca. 1 % Sorbinsäureanhydrid-Isomere. Da sowohl die Isomere im Endprodukt unerwünscht sind, als auch die dunkle Färbung des Produkts nicht den Vorstellungen eines Kunden entspricht, wurde die Synthesemethode verändert, um dieses zu vermeiden. Bei Versuchen zur Optimierung gelang es, bei Temperaturminderung weniger Isomere zu erzeugen. Auch der Austausch der Sorbinsäure gegen Kaliumsorbat brachte eine Verringerung der Isomere auf 0,4 %, sowie eine erhöhte Ausbeute (91 %). Zudem musste das Triethylamin nicht mehr als Hilfsbase eingesetzt werden. Schließlich wurde das Lösungsmittel Toluol durch Ethylacetat ersetzt, um die anschließende Entfernung des Lösungsmittels zu erleichtern. Abschließend wurde die Raum-Zeit-Ausbeute der Methode optimiert, dazu wurde die Menge des eingesetzten Lösungsmittels verringert. Eine optimale Ausbeute und gute Durchführbarkeit des Versuches zeigte sich bei einem Startgehalt der Suspension von 40 % Kaliumsorbat.

Kaliumsorbat wurde somit in Ethylacetat bei 0 – 10 °C mit 0,45 mol Phosgen umgesetzt und über Nacht bei RT gerührt. Danach wurde der Reaktionsansatz mit Wasser versetzt, um das entstandene Kaliumchlorid zu lösen und die Mischung wurde im Scheidetrichter abgetrennt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Endprodukt enthielt 95 bis 97 % Sorbinsäureanhydrid, 1 bis 2,5 % Sorbinsäure, zwischen 0,1 bis 1 % Sorbinsäurechlorid und circa 0,2 % Sorbinsäureanhydrid-Isomere. Bei längerer Wasserwäsche ist im Produkt kein Sorbinsäurechlorid mehr enthalten, allerdings erhöht sich die Menge der Sorbinsäure durch die ausgelöste Hydrolyse auf bis zu 4,5 %.

Diese Methode ist großtechnisch gut durchführbar, zudem sind die Eduktkosten relativ gering und es werden hohe Ausbeuten erzielt, dies führt zu der Möglichkeit, eine großtechnische Sorbinsäureanhydrid-Anlage rentabel zu bewirtschaften.

Synthese mit Diphenylchlorophosphat

Honda et. al. ^{[69][70]} synthetisierten 2003 Sorbinsäureanhydrid als ersten Schritt einer Totalsynthese von Securinin aus Sorbinsäure mit Diphenylchlorophosphat. Nach dieser Methode (siehe experimenteller Teil) wurden ca. 100 g Sorbinsäureanhydrid zur Bestimmung von Stoffeigenschaften wie Hydrolysedaten und Lagerstabilitätsdaten hergestellt. Auch wurden die ersten Spektren von Sorbinsäure mit dem Produkt dieser Reaktion (JB 005-DPCP) aufgenommen.

Das bei niedrigen Temperaturen (0 – 20 °C) entstandene Sorbinsäureanhydrid ist leicht gelblich gefärbt. Die Produktausbeute betrug analog zur beschriebenen Literatur zwischen 73 und 75 %. Durch das Ausschütteln mit Ammoniumchlorid-Lösung wird eine vormals höhere Rohausbeute auf diese 73 – 75 % der Theorie verringert, da aber die Verunreinigung mit Sorbinsäure relativ gering ist (3 %), entstand ein Produkt, welches für mikrobiologische Tests eingesetzt werden kann. Der Prozentanteil von Isomeren in dem Produkt betrug max. 0,1 %.

Da die Kosten für Diphenylchlorophosphat sehr hoch sind und eine Wäsche mit Ammoniumchlorid-Lösung sehr lange dauert, ist dieses Verfahren für ein großtechnisches Up Scaling nicht geeignet.

Beim Vergleich aller aufgeführten Chlorierungsreaktionen wird deutlich, dass mit Phosgen als Chlorierungsmittel die höchsten Ausbeuten von Sorbinsäurechlorid erzielt werden. Folglich ist auch hier die Ausbeute an Sorbinsäureanhydrid am höchsten, da die Ausbeute bei den zweistufigen Reaktionen vom ersten Reaktionsschritt abhängig ist. Bei den einstufigen geführten Reaktionen sind die Synthesen mit Hilfe von Thionylchlorid oder Phosgen die Reaktionen, die die beste Ausbeute erbringen. Großtechnisch werden heutzutage die meisten Säurechlorid- und Anhydridsynthese mit Hilfe von Thionylchlorid oder Phosgen durchgeführt, da hier die Kosten für Edukte gering sind, die Ausbeuten verhältnismäßig hoch sind und sowohl kontinuierlich, als auch batchweise produziert werden kann. Sorbinsäureanhydrid soll später in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden, deswegen ist es zudem notwendig, das Produkt in Lebensmittelqualität herzustellen. Da bei der Reaktion von Sorbinsäure mit Thionylchlorid mit hoher Wahrscheinlichkeit Rückstände von Schwefel im Produkt verbleiben, ist diese Methode weniger gut geeignet, um Sorbinsäureanhydrid herzustellen. So emp-

fiel sich als kostengünstige Methode mit hoher Ausbeute und wenig Nebenkomponenten die Synthese von Sorbinsäureanhydrid mit Phosgen.

3.2.3 Synthese mit Dicyclohexylcarbodiimid

Eine weitere, spezielle Synthese von Carbonsäureanhydriden kann auch mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) durchgeführt werden. Dabei entsteht aus DCC und einer Carbonsäure zunächst ein O-Acylisoharnstoff, der wiederum mit Carbonsäure zu einem Anhydrid reagieren kann.

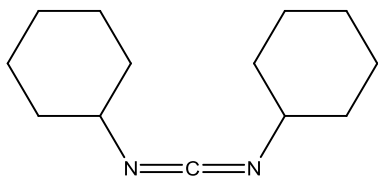


Abbildung 8: Dicyclohexylcarbodiimid

Der Reaktionsansatz wurde zunächst bei 20 °C gerührt. Da nach 24 h keine Reaktion stattgefunden hatte, wurde die Suspension dann auf 30 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur fand eine Umsetzung statt. Nach zwei Tagen wurde extrahiert und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt. Es bildete sich ein gelbliches Öl, aus welchem Sorbinsäureanhydrid bei Raumtemperatur auskristallisierte. Die Ausbeute verschiedener Versuche bei Temperaturen zwischen 20 und 40 °C und unterschiedlich langer Rührzeiten betrug im Durchschnitt 67 %. Mit den wässrigen Phasen konnte ein großer Teil der nicht umgesetzten Sorbinsäure entfernt werden, so dass im Produkt nur noch ein Anteil von 1,9 % vorlag. Auch dieses Produkt wurde für die mikrobiologischen Versuche genutzt.

Die großtechnische Synthese mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid ist, genau wie die Methode mit DPCP, viel zu teuer, als dass eine Anlage rentabel betrieben werden könnte. Um einen Analysenstandard im Labormaßstab herzustellen, wurde diese Methode aber bevorzugt verwendet.

Beim Vergleich aller Synthesewege kann eindeutig festgestellt werden, dass bei den Synthesen mit Thionylchlorid, Phosgen und Diphenylchlorophosphat die größten Ausbeuten erzielt werden (siehe Tabelle 29 im Anhang). Thionylchlorid und Phosgen werden in der Industrie häufig für Chlorierungen verwendet. Diphenylchlorophosphat hingegen ist als Edukt, wie oben erwähnt, viel zu teuer für eine großtechnische Umsetzung.

3.2.4 „Up scaling“ für den Produktionsmaßstab

Es gibt verschiedene Kriterien, die eine Methode erfüllen muss, damit sie auf Produktionsmaßstab vergrößert werden kann. Für die Synthese des Sorbinsäureanhydrids im Produktionsmaßstab (zunächst bis 1000 kg) muss eine Synthesemöglichkeit ausgewählt werden, die hohe Ausbeuten und eine hohe Reinheit erzielt. Zudem muss sie im Produktionsbetrieb umsetzbar sein und die Kosten für Edukte und Produktion sollten so günstig, wie möglich sein. Da das Sorbinsäureanhydrid als Konservierungsmittel für Lebensmittel eingesetzt werden soll, ist es ebenfalls nötig, manche Einsatzstoffe bzw. Reaktionsprodukte selbst im ppm-Bereich zu vermeiden, um ein Produkt in Lebensmittelqualität zu erzeugen.

Deswegen fallen zuerst die Methoden weg, die zu geringe Ausbeuten (bis 60 %) erzeugen. Das sind die Methoden mit Phosphor- und Schwefelsäure, Phosphorpentoxid, Thionylchlorid (ohne Zusatz), Oxalylchlorid, Phosphorylchlorid und Phosphorpentachlorid. Auch die Synthesen mit Hilfe von Diphenylchlorophosphat und Dicyclocarbodiimid fallen aufgrund der Eduktkosten weg.

Es bleiben noch die modifizierten, zweistufigen Methoden mit Thionylchlorid und die einstufige Phosgensynthese übrig. Wie oben erwähnt muss das Produkt in Lebensmittelqualität synthetisiert werden, weshalb auch die Herstellung mit Thionylchlorid großtechnisch ausfällt. So eignet sich zur Optimierung und Vergrößerung auf Produktionsmaßstab nur die Sorbinsäureanhydrid-Synthese mittels Phosgen. Bei dieser Methode ist die Ausbeute sehr hoch, das Rohprodukt entspricht den Spezifikationsvorgaben, so dass nur ein Reinigungsschritt benötigt wird. Die Färbung des Produkts ist sehr hell, die Eduktkosten sind gering und die Synthese ist mit einfachen Mitteln realisierbar.

Besonders beachtet werden muss die Toxizität des Phosgens, der stöchiometrisch genaue Einsatz der Edukte und die Zeiten während Wasserwäsche und Destillation des Lösungsmittels. Da Phosgen großtechnisch seit vielen Jahren zur Chlorierung diverser Stoffe verwendet wird, gibt es viele Schutzmaßnahmen, die einen sicheren Umgang mit Phosgen gewährleisten. Phosgen ist außerdem sehr reaktiv, deswegen reagiert es schnell ab, so dass eine Gefährdung nur von kurzer Dauer ist. Zudem kann überschüssiges Phosgen nach einer Reaktion aus dem Ansatz ausgetrieben und aufgefangen werden, so dass es nicht in die Umwelt gelangt.

3.3 Charakterisierung und Stoffeigenschaften von Sorbinsäureanhydrid

3.3.1 Stoffeigenschaften und Spektren von Sorbinsäureanhydrid

Sorbinsäureanhydrid ist ein weißlich-gelber Feststoff mit einem Schmelzbereich zwischen 36 und 38 °C. Der Geruch ist süßlich und leicht stechend. Die Wasserlöslichkeit beträgt 0,39 g/L bei 20 °C. Der pH-Wert bei dieser Löslichkeit ist 5,2. Der Siedepunkt liegt bei 0,2 mbar über 120 °C.

Tabelle 8: Spezifikation von Sorbinsäureanhydrid

| | | |
|-------------------|---|------------------------|
| Name | Sorbinsäureanhydrid, (<i>all-E</i>)-2,4-Hexadiensäureanhydrid, (2 <i>E</i> ,2' <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,4' <i>E</i> -Hexadienoicacid,1,1'-anhydride) | |
| Summenformel | C ₁₂ H ₁₄ O ₃ | |
| molare Masse | 206,2 g/mol | |
| pH-Wert | 5,2 | bei 0,39 g/L bei 25 °C |
| Schmelzpunkt | 36 – 38 °C | |
| Siedepunkt | > 120 °C | bei 0,2 mbar |
| Wasserlöslichkeit | 0,39 g/L | bei 20 °C |
| CAS-Nummer | 13390-06-2 | |

UV-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid

Das UV-Spektrum wurde mit Hilfe der HPLC-Anlage (Gerät 1) aufgenommen. Das Extinktionsmaximum von Sorbinsäureanhydrid liegt im UV-Bereich bei 280 nm. Der Kurvenverlauf ähnelt dem der Sorbinsäure, ist aber von 264 nm um 16 nm auf 280 nm verschoben.

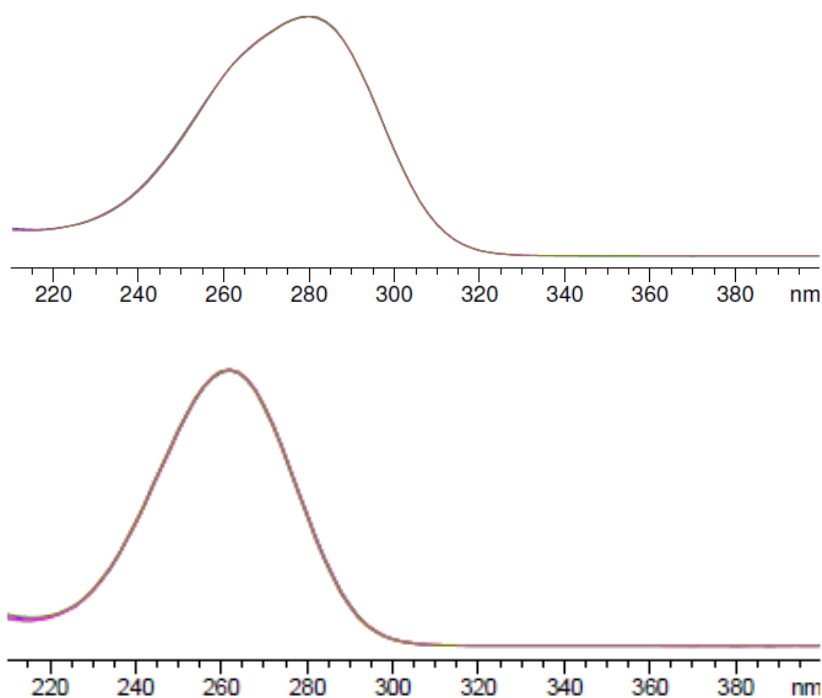


Abbildung 9: UV-Spektren von Sorbinsäureanhydrid (oben) und Sorbinsäure (unten) als Vergleich ^[89]

Infrarot-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid

Im Infrarotspektrum von E,E-2,4-Hexadiensäureanhydrid sind die Banden der C=O-Doppelbindung bei $1764 + 1709 \text{ cm}^{-1}$ deutlich zu erkennen. Auch sind zwischen 1380 und 1130 cm^{-1} die Banden der Anhydrid-Bindungen sichtbar.

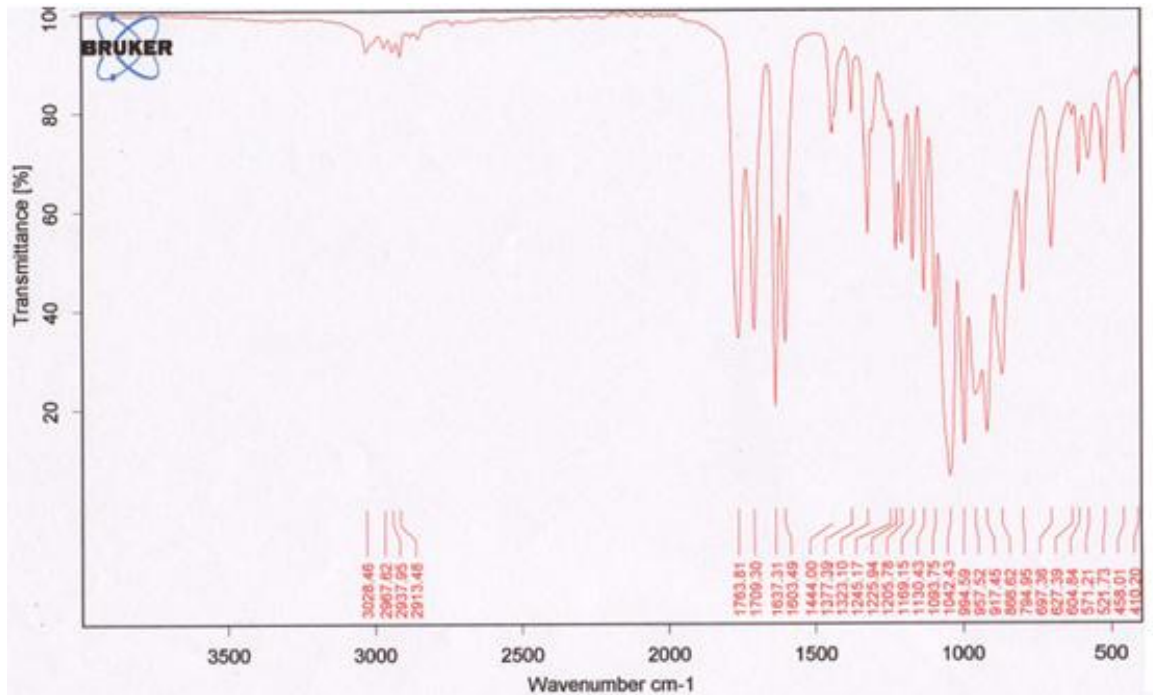


Abbildung 10: IR-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid (KBr)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3030 - 2910 \text{ cm}^{-1}$
 $1764 + 1709 \text{ cm}^{-1}$ (s, C=O)
 $1380 - 1130 \text{ cm}^{-1}$ (w, Anhydride)

Das Spektrum von Sorbinsäureanhydrid ist zwischen 1300 und 400 cm^{-1} mit Sorbinsäure vergleichbar. Typisch bei beiden Molekülen sind die zwei Doppelbanden zwischen 1600 und 1800 cm^{-1} . Erst im Bereich unter 1300 cm^{-1} , also im Fingerprintbereich unterscheiden sich die beiden Infrarotspektren (vgl. IR-Spektrum von Sorbinsäure im Anhang).

Massenspektrum von Sorbinsäureanhydrid

Das Massenspektrum von Sorbinsäureanhydrid zeigt den höchsten Peak bei 113,0 Dalton an. Dies ist ein Sorbinsäure-Fragment $[M_{SS}+H]^+$.

Der Massenpeak von Sorbinsäureanhydrid ist dreimal erkennbar: als Masse + Wasserstoff (207,1), als Masse + Ammonium (224,1) und als Masse + Natrium (229,1).

Ebenfalls erkennbar sind die Anlagerungen zweier Sorbinsäureanhydrid-Moleküle an Ammonium- bzw. Natriumionen bei Massen von 430,2 bzw. 435,1 g/mol. Durch die durchgeführte Elektrospray-Ionisation wurden keine weiteren Fragmente erzeugt.

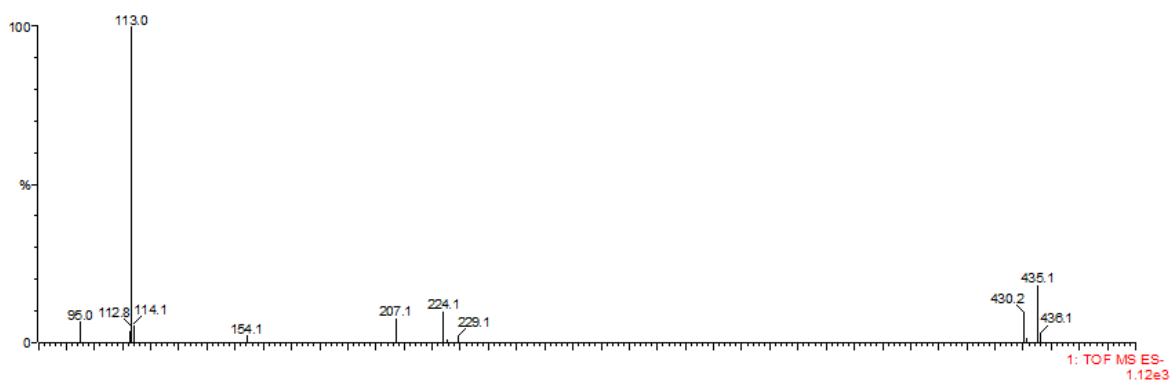
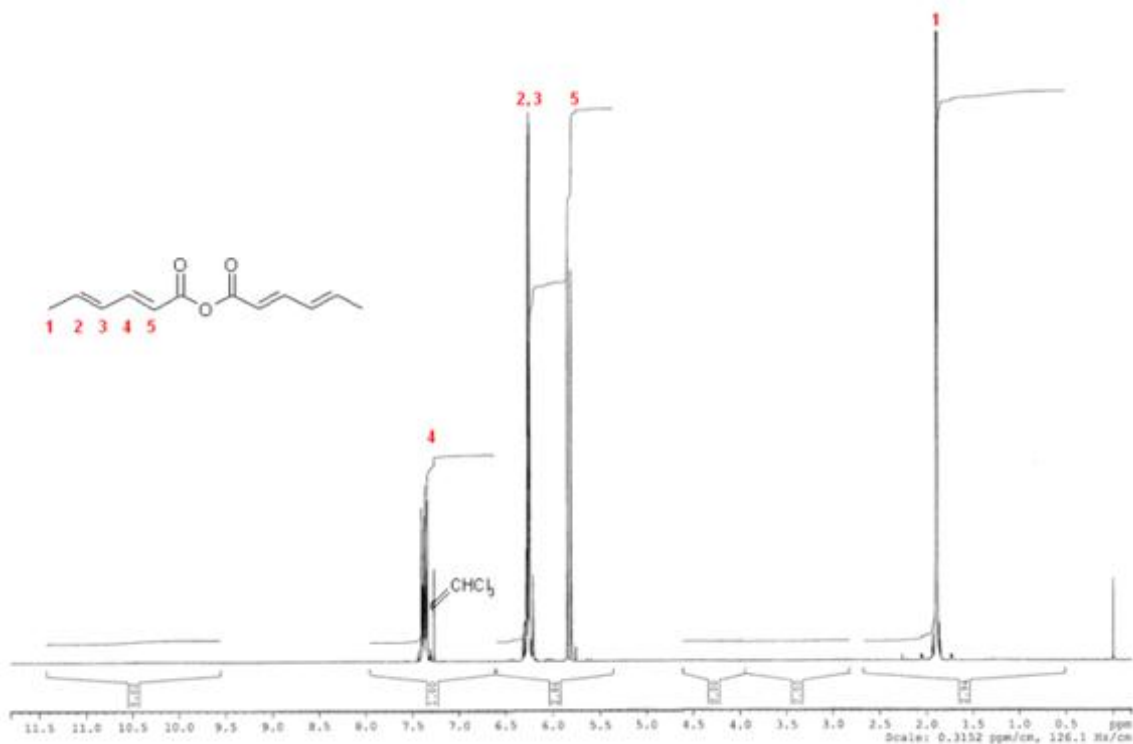


Abbildung 11: LC-MS Spektrum von Sorbinsäureanhydrid

MS:

| | | |
|------|-------|--------------------------------------|
| m/Z= | 113,0 | (100, [$M_{SS}+H$] ⁺) |
| | 207,1 | (10, [$M + H$] ⁺) |
| | 224,1 | (12, [$M + NH_4$] ⁺) |
| | 229,1 | (2, [$M + Na$] ⁺) |
| | 430,2 | (14, [$2M + NH_4$] ⁺) |
| | 435,1 | (20, [$2M + Na$] ⁺) |

¹H-NMR-Spektrum von SorbinsäureanhydridAbbildung 12: ¹H-NMR-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid

| | | | |
|---------------------|------------|----------|-----------------------------|
| ¹ H-NMR: | $\delta =$ | 1,89 ppm | (m, 6H, CH ₃ -1) |
| | | 5,82 ppm | (d, 2H, CH-5) |
| | | 6,25 ppm | (m, 4H, CH-2, CH-3) |
| | | 7,37 ppm | (m, 2H, CH-4) |

Im Protonen-NMR-Spektrum sind vier Peaks zu erkennen, die durch Sorbinsäureanhydrid verursacht werden. Bei 1,89 ppm ist ein Multipllett zu sehen, welches die sechs Wasserstoffatome der beiden Methylgruppen anzeigt. Bei 5,82 ppm wird ein Duplett angezeigt, welches durch die zwei H-Atome an Stelle Nummer 5 verursacht wird. Der Peak bei 6,25 ppm wird von 4 Wasserstoffatome ausgelöst wird, die an Stelle 2 und 3 im Molekül liegen und die beiden Wasserstoffatome an CH-4 werden bei 7,37 ppm angezeigt.

Diese Peaks und ihre Kopplungen lassen erkennen, dass die trans-Form von Sorbinsäureanhydrid vorliegt. Zudem ist keine Säurefunktion mehr erkennbar, was die Reinheit des Produkts anzeigt. Dieses Spektrum ist vergleichbar mit den NMR-Ergebnissen von Honda et. al. [70] und zeigt die bei einem Diensystem erwarteten Peaks.

¹³C-NMR-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid

Das C-NMR-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid ist mit dem Spektrum von Sorbinsäure vergleichbar. Die C-Atome 2 bis 6 weisen die gleichen Peaks auf. Einzig der Peak des C-Atoms 1 verschiebt sich von 173 auf 163 ppm. Es zeigt sich der Unterschied der Kohlenstoffatome der Carbonylfunktion im Vergleich mit Kohlenstoffatomen der Anhydridfunktion. Vergleiche dazu das C-NMR-Spektrum von Reger und Habib ^[90].

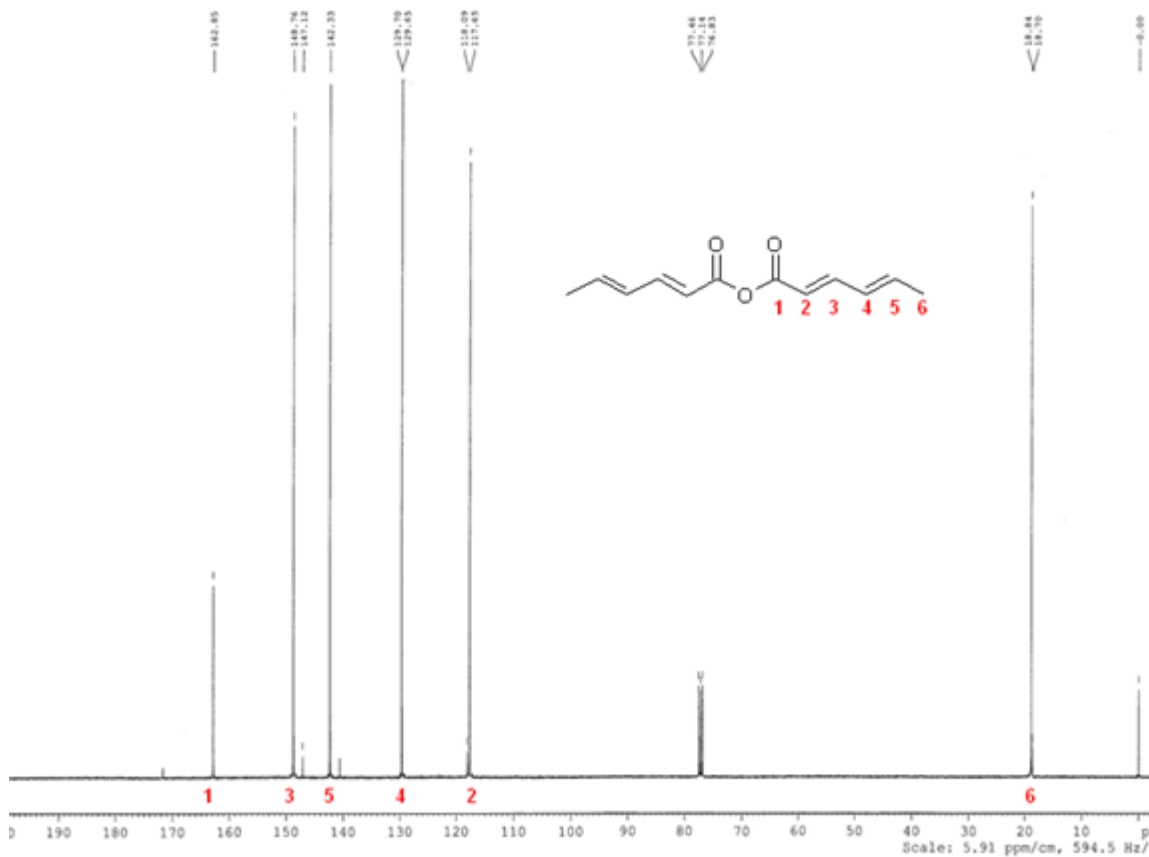


Abbildung 13: ¹³C-NMR-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid

| | | | |
|----------------------|-----|---------|-----------|
| ¹³ C-NMR: | δ = | 19 ppm | (2C, C-6) |
| | | 118 ppm | (2C, C-2) |
| | | 130 ppm | (2C, C-4) |
| | | 143 ppm | (2C, C-5) |
| | | 149 ppm | (2C, C-3) |
| | | 163 ppm | (2C, C-1) |

HPLC-Chromatogramm von Sorbinsäureanhydrid

Für die HPLC-Messung von Sorbinsäure als Konservierungsmittel in Lebensmitteln gibt es viele verschiedene, auch zertifizierte Methoden ^{[91][92][93][94][95][96][97]}. Die verschiedenen HPLC-Messungen dieser Arbeit wurden auf drei verschiedenen Analysengeräten durchgeführt. Es wurde immer die gleiche Säule benutzt, aber das Laufmittel musste je nach Anlage verändert werden, so dass es zu unterschiedlichen Retentionszeiten für Sorbinsäure und Sorbinsäureanhydrid kam. Das folgende Chromatogramm wurde an LC 2 aufgenommen.

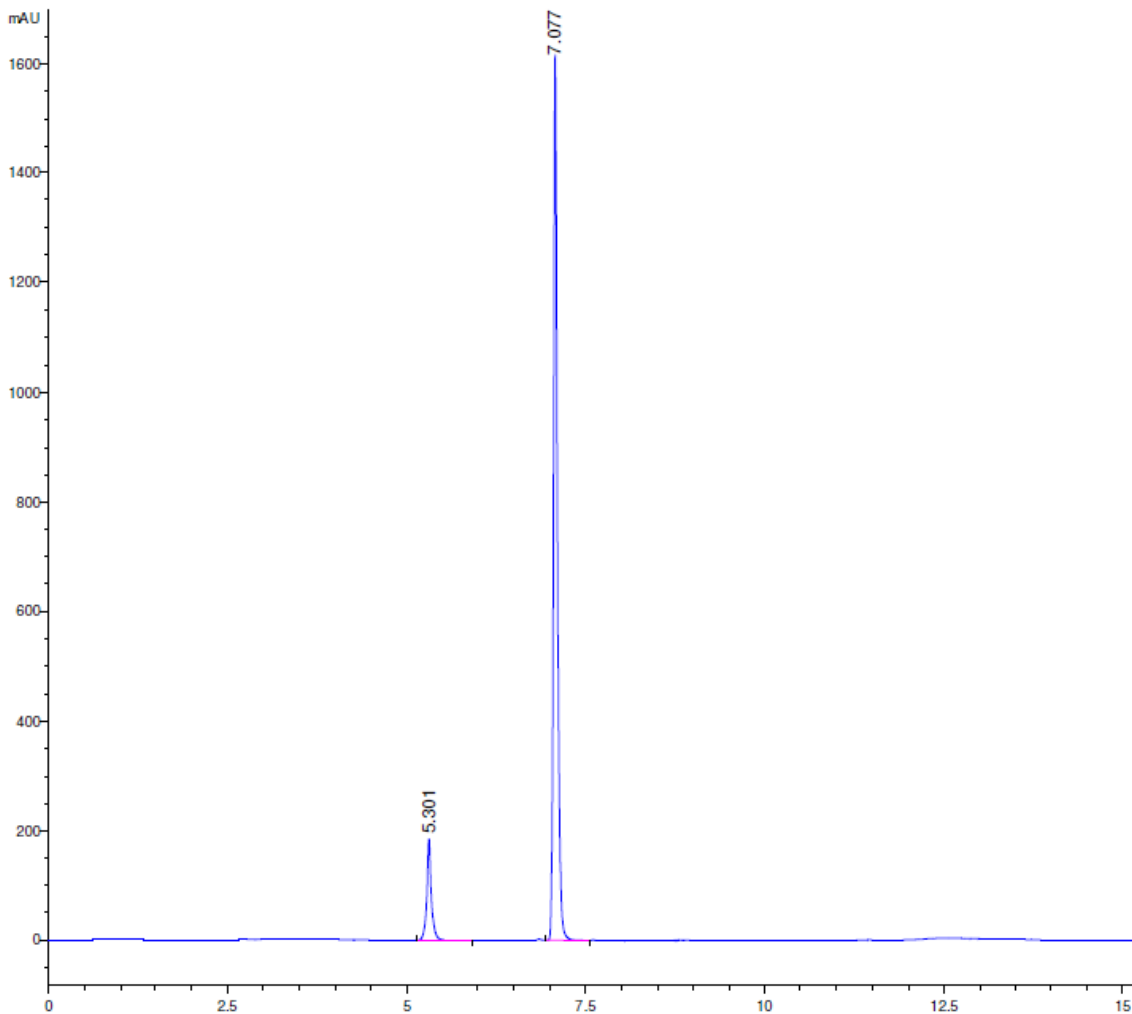


Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von Sorbinsäureanhydrid (280 nm)

Die Retentionszeit von Sorbinsäure beträgt 5,30 min und die Retentionszeit von Sorbinsäureanhydrid beträgt 7,08 min.

GC-Chromatogramm von Sorbinsäureanhydrid

Unten abgebildet ist ein Ausschnitt aus dem GC-Chromatogramm von Sorbinsäureanhydrid. Zu sehen sind drei Peaks, die von Sorbinsäureanhydrid und den beiden dazugehörigen Isomeren verursacht werden. Da das Isomer mit der geringsten Retentionszeit nur in sehr kleiner Konzentration vorkommt, war es nötig, die Konzentration von Sorbinsäureanhydrid in der Probelösung zu erhöhen. Deshalb ist der Hauptpeak (All-E-Sorbinsäureanhydrid) in der Abbildung abgeschnitten.

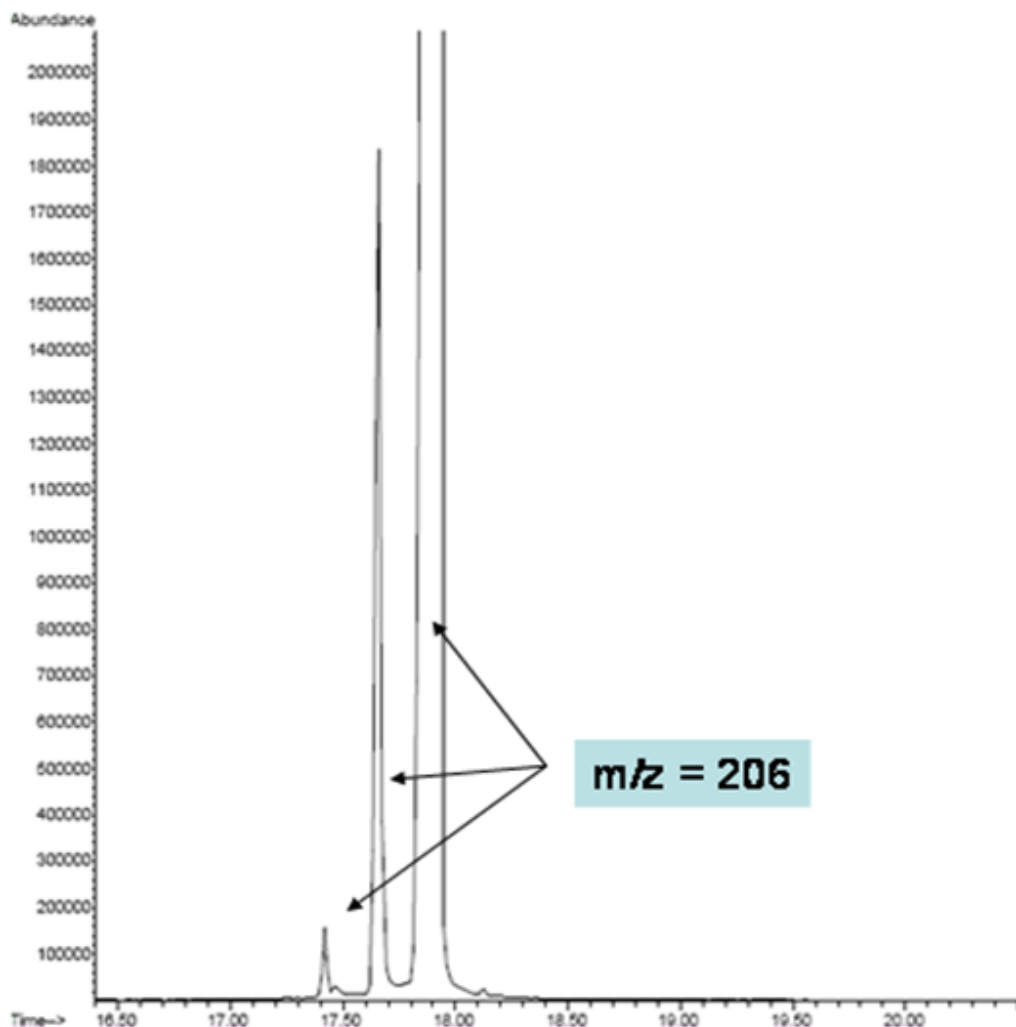


Abbildung 15: Ausschnitt des GC-Chromatogramms von Sorbinsäureanhydrid

Die Retentionszeit von Isomer 1 beträgt 17,4 min. Die Retentionszeit von Isomer 2 beträgt 17,65 min. und die Retentionszeit von E,E-2,4-Hexadiensäureanhydrid beträgt 17,9 min. Die Messbedingungen sind im experimentellen Teil aufgeführt. Vorlagen für diese Bedingungen ergaben sich aus der Literatur nach Stafford und Black ^[98], die Sorbinsäure aus getrockneten Pflaumen nachwies. Ebenso gibt es verschiedene andere Methoden, die Sorbinsäure per Gaschromatographie aus unterschiedlichen Lebensmittel nachgewiesen haben ^{[99][100][101]}.

MALDI-Massenspektrum von Sorbinsäureanhydrid

Die Sorbinsäureanhydrid-Probe wurde für das MALDI-Massenspektrum mit Kaliumchlorid versetzt. Als Matrix wurde 2,4-Dihydroxybenzoesäure (DHB, 154,1 g/mol) verwendet. Auch hier gibt es Methoden zur Bestimmung von Sorbinsäure^[102], diese wurden zur Orientierung für erste Messungen benutzt. Danach wurden die Bedingungen für Sorbinsäureanhydrid optimiert.

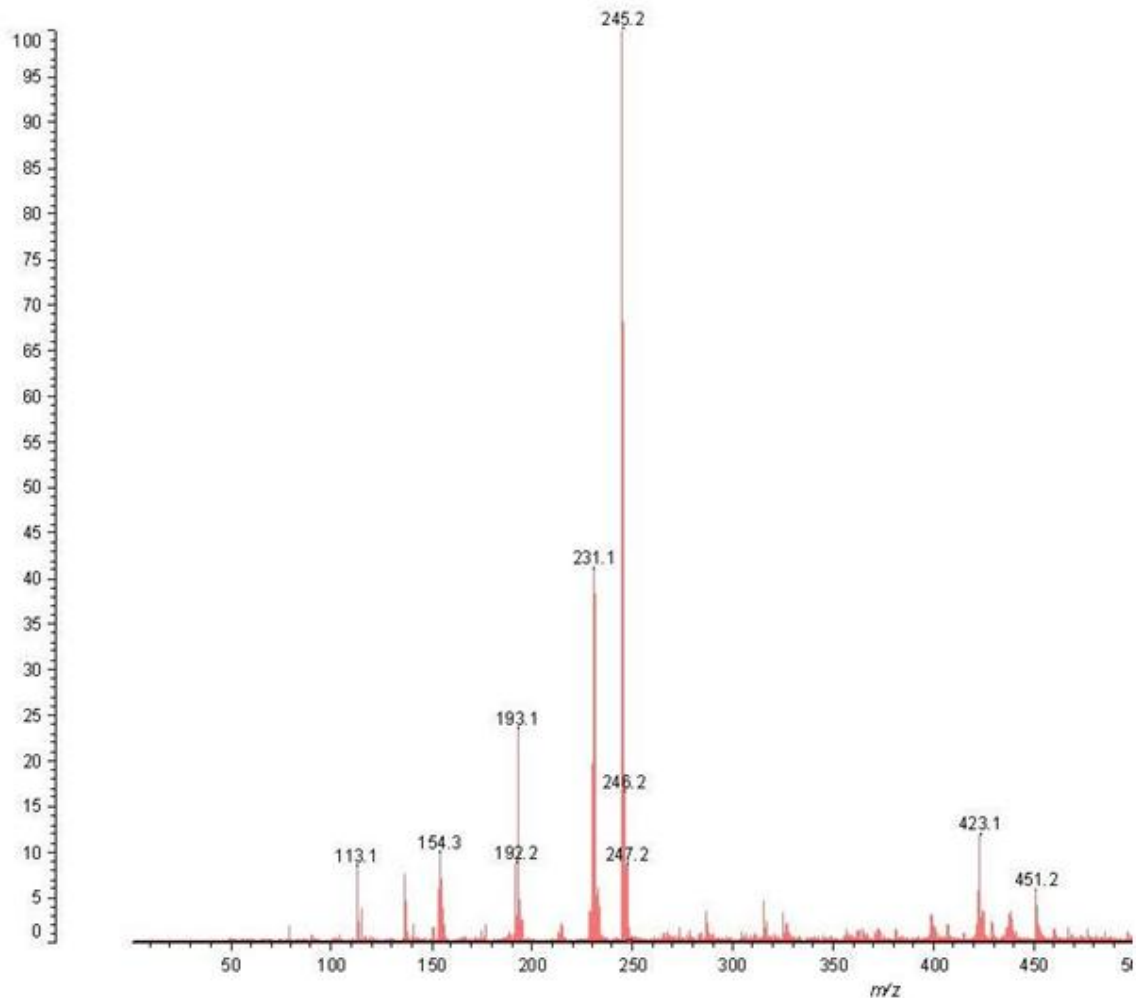


Abbildung 16: MALDI-TOF-MS-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid

Im MALDI-Spektrum können Sorbinsäure (m/z : 113,1 $[M+H]^+$) und Sorbinsäureanhydrid (m/z : 245,2 $[M+K]^+$) angezeigt werden. Auch bei 423,1 (12, $[2M - C_2H_4 + K]^+$) und 451,2 (5, $[2M + K]^+$) wird die Masse von Sorbinsäureanhydrid sichtbar.

3.3.2 Formulierung von Sorbinsäureanhydrid

Um den Umgang mit Sorbinsäureanhydrid in der Praxis zu erleichtern, muss eine Formulierung gefunden werden, bei der das Anhydrid stabil gelagert werden kann. Außerdem muss eine gute Dosierbarkeit gewährleistet sein.

Da das Produkt nach der Destillation des Lösungsmittels als flüssige Schmelze vorliegt, ist es mit geringem Aufwand möglich, Pastillen herzustellen. Diese sind gut dosierbar und einfach handzuhaben. Im Labormaßstab wurden per Hand einige Pastillen auf Glas gegossen. Anhand des Fotos wird deutlich, dass es schwierig ist, einheitliche Pastillen einer bestimmten Größe zu erzeugen. Von Vorteil wären runde Pastillen mit einem Durchmesser von bis zu einem Zentimeter, da die Oberfläche der Pastillen dann nicht so groß wäre. Da die Oberflächenspannung der Schmelze bei einer Temperatur von größer 40 °C relativ gering wird, ist dies aber per Hand nicht möglich. Die größeren Pastillen sind unregelmäßig geformt und eher flach.

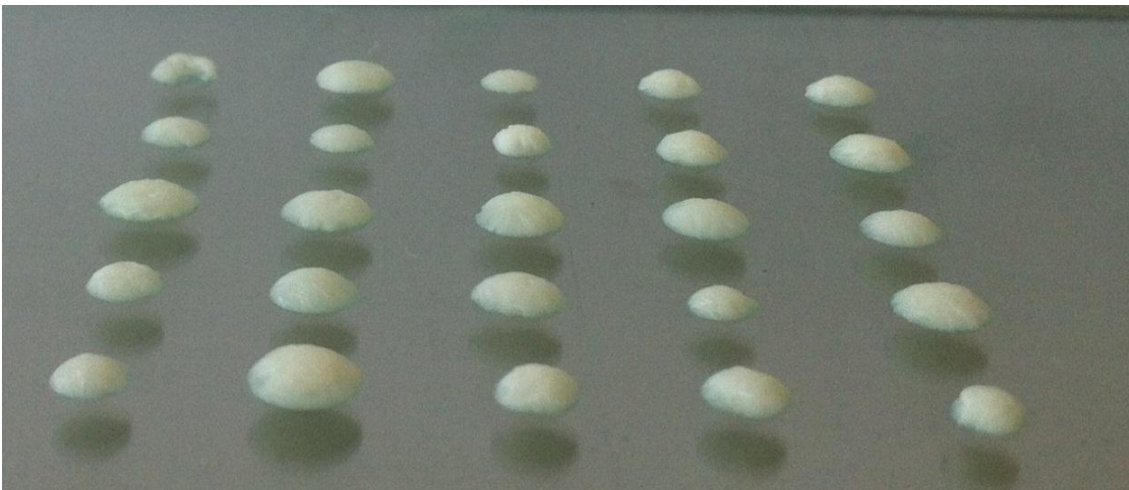


Abbildung 17: Vorversuch zur Pastillierung von Sorbinsäureanhydrid bei 40 °C

Die kleineren Pastillen dagegen besitzen eine runde Oberfläche und sind eher reproduzierbar herzustellen. Prinzipiell ist es also möglich, Pastillen zu gießen.

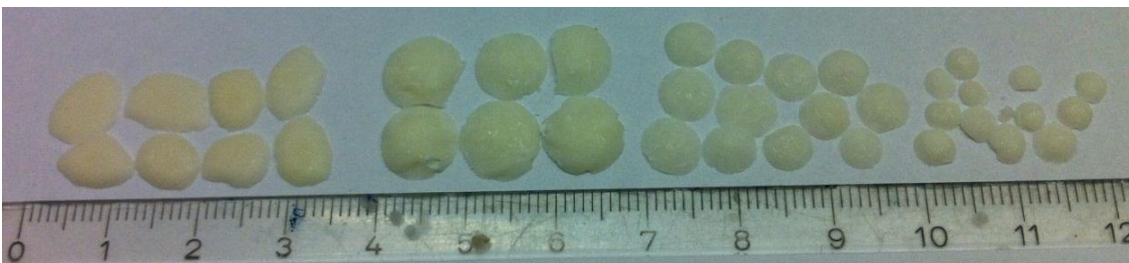


Abbildung 18: Vergleich der verschiedenen Pastillengrößen

Nach diesen Vorversuchen wurde eine Pastillierung von Sorbinsäureanhydrid im größeren Maßstab durchgeführt. Dazu wurde Sorbinsäureanhydrid kurzzeitig auf 50 °C erhitzt und

Tropfen auf einen Pastillierteller getropft. Durch Veränderung der Tropfgeschwindigkeit bzw. der Tropfengröße und der Fallhöhe, sowie der Temperaturregelung und der Materialwahl des Tellers wurden verschiedene Pastillen hergestellt. Die Pastillierung konnte in sauerstoffarmer Atmosphäre betrieben werden.

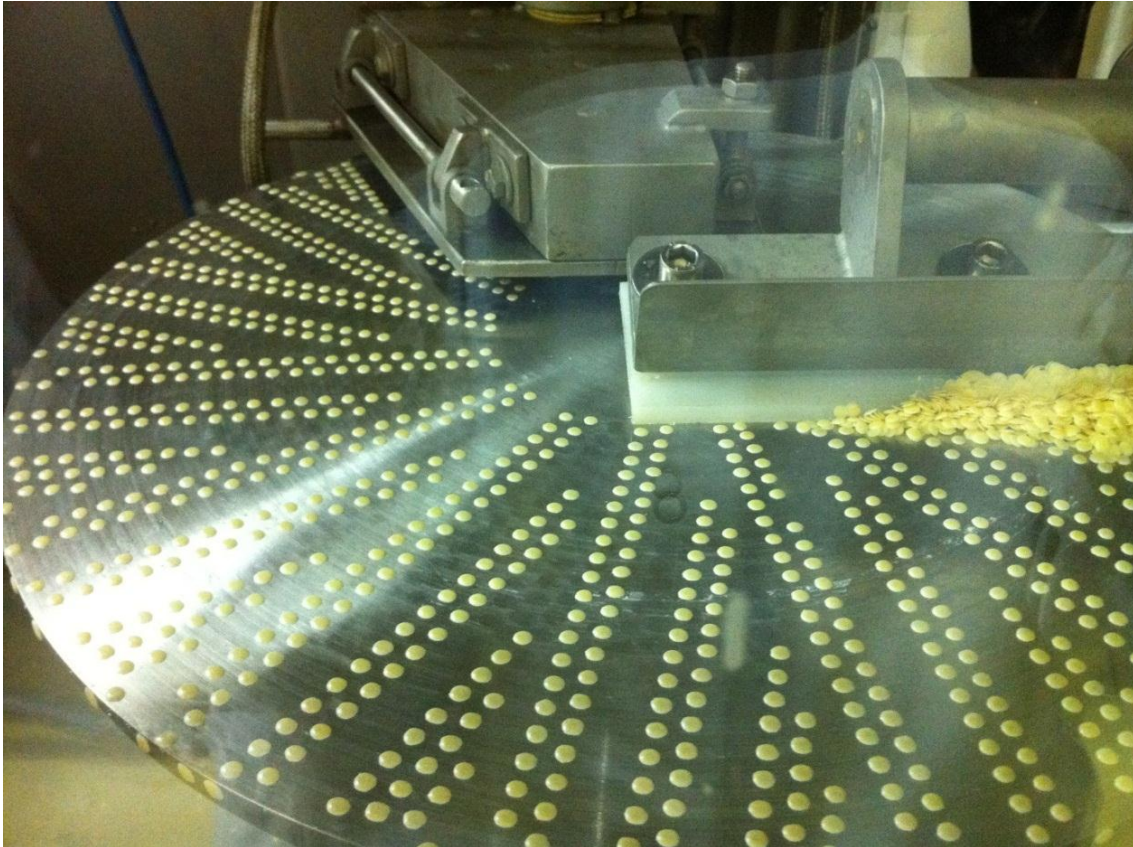


Abbildung 19: Pastillierteller der Firma Gouda GMF

Es wurden vier verschiedene Pastillierversuche durchgeführt. Die ersten beiden Versuche wurden mit Rohware durchgeführt, welche einen Sorbinsäureanhydrid-Gehalt von 92 % aufwies, die anderen beiden Versuche wurden ungefähr 95 % Rohware durchgeführt. Die Pastillierung wurde so beendet, dass je mindestens 500 g des Anhydrids im Schmelzbehälter zurückblieben.

Nach der Pastillierung wurden die Pastillen auf ihre Form und ihren Sorbinsäureanhydridgehalt überprüft. Die Höhe der Pastillen betrug zwischen 0,7 – 1,4 mm. Der Durchmesser der Pastillen bewegte sich zwischen 5 und 9 mm. Das Gewicht der Pastillen schwankte dadurch zwischen 16 und 40 mg. Im Schmelzbehälter blieben jeweils Rückstände zurück, die bereits zu polymerisieren zu beginnen. Deshalb erhöhte sich der Sorbinsäureanhydrid-Gehalt der Pastillen auf 96 %. Das Prinzip der Aufreinigung durch Schmelzen, wie es beim Zonenschmelzverfahren angewendet wird, funktioniert also auch hier. Allerdings kann das An-

hydrid nur für einen kurzen Zeitraum in Schmelze gehalten werden, da wie oben beschrieben, die Polymerisation bereits einsetzte.

Tabelle 9: Daten der Pastillierung

| <i>Versuch Nummer</i> | <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Rohware (Gehalt SSA) | 92,0% | 92,0% | 95,0% | 95,0% |
| Pastille (Gehalt SSA) | 96,3% | 96,2% | 94,4% | 93,1% |
| Höhe der Pastillen | 1,4 mm | 1,0 mm | 0,9 mm | 0,7 mm |
| Durchmesser der Pastillen | 7 – 9 mm | 5 – 6 mm | 5 – 7 mm | 5 – 7 mm |
| Gewicht (100 Pastillen) | 3,98 g | 2,23 g | 2,3 g | 1,6 g |
| Gewicht (1 Pastille) | 39,8 mg | 22,3 mg | 23,0 mg | 16,0 mg |
| Kühlzeit | 47 s | 47 s | 38 s | 38 s |
| Fallhöhe der Tropfen | 6 mm | 4 mm | 4 mm | 4 mm |
| Vakuumhub | 14 mm | 9 mm | 9 mm | 6 mm |
| Kühlmedium | 1 °C | 1 °C | 4 °C | 4 °C |
| Heizmedium | 42 °C | 42 °C | 47 °C | 47 °C |
| Temperatur im Schmelzbehälter | 46,5 °C | 43,0 °C | 48,0 °C | 46,5 °C |
| Temperatur am Messer | 15,0 °C | 6,3 °C | 7,6 °C | 6,2 °C |
| Luftfeuchtigkeit im Gehäuse | 30,0% | 30,0% | 38,0% | 38,0% |
| Temperatur im Gehäuse | 26,0 °C | 30,0 °C | 28,0 °C | 27,0 °C |

Nach Analyse des Sorbinsäureanhydrid-Gehalts wurden auch die Isomer- und Sorbinsäureanteile analysiert. Charge Nummer 1 wurde bis zur Analyse unter Stickstoff gelagert. Charge Nummer 2 wurde ohne Schutzgas gelagert. Probe 4 C wurde aus Charge 2 entnommen und unter Stickstoff gelagert. Die unter Stickstoff gelagerten Proben enthielten am meisten Sorbinsäureanhydrid. Der Gehalt aller drei pastillierten und unter Stickstoff gelagerten Proben lag über 96 %. Da der Ausgangsgehalt der Rohware nur bei ca. 95 % lag, fand durch die Pastillierung eine Reinigung des Anhydrids statt. Im Schmelzbehälter blieb polymerisiertes Material zurück, welches dunkler war, als die Ausgangsware.

Tabelle 10: Analysen der Pastillen

| <i>Versuch</i> | <i>1 A</i> | <i>1 B</i> | <i>4 A</i> | <i>4 B</i> | <i>4 C</i> |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------|
| Charge | Nr. 1 | Nr. 1 | Nr. 2 | Nr. 2 | Nr. 2, N ₂ |
| Gehalt SSA [%] | 96,33 | 96,15 | 94,36 | 93,06 | 96,47 |
| Gehalt SSA Isomer 1 [%] | 0,04 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| Gehalt SSA Isomer 2 [%] | 0,15 | 0,13 | 0,37 | 0,10 | 0,10 |
| Gehalt SS [%] | 3,60 | 3,47 | 3,17 | 3,10 | 2,91 |

Anhand des Anhydridgehalts in den verschiedenen Proben wird deutlich, dass schon eine kurze Exposition an der Luft zum Abbau von Sorbinsäureanhydrid führt. Die Stabilität von Sorbinsäureanhydrid muss daher genauer untersucht werden.

3.3.3 Stabilität von Sorbinsäureanhydrid

Es gibt verschiedene Kriterien, die ein Lebensmittelzusatzstoff erfüllen muss. Zu diesen gehört auch eine gewisse Stabilität. Da im Laufe der vorangegangenen Untersuchungen festgestellt wurde, dass Sorbinsäureanhydrid an der Luft relativ schnell abgebaut wird, wurde die Haltbarkeit besonders gründlich untersucht.

Es gibt mehrere Definitionen von Haltbarkeit. Bei Lebensmitteln versteht man unter der Mindesthaltbarkeit die Zeitspanne, bis zu der ein Lebensmittel unter angemessenen Aufbewahrungsbedingungen seine spezifischen Eigenschaften behält ^[103].

Nach einer Richtlinie der Arbeitsgemeinschaft für pharmazeutische Verfahrenstechnik, die sich auf Arzneimittel bezieht, ist Haltbarkeit die „gleichbleibende Qualität eines Fertigarzneimittels über die projizierte Haltbarkeitsperiode und zwar sowohl in galenischer, physikalischer, chemischer, biologischer, als auch mikrobiologischer Hinsicht, insbesondere seinem Wirkstoffgehalt, seiner Wirkstoff-Freigabe und seiner Reinheit ^[104].

Die Haltbarkeitsprüfungen von Konservierungsmitteln beziehen sich deshalb nicht nur auf die chemische Stabilität (Wirkstoffgehalt oder Gehalt von Zersetzungsprodukten), sondern auch auf die physikalische (galenische) Form und mikrobiologische Stabilität (Keimzahl). Zudem kann sich auch die Organoleptik verändern, weshalb Aussehen, Geruch und Geschmack (eingeschränkt) ebenfalls untersucht werden.

Die chemische Stabilität von Sorbinsäureanhydrid wurde durch eine Langzeitverfolgung des Wirkstoffgehalts untersucht. Dazu wurden Sorbinsäureanhydrid-Proben bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert und monatlich ihr Gehalt gemessen. Die physikalische Form kann bei dieser Prüfung ebenfalls begutachtet werden. Ein Abbau des Pulvers oder der Pastillen durch Mikroorganismen wird ausgeschlossen, da Sorbinsäureanhydrid antibakteriell wirkt.

Zunächst wurde die Lagerstabilität bei verschiedenen Temperaturen an der Luft untersucht. Es ist üblich einen Lagerversuch bei 40 °C und erhöhter Luftfeuchtigkeit durchzuführen, um zu sehen, wie sich ein Stoff verhält. Danach kann mithilfe verschiedener Formeln die Langzeitstabilität bei 20 °C und geringerer Luftfeuchtigkeit abgeschätzt werden.

Nachdem Sorbinsäureanhydrid 3 Tage bei 40 °C gelagert wurde, verfärbte sich das Produkt von weißlich-gelb nach tiefgelb bis bräunlich. Zudem reagierte das Pulver zu einem gelben, gummiähnlichem Feststoff. Dieser ließ sich in den bekannten Lösungsmitteln für Sorbinsäureanhydrid nicht wieder auflösen.

Aufgrund seiner Unlöslichkeit konnte der Feststoff nicht mittels üblicher Analysemethoden untersucht werden. Die MALDI-TOF-MS-Analyse, welche oft zur Polymeranalytik eingesetzt

wird, zeigte neben der Masse für Sorbinsäureanhydrid (206 g/mol) die Masse 451 an. Dies wird verursacht durch zwei Anhydridmoleküle, die sich an ein Kaliumion anlagern. Massen, welche durch Oligomere oder sogar Polymere verursacht werden, konnten nicht nachgewiesen werden. Nur die Änderung der galenischen Form lässt auf eine Polymerisation schließen. Denkbar ist, dass das Polymer so zäh ist, dass durch den Laser keine größeren Fragmente oder Moleküle aus dem Polymer „gelöst“ wurden konnten, die detektiert werden konnten. Eine Pyrolyse mit Kopplung an ein Massenspektrometer, wie sie oft in der Polymeranalytik eingesetzt wird, konnte nicht durchgeführt werden.

Nachdem dieser erste Test zeigte, dass das Sorbinsäureanhydrid bei Temperaturen oberhalb der Schmelztemperatur seine galenische Form veränderte, wurden alle folgenden Tests bei Raumtemperatur oder niedrigeren Temperaturen durchgeführt. Zunächst wurden Lagertests bei 20 °C durchgeführt. Die Proben wurden teils dunkel, teils im Hellen gelagert.

Die Lagerung bei 20 °C in geöffneten Glasflaschen zeigte einen schnellen Abbau des Sorbinsäureanhydrids. Innerhalb eines Monats waren mindestens 50 % des Sorbinsäureanhydrids zu Sorbinsäure hydrolysiert.

Lagerstabilität von Sorbinsäureanhydrid bei 20 °C

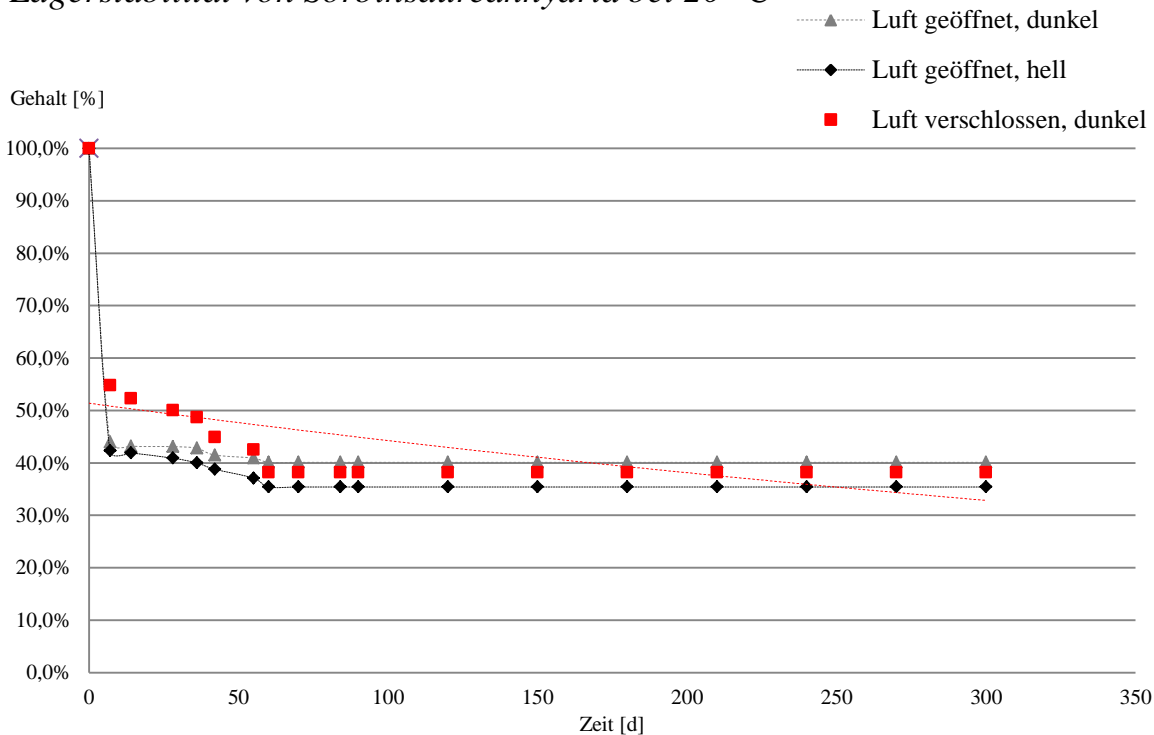


Abbildung 20: Lagerstabilität von Sorbinsäureanhydrid bei 20 °C, Luft

Es fand keine Gelierung oder Verklumpung des Pulvers statt. Allerdings verfärbte sich das Pulver durch den größer werdenden Sorbinsäure-Anteil immer heller, je länger es gelagert

wurde. Der zunächst stechende Geruch wurde schwächer, der Geschmack des Feststoffs wurde nicht untersucht.

Auch bei Proben, die verschlossen bei 20 °C gelagert wurden, wurde ein Abbau von bis zu 50 % innerhalb des ersten Monats beobachtet, er geschah nur wenig langsamer als der Abbau der geöffneten Proben. Die Stabilitätsmessungen der Proben, die im Kühlschrank bei 7 °C gelagert wurden, ergaben die gleichen Ergebnisse, allerdings verlangsamte sich auch hier der Abbau etwas. Da das Sorbinsäureanhydrid in allen drei Fällen unter Luft gelagert wurde, wird davon ausgegangen, dass entweder Sauerstoff oder Wasser aus der Luft, oder sogar beides den Abbau zu Sorbinsäure bewirken.

Die Ergebnisse der Lagertests innerhalb der ersten vier Wochen zeigten, dass Sorbinsäureanhydrid nicht stabil an der Luft gelagert werden kann. Deshalb wurden weitere Lagertests unter Schutzgas durchgeführt. Als Schutzgase wurden Stickstoff und Argon eingesetzt. Die ersten Stabilitätstests wurden weiter beprobt, um festzustellen, bis zu welchem Gehalt das Anhydrid abgebaut wird. Nach ca. 2,5 Monaten war bei beiden Lagerversuchen ein Punkt erreicht, an dem kein weiteres Anhydrid mehr abgebaut wurde. So blieb der Gehalt nach 60 Tagen unverändert um 40 %. Bei Proben, die im Hellen gelagert wurden, betrug der Restgehalt an Sorbinsäureanhydrid noch $35,4 \pm 0,1$ %. Dies war der niedrigste Restgehalt, der in allen Proben gemessen wurde. Bei Proben, welche verschlossen und/oder dunkel gelagert wurden, war der Restgehalt etwas höher und lag zwischen 38,2 und 40,1 %.

Die Lagertests unter Stickstoff wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Zusätzlich dazu wurden auch verschiedene Arten der Verpackung untersucht. So wurde pulverförmiges Sorbinsäureanhydrid sowohl in Glasflaschen als auch in Folienbeuteln verpackt gelagert und auf die Stabilität hin untersucht. Die Proben wurden mehrmals evakuiert und mit Schutzgas befüllt, bevor sie in einer „Glove box“ verschlossen wurden. Dies gewährleistete den Ausschluss von Sauerstoff. Es wurden so viele Proben abgefüllt, dass pro Messvorgang eine Flasche bzw. ein Beutel geöffnet und verbraucht werden konnte und nicht erneut evakuiert werden musste.

Bei der Lagerung im Folienbeutel unter Schutzgas wurde innerhalb der ersten drei Monate nur 1 % Sorbinsäureanhydrid abgebaut (siehe Abbildung 21). Der Gehalt sank also nur auf $99,1 \pm 0,1$ % des Anfangsgehaltes. Die Kontrollproben, die ohne Schutzgas gelagert wurden, verhielten sich ähnlich, wie die ersten Ergebnisse der Lagertests es gezeigt haben. Der Abbau verlief allerdings in den ersten 14 Tagen langsamer als erwartet, danach zeigte sich aber eine Ab-

reicherung auf einen Gehalt an Sorbinsäureanhydrid von nur noch $35,4 \pm 0,1$ %. Der Abbau des Anhydrids unter Schutzgas verlief deutlich langsamer. Es erfolgte innerhalb von 70 Tagen nur eine Abreicherung auf $94,6 \pm 0,1$ % bzw. sogar nur auf $99,6 \pm 0,1$ %.

Lagerstabilität von Sorbinsäureanhydrid im Folienbeutel unter Schutzgas bei 7 °C

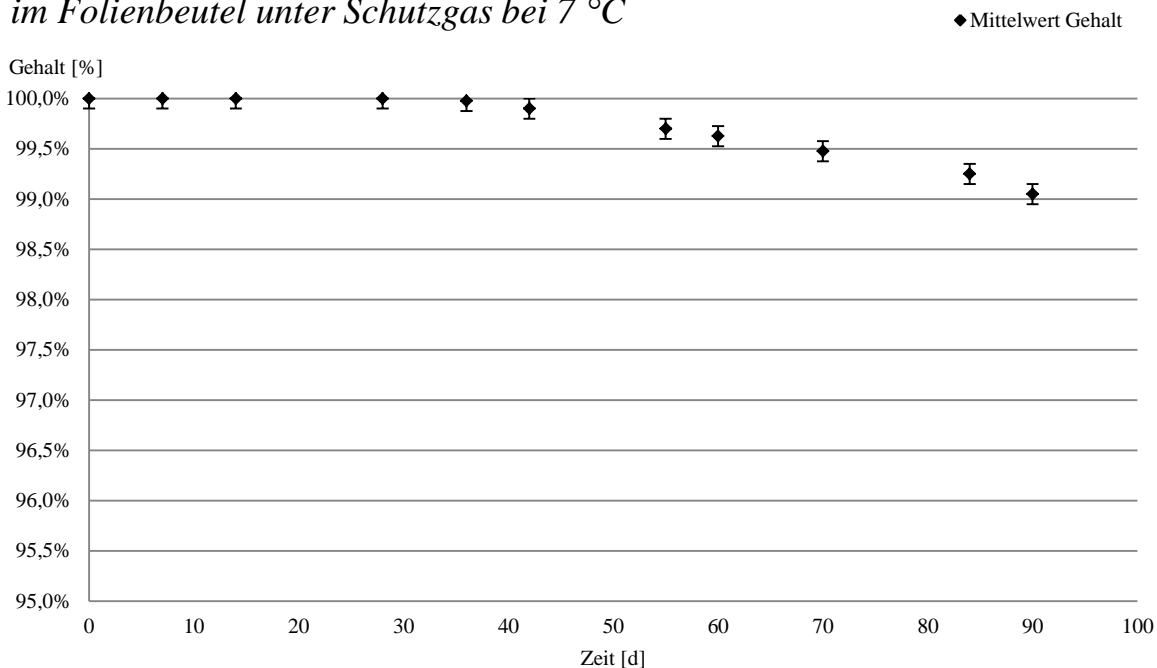


Abbildung 21: Lagerstabilität von Sorbinsäureanhydrid unter Schutzgas bei 7 °C

Diese Versuchsreihe zeigte, dass die Proben, welche in einem Folienbeutel (mit Aluminiumfoliensicht) verpackt wurden, am stabilsten gelagert werden konnten. Die Glasflaschen waren weniger gasdicht als die Beutel.

Tabelle 11: Stabilitätsprüfung von Sorbinsäureanhydrid unter Schutzgas

| Zeit [d] | 0 | 14 | 28 | 42 | 56 | 70 |
|--|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Gehalt SAA in Glasflaschen ohne Schutzgas | 100 % | 98,5 % | 41,9 % | 40,0 % | 35,4 % | 35,4 % |
| Gehalt SAA in Glasflaschen unter Schutzgas | 100 % | 98,5 % | 97,3 % | 96,4 % | 95,9 % | 94,6 % |
| Gehalt SAA in Alubeuteln unter Schutzgas | 100 % | 100 % | 100 % | 99,8 % | 99,8 % | 99,6 % |

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass Sorbinsäureanhydrid unter Schutzgaslagerung unter Stickstoff oder Argon beim Ausschluss von Wasser und Sauerstoff stabil ist. Im Rahmen der Fehlergrenzen treten Unterschiede bei beiden Schutzgasen im Gehalt von 0,1 % auf. Das bedeutet, beide Gase verhindern den Eintritt von Wasser und/oder Sauerstoff in das jeweilige Lagergefäß. Auch hier zeigte sich deutlich der positive Effekt der Schutzgase für die Stabilität

des Anhydrids. Da über einen Zeitraum von drei Monaten nur ein Abbau von 1 % Sorbinsäureanhydrid stattfindet, ist eine Haltbarkeit innerhalb der Spezifikation gegeben.

Auch bei kurzzeitiger thermischer Belastung (40 °C, 60 Minuten oder 85 °C, 5 Minuten) bleibt der Gehalt von Sorbinsäureanhydrid sowohl unter Argon als auch unter Stickstoff stabil. Auch bei Lagerung über 24 h fand ebenfalls kein Abbau des Anhydrids statt, dieser beginnt erst nach ungefähr 26 h. Eine Stabilität beim längerfristigen Erhitzen ist somit nicht gegeben. Auch ohne Gegenwart von Sauerstoff bilden sich hier nach einiger Zeit allerdings die oben bereits erwähnten gelben, gummiartigen Polymere.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Sorbinsäureanhydrid ein relativ empfindlicher Stoff ist, der an der Luft und unter Feuchtigkeit nicht gelagert werden kann. Findet eine Lagerung unter Stickstoff oder Argon in verschlossenen Verpackungen statt, kann Sorbinsäureanhydrid mindestens drei Monate gelagert werden, ohne dass ein signifikanter Gehaltsabbau stattfindet. Da es bei maschineller Abfüllung möglich ist völlig sauerstofffrei zu arbeiten, ist sogar eine längere Lagerzeit denkbar.

3.3.4 Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid

Für die Anwendung als Konservierungsmittel für Getränke ist die Untersuchung der Löslichkeit in Wasser von großer Bedeutung. Da das Sorbinsäureanhydrid ein eher unpolares Molekül ist, wird eine geringe Wasserlöslichkeit erwartet. Es wurden verschiedene Formulierungen auf die Löslichkeit hin untersucht: Pulver, Pastillen und Schmelze.

Zur Bestimmung der Löslichkeit wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurde die wässrige Lösung per HPLC auf ihren Gehalt untersucht und zum anderen wurde eine definierte Menge Sorbinsäureanhydrid in Wasser gegeben und die nicht gelösten Bestandteile wurden abfiltriert und zurückgewogen.

Beide Methoden zeigen die gleichen Ergebnisse für die Wasserlöslichkeit der verschiedenen Sorbinsäureanhydrid-Formulierungen an: $0,390 \pm 0,001$ g Pulver lösen sich in einem Liter Wasser, $0,220 \pm 0,001$ g Pastillen oder $0,31 \pm 0,001$ g Schmelze. Das liegt daran, dass Sorbinsäureanhydrid in der Kälte pulverisiert wurde, die Pastillen und die Schmelze aber jeweils auf 50 °C erhitzt wurden. Durch die Hitzeeinwirkung unter Sauerstoff bzw. an der Luft bildete sich auf der Oberfläche der Pastillen bzw. auf der Oberfläche der Schmelze eine Schicht, die sich bei Eintrag in Wasser nicht löste. Je länger Sorbinsäureanhydrid erhitzt wurde, desto größer war der nicht lösliche Rest.

Tabelle 12: Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid in Wasser (Rückwägung)

| <i>Material</i> | <i>Zugabe zu 1,0 L Wasser (20°C)</i> | <i>Rückwaage Sorbinsäureanhydrid</i> | <i>Wasserlöslichkeit</i> |
|-----------------|--|--|--------------------------|
| Pulver | 1,003 g | 0,617 g | 0,39 g/L |
| Pastillen | 1,021 g | 0,805 g | 0,22 g/L |
| Schmelze | 0,999 g | 0,684 g | 0,32 g/L |

Tabelle 13: Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid in Wasser per HPLC

| <i>Material</i> | <i>Wasserlöslichkeit bei 20 °C</i> | <i>Bemerkungen</i> |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Pulver | 0,39 g/L | |
| Pastillen | 0,22 g/L | Hüllen lösten sich nicht |
| Schmelze | 0,31 g/L | Filmbildung auf der Oberfläche |

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit wurden verschiedene Lösungsmittel untersucht, die als Lösungsvermittler dienen sollen, indem sie das Sorbinsäureanhydrid vorlösen und damit eine gute Verteilung des Konservierungsmittels im Getränk bewirken können. Es wurden unterschiedliche Alkohole, Ester, Ketone, Amide und Anhydride getestet. Da bei späterer Anwendung möglichst wenig Lösungsmittel in ein Getränk zugegeben werden soll, war es nötig, ein LSM zu finden, welches das Anhydrid in einem Verhältnis von 1:1 oder besser löst.

Für einen ersten Löslichkeitstest wurden je 500 mg Anhydrid-Pastillen und 500 mg Lösungsmittel vermischt und 30 Minuten stehen gelassen. Danach wurde die Lösung nach Verdünnung per HPLC auf ihren Sorbinsäureanhydrid-Gehalt untersucht. Fanden sich mehr als 80 % des Anhydrids in Lösung, wurden 100 mg Sorbinsäureanhydrid in Lösungsmittel zu 1 L Wasser gegeben und die Löslichkeit, Verteilung und/oder Hüllenbildung beobachtet.

Sorbinsäureanhydrid ist demnach gut löslich in kurzkettigen Alkoholen, wie Ethanol und iso-Propanol, sehr gut löslich in Ethylacetat und Ethylenglycoldiacetat, welche eine ähnliche Struktur aufweisen und ebenfalls löslich bis gut löslich in kurzkettigen Estern. Auch N-Methylpyrrolidon und Tetrahydrofuran sind zunächst als Lösungsmittel gut geeignet.

Es stellte sich heraus, dass bei Einbringen der Lösungen in Wasser Sorbinsäureanhydrid kurzfristig ausfällt, durch Umschütteln aber wieder in Lösung geht. Dies ist dadurch zu erklären, dass beim Injizieren einer Sorbinsäureanhydrid-Lösung in Wasser die Konzentration von Sorbinsäureanhydrid an der Injektionsstelle größer ist als die Löslichkeit. Durch Schütteln verteilt sich das Anhydrid im Wasser und geht dann in Lösung.

Allerdings ist für den Einsatz im Getränk nicht nur die gute Löslichkeit entscheidend, sondern auch Eigenschaften des Lösungsmittels, wie Geruch, Farbe und Mischbarkeit mit Wasser. Unter diesen Kriterien fallen einige der Lösungsmittel, in denen sich Sorbinsäureanhydrid sehr gut löst, weg.

Dies sind N-Methylpyrrolidon, Methylbutyrat, Ethylacetat, n-Butylacetat und Tetrahydrofuran wegen des jeweiligen Geruchs, da selbst 10 mg/L Wasser noch charakteristisch riechen. Die restlichen drei Fruchttester (Ethylformiat, Ethylpropionat und n-Propylacetat) riechen fruchtig, was sowohl von Vor- als auch von Nachteil für den Einsatz in der Getränkeindustrie sein kann. Die beiden verwendeten Anhydride - Essigsäure- und Propionsäureanhydrid - bilden mit Sorbinsäureanhydrid eine gelbliche Lösung und reagieren in kleinen Mengen zu den jeweiligen gemischten Anhydriden, welche nicht erwünscht sind.

So bleiben Ethylenglycoldiacetat als sehr gutes Lösungsmittel und Ethanol, iso-Propanol, Aceton und 2-Butanon als gute Lösungsmittel übrig. Da Ethylenglycoldiacetat als Lebensmittelzusatzstoff nicht zugelassen ist, kommt es für eine Anwendung in der Getränkeindustrie ohne Zulassung nicht infrage. Ethanol, iso-Propanol, Aceton und 2-Butanon, dürfen in Getränken als fruchteigener Alkohol vorkommen, unterliegen aber verschiedenen Grenzwerten.

Tabelle 14: Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid in verschiedenen Lösungsmitteln

| <i>Lösungsmittel</i> | <i>Löslichkeitsverhalten</i> | <i>ungefähre Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid</i> |
|-----------------------|------------------------------|--|
| Methanol | gut löslich | 790 g/L |
| Ethanol | gut löslich | 790 g/L |
| iso-Propanol | gut löslich | 780 g/L |
| 1,2-Propandiol | nicht löslich | 80 g/L |
| Polyethylenglycol | nicht löslich | 50 g/L |
| Benzylalkohol | löslich | 630 g/L |
| N-Methylpyrrolidon | gut löslich | 1040 g/L |
| Triethylcitrat | kaum löslich | 38 g/L |
| Glycerindiacetat | kaum löslich | 40 g/L |
| Glycerintriacetat | kaum löslich | 35 g/L |
| Ethylenglycoldiacetat | sehr gut löslich | 1340 g/L |
| Methylbutyrat | löslich | 605 g/L |
| Ethylformiat | löslich | 575 g/L |
| Ethylacetat | sehr gut löslich | 2000 g/L |
| Ethylpropionat | löslich | 725 g/L |
| n-Butylacetat | sehr gut löslich | 1860 g/L |
| n-Propylacetat | löslich | 540 g/L |
| Essigsäureanhydrid | löslich | 505 g/L |
| Propionsäureanhydrid | löslich | 430 g/L |
| Tetrahydrofuran | sehr gut löslich | 1000 g/L |
| Aceton | löslich | 690 g/L |
| 2-Butanon | löslich | 770 g/L |

Zur Erweiterung der Löslichkeitsuntersuchungen und Stabilitätsprüfungen wurde nun noch die Stabilität von Sorbinsäureanhydrid in ethanolischer Lösung untersucht. Dazu wurden 10,00 g Sorbinsäureanhydrid in 100 g Ethanol gelöst und täglich auf ihren Gehalt hin überprüft. Es zeigte sich ein Abbau von zunächst ca. 2 % am Tag. Es bildete sich in den ersten fünf Tagen nur Sorbinsäure. Der Abbau verlangsamte sich täglich ein wenig, so dass nach 2 Wochen noch 8,24 g Sorbinsäureanhydrid nachgewiesen werden konnten. Nach drei Wochen waren noch 7,96 g SSA in Lösung. Der Sorbinsäuregehalt stieg in dieser Zeit langsam an. Nach zwei Wochen konnte zudem Ethylsorbat nachgewiesen werden.

Auch eine einprozentige Sorbinsäureanhydrid-Lösung wurde untersucht. Hier verlief der Abbau langsamer als bei 10 prozentiger Lösung.

Tabelle 15: Stabilität von SSA in ethanolischer Lösung

| Zeit [d] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 14 | 21 |
|--------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Gehalt SSA [%], 10 % SSA | 100 | 97,9 | 95,9 | 94,1 | 93,1 | 82,4 | 79,6 |
| Gehalt SSA [%], 1 % SSA | 100 | 98,2 | 96,8 | 95,7 | 94,6 | 86,3 | 81,5 |

Der Sorbinsäureanhydrid-Gehalt ist sowohl in wässrigen, als auch in alkoholischen Lösungen nicht stabil. Ebenso ist der Sorbinsäure-Gehalt in wässrigen Lösungen nicht dauerhaft stabil. Allerdings ist innerhalb der ersten 60 Tage keine Veränderung feststellbar. Erst nach 120 Tagen nimmt der Gehalt von Sorbinsäure langsam ab ^[105]. Arya beschrieb die Bildung von Carbonylen bei der Autoxidation von Sorbinsäurelösungen ^[22], Hildegard und Sabalitschka die Bildung von Crotonaldehyd, Acrolein und Malonaldehyd ^[106].

Nach den ersten 70 Tagen der Sorbinsäureanhydrid-Hydrolyse verringerte sich der Sorbinsäuregehalt nicht. Zudem konnten weder Crotonaldehyd, Acrolein oder Malonaldehyd per HPLC nachgewiesen werden.

Eine Lagerung als Lösung in Ethanol ist aufgrund des oben gezeigten Abbaus nicht möglich. Allerdings ist es möglich, höher konzentrierte Lösungen über 24 h aufzubewahren, solange kein Sauerstoff in die Lösung eindringen kann, d.h. unter Schutzgas kann eine Sorbinsäureanhydridlösung in reinem Ethanol ca. 24 h gelagert werden.

3.3.5 Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid

Carbonsäureanhydride zersetzen sich in Wasser zu den resultierenden Carbonsäuren, so auch Sorbinsäureanhydrid, welches in Sorbinsäure zerfällt. Dies ist für den Einsatz im Lebensmittelbereich erwünscht, da das Sorbinsäureanhydrid nicht mehr im Endprodukt vorhanden sein soll. Um dies zu gewährleisten, muss beobachtet werden, bei welchen pH-Werten und Temperaturen Sorbinsäureanhydrid hydrolysiert. Die Hydrolyse in Wasser bzw. in wässrigen Puffer-

systemen sollte sich exponentiell verhalten. Zudem sollte die Reaktion bei erhöhter Temperatur schneller ablaufen.

Die verschiedenen Hydrolysekurven wurden sowohl in Wasser als auch in wässrigen Puffersystemen, Methanol, Ethanol und Iso-Propanol gemessen. Der jeweilige Gehalt wurde per HPLC bestimmt und die Daten als Hydrolysekurve abgebildet.

Die erste Bestimmung wurde in reinem Wasser durchgeführt. Zu Beginn der Messung betrug der pH-Wert 6,9. Nach Ende der Messung lag der pH-Wert bei 6,5. Sorbinsäureanhydrid wurde in reinem Wasser bei 20 °C innerhalb von 5 Tagen vollständig zu Sorbinsäure hydrolysiert. Proportional zum Abbau des Anhydrids stieg der Gehalt der Sorbinsäure. Die Wiederfindung von 100 mg eingesetztem Sorbinsäureanhydrid betrug $97,5 \pm 1,0$ mg Sorbinsäure (106 mg). Der Fehler ergibt sich aus den Messfehlern, die bei Einwiegen und Pipettieren gemacht wurden, zudem können bei der Probennahme, besonders zu Beginn der Hydrolyse geringe Zeitfehler entstehen und eine weitere Hydrolyse konnte während der HPLC-Messung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in Wasser

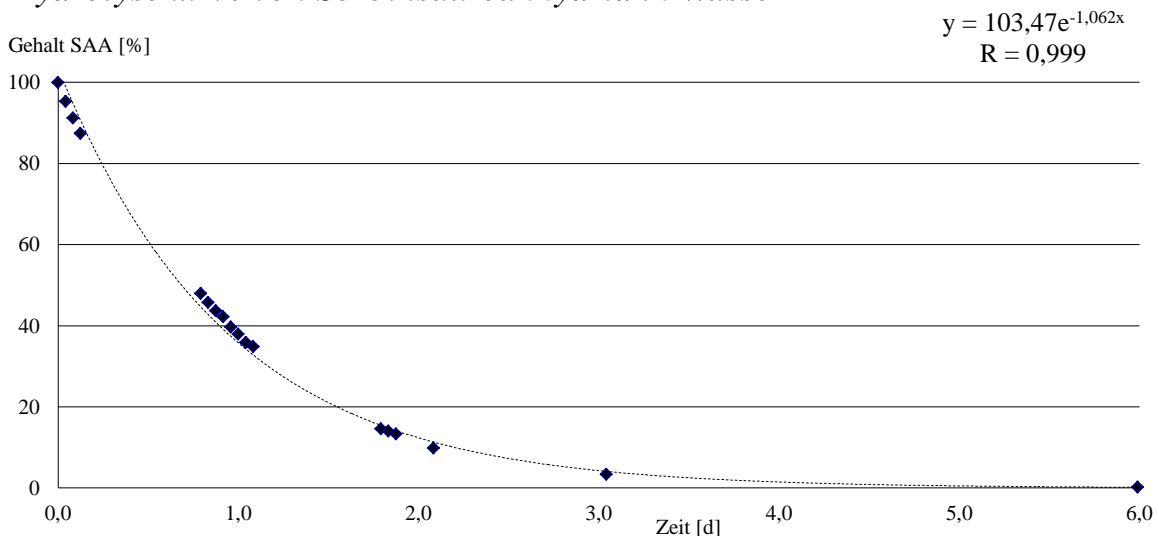


Abbildung 22: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in demin. Wasser bei 20 °C

Die Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid entspricht einer Reaktion erster Ordnung. Dabei ist die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Konzentration des zerfallenden Stoffes abhängig. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu berechnen, werden die x-Werte der Kurve mit dem natürlichen Logarithmus logarithmiert.

So erhält man einen linearen Zusammenhang zwischen der Zeit und der logarithmierten Konzentration. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist gleich der Steigung. Die Geschwindigkeits-

konstante für den Abbau von Sorbinsäureanhydrid in demineralisiertem Wasser bei 20 °C beträgt somit 0,046 1/h

Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid in Wasser, 20°C

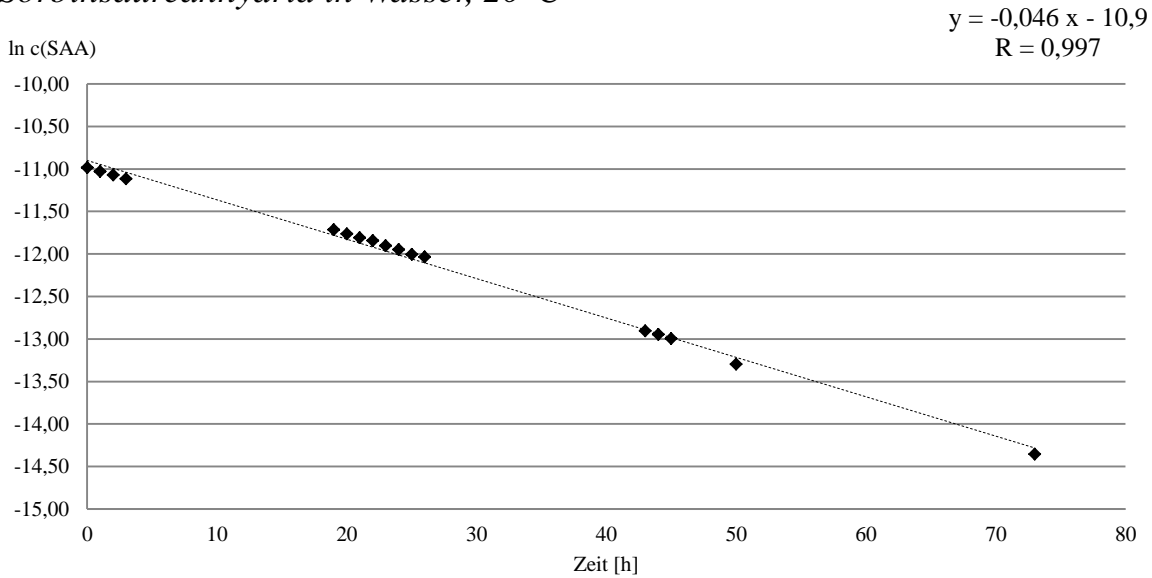


Abbildung 23: Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von SSA in demineralisiertem Wasser

Eine weitere Messung wurde in destilliertem Wasser durchgeführt (siehe Abbildung 24). Der Kurvenverlauf ist gleich der Hydrolysekurve in demineralisiertem Wasser, die Reaktionsgeschwindigkeit ist allerdings etwas langsamer (0,026 1/h).

Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid bei 20 °C

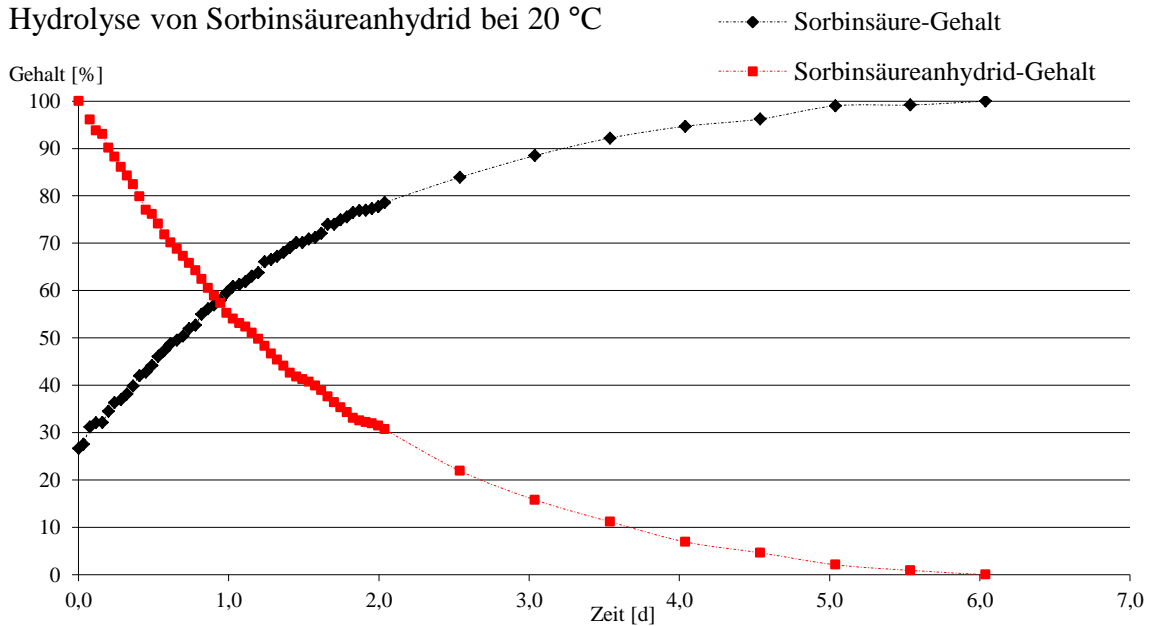


Abbildung 24: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in destilliertem Wasser bei 20 °C

Da der einzige Unterschied zwischen den beiden Wasserarten darin besteht, dass in demineralisiertem Wasser noch Natrium-Ionen enthalten sind, ist es wahrscheinlich, dass Spuren von Fremd-Ionen die Hydrolyse katalysieren. Die pH-Werte zu Beginn und Ende der Messung unterschieden sich um 0,1.

Weil die meisten Getränke einen geringeren pH-Wert als Wasser aufweisen, wurden ebenfalls Hydrolysekurven in wässrigen Phosphat-Puffersystemen aufgenommen, um einen Trend der Reaktionsgeschwindigkeiten abschätzen zu können. Die Hydrolysekurven wurden noch nicht im Getränk bestimmt, da die Matrix Getränk komplex aufgebaut ist und die verschiedenen Inhaltsstoffe die Hydrolysekurven beeinflussen können.

Bei der Aufnahme der Hydrolysekurven in einem Puffer bei pH 2 zeigte sich deutlich, dass die Hydrolyse bei erhöhter Temperatur schneller abläuft. Der vollständige Abbau des Sorbinsäureanhydrids trat bei 20 °C erst nach 52 h auf, wohingegen bei 30 °C schon nach 24 h kein Sorbinsäureanhydrid im Puffersystem mehr nachweisbar war. Auch hier betrug die Wiederfindung von Sorbinsäure 98 %.

Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 2

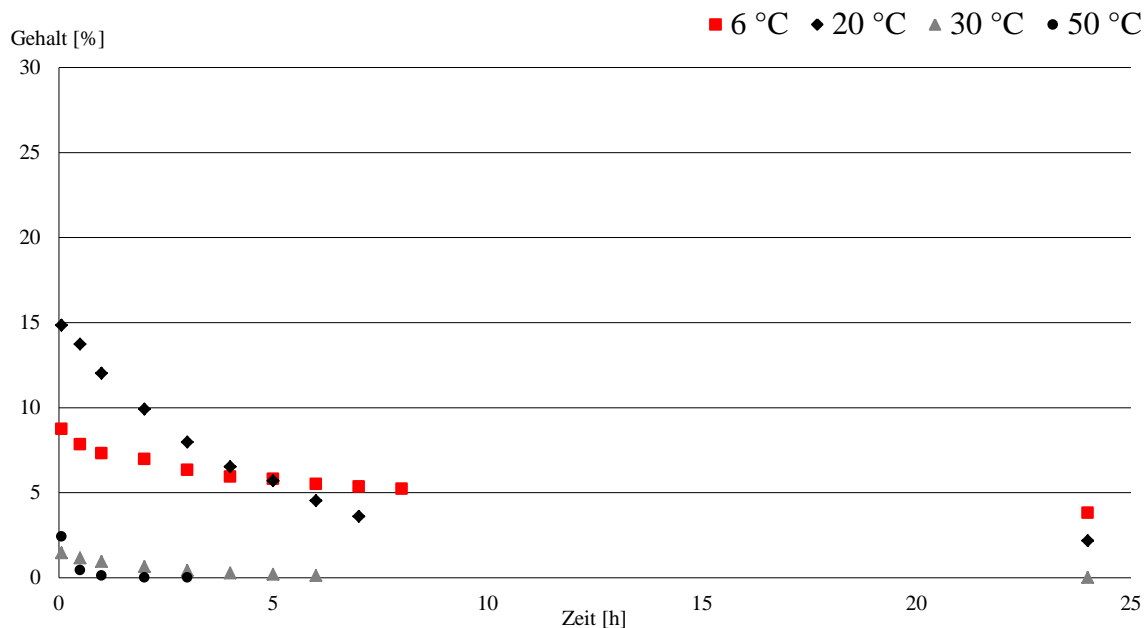


Abbildung 25: Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 2

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse bei pH 2 steigen wie erwartet mit steigender Temperatur, da sich nach der sogenannten RGT-Regel (Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel) die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10 K verdoppelt bis vervierfacht (Van't Hoff). Diese Regel gilt vor allem im Bereich zwischen 10 und 40 °C. Bei größeren Temperaturdifferenzen wird die RGT-Regel hingegen ungenau und gilt nicht mehr.

Bei Erhöhung der Temperatur von 10 auf 20 °C bzw. von 20 auf 30 °C verdoppelt sich die Hydrolysegeschwindigkeit von Sorbinsäureanhydrid, bei Erhöhung von 30 auf 50 °C veracht-facht sich diese.

Der Faktor, um den die Reaktionsgeschwindigkeit steigt, wenn die Temperatur um 10 K erhöht wird, heißt Q_{10} -Wert. Er berechnet sich aus:

$$Q_{10} = \frac{R_2}{R_1}^{10K/(T_2-T_1)}$$

Der Q_{10} -Wert für die Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid in Puffer mit pH 2 bei Erhöhung der Temperatur von 20 auf 30 °C beträgt somit 2,1.

$$Q_{10} = \frac{0,42}{0,20}^{10K/(303K-293K)} = 2,1$$

Analog dazu beträgt der Q_{10} -Wert bei Erhöhung von 30 auf 50 °C 2,8.

$$Q_{10} = \frac{3,19}{0,42}^{10K/(323K-303K)} = 2,8$$

Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse von SAA bei pH 2

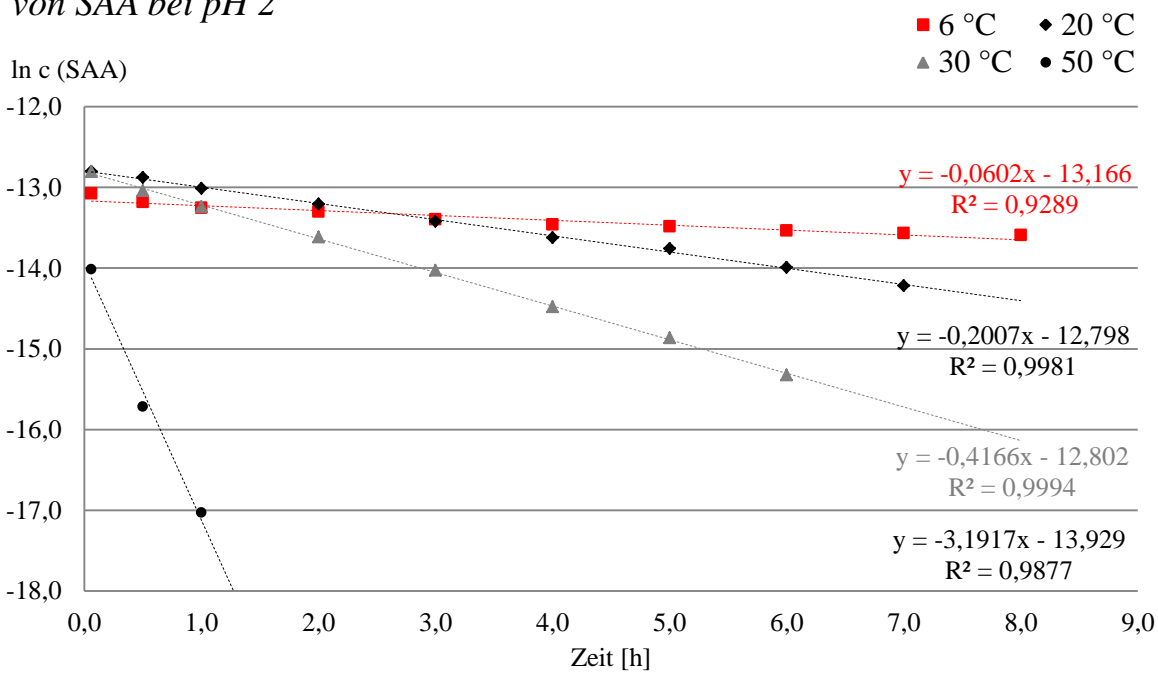


Abbildung 26: Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse von SSA bei pH 2

Die Hydrolysekurven für pH-Werte zwischen 2 und 7 verlaufen alle analog der oben gezeigten Kurven. Allerdings unterscheiden sich die Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich voneinander. Die weiteren Hydrolysekurven befinden sich der Übersichtlichkeit wegen im Anhang. Im folgenden Diagramm sind die Reaktionszeiten bei den unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten nebeneinander gestellt. Die dargestellten Werte für pH 2 unterscheiden sich von den obigen Werten, da ein anderes Puffersystem verwendet wurde mit dem je nach Einwaage der Salze der pH-Wert zwischen 2 und 6 eingestellt werden konnte. Mit dem ersten Puffer konnte dieses Spektrum nicht abgedeckt werden. Es ergaben sich bereits hier Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Hydrolyse in dem zweiten Puffersystem geschah langsamer als bei den ersten Versuchen. Wie später deutlich wird, liegen die Werte der zweiten Versuchsreihe näher an den tatsächlichen im Saft ablaufenden Hydrolysen.

Geschwindigkeitskonstanten des SAA-Abbaus

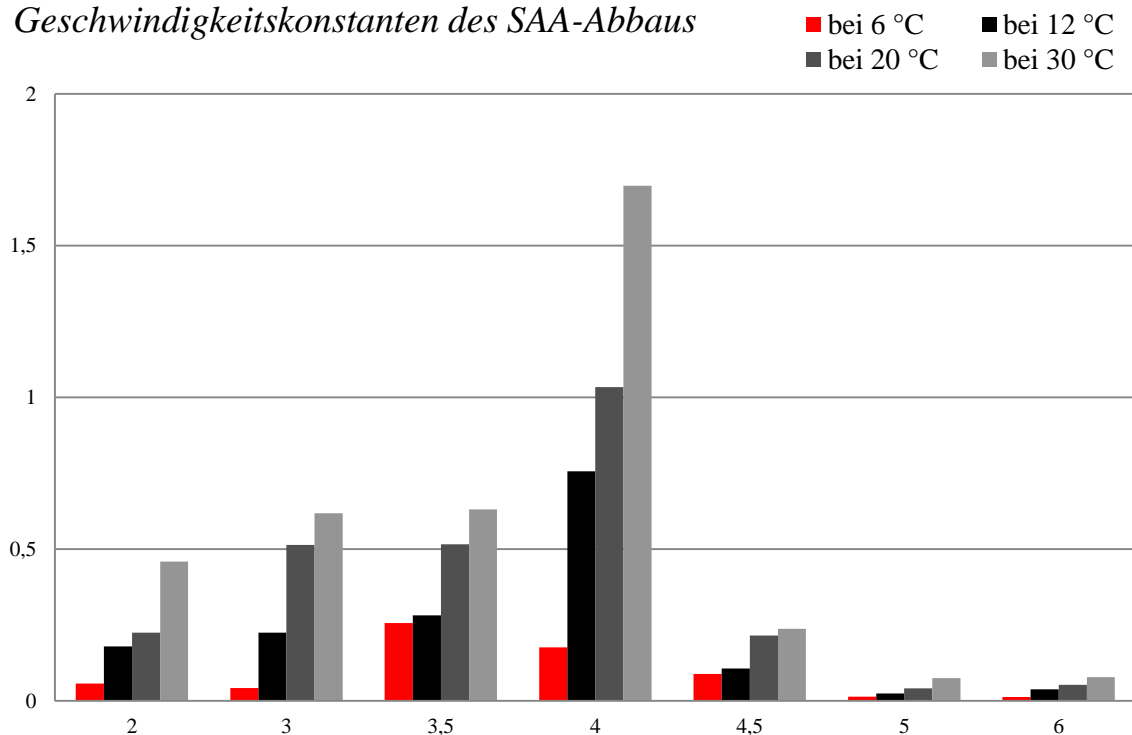


Abbildung 27: Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten von Sorbinsäureanhydrid

Bei allen pH-Werten wird die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit Erhöhung der Temperatur deutlich. Die Erhöhung der Geschwindigkeit liegt im Rahmen der RGT-Regel nach van't Hoff.

Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt bis zu einem pH-Wert von 4 an. Hier dauert die vollständige Hydrolyse bei 6 °C nur 30 Stunden, bei 30 °C ist das gesamte Sorbinsäureanhydrid innerhalb von 3 h in der Pufferlösung zu Sorbinsäure hydrolysiert. Bei langsamer Steigerung des pH-Wertes nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit dann wieder ab.

Betrachtet man abschließend noch einmal den Abbau nach 24 h, bzw. die Zeit, die benötigt wird, bis Sorbinsäureanhydrid vollständig hydrolysiert wurde, so erkennt man, dass die schnellste Hydrolyse bei pH 4 stattfindet. Bei verschiedenen anderen pH-Werten ähneln sich die Zeiten der vollständigen Hydrolyse, wohingegen sich die Hydrolysegeschwindigkeiten deutlich unterscheiden.

Tabelle 16: Zusammenfassende Tabelle der Sorbinsäurehydrolyse bei 20 °C

| <i>pH-Wert</i> | <i>Gehalt nach 24h [%]</i> | <i>Zeit bis zum vollständigen Abbau</i> |
|----------------|----------------------------|---|
| pH 2 | 4 | 52 h |
| pH 3 | 3 | 38 h |
| pH 4 | 0 | 5 - 6 h |
| pH 5 | 41 | 96 h |
| pH 6 | 29 | 92 h |

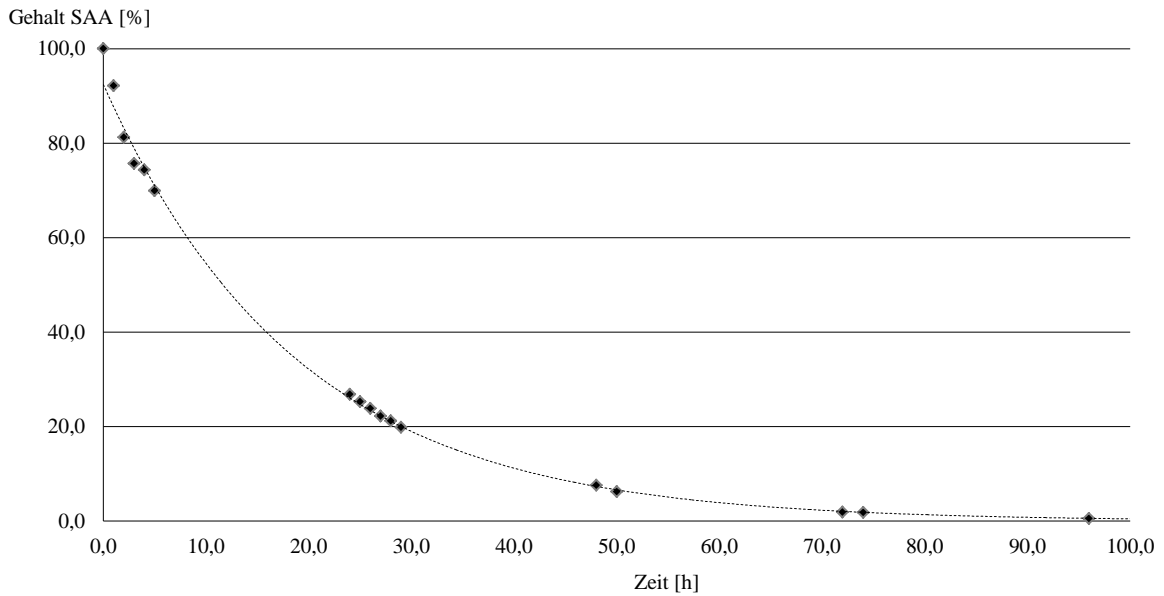
Nachdem die Hydrolysen in wässrigen Puffersystemen beobachtet wurden, wurden nun auch Hydrolysekurven in ausgewählten Getränken gemessen. Durch die Getränkeinhaltsstoffe ergaben sich für die HPLC-Messungen keine Probleme, da die Retentionszeiten dieser Inhaltsstoffe kürzer waren, als die von Sorbinsäure und Sorbinsäureanhydrid. Um auszuschließen, dass den Getränken zugesetzte Sorbinsäure das Ergebnis verfälscht wurden zunächst HPLC-Analysen der Getränke durchgeführt. In keinem Getränk lag Sorbinsäure oder Kalium-sorbat vor.

Als erstes wurde die Hydrolyse in einem aromatisierten Wasser (auch „flavoured Water“ genannt) mit maximal 3 % Fruchtanteil durchgeführt. Diese Matrix mit einem sehr geringen Fruchtanteil konnte ohne zusätzliche Aufarbeitung zur Messung verwendet werden. Das „flavoured Water“ (Apfel) hat einen pH-Wert von 3,1.

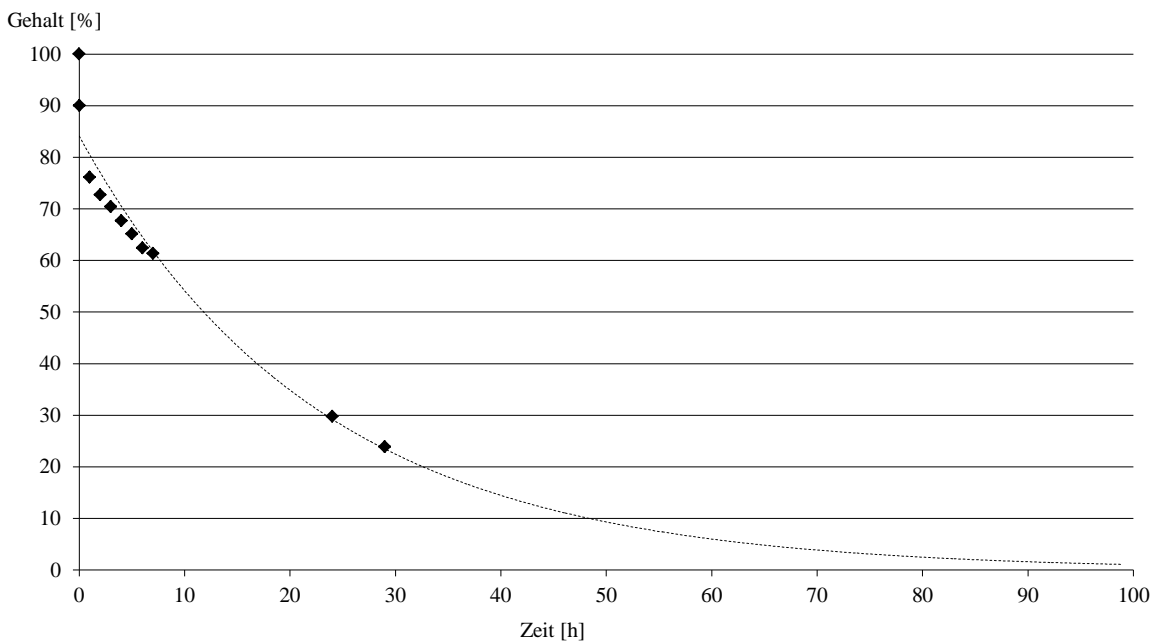
Verglichen mit der Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid in einem Puffersystem mit pH 3 müssten also nach 24 h circa 70 % des Anhydrids abgebaut sein und die Hydrolyse sollte nach ungefähr 50 h vollständig abgelaufen sein.

Nach 24 h zeigte sich in dem „flavoured Water“ (Apfel) ein Abbau von über 70 % des Sorbinsäureanhydrids. Dies deckt sich also mit den Ergebnissen der Hydrolyse in dem wässrigen Puffer. Der vollständige Abbau von Sorbinsäureanhydrid in dem aromatisierten Wasser dauerte allerdings 102 h. Diese Zeitspanne ist doppelt so groß, wie die beim Abbau im Puffer.

Die folgende Abbildung zeigt die Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in dem flavoured Water bei einem anfänglichen pH-Wert von 3,1 und einer Temperatur von 20 °C.

Hydrolysekurve von SAA in flavoured Water (pH 3,1, 20 °C)**Abbildung 28: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in flavoured water**

Des Weiteren wurde auch der Abbau in Apfelsaft und Traubensaft untersucht (siehe Abbildung 29). Dieser glich dem Abbau des Sorbinsäureanhydrids in aromatisiertem Wasser. Nach 24 h waren circa 70 % zu Sorbinsäure hydrolysiert. Erst nach 106 h war auch hier das restliche Sorbinsäureanhydrid abgebaut. Die Hydrolysekurve des Anhydrids in Traubensaft befindet sich im Anhang (Abbildung 51).

Hydrolysekurve von SAA in Apfelsaft (pH 3,5, 20 °C)**Abbildung 29: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in Apfelsaft (pH 3,5, 20 °C)**

Die Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid ist also nicht nur vom pH-Wert der wässrigen Lösung abhängig, sondern auch von den Inhaltsstoffen der Lösung, welche den Abbau sowohl hemmen als auch beschleunigen können. Die Geschwindigkeit des Abbaus würde später bei Einsatz in der Industrie gegebenenfalls Quarantänezeiten bedingen. Auch die mikrobiologische Wirksamkeit ist geschwindigkeitsabhängig, da sie bei langsamerem Abbau größer ist und Sorbinsäureanhydrid in fast allen Fällen deutlich besser wirkt als das Hydrolyseprodukt Sorbinsäure (siehe Kapitel 3.4 Mikrobiologische Wirksamkeit).

Der Abbau von Sorbinsäureanhydrid in Ethanol wurde ebenfalls bestimmt. Unter gleichen Bedingungen wie bei den vorherigen Hydrolysen (20 °C) lief die Reaktion zu Sorbinsäure wie erwartet sehr langsam ab. Deshalb wurde das Experiment bei einer Temperatur von 40 °C erneut gestartet. Auch der Abbau in reinem Methanol und reinem iso-Propanol wurde bei 40 °C gemessen. Im folgenden Diagramm sind alle drei Abbaukurven abgebildet. Die Reaktionsgeschwindigkeiten aller drei Reaktionen sind bei 40 °C vergleichbar. Der Abbau in Isopropanol verläuft etwas langsamer als der Abbau in Methanol oder Ethanol. Dies war zu erwarten, da die primären Alkohole schneller reagieren. In diesen Fällen bildet sich nicht nur Sorbinsäure, sondern nach ca. 24 h auch Methyl- bzw. Ethylsorbat, welches jeweils per HPLC bestimmt werden konnte. Beim Abbau des Sorbinsäureanhydrids in Isopropanol bildeten sich Sorbinsäure und Isopropylsorbat. Dies war wichtig, für die Bestimmung der Wiederfindung von Sorbinsäure nach der Hydrolyse.

Abbaukurven von Sorbinsäureanhydrid bei 40 °C

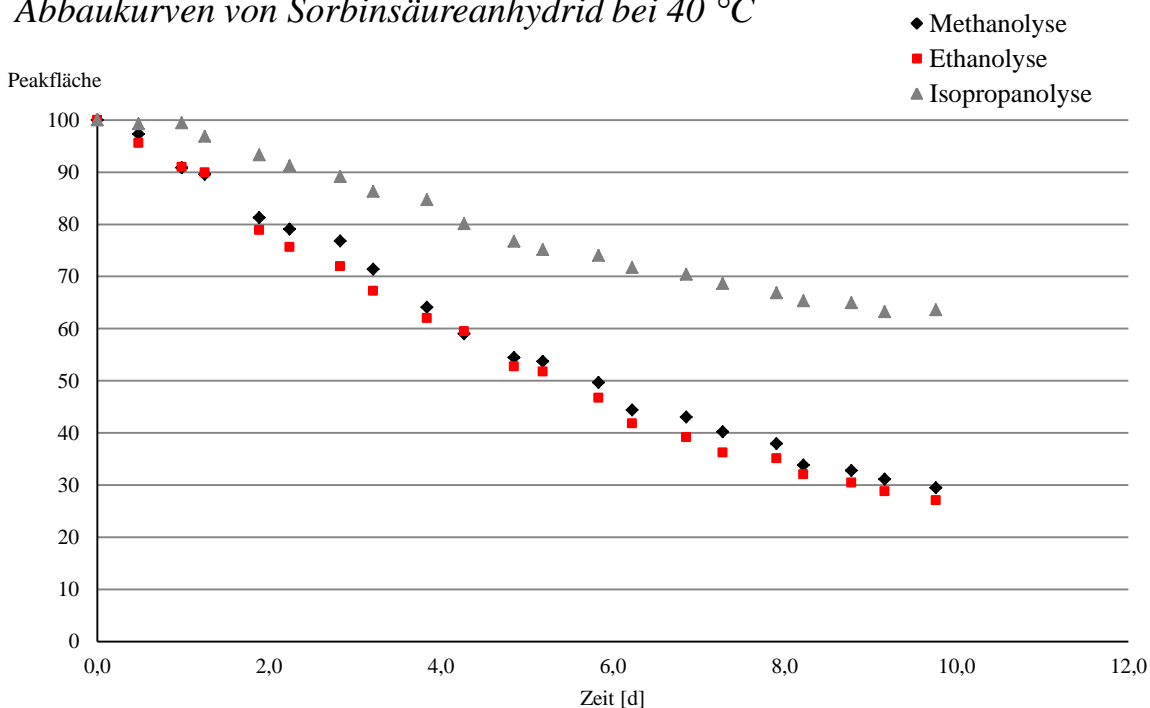


Abbildung 30: Abbaukurven von Sorbinsäureanhydrid in Alkoholen

Die Reaktionsgeschwindigkeiten des Abbaus in Methanol und Ethanol betragen $0,13 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,14 \text{ h}^{-1}$. Die Abbaugeschwindigkeit in Isopropanol betrug $0,05 \text{ h}^{-1}$. Die Reaktionen in Methanol und Ethanol liefen also ungefähr doppelt so schnell ab, wie der Abbau in Isopropanol (siehe Abbildung 52).

Der Abbau von Sorbinsäureanhydrid in Ethanol lässt Rückschlüsse auf die Hydrolyse in alkoholischen Getränken zu. Da die Alkoholgehalte verschiedener Getränke große Varianz aufweisen, wurde die Hydrolysegeschwindigkeit von Sorbinsäureanhydrid beispielhaft in einem Weinmischgetränk gemessen. Da die Ethanolyse deutlich langsamer verläuft als die Hydrolyse, wird vermutet, der Abbau von Sorbinsäureanhydrid langsamer verläuft als die reine Hydrolyse, aber deutlich schneller als die Ethanolyse. Die verschiedenen alkoholischen Getränke, die für eine Konservierung mit Sorbinsäureanhydrid in Frage kommen, weisen Alkoholgehalte zwischen 2 und 16 Vol. % auf. Deshalb muss auch hier für fast jedes Getränk eine eigene Hydrolysekurve aufgenommen werden.

*Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid in einem Weinmischgetränk,
pH 3,5*

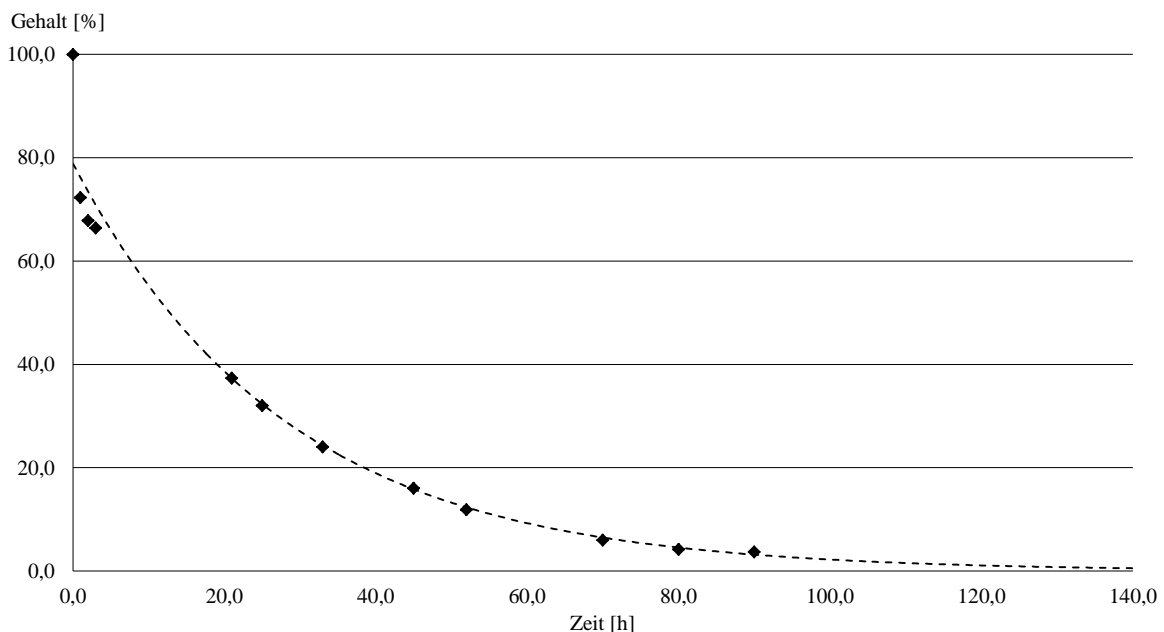


Abbildung 31: Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid in einem Weinmischgetränk, pH 3,5

Das obige Beispiel zeigt die Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid in einem Weinmischgetränk. Der pH-Wert liegt bei 3,5. Bei der vergleichbaren Hydrolyse in dem Puffersystem waren nach 24 h bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ etwa 85 % des eingesetzten Anhydrids zu Sorbinsäure hydrolysiert. In dem Weinmischgetränk waren nach 24 h bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ gut 68 % Sorbinsäureanhydrid hydrolysiert. Das bedeutet, die Hydrolyse geschieht, genau wie erwartet, langsamer als im wässrigen Puffersystem, aber deutlich schneller als in reinem Ethanol.

Anhand der verschiedenen Messungen kann ein Trend der Hydrolysegeschwindigkeiten angegeben werden. Da allerdings nicht nur der pH-Wert und die Temperatur einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben, sondern auch andere Faktoren, wie die jeweiligen Inhaltsstoffe (z.B. Natriumionen, Ethanolgehalt, typische Getränkeinhaltsstoffe), ist es notwendig, jeweils die Hydrolysekurve für verschiedene Getränkegruppen zu bestimmen.

3.4 Mikrobiologische Wirksamkeit

3.4.1 Verderb von Getränken durch Mikroorganismen

Bakterien, Hefen und Schimmelpilze können bei Anwesenheit in Getränken zum Verderb führen. Um das Auftreten von Mikroorganismen zu verhindern, werden vielfältige Maßnahmen zu ihrer Bekämpfung ergriffen (siehe Einleitung).

Durch den sauren pH-Wert der meisten Getränke stellen nur bestimmte Mikroorganismen ein Problem für die Produktions- und Abfüllbetriebe dar. Bei den Schimmelpilzen treten am häufigsten *Aspergillus* und *Penicillium* Arten auf, zu den weiteren Arten gehören *Byssochlamys* und *Mucor* Spezies, sowie *Trichoderma*. Typische Hefen, die bei der Getränkeherstellung auftreten können, sind *Brettanomyces* und *Candida* Arten, sowie *Saccharomyces* und *Zygosaccharomyces* Arten. Bei den Bakterien treten Essigsäurebakterien als bakterielle Verkeimung von Getränken am häufigsten auf, da sie bei relativ niedrigen pH Werten wachsen können (pH 3,0 – 3,5) und nur wenige Nährstoffe benötigen. Ebenso häufig entstehen mikrobielle Verunreinigungen in Getränken durch Milchsäurebakterien.

In je 30 % der Fälle treten Probleme mit Schimmelpilzen und Vorfälle mit Bakterienwachstum auf. Vierzig Prozent der Verkeimungen werden durch Hefen ausgelöst. Diese verursachen Trübungen, Bodensätze oder Kahmhäute. Das Auftreten dieser Getränkefehler, ebenso wie das Auftreten von Stoffwechselprodukten im Getränk ist bei Soft Drinks unerwünscht. Zu den sich bildenden Stoffwechselprodukten gehören zum Beispiel Ethylalkohol oder Kohlendioxid, Essigsäure und Milchsäure. Da die meisten Hefen und deren Sporen nicht hitzeresistent sind, kann man Getränke pasteurisieren, um diese keimfrei herzustellen^[107]. Bei der Pasteurisation kann es allerdings zur Veränderung des Geschmacks oder der Farbe kommen, weshalb in vielen Fällen nur eine Kurzzeit-Erhitzung eingesetzt wird.

Andere Probleme treten auf, wenn Schimmelpilze in Getränken vorhanden sind. Diese können für den Menschen giftige Mykotoxine bilden. Bei Obstsaften kann durch *Penicillium expansum*, *Penicillium urticae*, *Byssochlamys nivea* oder *Byssochlamys fulva* Patulin gebildet werden, welches sowohl Leberzirrhose, als auch Leberkrebs auslösen kann^[8]. Auch Aflatoxine oder Ochratoxine können auftreten, welche von *Aspergillus* Arten gebildet werden. Da diese Stoffe entweder mutagen oder cancerogen für den Menschen sind, muss das Auftreten der Schimmelpilze im Getränk vermieden werden.

Bakterien können die Fermentation oder Gärung von Säften in Gang setzen und somit den Verderb beschleunigen, bei diesen Vorgängen können sich ebenfalls Ethanol und Kohlendioxid bilden. Letzteres führt in großen Mengen zu einem Überdruck in Getränkeflaschen und sogar zum Platzen.

Mit besonderen Herausforderungen verbunden sind zusätzlich noch jene Mikroorganismen, welche Sporen bilden können. Sporen sind Dauerformen von MIO, die sich bilden, wenn die Lebensbedingungen für den Organismus ungünstig werden. Dabei werden alle Stoffwechselfvorgänge eingestellt. Verbessert sich das Milieu, wandelt sich die Spore wieder zum lebenden Bakterium um. Die meisten Sporen sind hitze- und kälteresistent und ebenfalls resistent gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Dies macht ein Auftreten im Getränk zu einem großen Problem.

3.4.2 Wirkmechanismus von Sorbinsäure und Sorbinsäureanhydrid

Sorbinsäure wird hauptsächlich eingesetzt, um Schutz vor Schimmelpilz- bzw. Hefebefall von Produkten zu gewährleisten. Gegenüber Bakterien ist Sorbinsäure weniger wirksam, es können aber einige katalasepositive Bakterien mit Hilfe von Sorbinsäure gehemmt werden.

Sorbinsäure kann verschiedenste Enzyme der Mikroorganismen hemmen, welche wichtige Funktionen steuern. Zu diesen gehören vor allem die Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels, Katalase und Peroxidase, sowie Enzyme mit SH-Gruppen. Die Hemmwirkung wird ausgelöst durch Kondensationsreaktionen unterschiedlicher funktionellen Gruppen der Enzyme und 1,4-Additionen an die Doppelbindungen. Bei Hefen werden hauptsächlich Enolasen durch Sorbinsäure gehemmt ^{[108][109]}. Dehydrogenasen werden ebenfalls vermehrt gehemmt, da die Säure über eine Doppelbindung kovalent mit dem Zinkanteil des Enzyms oder mit den SH-Gruppen reagiert ^[28].

Bisher sind keine Resistenzbildungen von Mikroorganismen gegenüber Sorbinsäure bekannt. So wurden unterschiedliche Organismen, wie z. B. *Escherichia coli* ^[110], *Saccharomyces cerevisiae* oder *Aspergillus niger* ^{[111][112]}, auf etwaige Resistenzbildungen untersucht. Einzig eine Adaption an die circa doppelte Grenzhemmkonzentration kann zeitweilig festgestellt werden, die Grenzhemmkonzentration nimmt dann bei Absetzen der Sorbinsäuredosis wieder ab ^[113].

Einige Mikroorganismen können sogar Sorbinsäure verwerten. Zu diesen gehören, wie oben schon erwähnt *Penicillium roqueforti* ^[32], manche Stämme von *Aspergillus niger* ^[33] und einzelne Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* ^[34]. Da hier die Wirkung von Sorbinsäureanhydrid besonders interessant ist, werden im Folgenden die Schimmelpilze *Penicillium roqueforti* und *Aspergillus niger* eingehend untersucht. Die antimikrobielle Wirkung von Sorbinsäureanhydrid wird aber auch gegenüber Hefen und Bakterien untersucht.

Da Sorbinsäureanhydrid zu Sorbinsäure hydrolysiert, wurde zunächst davon ausgegangen, dass die antimikrobielle Wirkung beider Stoffe vergleichbar ist. Allerdings ist bekannt, dass

kurzkettige Anhydride konservierend wirken können^[38], deshalb könnte Sorbinsäureanhydrid eine bessere Wirksamkeit als Sorbinsäure besitzen. Nach den ersten mikrobiologischen Tests wurde dann auch eine weit höhere antimikrobielle Wirkung des Anhydrids festgestellt, so dass Sorbinsäureanhydrid ein anderes Wirkspektrum besitzen muss als Sorbinsäure. Positiv daran ist, dass Sorbinsäureanhydrid später in Getränken als Konservierungsmittel eingesetzt werden könnte, im Getränk dann zu Sorbinsäure hydrolysiert und die Sorbinsäure dann immer noch eine persistente Wirkung gegenüber Mikroorganismen aufweist. So wäre das Risiko einer Verkeimung auch nach Öffnen des Getränks gering.

3.4.3 Wirkung von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Schimmelpilzen im Getränk

Da bekannt ist, dass Sorbinsäure verschiedene Arten von *Aspergillus* im Wachstum hemmen kann^[114], wird erwartet, dass auch Sorbinsäureanhydrid gegenüber diesem Schimmelpilz eine antimikrobielle Wirkung zeigt.

Um einen ersten Eindruck der Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid zu bekommen, wurde die Wirksamkeit in verschiedenen Abtötetests untersucht. Dazu wurden bekannte Mengen des jeweiligen Schimmelpilzes zu einer Getränkematrix gegeben und der Wirkstoff zugesetzt. Danach wurde in regelmäßigen Abständen das Keimwachstum untersucht. Die genauen Methoden zur Bestimmung der Wirksamkeit sind im experimentellen Teil dargestellt.

Es wurden zwei *Aspergillus niger* Stämme, *Byssochlamys fulva*, sowie *Penicillium brevicompactum* und *Penicillium roqueforti* auf ihre Resistenz gegenüber Sorbinsäureanhydrid untersucht.



Abbildung 32: *Aspergillus niger* (S 200, links) und *Byssochlamys fulva* (S 203)

Um die Hemmkonzentration gegenüber den verschiedenen Keimen einzuschätzen, wurden drei unterschiedliche Sorbinsäureanhydrid-Dosagen eingesetzt. Diese richteten sich nach den zugelassenen Mengen an Sorbinsäure für Getränke. Von Sorbinsäure dürfen bis zu 300 mg/L eingesetzt werden, typisch ist ein Einsatz von 250 ppm. Deshalb wurde die höchste einzuset-

zende Dosis für Sorbinsäureanhydrid zunächst auf ebenfalls 250 ppm festgelegt und zusätzlich die Wirkung von 50 und 100 ppm Sorbinsäureanhydrid auf die verschiedenen Schimmelpilze getestet.

Die drei Fotos der Schimmelpilze zeigen 4 bis 10 keimbildende Einheiten pro Milliliter. Die Nährböden in den Petrischalen sind von diesen wenigen Keimen stark bewachsen, so dass ein Auszählen von höheren Keimzahlen relativ schwierig ist. Deshalb wurden zunächst geringe Keimeinsaatungen getestet, bei denen die Petrischalen nach 24 h begutachtet wurden. Erst danach wurden höhere Keimeinsaatungen eingesetzt. Hier wurden Verdünnungen der Matrixlösungen hergestellt, um die genaue Keimzahl bestimmen zu können.



Abbildung 33: *Penicillium roqueforti* (S 204)

Am Beispiel von *Penicillium roqueforti* wird die Durchführung eines solchen Abtöte-Tests erläutert. Eine Woche vor Beginn des Tests wird *Penicillium roqueforti thom* (S 204) frisch geimpft, in einer Natriumchloridlösung suspendiert und Agarplatten für eine Keimzählung mit Verdünnungen dieser Suspension beimpft. Diese Platten werden nach 24 bzw. 48 h ausgezählt. Die Keimeinsaat für den Versuch soll 50 Keime pro Milliliter betragen.

Tabelle 17: Auswertung der Keimzählung von *Penicillium roqueforti thom*, S 204

| Lösung | ST 3 | ST 4 | ST 5 | ST 6 | ST 7 | ST 8 | ST 9 | ST 10 |
|--------|------|------|---------|-------|------|------|------|-------|
| KBE/mL | +/+ | +/+ | 170/184 | 20/20 | 1/2 | 0/1 | -/- | -/- |

ST: Stammlösung, +/+ : mehr als 300 KBE/mL, -/-: kein Wachstum

Von Stammlösung 6 ausgehend wird nun die einzusetzende Menge Keimsuspension berechnet. Da in 100 mL Matrix später 50 Keime/mL vorhanden sein sollen, müssen 25 µl der Stammlösung 2 zu dosiert werden. Sobald die Keimsuspension zu der Getränkematrix zugegeben wurde, werden zum einen Proben genommen, um die Startkeimzahl zu kontrollieren, und zum anderen werden die Wirkstoffe in den jeweiligen Mengen zugesetzt. Danach wird in

regelmäßigen Abständen (zunächst nach 24 h, danach 1x pro Woche) das Wachstum der Keime untersucht.

Tabelle 18: Auswertung des Abtötetests von *Penicillium roqueforti thom*, S 204, Keimeinsaat: 50 KBE/mL

| Wirkstoff | Start-KZ | 24h-KZ | 1 Wo-KZ | 2 Wo-KZ | 4 Wo-KZ |
|-------------|----------|---------|----------|---------|---------|
| A Nullprobe | 28/28 | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| B 50 SSA | 8/7 | 1/0/1/0 | 12/9/8/5 | +/+ | +/+ |
| C 100 SSA | 19/23 | 3/2/1/2 | 5/4/9/8 | 5/7/3/4 | +/+ |
| D 250 SSA | 38/15 | 2/3/1/0 | 6/4/5/5 | 7/9/3/4 | 1/1/0/1 |
| E 300 KS | 12/23 | 7/3/1/0 | 2/3/7/8 | 3/3/2/2 | 1/0/1/0 |

B: 50 mg/L Sorbinsäureanhydrid, C: 100 mg/L Sorbinsäureanhydrid, D: 250 mg/L Sorbinsäureanhydrid, E: 300 mg/L Kaliumsorbat

Die Startkeimzahl beträgt 20 KBE/mL. Nach 24 h sind die beimpften Platten der Kontrollprobe voll bewachsen und nach einer Woche ist in den Flaschen der Nullprobe der Schimmel schon mit bloßem Auge sichtbar.

Nach 24 h sind in der mit Wirkstoff versetzten Matrix im Durchschnitt nur 2 KBE/mL gewachsen. Innerhalb der nächsten vier Wochen wuchs der Schimmel sichtbar in den Flaschen mit 50 bzw. 100 ppm Sorbinsäureanhydrid. In den Flaschen, die mit 250 ppm Sorbinsäureanhydrid ausgerüstet waren, wuchs nach vier Wochen nur ein Keim/mL. 300 mg Kaliumsorbat pro Liter Matrix zeigten eine vergleichbare Wirkung, auch hier wuchs nach vier Wochen nur noch 1 Keim/mL.

Dieser erste Test zeigt, dass Sorbinsäureanhydrid in geringer Dosierung das Wachstum von *Penicillium roqueforti thom* hemmen kann. Die größte Dosis zeigt sich zudem nach vier Wochen als so wirksam, dass nur noch 1 Keim/mL übrig bleibt. Mit einer etwas höheren Dosierung (300 ppm), die später getestet wurde, konnte der Schimmelpilz bei vergleichbaren Bedingungen gänzlich abgetötet werden. Bei Keimeinsaat bis 1.000 Keime/mL zeigten sich ebenfalls wachstumshemmende bis abtötende Wirkungen von Sorbinsäureanhydrid. Bei höheren Keimeinsaat wirken die 250 mg/L aber nur noch hemmend. Das bedeutet, kleine Keimmengen von *Penicillium roqueforti* können durch Sorbinsäureanhydrid abgetötet werden und größere Keimvorkommnisse können immerhin im Wachstum gehemmt werden.

Da *Penicillium roqueforti* in der Lage ist, Sorbinsäure zu verwerten und dabei 1,3-Pentadien zu bilden, stellt sich die Frage, ob Sorbinsäureanhydrid ebenfalls verstoffwechselt wird. Nach Zugabe von 300 mg/L Sorbinsäureanhydrid und 300 mg/L Kaliumsorbat stellte sich heraus, dass der Schimmel durch die höhere Dosierung an Sorbinsäureanhydrid abgetötet wurde, während das Kaliumsorbat zum Teil verwertet wurde. Bei längerer Beobachtung der Flaschen wuchs nach ca. 2 Monaten in den Flaschen, in denen Kaliumsorbat als Wirkstoff war, der

Schimmelpilz wieder. Zudem konnte nach 55 Tagen der charakteristische Geruch von Pentadien in den Kaliumsorbat-Proben nachgewiesen werden. In den Flaschen, zu denen Sorbinsäureanhydrid gegeben wurde, wuchs der Schimmelpilz nicht und es bildete sich auch kein Pentadien. Da das Sorbinsäureanhydrid in wässriger Lösung zu Sorbinsäure hydrolysiert, ist es mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich nachzuweisen, ob Sorbinsäureanhydrid ebenfalls verstoffwechselt werden kann. Auch bei ¹³C- oder radioaktiv-markierten Sorbinsäureanhydridmolekülen wäre es nicht möglich nachzuweisen, ob die verstoffwechselte Substanz aus dem Anhydrid oder der daraus hydrolysierten Sorbinsäure stammt.

In gleicher Weise wie bei *Penicillium roqueforti* wurden verschiedene Keimeinsaat und verschiedene Schimmelpilze auf ihre Anfälligkeit gegenüber Sorbinsäureanhydrid getestet. Die genauen Daten finden sich im Anhang.

Die Ergebnisse der Abtötetests zeigten, dass eine Zugabe von 250 mg Sorbinsäureanhydrid pro Liter Getränkematrix vier der fünf getesteten Schimmelpilze bei Keimeinsaat bis 1000 KBE/mL abtötet. Der einzige Schimmelpilz, der auf die unterschiedlichen Mengen SSA nicht reagierte, war einer der beiden *Aspergillus niger* Stämme. Dieser Stamm ist ein hochresistenter Stamm, der gegenüber allen getesteten Konservierungsmitteln (Sorbat, Benzoat, Velcorin und Sorbinsäureanhydrid) keine Wirkung zeigte.

Bei den höheren Keimeinsaat bewirkte der Einsatz der höchsten Dosis Sorbinsäureanhydrid immerhin noch eine Hemmung des Wachstums. Auch der Einsatz von 100 ppm Sorbinsäureanhydrid zeigte eine Hemmung des Wachstums gegenüber allen vier Stämmen. Bei geringeren Keimeinsaat (bis 1.000 KBE/mL) wirkte die Zugabe von 250 ppm Sorbinsäureanhydrid abtötend auf 99,9 % der Keime. Alle Angaben beziehen sich auf einen Zeitraum von der Dosage bis vier Wochen danach.

Bei den vier getesteten Keimen war es möglich, geringe Keimeinsaat abzutöten, so dass kein Wachstum mehr zu erkennen war. Bei größeren Keimeinsaat war es nur möglich, das Wachstum zu hemmen.

Tabelle 19: Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Schimmelpilzen

| Name | Keimeinsaat | Sorbinsäureanhydrid | | |
|-----------------------------------|--------------|---------------------|----------|----------|
| | | 50 ppm | 100 ppm | 250 ppm |
| <i>Aspergillus niger</i> | 100 – 1.000 | nicht wirksam* | hemmend* | wirksam* |
| <i>Byssoschlamys fulva</i> | bis 200.000 | nicht wirksam | hemmend | hemmend |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> | 100 – 10.000 | nicht wirksam | hemmend | hemmend |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | 100 – 1.000 | nicht wirksam | hemmend | wirksam |

*Nicht wirksam: > 300 KBE/mL, hemmend: < 1/5 der Einsaat, wirksam < 5 KBE/mL, sehr wirksam: < 1 KBE/mL

Zu vermuten ist, dass Sorbinsäureanhydrid in großen Dosen viele verschiedene Arten von Schimmelpilzen abtöten kann, wenn sie in kleiner Keimzahl auftreten. Da aber jeder Schimmelpilz anders reagiert, muss vor dem Einsatz bei einem Problem in der Getränkeindustrie zunächst die Wirksamkeit gegenüber dem jeweiligen Schimmelpilz getestet werden.

In geringerer Dosierung wirkt Sorbinsäureanhydrid immerhin wachstumshemmend, dies verzögert ein Auftreten von großen Mengen Mikroorganismen, so dass in einem Produktionsbetrieb geeignete Maßnahmen ergriffen werden können, um den Organismus zu entfernen.

Von Vorteil bei geringen Keimbelastungen ist zudem die nach der Hydrolyse entstehende Sorbinsäure. Sie hat eine persistente Wirkung und verhindert ebenfalls das Keimwachstum.

3.4.4 Wirkung von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Hefen im Getränk

Des Weiteren wurde die Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber verschiedenen in Getränken vorkommenden Hefen untersucht. Da Sorbinsäure bei Hefebefall als wirksames Konservierungsmittel eingesetzt ^{[115][116][117]} wird, kommt es nach der Hydrolyse des Anhydrids zu einer weiteren antimikrobiellen Wirkung.

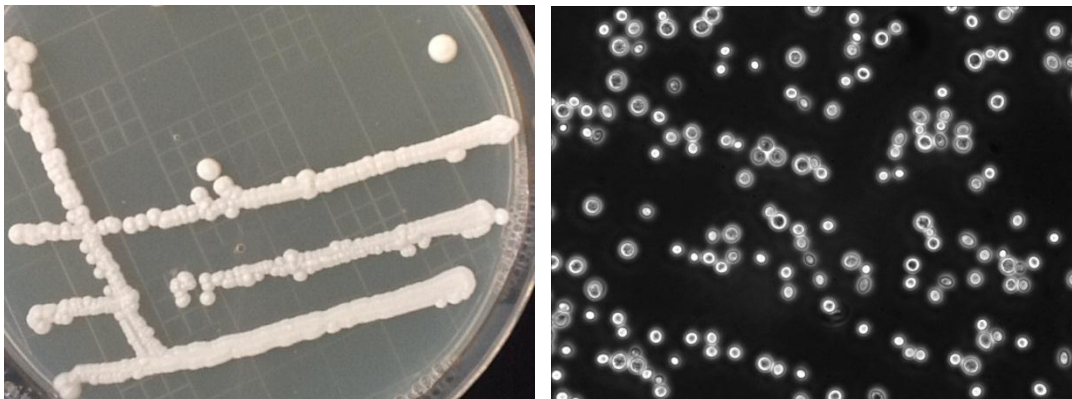


Abbildung 34: *Saccharomyces cerevisiae* (H 16332)

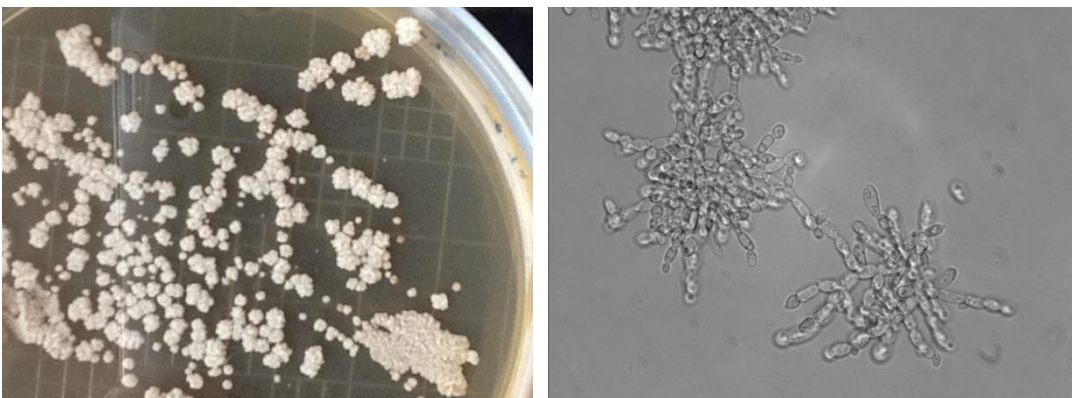


Abbildung 35: *Zygosaccharomyces bailii* (H 16237)

Es wurden verschiedene Abtötetests mit *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* und einem *Candida*-Mix durchgeführt. Zunächst wurden wieder geringe Keimeinsaat getestet, um einen ersten Eindruck der Wirksamkeit zu erlangen. Da 50 mg/L Sorbinsäureanhydrid hier bei allen Keimen eine sehr gute Wirksamkeit zeigte, wurden die Keimeinsaat auf bis zu 200.000 KBE/mL erhöht. Auch bei diesen Tests zeigte sich eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber den beiden einzelnen Hefen. Nach Zugabe von nur 50 mg Sorbinsäureanhydrid pro Liter Getränkematrix bei Keimeinsaat bis zu 200.000 Keime/mL wurden die Keime bis auf sehr wenige Ausnahmen (1-10 Keime/mL *Zygosaccharomyces* wuchsen noch) abgetötet, das heißt, eine vergleichsweise geringe Sorbinsäureanhydrid-Zugabe kann viele Keime abtöten.

Tabelle 20: Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Hefen

| Name | Keimeinsaat | Sorbinsäureanhydrid | | |
|---------------------------------|-------------|---------------------|--------------|--------------|
| | | 50 ppm | 100 ppm | 250 ppm |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | bis 200.000 | sehr wirksam | sehr wirksam | sehr wirksam |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | bis 200.000 | wirksam | sehr wirksam | sehr wirksam |
| <i>Candida</i> -Mix | bis 200.000 | hemmend | hemmend | wirksam |

*Nicht wirksam: > 300 KBE/mL, hemmend: < 1/5 der Einsaat, wirksam < 5 KBE/mL, sehr wirksam: < 1 KBE/mL

Auch die Keime der *Candida*-Mischung wurden von 250 ppm Sorbinsäureanhydrid fast vollständig abgetötet. Das Anhydrid ist somit gegenüber allen getesteten Hefen sehr wirksam. Sogar die Zugabe von 1 mg Sorbinsäureanhydrid zeigte ein gehemmtes Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*.

Diese geringe Dosis wurde getestet, um eventuell einen ersten Eindruck des Wirkmechanismus von Sorbinsäureanhydrid zu bekommen. Die Mikroorganismen sollen dabei einer geringen Konzentration des Wirkstoffs ausgesetzt werden, ohne abgetötet zu werden. So wurden zu dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm täglich 1 mg/L Sorbinsäureanhydrid zugesetzt, diese Zugabe verlangsamte das Wachstum der Hefe. Vor der ersten Zugabe des Anhydrids wurde ein „Analytischer Profil Index“-Test (API-Test) mit den Zellen durchgeführt. Hierbei werden hauptsächlich Enzymleistungen des Kohlenhydrat- oder Aminosäurestoffwechsels nachgewiesen. Durch Indikatoren werden verschiedene Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen bei Anwesenheit verschiedener Kohlenhydrate oder anderer Nährstoffe sichtbar gemacht.

Nach einer bzw. zwei Wochen wurde erneut ein API-Test mit den Zellen durchgeführt, die der Anwesenheit von Sorbinsäureanhydrid ausgesetzt waren. Er sollte eventuell auftretende Veränderungen im Kohlenhydrat- oder Aminosäurestoffwechsel zeigen.

Beim Vergleich aller drei Tests zeigte sich kein sichtbarer Unterschied in der Verstoffwechslung der verschiedenen angebotenen Nährstoffe. Alle drei Tests zeigen die gleichen bewachsenen Felder, bzw. die gleichen Farbumschläge.

Somit konnten anhand des API-Tests keine Schlüsse auf eine mögliche Wirkweise von Sorbinsäureanhydrid auf die Mikroorganismen gezogen werden.

3.4.5 Wirkung von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Bakterien im Getränk

Sorbinsäureanhydrid wurde ebenfalls auf seine mikrobiologische Wirksamkeit gegenüber vier verschiedenen Essigsäurebakterien und zwei unterschiedlichen Milchsäurebakterien getestet. Es wurden unterschiedliche Keimeinsaat untersucht.

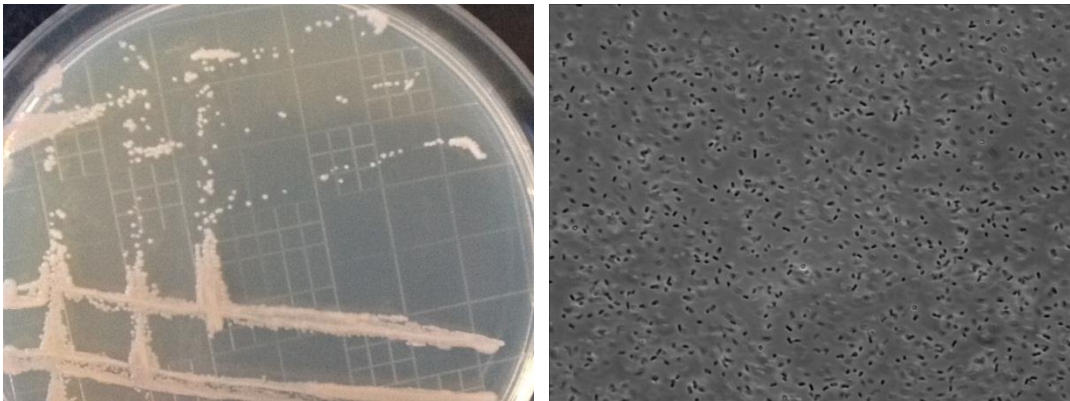


Abbildung 36: *Asaia bogorensis* (B 16011)

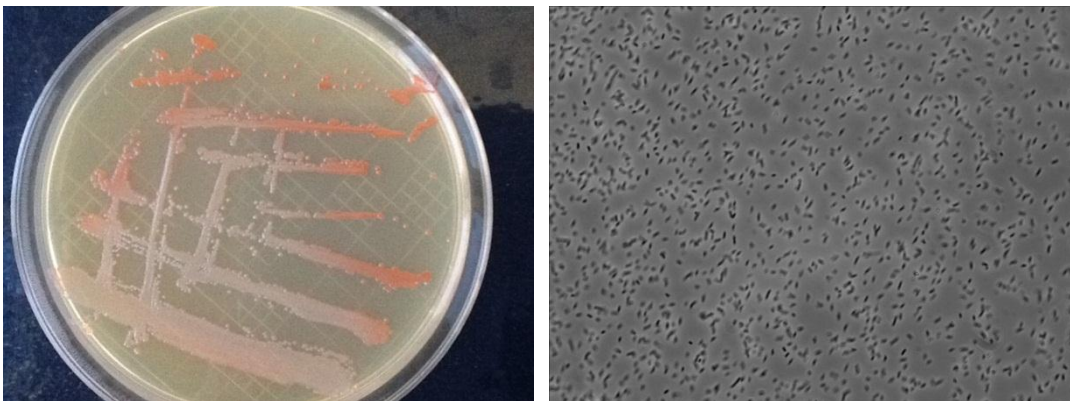


Abbildung 37: *Asaia lannaensis* (B 16239)

Gegenüber den vier getesteten Essigsäurebakterien ist Sorbinsäureanhydrid antimikrobiell wirksam. Bis zu 10.000 Keime *Acetobacter aceti* pro Milliliter Matrix werden schon bei der sehr geringen Konzentration von 50 ppm Sorbinsäureanhydrid abgetötet, *Asaia bogorensis* (75.000 KBE/mL) wird im Wachstum bei 50 mg/L Einsatz von Sorbinsäureanhydrid im Wachstum stark gehemmt und bei einer Zugabe von 250 mg/L Anhydrid gänzlich abgetötet. Das Wachstum von *Asaia lannaensis* wird nach Dosage der geringsten Menge gehemmt (bei

100.000 KBE/mL) und auch verschiedene *Gluconacetobacter*-Spezies werden von der höchsten Sorbinsäureanhydrid-Konzentration im Wachstum gehemmt. Im Vergleich dazu bewirkt eine Zugabe von jeweils 250 mg/L Kaliumsorbat bei den angegebenen Keimeinsaat keine Hemmung des Wachstums.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Sorbinsäureanhydrid einen anderen mikrobiologischen Wirkmechanismus besitzen muss als Sorbinsäure. Da im Falle dieser vier Essigsäurebakterien Kaliumsorbat nicht abtötend oder hemmend auf die Bakterien wirkt, muss das Anhydrid selbst die mikrobiozide Wirkung besitzen. Der Zerfall zu Sorbinsäure setzt allenfalls weiteres antimikrobielles Potenzial frei, welches allerdings bei den Essigsäurebakterien nicht zum Tragen kommt. Bei drei der vier Bakterien ist eine Hemmung des Wachstums schon bei einer Konzentration von 50 mg/L deutlich erkennbar. Einzig der *Gluconacetobacter spez.* ist relativ resistent gegenüber Sorbinsäureanhydrid. Die vorher bestimmte Höchstdosis wirkt hier nur hemmend auf das Wachstum. Erst eine deutlich größere Zugabe von Sorbinsäureanhydrid tötet die Bakterien gänzlich ab.

Tabelle 21: Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Essigsäurebakterien

| Name | Keimeinsaat | Sorbinsäureanhydrid | | |
|--------------------------------|--------------|---------------------|---------------|--------------|
| | | 50 ppm | 100 ppm | 250 ppm |
| <i>Acetobacter aceti</i> | 10.000 K/mL | sehr wirksam | sehr wirksam | sehr wirksam |
| <i>Asaia bogorensis</i> | 75.000 K/mL | wirksam | wirksam | sehr wirksam |
| <i>Asaia lannaensis</i> | 100.000 K/mL | hemmend | hemmend | hemmend |
| <i>Gluconacetobacter spez.</i> | 1000 K/mL | nicht wirksam | nicht wirksam | hemmend |

*Nicht wirksam: > 300 KBE/mL, hemmend: < 1/5 der Einsaat, wirksam < 5 KBE/mL, sehr wirksam: < 1 KBE/mL

In Bezug auf die getesteten Essigsäurebakterien zeigte das Sorbinsäureanhydrid eine deutlich bessere Wirksamkeit als Sorbinsäure. Vermutet wird, dass das Anhydrid gegenüber den meisten Essigsäurebakterie eine mikrobiozide Wirkung zeigt. Allerdings sind die Vorgänge innerhalb der verschiedenen Mikroorganismen sehr komplex und sehr unterschiedlich, so dass die Wirksamkeit des Anhydrids für jeden Keim einzeln getestet werden müsste. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit war es nicht möglich, weitere Essigsäurebakterien zu testen. Bis es zu einem industriellen Einsatz des Anhydrids kommt, ist es notwendig, weitere Mikroorganismen auf ihre Resistenz gegenüber Sorbinsäureanhydrid zu testen. Bei speziellen Problemen mit selten vorkommenden Mikroorganismen während der industriellen Herstellung von Getränken sollte die Wirksamkeit des Wirkstoffes vor einem Einsatz geprüft werden.

Nach den Essigsäurebakterien wurden zwei Milchsäurebakterien getestet. Die meisten *Lactobacillen* sind mikroaerob, das bedeutet, sie vertragen nur geringe Mengen Sauerstoff. Manche

Lactobacillen sind anaerob und wachsen somit nur gut in einer Umgebung, die frei von Sauerstoff ist. Deshalb wurden alle Versuche mit *Lactobacillen* unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.

In diesen Abtöte-Tests zeigte sich, dass die Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Milchsäurebakterien sehr unterschiedlich sein kann. So konnten 50 mg/L Sorbinsäureanhydrid eine Million Keime pro Milliliter von *Lactobacillus brevis* in Getränkematrix abtöten. *Lactobacillus casei* hingegen wuchs auch bei Zugabe von 250 mg/L Anhydrid bei einer geringeren Keimeinsaat. Das Kaliumsorbat zeigte keinerlei Wirkung gegenüber beiden *Lactobacillen*. Auch in diesem Fall ist das Sorbinsäureanhydrid wirksamer als Sorbinsäure.

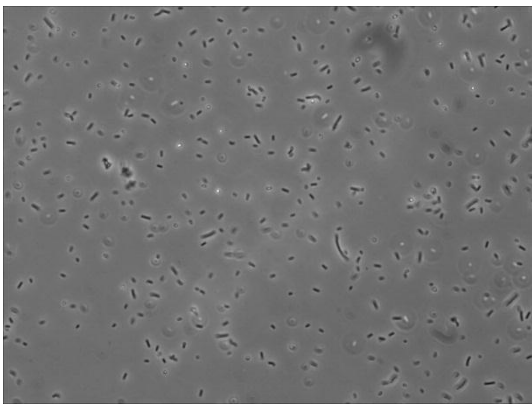


Abbildung 38: *Lactobacillus brevis* (B 15190)

Tabelle 22: Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Milchsäurebakterien

| Name | Keimeinsaat | Sorbinsäureanhydrid | | |
|-----------------------------|------------------|---------------------|---------------|---------------|
| | | 50 ppm | 100 ppm | 250 ppm |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | bis 100.000 K/mL | wirksam | wirksam | wirksam |
| <i>Lactobacillus casei</i> | bis 10.000 K/mL | nicht wirksam | nicht wirksam | nicht wirksam |

*Nicht wirksam: > 300 KBE/mL, hemmend: < 1/5 der Einsaat, wirksam < 5 KBE/mL, sehr wirksam: < 1 KBE/mL

Allerdings lässt sich auch hier keine verallgemeinernde Aussage über die Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Milchsäurebakterien treffen. Wie für die Essigsäurebakterien und alle anderen Mikroorganismen gilt die Komplexität des Wirkmechanismus auch für Milchsäurebakterien. Es ist somit notwendig die Wirksamkeit für jeden mehrere Keime gesondert zu untersuchen.

Wie die Wirksamkeitstests mit den verschiedenen Mikroorganismen zeigen, ist es möglich verschiedene Mikroorganismen mit Hilfe von Sorbinsäureanhydrid in Getränken abzutöten. Dabei orientiert sich die verabreichte Dosis an der zugelassenen Höchstmenge von Sorbinsäure. Da die Wirksamkeit im Vergleich zu Sorbinsäure in den meisten Fällen deutlich höher war, kann eine geringere Menge als 250 ppm als Konservierungsmittel verwendet werden.

Aufgrund seiner antimikrobiellen Wirksamkeit ist Sorbinsäureanhydrid als Konservierungsmittel für die Getränke geeignet.

3.5 Toxizität von Sorbinsäure und Sorbinsäureanhydrid

Metabolismus und Toxikologie von Sorbinsäure wurden schon früh aufgeklärt und sind gut bekannt. Fingerhut et. al. zum Beispiel untersuchten den Metabolismus von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Sorbinsäure, dabei wurden 85 % des Kohlenstoffs in ausgeatmetem CO_2 wiedergefunden, 3 % in inneren Organen, 3 % in Muskeln, 2 % im Urin, 0,4 % im Fäces und 6,6 % in sonstigen Körperteilen. Nach oraler Aufnahme wird das Konzentrationsmaximum im Blutplasma ungefähr innerhalb einer Stunde erreicht. Der Abbau von Sorbinsäure durch β -Oxidation hat eine ungefähre Halbwertszeit von ebenfalls 60 Minuten ^[118].

Da Sorbinsäure über den Fettstoffwechsel abgebaut wird, sind auch einmalige höhere Dosen eher unbedenklich. Des Weiteren wirkt Sorbinsäure weder mutagen noch karzinogen. Die letale Dosis (LD_{50}) für Ratten liegt bei 10 g/ kg Körpergewicht. Der ADI-Wert (acceptable daily intake) wurde von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) auf max. 25 mg/ kg Körpergewicht festgelegt und wurde früher auch in der Zusatzstoffzulassungsverordnung angegeben ^[10]. Das entspricht bei einer erwachsenen Person (75 kg) einer täglichen Aufnahmemenge von 1,875 g Sorbinsäure.

Über Sorbinsäureanhydrid gab es zu Beginn der Dissertationsarbeit nur die Daten über die akute orale Dosis, sie beträgt nach Troller und Olsen 2,0 g/kg Körpergewicht und wurde an Ratten getestet ^[38]. Ansonsten gibt es keine öffentlich zugänglichen toxikologischen Daten.

Im Rahmen des Projektes wurden toxikologische Untersuchungen in Auftrag gegeben. Da diese Studien über längere Zeiträume durchgeführt werden, liegen bisher keine weiteren Ergebnisse zur Toxizität von Sorbinsäureanhydrid vor.

3.6 Anwendungsmöglichkeiten

Da das Sorbinsäureanhydrid - wie oben bereits dargestellt - nicht gut wasserlöslich ist, muss eine Möglichkeit gefunden werden, den Stoff im Getränk zu verteilen, ohne dass er wieder als Feststoff ausfällt. Zunächst wurde versucht, das Sorbinsäureanhydrid möglichst klein zu zermahlen und es in Wasser zu lösen. Für die Löslichkeitsversuche in Wasser wurde jeweils ein Überschuss an Sorbinsäureanhydrid zum Wasser hinzugegeben und später abfiltriert. Dies ist industriell nicht möglich. So wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Anwendung in einem Getränkebetrieb möglich zu machen.

Bei dem Versuch das Sorbinsäureanhydrid als Schmelze bei ca. 40 °C zu zugeben, fiel ein Großteil des Produkts als weiße Flocken aus, ein kleiner Teil löste sich und es bildete sich außerdem ein öliger, schillernder Film auf der Wasseroberfläche.

Vielleicht ist es möglich, die Schmelze über eine Düse ins Getränk einzubringen, wenn die Tropfen, die an der Düse versprüht werden klein genug sind, so dass sich ein Kolloid bildet. Die Teilchen müssten dann eine Größe zwischen 1 nm bis 1 µm aufweisen.

Einfacher ist es, das Anhydrid vorzulösen, um eine bessere Verteilung im Getränk zu gewährleisten. Dazu eignen sich die in Kapitel 3.3.4 genannten Lösungsmittel, wie Ethylenglycoldiacetat, Methanol, Ethanol, iso-Propanol, Aceton und 2-Butanon wegen ihrer physikalischen Eigenschaften. Da die Dichte von Ethylenglycoldiacetat größer ist als die Dichte von Wasser, sinken die in Wasser injizierten Tröpfchen der Sorbinsäureanhydrid-Lösung zu Boden und werden durch Rühren wieder aufgewirbelt. Selbst bei diesem gut geeigneten Lösungsmittel fällt ein Teil des Sorbinsäureanhydrids als weiße Flocken aus. Allerdings ist Ethylenglycoldiacetat nicht für die Verwendung in Getränken zugelassen.

Es müssen also weitere Tests gemacht werden, um eine ideale Anwendung in der Industrie zu gewährleisten. Weitere Möglichkeiten der Anwendung wären als Lösung in überkritischem CO₂, dies ist zum Beispiel bei der Extraktion von Gewürzaromen oder bei der Kaffeeverarbeitung ein typisches Lösungsmittel.

Vielleicht wäre eine weitere Möglichkeit der Anwendung auch ein Aufzug auf einen Trägerstoff, der ebenfalls die bessere Verteilung im Getränk gewährleistet. Dieser Trägerstoff könnte ein normaler Inhaltsstoff eines Getränks sein, wie zum Beispiel Zucker oder ein Emulgator oder ähnliches. Dazu muss allerdings ausgeschlossen sein, dass das Sorbinsäureanhydrid Reaktionen mit eben diesen Stoffen eingeht.

3.7 Nebenreaktionen mit Getränkeinhaltsstoffen

Sorbinsäureanhydrid kann als Konservierungsmittel nur in Getränken eingesetzt werden, wenn ausgeschlossen ist, dass es mit Inhaltsstoffen aus dem Getränk reagiert und toxische Reaktionsprodukte bildet.

Es sind verschiedene Reaktionen von Sorbinsäure mit Nitrit-Ionen bekannt, ebenso ist die Autoxidation untersucht, genauso wie nucleophile Reaktionen mit Sulfit-Ionen oder Aminen ^[119]. Diese Reaktionen laufen relativ langsam ab, nach 24 – 48 h sind allerdings Reaktionsprodukte per HPLC nachweisbar. Die Reaktion von Sorbinsäure mit Methylamin in Wasser wurde von Ferrand genauer untersucht, es bildeten sich bei unterschiedlichen Temperaturen jeweils zwei Hauptprodukte (Ethyl-5-(N-methylamino)-3-hexenoat bzw. -2-hexenoat bei 20 °C und bei 50 °C N-Methyl-6-methyl-3,6-dihydro-2-pyridon und N-Methyl-6-methyl-5,6-dihydro-2-pyridon) ^[118]. Auch Reaktionen von Sorbinsäure mit Thiolen ^[120] und die nichtenzymatische Bräunung von Sorbinsäure sind in der Literatur belegt ^[121].

Aufgrund dieser verschiedenen Versuche und aufgrund der Tatsache, dass Anhydride als reaktionsfreudig gelten, wurde zunächst davon ausgegangen, dass Sorbinsäureanhydrid mit verschiedenen Getränkeinhaltsstoffen, vor allem den Aminosäuren, reagiert.

Um dies nachzuweisen wurden verschiedene Modellversuche in konzentrierten Lösungen, sowie einige Versuche direkt im Getränk durchgeführt, bei denen Sorbinsäureanhydrid mit Getränkeinhaltsstoffen zur Reaktion gebracht werden sollte.

Bei den Messungen zur Aufnahme der Hydrolysekurven in Getränken (siehe oben) zeigten sich im HPLC-Chromatogramm keine neuen Peaks, weshalb davon ausgegangen wird, dass zumindest keine spontanen, mengenmäßig großen Reaktionen mit Getränkeinhaltsstoffen auftreten, die per HPLC nachweisbar sind. Dies wurde in Versuchen bestätigt, bei denen Sorbinsäureanhydrid im Überschuss zu aromatisiertem Wasser oder Apfelsaft gegeben wurde und über 1 Woche gerührt wurde. Es wurden täglich drei Proben dieser Versuche per HPLC gemessen, dabei traten Veränderungen des Chromatogramms nur im Gehalt des Anhydrids bzw. der Sorbinsäure auf. In dem Maße, in dem der Gehalt des Anhydrids abnahm, nahm der Gehalt der Sorbinsäure zu. Die Wiederfindung der Sorbinsäure nach Abschluss der Versuche lag erneut bei 98,5 %.

Nachdem bei Raumtemperatur keinerlei Nebenprodukte auftraten, wurden die Modellversuche bei höherer Temperatur durchgeführt. Hierbei wurden konzentrierte Lösungen des jeweiligen Inhaltsstoffes mit einer Lösung von Sorbinsäureanhydrid gemischt und für mindestens 24 h bei 50 – 80 °C gerührt.

Erwartet wurden verschiedene Reaktionen an der Anhydridfunktion: die Hydrolyse zu Sorbinsäure, eine Veresterung bei Reaktion mit Alkoholen oder die Aminolyse zu Sorbinsäureamiden. Möglich sind auch Reaktionen an den verschiedenen Doppelbindungen, wie Addition, oxidative Spaltung oder die Dimerisierung, Oligomerisierung oder Polymerisation. Die Bildung von Hydroperoxiden, wie sie bei Sorbinsäure beobachtet wurde, könnte ebenfalls auftreten.

Zunächst wurden Zucker und Süßstoffe untersucht, danach verschiedene Vitamine, die in den meisten Getränken vorhanden sind. Bei allen Reaktionen konnte kein anderes Reaktionsprodukt als Sorbinsäure nachgewiesen werden. In den verschiedenen Reaktionsansätzen war immer noch eine große Menge Sorbinsäureanhydrid vorhanden, welches per HPLC nachgewiesen werden konnte.

Als nächstes wurden Ammoniak und Aminosäuren getestet. Dabei bildete sich nach ca. 12 h Reaktionszeit in einer Mischung aus Sorbinsäureanhydrid und konzentriertem Ammoniak Sorbinsäureamid mit einer Masse von 111 g/mol, welches durch LC-MS nachgewiesen wurde.

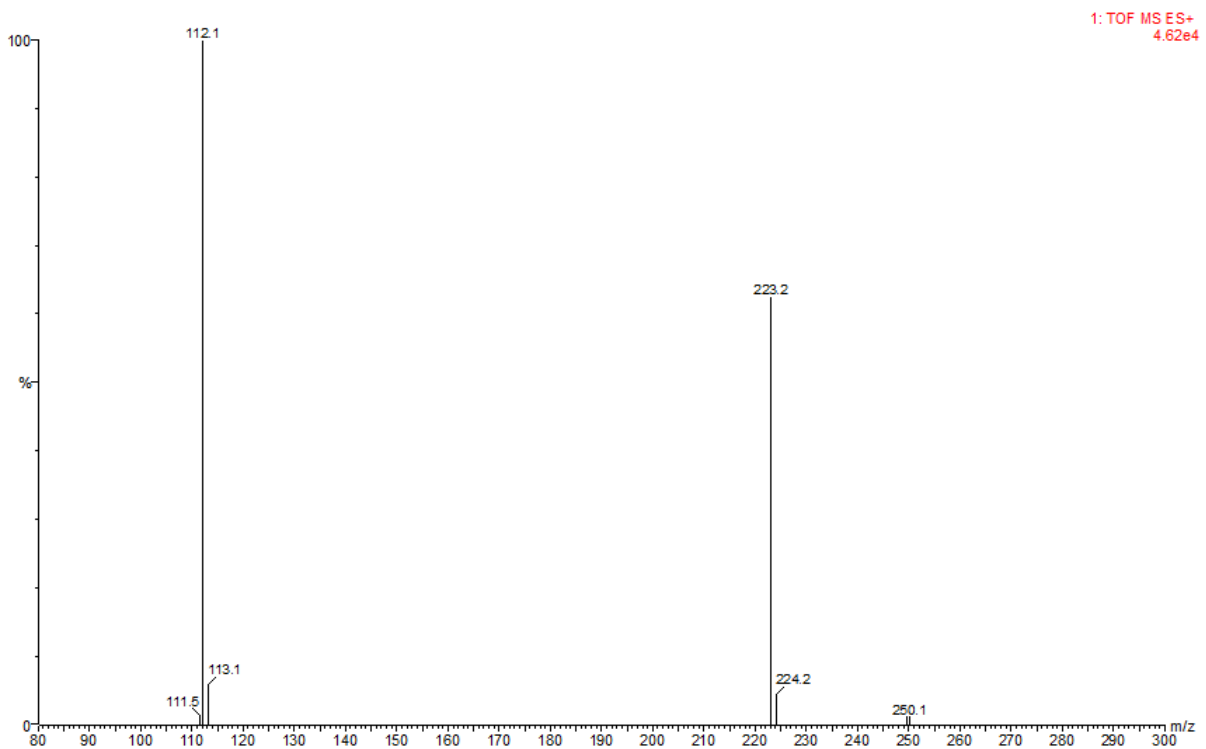


Abbildung 39: Massenspektrum von Sorbinsäureamid

Daraufhin wurde erwartet, dass bei Mischungen mit den Aminosäuren ebenfalls Amide gebildet werden. Dies war nicht der Fall. In allen Reaktionsansätzen konnten nur Sorbinsäureanhydrid, die eingesetzte Aminosäure und Sorbinsäure nachgewiesen werden.

In der folgenden Tabelle sind alle eingesetzten Edukte nach ihren Stoffklassen aufgezählt. Bei allen Reaktionsansätzen fand keine weitere Reaktion, außer einer Hydrolyse zu Sorbinsäure statt.

Tabelle 23: Edukte für die Umsetzung von SSA mit Getränkeinhaltsstoffen

| <i>Stoffklasse</i> | <i>Eingesetzte Edukte</i> |
|--------------------|---|
| Zucker | Fructose, Glucose, Saccharose |
| Süßstoffe | Acesulfam K, Aspartam, Cyclamat, D-Mannit, Neohesperidin, Saccharin, Stevia |
| Vitamine | Ascorbinsäure, Carotin, Cobalamin, Folsäure, Nicotinsäure, Riboflavin, Thiamin, Tocopherol, Pantothersäure, Pyridoxin |
| Säuren | Äpfelsäure, Citronensäure, Milchsäure, Weinsäure |
| Aminosäuren | Glutamin, Histidin, Prolin, Serin, Arginin |
| Sonstiges | Carnitin, Coffein, Essigsäure, Ethanol, Glucosamin, Limonen, Lysozym, Natriumbenzoat, Phosphorsäure, Taurin |

In den getesteten Getränken konnten per HPLC keine Nebenreaktionsprodukte detektiert werden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode lagen für Sorbinsäure bei 100 ppb bzw. für Sorbinsäureanhydrid bei 1 ppm. Da in allen Fällen eine Wiederfindung von Sorbinsäure > 98 % gegeben war, könnten nur 2 % des Sorbinsäureanhydrids mit Getränkeinhaltsstoffen reagieren. In diesem Fall also könnten 2 mg Sorbinsäureanhydrid zu Nebenprodukten reagieren. Die Konzentrationen der sich bildenden Stoffe lägen also nahe an den Nachweisgrenzen der Methode. Mithilfe einer anderen Methode könnten evtl. gebildete Nebenprodukte in diesen geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Diese Mittel standen während der Dissertation aber nicht zur Verfügung.

Da keine spontanen Reaktionen im Getränk beobachtet wurden und auch in den Modellversuchen bei hohen Konzentrationen und erhöhter Temperatur keine Reaktionen von Sorbinsäureanhydrid mit den Getränkeinhaltsstoffen beobachtet werden konnte, wird davon ausgegangen, dass das Sorbinsäureanhydrid unter den gegebenen Umständen eher hydrolysiert, als dass es andere Reaktionen eingeht.

Alkohole wurden in diesem Versuchsteil nicht untersucht, da sich schon bei den Löslichkeits- und Stabilitätsversuchen zeigte, dass sich Sorbinsäure-Ester durch Lagerung von Sorbinsäureanhydrid in Alkoholen (Methanol, Ethanol und Iso-Propanol) bilden. Zudem ist bekannt, dass durch Sorbinsäure in Weinen ein Geranienton verursacht wird ^[122]. Dieser wird verursacht durch 2-Ethoxy-3,5-Hexadien. Für eine Anwendung in Wein müssten somit auch diese Nebenreaktionsprodukte toxikologisch untersucht werden.

Die einzige weitere Reaktion neben der Bildung der Ester war die Reaktion mit Ammoniak, die nur im Modellversuch mit konzentrierten Lösungen stattfand. Diese Umstände sind im Getränk nicht gegeben. Deswegen wird davon ausgegangen, dass es bei Normalbedingungen im Getränk nicht zu weiteren Nebenreaktionen von Sorbinsäureanhydrid mit Getränkeinhaltsstoffen kommt, sondern nur die Hydrolyse zu Sorbinsäure und die Esterbildung mit Alkoholen in nachweisbaren Mengen stattfinden kann.

3.8 Sensorische Tests

3.8.1 Einführung in der Sensorik

Die Sensorik untersucht den Zusammenhang zwischen Produkten und deren Wahrnehmung bzw. Bewertung mit menschlichen Sinnen ^[123]. Im Fall eines Lebensmittels werden vor allem der Sehsinn (Aussehen), der Geruchssinn und der Geschmackssinn angesprochen. Je nach Produkt können auch die Hautsinne (Tastsinn, Temperatursinn und Schmerzsinn), sowie der Gehörsinn eine große Rolle in der Beurteilung eines Lebensmittels spielen.

Da die Sinne jedes Menschen individuell ausgeprägt sind, ist es wichtig, ein Lebensmittel reproduzierbar zu beurteilen. Deswegen werden zum einen Sensoriktests in einem normierten Rahmen durchgeführt und zum anderen werden die Prüfer eines Lebensmittels für analytische Sensorik-Methoden in regelmäßigen Abständen geschult, um objektive, reproduzierbare Beurteilungen abzugeben. Bei diesen Tests werden häufig zwei oder mehrere Proben verglichen und ein Unterschied gesucht oder es wird eine Produktbeschreibung vorgenommen, bei der verschiedene Attribute nach ihrer Intensität bewertet werden.

Eine zweite Gruppe von Sensorik-Methoden besteht aus hedonischen Tests und führt zu subjektiven Ergebnissen. Diese werden meist mit großen Gruppen von ungeschulten Testern durchgeführt und geben Auskunft über die Beliebtheit eines Produktes oder über die Bevorzugung eines Produktes gegenüber einem anderen.

Für Konservierungsmittel, die im Lebensmittelbereich eingesetzt werden, ist es wichtig, dass sie den Geschmack des Lebensmittels nicht verfälschen. Außerdem sollten sie weder Aussehen und Geruch, noch Textur und Nachgeschmack des Produktes verändern. Deshalb war es wichtig, Sorbinsäureanhydrid sensorisch zu untersuchen.

3.8.2 Sensorische Untersuchungen an Sorbinsäureanhydrid

Da bei Durchführung der sensorischen Prüfungen nicht feststand, ob Sorbinsäureanhydrid toxisches Potential aufweist, wurden die Proben für die Sensoriktests 7 Tage vor Testbeginn angesetzt. In dieser Zeitspanne hydrolysierte das Sorbinsäureanhydrid zu Sorbinsäure. Direkt vor Testbeginn wurden die Proben dann noch per HPLC untersucht. Nur wenn kein Sorbinsäureanhydrid mehr nachgewiesen werden konnte, wurden die Proben verkostet. Da in den Proben dann nur noch Sorbinsäure vorliegt, wurde davon ausgegangen, dass weder ein Fehlgeschmack, noch eine deutliche Geschmacksänderung beobachtet werden kann.

Um dies zu beweisen, testeten über 40 Personen in unterschiedlichen Sensoriktests verschiedene mit Sorbinsäureanhydrid versetzte Getränke auf ihren Geschmack. Es wurden sowohl analytische Methoden, wie Unterschiedsprüfungen, als auch hedonische Methoden (Beliebtheitstests) benutzt. Diese Tests können sowohl von geschulten, als auch von ungeschulten Prüfern durchgeführt werden ^[124].

In diesem Fall fand vor der ersten Sensorikprüfung eine Schulung statt ^{[125][126]}. Bei dieser Schulung wurden Grundlagen der Sensorik, sowie die fachgerechte Terminologie zur Beurteilung von Getränkeproben vermittelt. In einem zweiten Teil der Schulung wurde der Geschmack von Sorbat erlernt, um später einen Vergleich bzw. einen Standard besser bewerten zu können. Der Geschmacksschwellenwert eines geschulten Panels liegt für Sorbinsäure zwischen 135 bis 150 mg/L. Bei ungeschulten Prüfern kann die Geschmacksschwelle zwischen 200 und 500 mg/L variieren ^[127]. Zur Feststellung des Schwellenwertes für die Teilnehmer dieser Schulung wurden zwei Rangfolgetests durchgeführt ^{[128][129]}. Beim ersten Test wurden 5 verschiedene Konzentrationen von Kaliumsorbat (50mg/L, 150 mg/L, 250 mg/L, 350 mg/L, 450 mg/L) in einem stillen Wasser gelöst, der zweite Test erfolgte in stillem Wasser, welches mit Zitronensaft versetzt wurde. Der Prüfauftrag lautete: Bringen Sie die Proben in die Reihenfolge der Intensität des Sorbinsäuregeschmacks. Vergeben sie dabei für die entsprechenden Probennummern die Ziffern 1 (geringste Intensität) bis 5 (intensivste Probe). Die Prüfung wurde bei 24 °C durchgeführt, die Getränke waren auf ca. 12 °C gekühlt. An der Prüfung nahmen 20 ungeschulte Prüfer teil.

Eine Prüfperson beurteilte alle fünf Proben falsch. 4 Prüfer erkannten nur eine Konzentration, 2 Prüfer erkannten 2 Proben richtig. 11 Prüfer erkannten 3 richtige Proben und nur 2 Prüfpersonen konnten alle Proben in die richtige Reihenfolge bringen. 16 von 20 Prüfern (80 %) erkannten die Probe mit der höchsten Intensität. 14 von 20 Prüfern konnten eine Tendenz der Proben erkennen, und beurteilten benachbarte Proben, also Proben mit ähnlicher Konzentration, verkehrt.

Tabelle 24: Ergebnisse der Sensorikschulung Sorbinsäure

| <i>stilles Wasser</i> | <i>Probe 1 50 mg/L</i> | <i>Probe 2 150 mg/L</i> | <i>Probe 3 250 mg/L</i> | <i>Probe 4 350 mg/L</i> | <i>Probe 5 450 mg/L</i> | <i>Beurteilung</i> |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Prüfer 1 | 3 | 1 | 2 | 4 | 5 | 2 richtig |
| Prüfer 2 | 3 | 1 | 4 | 2 | 5 | 1 richtig |
| Prüfer 3 | 1 | 3 | 2 | 4 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 4 | 1 | 2 | 4 | 3 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 5 | 1 | 2 | 4 | 3 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 6 | 3 | 2 | 1 | 4 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 7 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | alle richtig |
| Prüfer 8 | 1 | 2 | 4 | 5 | 3 | 2 richtig |
| Prüfer 9 | 2 | 1 | 4 | 3 | 5 | 1 richtig |
| Prüfer 10 | 2 | 1 | 3 | 4 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 11 | 2 | 1 | 4 | 5 | 3 | alle falsch |
| Prüfer 12 | 1 | 2 | 3 | 5 | 4 | 3 richtig |
| Prüfer 13 | 2 | 1 | 4 | 3 | 5 | 1 richtig |
| Prüfer 14 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | alle richtig |
| Prüfer 15 | 1 | 3 | 2 | 4 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 16 | 2 | 1 | 3 | 4 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 17 | 1 | 2 | 4 | 3 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 18 | 3 | 2 | 1 | 4 | 5 | 3 richtig |
| Prüfer 19 | 1 | 3 | 2 | 5 | 4 | 1 richtig |
| Prüfer 20 | 1 | 2 | 4 | 3 | 5 | 3 richtig |

Ein eindeutiger Geschmack konnte von den meisten Testpersonen erst bei Konzentrationen von größer 350 mg/L festgestellt werden und wurde als schwach sauer, sowie kratzend bzw. adstringierend beschrieben. In Hangers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis wird der Geschmack gleichermaßen beschrieben ^[130]. Prüfer, welche 3 oder mehr richtige Antworten gegeben haben, wurden für die folgenden Tests vermehrt eingesetzt. Prüfer, welche weniger als 3 richtige Antworten gegeben hatten, wurden erneut geschult.

Die zweite Rangfolgeprüfung wurde mit nur vier Proben (100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L) in stillem Wasser mit Zitronensaft durchgeführt.

Drei Prüfer erkannten keine Probe richtig, 4 Prüfer konnten nur eine Konzentration richtig zuordnen. 9 Prüfer konnten zwei Konzentrationen richtig erkennen und ebenfalls vier Prüfer erkannten alle Proben richtig. Von diesen vier Prüfpersonen hatten zwei schon in Wasser die Konzentrationen richtig zugeordnet. Bei dieser Prüfung erkannten nur 60 % die Probe mit der größten Konzentration an Sorbinsäure. 13 von 20 Prüfern konnten auch hier die Tendenz erkennen und verwechselten benachbarte Proben. Dieser Test wurde ebenso wie der Test mit stillem Wasser mit den Prüfern wiederholt, die weniger als zwei richtige Antworten gaben.

Nachdem alle Tester nun den Geschmack von Sorbat kannten, wurden erste Tests mit in Wasser gelöstem Sorbinsäureanhydrid durchgeführt. Da bei einem nicht vollständig geprüften Stoff ein Risiko für den Prüfer besteht, wurden die Getränkeproben mindestens 7 Tage vor dem Test vorbereitet. So hydrolysierte das Sorbinsäureanhydrid zu Sorbinsäure und per HPLC wurde unmittelbar vor einem Test sichergestellt, dass in den Proben kein Sorbinsäureanhydrid mehr nachweisbar war.

Tabelle 25: Ergebnisse der Sensorikschulung Sorbinsäure in stillem Wasser mit Zitrone

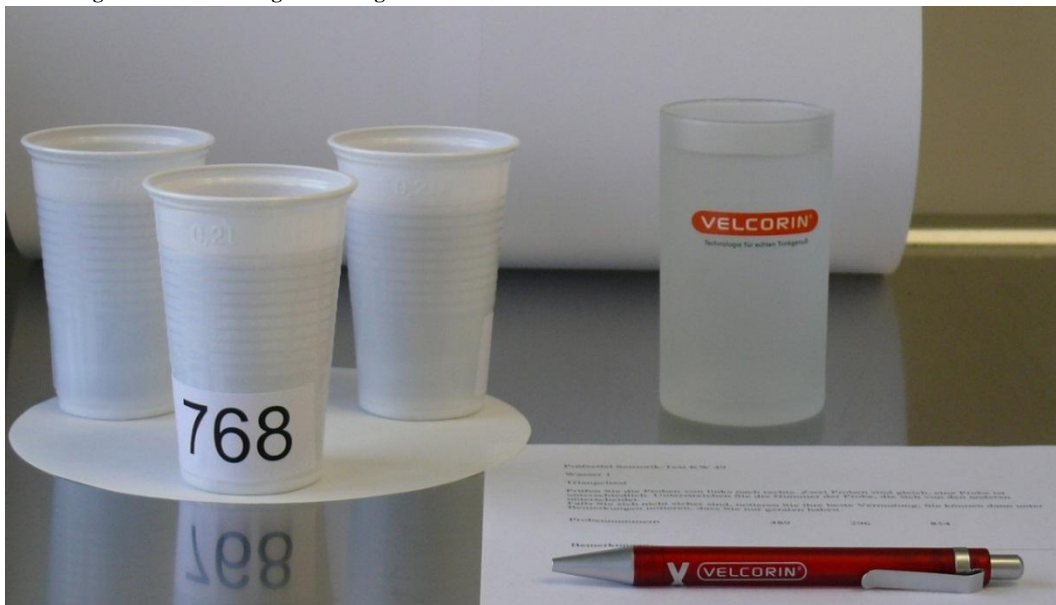
| <i>Stilles Wasser mit Zitrone</i> | <i>Probe 1 100 mg/L</i> | <i>Probe 2 200 mg/L</i> | <i>Probe 3 300 mg/L</i> | <i>Probe 4 400 mg/L</i> | <i>Beurteilung</i> |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Prüfer 1 | 2 | 4 | 1 | 3 | alle falsch |
| Prüfer 2 | 2 | 1 | 3 | 4 | 2 richtig |
| Prüfer 3 | 1 | 2 | 3 | 4 | alle richtig |
| Prüfer 4 | 1 | 3 | 2 | 4 | 2 richtig |
| Prüfer 5 | 4 | 3 | 1 | 2 | alle falsch |
| Prüfer 6 | 1 | 2 | 4 | 3 | 2 richtig |
| Prüfer 7 | 1 | 3 | 4 | 2 | 1 richtig |
| Prüfer 8 | 2 | 1 | 3 | 4 | 2 richtig |
| Prüfer 9 | 2 | 4 | 3 | 1 | 1 richtig |
| Prüfer 10 | 2 | 1 | 3 | 4 | 2 richtig |
| Prüfer 11 | 3 | 2 | 1 | 4 | 2 richtig |
| Prüfer 12 | 1 | 2 | 4 | 3 | 2 richtig |
| Prüfer 13 | 2 | 3 | 1 | 4 | 1 richtig |
| Prüfer 14 | 1 | 2 | 4 | 3 | 2 richtig |
| Prüfer 15 | 2 | 1 | 4 | 3 | alle falsch |
| Prüfer 16 | 1 | 2 | 3 | 4 | alle richtig |
| Prüfer 17 | 2 | 1 | 3 | 4 | 2 richtig |
| Prüfer 18 | 1 | 2 | 3 | 4 | alle richtig |
| Prüfer 19 | 3 | 1 | 2 | 4 | 1 richtig |
| Prüfer 20 | 1 | 2 | 3 | 4 | alle richtig |

Zunächst wurden Unterschiedsprüfungen als Triangeltest ^{[131][132]} mit Getränkeproben durchgeführt, welche mit Sorbinsäureanhydrid bzw. der gleichen stöchiometrischen Menge Sorbinsäure versetzt waren. Dabei mussten die Prüfer aus drei Proben die unterschiedliche Probe herausfinden. Die Anordnung der Prüfmuster erfolgt in einem Dreieck, aus welchem sich der Name für den Test ableitet.

Bei dieser Unterschiedsprüfung stellte sich heraus, dass Konzentrationen von 50 mg Sorbinsäureanhydrid oder Sorbinsäure pro Liter Getränk in reinem Wasser nicht unterscheidbar waren. Ab einer Konzentration von 200 mg/L Wasser konnten 55 % der Probanden einen ge-

schmacklichen Unterschied feststellen. Diese 55 % liegen zwar unterhalb des Grenzwertes, bei dem statistisch sicher Unterschiede festgestellt werden können, allerdings deutlich über dem Grenzwert, an dem kein Unterschied festgestellt werden kann. So ist zu vermuten, dass besser geschulte Prüfer in Getränkebetrieben diesen Unterschied deutlich herausschmecken würden. Da Konservierungsmittel als Zusatzstoffe für Mineralwässer verboten sind, ist ein Geschmacksunterschied in reinem Wasser allerdings zu vernachlässigen. Dieser Test sollte den Prüfern noch einmal den Geschmack von Sorbinsäureanhydrid verdeutlichen, so wurden nach dem Test die Ergebnisse einzeln mitgeteilt und die Prüfer, die den Unterschied korrekt beurteilt hatten, wurden für die nächsten Prüfungen vermehrt eingesetzt.

Abbildung 40: Testanordnung des Triangeltests



Nachstehend folgt der Prüfbericht für diesen ersten Triangeltest.

Prüfbericht der Triangelprüfung in reinem Wasser

Test Nummer: 1A + B

a) zugrunde gelegte Normen

Die Dreiecksprüfungen wurden durchgeführt nach Vorschrift 00.90-7 Untersuchung von Lebensmitteln - Sensorische Prüfverfahren, Dreiecksprüfung aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, September 2006 (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN ISO 4120, Ausgabe April 2005) ^[131].

b) Zweck der Prüfungen

Es soll festgestellt werden, ob zwischen den verschiedenen Prüfmustern ein Unterschied besteht.

c) Art des Prüfmusters

Probensatz 1A: stilles Wasser

Probensatz 1B: stilles Wasser

Probe A: 50 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe A: 200 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe B: 50 ppm Sorbinsäure

Probe B: 200 ppm Sorbinsäure

d) Anzahl der Prüfproben

Die Proben wurden in Triaden gereicht. Insgesamt wurden pro Prüfergruppe vier Triaden geprüft. Es gab keine Bezugsproben oder Blindproben.

e) Prüfklima

Die Tests fanden in Kleingruppen a 5 Personen statt, die Temperatur im Prüfraum betrug 22 °C, die Prüfproben hatten eine Temperatur von 16 °C. Die Tests wurden bei Tageslicht mit zugeschaltetem Raumlicht gemacht.

f) Qualifikation und Anzahl der Prüfer

Es nahmen insgesamt 20 ungeschulte Prüfer an den Tests teil. Die Prüfer waren zwischen 25 und 60 Jahre alt.

g) Abweichungen von den Festlegungen der oben genannten Normen

Die Prüfungen wurden nicht in Prüfkabinen vorgenommen.

j) Ergebnisse der Prüfungen einschließlich statistischer Auswertungen

Probensatz 1A: Die Probe A enthielt 50 mg/L Sorbinsäureanhydrid, die Probe B 50 mg/L Sorbinsäure. Es wurden 20 Probensätze verteilt. 8 Prüfer haben die unterschiedliche Probe richtig erkannt. Das bedeutet, 40 % der Prüfer erkannten die unterschiedliche Probe. Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,2$ müssen 12 von 20 Personen die richtige Probe erkennen, um einen Unterschied feststellen zu können. Es wurde somit kein wahrnehmbarer Unterschied erkannt, die Proben unterscheiden sich nicht voneinander.

Probensatz 1B: Die Probe A enthielt 200 mg/L Sorbinsäureanhydrid, die Probe B 200 mg/L Sorbinsäure. Es wurden 20 Probensätze verteilt. 11 Prüfer haben die unterschiedliche Probe richtig erkannt. Das bedeutet, 55 % der Prüfer erkannten die unterschiedliche Probe. Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,2$ müssen 12 von 20 Personen die richtige Probe erkennen, um einen Unterschied feststellen zu können. Da nur 11 Personen einen Unterschied erkannt, kann nicht eindeutig festgestellt werden, dass ein wahrnehmbarer Unterschied besteht. Zu vermuten ist aber, dass besser geschulte Prüfer hier einen deutlichen Unterschied bemerken würden.

h) Testergebnisse als Anhang

Tabelle 26: Ergebnisse des Sensoriktests 1A, Wasser 50 ppm SSA/ SS

| Name | 1 | | 2 | | 3 | | Antwort | Richtig oder Falsch |
|------------|-----|---|-----|---|-----|---|---------|---------------------|
| Proband 1 | 56 | A | 472 | B | 664 | B | -* | falsch |
| Proband 2 | 772 | B | 495 | A | 307 | B | 307 | falsch |
| Proband 3 | 895 | B | 741 | B | 243 | A | - | falsch |
| Proband 4 | 77 | B | 934 | A | 429 | B | 77 | falsch |
| Proband 5 | 994 | A | 667 | B | 593 | A | 667 | richtig |
| Proband 6 | 945 | B | 933 | B | 386 | A | 386 | richtig |
| Proband 7 | 721 | A | 150 | B | 992 | A | 150 | richtig |
| Proband 8 | 491 | A | 789 | B | 609 | B | 789 | falsch |
| Proband 9 | 403 | A | 193 | A | 332 | B | 332 | richtig |
| Proband 10 | 700 | B | 574 | A | 320 | A | 700 | richtig |
| Proband 11 | 382 | A | 621 | B | 549 | B | 382 | richtig |
| Proband 12 | 361 | B | 332 | A | 951 | A | 951 | falsch |
| Proband 13 | 285 | B | 740 | B | 313 | A | - | falsch |
| Proband 14 | 837 | B | 777 | A | 600 | B | - | falsch |
| Proband 15 | 714 | A | 431 | A | 116 | B | 714 | falsch |
| Proband 16 | 103 | A | 508 | B | 68 | A | 508 | richtig |
| Proband 17 | 73 | B | 807 | B | 421 | A | 807 | falsch |
| Proband 18 | 545 | B | 608 | A | 153 | A | 545 | richtig |
| Proband 19 | 842 | B | 741 | A | 508 | B | 508 | falsch |
| Proband 20 | 243 | A | 888 | B | 604 | B | 604 | falsch |

*Die Antwort „kein Unterschied“ wurde mit einem '-' gekennzeichnet und als falsch behandelt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 27: Ergebnisse des Sensoriktests 1B, Wasser 200 ppm SSA/ SS

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 1 | 664 | A | 56 | B | 472 | B | 56 | falsch |
| Proband 2 | 307 | B | 772 | A | 495 | B | 772 | richtig |
| Proband 3 | 243 | B | 895 | B | 741 | A | 243 | falsch |
| Proband 4 | 429 | B | 77 | A | 934 | B | 77 | richtig |
| Proband 5 | 593 | A | 994 | B | 667 | A | 667 | falsch |
| Proband 6 | 386 | B | 945 | B | 933 | A | 933 | richtig |
| Proband 7 | 992 | A | 721 | B | 150 | A | -* | falsch |
| Proband 8 | 609 | A | 491 | B | 789 | B | 609 | richtig |
| Proband 9 | 332 | A | 403 | A | 193 | B | 193 | richtig |
| Proband 10 | 320 | B | 700 | A | 574 | A | 320 | richtig |
| Proband 11 | 549 | A | 382 | B | 621 | B | 382 | falsch |
| Proband 12 | 951 | B | 361 | A | 332 | A | 951 | richtig |
| Proband 13 | 313 | B | 285 | B | 740 | A | 740 | richtig |
| Proband 14 | 600 | B | 837 | A | 777 | B | 837 | richtig |
| Proband 15 | 116 | A | 714 | A | 431 | B | 116 | falsch |
| Proband 16 | 68 | A | 103 | B | 508 | A | 103 | richtig |
| Proband 17 | 421 | B | 73 | B | 807 | A | 807 | richtig |
| Proband 18 | 153 | B | 545 | A | 608 | A | - | falsch |
| Proband 19 | 508 | B | 842 | A | 741 | B | 741 | falsch |
| Proband 20 | 604 | A | 243 | B | 888 | B | 888 | falsch |

*Die Antwort „kein Unterschied“ wurde mit einem ‘-’ gekennzeichnet und als falsch behandelt

Nach dieser ersten Unterschiedsprüfung wurden analog Triangeltests mit aromatisiertem Wasser (3 % Apfelsaftgehalt), Apfelsaft, Orangensaft und Rotwein (10 % Alkoholgehalt) durchgeführt. Die weiteren Prüfberichte befinden sich im Anhang.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Sensoriktest-Ergebnisse

| <i>Getränk</i> | <i>Zugabe Sorbinsäureanhydrid</i> | <i>Richtige Antworten</i> | <i>Unterschied</i> |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Wasser | 50 ppm | 40 % | nicht erkannt |
| | 200 ppm | 55 % | erkannt |
| Aromatisiertes Wasser | 50 ppm | 30 % | nicht erkannt |
| | 200 ppm | 55 % | bedingt erkannt |
| Apfelsaft | 50 ppm | 30 % | nicht erkannt |
| | 200 ppm | 45 % | bedingt erkannt |
| Orangensaft | 50 ppm | 25 % | nicht erkannt |
| | 200 ppm | 35 % | nicht erkannt |
| Rotwein | 50 ppm | 35 % | nicht erkannt |
| | 200 ppm | 30 % | nicht erkannt |

Das Ergebnis aller Tests ist, dass je höher der Aromaanteil eines Getränks ist, desto seltener wird ein Unterschied zwischen den verschiedenen Proben erkannt.

Bei dem aromatisierten Wasser mit ca. 3 % Fruchtanteil konnte die hohe Sorbinsäureanhydridkonzentration von 200 mg/L Getränk bedingt erkannt werden. Ebenso verhielt es sich mit Apfelsaft, wo ebenfalls nur die höhere Konzentration als bedingt unterschiedlich erkannt wurde. In Orangensaft und Rotwein konnten sowohl die geringere Konzentration Sorbinsäureanhydrid, als auch die 200 ppm nicht von Sorbinsäure unterschieden werden. Bei Kontrollversuchen mit unbehandeltem Getränk konnten die Proben ebenfalls nicht voneinander unterschieden werden. Es ist bekannt, dass aus Sorbinsäure in Wein Ethylsorbat entstehen kann (siehe oben) ^{[133][134][135]}. Durch Milchsäurebakterien werden sowohl Sorbinsäure, als auch dieser Ester zu 2-Ethoxy-3,5-hexadien verstoffwechselt, dies verursacht den sogenannten Geranienton ^[136]. Dieses Ethoxyhexadien wurde ebenfalls sensorisch getestet. Dabei wurde ein deutlicher Unterschied erkannt und die Proben mit 2-Ethoxy-3,5-hexadien als nicht genießbar aussortiert (siehe Präferenztest).

Diese Tests lassen also die Schlussfolgerung zu, dass 50 ppm Sorbinsäureanhydrid zu einem fruchtsafthaltigen Getränk zugegeben werden können, ohne dass sich der Geschmack des Getränks verändert. 200 mg/L Sorbinsäureanhydrid können hingegen nur dann zugegeben werden, wenn der Fruchtsaftanteil und somit der Aromaanteil im Getränk groß genug ist.

Ergebnisse der Unterschiedsprüfungen

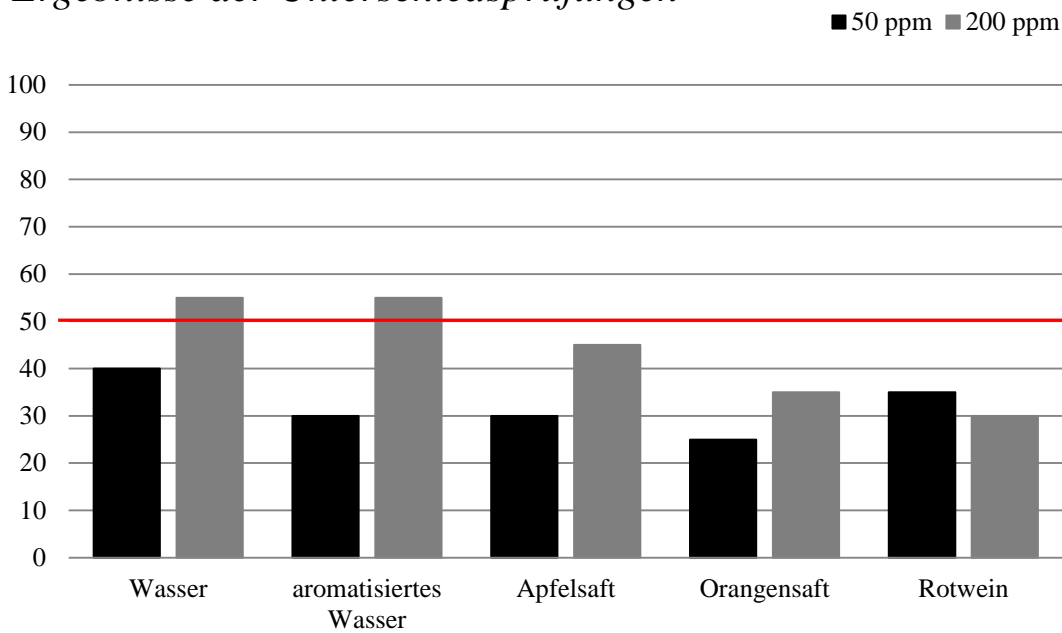


Abbildung 41: grafische Darstellung der Sensorik-Ergebnisse

Zusätzlich zu den verschiedenen Unterschiedsprüfungen wurde ein „A / nicht A“-Test durchgeführt ^[137]. Ziel dieses Tests war es, einen Apfelsaftstandard aus einer Reihe verschiedener Proben wieder zu erkennen, außerdem sollten Unterschiede zwischen den Proben benannt werden. Dieser Test diente erneut dazu, zu zeigen, dass sich eine Apfelsaftprobe nicht von einer Probe mit 50 mg/L Anhydrid bzw. einer Probe von 250 mg/L Sorbinsäure unterscheidet. Eine vierte, mit Limonen versetzte Probe wurde zusätzlich in das Probenset integriert, um zu zeigen, dass sich hier deutliche Geschmacksunterschiede zeigen.

Ergebnisse des "A/nicht A"-Tests

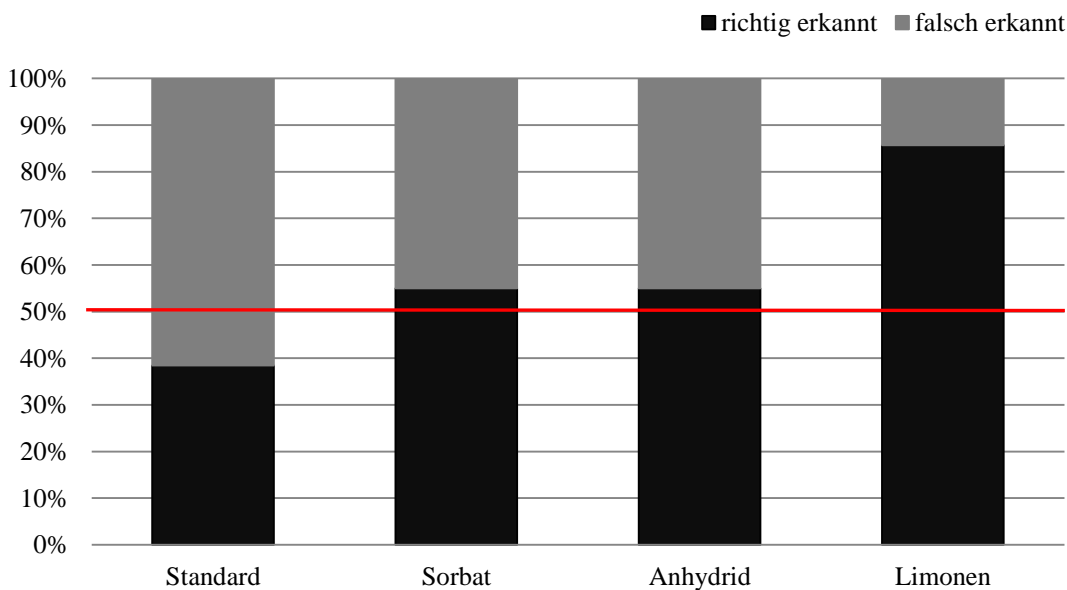


Abbildung 42: Grafische Darstellung der Sensorikergebnisse des "A/nicht A"-Tests

Nach Auswertung des Tests zeigten sich die erwarteten Ergebnisse. Proben, welche mit Limonen versetzt waren, wurden eindeutig erkannt. Der Geschmacksunterschied zum Standard wurde als saurer und etwas bitterer beschrieben, auch der Citrusgeschmack des Limonens wurde von vielen Prüfern erkannt. Alle anderen drei Proben (Standard, Anhydrid, Sorbinsäure) konnten nicht eindeutig erkannt und voneinander unterschieden werden. Dies bestätigt das Ergebnis der Unterschiedsprüfungen.

Als letzter Test wurde ein Präferenztest mit ungeschulten Testern durchgeführt. Dazu wurden drei verschiedene Proben gereicht:

Probe 1: Apfelsaft mit 250 ppm Sorbinsäure

Probe 2: Apfelsaft mit 50 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe 3: Apfelsaft mit 0,1 ppm 2-Ethoxy-3,5-hexadien

Es wird erwartet, dass die Proben 1 und 2 der Probe 3 deutlich vorgezogen werden, da Ethoxyhexadien einen Geranienton verursacht. Dies ist bekannt bei Weinen, welche mit Sorbinsäure konserviert werden, da Sorbinsäure durch Milchsäurebakterien zu Ethoxyhexadien umgewandelt wird ^[138]. Um alle obigen Ergebnisse zu bestätigen, sollte zwischen den Proben 1 und 2 keine Präferenz zu erkennen sein.

Ergebnisse des Präferenztests

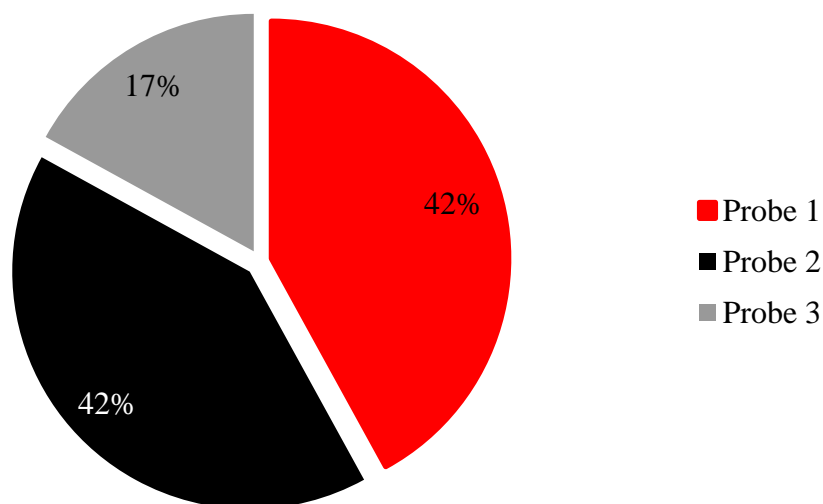


Abbildung 43: Ergebnisse der Präferenztests

Sorbinsäureanhydrid bzw. das zu Sorbinsäure hydrolysierte Sorbinsäureanhydrid konnte von den Testern nicht von „normaler“ Sorbinsäure unterschieden werden. Dies ist positiv für den Einsatz in Getränken.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob trans, trans- 2,4-Hexadiensäureanhydrid (Sorbinsäureanhydrid) als Getränkekonservierungsmittel geeignet ist. Ziel der Arbeit war es zunächst, eine Synthese von Sorbinsäureanhydrid zu entwickeln, die großtechnisch umsetzbar ist. Die Synthese von Sorbinsäureanhydrid im Labormaßstab ließ sich nach verschiedenen Methoden in guten Ausbeuten und Reinheit durchführen. Großtechnisch konnte Sorbinsäureanhydrid nur unter Verwendung von Phosgen mit anschließender Wasserwäsche, Phasentrennung und abschließender Destillation in hoher Reinheit und Ausbeute hergestellt werden.

Die wichtigsten Stoffeigenschaften und das chemische Verhalten von Sorbinsäureanhydrid wurden eingehend analysiert. Dabei zeigte sich, dass aufgrund der Hydrolysegeschwindigkeiten das Anhydrid nur mit Quarantänezeiten von über 24 Stunden in der Getränkeindustrie eingesetzt werden könnte. Allerdings ist bei genügend langer Hydrolysezeit kein Sorbinsäureanhydrid mehr im Getränk vorhanden, so dass der Verbraucher nicht mit Sorbinsäureanhydrid in Berührung kommt. Die entstehende Sorbinsäure erzeugt eine geringe persistente Wirkung gegenüber erneuter Verkeimung und schützt das Getränk somit zusätzlich.

Die mikrobiologische Wirksamkeit wurde im Detail untersucht, dabei zeigten die verschiedenen Versuche, dass Sorbinsäureanhydrid im Vergleich zu Kaliumsorbat eine bis zu 5-fach höhere antimikrobielle Wirkung aufweist. Der Wirkmechanismus konnte nicht geklärt werden. Hier könnten eventuell weitere mikrobiologische Experimente zum genaueren Verständnis beitragen.

Es konnten bei Einsatz von Sorbinsäureanhydrid in nicht-alkoholischen Getränken keine Nebenreaktionen mit Getränkeinhaltsstoffen unter „normalen“ Lagerbedingungen beobachtet werden. Erst bei im Labor durchgeführten Ansätzen mit großen Mengen Sorbinsäureanhydrid und Ammoniak in wenig Lösungsmittel bei Temperaturen über 50 °C konnte Sorbinsäureamid als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Diese Reaktionsträgheit des Anhydrids spricht für eine Verwendung als Konservierungsmittel. In alkoholischen Getränken kann es jedoch zu einer Reaktion von Sorbinsäureanhydrid mit Alkohol kommen. Dabei entsteht hauptsächlich Ethylsorbat, welches chemisch, physikalisch und toxisch noch nicht umfassend untersucht wurde. Bevor Sorbinsäureanhydrid also in alkoholischen oder nicht-alkoholischen

Getränken verwendet werden kann, müssen sowohl das Anhydrid als auch auftretende Nebenprodukte toxikologisch untersucht werden.

Des Weiteren wurden verschiedene Anwendungsmöglichkeiten und Formulierungen, sowie die Verpackung von Sorbinsäureanhydrid diskutiert. Auf diesem Gebiet muss noch weitere Entwicklungsarbeit geleistet werden, da sowohl die Wasserlöslichkeit, als auch der niedrige Schmelzpunkt von Sorbinsäureanhydrid eine Herausforderung für die Anwendungstechnik in einem Getränkebetrieb bedeuten.

Im Rahmen der Zulassung als Konservierungsmittel für Getränke muss die gesundheitliche Unbedenklichkeit des Stoffes geprüft werden, die technologische Notwendigkeit bewiesen werden und der Schutz vor Täuschung gewährleistet sein. Deswegen müssen vor allem die verschiedenen toxikologischen Untersuchungen durchgeführt und genau analysiert werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass Sorbinsäureanhydrid nach den bisherigen Ergebnissen durchaus als Konservierungsmittel für Getränke einsetzbar ist.

5. Experimenteller Teil

5.1 Synthesen von Sorbinsäureanhydrid

5.1.1 Wasserentzug der Sorbinsäure

5,0 g (45 mmol) Sorbinsäure wurden in 100 mL Toluol suspendiert, dann wurden 2,7 mL (50 mmol) Schwefelsäure unter Rühren langsam zu getropft. Nach zehnmütigem Nachrühren wurde die Reaktionslösung erwärmt und 2 h bei Rückfluss (RF ~110 °C) gerührt. Dabei färbte sich der Reaktionsansatz bräunlich-schwarz. Nach Extraktion mit gesättigter Natriumhydrogensulfatlösung ergaben sich nur 10 - 90 mg (0,005 – 0,044 mmol) Ausbeute (0,25 – 2,3 %) von Sorbinsäureanhydrid. Analog wurde der Versuch mit 50 mmol Phosphorsäure durchgeführt.

Synthese mit Phosphorpentoxid: 5,0 g (45 mmol) Sorbinsäure wurden mit 6,3 g (45 mmol) Phosphorpentoxid vorgelegt und in 20 mL Toluol suspendiert und auf 50 °C erwärmt. Laut DC-Kontrolle erfolgte Umsetzung. Es wurden 60 % der theoretischen Ausbeute erhalten

5.1.2 Klassische Synthese über das Sorbinsäurechlorid

einstufige Synthese mit Thionylchlorid

Analog der Synthese eines Sorbinsäure-Polyesters ^[86] wurden 5,0 g (45 mmol) Sorbinsäure zusammen mit 6,2 mL (45 mmol) Triethylamin bei RT in 100 mL Toluol gerührt. Zu der Lösung wurden innerhalb von 15 Minuten 1,7 mL (23 mmol) Thionylchlorid zu getropft. Nach erfolgter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf 90 °C erhitzt und 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Die dabei entstandenen Gase Schwefeldioxid und Salzsäure wurden über eine Waschflasche zur Neutralisation aus der Reaktionsapparatur geleitet. Die Ausbeute betrug 2,8 g (61% der Theorie).

zweistufige Synthese mit Thionylchlorid

Zu einer Suspension aus 5,0 g (45 mmol) Sorbinsäure und 100 mL Dichlormethan wurden bei RT 3,4 mL (46mmol) Thionylchlorid zu getropft und auf 70 °C erhitzt. Auch hier war Gasbildung zu beobachten. Nach 3 h ließ diese nach und der Reaktionsansatz wurde fraktioniert destilliert. Die Ausbeute an flüssigem, farblosem Sorbinsäurechlorid betrug 5,0 g (76 % der Theorie). Das Säurechlorid wurde dann zu einer Suspension aus 3,8 g (34 mmol) Sorbinsäure und 100 mL Toluol getropft und bei 70 °C für 2 h gerührt. Dabei entstanden 6,9 g (98,4 %) Sorbinsäureanhydrid.

Synthese mit Oxalylchlorid ^{[67][66]}

10,0 g (90 mmol) Sorbinsäure wurden in 100 mL wasserfreiem Benzol suspendiert und unter Rühren mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 4,3 mL (50 mmol) Oxalylchlorid in 20 mL wasserfreiem Benzol innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Nach weiteren 15 Minuten wurde das Eisbad entfernt und bei Raumtemperatur eine Stunde nachgerührt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bis zum Rückfluss erhitzt und eine Stunde bei 80 °C gerührt. Die Suspension wurde heiß abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt. Es wurde kein Sorbinsäurechlorid gebildet.

Bei einem erneuten Versuchsansatz wurden der Anfangssuspension zwei Tropfen DMF zugegeben. Ansonsten wurde der Ansatz analog gehandhabt. Dabei fand eine Umsetzung zu 4,2 g (45 % der Theorie) Sorbinsäureanhydrid statt.

Synthese mit Phosgen ^[65]

In eine Suspension aus 50,0 g (333 mmol) Kaliumsorbitat und 90 mL Ethylacetat wurden bei 0 - 10°C 16 mL (233 mmol) Phosgen eingeleitet. Nach vollständiger Einleitung wurde 24h nachgerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 50 mL Wasser versetzt, um entstandenes Kaliumchlorid zu lösen und abzutrennen (24,5 g Kaliumchlorid (98,7 %) wurden nach Trocknen erhalten), danach wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeengt und das gelbliche Öl in Glasflaschen abgefüllt. Nach einiger Zeit im Kühlschrank bildete sich eine gelblich-weiße Schmelze. Die Ausbeute betrug 33,8 g (98,6 % der Theorie).

Reaktion von Säurechlorid mit Säure

In eine Suspension aus 3,9 g (35 mmol) Sorbinsäure in 50 mL Ethylacetat wurden bei RT 5,1 g (35 mmol) Sorbinsäurechlorid zugetropft. Nachdem alles zugetropft war, wurde das Reaktionsgemisch auf 80 °C erwärmt und 3 h gerührt. Nach Extraktion mit 25 mL Wasser wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeengt. Es bildete sich 7,0 g Sorbinsäureanhydrid (97,0 % der theoretischen Ausbeute).

5.1.3 Synthese mit Diphenylchlorophosphat

Nach der Versuchsvorschrift von Honda et al ^{[69][70]} wurde eine Suspension aus 8,4 g (75 mmol) Sorbinsäure, 10,5 mL (75 mmol) Triethylamin und 500 mL Dichlormethan bei 0° C solange gerührt, bis sich eine klare Lösung ergab (~30 Minuten). Anschließend wurden 7,9 mL (37,5 mmol) Diphenylchlorophosphat zugetropft.

Die Reaktion verlief relativ langsam, weshalb 10 h nachgerührt wurde. Nach Extraktion mit gesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung, Waschen mit Natriumchlorid-Lösung, Trocknen über Natriumsulfat und anschließendem Einengen des Lösungsmittels ergaben sich 7,6 g Rohprodukt (97 % Ausbeute). Dieses Rohprodukt war zum Teil mit Sorbinsäureanhydrid verunreinigt. Eine anschließend durchgeführte Kieselgelchromatographie führte zu 95 % igem Sorbinsäureanhydrid mit einer Restausbeute von 73 %. Dies bestätigten auch die Versuche von Honda et al. Diese erzielten Ausbeuten zwischen 70 und 75 %.

5.1.4 Synthese mit Dicyclohexylcarbodiimid

5,6 g (50 mmol) Sorbinsäure wurde in 50 mL Dichlormethan suspendiert und bei RT 5,2 g (25 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Die Suspension wurde 2h bei RT gerührt. Die erste Reaktionskontrolle ergab keinen Umsatz, weshalb dann auf 30°C erhitzt wurde und 2 Tage bei dieser Temperatur gerührt wurde. Nach Extraktion mit Natriumchlorid-Lösung (2x 20 mL) wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeeengt. Es blieb ein gelbliches Öl zurück, welches bei RT auskristallisierte. Dies waren 3,1 g Sorbinsäureanhydrid (67 % Ausbeute der Theorie). In der wässrigen Phase blieb weißer Feststoff zurück. Dieser weiße Feststoff war Eduktgemisch von Sorbinsäure und DCC.

5.2 Methoden

5.2.1 HPLC-Methode, Gerät 1

Probenvorbereitung

Probe in Ethylacetat lösen, Wirkstoff-Gehalte sollten zwischen 1 und 500 ppm liegen.

Bedingungen:

Gerät: Agilent LC 01
Säule: RP-18 select B, LiChrosphere 60, 5 µm
Ofen: 40 °C
Fluss: 1,5 ml/min
Detektor: UV, 264 & 280 nm, 4nm Spaltbreite

Eluent A: Wasser, 0,1 % H₃PO₄ (85% ige)

Eluent B: Acetonitril

Gradient:

| Zeit [min] | Gehalt B [%] |
|------------|--------------|
| 2 | 5 |
| 7 | 90 |
| 10 | 90 |
| 14 | 5 |

Injektionsvolumen: 15 µl

Stoppzeit: 20 min

Nachlaufzeit: 6 min

5.2.2 HPLC-Methode, Gerät 2

Probenvorbereitung

Probe in Ethylacetat lösen, Wirkstoff-Gehalte sollten zwischen 1 und 200 ppm liegen.

Bedingungen:

Gerät: Shimadzu LC 10A

Säule: RP-18 select B, LiChrosphere 60, 5 µm

Ofen: 40 °C

Fluss: 1,5 ml/min

Detektor: UV, 264 nm, 4nm Spaltbreite

Eluent A: 90 % Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (1,56 g/L), pH 5
10 % Acetonitril

Eluent B: Acetonitril

Gradient:

| Zeit [min] | Gehalt B [%] |
|------------|--------------|
| 3 | 1 |
| 8 | 85 |
| 12 | 85 |
| 15 | 95 |

Injektionsvolumen: 10 µl

Stoppzeit: 17 min

Nachlaufzeit: 7 min

5.2.3 HPLC-Methode, Gerät 3

Probenvorbereitung

Probe in Ethylacetat lösen, Wirkstoff-Gehalte sollten zwischen 1 und 200 ppm liegen.

Bedingungen:

Gerät: Shimadzu LC 10A
Säule: RP-18 select B, LiChrosphere 60, 5 µm
Ofen: 40 °C
Fluss: 2,0 ml/min
Detektor: UV, 264 nm, 4nm Spaltbreite

Eluent A: 90 % Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (1,56 g/L), pH 5
10 % Acetonitril

Eluent B: 90 % Acetonitril
10 % destilliertes Wasser

Gradient:

| Zeit [min] | Gehalt B [%] |
|------------|--------------|
| 2 | 5 |
| 10 | 60 |
| 15 | 80 |
| 17 | 80 |

Injektionsvolumen: 10 µl
Stoppzeit: 17 min
Nachlaufzeit: 6 min

5.2.4 IR-Methode

Probenvorbereitung

Sorbinsäureanhydrid wurde als flüssige Schmelze auf einer ATR-Kristall-Platte ausgestrichen.

Bedingungen

Gerät: Bruker Alpha-P (ATR FTIR)

Scans pro Minute: 24

Spektralbereich: 400 – 4000 cm⁻¹

5.2.5 MS-Methode

Das Massenspektrum wurde von Currenta Analytics aufgenommen und zur Verfügung gestellt.

5.2.6 ¹H-NMR-Methode

Das Massenspektrum wurde von der Currenta GmbH & Co.OHG nach Methode 2012-0620501-8D an einem Bruker/DPX 400 aufgenommen und zur Verfügung gestellt. Akkreditiert nach DIN EN ISO/IEC 17025.

5.2.7 GC-Methode

Probenvorbereitung

Die reine Substanz wird analysiert.

Bedingungen:

Gerät: HP 7890, Kapillar-GC
Säule: VF 1ms (Varian CP 8901) 10 m lang, 0,1 mm innerer Durchmesser,
0,4 µL Filmdicke
Injektor: 220 °C, ~ 150 mL/min Split
Injektionsvolumen: 1 µl
Gas: Helium
Fluss: 0,5 ml/min (beim Start)

Ofen:

| Heizrate [°C/min] | Temperatur | Haltezeit [min] |
|-------------------|------------|-----------------|
| | 100 | 0 |
| 30 | 300 | 5 |

Detektor: FID, 320 °C

5.2.8 MALDI-Methode

Probenvorbereitung

Sorbinsäureanhydrid wird mit Dihydroxybenzoesäure und Kaliumchlorid vermischt und auf das Target appliziert.

Bedingungen:

| | |
|----------------------|--|
| Gerät: | Shimadzu Axima Performance™ |
| Probenteller: | 2 mm flaches Target, für 384 Analysen geeignet |
| Analysenbetrachtung: | monochromatische CCD Kamera (25x Vergrößerung) |
| Ionenquelle: | MALDI, gepulst (Positivmodus) |
| Laser: | 337 nm Stickstofflaser, fixierter Fokus |
| Analysator: | Reflektron, Driftstrecke: 2,0 m |
| Detektor: | Reflektron Modus |
| Software: | Shimadzu Biotech Launpad™ 2.8.3 20080616 |

Geräteeinstellungen:

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Detektormodus | Reflektron |
| Massenbereich | 0,0 – 5000,0 Da |
| Max. Laserwiederholungsrate | 5,0 |
| Profile | 441 pro Probe |
| Laserschüsse | 2 akkumuliert pro Profil |
| Anzahl der Spektren | 882 |
| Pulsed extraction | Optimiert bei 2500,0 Da |
| Raster | 441 Punkte |
| Raster Typ | Quadratisch |
| Raster Ausführungsform | Serpentinen Muster |

5.2.9 weitere Geräte

| | |
|-----------------|--|
| Analysenwaage: | Sartorius Analysenwaage |
| Kryostat: | mgw Lauda RMT, Thermostat |
| Photometer: | Dr. Lange, Cadas 200, Spektralphotometer, 200 – 800 nm |
| Ultraschallbad: | Sonorex Super 10 P, Bandelin |
| Waage: | Mettler Toledo, Präzisionswaage |

5.2.10 verwendete Chemikalien

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| 1,2-Propandiol | Methanol |
| 2-Butanon | Methylbutyrat |
| Aceton | Natriumcarbonat |
| Acetonitril | Natriumchlorid |
| Ammoniumchlorid | Natriumdihydrogenphosphat |
| Benzol | Natriumhydrogencarbonat |
| Benzylalkohol | Natriumhydroxid |
| Dichlormethan | Natriumsulfat |
| Dicyclohexylcarbodiimid | n-Butylacetat |
| Dihydroxybenzoesäure | N-Methylpyrrolidon |
| Dimethylformamid | n-Propylacetat |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Oxalylchlorid |
| Diphenylchlorophosphat | Phosgen |
| Essigsäureanhydrid | Phosphorpentoxid |
| Ethanol | Phosphorsäure |
| Ethylacetat | Polyethylenglycol |
| Ethylenglycoldiacetat | Propionsäureanhydrid |
| Ethylformiat | Schwefelsäure |
| Ethylpropionat | Sorbinsäure |
| Glycerindiacetat | Sorbinsäureanhydrid |
| Glycerintriacetat | Sorbinsäurechlorid |
| Hexan | Tetrahydrofuran |
| iso-Propanol | Thionylchlorid |
| Kaliumchlorid | Toluol |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Triethylamin |
| Kaliumsorbit | Triethylcitrat |
| Kieselgel | |

5.3 Untersuchung der mikrobiologischen Wirksamkeit

Grundsätzlich werden sterile Reagenzien und Geräte verwendet. Matrices und Agar werden vor dem Versuch autoklaviert, um eine Kontamination durch in Getränken oder im Wasser vorhandene Keime auszuschließen.

a) Herstellen einer Keimlösung

Schräggkulturröhrchen oder Gewebekulturflaschen werden mit einem Keim beimpft und 2 Tage bei keimspezifischer Wachstumstemperatur (meist zwischen 26 und 30 °C) gelagert. Die optimal gewachsenen Keime werden mit bis zu 30 mL isotonischer Natriumchloridlösung benetzt, abgeschwemmt oder mittels Glasperlen intensiv abgerollt und bei Bedarf filtriert.

b) Verdünnungsreihe zur Keimzählung, Koch'sches Plattengussverfahren

Die unter 5.3.1 a) hergestellte Keimsuspension (Original) wird 1:10 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt, diese Verdünnungsreihe wird fortgeführt bis zu einer Verdünnung von 1:10¹². Von jeder Lösung der Verdünnungsreihe werden 2x 1mL Lösung in eine Petrischale pipettiert und 10 mL Agar zugegeben. Die Schalen werden mindestens zwei Tage bei konstanter Temperatur gelagert, danach werden die gewachsenen Keime nach 2, 5 oder 7 Tagen gezählt.

c) Start des Abtöteversuchs und Kontrolle der Keimeinsaat (Start-Keimzahl)

Je nach Keimzählung wird eine bestimmte Menge Keimlösung zu autoklavierter Matrix (Apfelsaft, Wasser o. ä.) gegeben und gut geschüttelt. Zur Kontrolle der Keimeinsaat werden dann erneut 2x 1 mL Lösung der Positivkontrollen in 10 mL Agar eingearbeitet und in den folgenden Tagen bei keimspezifischer Wachstumstemperatur gelagert und ausgezählt.

Nach der Entnahme der 2 mL wird Wirkstoff (Sorbinsäureanhydrid, Kaliumsorbat o. a.) zugegeben und die Proben 30 s kräftig geschüttelt. Danach werden die Proben bei Temperaturen zwischen 26 – 45 °C gelagert, die Verschlüsse der Probenflaschen werden nicht ganz zuge dreht, damit beim Hefe-Wachstum und daraus resultierender CO₂-Bildung Berst-Gefahr besteht.

d) 24-Stunden-, 7-Tage- und 4-Wochen-Werte

24 h nach Wirkstoffzugabe werden 2x 10 mL Lösung aus den Matrixflaschen entnommen und mit Hilfe einer Impföse in 30 ml Agar eingerührt. Nach der Brutzeit bei konstanter Temperatur werden auch hier die gewachsenen Keime pro Petrischale gezählt .

6. Anhang

6.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

Tabelle 29: Vergleich der der Reaktionsausbeuten

| <i>Edukt</i> | <i>Ausbeute [%]</i> | | |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------|
| | <i>Sorbinsäurechlorid</i> | <i>Sorbinsäureanhydrid</i> | |
| Phosphorsäure | einstufig | - | 0,4 – 2,3 |
| Schwefelsäure | einstufig | - | 0,2 – 0,8 |
| Phosphorpentoxid | einstufig | - | 35,1 – 41,2 |
| Thionylchlorid | einstufig | - | 49,2 – 61,5 |
| Thionylchlorid | zweistufig | 54,6 | 52,5 |
| mit Hilfsbase | zweistufig | 77,1 – 85,3 | 75,0 – 83,2 |
| mit Kaliumsorbat | zweistufig | 76,4 – 82,3 | 74,3 – 80,2 |
| Oxalylchlorid | einstufig | - | 35,0 |
| Oxalylchlorid | zweistufig | 39,0 – 41,0 | 37,0 – 39,0 |
| Phosphorylchlorid | zweistufig | 59,3 – 61,6 | 57,1 – 59,5 |
| Phosphorpentachlorid | zweistufig | 60,0 | 58,0 |
| Phosgen | einstufig | - | 87 – 93 |
| Diphenylchlorophosphat | einstufig | - | 73 – 75 |
| Dicyclocarbodiimid | einstufig | - | 67 |

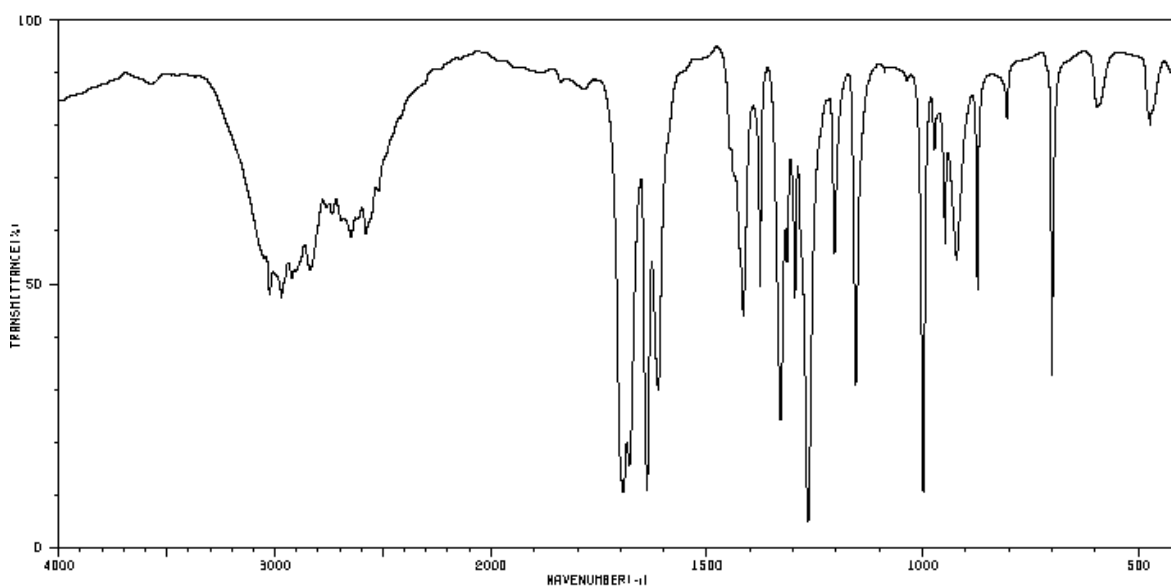


Abbildung 44: IR-Spektrum von Sorbinsäure

Tabelle 30: Messungen der Stabilitätsdaten von Sorbinsäureanhydrid

| Lager- temperatur | Zeit [d] | 0 | 7 | 14 | 28 | 36 | 42 | 55 | 60 | 70 | 84 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 | 270 | 300 | | |
|----------------------|------------------------------|-----|------|------|-------------|-------|-------------|-------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 6-8 °C | Luft geöffnet, dunkel | 100 | 44 | 43,2 | 43,1 | 42,8 | 41,5 | 40,9 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | 40,1 | |
| | Luft verschlossen, dunkel | 100 | 50 | 46,3 | 43,4 | 41,9 | 40,2 | 39,4 | 38,7 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 | 38,2 |
| | Stickstoff, dunkel | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 99,9 | 99,8 | 99,7 | 99,5 | 99,3 | 99,1 | 98,5 | 97,8 | 97,1 | 96,3 | 95,6 | 94,9 | 94,9 | 94,4 | 94,4 |
| | Argon, dunkel | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 99,9 | 99,7 | 99,6 | 99,4 | 99,2 | | | | | | | | | | |
| 20 °C | Luft geöffnet, dunkel | 100 | 98,5 | 41,9 | 40 | 38,9 | 37,4 | 36,1 | 35,4 | 34,6 | 34,4 | 34,4 | 34,4 | 34,4 | 34,4 | 34,3 | 34,4 | 34,4 | 34,3 | 34,3 | 34,3 |
| | Luft verschlossen, dunkel | 100 | 99,3 | 98,5 | 97,9 | 96,9 | 96,7 | 95,6 | 95,4 | 94,9 | 93,5 | 92,4 | | | | | | | | | |
| | Stickstoff, dunkel | 100 | 100 | 100 | 100 | 99,9 | 99,8 | 99,8 | 99,7 | 99,6 | 99,5 | 99 | 98,7 | | | | | | | | |
| | Argon, dunkel | 100 | 100 | 100 | 100 | 99,9 | 99,8 | 99,8 | 99,7 | 99,6 | 99,5 | 99,4 | | | | | | | | | |
| 40 °C | Luft geöffnet, dunkel | 100 | 80,2 | 35,8 | abgebrochen | wegen | Gelierung | | | | | | | | | | | | | | |
| | Luft verschlossen, dunkel | 100 | 84,1 | 40,2 | abgebrochen | wegen | Gelierung | | | | | | | | | | | | | | |
| | Stickstoff, dunkel | 100 | 94,2 | 90,7 | 82,6 | 73,5 | abgebrochen | wegen | Gelierung | | | | | | | | | | | | |
| | Argon, dunkel | 100 | 94,4 | 90,8 | 82,5 | 73,8 | abgebrochen | wegen | Gelierung | | | | | | | | | | | | |

Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid bei pH 3, 20 °C

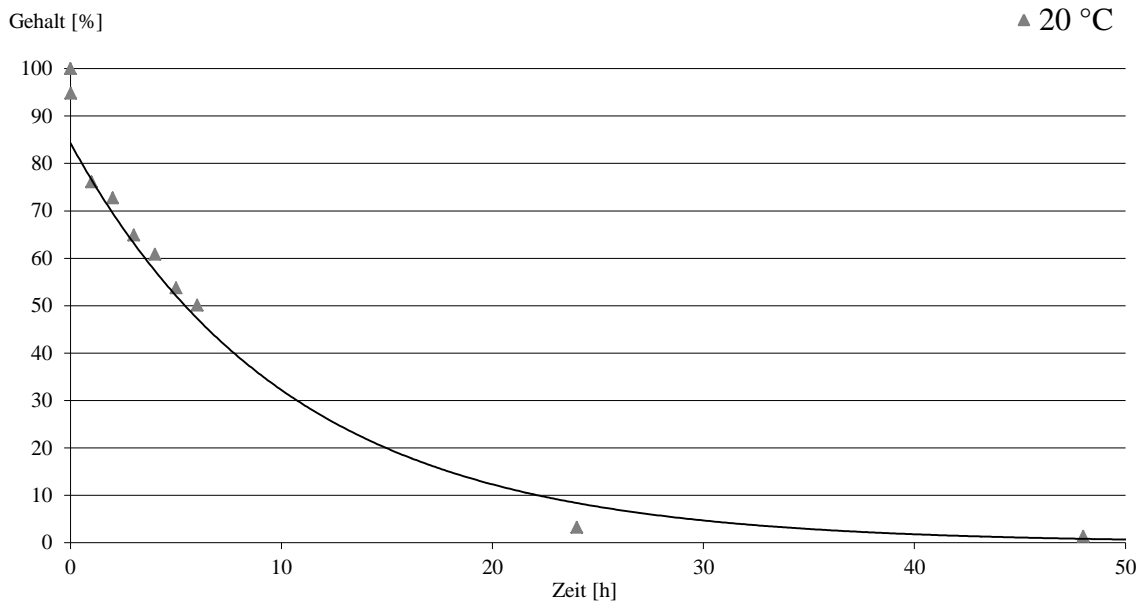


Abbildung 45: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid bei pH3, 20 °C

Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 3,5

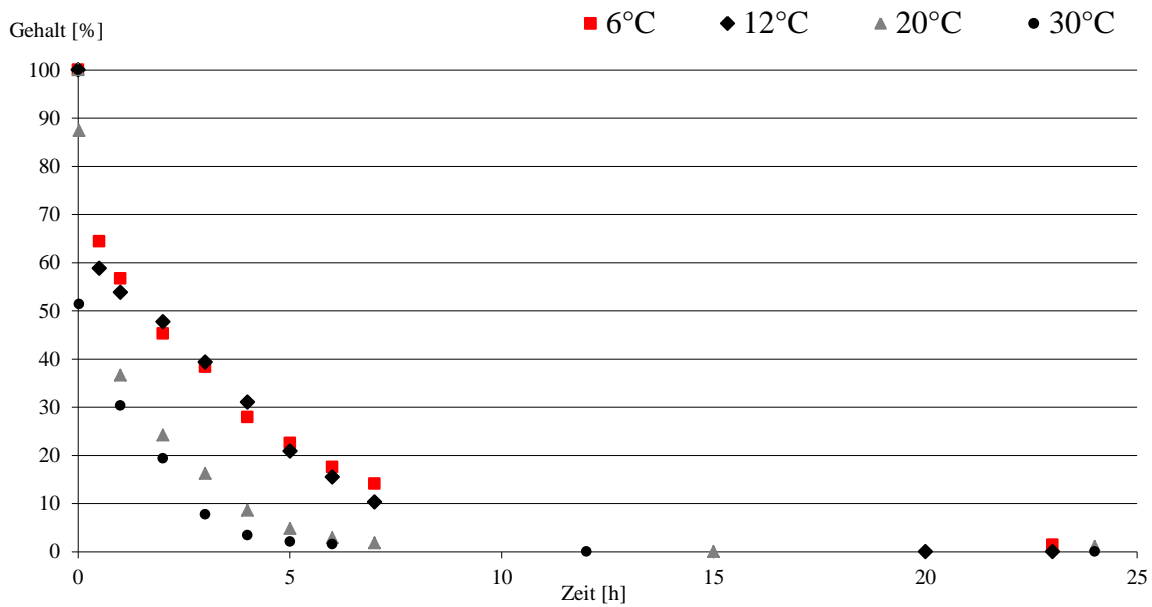


Abbildung 46: Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 3,5

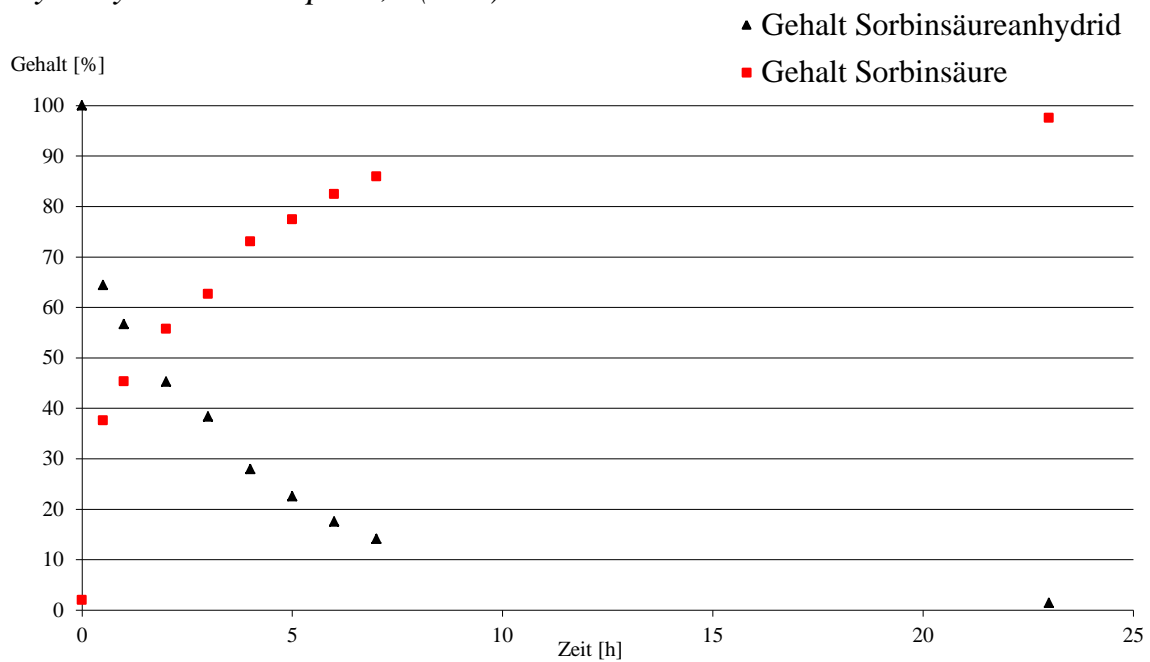
Hydrolysekurve bei pH 3,5 (6 °C)

Abbildung 47: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid bei pH 3,5, 6 °C

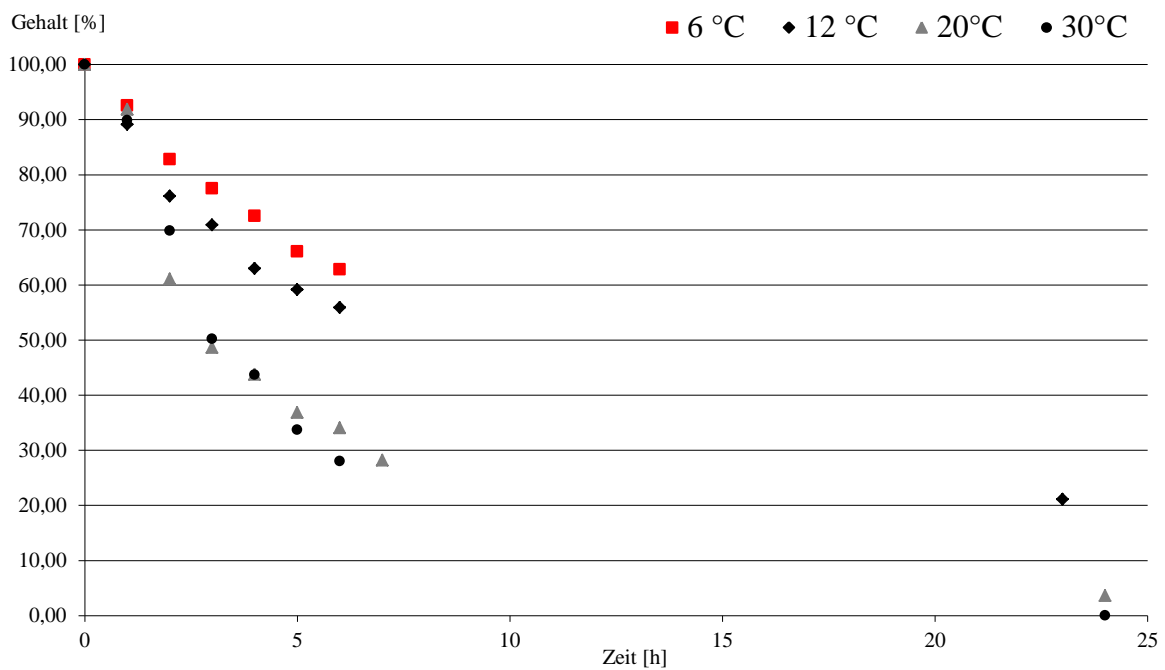
Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 4,5

Abbildung 48: Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 4,5

Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 5

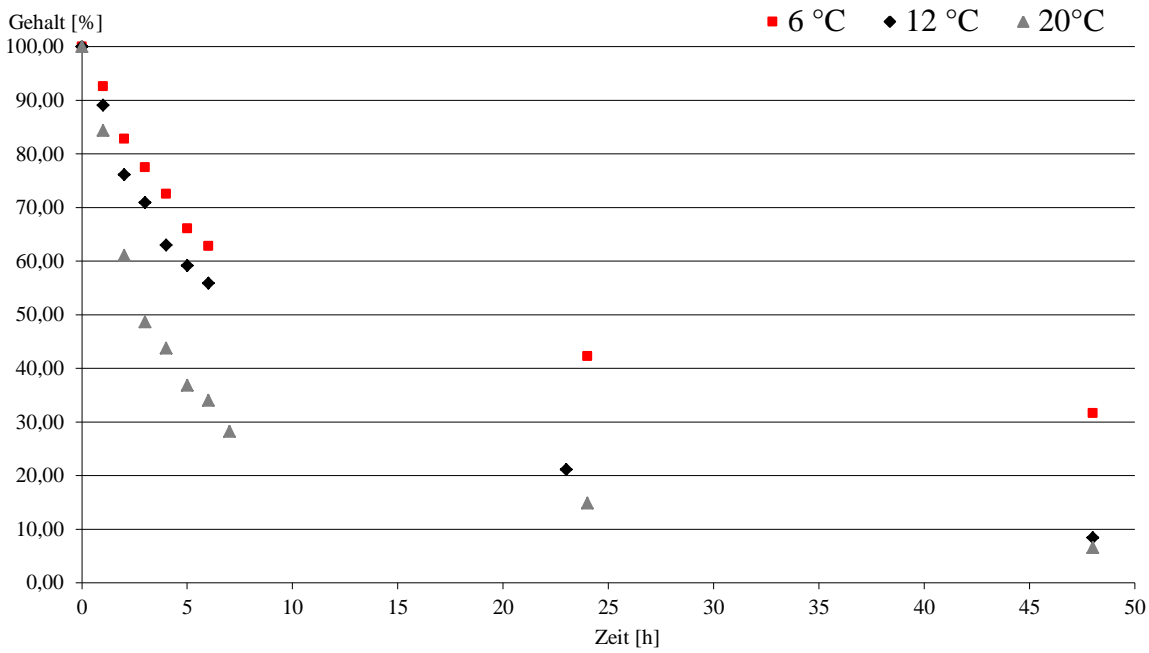


Abbildung 49: Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 5

Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid bei pH 6, 20 °C

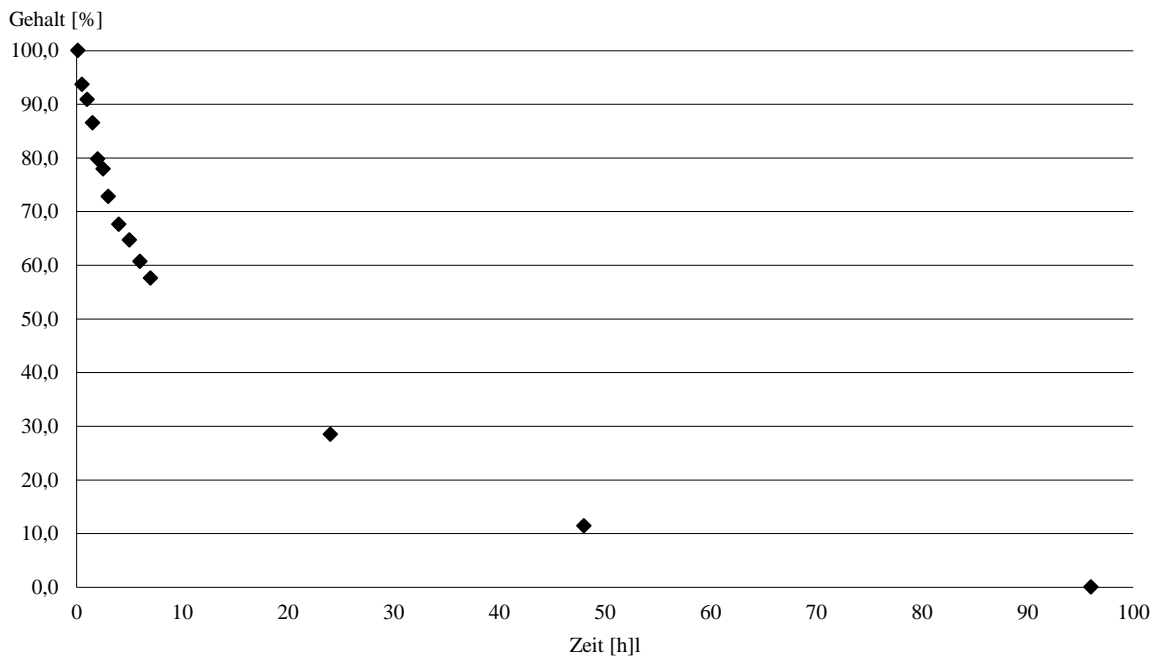


Abbildung 50: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid bei pH 6, 20 °C

Tabelle 31: Reaktionsgeschwindigkeiten des Sorbinsäureanhydrid-Abbaus

| pH-Wert | Geschwindigkeitskonstanten des Sorbinsäureanhydrid-Abbaus | | | |
|---------|---|-----------|-----------|-----------|
| | bei 6 °C | bei 12 °C | bei 20 °C | bei 30 °C |
| 2,0 | 0,060 | 0,124 | 0,2007 | 0,4166 |
| 3,0 | 0,042 | 0,224 | 0,513 | 0,618 |
| 3,5 | 0,226 | 0,281 | 0,516 | 0,631 |
| 4,0 | 0,176 | 0,756 | 1,034 | 1,697 |
| 4,5 | 0,088 | 0,106 | 0,215 | 0,237 |
| 5,0 | 0,013 | 0,024 | 0,041 | 0,074 |
| 6,0 | 0,012 | 0,038 | 0,052 | 0,078 |

Abbau von Sorbinsäureanhydrid in Traubensaft, pH 3,5

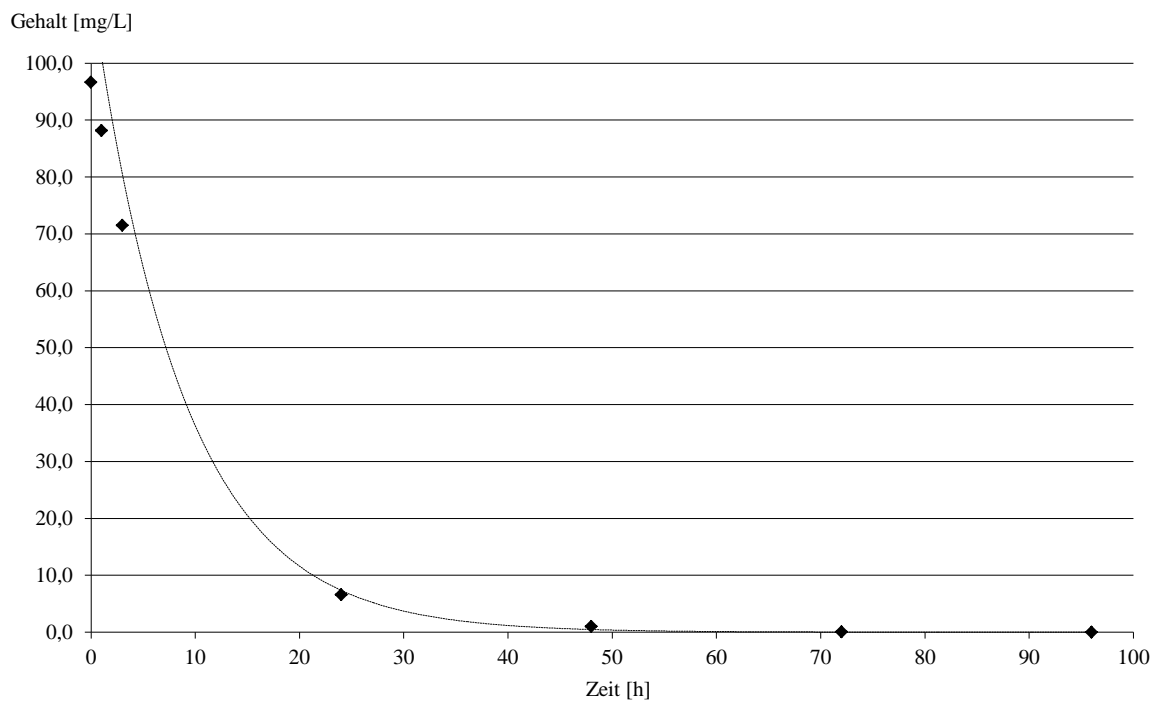


Abbildung 51: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in Traubensaft bei pH 3,5

Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse von SAA in Alkoholen

ln SAA-Gehalt

- ▲ in Methanol
- ◆ in Ethanol
- in Isopropanol

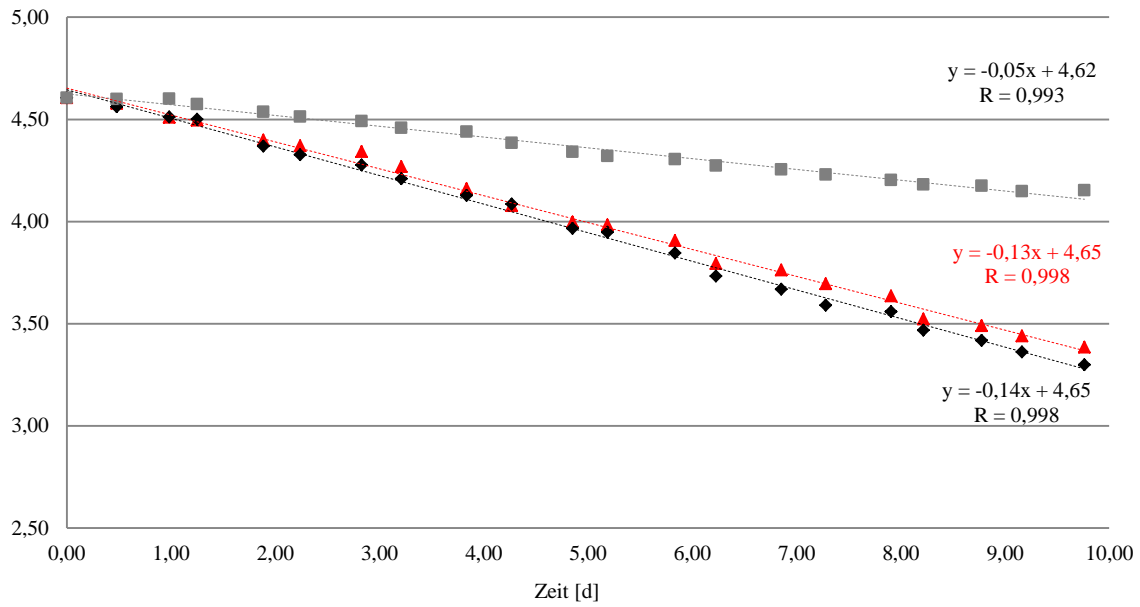


Abbildung 52: Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse von SSA in Alkoholen

Abtöteversuche von *Aspergillus niger*

Testnummer: 2010 Intern 5

Prüfkeim: *Aspergillus niger*, S 200

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1, 100 mL

Nährboden: CM 59, 30 °C

Keimeinsaat: 200 KBE/mL, 1.000 KBE/mL

Tabelle 32: Auswertung Abtöteversuch 6.2.1, 200

| Wirkstoff | Start KZ | 24 h KZ | 1 Woche KZ | 2 Wochen KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|----------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Blindprobe | 208/158 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 50 ppm SSA | 170/118 | 47/56/66/68 | ++ | ++ | ++ |
| 100 ppm SSA | 189/191 | 0/1/2/1 | 2/4/3/0 | 21/22/5/5 | ++ |
| 250 ppm SSA | 201/173 | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | 167/184 | ++ | ++ | ++ | ++ |

KZ = Keimzahl, ++ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 33: Auswertung Abtöteversuch 6.2.1, 500

| Wirkstoff | Start KZ | 24 h KZ | 1 Woche KZ | 2 Wochen KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|----------|-----------|------------|-------------|-------------|
| Blindprobe | 568/732 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 50 ppm SSA | 648/576 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 100 ppm SSA | 512/664 | 1/0/38/10 | ++ | ++ | ++ |
| 250 ppm SSA | 548/744 | 19/10/0/1 | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | 760/668 | ++ | ++ | ++ | ++ |

KZ = Keimzahl, ++ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von *Byssochlamys fulva*

Testnummer: 2010 log-Red 4

Prüfkeim: *Byssochlamys fulva*, S 6.1

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: CM 59, 26 °C

Keimeinsaat: 4.000 KBE/mL, 200.000 KBE/mL

Tabelle 34: Auswertung Abtöteversuch 6.2.2, 4.000

| Wirkstoff | Start KZ | 24 h KZ | 1 Woche KZ | 2 Wochen KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|----------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Blindprobe | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 50 ppm SSA | ++ | 16/20/30/32 | ++ | ++ | ++ |
| 100 ppm SSA | ++ | 7/2/3/3 | 1/2/0/1 | -/- | -/- |
| 250 ppm SSA | ++ | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

++ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 35: Auswertung Abtöteversuch 6.2.2, 200.000

| Wirkstoff | Start KZ | 24 h KZ | 1 Woche KZ | 2 Wochen KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|----------|---------|------------|-------------|-------------|
| Blindprobe | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 50 ppm SSA | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 100 ppm SSA | ++ | ++ | ++ | 298/277 | 261/253 |
| 250 ppm SSA | ++ | ++ | 281/279 | 264/258 | 250/242 |
| 250 ppm KS | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

++ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von *Penicillium brevicompactum*

Testnummer: 2010 Intern 1

Prüfkeim: *Penicillium brevicompactum*, S 1410

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: CM 59, 26 °C

Keimeinsaat: 8.000 KBE/mL

Tabelle 36: Auswertung Abtöteversuch 6.2.3, 8.000

| Wirkstoff | Start KZ | 24 h KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|----------|-------------|-------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | 26/25/19/16 | +/+ |
| 100 ppm SSA | +/+ | 3/2/7/1 | +/+ |
| 250 ppm SSA | +/+ | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbarAbtöteversuche von *Penicillium roqueforti*

Testnummer: 2011 Intern 1

Prüfkeim: *Penicillium roqueforti*, S 204

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: CM 139, 26 °C

Keimeinsaat: 50 KBE/mL, 1.000 KBE/mL

Tabelle 37: Auswertung Abtöteversuch 6.2.4, 50

| Wirkstoff | Start-KZ | 24h-KZ | 1 Wo-KZ | 2 Wo-KZ | 4 Wo-KZ |
|------------|----------|---------|----------|---------|---------|
| Blindprobe | 28/28 | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 SSA | 8/7 | 1/0/1/0 | 12/9/8/5 | +/+ | +/+ |
| 100 SSA | 19/23 | 3/2/1/2 | 5/4/9/8 | 5/7/3/4 | +/+ |
| 250 SSA | 38/15 | 2/3/1/0 | 6/4/5/5 | 7/9/3/4 | 1/1/0/1 |
| 300 KS | 12/23 | 7/3/1/0 | 2/3/7/8 | 3/3/2/2 | 1/0/1/0 |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 38: Auswertung Abtöteversuch 6.2.4, 1.000

| Wirkstoff | 24 h KZ | 1 Woche KZ | 2 Wochen KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|---------|-------------|-------------|-------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| 100 ppm SSA | +/+ | 301/289 | 247/231 | 197/206 |
| 250 ppm SSA | +/+ | 27/35/44/39 | 5/12/9/11 | -/- |
| 250 ppm KS | +/+ | 31/28/21/65 | 4/23/4/14 | -/- |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von *Saccharomyces cerevisiae*

Testnummer: 2011 Intern 14
 Prüfkeim: *Saccharomyces cerevisiae*, H 100
 Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL
 Nährboden: CM 920, 26 °C
 Keimeinsaat: 100.000 KBE/mL

Tabelle 39: Auswertung Abtöteversuch 6.2.6, 100.000

| <i>Wirkstoff</i> | <i>Start KZ</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>4 Wochen KZ</i> |
|------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | -/- | -/- |
| 100 ppm SSA | +/+ | -/- | -/- |
| 250 ppm SSA | +/+ | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | +/+ | -/- | -/- |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von *Zygosaccharomyces bailii*

Testnummer: 2011 Intern 14
 Prüfkeim: *Zygosaccharomyces bailii*, H 37
 Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL
 Nährboden: CM 59, 26 °C
 Keimeinsaat: 20.000 KBE/mL

Tabelle 40: Auswertung Abtöteversuch 6.2.7, 20.000

| <i>Wirkstoff</i> | <i>Start KZ</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>4 Wochen KZ</i> |
|------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | +/+ | +/+ |
| 100 ppm SSA | +/+ | 31/33/38/39 | -/- |
| 250 ppm SSA | +/+ | 8/7/21/15 | -/- |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von einem Candida-Mix

Testnummer: 2010 Intern 2

Prüfkeim: Candida krusei (H 102), Candida lambica (H), Candida oleophila (H 10915-7),
Candida sake (H)

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: CM 920, 26 °C

Keimeinsaat: 200.000 KBE/mL

Tabelle 41: Auswertung Abtöteversuch 6.2.8, 200.000

| <i>Wirkstoff</i> | <i>Start KZ</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>4 Wochen KZ</i> |
|------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | +/+ | ~ 540 |
| 100 ppm SSA | +/+ | +/+ | ~ 320 |
| 250 ppm SSA | +/+ | +/+ | -/- |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | +/+ |

+ / + = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, - / - = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von *Acetobacter aceti*

Testnummer: 2011-intern 7, 8

Prüfkeim: *Acetobacter aceti*, B 104

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: CM 361, 26 °C

Keimeinsaat: 50 KBE/mL, 1.000 KBE/mL, 10.000 KBE/mL

Tabelle 42: Auswertung Abtöteversuch 6.2.9, 50

| Wirkstoff | 24 h KZ | 1 Woche KZ | 2 Wochen KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| Blindprobe | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 50 ppm SSA | 5/1/0/1 | -/- | -/- | -/- |
| 100 ppm SSA | 2/0/0/0 | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm SSA | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | 97/89/10/103 | ++ | ++ | ++ |

++ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 43: Auswertung Abtöteversuch 6.2.9, 1.000

| Wirkstoff | 24 h KZ | 1 Woche KZ | 2 Wochen KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| Blindprobe | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 50 ppm SSA | 98/93/88/100 | 0/1/0/2 | -/- | -/- |
| 100 ppm SSA | 35/35/25/25 | 0/0/1/1 | -/- | -/- |
| 250 ppm SSA | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | ++ | ++ | ++ | ++ |

++ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 44: Auswertung Abtöteversuch 6.2.9, 10.000

| Wirkstoff | 24 h KZ | 1 Woche KZ | 2 Wochen KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|---------------|------------|-------------|-------------|
| Blindprobe | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 50 ppm SSA | 141/108/82/94 | -/- | -/- | -/- |
| 100 ppm SSA | 5/10/8/10 | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm SSA | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | ++ | ++ | ++ | ++ |

++ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von *Asaia bogorensis*

Testnummer: 2010 Intern 6

Prüfkeim: *Asaia bogorensis*, B 13987-1

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: OSA, 26 °C

Keimeinsaat: 200 KBE/mL, 75.000 KBE/mL

Tabelle 45: Auswertung Abtöteversuch 6.2.10, 200

| <i>Wirkstoff</i> | <i>Start KZ</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>1 Woche KZ</i> |
|------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Blindprobe | 192 | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | 193 | 5/1/6/4 | +/+ |
| 100 ppm SSA | 197 | 1/1/1/1 | 261/290 |
| 250 ppm SSA | 203 | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | 200 | 55/28/47/36 | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 46: Auswertung Abtöteversuch 6.2.10, 75.000

| <i>Wirkstoff</i> | <i>Start KZ</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>1 Woche KZ</i> |
|------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | +/+ | +/+ |
| 100 ppm SSA | +/+ | ~ 400 | 291/302 |
| 250 ppm SSA | +/+ | 279/241 | 5/2/0/1 |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von *Asaia lannaensis*

Testnummer: 2010 Intern 7

Prüfkeim: *Asaia lannaensis*, B 14140-1

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: OSA, 26 °C

Keimeinsaat: 1.000 KBE/mL, 75.000 KBE/mL

Tabelle 47: Auswertung Abtöteversuch 6.2.11, 1.000

| <i>Wirkstoff</i> | <i>Start KZ</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>1 Woche KZ</i> |
|------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | 6/5/9/4 | +/+ |
| 100 ppm SSA | +/+ | 7/5/2/8 | +/+ |
| 250 ppm SSA | +/+ | 3/8/3/5 | 109/112 |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | 190/211 |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 48: Auswertung Abtöteversuch 6.2.11, 75.000

| <i>Wirkstoff</i> | <i>Start KZ</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>1 Woche KZ</i> |
|------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | +/+ | +/+ |
| 100 ppm SSA | +/+ | +/+ | +/+ |
| 250 ppm SSA | +/+ | ~ 670 | ~ 350 |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von Gluconacetobacter

Testnummer: 2011 Intern 10, 11

Prüfkeim: Gluconacetobacter Spezies, B 15086-1a

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: OSA, 26 °C

Keimeinsaat: 10 KBE/mL, 1.000 KBE/mL

Tabelle 49: Auswertung Abtöteversuch 6.2.12, 10

| <i>Wirkstoff</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>1 Woche KZ</i> | <i>2 Wochen KZ</i> | <i>4 Wochen KZ</i> |
|------------------|----------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Blindprobe | 28/24/38/36 | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | 0/5/2/2 | -/- | -/- | -/- |
| 100 ppm SSA | 0/1/1/2 | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm SSA | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | 8/5/7/13 | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 50: Auswertung Abtöteversuch 6.2.12, 1.000

| <i>Wirkstoff</i> | <i>24 h KZ</i> | <i>1 Woche KZ</i> | <i>2 Wochen KZ</i> | <i>4 Wochen KZ</i> |
|------------------|-----------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Blindprobe | 115/124/138/132 | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | 12/18/9/9 | -/- | -/- | -/- |
| 100 ppm SSA | 7/6/7/8 | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm SSA | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | 24/23/27/31 | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Abtöteversuche von *Lactobacillus brevis*

Testnummer: 2011 Intern 4, 5

Prüfkeim: *Lactobacillus brevis*, B 101

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: CM 361, 26 °C, anaerob

Keimeinsaat: 10.000 KBE/mL, 100.000 KBE/mL

Tabelle 51: Auswertung Abtöteversuch 6.2.13, 10.000

| Wirkstoff | Start KZ | 24 h KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|----------|-----------------|-------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | 116/134/144/143 | -/- |
| 100 ppm SSA | +/+ | 111/130/133/127 | -/- |
| 250 ppm SSA | +/+ | 95/69/85/84 | -/- |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

Tabelle 52: Auswertung Abtöteversuch 6.2.13, 100.000

| Wirkstoff | Start KZ | 24 h KZ | 1 Wochen KZ |
|-------------|----------|---------|-------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | -/- | -/- |
| 100 ppm SSA | +/+ | -/- | -/- |
| 250 ppm SSA | +/+ | -/- | -/- |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbarAbtöteversuche von *Lactobacillus casei*

Testnummer: 2011 Intern 6

Prüfkeim: *Lactobacillus casei*,

Matrix: Apfelsaft : Wasser, 1:1; 100 mL

Nährboden: CM 361, 26 °C, anaerob

Keimeinsaat: 10.000 KBE/mL

Tabelle 53: Auswertung Abtöteversuch 6.2.14, 10.000

| Wirkstoff | Start KZ | 24 h KZ | 4 Wochen KZ |
|-------------|----------|-----------------|-------------|
| Blindprobe | +/+ | +/+ | +/+ |
| 50 ppm SSA | +/+ | 185/176/178/201 | -/- |
| 100 ppm SSA | +/+ | 145/173/168/189 | -/- |
| 250 ppm SSA | +/+ | 159/130/130/130 | -/- |
| 250 ppm KS | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ = ≥ 300 KBE, „Zahl“ = Anzahl sichtbarer KBE, -/- = keine Keime sichtbar

 Prüfberichte der Sensoriktests mit Sorbinsäureanhydrid
Prüfprotokoll 2 – Sensoriktest Nr. A-D*a) zugrunde gelegte Normen*

Die Dreiecksprüfungen wurden durchgeführt nach Vorschrift 00.90-7 Untersuchung von Lebensmitteln - Sensorische Prüfverfahren, Dreiecksprüfung aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, September 2006 (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN ISO 4120, Ausgabe April 2005).

b) Zweck der Prüfungen

Es soll festgestellt werden, ob zwischen den verschiedenen Prüfmustern ein Unterschied besteht.

c) Art des Prüfmusters

Probensatz 2A: flavoured water (Apfel)

Probe A: 50 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe B: 50 ppm Sorbinsäure

Probensatz 2B: flavoured water (Apfel)

Probe A: 200 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe B: 200 ppm Sorbinsäure

Probensatz 2C: Apfelsaft

Probe A: 50 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe B: 50 ppm Sorbinsäure

Probensatz 2 D: Apfelsaft

Probe A: 200 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe B: 200 ppm Sorbinsäure

d) Anzahl der Prüfproben

Die Proben wurden in Triaden gereicht. Insgesamt wurden pro Prüfergruppe vier Triaden geprüft. Es gab keine Bezugsproben oder Blindproben.

e) Prüfklima

Die Tests fanden in Kleingruppen a 5 Personen statt, die Temperatur im Prüfraum betrug 22 °C, die Prüfproben hatten eine Temperatur von 16 °C. Die Tests wurden bei Tageslicht mit zugeschaltetem Raumlicht gemacht.

f) Qualifikation und Anzahl der Prüfer

Es nahmen insgesamt 20 ungeschulte Prüfer an den Tests teil. Die Prüfer waren zwischen 25 und 60 Jahre alt.

g.) Abweichungen von den Festlegungen der oben genannten Normen

Die Prüfungen wurden nicht in Prüfkabinen vorgenommen.

h.) Anzahl der richtigen und der gesamten Antworten

In Test A wurden 30 % richtige Antworten gegeben, in Test B 55 % richtige Antworten. Bei Test C wurden 30 % richtig beantwortet und bei Test D gaben 45 % der Probanden die richtige Antwort

i.) Angabe der Sicherheitsschwelle

Bei einer niedrigen Sicherheitsschwelle von $\alpha = 0,05$ müssen 13 bis 14 von 20 Antworten richtig sein (65 – 70 %), um die Proben zweifelsfrei voneinander zu unterscheiden.

j.) Ergebnisse der Prüfungen einschließlich statistischer Auswertungen

Bei den Proben mit höherem Sorbinsäureanhydrid-Gehalt ist eine leichte Differenzierung erkennbar. Die Anzahl der richtig gegebenen Antworten liegt über dem Erwartungswert (statistisch $> 33,3$ %), allerdings unterhalb der Sicherheitsschwelle von 14 richtigen Antworten (bei $\alpha = 0,05$). Das bedeutet, dass die Proben mit Konzentrationen von 200 mg/L vermutlich unterscheidbar sind. Es sollten zusätzliche sensorische Prüfungen unternommen werden.

Bei den Proben mit geringer Anhydrid-Konzentration liegt die Anzahl der richtigen Antworten unterhalb des statistischen Erwartungswertes bei ununterscheidbaren Mustern. Somit wurde bei beiden Proben kein Geschmacksunterschied erkannt.

k) Testergebnisse als Anhang

Tabelle 54: Ergebnisse des Sensoriktests 2A, flavoured Water 50 ppm SSA/ SS

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 1 | 234 | A | 498 | B | 165 | B | 234 | Richtig |
| Proband 2 | 403 | B | 320 | A | 382 | B | 320 | Richtig |
| Proband 3 | 313 | B | 895 | B | 103 | A | 895 | Falsch |
| Proband 4 | 741 | B | 776 | A | 371 | B | 776 | Richtig |
| Proband 5 | 304 | A | 77 | B | 421 | A | 77 | Richtig |
| Proband 6 | 193 | B | 56 | B | 621 | A | 193 | Falsch |
| Proband 7 | 837 | A | 359 | B | 683 | A | 837 | Falsch |
| Proband 8 | 508 | A | 775 | B | 971 | B | 508 | Richtig |
| Proband 9 | 992 | A | 772 | A | 951 | B | 772 | Falsch |
| Proband 10 | 431 | B | 116 | A | 933 | A | 431 | Richtig |

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 11 | 970 | A | 807 | B | 526 | B | 526 | Falsch |
| Proband 12 | 609 | B | 334 | A | 604 | A | 604 | Falsch |
| Proband 13 | 842 | B | 278 | B | 442 | A | 278 | Falsch |
| Proband 14 | 740 | B | 307 | A | 574 | B | 307 | Richtig |
| Proband 15 | 705 | A | 013 | A | 343 | B | 343 | Richtig |
| Proband 16 | 068 | A | 118 | B | 888 | A | 118 | Richtig |
| Proband 17 | 346 | B | 044 | B | 285 | A | 346 | Falsch |
| Proband 18 | 666 | B | 495 | A | 700 | A | 666 | Richtig |
| Proband 19 | 153 | B | 920 | A | 871 | B | 920 | Richtig |
| Proband 20 | 789 | A | 502 | B | 593 | B | 502 | Falsch |

Tabelle 55: Ergebnisse des Sensoriktests 2B, flavoured Water 200 ppm SSA / SS

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 1 | 243 | A | 371 | B | 044 | B | 371 | Falsch |
| Proband 2 | 498 | B | 740 | A | 285 | B | -* | Falsch |
| Proband 3 | 165 | B | 307 | B | 837 | A | 165 | Falsch |
| Proband 4 | 970 | B | 574 | A | 508 | B | 574 | Richtig |
| Proband 5 | 807 | A | 304 | B | 775 | A | 304 | Richtig |
| Proband 6 | 526 | B | 077 | B | 971 | A | 971 | Richtig |
| Proband 7 | 403 | A | 421 | B | 666 | A | 421 | Richtig |
| Proband 8 | 320 | A | 705 | B | 495 | B | 320 | Richtig |
| Proband 9 | 382 | A | 013 | A | 700 | B | 013 | Falsch |
| Proband 10 | 609 | B | 343 | A | 992 | A | 609 | Richtig |
| Proband 11 | 334 | A | 193 | B | 772 | B | 334 | Richtig |
| Proband 12 | 604 | B | 056 | A | 951 | A | 951 | Falsch |
| Proband 13 | 313 | B | 621 | B | 153 | A | 153 | Richtig |
| Proband 14 | 895 | B | 068 | A | 920 | B | 895 | Falsch |
| Proband 15 | 103 | A | 118 | A | 871 | B | 871 | Richtig |
| Proband 16 | 842 | A | 888 | B | 431 | A | 842 | Falsch |
| Proband 17 | 278 | B | 837 | B | 116 | A | 837 | Falsch |
| Proband 18 | 442 | B | 359 | A | 933 | A | 933 | Falsch |
| Proband 19 | 741 | B | 683 | A | 789 | B | 683 | Richtig |
| Proband 20 | 776 | A | 346 | B | 502 | B | 776 | Richtig |

*Die Antwort „kein Unterschied“ wurde mit einem '-' gekennzeichnet und als falsch behandelt

Tabelle 56: Ergebnisse des Sensoriktests 2C, Apfelsaft 50 ppm SSA/ SS

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 1 | 63 | A | 996 | B | 671 | B | 996 | Falsch |
| Proband 2 | 91 | B | 954 | A | 39 | B | 39 | Falsch |
| Proband 3 | 133 | B | 930 | B | 585 | A | 930 | Falsch |
| Proband 4 | 189 | B | 756 | A | 104 | B | 756 | Richtig |
| Proband 5 | 203 | A | 684 | B | 182 | A | 203 | Falsch |

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 6 | 259 | B | 636 | B | 234 | A | 259 | Falsch |
| Proband 7 | 266 | A | 600 | B | 507 | A | 600 | Richtig |
| Proband 8 | 315 | A | 558 | B | 598 | B | 558 | Falsch |
| Proband 9 | 357 | A | 534 | A | 637 | B | 357 | Falsch |
| Proband 10 | 462 | B | 516 | A | 988 | A | 516 | Falsch |
| Proband 11 | 497 | A | 462 | B | 897 | B | 897 | Falsch |
| Proband 12 | 553 | B | 414 | A | 793 | A | 414 | Falsch |
| Proband 13 | 588 | B | 372 | B | 494 | A | 494 | Richtig |
| Proband 14 | 602 | B | 306 | A | 377 | B | 377 | Falsch |
| Proband 15 | 714 | A | 282 | A | 273 | B | 714 | Falsch |
| Proband 16 | 763 | A | 258 | B | 013 | A | 013 | Falsch |
| Proband 17 | 812 | B | 222 | B | 547 | A | 547 | Richtig |
| Proband 18 | 847 | B | 186 | A | 649 | A | 847 | Richtig |
| Proband 19 | 924 | B | 132 | A | 546 | B | 132 | Richtig |
| Proband 20 | 994 | A | 078 | B | 332 | B | 078 | Falsch |

*Die Antwort „kein Unterschied“ wurde mit einem '-' gekennzeichnet und als falsch behandelt.

Tabelle 57: Ergebnisse des Sensoriktests 2D, Apfelsaft 200 ppm SSA/ SS

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 1 | 063 | A | 598 | B | 282 | B | 282 | Falsch |
| Proband 2 | 996 | B | 357 | A | 273 | B | 357 | Richtig |
| Proband 3 | 671 | B | 534 | B | 763 | A | 534 | Falsch |
| Proband 4 | 091 | B | 637 | A | 258 | B | 637 | Richtig |
| Proband 5 | 954 | A | 462 | B | 013 | A | 954 | Falsch |
| Proband 6 | 039 | B | 516 | B | 812 | A | 812 | Richtig |
| Proband 7 | 133 | A | 988 | B | 222 | A | 222 | Falsch |
| Proband 8 | 930 | A | 497 | B | 547 | B | 930 | Richtig |
| Proband 9 | 585 | A | 462 | A | 847 | B | 585 | Falsch |
| Proband 10 | 189 | B | 897 | A | 186 | A | 897 | Falsch |
| Proband 11 | 756 | A | 553 | B | 649 | B | 553 | Falsch |
| Proband 12 | 104 | B | 414 | A | 924 | A | 104 | Richtig |
| Proband 13 | 203 | B | 793 | B | 132 | A | 203 | Falsch |
| Proband 14 | 684 | B | 588 | A | 546 | B | 588 | Richtig |
| Proband 15 | 182 | A | 372 | A | 994 | B | 372 | Falsch |
| Proband 16 | 259 | A | 494 | B | 078 | A | 494 | Richtig |
| Proband 17 | 636 | B | 602 | B | 332 | A | 636 | Falsch |
| Proband 18 | 507 | B | 306 | A | 791 | A | 507 | Richtig |
| Proband 19 | 315 | B | 377 | A | 047 | B | 047 | Falsch |
| Proband 20 | 558 | A | 714 | B | 242 | B | 558 | Richtig |

*Die Antwort „kein Unterschied“ wurde mit einem '-' gekennzeichnet und als falsch behandelt.

Prüfprotokoll 3 – Sensoriktest Nr. A+B

a) zugrunde gelegte Normen

Die Dreiecksprüfungen wurden durchgeführt nach Vorschrift 00.90-7 Untersuchung von Lebensmitteln - Sensorische Prüfverfahren, Dreiecksprüfung aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, September 2006 (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN ISO 4120, Ausgabe April 2005).

b) Zweck der Prüfungen

Es soll festgestellt werden, ob zwischen den verschiedenen Prüfmustern ein Unterschied besteht.

c) Art des Prüfmusters

Probensatz 3A: Orangensaft

Probensatz 2B: Orangensaft

Probe A: 50 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe A: 200 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe B: 50 ppm Sorbinsäure

Probe B: 200 ppm Sorbinsäure

d) Anzahl der Prüfproben

Die Proben wurden in Triaden gereicht. Insgesamt wurden pro Prüfergruppe zwei Triaden geprüft. Es gab keine Bezugsproben oder Blindproben.

e) Prüfklima

Die Tests fanden in zwei Gruppen a 10 Personen statt, die Temperatur im Prüfraum betrug 21 °C, die Prüfproben hatten eine Temperatur von 16 °C. Die Tests wurden bei Tageslicht mit zugeschaltetem Raumlicht gemacht.

f) Qualifikation und Anzahl der Prüfer

Es nahmen insgesamt 20 ungeschulte Prüfer an den Tests teil. Die Prüfer waren zwischen 25 und 50 Jahre alt.

g) Abweichungen von den Festlegungen der oben genannten Normen

Die Prüfungen wurden nicht in Prüfkabinen vorgenommen.

h.) Anzahl der richtigen und der gesamten Antworten

In Test A wurden 25 % richtige Antworten gegeben, in Test B 35 % richtige Antworten.

i.) Angabe der Sicherheitsschwelle

Bei einer geringen Sicherheitsschwelle von $\alpha = 0,05$ müssen 13 bis 14 von 20 Antworten richtig sein (65 – 70 %), um die Proben zweifelsfrei voneinander zu unterscheiden.

j.) Ergebnisse der Prüfungen einschließlich statistischer Auswertungen

Bei beiden Test, in denen Orangensaft verkostet wurde, wurden alle Proben gleichmäßig als die Unterschiedliche bewertet. Sowohl die Probe mit 50 mg/L Sorbinsäureanhydrid, als auch die Probe mit 200 mg/L Sorbinsäureanhydrid konnten nicht von Proben unterschieden werden, welche mit der gleichen Menge Sorbinsäure versetzt waren. In Orangensaft kann Sorbinsäureanhydrid nicht erkannt werden.

k) Testergebnisse als Anhang

Tabelle 58: Ergebnisse des Sensoriktests 3A, Orangensaft 50 ppm SSA/ SS

| Name | 1 | | 2 | | 3 | | Antwort | Richtig oder Falsch |
|------------|-----|---|-----|---|-----|---|---------|---------------------|
| Proband 1 | 403 | A | 609 | B | 777 | B | 403 | Richtig |
| Proband 2 | 193 | B | 077 | A | 600 | B | 600 | Falsch |
| Proband 3 | 332 | B | 934 | B | 714 | A | 934 | Falsch |
| Proband 4 | 721 | B | 429 | A | 431 | B | 429 | Richtig |
| Proband 5 | 150 | A | 945 | B | 116 | A | 116 | Falsch |
| Proband 6 | 992 | B | 933 | B | 103 | A | 992 | Falsch |
| Proband 7 | 700 | A | 386 | B | 508 | A | 386 | Richtig |
| Proband 8 | 574 | A | 994 | B | 068 | B | 994 | Falsch |
| Proband 9 | 320 | A | 667 | A | 073 | B | 073 | Richtig |
| Proband 10 | 056 | B | 593 | A | 807 | A | 807 | Falsch |
| Proband 11 | 472 | A | 382 | B | 421 | B | 421 | Falsch |
| Proband 12 | 664 | B | 621 | A | 545 | A | 545 | Falsch |
| Proband 13 | 772 | B | 549 | B | 608 | A | 549 | Falsch |
| Proband 14 | 495 | B | 361 | A | 153 | B | 495 | Falsch |
| Proband 15 | 307 | A | 332 | A | 842 | B | 307 | Falsch |
| Proband 16 | 895 | A | 951 | B | 741 | A | 951 | Richtig |
| Proband 17 | 741 | B | 285 | B | 508 | A | 285 | Falsch |
| Proband 18 | 243 | B | 740 | A | 379 | A | 740 | Falsch |
| Proband 19 | 491 | B | 313 | A | 888 | B | 888 | Falsch |
| Proband 20 | 789 | A | 837 | B | 604 | B | 837 | Falsch |

Tabelle 59: Ergebnisse des Sensoriktests 3B, Orangensaft 200 ppm SSA/ SS

| Name | 1 | | 2 | | 3 | | Antwort | Richtig oder Falsch |
|------------|-----|---|-----|---|-----|---|---------|---------------------|
| Proband 1 | 604 | A | 386 | B | 153 | B | 386 | Falsch |
| Proband 2 | 403 | B | 508 | A | 307 | B | 508 | Richtig |
| Proband 3 | 609 | B | 574 | B | 332 | A | 332 | Richtig |
| Proband 4 | 777 | B | 994 | A | 842 | B | 994 | Richtig |
| Proband 5 | 193 | A | 068 | B | 895 | A | 193 | Falsch |
| Proband 6 | 077 | B | 320 | B | 951 | A | 077 | Falsch |
| Proband 7 | 600 | A | 667 | B | 741 | A | 741 | Falsch |
| Proband 8 | 332 | A | 073 | B | 285 | B | 073 | Falsch |
| Proband 9 | 934 | A | 056 | A | 508 | B | 056 | Falsch |
| Proband 10 | 714 | B | 593 | A | 243 | A | 714 | Richtig |
| Proband 11 | 721 | A | 807 | B | 740 | B | 807 | Falsch |
| Proband 12 | 429 | B | 472 | A | 349 | A | 429 | Richtig |
| Proband 13 | 431 | B | 382 | B | 491 | A | 431 | Falsch |
| Proband 14 | 150 | B | 421 | A | 313 | B | 150 | Falsch |
| Proband 15 | 945 | A | 664 | A | 888 | B | 664 | Falsch |
| Proband 16 | 116 | A | 621 | B | 789 | A | 621 | Richtig |
| Proband 17 | 992 | B | 545 | B | 837 | A | 545 | Falsch |
| Proband 18 | 933 | B | 772 | A | 279 | A | 279 | Falsch |
| Proband 19 | 103 | B | 549 | A | 451 | B | 451 | Falsch |
| Proband 20 | 700 | A | 361 | B | 286 | B | 700 | Richtig |

*Die Antwort „kein Unterschied“ wurde mit einem '°' gekennzeichnet und als falsch behandelt

Prüfprotokoll 4 – Sensoriktest Nr. A+B

a) zugrunde gelegte Normen

Die Dreiecksprüfungen wurden durchgeführt nach Vorschrift 00.90-7 Untersuchung von Lebensmitteln - Sensorische Prüfverfahren, Dreiecksprüfung aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, September 2006 (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN ISO 4120, Ausgabe April 2005).

b) Zweck der Prüfungen

Es soll festgestellt werden, ob zwischen den verschiedenen Prüfmustern ein Unterschied besteht.

c) Art des Prüfmusters

Probensatz 4A: Rotwein (12 Vol. % Alkohol)

Probensatz 4B: Rotwein (s.o.)

Probe A: 50 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe A: 200 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe B: 50 ppm Sorbinsäure

Probe B: 200 ppm Sorbinsäure

d) Anzahl der Prüfproben

Die Proben wurden in Triaden gereicht. Insgesamt wurden pro Prüfergruppe zwei Triaden geprüft. Es gab eine Rotweinblindprobe.

e) Prüfklima

Die Tests fanden in Kleingruppen a 5 Personen statt, die Temperatur im Prüfraum betrug 20 °C, die Prüfproben hatten eine Temperatur von 16 °C. Die Tests wurden bei Tageslicht mit zugeschaltetem Raumlicht gemacht.

f) Qualifikation und Anzahl der Prüfer

Es nahmen insgesamt 20 ungeschulte Prüfer an den Tests teil.

g) Abweichungen von den Festlegungen der oben genannten Normen

Die Prüfungen wurden nicht in Prüfkabinen vorgenommen.

h) Anzahl der richtigen Antworten

7 Personen erkannten bei Probensatz 4A die unterschiedliche Probe. 6 Personen konnten die unterschiedliche Probe bei Probensatz 4B erkennen.

i) Testergebnisse als Anhang

Tabelle 60: Ergebnisse des Sensoriktests 4A, Rotwein 50 ppm SSA/ SS

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 1 | 25 | A | 314 | B | 694 | B | 25 | Richtig |
| Proband 2 | 362 | B | 710 | A | 930 | B | 362 | Falsch |
| Proband 3 | 800 | B | 291 | B | 908 | A | 800 | Falsch |
| Proband 4 | 329 | B | 790 | A | 592 | B | 592 | Falsch |
| Proband 5 | 664 | A | 494 | B | 97 | A | 494 | Richtig |
| Proband 6 | 496 | B | 832 | B | 411 | A | 411 | Richtig |
| Proband 7 | 830 | A | 810 | B | 123 | A | 830 | Falsch |
| Proband 8 | 738 | A | 811 | B | 254 | B | 811 | Falsch |
| Proband 9 | 136 | A | 667 | A | 375 | B | 667 | Falsch |
| Proband 10 | 519 | B | 777 | A | 737 | A | 777 | Falsch |
| Proband 11 | 717 | A | 110 | B | 585 | B | 717 | Richtig |
| Proband 12 | 138 | B | 570 | A | 956 | A | 570 | Falsch |
| Proband 13 | 565 | B | 628 | B | 166 | A | 166 | Richtig |
| Proband 14 | 205 | B | 470 | A | 529 | B | 529 | Falsch |
| Proband 15 | 276 | A | 460 | A | 609 | B | 460 | Falsch |

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 16 | 793 | A | 609 | B | 320 | A | 609 | Richtig |
| Proband 17 | 681 | B | 683 | B | 866 | A | 866 | Richtig |
| Proband 18 | 969 | B | 502 | A | 129 | A | 502 | Falsch |
| Proband 19 | 975 | B | 179 | A | 517 | B | 975 | Falsch |
| Proband 20 | 798 | A | 44 | B | 337 | B | 44 | Falsch |

Tabelle 61: Ergebnisse des Sensoriktests 4B, Rotwein 200 ppm SSA/ SS

| <i>Name</i> | <i>1</i> | | <i>2</i> | | <i>3</i> | | <i>Antwort</i> | <i>Richtig oder Falsch</i> |
|-------------|----------|---|----------|---|----------|---|----------------|----------------------------|
| Proband 1 | 617 | A | 401 | B | 449 | B | 401 | Falsch |
| Proband 2 | 726 | B | 700 | A | 395 | B | 395 | Falsch |
| Proband 3 | 726 | B | 268 | B | 314 | A | 314 | Richtig |
| Proband 4 | 517 | B | 143 | A | 292 | B | 517 | Falsch |
| Proband 5 | 774 | A | 339 | B | 559 | A | 774 | Falsch |
| Proband 6 | 737 | B | 212 | B | 536 | A | 536 | Richtig |
| Proband 7 | 836 | A | 300 | B | 921 | A | 300 | Richtig |
| Proband 8 | 571 | A | 737 | B | 246 | B | 737 | Falsch |
| Proband 9 | 516 | A | 231 | A | 382 | B | 231 | Falsch |
| Proband 10 | 739 | B | 824 | A | 342 | A | 342 | Falsch |
| Proband 11 | 106 | A | 718 | B | 821 | B | 821 | Falsch |
| Proband 12 | 172 | B | 696 | A | 255 | A | 172 | Richtig |
| Proband 13 | 371 | B | 689 | B | 758 | A | 371 | Falsch |
| Proband 14 | 749 | B | 801 | A | 491 | B | 749 | Falsch |
| Proband 15 | 876 | A | 754 | A | 989 | B | 989 | Richtig |
| Proband 16 | 562 | A | 764 | B | 315 | A | 562 | Falsch |
| Proband 17 | 935 | B | 250 | B | 277 | A | 250 | Falsch |
| Proband 18 | 530 | B | 219 | A | 925 | A | 219 | Falsch |
| Proband 19 | 526 | B | 423 | A | 254 | B | 423 | Richtig |
| Proband 20 | 870 | A | 193 | B | 937 | B | 937 | Falsch |

*Die Antwort „kein Unterschied“ wurde mit einem '°' gekennzeichnet und als falsch behandelt

Prüfprotokoll 5 – Sensoriktest Nr. A

Ziel des Tests war es, einen Standard A aus einer Reihe verschiedener Proben wieder zu erkennen, dazu wurde ein „A/nicht A“-Test durchgeführt. Es wurden Apfelsaft-Proben getestet, welche als „nicht A“-Proben mit Kaliumsorbat, Limonen oder Sorbinsäureanhydrid versetzt wurden.

a) zugrunde gelegte Normen

Der A/nicht A- Test wurde durchgeführt nach der DIN Vorschrift 10972 Sensorische Prüfverfahren – „A“ – „nicht A“ Prüfung, Ausgabe August 2003.

b.) Charakterisierung der Proben

Als Standard A wurde Apfelsaft verwendet.

Für die „nicht A“ –Proben wurde der Apfelsaft mit

50 ppm Anhydrid,

250 ppm Sorbat oder

50 ppm Limonen

versetzt und in verschiedener Reihenfolge und unterschiedlicher Anzahl zum Testen gereicht.

Die Probensets enthielten jeweils vier Proben plus Standard A.

c.) Prüfauftrag

Den ungeschulten Prüfern wurde mitgeteilt, dass es sich um einen „A/nicht A“ -Test handelt.

Der Prüfauftrag bestand darin, aus verschiedenen Proben die zu erkennen, welche gleich dem Standard ist (sind). Die anderen Proben sollen als „nicht A“ gekennzeichnet werden und der Geschmacksunterschied zum Standard A soll benannt werden.

d.) Prüfbedingungen

Die Prüfung wurde bei 20 °C durchgeführt, die Getränke wurden gekühlt (ca. 12 °C) verkostet. An der Prüfung nahmen 20 ungeschulte Prüfer teil.

e.) Anzahl der richtigen und der gesamten Antworten

Von den 26 ausgeteilten Standardproben wurden 10 richtig erkannt und 16 falsche Antworten gegeben. Von den „nicht A“ –Proben wurden 34 als vom Standard unterschiedlich erkannt, 20 Proben wurden nicht als unterschiedlich erkannt.

Insgesamt wurden 43 richtige Antworten und 37 falsche Antworten gegeben.

f.) Urteil

Es wurden weniger als die Hälfte der Standardproben richtig erkannt, somit konnte der Standard nicht zweifelsfrei identifiziert werden.

Die Proben, welche mit Limonen versetzt waren, konnten eindeutig identifiziert werden. Der Geschmacksunterschied wurde als saurer im Vergleich zum Standard beschrieben. Zudem trat bei dieser Probe ein leichter Geschmack nach Citrusfrüchten auf, welcher durch das Limonen verursacht wurde.

Die anderen beiden Proben (Sorbinsäureanhydrid und Sorbinsäure) konnten vom Standard nicht zweifelsfrei unterschieden werden.

Tabelle 62: Ergebnisse des Sensoriktests "A/nicht A"

| Prüfer | Probe 1 | Code | Antwort | Probe 2 | Code | Antwort | Probe 3 | Code | Antwort | Probe 4 | Code | Antwort |
|-----------|----------|------|---------|----------|------|---------|----------|------|---------|----------|------|---------|
| Prüfer 1 | Sorbat | 492 | Falsch | Standard | 933 | Falsch | Anhydrid | 971 | Falsch | Limonen | 920 | Richtig |
| Prüfer 2 | Standard | 653 | Falsch | Anhydrid | 945 | Richtig | Limonen | 371 | Richtig | Anhydrid | 73 | Falsch |
| Prüfer 3 | Limonen | 581 | Richtig | Limonen | 318 | Richtig | Standard | 334 | Richtig | Sorbat | 901 | Richtig |
| Prüfer 4 | Sorbat | 462 | Richtig | Sorbat | 480 | Falsch | Sorbat | 118 | Falsch | Standard | 429 | Falsch |
| Prüfer 5 | Anhydrid | 180 | Falsch | Standard | 683 | Richtig | Anhydrid | 502 | Richtig | Limonen | 934 | Richtig |
| Prüfer 6 | Standard | 98 | Richtig | Anhydrid | 79 | Richtig | Limonen | 468 | Richtig | Standard | 77 | Falsch |
| Prüfer 7 | Limonen | 349 | Richtig | Sorbat | 549 | Richtig | Standard | 994 | Richtig | Anhydrid | 526 | Richtig |
| Prüfer 8 | Anhydrid | 914 | Richtig | Standard | 776 | Falsch | Anhydrid | 272 | Falsch | Standard | 361 | Richtig |
| Prüfer 9 | Anhydrid | 821 | Richtig | Standard | 476 | Falsch | Sorbat | 957 | Richtig | Sorbat | 343 | Falsch |
| Prüfer 10 | Standard | 84 | Richtig | Sorbat | 604 | Richtig | Sorbat | 421 | Richtig | Limonen | 970 | Richtig |
| Prüfer 11 | Sorbat | 105 | Falsch | Anhydrid | 888 | Richtig | Standard | 788 | Falsch | Sorbat | 705 | Richtig |
| Prüfer 12 | Limonen | 263 | Falsch | Standard | 243 | Richtig | Limonen | 225 | Falsch | Standard | 153 | Falsch |
| Prüfer 13 | Anhydrid | 621 | Falsch | Standard | 593 | Falsch | Anhydrid | 304 | Falsch | Anhydrid | 445 | Falsch |
| Prüfer 14 | Sorbat | 576 | Falsch | Anhydrid | 667 | Falsch | Standard | 609 | Falsch | Sorbat | 608 | Richtig |
| Prüfer 15 | Standard | 740 | Falsch | Limonen | 994 | Richtig | Sorbat | 68 | Falsch | Limonen | 545 | Richtig |
| Prüfer 16 | Sorbat | 362 | Richtig | Sorbat | 508 | Falsch | Anhydrid | 789 | Richtig | Standard | 770 | Falsch |
| Prüfer 17 | Limonen | 328 | Richtig | Standard | 741 | Richtig | Limonen | 491 | Richtig | Anhydrid | 421 | Falsch |
| Prüfer 18 | Anhydrid | 907 | Richtig | Standard | 842 | Falsch | Standard | 772 | Falsch | Sorbat | 807 | Falsch |
| Prüfer 19 | Standard | 835 | Richtig | Sorbat | 386 | Richtig | Sorbat | 227 | Richtig | Standard | 13 | Richtig |
| Prüfer 20 | Standard | 497 | Falsch | Anhydrid | 108 | Richtig | Anhydrid | 775 | Richtig | Standard | 871 | Falsch |

Prüfprotokoll 6 – Sensoriktest Nr. A

Es wurde ein Präferenztest durchgeführt. Das Ziel dieses Testes war es, herauszufinden, welche Probe bevorzugt wird.

a.) Charakterisierung der Proben

Probe 1: Apfelsaft mit 250 ppm Sorbinsäure

Probe 2: Apfelsaft mit 50 ppm Sorbinsäureanhydrid

Probe 3: Apfelsaft mit 0,1 ppm 2-Ethoxy-3,5-hexadien

b.) Prüfauftrag

Den ungeschulten Prüfern wurde mitgeteilt, dass es sich um einen Präferenztest handelt. Der Prüfauftrag bestand darin, die verschiedenen Proben nach ihrem Geschmack zu ordnen. Die Probe, die am besten schmeckt, wurde bezeichnet, als 1. Wahl, die nächste Probe als 2. Wahl und die dritte Probe als 3. Wahl.

c.) Prüfbedingungen

Die Prüfung wurde bei 20 °C durchgeführt, die Getränke wurden gekühlt (ca. 12 °C) verkostet. An der Prüfung nahmen 40 ungeschulte Prüfer teil.

d.) Auswertung der Antworten

Die Probe, welche 1. Wahl ist, erhält 3 Punkte, die zweite Wahl erhält 2 Punkte und die dritte Wahl erhält einen Punkt. Dadurch ergeben sich durch die Antworten der Tester folgende Endsummen:

Probe 1: 99

Probe 2: 101

Probe 3: 40

5.) Urteil

Die dritte Probe (mit 0,1 ppm Ethoxyhexadien) wurde von allen als die schlechteste Probe bewertet. Die Proben 1 und 2 haben jeweils eine Summe um 100 Punkte, womit eine klare Präferenz ausgeschlossen ist. Allerdings wurde die Probe 2 (mit 50 ppm Sorbinsäureanhydrid) knapp besser bewertet.

6.) Testergebnisse als Anhang

Tabelle 63: Ergebnisse des Sensoriktests 6A, Präferenztest

| <i>Proband Nummer</i> | <i>Probe 1</i> | <i>Probe 2</i> | <i>Probe 3</i> |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| Proband 1 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 2 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 3 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 4 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 5 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 6 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 7 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 8 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 9 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 10 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 11 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 12 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 13 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 14 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 15 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 16 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 17 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 18 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 19 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 20 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 21 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 22 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 23 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 24 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 25 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 26 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 27 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 28 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 29 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 30 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 31 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 32 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 33 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 34 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 35 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 36 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 37 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 38 | 2 | 3 | 1 |
| Proband 39 | 3 | 2 | 1 |
| Proband 40 | 2 | 3 | 1 |
| Summe | 99 | 101 | 40 |

6.2 Abkürzungsverzeichnis

| <i>Abkürzung</i> | <i>Bedeutung</i> |
|--------------------------------|---|
| % ige | prozentige |
| ° C | Grad Celsius |
| AG | Arbeitsgemeinschaft |
| BASF | Badische Anilin und Soda Fabrik |
| BASIL | Biphasic Acid Scavenging Utilizing Ionic Liquids |
| C | Kohlenstoff |
| ca. | circa |
| Cl ⁻ | Chlorid-Ion |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| DABCO | Diazabicyclooctan |
| DCC | Dicyclocarbodiimid |
| DHB | Dihydroxybenzoesäure |
| DIN | Deutsche Industrie Norm |
| DPCP | Diphenylchlorophosphat |
| DMF | Dimethylformamid |
| et. al. | et alii, und andere |
| g | Gramm |
| g/kg | Gramm pro Kilogramm |
| GC | Gaschromatograph(ie) |
| h | hour(s), Stunde(n) |
| H | Wasserstoff |
| H ⁺ | Proton |
| H ₂ SO ₄ | Schwefelsäure |
| H ₃ PO ₄ | Phosphorsäure |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie |
| IR | Infrarot |
| KBE | Kolonien bildende Einheiten |
| kg | Kilogramm |
| KS | Kaliumsorbit |
| L | Liter |
| LFGB | Lebens- und Futtermittelgesetzbuch |
| LSM | Lösungsmittel |
| m/Z | Masse-Ladungsverhältnis |
| MALDI- TOF-MS | Matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight - mass spectrometry, Matrix unterstützte Laser Desorption Ionisation- Flugzeit-Massenspektrometer |
| max. | Maximal |
| mbar | Millibar |
| mg | Milligramm |
| mg/L | Milligramm pro Liter |
| mL | Milliliter |
| min | Minute(n) |

| | |
|-------------------|--|
| mind. | Mindestens |
| MIO | Mikroorganismus, Mikroorganismen |
| MS | Massenspektrum |
| MSA | Maleinsäureanhydrid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaNO ₂ | Natriumnitrit |
| NaNO ₃ | Natriumnitrat |
| Nm | Nanometer |
| NMR | Nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz |
| o.a. | oder andere |
| o.ä. | oder ähnliche |
| PET | Polyethylenterephthalat |
| PCl ₅ | Phosphorpentachlorid |
| POCl ₃ | Phosphorylchlorid |
| ppm | parts per million, Teile pro Million |
| PSA | Phthalsäureanhydrid |
| RF | Rückfluss |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde(n) |
| SO ₂ | Schwefeldioxid |
| SS | Sorbinsäure |
| SSA | Sorbinsäureanhydrid |
| SSCl | Sorbinsäurechlorid |
| t | Tonne(n) |
| TEA | Triethylamin |
| USA | United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika |
| UV | Ultraviolett |
| vgl. | vergleiche |
| Vol. | Volumen |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZZulV | Zusatzstoff-Zulassungsverordnung |

6.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Hitzebehandlung von Milch..... | 2 |
| Tabelle 2: Methoden zur Lebensmitteltrocknung | 4 |
| Tabelle 3: Eingesetzte Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie | 8 |
| Tabelle 4: Reaktionsausbeuten beim direkten Wasserentzug | 17 |
| Tabelle 5: Reaktionsausbeuten ausgewählter Versuche mit Thionylchlorid | 20 |
| Tabelle 6: Reaktionsausbeuten ausgewählter Versuche mit Oxalylchlorid..... | 22 |
| Tabelle 7: Reaktionsausbeuten ausgewählter Versuche mit Phosphorchloriden..... | 23 |
| Tabelle 8: Spezifikation von Sorbinsäureanhydrid | 28 |
| Tabelle 9: Daten der Pastillierung..... | 38 |
| Tabelle 10: Analysen der Pastillen..... | 38 |
| Tabelle 11: Stabilitätsprüfung von Sorbinsäureanhydrid unter Schutzgas | 42 |
| Tabelle 12: Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid in Wasser (Rückwägung)..... | 44 |
| Tabelle 13: Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid in Wasser per HPLC | 44 |
| Tabelle 14: Löslichkeit von Sorbinsäureanhydrid in verschiedenen Lösungsmitteln | 45 |
| Tabelle 15: Stabilität von SSA in ethanolischer Lösung | 46 |
| Tabelle 16: Zusammenfassende Tabelle der Sorbinsäurehydrolyse bei 20 °C..... | 52 |
| Tabelle 17: Auswertung der Keimzählung von <i>Penicillium roqueforti thom</i> , S 204 | 60 |
| Tabelle 18: Auswertung des Abtötetests von <i>Penicillium roqueforti thom</i> | 61 |
| Tabelle 19: Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Schimmelpilzen..... | 62 |
| Tabelle 20: Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Hefen | 64 |
| Tabelle 21: Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Essigsäurebakterien..... | 66 |
| Tabelle 22: Wirksamkeit von Sorbinsäureanhydrid gegenüber Milchsäurebakterien | 67 |
| Tabelle 23: Edukte für die Umsetzung von SSA mit Getränkeinhaltsstoffen | 72 |
| Tabelle 24: Ergebnisse der Sensorikschulung Sorbinsäure | 75 |
| Tabelle 25: Ergebnisse der Sensorikschulung Sorbinsäure in stillem Wasser mit Zitrone | 76 |
| Tabelle 26: Ergebnisse des Sensoriktests 1A, Wasser 50 ppm SSA/ SS | 79 |
| Tabelle 27: Ergebnisse des Sensoriktests 1B, Wasser 200 ppm SSA/ SS | 80 |
| Tabelle 28: Zusammenfassung der Sensoriktest-Ergebnisse | 81 |
| Tabelle 29: Vergleich der der Reaktionsausbeuten..... | 98 |
| Tabelle 30: Messungen der Stabilitätsdaten von Sorbinsäureanhydrid | 99 |
| Tabelle 31: Reaktionsgeschwindigkeiten des Sorbinsäureanhydrid-Abbaus | 103 |
| Tabelle 32: Auswertung Abtöteversuch 6.2.1, 200..... | 105 |
| Tabelle 33: Auswertung Abtöteversuch 6.2.1, 500..... | 105 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 34: Auswertung Abtöteversuch 6.2.2, 4.000 | 106 |
| Tabelle 35: Auswertung Abtöteversuch 6.2.2, 200.000 | 106 |
| Tabelle 36: Auswertung Abtöteversuch 6.2.3, 8.000 | 107 |
| Tabelle 37: Auswertung Abtöteversuch 6.2.4, 50 | 107 |
| Tabelle 38: Auswertung Abtöteversuch 6.2.4, 1.000 | 107 |
| Tabelle 39: Auswertung Abtöteversuch 6.2.6, 100.000 | 108 |
| Tabelle 40: Auswertung Abtöteversuch 6.2.7, 20.000 | 108 |
| Tabelle 41: Auswertung Abtöteversuch 6.2.8, 200.000 | 109 |
| Tabelle 42: Auswertung Abtöteversuch 6.2.9, 50 | 110 |
| Tabelle 43: Auswertung Abtöteversuch 6.2.9, 1.000 | 110 |
| Tabelle 44: Auswertung Abtöteversuch 6.2.9, 10.000 | 110 |
| Tabelle 45: Auswertung Abtöteversuch 6.2.10, 200 | 111 |
| Tabelle 46: Auswertung Abtöteversuch 6.2.10, 75.000 | 111 |
| Tabelle 47: Auswertung Abtöteversuch 6.2.11, 1.000 | 112 |
| Tabelle 48: Auswertung Abtöteversuch 6.2.11, 75.000 | 112 |
| Tabelle 49: Auswertung Abtöteversuch 6.2.12, 10 | 113 |
| Tabelle 50: Auswertung Abtöteversuch 6.2.12, 1.000 | 113 |
| Tabelle 51: Auswertung Abtöteversuch 6.2.13, 10.000 | 114 |
| Tabelle 52: Auswertung Abtöteversuch 6.2.13, 100.000 | 114 |
| Tabelle 53: Auswertung Abtöteversuch 6.2.14, 10.000 | 114 |
| Tabelle 54: Ergebnisse des Sensoriktests 2A, flavoured Water 50 ppm SSA/ SS | 116 |
| Tabelle 55: Ergebnisse des Sensoriktests 2B, flavoured Water 200 ppm SSA / SS | 117 |
| Tabelle 56: Ergebnisse des Sensoriktests 2C, Apfelsaft 50 ppm SSA/ SS..... | 117 |
| Tabelle 57: Ergebnisse des Sensoriktests 2D, Apfelsaft 200 ppm SSA/ SS | 118 |
| Tabelle 58: Ergebnisse des Sensoriktests 3A, Orangensaft 50 ppm SSA/ SS..... | 120 |
| Tabelle 59: Ergebnisse des Sensoriktests 3B, Orangensaft 200 ppm SSA/ SS..... | 121 |
| Tabelle 60: Ergebnisse des Sensoriktests 4A, Rotwein 50 ppm SSA/ SS..... | 122 |
| Tabelle 61: Ergebnisse des Sensoriktests 4B, Rotwein 200 ppm SSA/ SS..... | 123 |
| Tabelle 62: Ergebnisse des Sensoriktests "A/nicht A" | 125 |
| Tabelle 63: Ergebnisse des Sensoriktests 6A, Präferenztest | 127 |

6.4 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Strukturformeln von Sorbinsäure und Parasorbinsäure | 8 |
| Abbildung 2: Strukturformel von Sorbinsäureanhydrid | 10 |
| Abbildung 3: formale Anhydridbildung | 15 |
| Abbildung 4: Wasserentzug | 17 |
| Abbildung 5: allgemeine Reaktionsfolge..... | 19 |
| Abbildung 6: Reaktionsgleichung mit Oxalylchlorid | 22 |
| Abbildung 7: Reaktionsgleichung mit Phosgen..... | 24 |
| Abbildung 8: Dicyclohexylcarbodiimid..... | 26 |
| Abbildung 9: UV-Spektren von Sorbinsäureanhydrid und Sorbinsäure als Vergleich | 28 |
| Abbildung 10: IR-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid (KBr)..... | 29 |
| Abbildung 11: LC-MS Spektrum von Sorbinsäureanhydrid | 30 |
| Abbildung 12: ¹ H-NMR-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid..... | 31 |
| Abbildung 13: ¹³ C-NMR-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid | 32 |
| Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von Sorbinsäureanhydrid (280 nm) | 33 |
| Abbildung 15: Ausschnitt des GC-Chromatogramms von Sorbinsäureanhydrid..... | 34 |
| Abbildung 16: MALDI-TOF-MS-Spektrum von Sorbinsäureanhydrid | 35 |
| Abbildung 17: Vorversuch zur Pastillierung von Sorbinsäureanhydrid bei 40 °C..... | 36 |
| Abbildung 18: Vergleich der verschiedenen Pastillengrößen..... | 36 |
| Abbildung 19: Pastillierteller der Firma Gouda GMF | 37 |
| Abbildung 20: Lagerstabilität von Sorbinsäureanhydrid bei 20 °C, Luft | 40 |
| Abbildung 21: Lagerstabilität von Sorbinsäureanhydrid unter Schutzgas bei 7 °C | 42 |
| Abbildung 22: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in demin. Wasser bei 20 °C | 47 |
| Abbildung 23: Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von SSA in demin. Wasser | 48 |
| Abbildung 24: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in destilliertem Wasser bei 20 °C | 48 |
| Abbildung 25: Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 2..... | 49 |
| Abbildung 26: Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse von SSA bei pH 2..... | 50 |
| Abbildung 27: Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten von Sorbinsäureanhydrid..... | 51 |
| Abbildung 28: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in flavoured water | 53 |
| Abbildung 29: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in Apfelsaft (pH 3,5, 20 °C) | 53 |
| Abbildung 30: Abbaukurven von Sorbinsäureanhydrid in Alkoholen | 54 |
| Abbildung 31: Hydrolyse von Sorbinsäureanhydrid in einem Weinmischgetränk, pH 3,5 | 55 |
| Abbildung 32: <i>Aspergillus niger</i> (S 200, links) und <i>Byssoschlamys fulva</i> (S 203)..... | 59 |
| Abbildung 33: <i>Penicillium roqueforti</i> (S 204)..... | 60 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 34: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (H 16332) | 63 |
| Abbildung 35: <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (H 16237)..... | 63 |
| Abbildung 36: <i>Asaia bogorensis</i> (B 16011) | 65 |
| Abbildung 37: <i>Asaia lannaensis</i> (B 16239) | 65 |
| Abbildung 38: <i>Lactobacillus brevis</i> (B 15190) | 67 |
| Abbildung 39: Massenspektrum von Sorbinsäureamid..... | 71 |
| Abbildung 40: Testanordnung des Triangeltests | 77 |
| Abbildung 41: grafische Darstellung der Sensorik-Ergebnisse..... | 82 |
| Abbildung 42: Grafische Darstellung der Sensorikergebnisse des "A/nicht A"-Tests..... | 82 |
| Abbildung 43: Ergebnisse der Präferenztests | 83 |
| Abbildung 44: IR-Spektrum von Sorbinsäure | 98 |
| Abbildung 45: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid bei pH3, 20 °C..... | 100 |
| Abbildung 46:Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 3,5 | 100 |
| Abbildung 47: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid bei pH 3,5, 6 °C..... | 101 |
| Abbildung 48: Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 4,5 | 101 |
| Abbildung 49: Hydrolysekurven von Sorbinsäureanhydrid bei pH 5 | 102 |
| Abbildung 50: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid bei pH 6, 20 °C..... | 102 |
| Abbildung 51: Hydrolysekurve von Sorbinsäureanhydrid in Traubensaft bei pH 3,5..... | 103 |
| Abbildung 52: Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse von SSA in Alkoholen..... | 104 |

6.5 Literaturverzeichnis

- [1] Langer C. *Charakterisierung und Klassifizierung von Feinkostproben* Diplomarbeit Universität Bonn 2008
- [2] Raczek N.N. *Food and beverage preservation* 1 Ed. Springer: Berlin, Heidelberg, New York (2005) pp 287-304.
- [3] Davidson P.M.; Sofos J.N.; Branen A.L. *Antimicrobials in Food*; 3 Ed. CRC Press(2005)
- [4] Körperth H. *Konservierung der Lebensmittel (Praxis-Schriftenreihe: Abteilung Chemie Bd. 33)*; 1 Aulis-Verlag Deubner Köln (1979)
- [5] Whitaker J.R. *Trends in Food Science & Technology* (1991) 94-97 *Enzymes: monitors of food stability and quality*
- [6] Lück E. *Chemische Lebensmittelkonservierung*; 1 Ed. Springer Berlin, Heidelberg, New York (1977)
- [7] Heiss R.; Eichner K. *Haltbarmachen von Lebensmitteln: Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Qualitätserhaltung*; 4 Ed. Springer Berlin, Heidelberg, New York (2002)
- [8] Belitz H.-D.; Grosch W.; Schieberle P. *Sorbinsäure (2,4-Hexadiencarbonsäure)* 6. Auflage Springer: Berlin, Heidelberg (2001) pp 463-464.
- [9] Behler A.; Hartmann-Schreier J. *Konservierungsmittel* Georg Thieme Verlag: (2007) .
- [10] Bundesministerium für Gesundheit. (1998) *Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung - ZZuLV)*
- [11] Manger H.J. *Füllanlagen für Getränke - Kompendium zur Reinigungs-, Füll- und Verpackungstechnik für Einweg- und Mehrwegflaschen, Dosen, Fässer und Kegs*; 1 Ed. Versuchs- u. Lehranstalt f. Brauerei(2008)
- [12] Strahlman E. *Mitteilungen aus der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* (1974) 65, 96-130 *Entdeckungsgeschichte antimikrobieller Konservierungsstoffe für Lebensmittel*
- [13] Diemair W.; Franzen K. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1959) 109, 373-378 *Über das Vorkommen der Parasorbinsäure und der Sorbinsäure*
- [14] Lück E. *Food Additives and Contaminants* (1990) 7, 711-715 *Food Applications of sorbic acid and its salts*
- [15] Doebner O. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* (1894) 27, 344-351 *Über das flüchtige Oel der Vogelbeeren, die Parasorbinsäure und ihre Isomerie mit der Sorbinsäure*

-
- [16] Eisner U.; Elvidge J.A.; Linstead R.P. *Journal of the Chemical Society* (1953) 1372 *Polyene Acids. Part VI. A new (cis-trans)Isomer of Sorbic Acid and its Relation to Hex-enolactones*
- [17] Butenandt A.; Hecker E.; Zacchau H.G. *Chemische Berichte* (1955) 88, 1185-1196 *Über die vier geometrischen Isomere des 2,4-Hexadienols-(1)*
- [18] Somogyi L.P.; Kishi A.; Ma X.; Müller S. *Chemical Industries Newsletter* (2008) *Food additives - SCUP Report Abstract*
- [19] Specialty Chemicals SRI Consulting "China Report: Chemical Product Trends - Market coverage of China's leading chemicals," 2008
- [20] Vogel J.; Prahl L. *Sorbinsäure als Konservierungsmittel*; VEB Fachbuchverlag Leipzig (1969)
- [21] Melnick, D.; Gooding, C. M.; Luckmann F. *Journal of Food Science* (1954) 19, 44-58 *Sorbic acid as a fungistatic agent for foods*
- [22] Arya S.S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1980) 28, 1246-1249 *Stability of Sorbic Acid in aqueous solutions*
- [23] Ledward D.A. *Food Additives and Contaminants: Part A* (2010) 7, 677-683 *Stability of sorbic acid in intermediate moisture systems*
- [24] Rehm H.-J.; Wallnöfer P. *Die Naturwissenschaften* (1963) 13-14 *Zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der Sorbinsäure*
- [25] Freese E.; Levin B.C. *Developments in Industrial Microbiology* (1978) 207-227 *Action mechanism of preservatives and antiseptics*
- [26] York G.K.; Vaughn R.H. *Journal of Bacteriology* (1964) 88, 411-417 *Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid*
- [27] Khandelwal G.D.; Wedzicha B.L. *Food Chemistry* (1990) 37, 159-169 *Derivatives of Sorbic Acid-Thiol Adducts*
- [28] Martoadiprawito W.; Whitaker J.R. *Biochimica et Biophysica Acta* (1963) 77, 536-544 *Potassium sorbate inhibition of yeast alcohol dehydrogenase*
- [29] Eklund T. *Journal of General Microbiology* (1985) 131, 73-76 *The Effect of Sorbic Acid and Esters of p-Hydroxybenzoic Acid on the Protonmotive Force in Escherichia coli Membrane Vesicles*
- [30] Skirdal I.M.; Eklund T. *Journal of Applied Bacteriology* (1993) 74, 191-195 *Microcultural model studies on the effect on Sorbic Acid on Penicillium chrysogenum, Cladosporium cladosporioides and Ulacladium atrum at different pH levels*
- [31] Oka S. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* (1960) 24, 59-65 *Studies on transfer of antiseptics to microbes and their toxic effect, Part I*

- [32] Marth E.H.; Capp C.M.; Hasenzahl L.; Jackson H.W.; Hussong R.V. *Journal of Dairy Science* (1966) 49, 1197-1205 *Degradation of Potassium Sorbate by Penicillium Species*
- [33] Plumridge A.; Melin P.; Stratford M.; Novodvorska M.; Shunburne L.; Dyer P.S.; Roubos J.A.; Menke H.; Stark J.; Stam H.; Archer D.B. *Fungal Genetics and Biology* (2010) 47, 683-692 *The decarboxylation of the weak-acid preservative, sorbic acid, is encoded by linked genes in Aspergillus spp.*
- [34] Stratford M.; Plumridge A.; Archer D.B. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) 73, 6534-6542 *Decarboxylation of Sorbic Acid by Spoilage Yeasts Is Associated with the PADI Gene*
- [35] Kaulen J.; Vogl E.; Ritzer E.; Hoffmann M. (2006) *Patent: Konservierungsmittel auf Basis von Carbonsäureanhydriden* DE 102006035202A1
- [36] Farbwerke Hoechst (1966) *Patent: Process of the Manufacture of Anhydrides of Sorbic Acid* US 1,138,813
- [37] Thoma W.; Genth, H. (1963) *Patent: Preservatives consisting of mixed anhydrides of alkylcarbonic acids* US 3,097,996
- [38] Troller J.A.; Olsen R.A. *Journal of Food Science* (1967) 32, 228-231 *Derivatives of Sorbic Acid as Food Preservatives*
- [39] Pérez-Pérez C.; Regalado-González C.; Rodríguez-Rodríguez C.A.; Barbosa-Rodríguez J.R.; Villasenor-Ortega F. *Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings* edited by Guevara-González R.G.; Torres-Pacheco I., Eds.; (2006) pp 193-216.
- [40] Saxby M.J.; Stephens M.A.; Reid R.G. *Food Chemistry* (1982) 9, 283-287 *Degradation of Sorbic Acid in model food systems*
- [41] Vermeiren L.; Devlieghere F.; van Beest M.; de Kruijf N.; Debevere J. *Trends in Food Science & Technology* (1999) 10, 77-86 *Developments in the active packaging of foods*
- [42] Falguera V.; Quintero J.P.; Jiménez A.; Muñoz J.A.; Ibarz A. *Trends in Food Science & Technology* (2011) 22, 292-303 *Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use*
- [43] Mastromatteo; Mastromatteo; Conte; Del Nobile *Trends in Food Science & Technology* (2010) 21, 591-598 *Advances in controlled release devices for food packaging applications*
- [44] Cahan R.; Goldstein V.; Finkelstein B.; Bormashenko E. *Thesis: Development of the novel active packaging film preventing migration of antimicrobial component* The College of Judea and Samaria Ariel 2011
- [45] Weng Y.-M.; Chen M.-J. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* (1997) 30, 485-487 *Sorbic Anhydride as Antimycotic Additive in Polyethylene Food Packaging Films*

- [46] Weng Y.-M.; Chen M.-J.; Chen W. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* (1999) 32, 191-195 *Antimicrobial Food Packaging Materials from Poly(ethylene-co-methacrylic acid)*
- [47] Sorrentino A.; Gorrasi G.; Vittoria V. *Trends in Food Science & Technology* (2007) 18, 84-95 *Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications*
- [48] Weng Y.-M.; Hotchkiss J.H. *Packaging Technology and Science* (1993) 6, 123-128 *Anhydrides as Antimycotic Agents Added to Polyethylene Films for Food Packaging*
- [49] Richards D.; Bodnar A. (2010) *Report: Canadian Beverage Forecast*
- [50] Wirtschaftsvereinigung Alkoholfreie Getränke. (2011) *Statistischer Jahresbericht der WAFG 2010*
- [51] Larock; R.C. *Anhydrides* edited by Larock R.C., Ed.; VCH: (1989) .
- [52] Vollhardt K.P.; Schore N.E. *Organische Chemie*; (2011)
- [53] Horning E.C.; Finelli A.F. *Organic Synthesis* (1963) 4, 790-791 *α -Phenylglutaric anhydride [Glutaric anhydride, 2-phenyl]*
- [54] Selinger Z.; Lapidot Y. *Journal of Lipid Research* (1966) 7, 174-175 *Synthesis of fatty acid anhydrides by reaction with dicyclohexylcarbodiimide*
- [55] Shelkov R.; Nahmany M.; Melman A. *Organic & Biomolecular Chemistry* (2004) 2, 397-401 *Selective esterification of alcohols and phenols through carbodiimide couplings*
- [56] Coulbeck E.; Eames J. *Tetrahedron Asymmetry* (2009) 20, 635-640 *A method for determining the enantiomeric purity of profens*
- [57] Cason J. *Organic Synthesis* (1963) 4, 630-633 *β -Methylglutaric anhydride [Glutaric anhydride, 3-methyl]*
- [58] Liesen G.P.; Sukenik C.N. *Journal of Organic Chemistry* (1987) 52, 455-457 *Activated Anhydrides of Tartaric and Malic Acid*
- [59] Wallace J.M.; Copenhaver J.E. *Journal of the American Chemical Society* (1941) 63, 699-700 *Anhydrides of the Normal Aliphatic Saturated Monobasic Acids*
- [60] Bartoli G.; Bosco M.; Carlone A.; Dalpozzo R.; Marcantoni E.; Melchiorre P. *Synthesis* (2007) 22, 3489-3496 *Reaction of Dicarbonates with Carboxylic Acids catalyzed by weak Lewis Acids: General Method for the Synthesis of Anhydrides and Esters*
- [61] Carpenter F.H. *Journal of the American Chemical Society* (1948) 70, 2964-2965 *The Anhydride of Benzylpenicillin*
- [62] Kazemi F.; Kiasat A.R.; Mombaini B. *Synthetic Communications* (2007) 37, 3219-3223 *Simple preparation of symmetrical Carboxylic Acid Anhydrides by means of Sodium carbonate / Thionyl chloride*

- [63] Fieser L.F.; Martin E.L.; Shriner R.L.; Struck H.C. *Organic Synthesis* (1943) 2, 560-562 *Succinic Anhydride*
- [64] Kocz R.; Roestamadji J.; Mobashery S. *Journal of Organic Chemistry* (1994) 59, 2913-2914 *A convenient triphosgene-mediated synthesis of symmetric carboxylic acid anhydrides*
- [65] Rinderknecht H.; Ma V. *Helvetica Chimica Acta* (1964) 1, 162-165 *Eine einfache neue Synthese für Säureanhydride*
- [66] Schrecker A.W.; Maury P.B. *Journal of the American Chemical Society* (1954) 5803 *Preparations of Nicotinic and Isonicotinic Anhydride*
- [67] Adams R.; Ulich L.H. *Journal of the American Chemical Society* (1920) 599-611 *The use of oxalyl chloride and bromide for producing acid chlorides, acid bromides and anhydrides (3.)*
- [68] Mestres R.; Palomo C. *Synthesis* (1981) 218-220 *Phosphorus in Organic Chemistry; I. Mild and Convenient Reagents for the Preparation of Symmetrical Carboxylic Acid Anhydrides*
- [69] Honda T.; Namiki H.; Kudoh M.; Watanabe N.; Nagase H.; Mizutani H. *Tetrahedron Letters* (2000) 41, 5927-5930 *A novel intramolecular Diels-Alder approach to securinine alkaloids: a formal synthesis of securinine*
- [70] Honda T.; Namiki H.; Kudoh M.; Nagase H.; Mizutani H. *Heterocycles* (2002) 59, 169-187 *A formal total synthesis of Securinine via an intramolecular [4+2]cycloaddition reaction*
- [71] Holzapfel C.W.; Pettit G.R. *Journal of Organic Chemistry* (1984) 50, 2323-2327 *Synthesis of the Dolastatin Thiazole Amino Acid Component (gln)Thz*
- [72] Weinshenker N.M.; Shen C.-M. *Tetrahedron Letters* (1972) 32, 3281-3284 *Polymeric Reagents I Synthesis of an insoluble Polymeric Carbodiimide*
- [73] Kaminski Z.J.; Kolesinska B.; Malgorzata M. *Synthetic Communications* (2004) 34, 3349-3358 *Mild and efficient synthesis of Carboxylic Acid Anhydrides from Carboxylic Acids and Triazine Coupling Reagents*
- [74] Orshansky, J.; Bograshov, E. *Chemistry & Industry* (1944) 382, *Laboratory method for the preparation of organic acid anhydrides*
- [75] Castro B.; Dormoy J.R. *Bulletin de la Société Chimique de France* (1971) 8, 3034-3036 *Dehydration of carboxylic acids to anhydrides*
- [76] Baghernejad B. *European Journal of Chemistry* (2010) 1, 54-60 *1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) as a useful catalyst in organic synthesis*
- [77] Hu Y.L.; Zhao X.E.; Lu M. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* (2010) 25, 255-262 *Efficient and Convenient Synthesis of Symmetrical Carboxylic Anhydrides from Carboxylic Acids with Sulfated Zirconia by Phase Transfer Catalysis*

- [78] Plusquellec D. *Tetrahedron Letters* (2011) *44*, 2471-2476 *A new synthesis of carboxylic and carbonic acid anhydrides using phase transfer reactions*
- [79] Schmitt B.; Knebel J.; Klesse W.; Wittkowski A.; Laux B. (2002) *Patent: Verfahren zur Herstellung von Anhydriden ungesättigter Carbonsäuren* EP1231201 19.09.2002
- [80] Beutler J.A.; Karbon E.W.; Brubaker A.N.; Malik R.; Curtis D.R.; Enna S.J. *Brain Research* (1985) *330*, 135-140 *Securinine alkaloids: A new class of GABA receptor antagonist*
- [81] Merciadetz M.; Mohammed K.; Maniere F.Y. (1994) *Patent: Stabilized sorbic acid and salt thereof* US 005354902A
- [82] Kitamura T.; Matsumoto A. *Macromolecules* (2007) *40*, 6143-6149 *Facile Synthesis of degradable gels by oxygen cross-linking of polymers including a dienyl group on their side chain or at chain ends*
- [83] Wilmer, K. F.; Zhang, Z.-D. *Tetrahedron Letters* (1986) *27*, 4937-4940 *Phase managed organic synthesis 3. Symmetrical anhydrides from carboxylic acids via polymer assisted reaction*
- [84] Hoye T.R.; Magee A.S.; Trumper W.S. *Synthetic Communications* (1982) *12*, 183-187 *3,5-Hexadienoic Esters: a convenient preparation*
- [85] Kim J.-G.; Jang D.O. *Bulletin of the Korean Chemical Society* (2009) *30*, 27-28 *Synthesis of Symmetrical Carboxylic Acid Anhydrides from Acyl Chlorides in the Presence of In Metal and DMF*
- [86] Fernholz H.; Neu H.; Schmidt H.J.; Nen H. (1964) *Patent: Verfahren zur Herstellung von Sorbinsäurehalogeniden* GB Patent 1077739
- [87] Brewster J.H.; Ciotti C.J. *Journal of the American Chemical Society* (1955) *77*, 6214-6215 *Dehydrations with Aromatic Sulfonyl Halides in Pyridine. A Convenient Method for the Preparation of Esters*
- [88] Cotarca L.; Eckert H. *Phosgenations - A Handbook*; 1 Ed. Wiley-VCH Weinheim (2003)
- [89] Marsili N.R.; Lista A.; Fernandez Band B.S.; Goicoechea H.C.; Olivieri A.C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004) *52*, 2479-2484 *New method for the determination of Benzoic and Sorbic Acids in commercial orange juices based on second order spectrometric data generated by a pH gradient flow injection technique*
- [90] Reger D.L.; Habib M.M. *Journal of Physical Chemistry* (1980) *84*, 82 *Carbon-13 NMR Investigation into the Interaction of Sodium Sorbate and Sorbic Acid with various Micelle Forming Surfactants*
- [91] Kakemoto M. *Journal of Chromatography* (1992) *594*, 253-257 *Simultaneous determination of sorbic acid, dehydroacetic acid and benzoic acid by gas chromatography-mass-spectrometry*
- [92] Williams M.L. *Food Chemistry* (1986) *22*, 235-244 *Rapid Separation of Soft Drinks Ingredients using High Performance Liquid Chromatography*

- [93] Amati A.; Castellari M.; Ensini I.; Spinabelli U.; Arfelli A. *Chromatographia* (1997) 44, 645-648 *Determination of Sorbic Acid in wines with a hydrogen sulfonated divinyl benzene-styrene copolymer HPLC column*
- [94] Aitzemüller K.; Arzberger E. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1984) 178, 279-283 *Analyse von Konservierungsstoffen in fetthaltigen Lebensmitteln mittels HPLC*
- [95] Hannisdal A. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1992) 194, 517-519 *Analysis of acesulfame-K, saccharin and preservatives in beverages and jams by HPLC*
- [96] Stahl E.; Laub E. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1973) 152, 280-286 *Liquid-Chromatographie von Weinen und Fruchtsäften*
- [97] Saad B.; Bari M.F.; Saleh M.I.; Ahmad K.; Talib M.K.M. *Journal of Chromatography A* (2005) 1073, 393-397 *Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography*
- [98] Stafford A.E.; Black D.R. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1978) 26, 1442-1444 *Analysis of Sorbic Acid in dried prunes by gas chromatography*
- [99] Dong C.; Mei Y.; Chen L. *Journal of Chromatography A* (2006) 1117, 109-114 *Simultaneous determination of Sorbic and Benzoic Acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography*
- [100] Renner T.; Baer-Koetzle M.; Scherer G. *Journal of Chromatography A* (1999) 847, 127-133 *Determination of Sorbic Acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry*
- [101] The Nordic Committee on Food Analysis in: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1984) 179, 455-457 *Benzoic Acid and Sorbic Acid in Foods Quantitative Determination by Gas Chromatography*
- [102] Lopes I.C.; Santos P.V.F.; Diculescu V.C.; de Arajo M.C.U.; Oliveira-Brett A.M. *Analytical Letters* (2012) 45, 408-417 *Sorbic Acid and Its Degradation Products: Electrochemical Characterization*
- [103] Eidgenössisches Departement des Inneren. (2012) *Verordnung des Eidgenössischen Departement des Inneren über die Kennzeichnung und Anpreisung von Lebensmitteln*
- [104] Grimm W.; Thomae K. *Richtlinie: Haltbarkeit und Haltbarkeitsprüfungen von Arzneimitteln*; 130 APV Richtlinie(1985)
- [105] Vidyasagar K.; Arya S.S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1983) 31, 1262-1264 *Stability of Sorbic Acid in Orange Squash*
- [106] Hildegard M.; Sabalitschka T. *Chemical Abstracts* (1965) 91, 720 *Instability of Sorbic acid IV, Stabilization with Propyl Gallate*
- [107] Müller G. *Mikrobiologie pflanzlicher Lebensmittel - Eine Einführung*; VEB Fachbuchverlag Leipzig (1988)

- [108] Azukas J.J.; Costilow R.N.; Sadoff H.L. *Journal of Bacteriology* (1961) 81, 189-194
Inhibition of Alcoholic Fermentation by Sorbic Acid
- [109] Azukas J.J. *Sorbic Acid Inhibition of Enolase from Yeast and Lactic Acid Bacteria* Dissertation Michigan State University 1962
- [110] Rehm H.-J. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1961) 115, 293-309
Grenzhemmkonzentrationen der zugelassenen Konservierungsmittel gegen Mikroorganismen
- [111] Lukas E.-M. *Untersuchungen über die Einwirkung subletaler Sorbinsäuremengen auf Aspergillus niger van Tieghem* Dissertation Technische Hochschule München 1962
- [112] Lukas E.-M. *Zentralblatt für Bakteriologie* (1964) 117, 245-509 *Zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der Sorbinsäure II. Mitteilung: : Die Wirkung von Sorbinsäure auf Aspergillus niger von Tieghem und andere Schimmelpilze*
- [113] Lück H.; Rickerl E. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1959) 109, 322
Untersuchungen an Escherichia coli über eine Resistenzsteigerung gegen Konservierungsmittel und Antibiotica
- [114] Wallhäußer K.H.; Lück E. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1978) 167, 156-157
Zur Wirkung von Sorbinsäure gegen Mykotoxinbildner
- [115] Mollapour M.; Phelan J.P.; Millson S.H.; Piper P.W.; Cooke F.T. *Biochemical Journal* (2006) 395, 73-80
Weak acid and alkali stress regulate phosphatidylinositol bisphosphate synthesis in Saccharomyces cerevisiae
- [116] Reinhard L.; Radler F. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1981) 172, 382-388
Die Wirkung von Sorbinsäure auf Saccharomyces cerevisiae
- [117] Holyoak C.D.; Stratford M.; McMullin Z.; Cole M.B.; Crimmins K.; Brown A.J.P.; Coote P.J. *Applied and Environmental Microbiology* (1996) 62, 3158-3164
Activity of the Plasma Membrane H⁺-ATPase and Optimal Glycolytic Flux are Required for Rapid Adaptation and Growth of Saccharomyces cerevisiae in the Presence of the Weak-Acid Preservative Sorbic Acid
- [118] Fingerhut; Schmidt; Lang *Biochemische Zeitschrift* (1962) 336, 118
Über den Stoffwechsel der 1-14C-Sorbinsäure
- [119] Wedzicha B.L.; Brook M.A. *Food Chemistry* (1989) 31, 29-40
Reaction of Sorbic Acid with Nucleophiles: Preliminary Studies
- [120] Wedzicha B.L.; Zeb A. *International Journal of Food Science and Technology* (1990) 25, 168-179
Catalysis of the reaction between sorbic acid and thiols by surfactants
- [121] Thakur B.R.; Arya S.S. *International Journal of Food Science and Technology* (1991) 26, 157-164
Role of sorbic acid in nonenzymic browning reactions in liquid and solid model food systems
- [122] Tromp A.; Al Shaye N. *South African Journal for Enology and Viticulture* (1981) 2, 1-5
Sorbic Acid as a Wine Preservative - It's Efficiency and Organoleptic threshold

- [123] Derndorfer E. *Lebensmittelsensorik*; 3 Facultas Verlags- und Buchhandels AG Wien (2010)
- [124] DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (2009) *Sensorische Analyse -Vokabular, DIN EN ISO 5492:2009*
- [125] DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (1998) *Determination of sensitivity of taste by sensory analysis, DIN EN ISO 10959:1998*
- [126] DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (2008) *Sensory Analysis- General guidance for the selection, training and monitoring of assessors, Part 2: Expert sensory assessors, DIN EN ISO 8589-2:2008*
- [127] Postel W.; Drawert F. European Food Research and Technology (1970) *144*, 245-252
Über den Geschmacksschwellenwert der Sorbinsäure bei deutschen Weißweinen
- [128] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. (1999) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB *Untersuchung von Lebensmitteln- Sensorische Prüfverfahren-Rangordnungsprüfung*
- [129] DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (2010) *Sensory Analysis- Methodology- Ranking, DIN EN ISO 8587:2006*
- [130] Bruchhausen F.v. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band 9: Stoffe P-Z*; 5. Birkhäuser, Springer(1991)
- [131] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. (2006) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB *Untersuchung von Lebensmitteln- Sensorische Prüfverfahren- Dreiecksprüfung*
- [132] DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (2007) *Sensory Analysis - Methodology - Triangle test, DIN EN ISO 4120:2004*
- [133] de Rosa T.; Margheri G.; Moret I.; Scarponi G.; Versini G. American Journal of Enology and Viticulture (1983) *34*, 98-102 *Sorbic acid as a preservative in sparkling wine. It's efficiency and adverse flavor effect associated with Ethyl sorbate formation*
- [134] Chisholm M.G.; Samuels J.M. Journal of Agricultural and Food Chemistry (1992) *40*, 630-633 *Determination of the impact of the metabolites of Sorbic acid on the odor of a spoiled red wine*
- [135] Rigg M.W.; Rosenthal R. Journal of the American Chemical Society (1949) *71*, 2865-2868 *Ethyl Sorbate in the Diene Synthesis*
- [136] Voltz S.E.; Rigg M.W. Journal of Physical Chemistry (1954) *58*, 537-541 *A dielectric study of the autoxidation of ethyl sorbate*
- [137] DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (2003) *Sensory Analysis 'A' or 'not A' test, DIN 10972:2003*
- [138] Hühn; Sponholz; Pulver Mitteilungen für Wissenschaft und Technik (1999) *CDR-3*, 42-88 *Mikroorganismen bei der Weinbereitung*