

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037900**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.06.03**

(21) Номер заявки  
**201890901**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.11.17**

(51) Int. Cl. *A23L 3/005* (2006.01)  
*A23C 3/033* (2006.01)  
*A23L 2/48* (2006.01)  
*A23B 5/01* (2006.01)  
*C02F 1/48* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ЖИДКИХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБРАБОТКИ ИМПУЛЬСНЫМ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ**

---

(31) **62/256,497; 16177902.0**

(32) **2015.11.17; 2016.07.05**

(33) **US; EP**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/NL2016/050799**

(87) **WO 2017/086784 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**СТИЧТИНГ ВАГЕНИНГЕН РИСЕРЧ  
(NL)**

(72) Изобретатель:  
**Тиммерманс Риан Адриана Хендрика  
(NL), Де Морайш Рикарду Эрмириу  
(BR), Маствейк Хендрикус Корнелис  
(NL)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) DATABASE WPI Week 201561 Thomson Scientific, London, GB; AN 2015-51639A XP002764707, & JP 2015 159734 A (FRONTIER ENG KK) 7 September 2015 (2015-09-07) abstract  
DATABASE WPI Week 200771 Thomson Scientific, London, GB; AN 2007-757379 XP002764708, & JP 2007 229319 A (NAT AGRIC & FOOD RES ORG) 13 September 2007 (2007-09-13) abstract

US-A-4695472

US-A-5741539

EP-A1-2543254

WO-A1-2013141703

WO-A1-2014079149

---

(57) Настоящее изобретение относится к способу быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева. Согласно изобретению эффективной и успешной инактивации микробов достигают при приложении электрического поля напряженностью меньше чем 5,0 кВ/см в течение длительного периода времени, то есть путем выбора относительно низкой напряженности электрического поля и относительно продолжительной длительности импульса. Способ по изобретению эффективен при нейтральном pH и при pH ниже 7. Дополнительно, способ по изобретению эффективен для инактивации широкого спектра соответствующих микроорганизмов. Дополнительно, настоящее изобретение относится к указанному способу, в котором жидкий продукт предварительно нагревают перед обработкой способом по изобретению. Настоящее изобретение также относится к жидкому продукту, получаемому способом по изобретению.

---

**B1**

**037900**

**037900**

**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к способу быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева. Дополнительно, настоящее изобретение относится к указанному способу, в котором жидкий продукт предварительно нагревают перед обработкой способом по изобретению.

### Уровень техники

Импульсные электрические поля (ИЭП) используют в качестве метода индукции электропорации клеточной мембраны путем подачи кратковременных импульсов с помощью внешнего электрического поля высокой интенсивности. Наиболее широко принятая теория для указанного явления заключается в том, что путем приложения внешнего электрического поля к биологической мембране индуцируют локальные неустойчивости в липидном бислое, что в конечном итоге приводит к образованию пор. Образование пор (электропорация) усиливает проницаемость мембраны (электропроницаемость), которая, в зависимости от интенсивности приложенного электрического поля, является либо обратимым процессом, либо, когда применяется при высоких напряжениях, является необратимой, что приводит к гибели клеток.

В системе обработки ИЭП в непрерывном потоке необходимо учитывать различные критические времена (Mastwijk et al., 2007), включая длительность импульса, время между двумя импульсами (время паузы), время пребывания элементарного объема жидкости в области высокого электрического поля и время прохождения, время, чтобы покинуть область высокого электрического поля перед входом в секцию охлаждения. Суммарное время (эффективной) обработки определяется как произведение количества импульсов на время импульса, получаемого элементарным объемом жидкости в условиях высокого электрического поля при прокачке через устройство обработки. В настоящее время суммарное время обработки и напряженность электрического поля известны как критические факторы, определяющие эффективность необратимой электропорации (Saulis and Wouters, 2007). Необратимая электропорация эффективна для вегетативного микроорганизма при напряженностях поля в диапазоне 10-20 кВ/см при применении импульсов длительностью 2 мкс в течение суммарного времени обработки 100-400 мкс (фиг. 1). Рейнард и его коллеги (1998 г.) исследовали критический эффект длительности одиночного импульса для переноса генов. Они обнаружили, что минимальное время импульса, необходимое для ориентации, составляет ~1 мс, а измеренные критические времена отклика для проницаемости составляют от 3 до 5 мс при применении импульсов длительностью 24 мс при напряженности электрического поля 1-2,7 кВ/см.

В отличие от импульсов постоянного тока (DC) импульсы переменного тока (AC) используются для создания условий электрического поля высокой напряженности в жидкости. Несмотря на то что переменные токи с фиксированной частотой ( $f$ ) можно рассматривать как импульсы с длительностью  $1/f$ , характерная форма импульса, рассматриваемая здесь, является прямоугольной, это означает, что частота повторения импульсов меньше ширины полосы ( $1/\text{длительность импульса}$ ). Импульсы переменного тока с частотами больше 1 МГц (или длительностями импульсов менее 1 мкс) были рассмотрены в патенте США № 2010/0297313.

Выбор конкретных условий обработки связан с различными применениями и целью электропорации. Обратимая электропорация представляет собой процедуру, регулярно используемую в молекулярной биологии и клинической биотехнологии для введения в клетку малых или больших молекул, т.е. препаратов, олигонуклеотидов, антител и плазмид в цитоплазму, направленных на поддержание жизнедеятельности клеток. Необратимая электропорация может быть применена для извлечения молекул из клетки или для инактивации клеток. В настоящем изобретении мы ставим своей целью необратимую электропорацию как метод нетеплового консервирования, где максимальная температура, получаемая при обработке ИЭП, и время выдержки меньше, чем при обычной тепловой пастеризации. Это приводит, например, помимо других полезных аспектов, к лучшему сохранению свежего вкуса и питательных свойств продукта.

Условия обработки, выбранные для импульсной электрообработки с целью инактивации микробов, зависят от нескольких факторов и могут быть разделены на три группы: параметры обработки, характеристики микроорганизмов и характеристики среды обработки.

В дополнение к напряженности электрического поля и времени обработки температура считается критичной для эффективности инактивации микробов с помощью ИЭП (Raso et al., 2014). Увеличение напряженности электрического поля и времени обработки будет приводить к увеличению летальности ИЭП. В результате указанных условий на единицу массы будет подаваться больше энергии, что приведет к большему нагреву продукта. Типичные условия процесса, используемые для необратимой электропорации, находятся в диапазоне коротких микросекундных импульсов при высоком напряжении (5-80 кВ/см).

Степень инактивации микробов с помощью ИЭП увеличивают за счет увеличения температуры среды, например жидкого пищевого продукта, до обработки ИЭП, даже в диапазоне температур, которые не являются летальными для микроорганизмов. Безотносительно к теории, указанный эффект предварительного нагревания влияет на структуру фосфолипидного бислоя клеточной мембраны, делая клетки более уязвимыми для обработки ИЭП (Wouters et al., 1999).

Характеристики микроорганизмов оказывают влияние на эффективность инактивации микробов ИЭП. В целом, сообщалось, что относительно крупные микроорганизмы более чувствительны к ИЭП, чем более мелкие микроорганизмы, а грамотрицательные микроорганизмы более чувствительны к ИЭП, чем грамположительные микроорганизмы.

Эффективность обработки ИЭП часто изучают в жидких средах, суспендированных с микроорганизмами. Были изучены характеристики указанных сред обработки, и сообщалось, что рН имеет важное значение для эффективности обработки. А именно обработка ИЭП была намного эффективнее в средах с низким рН, чем в средах с нейтральным рН.

Промышленное применение необратимой обработки ИЭП ставит своей целью инактивацию микроорганизмов в непрерывном потоке при однократном прохождении через устройство для обработки. Циркуляционные контуры, обеспечивающие более чем один проход через устройство для обработки путем смешивания обработанного продукта с необработанным продуктом, как описано в патенте США № 2012/0103831, исключают из-за сложности процесса.

Как упоминалось ранее, подача внешних импульсов на продукт вводит энергию в продукт, что приводит к повышению температуры продукта. Указанное повышение температуры зависит от выбранных условий обработки и характеристик продукта (Heinz et al., 2002). Чтобы избежать чрезмерного нагрева продукта, в некоторых случаях между двумя камерами обработки помещали секции охлаждения (Sharma et al., 2014); однако в этом подходе необходимо больше электрической энергии и энергии для охлаждения. Другой описанной возможностью предотвращения слишком большого нагрева является введение пауз после подачи импульсов или после серии импульсов (El Zakhem et al., 2006); однако это невозможно в промышленных условиях, так как суммарное время обработки возрастает до 5200-7800 с в указанном исследовании (El Zakhem et al., 2007), в то время как типичные времена для внутривиточной тепловой пастеризации находятся в диапазоне от секунд до минут. Паузы между импульсами или между сериями импульсов длительностью по меньшей мере 1 мин также применяют в серийном производстве, описанном в СА 2758678.

Условия обработки, применяемые в промышленности, таковы, что ИЭП проводят с напряженностью электрического поля от 10 до 30 кВ/см, поскольку применение более высоких напряжений электрического поля имеет технические ограничения и может вызвать диэлектрический пробой пищевого материала.

Применяемые условия обработки подходят для жидких пищевых продуктов с низким рН, т.е. для высококислотных фруктовых соков с рН ниже примерно 4,6. Указанные условия обработки, по-видимому, в некоторых применениях являются подходящими для инактивации микроорганизмов более крупного размера в жидких пищевых продуктах. Также грамотрицательные микроорганизмы могут быть инактивированы более эффективно, чем грамположительные микроорганизмы. Особенно инактивация грамположительных бактерий мелкого размера является в большинстве случаев затруднительной в известном в настоящее время условиях обработки ИЭП. Дополнительно применяемые в настоящее время условия обработки с низким уровнем рН не применимы эффективным образом для пищевых продуктов, имеющих рН выше чем примерно 4,6.

Существующие в настоящее время обработки ИЭП для жидких пищевых продуктов включают в себя напряженности электрического поля, которые относительно высоки, то есть 5 кВ/см и выше, обычно 10-30 кВ/см. Указанные относительно высокие напряженности электрического поля обычно препятствуют увеличению масштабов обработки ИЭП до больших объемов по требованиям пиковой мощности и ограничениям в длительности однократного импульса максимальной энергией накопленного импульса. Указанные технологические рамки ограничивают максимальную пропускную способность одной линии для консервирования фруктовых соков с низкой проводимостью до 5000 л/ч.

Таким образом, существует потребность в условиях обработки ИЭП, которые эффективны для инактивации грамположительных бактерий и/или микробов с относительно мелкими размерами, предпочтительно без потери эффективности в отношении инактивации грамотрицательных бактерий и/или инактивации микробов, имеющих относительно крупные размеры; и/или инактивируют микроорганизмы и/или споры в жидких пищевых продуктах, имеющих рН выше примерно 4,6 и рН ниже 4,6; и/или экономически более выгодны, чем существующие способы инактивации; и/или применимы и имеют возможность увеличения масштабов до больших объемов пропускной способности с применением одной линии, чем условия, применяемые в существующей области техники.

#### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к способу быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева для получения нагретого жидкого продукта, включающему:

- а) обеспечение жидкого продукта;
- б) обеспечение устройства для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева;
- с) непрерывную подачу жидкого продукта на вход устройства и прохождение жидкого продукта

через устройство;

d) непрерывное генерирование электрического тока через текущий жидкий продукт в устройстве, причем минимально одиночный импульс подают на каждый элементарный объем жидкости во время прохождения с длительностью импульса по меньшей мере 10 мкс, где напряженность электрического поля составляет от 0,1 до 5 кВ/см и где максимальная температура жидкого продукта автономно остается ниже 92°C во время резистивного нагрева.

Часть изобретения состоит в том, что критическим фактором является длительность одиночного импульса, а не суммарное время эффективной обработки. При длительности импульса 2 мкс ( $\tau$ ) и напряженности электрического поля (E) 10 кВ/см авторы изобретения обнаружили, что инактивация была неэффективной, несмотря на то что суммарное время эффективной обработки, рассчитанное как  $E^2 \cdot \tau$ , было в 4 раза больше, чем при 20 кВ/см, где используется обычная обработка ИЭП. Было обнаружено, что при условиях 0,1-5 кВ/см инактивация эффективна только для длительностей импульсов больше 10 мкс, например от 100 до 1000 мкс.

Способ по изобретению применим к жидким пищевым продуктам и жидким кормовым продуктам, а условия обработки ИЭП по изобретению одинаково эффективны для инактивации грамотрицательных бактерий и грамположительных бактерий. Условия обработки ИЭП применимы к жидким пищевым продуктам и жидким кормовым продуктам, причем эти условия эффективны как для инактивации относительно крупных микробов, так и для инактивации относительно мелких микробов. Кроме того, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что условия обработки ИЭП по настоящему изобретению применимы в существующих в настоящее время условиях относительно низкого pH, а также применимы в условиях более высокого pH. Наконец, авторы изобретения обнаружили, что условия обработки применимы для более высоких объемов переработки жидких пищевых продуктов или жидких кормовых продуктов, чем объемы переработки, которые ранее были возможны при быстром и равномерном нагревании жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева, известным в области техники.

Второй аспект настоящего изобретения относится к жидкому продукту, получаемому способом по изобретению.

#### Описание графических материалов

Фиг. 1А и 1В - уменьшение количества жизнеспособных микроорганизмов *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella Senftenberg*, *Saccharomyces cerevisiae* в апельсиновом соке при pH 3,8 после различных условий обработки ИЭП. Панели слева представляют условия ИЭП, применяемые в настоящее время, а панели справа показывают условия обработки ИЭП по изобретению.

Ссылка на различные условия обработки ИЭП, относящиеся к каждой панели, сделана ниже панелей на фиг. 1В. Закрашенные черные треугольники: 10 кВ/см, 2 мкс; закрашенные серые ромбы: 15 кВ/см, 2 мкс; незакрашенные белые кружки: 20 кВ/см, 2 мкс; закрашенные серые кружки: 0,9 кВ/см, 1000 мкс; закрашенные черные ромбы: 2,7 кВ/см, 1000 мкс; незакрашенные белые ромбы: 2,7 кВ/см, 100 мкс; пунктирная линия: предел обнаружения.

Фиг. 2 - профиль температуропроводности апельсинового сока (pH 3,8), кокосовой воды (pH 5,0) и арбузного сока (pH 6,0).

Фиг. 3 - уменьшение количества жизнеспособных микроорганизмов *E. coli* и *L. monocytogenes* в апельсиновом соке, кокосовой воде и арбузном соке после обработки ИЭП при 2,7 кВ/см, 1000 мкс.

Фиг. 4 - микробиологический анализ (n=6) необработанного и обработанного ИЭП апельсинового сока, где некоторые анализы были качественными (фиг. 4В), а другие количественными (фиг. 4А).

Фиг. 5 - органолептическая оценка образцов апельсинового сока, хранившихся при 7°C и при температуре окружающей среды в течение указанного периода времени, где образцы были обозначены как "хорошие", если они были сопоставимы с свежавыжатым апельсиновым соком, и "нехорошие", если они не были сопоставимы со свежавыжатым апельсиновым соком.

Фиг. 6 - количество растворимых твердых веществ (градусы Брикса) в апельсиновом соке до обработки ИЭП и после обработки ИЭП в течение 3 месяцев хранения при 7°C и при температуре окружающей среды.

Фиг. 7 - кислотность апельсинового сока до обработки ИЭП и после обработки ИЭП в течение 3 месяцев хранения при 7°C и при температуре окружающей среды.

Фиг. 8 - pH апельсинового сока до обработки ИЭП и после обработки ИЭП в течение 3 месяцев хранения при 7°C и при температуре окружающей среды.

Фиг. 9 - содержание масел в апельсиновом соке до обработки ИЭП и после обработки ИЭП в течение 3 месяцев хранения при 7°C и при температуре окружающей среды.

Фиг. 10 - содержание витамина С в апельсиновом соке до обработки ИЭП и после обработки ИЭП в течение 3 месяцев хранения при 7°C и при температуре окружающей среды.

Фиг. 11 - активность пектинэстеразы до обработки ИЭП и после обработки ИЭП в течение 3 месяцев хранения при 7°C и при температуре окружающей среды.

### Подробное описание изобретения

Авторы изобретения в данной работе обнаружили, что условия обработки ИЭП применимы к жидким пищевым продуктам и жидким кормовым продуктам, причем эти условия одинаково эффективны для инактивации грамотрицательных бактерий, а также грамположительных бактерий. Авторы изобретения также обнаружили, что условия обработки ИЭП применимы к жидким пищевым продуктам и жидким кормовым продуктам, причем эти условия эффективны как для инактивации относительно крупных микробов, так и для инактивации относительно мелких микробов. Кроме того, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что условия обработки ИЭП по настоящему изобретению применимы в условиях относительно низкого pH, а также применимы в условиях более высокого pH. Наконец, авторы изобретения обнаружили, что условия обработки ИЭП применимы к большим объемам обработки жидких пищевых продуктов и жидких кормовых продуктов, чем объемы, которые были ранее возможны с имеющимися в настоящее время условиями обработки.

При этом, авторы изобретения предлагают способ, который устраняет многие недостатки, связанные с известными в настоящее время способами нагревания жидкого продукта для получения жидкого продукта с уменьшенной микробной нагрузкой.

Настоящее изобретение относится к способу быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева для получения нагретого жидкого продукта, включающему:

- a) обеспечение жидкого продукта;
- b) обеспечение устройства для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева;
- c) непрерывную подачу жидкого продукта на вход устройства и прохождение жидкого продукта через устройство;
- d) непрерывное генерирование электрического тока через текущий жидкий продукт в устройстве, причем минимальный одиночный импульс подают на каждый элементарный объем жидкости во время прохождения с длительностью импульса по меньшей мере 10 мкс, где напряженность электрического поля составляет от 0,1 до 5 кВ/см; и где максимальная температура жидкого продукта автономно остается ниже 92°C во время резистивного нагрева.

Согласно настоящему изобретению способ быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до температуры нагрева путем резистивного нагрева обеспечивает нагретый жидкий продукт с уменьшенной микробной нагрузкой.

Нагревание жидкого продукта до температуры выше определенной максимальной температуры, например заданной максимальной температуры, может вызвать нежелательное уменьшение свежих вкусов, витаминов и питательных веществ и денатурацию белков, присутствующих в свежем (необработанном) продукте. Степень уменьшения и денатурации компонентов связана с температурой и временем воздействия обработки на продукт. Различные жидкие продукты подвергаются различным температурно-временным комбинациям для получения желаемой степени ферментативной и микробной инактивации. Таким образом, альтернативные нетермические процессы со сниженной температурой и/или временем воздействия на продукт привлекают большой интерес, так как они могут лучше сохранять свежие характеристики продукта. Когда можно уменьшить температуру или время воздействия, можно ожидать лучшего качества продукта. В способе по изобретению время воздействия тепла резко уменьшается, и из-за выбранных условий обработки максимальная температура жидкого продукта автономно остается ниже примерно 92°C во время резистивного нагрева. Предпочтительно максимальная температура жидкого продукта автономно остается ниже критической температуры во время резистивного нагрева согласно способу по изобретению, при этой температуре жидкий продукт не страдает от уменьшения теплочувствительных компонентов или денатурации белков, если они присутствуют в продукте, в то время как микробная нагрузка в жидком продукте снижается до приемлемого уровня.

В настоящей работе благодаря способу по настоящему изобретению условия обработки становятся применимыми, они предотвращают перегрев жидкого продукта, при этом все еще успешно и эффективно снижают микробную нагрузку жидкого продукта.

В способе по изобретению критическим фактором является длительность одиночного импульса, а не суммарное время эффективной обработки. При применении импульсов длительностью 2 мкс и напряженности электрического поля 10 кВ/см было установлено, что инактивация микробов неэффективна, несмотря на то что суммарное время эффективной обработки было в четыре раза больше, чем при 20 кВ/см, соответствующей напряженности электрического поля, при которой проводят обычную обработку ИЭП. Не будучи связанными теорией, объяснение заключается в том, что при уменьшении напряженности электрического поля до 10 кВ/см эффект электропорации снижен.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что в условиях низкой напряженности электрического поля 0,1-5 кВ/см, комбинированной с продолжительными длительностями импульсов 100 и 1000 мкс, инактивация микробов была эффективной для достижения инактивации при температурно-временных комбинациях, менее интенсивных, чем требуется при обычной тепловой пастеризации или обработке ИЭП при 10 кВ/см. Безотносительно к теории, эти данные указывают на то, что длительность

импульса стала критическим фактором в способе по изобретению.

Безотносительно к теории, внешнее электрическое поле, приложенное к продукту, оказывает влияние на белковые каналы в клеточной мембране и/или липидный домен клеточной мембраны микроорганизма, присутствующего в продукте, приводя к конформационным изменениям в каналах и/или в домене. Мембранные белковые каналы открываются при мембранном потенциале 50 мВ, что значительно ниже чем 150-400 мВ, необходимые для образования пор в липидном бислое (Tsong, 1992).

Поскольку открытие и закрытие многих белковых каналов зависит от трансмембранных потенциалов, предполагают, что при применении электрической обработки будут открыты потенциалзависимые белковые каналы. Как только эти каналы будут открыты, они будут проводить более высокий ток, чем ток, для которого предназначены эти каналы. В результате эти каналы могут стать необратимо денатурированными джоулевым нагревом и/или электрической модификацией их функциональных групп (Tsong, 1992). Открытие/закрытие белкового канала происходит в субмикросекундном временном диапазоне, тогда как денатурация белка занимает от миллисекунды до нескольких секунд (Tsong, 1992).

Это говорит о том, что белковые каналы могут быть изменены при напряженности электрического поля в 3-8 раз меньше напряженности электрического поля, при которой изменяются липидные бислои, а именно при напряженности электрического поля от 2,5 до 7 кВ/см для инактивации белкового канала, по сравнению с требуемой 20 кВ/см для необратимого повреждения путем электропорации липидного бислоя (т.е. традиционные условия ИЭП). Согласно изобретению напряженность электрического поля от 0,1 до 5 кВ/см в комбинации с длительностью импульса 10-1000 мкс является достаточной и эффективной для достижения эффективной инактивации микробов в жидком продукте. Например, способ по изобретению применим для жидкого продукта в устройстве ИЭП 1 л/ч ("система ИЭП"). Для указанного примерного жидкого продукта длительность импульса была установлена равной 100 мкс или 1000 мкс, а выбранная напряженность электрического поля или "напряженность электрического поля" составляла 0,9 или 2,7 кВ/см. Количество импульсов, подаваемых на жидкий продукт, варьировалось от 0 до 35, промежутки времени между двумя последовательными импульсами варьировались от 0,6 до 199 мс, в результате полученные максимальные температуры варьировались от 36 до 92°C. Смотри более подробное описание примеров, демонстрирующих эффективность способа по изобретению, пример 1 ниже.

Авторы изобретения обнаружили, что инактивация микробов особенно эффективна для вегетативных клеток. С большой степенью вероятности, на основе этого эффекта способа по изобретению, способ по изобретению обеспечивает эффективный механизм инактивации спор. Споры содержат незаменимые белки для прорастания во внутренней мембране и кортексе споры, которые являются мишенями для внешних электрических раздражителей.

В качестве еще одного примера применения способа по изобретению, например, партию жидкого продукта обрабатывают в способе по изобретению, применяя устройство ИЭП 1200 л/ч для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева. Длительность импульса составляет 1000 мкс, а напряженность электрического поля составляет 2,0 кВ/см. Количество импульсов, подаваемых на жидкий продукт, составляет примерно 5 импульсов, а временной интервал между двумя последовательными импульсами составляет 3,8 мс. Смотри также пример 3 ниже для подробного варианта реализации изобретения.

Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, где рН жидкого продукта составляет от 1,5 до 9,0, предпочтительно выше 4,6, предпочтительно от 4,8 до 9,0, более предпочтительно от 5,5 до 8,0, более предпочтительно от 6,0 до 7,5. Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, где рН составляет примерно 5,0, предпочтительно примерно 6,0.

Кроме того, в одном варианте реализации изобретение относится к способу по изобретению, где рН жидкого продукта ниже 4,6, предпочтительно от 1,5 до 4,6, более предпочтительно от примерно 1,5 до примерно 3,8.

В следующем варианте реализации настоящего изобретения рН жидкого продукта составляет более 4,6, предпочтительно от 4,6 до 9,0. Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором рН жидкого продукта составляет от 5,0 до 9,0, предпочтительно от 6,0 до 9,0.

В настоящей работе из-за применимости способа по изобретению жидкие продукты, имеющие широкий диапазон рН, обрабатывают в одном и том же способе по изобретению. Поскольку способ по изобретению применим для обработки жидких продуктов с таким широким варьированием рН, разнообразие жидких продуктов, для которых требуется обработка ИЭП и которые могут быть выбраны для обработки в способе по изобретению, очень велико. Практически любой жидкий продукт, ингредиент или полуфабрикат, применяемый, например, в пищевой промышленности, в настоящей работе подходит для быстрого и равномерного нагревания способом по изобретению. Благодаря неожиданному обнаружению авторов изобретения, что их обработка ИЭП успешна и эффективна в таком широком диапазоне рН, обработка пищевых продуктов с помощью способа, включающего ИЭП по изобретению, теперь стала более доступной, чем раньше.

Кроме того, одним из вариантов реализации изобретения является жидкий продукт по изобретению, имеющий электрическую проводимость от 0,01 до 10 См/м, измеренную при 20°C, более предпочтительно от 0,1 до 3 См/м, измеренную при 20°C, наиболее предпочтительно от 0,2 до 0,8 См/м, измеренную при 20°C.

Электрическая проводимость в указанных границах обычно предпочтительна, поскольку такая электрическая проводимость способствует быстрому и равномерному нагреванию жидкого продукта согласно способу по изобретению. Так как большинство жидких пищевых продуктов имеют электрическую проводимость в границах, подходящих для применения способа по изобретению к указанным жидким пищевым продуктам, способ по изобретению применим для обработки многочисленных жидких пищевых продуктов, для которых необходимо уменьшение микробной нагрузки. Например, электрическая проводимость при 20°C была измерена для нескольких партий жидких пищевых продуктов и составляла, например, 0,1 См/м для клюквенного сока, 0,15 См/м для пива, 0,2 См/м для яблочного сока, 0,4 См/м для шоколадного молока, 0,45 См/м для цельного молока, 0,4 См/м для соевого молока, 0,25 См/м для миндального молока, 1,0 См/м для морковного сока и 1,8 См/м для томатного соуса. Таким образом, способ по изобретению применим для широкого спектра сильно различающихся жидких пищевых продуктов.

Безотносительно к теории, представляется, что условия обработки ИЭП по настоящему изобретению открывают путь к новому механизму инактивации микробов.

Авторы изобретения в ходе настоящей работы обнаружили, что жидкие пищевые продукты эффективно пастеризуются, то есть микробы успешно и эффективно инактивируются при применении условий обработки ИЭП по изобретению, включающих неожиданно низкую напряженность электрического поля 0,1-5 кВ/см, предпочтительно 4 кВ/см или ниже, более предпочтительно 3 кВ/см или ниже, в комбинации с длительностью импульса 10-1000 мкс, предпочтительно примерно 1000 мкс, более предпочтительно примерно 100 мкс, при максимальной температуре жидкого пищевого продукта в диапазоне от 40 до 92°C, предпочтительно от 50 до 92°C, более предпочтительно примерно от 60 до 85°C.

Согласно изобретению пастеризация при применении способа по изобретению особенно эффективна и успешна, когда количество импульсов, подаваемых в непрерывно текущий жидкий продукт, составляет по меньшей мере 1, предпочтительно от 1 до 100, более предпочтительно от 5 до 50, на каждый элементарный объем жидкости во время прохождения в зоне обработки.

Количество импульсов задается уравнением 1

$$n = \frac{V \cdot f}{\phi} \quad (\text{уравнение 1}),$$

где n - число импульсов, V - объем камеры обработки (L), f - частота импульсов (Гц), а  $\phi$  - скорость потока (л/ч).

Количество импульсов не является критической мерой при разработке способа при условии, что, по меньшей мере, одиночный импульс подан на каждый элементарный объем жидкости, протекающей через камеру обработки устройства для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта, по изобретению. Чтобы гарантировать, что по крайней мере один импульс подан на каждый элементарный объем жидкости, система должна быть спроектирована таким образом, чтобы время пребывания в камере обработки было больше 1/f. Количество поданных импульсов будет зависеть от разработки способа на основе требуемой пропускной способности жидкого продукта ( $\phi$ , л/ч), проводимости жидкого продукта ( $\sigma$ , См/м), удельной теплоемкости продукта ( $c_p$ , кДж/кг·К), плотности продукта ( $\rho$ , кг/м<sup>3</sup>), приложенной напряженности электрического поля (E, В/м), длительности импульса ( $\tau_{\text{импульса}}$ , с) и градиента температуры ( $\Delta T$ , °C), полученного с помощью способа (разница между температурой на входе жидкого продукта и температурой на выходе). Связь между этими параметрами приведена в уравнении 2.

$$\Delta T(\rho \cdot c_p) = \sigma \cdot E^2 \cdot n \cdot \tau_{\text{импульса}} \quad (\text{уравнение 2})$$

Как упоминалось ранее и как дополнительно показано в примере 1 ниже, длительность импульса имеет решающее значение для эффективности обработки ИЭП согласно способу по изобретению. Таким образом, применение одного относительно длинного импульса может быть более эффективным, чем применение более коротких импульсов с аналогичным суммарным временем эффективной обработки.

Например, для жидкого продукта, обработанного в устройстве ИЭП 1 л/ч с непрерывным потоком, со скоростью 1 л/ч, согласно способу по изобретению обычно длительность импульса составляет примерно 100-1000 мкс, а напряженность электрического поля составляет примерно 2,7 кВ/см.

Как правило, количество импульсов составляет примерно 1-25, а временные интервалы между двумя последовательными импульсами составляют примерно 0,6-39 мс, в зависимости от требуемого повышения температуры по всем камерам обработки, определяемого разницей между температурой на входе и максимальной температурой.

Например, для партии жидкого продукта, обработанной в устройстве ИЭП 1200 л/ч согласно способу по изобретению, обычно длительность импульса составляет 1000 мкс, а напряженность электрического поля составляет примерно 2,0 кВ/см в способе по изобретению. Как правило, количество импульсов составляет примерно 5, а временные интервалы между двумя последовательными импульсами составляют примерно 3,8 мс.

Как правило, способ по изобретению применим для обработки жидкого продукта в устройстве ИЭП, имеющем пропускную способность от 30 до 200 л/ч согласно изобретению.

Как правило, способ по изобретению применим для обработки жидкого продукта в устройстве ИЭП, имеющем пропускную способность около 30000 л/ч согласно изобретению.

Одним из вариантов реализации изобретения является способ изобретения, в котором устройство для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры имеет пропускную способность от примерно 1 л/ч до примерно 30000 л/ч, предпочтительно примерно 1 л/ч, или примерно 30 л/ч, или примерно 200 л/ч, или примерно 1200 л/ч, или примерно 30000 л/ч.

Опять же, безотносительно к теории, эти условия обработки ИЭП по изобретению приводят к инактивации микробов, следуя теоретическому механизму инактивации белковых каналов мембран клеток. Указанные новые условия обработки ИЭП по изобретению обеспечивают новые возможности для инактивации микробов по сравнению с используемыми в настоящее время условиями обработки ИЭП. В указанных новых условиях по изобретению все вегетативные микроорганизмы инактивированы без предпочтения инактивации относительно крупных микроорганизмов и/или грамотрицательных микроорганизмов по сравнению с относительно мелкими микроорганизмами и/или грамположительными микроорганизмами.

Таким образом, в способе по изобретению грамотрицательные бактерии, такие как, например, штаммы *Escherichia coli*, виды *Salmonella*, другие *Enterobacteriaceae* и бактерии уксусной кислоты, инактивированы в жидких продуктах. Дополнительно, в способе по изобретению грамположительные бактерии, такие как, например, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, штаммы *Leuconostoc* и *Streptococcus*, также инактивированы в жидких продуктах. Исходя из ожидаемого теоретического механизма можно предположить, что также спорообразующие бактерии могут быть инактивированы, так как их клеточная мембрана также содержит потенциалзависимые каналы, такие как бактерии *Alicyclobacillus* и бактерии *Clostridium*. Кроме того, сами споры содержат незаменимые белки для прорастания во внутренней мембране и кортексе споры, которые могут быть мишенью для внешних приложенных импульсов.

Кроме того, способ по изобретению подходит для инактивации в жидких продуктах относительно крупных микроорганизмов, таких как, например, дрожжи и плесени. Способ по изобретению также подходит для инактивации в жидких продуктах относительно мелких микроорганизмов, таких как, например, *L. monocytogenes*. Конечно, способ по изобретению в равной степени подходит для инактивации в жидких продуктах микроорганизмов с размерами, находящимися в диапазоне размеров примерных микроорганизмов, показанных в примере 1.

Далее, с указанными новыми условиями по изобретению, теперь возможна инактивация микроорганизмов во всех типах (жидких пищевых) продуктов, поскольку условия обработки ИЭП по изобретению одинаково эффективны для инактивации микроорганизмов в жидких пищевых продуктах, имеющих относительно низкий pH, и в жидких пищевых продуктах, имеющих относительно высокий pH.

Наконец, из-за более низкой напряженности электрического поля, применяемой в условиях обработки ИЭП по изобретению, по сравнению с применяемыми в настоящее время условиями обработки ИЭП, указанные условия по изобретению легко адаптировать к расширенному производству, поскольку в изобретении используются более низкие максимальные напряжения, что делает условия обработки ИЭП по изобретению применимыми для реализации в промышленности при больших объемах и пропускной способности.

Способ по изобретению особенно подходит для жидких пищевых продуктов, обрабатываемых способом по изобретению в устройстве для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до температуры нагрева путем резистивного нагрева, когда время пребывания жидкости в области высокого электрического поля составляет от примерно 17 мс до 2 с. Частота импульсов ограничена от 1 до 50 кГц, чтобы избежать высвобождения металла из электродов (Mastwijk, 2006). Как правило, согласно изобретению в способе по изобретению скорость потока жидкого продукта составляет примерно от 1 до 5000 л/ч, предпочтительно примерно от 1000 до 30000 л/ч.

Еще одним вариантом реализации изобретения является способ по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения, в котором жидкий продукт представляет собой жидкий пищевой продукт или жидкий кормовой продукт.

Дополнительно, одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором жидкий продукт представляет собой ингредиент, полуфабрикат или конечный жидкий продукт, такой как фруктовый сок, овощной сок, детское питание, джем, спред или смузи, алкогольный или безалкогольный напиток, молочный продукт, растительный молочный продукт, яичная масса, суп или соус.

Одним из вариантов реализации изобретения является способ быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева по изобретению, в котором молочный продукт выбран из молока, молочного продукта или жидкой композиции, содержащей молочный компонент или молочную фракцию.

Дополнительно, одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором жидкий продукт представляет собой молочный продукт, включающий молоко, молочный продукт, молочный компонент или молочную фракцию.

Важным аспектом изобретения является обнаружение того, что во время обработки ИЭП не нужна

охлаждающая секция между камерами обработки устройства, применяемого в способе по изобретению, чтобы поддерживать температуру жидкого продукта ниже примерно 92°C, или ниже примерно 85°C, или ниже примерно 70°C, или ниже примерно 60°C в соответствии с изобретением. Как упоминалось ранее, в существующих в настоящее время способах охлаждающие секции добавляют между камерами обработки, чтобы избежать перегрева жидкого продукта. Как уже было сказано, в настоящем изобретении важно, что охлаждение в способе по изобретению не требуется, так как нагрев при критических температурах очень быстрый (время пребывания в камерах обработки, составляет менее 1 с), время воздействия максимальной температуры является очень коротким.

Чтобы иметь эффективный процесс, только воздействие критических температур (температур, влияющих на качество продукта) получают с помощью электрической энергии, описанной в изобретении. В некритичной температурной области нагревание может осуществляться обычными способами. Таким образом, предпочтительно, в способе по изобретению жидкий продукт предварительно нагревают до температуры в диапазоне от 20 до 70°C перед подачей в устройство, предпочтительно от 35 до 65°C, более предпочтительно от 40 до 60°C. Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором жидкий продукт предварительно нагревают перед подачей в устройство до температуры в диапазоне от 20 до 70°C, предпочтительно от 35 до 65°C, более предпочтительно от 40 до 60°C.

Для практических целей жидкие продукты, обработанные способом по изобретению, такие как жидкий пищевой продукт, немедленно охлаждают до температуры окружающей среды или ниже, например охлаждают до 2-8°C. Поскольку время выдержки не требуется, охлаждение жидкого продукта происходит сразу (предпочтительно в течение 3 с) после того, как жидкий продукт выходит из области высокого электрического поля. Согласно настоящему изобретению охлаждающие трубки могут быть установлены на 0,5 м ниже по потоку от области высокого электрического поля. Для системы 30000 л/ч (8,3 л/с) с диаметром трубы 3 дюйма это означает объем 2,2 л или 0,27 с перед входом в первую секцию охлаждения и приблизительно 1-5 с (в зависимости от вязкости) до того, как падение критической температуры на первые 10°C от максимальной температуры установлено, с последующим (обычным) охлаждением до требуемой температуры на выходе, обычно в диапазоне 4-7°C.

Термин "автономно" имеет свое традиционное значение и в настоящем документе относится к температуре жидкого продукта, которая достигает определенного значения в способе по изобретению без помощи внешнего охлаждения (или нагревания) во время обработки.

Жидкий продукт, такой как, например, жидкий пищевой продукт, выбранный из апельсинового сока, молочного продукта, кокосовой воды, арбузного сока, например, предварительно нагревают до примерно 40°C, примерно 50°C или примерно 60°C. Например, для эффективной и успешной инактивации микроорганизмов в жидком продукте при применении способа по изобретению жидкий продукт предварительно нагревают до температуры примерно от 30 до 65°C, предпочтительно от 36 до 59°C.

Предпочтительно максимальная температура жидкого продукта автономно остается ниже примерно 85°C во время резистивного нагрева, более предпочтительно ниже примерно 70°C, или ниже примерно 63°C, или ниже примерно 60°C согласно изобретению. Часть изобретения состоит в том, что параметры способа по изобретению выбраны таким образом, что максимальная температура жидкого продукта автономно остается ниже выбранной температуры. При выбранной температуре или ниже ее обеспечено эффективное и успешное уничтожение микроорганизмов, присутствующих в жидком продукте, тогда как нежелательное уменьшение свежего вкуса и запаха, витаминов и питательных веществ и денатурация белков, присутствующих в свежем (необработанном) жидком продукте, предотвращено или по меньшей мере предотвращено в значительной степени при применении способа по изобретению.

Применяя напряженность электрического поля по изобретению с длительностью импульса по изобретению, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что температура жидкого продукта остается ниже максимальной температуры примерно 92°C, или примерно 85°C, или примерно 70°C, или примерно 60°C согласно изобретению, что делает способ по изобретению особенно подходящим для реализации в расширенном производстве, например в промышленных условиях. Примером промышленного применения способа по изобретению является обработка жидкого пищевого продукта в устройстве для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева, при этом прохождение жидкого пищевого продукта через устройство происходит со скоростью примерно от 500 до 30000 л/ч, например примерно 1200 л/ч согласно изобретению.

Следовательно, одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором температура жидкого продукта автономно остается ниже 85°C во время резистивного нагрева, предпочтительно ниже 75°C, более предпочтительно ниже 60°C.

В одном варианте реализации изобретение относится к способу по изобретению, в котором напряженность электрического поля ниже примерно 5 кВ/см.

Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором напряженность электрического поля составляет от 0,5 до 5 кВ/см, более предпочтительно от 2,5 до 4 кВ/см. В одном варианте реализации изобретение относится к способу по изобретению, где напряженность электрического поля ниже примерно 3 кВ/см, предпочтительно примерно 2,7 кВ/см или ниже, более предпоч-

тительно составляет от примерно 0,9 до примерно 2,5 кВ/см.

Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором длительность импульса составляет по меньшей мере 10 мкс, более предпочтительно от 10 до 2000 мкс, еще более предпочтительно от 50 до 500 мкс, наиболее предпочтительно от 50 до 100 мкс. В одном варианте реализации изобретение относится к способу по изобретению, в котором длительность импульса составляет от примерно 100 мкс до примерно 1000 мкс. В еще одном варианте реализации изобретение относится к способу по изобретению, где длительность импульса составляет 1000 мкс или ниже, предпочтительно примерно 100 мкс.

Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором применяемые импульсы представляют собой биполярные импульсы. Таким образом, одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором минимальный одиночный импульс, применяемый к жидкому продукту, представляет собой импульс, применяемый в форме биполярного импульса. Предпочтительным является применение биполярного импульса к жидкому продукту, чтобы избежать повреждения электрода (Loeffler, 1996). Разумеется, часть изобретения также относится к другим типам импульсов, которые в равной степени применимы в способе по изобретению.

Способ по изобретению особенно подходит для инактивации микроорганизмов в жидких пищевых продуктах, таких как соки, соусы, молочные продукты. Другими словами, примерами таких жидких пищевых продуктов являются ингредиент, полуфабрикат или конечный жидкий продукт, такой как фруктовый сок, овощной сок, детское питание, джем, спред или смузи, алкогольный или безалкогольный напиток, молочный продукт, растительный молочный продукт, яичная масса, суп или соус.

Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в который представляет собой способ инактивации микроорганизмов в жидком продукте. Как было сказано ранее, способ по изобретению имеет много преимуществ по сравнению с настоящими способами нагревания жидкого продукта путем резистивного нагрева. Одним из основных преимуществ, достигаемых в способе по изобретению, является пастеризация жидкого продукта, например жидкого пищевого продукта, в котором микроорганизм является мелким или крупным, где микроорганизм представляет собой грамтрицательную бактерию или грамположительную бактерию.

С практической целью жидкие продукты, обработанные способом по изобретению, такие как жидкий пищевой продукт, охлаждают до температуры окружающей среды или ниже, например охлаждают до 2-8°C, сразу же после того, как способ по изобретению применяют к жидкому продукту.

Поэтому, одним из вариантов реализации изобретения является способ, в котором нагретый жидкий продукт охлаждают сразу же после прохождения через устройство для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева. Разумеется, с практическими целями охлаждение целесообразно проводить сразу же после того, как жидкий продукт прошел через устройство, например как можно быстрее, предпочтительно в течение 3 с. Таким образом, также вариантом реализации изобретения является способ по изобретению, в котором нагретый жидкий продукт охлаждают после его пропускания через устройство для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до температуры нагрева посредством резистивного нагрева. Часть изобретения состоит в том, что способ по изобретению подходит для применения с устройством для быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до температуры нагрева путем резистивного нагрева, причем устройство работает при скорости потока жидкого продукта от примерно 0,5 до примерно 2000 л/ч, предпочтительно от примерно 0,5 до примерно 2 л/ч, более предпочтительно при примерно 1 л/ч или предпочтительно от примерно 100 до примерно 2000 л/ч, предпочтительно примерно от 1000 до 1500 л/ч, более предпочтительно примерно 1200 л/ч. Предпочтительно скорость потока составляет примерно 30000 л/ч.

Как было сказано выше, ранее было установлено, что предварительный нагрев жидкого продукта перед тем, как обработать жидкий продукт способом быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева, улучшает эффективность инактивации во время обработки. Однако охлаждение жидкого продукта в ходе обработки было необходимым условием, так как жидкий продукт нагревался до неприемлемых значений при применении условий ИЭП, известных в области техники. Как уже было сказано, важным обнаружением в настоящем изобретении было то, что охлаждение в способе по изобретению не требуется, так как температура жидкого продукта не превышает недопустимый порог. Поэтому в способе по настоящему изобретению жидкий продукт предварительно нагревают перед тем, как обработать жидкий продукт способом быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева без необходимости охлаждения во время обработки. Таким образом, предпочтительно в указанном способе жидкий продукт предварительно нагревают до температуры в интервале от 20 до 70°C перед подачей в устройство, предпочтительно от 35 до 65°C, более предпочтительно от 40 до 60°C.

Способ по изобретению является очень успешным и эффективным для инактивации микроорганизмов, присутствующих в жидком продукте, обработанном способом быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до заданной температуры путем резистивного нагрева согласно изобретению. Применяя способ по изобретению к жидкому продукту, содержащему микроорганизмы, микробное число уменьшают по меньшей мере на  $2 \log$  КОЕ/мл, наиболее предпочтительно на  $6 \log$  КОЕ/мл или больше.

Таким образом, предпочтительно изобретение представляет собой способ, в котором микробное число (колониобразующая единица, КОЕ) в жидком продукте уменьшают, по меньшей мере, на  $2\log$  КОЕ/мл, предпочтительно по меньшей мере на  $5\log$  КОЕ/мл, наиболее предпочтительно на  $6\log$  КОЕ/мл или больше. Одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором микробное число в жидком продукте уменьшают по меньшей мере на  $4\log$  КОЕ/мл, предпочтительно по меньшей мере на  $7\log$  КОЕ/мл.

Авторы изобретения установили, что такое уменьшение микробного числа в жидких пищевых продуктах в значительной степени способствует сохранению качественных показателей продукта. Например, вкус, запах, цвет и внешний вид сохраняются в течение длительного периода времени для жидких пищевых продуктов, обработанных способом по изобретению, по сравнению с необработанными жидкими пищевыми продуктами. Например, в способе по изобретению вкус и запах жидкого пищевого продукта сохраняется в течение примерно 60 дней или более при применении способа по изобретению к апельсиновому соку, когда сок хранится при примерно  $7^{\circ}\text{C}$ . Столь же эффективным является сохранение качества апельсинового сока в течение примерно 23 дней при хранении при температуре окружающей среды после обработки апельсинового сока способом по изобретению.

Способ по изобретению оказывается одинаково применимым для инактивации грамположительных бактерий в жидком продукте и для инактивации грамотрицательных бактерий в жидком продукте. Кроме того, размер микроорганизма не играет ограничивающей роли, а это означает, что микроорганизмы как мелкого размера, так и более крупного размера инактивируются способом по изобретению. Таким образом, различные аспекты и варианты реализации изобретения являются важным вкладом в область техники, поскольку до настоящего изобретения мелкие грамположительные бактерии не могли быть эффективно инактивированы известными способами быстрого и равномерного нагревания жидкого продукта до температуры нагрева путем резистивного нагрева. Таким образом, одним из вариантов реализации изобретения является способ по изобретению, в котором микроорганизмы необязательно включают грамположительные бактерии.

При применении способа по изобретению к жидкому продукту рН жидкого продукта минимально изменяется в ходе обработки, если она вообще изменяется. Это еще одна полезная особенность способа по изобретению.

В одном варианте реализации изобретение, таким образом, относится к способу, в котором рН жидкого продукта в конце обработки находится в диапазоне 0,5 единицы рН от рН в начале процесса, предпочтительно в диапазоне 0,2 единицы рН, более предпочтительно в диапазоне 0,1 рН, наиболее предпочтительно в диапазоне 0,05 единицы рН.

Способ по изобретению подходит для жидких продуктов, в частности жидких пищевых продуктов.

Второй аспект изобретения относится к жидкому продукту, получаемому способом по изобретению, как было описано выше.

Изобретение дополнительно иллюстрируется следующими неограничивающими примерами, представленными ниже.

### Примеры

#### Пример 1.

Инактивация микробов *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella Senftenberg* и *Saccharomyces cerevisiae* при рН=3,6 в апельсиновом соке (шкала 1 л/ч).

Патогенные и вызывающие порчу микроорганизмы были отобраны на основе их морфологии и их связи и распространенности во фруктовом соке. Дополнительно, в качестве критерия отбора штаммов использовали термостойкость или ИЭП-устойчивость штаммов. Отобранные микроорганизмы перечислены в табл. 1.

Таблица 1

## Штаммы бактерий и штаммы дрожжей, применявшиеся в этом примере

Виды/штаммы применявшиеся	Коллекция культур	Бактерии / дрожжи	Структура клеточной стенки	Размер* (микрометры)	Ссылка
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	Бактерии	Грамотрицательные	1.1-1.5 x 2-6	Gurtler <i>et al.</i> (2011)
<i>Listeria monocytogenes</i> NV8		Бактерии	Грамположительные	0.4-0.5 x 0.5-2	Van der Veen <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC14917	Бактерии	Грамположительные	0.9-1.2 x 3-8	Campos and Cristianini (2007)
<i>Salmonella enterica</i> подвид. <i>enterica</i> serovar Senftenberg	ATCC43845	Бактерии	Грамотрицательные	0.7-1.5 x 2-5	Doyle and Mazzotta (2000)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1544	Дрожжи		3-15 x 2-8	Put <i>et al.</i> (1976)
(Центр Биоразнообразия Грибов, Утрехт, Нидерланды); ATCC: Американская коллекция типовых культур, USA					
* Характерные размеры взяты из Bergey, 1986					

Свежие культуры всех пяти микроорганизмов, перечисленных в табл. 1, были посеяны на чашки Петри из замороженного материала на среду и культивировались в течение ночи. Культивирование *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Senftenberg* было описано у Timmermans *et al.*, 2014 г. Свежие культуры *Lactobacillus plantarum* получали аналогичным образом путем посева на чашки из замороженного материала на среду MRS, содержащую 52,2 г MRS (De Man, Rosoga и Sharp жидкая среда, Merck) и 12 г агара на 1 л дистиллированной воды. Чашки инкубировали в течение ночи при 30°C. Одну колонию использовали для инокуляции 100 мл колбы с 10 мл жидкой среды MRS и культивировали в течение 24 ч при 20°C во встряхивающем инкубаторе (180 об/мин). Из этой культуры 200 мкл использовали для инокуляции 19,8 мл свежей жидкой среды MRS с добавлением 1% глюкозы (колба на 100 мл) и инкубировали в течение 24 ч при 20°C и 180 об/мин.

После культивирования клетки промывали и суспензию выбранного микроорганизма добавляли к апельсиновому соку (Minute Maid®) до конечной концентрации примерно 1,0E+8–1,0E+9 КОЕ/мл.

Инокулированную суспензию прокачивали через систему ИЭП 1 л/ч со скоростью потока 13,0±0,5 мл/мин и до электрической обработки предварительно нагревали до 36°C. Затем суспензия поступала в две расположенные вертикально на одной прямой камеры обработки, в которых проводили электрическую обработку. Из-за различий в интенсивности условий обработки (напряженность электрического поля, длительность импульса и количество поданных импульсов) сок нагревался до различных максимальных температур автономно (табл. 2 иллюстрирует применяемые условия). Не была добавлена секция выдержки, поэтому сразу после выхода из камер обработки (в течение 3 с) сок охлаждали с помощью нагревательной спирали, которая была погружена в водяную баню. На выходе образцы собирали асептически. Из-за различий выбранной частоты количества применяемых импульсов и последующее увеличение температуры, приводящее к максимальной температуре, варьировали (табл. 2). Образцы собирали при различных максимальных температурах и определяли кинетику постоянной силы электрического поля и длительности импульса.

Количество жизнеспособных микробных клеток определяли путем посева 100 мкл серийно разведенного сока, обработанного ИЭП, в стерильном физиологическом солевом растворителе пептона (PSDF, peptone physiological salt diluent) на чашках соответствующего агара с добавлением 0,1% пирувата натрия для увеличения темпов роста сублетально поврежденных клеток (Timmermans et al., 2014). Выжившие клетки подсчитывали через 5 дней инкубации при 25°C (*S. cerevisiae*), 30°C (*L.monocytogenes*, *L. plantarum*) или 37°C (*S. Senftenberg*, *E.coli*).

Температуру до и сразу после камер обработки измеряли с помощью НУР-О термомпары Т-типа (Omega). Дополнительно, максимальную температуру измеряли косвенно с использованием NTC-резистора для контроля максимальной температуры.

Прямоугольные биполярные импульсы, напряжение и ток в камере обработки регистрировали с помощью цифрового осциллографа (Rigol DS1102E). Электрическую энергию получали путем численного интегрирования кривых напряжения и тока и приравнивали к тепловой энергии в пределах погрешности эксперимента (10%) согласно (Mastwijk, 2006) и (Timmermans et al., 2014).

Все эксперименты выполнялись в двух повторениях.

Таблица 2

Условия обработки ИЭП, примененные в настоящей работе

Напряженность электрического поля (кВ/см)	Длительность импульса (микросекунды)	Время пребывания в двух камерах обработки (миллисекунды)	Частота (Гц)	Количество импульсов	Расчетное время между 2 последовательными импульсами (миллисекунды)	Максимальная температура (°C)
20	2	14.5±0.5	[0-964]	[0-14]	[1.0-5.5]	[36-54]
15	2	48.9±1.9	[0-964]	[0-47]	[1.0-5.5]	[36-62]
10	2	227.3±8.5	[0-964]	[0-204]	[1.0-5.5]	[36-70]
2.7	100	17.5±0.7	[0-1400]	[0-25]	[0.6-2.7]	[36-70]
2.7	1000	17.5±0.7	[0-210]	[0-4]	[4.7-39]	[36-87]
0.9	1000	695.9±26	[0-50]	[0-35]	[19.0-199]	[36-92]

Протестированные условия приведены в табл. 2. Размеры камеры обработки варьировали для получения различной напряженности электрического поля. В результате указанных различных размеров времени пребывания в камерах обработки не было одинаковым для каждого протестированного условия. Для получения требуемой максимальной температуры частоту корректировали. Наконец, количество импульсов рассчитывали как произведение примененных времени пребывания продукта и частоты. Время между двумя импульсами рассчитывали путем деления времени пребывания на количество импульсов, минус длительность импульса.

Инактивация показана как логарифм количества выживших микроорганизмов в протестированных условиях  $N$ , деленное на начальную концентрацию микроорганизмов  $N_0$ , то есть  $\log_{10}(N/N_0)$ . На фиг. 1 инактивация показана как функция максимальной температуры на выходе из камеры обработки для тестируемых микроорганизмов. На левой панели показана инактивация при различной напряженности электрического поля для коротких импульсов (2 мкс), демонстрирующая современное состояние области техники, а на правой панели показана инактивация при различной напряженности электрического поля для длинных импульсов (т.е. 100 или 1000 мкс), демонстрирующая изобретение, описанное в этой заявке.

Инактивация *E.coli* в апельсиновом соке в зависимости от напряженности электрического поля и варьирующей длительности импульса показана на фиг. 1.

Увеличение напряженности электрического поля при неизменной длительности импульса приводило к большей инактивации при выбранной максимальной температуре, что видно на фиг. 1 как на левой

панели на фиг. 1 (напряженность электрического поля составляет 10, 15 или 20 кВ/см, длительность импульса составляет 2 мкс), так и на правой панели на фиг. 1 (напряженность электрического поля составляет 0,9 или 2,7 кВ/см, длительность импульса составляет 1000 мкс).

Этот эффект увеличения напряженности электрического поля можно было наблюдать и для других микроорганизмов, показанных на фиг. 1, что свидетельствует о большей инактивации при более высокой напряженности электрического поля. Можно предположить, что дальнейшее увеличение напряженности электрического поля в условиях, описанных в настоящем изобретении, до 5 кВ/см еще больше снизит максимальную температуру, при этом все еще инактивируя требуемое количество микроорганизмов.

Безотносительно к теории, это объясняется превышением внешнего электрического поля ( $E$ ) над критической напряженностью электрического поля ( $E_c$ ) мембраны, что приводит к большому повреждению и инактивации (Alvarez et al., 2006).  $E_c$  варьируется для разных микроорганизмов, и в технической области существует консенсус в отношении того, что для инактивации микроорганизмов требуется напряженность электрического поля выше 5 кВ/см (Raso et al., 2014). Однако в настоящей работе авторы изобретения впервые показывают, что также напряженность электрического поля ниже 5 кВ/см, например 2,7 кВ/см, эффективна для достижения инактивации микроорганизмов на достаточном уровне  $1,0E-7$  ( $N/N_0$ ) или ниже согласно изобретению. При сравнении левых панелей фиг. 1 с правыми панелями видно, что напряженность электрического поля 2,7 кВ/см с длительностью импульса 100 или 1000 мкс обеспечивает инактивацию микроорганизмов в более высокой степени по сравнению с более высокими напряженностями электрического поля и более короткой длительностью импульса, обычно применяемыми в данной области.

Безотносительно к теории, предполагают, что длительность импульса играет решающую роль в инактивации микроорганизма, намекая на другой механизм для условий, описанных в изобретении, чем применяемые в настоящее время. Предполагают, что, когда длительность импульса достаточно продолжительна, будут открыты потенциалзависимые белковые каналы и будут проводить более высокий ток, чем тот, для которого они предназначены. В результате каналы станут необратимо денатурированными, клетки потеряют свою жизнеспособность.

Данные по инактивации *E.coli* не показывают разницы в степени инактивации при 2,7 кВ/см при использовании импульсов 100 или 1000 мкс, намекая, что критическая длительность импульса составляет меньше 100 мкс.

Кроме того, можно видеть, что грамположительные и грамотрицательные бактерии могут быть инактивированы до  $1,0E-7$  ( $N/N_0$ ) с применением указанных новых условий обработки ИЭП. Также размер микроорганизмов не играет заметной роли в степени инактивации (правая панель), какую он играет в условиях существующего уровня техники (левая панель). Несмотря на то что дрожжи можно инактивировать при более низких максимальных температурах при 2,7 кВ/см, чем *L. plantarum* и *S. Senftenberg*, больших различий между *E.coli* и *L.monocytogenes* в новых условиях обработки ИЭП не обнаружено, в то время как большие различия обнаружены в применяемых в настоящее время условиях обработки ИЭП (левые панели).

#### Пример 2.

Инактивация микробов *E.coli* и *Listeria monocytogenes* в продуктах с различными характеристиками (масштаб 1 л/ч).

*Escherichia coli* (ATCC 35218) и *Listeria monocytogenes* NV8 получали из замороженного материала и культивировали в триптон-соевой жидкой среде (*E. coli*) или бульоне с сердечно-мозговым экстрактом (*L. monocytogenes*) согласно способу, описанному у (Timmermans et al., 2014).

После культивирования, клетки промывали и суспендировали для достижения концентрации примерно  $1,0E+8$  КОЕ/мл в апельсиновом соке (Minute Maid), кокосовой воде (Healthy People) или арбузном соке (свежевыжатый), каждый из которых имел различные pH и электрическую проводимость (см. фиг. 2). Использовали такую же систему устройства ИЭП и настройки, как описано в примере 1, имеющую скорость потока  $13,5 \pm 0,5$  мл/мин. Однако использовали только одно условие обработки - напряженность электрического поля 2,7 кВ/см и длительность импульса 1000 мкс. Поскольку проводимость варьирует среди трех продуктов (фиг. 2), были необходимы другие настройки частоты, количество импульсов, подаваемых во время обработки для достижения одной и той же максимальной температуры для каждого продукта, отличалось. В табл. 3 показаны диапазон протестированных частот, количество импульсов и максимальные температуры после обработки для трех протестированных соков.

Инактивация показана как логарифм количества выживших микроорганизмов в тестируемых условиях  $N$ , деленное на начальную концентрацию микроорганизмов  $N_0$ , то есть  $\log_{10}(N/N_0)$ .

Таблица 3

## Условия обработки ИЭП, примененные в настоящем исследовании

Продукт	Напряженность электрического поля (кВ/см)	Длительность импульса(микросекунды)	Время пребывания в двух камерах обработки (миллисекунды)	Частота (Гц)	Количество импульсов	Максимальная температура (°С)
Апельсиновый сок	2.7	1000	17.5±0.7	[0-210]	[0-4]	[36-87]
Арбузный сок	2.7	1000	17.5±0.7	[0-240]	[0-4]	[36-72]
Кокосовая вода	2.7	1000	17.5±0.7	[0-100]	[0-2]	[36-76]

Инактивация *E.coli* и *L.monocytogenes* при различных максимальных температурах в различных соках показана на фиг. 3. Когда сравнивают кривые инактивации *E.coli* (фиг. 3А) и *L.monocytogenes* (фиг. 3В) для различных жидких сред, т.е. жидкого продукта апельсинового сока, кокосовой воды и арбузного сока, видно, что не наблюдается различий в температурах, при которых начинается инактивация. Кроме того, степень инактивации одинакова для апельсинового сока, кокосовой воды и арбузного сока. Это показывает, что изменяющийся рН основы продукта, то есть жидкого продукта апельсинового сока, кокосовой воды и арбузного сока, а также различная электрическая проводимость не влияют на степень инактивации. Кроме того, сопоставимая кривая инактивации, показывающая инактивацию при одинаковой температуре, обнаружена для грамотрицательных *E.coli* (с размером бактериальной клетки примерно 0,7-1,5×2-5 мкм) и для грамположительных *L.monocytogenes* (с размером клетки примерно 0,4-0,5×0,5-2 мкм), что указывает на отсутствие различий у исследованных микроорганизмов.

Это показывает, что способ по изобретению, примененный к апельсиновому соку, кокосовой воде и арбузному соку, одинаково успешен и эффективен в отношении инактивации грамположительных бактерий и грамотрицательных бактерий во множестве различных жидких сред, то есть в различных жидких пищевых продуктах.

## Пример 3.

Микробиологическая проверка в масштабе 1200 л/ч.

Одна партия апельсинов (сорт Natal folha murcha) была в промышленных условиях отжата для получения 4000 л апельсинового сока. Апельсиновый сок не инокулировали микроорганизмами, следовательно популяцию микроорганизмов, естественно присутствующих в апельсиновом соке, изучали для проверки условий обработки, которые были определены ранее в 1 л/ч, в более крупных масштабах (1200 л/ч).

Апельсиновый сок закачивали со скоростью потока 1200±100 л/ч и предварительно нагревали до 59°C. Импульсы подавали в три вертикально расположенные камеры для обработки для достижения максимальной температуры 70°C. Объем зоны обработки в средней камере обработки был меньше (размеры: длина 14 мм, диаметр 8 мм), чем зона обработки первой и третьей (наружных) камер обработки (размеры 14 мм, диаметр 12 мм). Из-за соединений источников питания это приводило к двойной напряженности электрического поля в средней камере обработки по сравнению с внешними камерами обработки, а именно 1,9 кВ/см в средней и 1,0 кВ/см во внешней камере обработки. Импульсы имели фиксированную длительность 1000 мкс. Время пребывания в средней камере обработки составляло 5,4±0,5 мс, а во внешних камерах обработки 9,5±0,9 мс, общее количество импульсов, подаваемых во время обработки, составляло 5,1±0,01 при частоте повторения 207±18 Гц.

Сок охлаждали сразу после выхода из камер обработки в течение 3 с, таким образом время выдержки сводилось к минимуму, чтобы уменьшить тепловую нагрузку на продукт. После охлаждения сок упаковывали асептически и хранили.

Микробиологические образцы необработанного и обработанного ИЭП сока анализировали дважды в трех разных лабораториях, суммарно было проанализировано 6 необработанных и обработанных ИЭП образцов. Суммарное количество мезофильных бактерий при посеве на чашках Петри, суммарное коли-

чество колиформ и количество дрожжей и плесени анализировали согласно способу, описанному Doves и ИТО (2001). Ацидотермофильные спорообразующие бактерии (ATSB) анализировали согласно способу Eguchi et al. (1999), сальмонеллы анализировали согласно способу AOAC (2000), *Listeria monocytogenes* анализировали согласно способу ISO 11290-1 (1996) и молочнокислые бактерии анализировали согласно способу Silva et al. (2007).

Результаты инаktivации микробов в неочищенном апельсиновом соке и в апельсиновом соке, обработанном ИЭП, показаны на фиг. 4А и 4В. Первоначальная микробная нагрузка в неочищенном апельсиновом соке была относительно велика, поскольку примерно  $1,0E+5$  КОЕ/мл присутствовало в необработанном апельсиновом соке (фиг. 4А). После обработки ИЭП апельсинового сока на чашках Петри не было обнаружено никаких микроорганизмов (общее количество колоний на чашке) и дополнительно на чашках не было обнаружено ни плесени, ни дрожжей, ни колиформ (все чашки показывали  $<1$  КОЕ/мл; см. фиг. 4А). На фиг. 4В из качественных данных видно, что также все молочнокислые бактерии и ацидотермофильные спорообразующие бактерии (ATSB), которые присутствовали в необработанном апельсиновом соке, были инаktivированы в ходе обработки ИЭП указанного апельсинового сока.

Пример 4.

Действие условий обработки ИЭП по изобретению на аспекты качества и срок хранения, оцененное по микробиологическим показателям.

Образцы апельсинового сока, обработанные ИЭП, полученные и описанные в примере 3, анализировали каждую неделю во время исследования срока хранения, продолжавшегося в течение 3 месяцев. В течение этого периода были проанализированы аспекты качества и микробные числа. Микробиологический анализ был аналогичен способам, описанным в примере 3. Для анализа качества согласно способам, широко известным в области техники, количество растворимых твердых веществ (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011-1), кислотность (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011- 2), pH (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011-3), содержание масел (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011-4), содержание витамина С (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011-5) и активность пектинестеразы (Rouse and Atkins, 1955) измеряли в указанное время (табл. 2). Образцы хранили при  $7^{\circ}\text{C}$  и при комнатной температуре (температура окружающей среды  $20-25^{\circ}\text{C}$ ) для облегчения ускоренного исследования срока хранения.

Оценка численности микроорганизмов в образцах была проведена, результаты приведены в табл. 4. Микробные числа в образцах, обработанных ИЭП, оказались ниже предела обнаружения в 1 КОЕ/мл в течение всего исследования срока хранения, продолжавшегося в течение 104 дней, как при хранении апельсинового сока при температуре  $7^{\circ}\text{C}$ , так и при хранении апельсинового сока при температуре окружающей среды.

Таблица 4

Результаты микробиологического анализа обработанного ИЭП апельсинового сока во время срока хранения, хранившегося при  $7^{\circ}\text{C}$  или при температуре окружающей среды

День	Хранение при $7^{\circ}\text{C}$					Хранение при температуре окружающей среды				
	Число колоний на чашке	Дрожжи	Плесени	Молочнокислые бактерии	ATSB	Число колоний на чашке	Дрожжи	Плесени	Молочнокислые бактерии	ATSB
	КОЕ/мл									
1	<1	<1	<1	<10	absent	<1	<1	<1	<10	absent
6	<1	<1	<1	<10	НА.	<1	<1	<1	<10	НА.
13	НА.	НА.	НА.	НА.	absent	НА.	НА.	НА.	НА.	absent
20	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
27	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
34	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
41	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
48	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
55	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
62	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.

69	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
76	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
83	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
90	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
97	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.
104	<1	<1	<1	НА.	НА.	<1	<1	<1	НА.	НА.

НА - не анализировали

Органолептическая оценка проводилась обученной группой. Образцы оценивали по общему внешнему виду, цвету, запаху и вкусу. Образцы оценивали как "хорошие", когда свойства были сходными со свежавыжатым апельсиновым соком, образцы оценивались как "не хорошие", когда больше не было высокого качества свежавыжатого сока.

Результаты органолептической оценки в течение срока хранения показаны на фиг. 5. Образцы, хранившиеся при 7°C, были похожи на свежавыжатый апельсиновый сок до 64 дней хранения. После этого срока хранения свежий запах и вкус уменьшались, хотя внешний вид и цвет сока считались "хорошими" до 90 дней хранения при 7°C (фиг. 5А). Обработанные ИЭП соки, хранившиеся при температуре окружающей среды, были приемлемы только до 27 дней хранения (фиг. 5В). По истечении этого времени его больше нельзя было рассматривать как свежий сок.

Были также проверены аспекты качества апельсинового сока. Для проверки указанных аспектов необработанный сок анализировали также до обработки ИЭП, чтобы оценить воздействие способа на указанные аспекты.

Суммарное содержание растворимых твердых веществ (градусы Брикса) (фиг. 6, кривые экспериментов, проведенных при 7°C и при температуре окружающей среды, совпадают на 6-й день и далее на графике), кислотность (фиг. 7), рН (фиг. 8), содержание масел (фиг. 9) и содержание витамина С (фиг. 10) не изменялись при обработке ИЭП, при хранении при 7°C и при хранении при температуре окружающей среды.

Различия обнаружены в активности пектинметилэстеразы (РМЕ) до и после обработки ИЭП (фиг. 11). Из-за температуры, создаваемой во время обработки ИЭП, часть фермента РМЕ инактивируется, что приводит к снижению активности фермента. То есть тепло, создаваемое в способе по изобретению, увеличивает температуру сока до 70°C. Сок, подвергнутый обработке ИЭП по изобретению, предварительно нагревали до 59°C перед введением в устройство ИЭП при непрерывном потоке. Инактивация указанного фермента является одной из целей пастеризации, так как остаточная активность фермента может привести к помутнению и желатинизации цитрусового сока во время хранения. Активность этих ферментов выражается как выделение кислоты на 1 мл (умноженное на 1,0E+4) во время гидролиза пектина как функция времени при рН 7,8 и 20°C. Как правило, большинство пастеризаторов соков обеспечивают сок, обладающий активностью пектинестеразы, выраженной в единицах пектинестеразы (PEU) со значениями от 1,0E-6 до 1,0E-4.

**Источники**

- AOAC (2000). AOAC Official Method 989.13-1998. Motile *Salmonella* in all foods. AOAC International, Official Method of Analysis of AOAC International.
- Álvarez, I., Condón, S., Raso, J., (2006). Microbial inactivation by pulsed electric fields. In: Raso, J., Heinz, V. (Eds). Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry, Fundamentals and Applications. Springer, New York.
- Bergey, 1986. Manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore
- Campos, F.P., Cristianini, M. (2007) Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure pasteurisation. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8, 226-229
- Doyle, M.E., Mazotta, A.S. (2000) Review studies on the thermal resistance of *Salmonella*. Journal of Food Protection, 63, 779-795
- Dowes, F.P., Ito, K., (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4<sup>th</sup> edition. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., Pinhatti, M.E., Azuma, E., Variane, S.F. (1999). Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. Report of the research project ABE Citrus, Campinas (SP), Brasil.
- El Zakhem, H., Lanoisellé, J-L., Lebovka, N.I., Nonus, M., Vorobiev, E. (2006) Behavior of yeast cells in aqueous suspension affected by pulsed electric field. Journal of Colloid and Interface Science, 300, 553-563
- El Zakhem, H., Lanoisellé, J-L., Lebovka, N.I., Nonus, M., Vorobiev, E. (2007) Influence of temperature and surfactant on *Escherichia coli* inactivation in aqueous suspensions treated by moderate pulsed electric fields. International Journal of Food Microbiology, 120, 259-265
- Eynard, N., Rodriguez, F., Trotard, J., Teissié, J. (1998) Electrooptics studies of *Escherichia coli* electropulsation: orientation, permeabilization and gene transfer. Biophysical Journal, 75, 2587-2596
- Gurtler, J.B., Bailey, R.B., Geveke, D.J., Zhang, H.Q. (2011) Pulsed electric field inactivation of *E.coli* O157:H7 and non-pathogenic surrogate *E.coli* in strawberry juice as influenced by sodium benzoate, potassium sorbate, and citric acid. Food Control, 22, 1689-1694

- Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D. (2002). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – basic concepts for process design. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 103-111
- ISO 11290-1 (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: detection method.
- JBT Food Tech Citrus Systems (2011-1). Total soluble solids by refractometer. In: *Procedures for analysis of citrus products*. 6<sup>th</sup> Edition, Lakeland.
- JBT Food Tech Citrus Systems (2011-2). Total titratable acidity (industry method) In: *Procedures for analysis of citrus products*. 6<sup>th</sup> Edition, Lakeland.
- JBT Food Tech Citrus Systems (2011-3). pH. In: *Procedures for analysis of citrus products*. 6<sup>th</sup> Edition, Lakeland.
- JBT Food Tech Citrus Systems (2011-4). Recoverable oil (Scott method). In: *Procedures for analysis of citrus products*. 6<sup>th</sup> Edition, Lakeland.
- JBT Food Tech Citrus Systems (2011-5). Ascorbic acid by Iodine titration. In: *Procedures for analysis of citrus products*. 6<sup>th</sup> Edition, Lakeland.
- Loeffler, M.J. (2006) Generation and application of high intensity pulsed electric fields. In: Heinz, V., Raso, J. (Eds.) *Pulsed electric field technology for the food industry - fundamentals and applications*. Springer, New York.
- Mastwijk, H.C. (2006) Pulsed Power systems for application of pulsed electric fields in the food industry. In: Heinz, V., Raso, J. (Eds.) *Pulsed electric field technology for the food industry - fundamentals and applications*. Springer, New York.
- Mastwijk, H.C., Gulfo-van Beusekom, K., Pol-Hofstad, I.E., Schuten, H., Boonman, M, Bartels, P.V. (2007). Definitions and guidelines for reporting on pulsed electric field experiments. In: Lelieveld, H.L.M., Notermans, S., de Haan, S.W.H. (Eds.). *Food preservation by pulsed electric fields. From research to application*. Woodhead publishing.
- Raso, J., Condón, S., Álvarez, I., (2014). Non-thermal processing. Pulsed Electric Field. In: Batt, C.A. (Ed). *Encyclopedia of Food Microbiology* (second edition). Elsevier.
- Put, H.M.C., De Jong, J., Sand, F.E.M.J., Van Grinsven, A.M. (1976) Heat resistance studies on yeast spp. causing spoilage in soft drinks. *Journal of Applied Bacteriology*, 40, 135-152

Rouse, A.H., and Atkins, C.D. (1955) Pectinesterase and pectin in commercial citrus juices as determined by methods used at the citrus experiment station. Florida Agricultural Experiment Stations, 570, 3-19.

Saulis, G., Wouters, P.C. (2007). Probable mechanisms of microorganism inactivation by pulsed electric fields. In: Lelieveld, H.L.M., Notermans, S., de Haan, S.W.H. (Eds.). Food preservation by pulsed electric fields. From research to application. Woodhead publishing.

Sharma, P., Bremer, P., Oey, I., Everett, D.W. (2014) Bacterial inactivation in whole milk using pulsed electric field processing. International Dairy Journal, 35, 49-56

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., Gomes, R.A.R., Okazaki, M.M., ( 2007). Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos, third edition, São Paulo.

Timmermans, R.A.H., Nierop Groot, M.N., Nederhoff, A.L., van Boekel, M.A.J.S., Matser, A.M. Mastwijk, H.C. (2014). Pulsed electric field processing of different fruit juices: Impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic micro-organisms. International Journal of Food Microbiology, 173, 105–111.

Tsong, T.Y. (1992) Time sequence of molecular events in electroporation. In: Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., Sowers, A.E. (Eds). Guide to electroporation and electrofusion. Academic Press

Van der Veen, S., Wagendorp, A., Abee, T., Wells-Bennink, M.H. (2009). Diversity assessment of heat resistance of *Listeria monocytogenes* strains in a continuous-flow heating system. Journal of Food Protection, 5, 999-1004

Wouters, P.C., Dutreux, N., Smelt, J.P.P.M., Lelieveld, H.L.M. (1999). Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 5364-5371

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ инактивации микроорганизмов в жидком продукте путем резистивного нагрева для получения нагретого жидкого продукта, включающий:

а) непрерывную подачу жидкого продукта на вход устройства для быстрого и равномерного нагрева жидкого продукта до заданной температуры посредством резистивного нагрева и прохождение жидкого продукта через устройство;

б) непрерывное генерирование электрического тока через проходящий жидкий продукт в устройстве, где минимальный одиночный импульс подают на каждый элементарный объем жидкости во время прохождения, с длительностью импульса по меньшей мере 10 мкс, где напряженность электрического поля составляет от 0,1 до ниже 3 кВ/см,

так, чтобы максимальная температура нагретого жидкого продукта автономно оставалась в диапазоне от 40 до 85°C во время резистивного нагрева; а

микробное число (КОЕ) нагретого жидкого продукта уменьшалось по меньшей мере на  $2\log$  КОЕ/мл.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что рН жидкого продукта составляет от 1,5 до 9,0, предпочтительно выше 4,6, предпочтительно от 4,8 до 9,0, более предпочтительно от 5,5 до 8,0, более предпочтительно от 6,0 до 7,5.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что жидкий продукт имеет электрическую проводимость от 0,01 до 10 См/м, измеренную при 20°C, предпочтительно от 0,1 до 3 См/м, измеренную при 20°C, более предпочтительно от 0,2 до 0,8 См/м, измеренную при 20°C.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что жидкий продукт представляет собой жидкий пищевой продукт или жидкий кормовой продукт.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что жидкий продукт представляет собой ингредиент, полуфабрикат или конечный жидкий продукт, такой как фруктовый сок, овощной сок или смузи, джем, спред, алкоголь или безалкогольный напиток, молочный продукт, растительный молочный продукт, яичная масса, суп или соус.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что молочный продукт выбран из молока, молочного продукта или жидкой композиции, содержащей молочный компонент или молочную фракцию.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что температура жидкого продукта автономно остается ниже 75°C, предпочтительно ниже 60°C.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что напряженность электрического поля составляет 2,7 кВ/см или ниже.

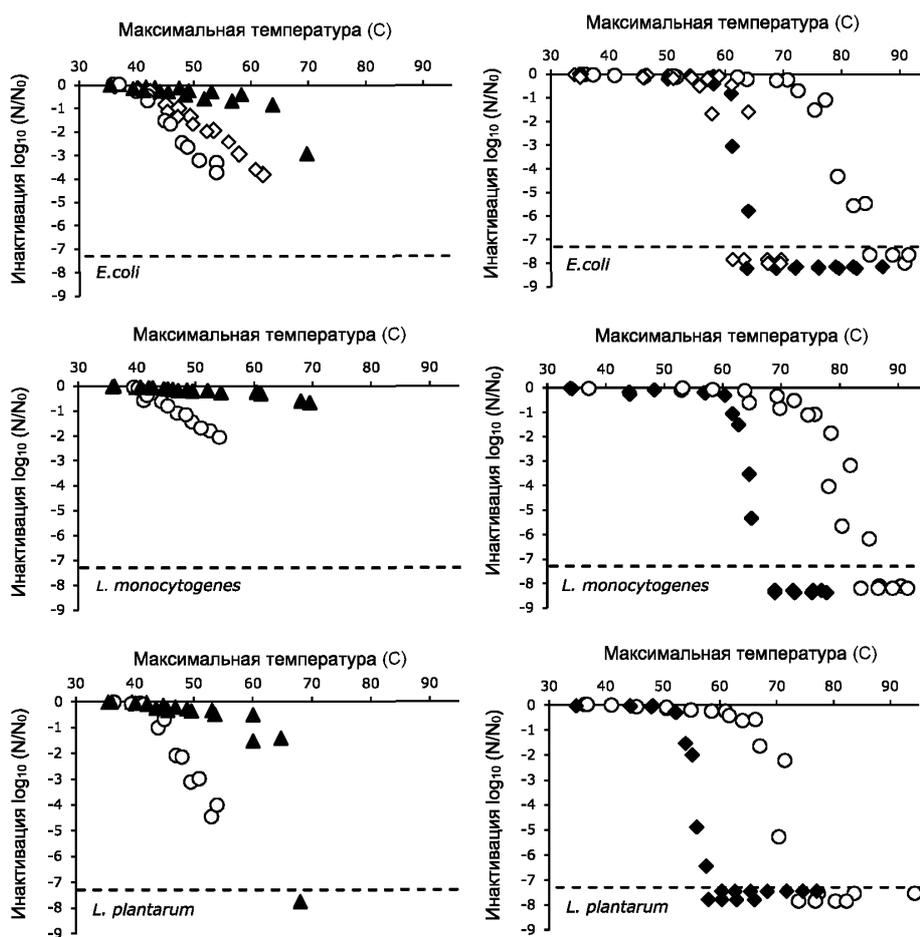
9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что длительность импульса составляет по меньшей мере 10 мкс, предпочтительно от 10 до 2000 мкс, более предпочтительно от 50 до 500 мкс, наиболее предпочтительно от 50 до 100 мкс.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором применяют биполярные импульсы.

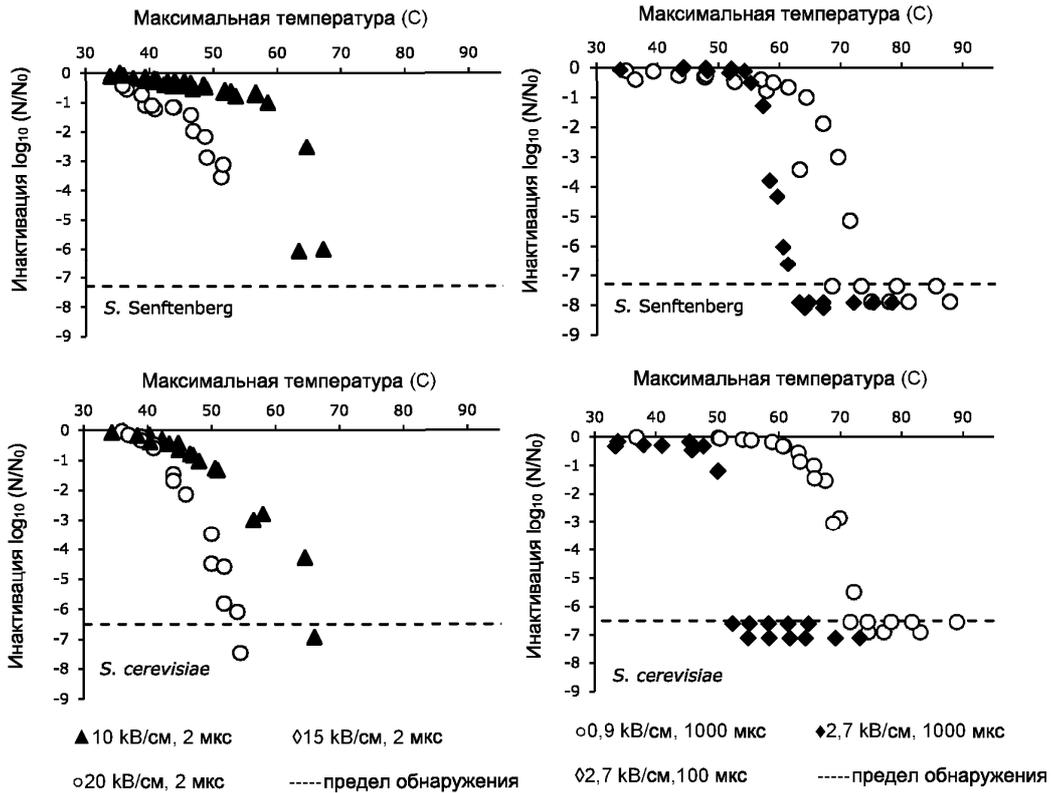
11. Способ по любому из пп.1-10, в котором нагретый жидкий продукт охлаждают сразу же после прохождения через устройство.

12. Способ по любому одному из пп.1-11, в котором жидкий продукт предварительно нагревают перед подачей в устройство до температуры в диапазоне от 20 до 70°C, предпочтительно от 35 до 65°C, более предпочтительно от 40 до 60°C.

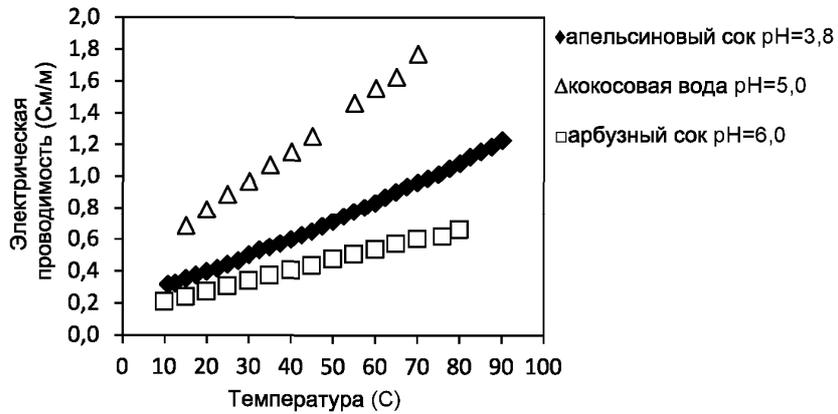
13. Способ по любому из пп.1-12, в котором микробное число (КОЕ) в нагретом жидком продукте уменьшается по меньшей мере на  $5 \log$  КОЕ/мл, предпочтительно на  $6 \log$  КОЕ/мл или более.



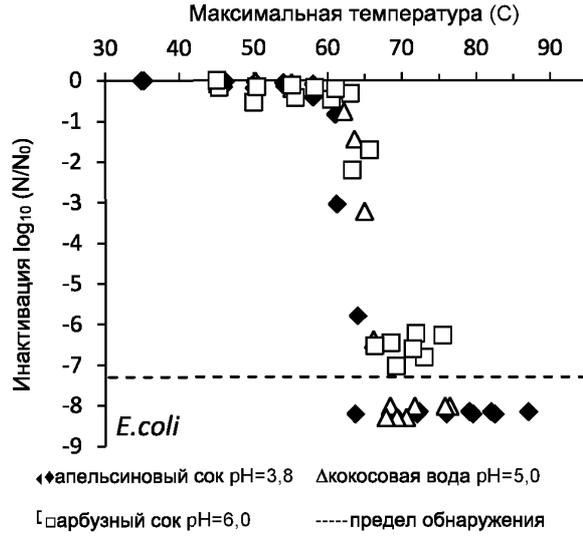
Фиг. 1А



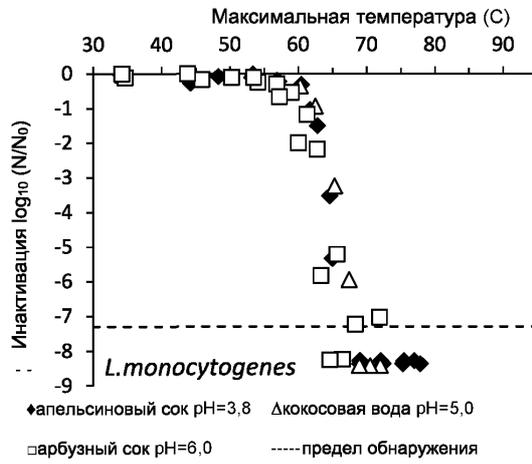
Фиг. 1В



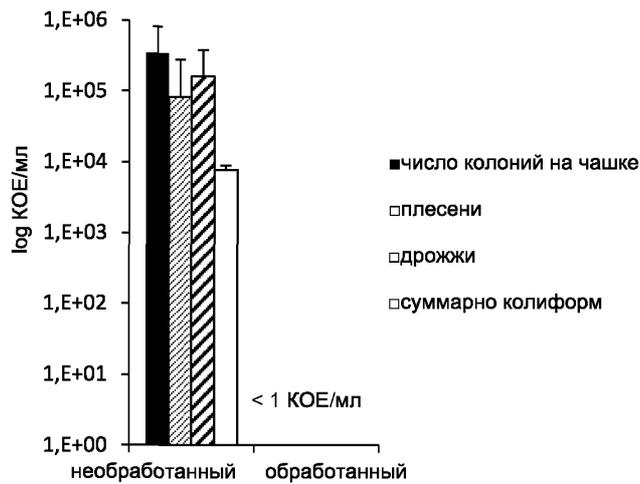
Фиг. 2



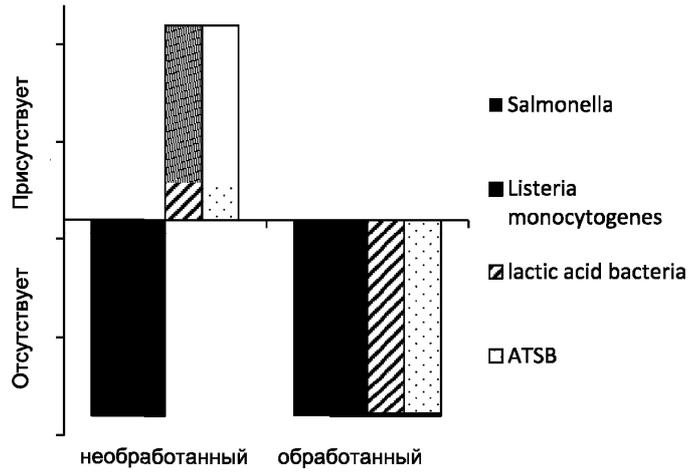
Фиг. 3А



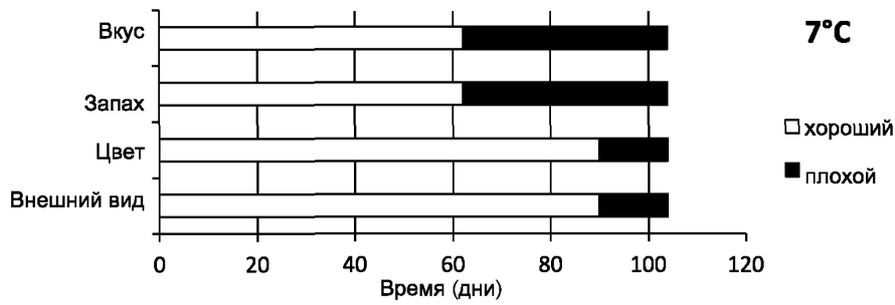
Фиг. 3В



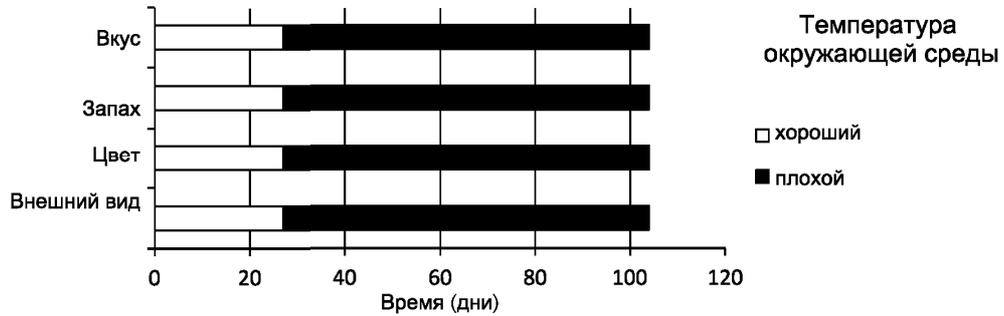
Фиг. 4А



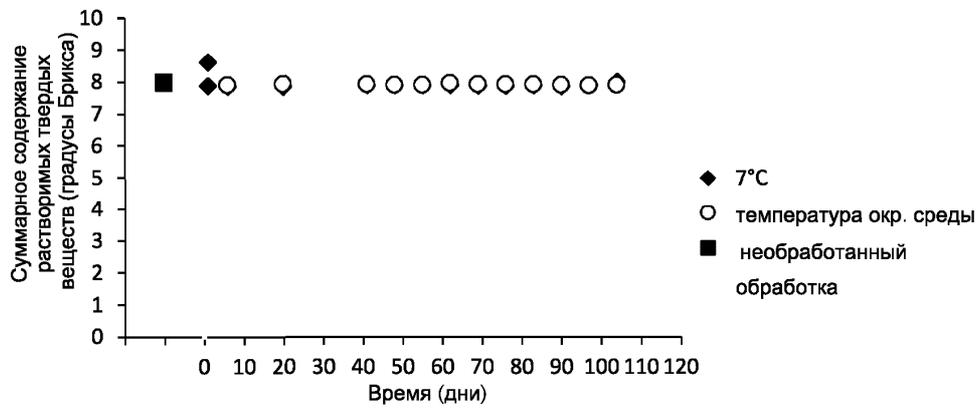
Фиг. 4В



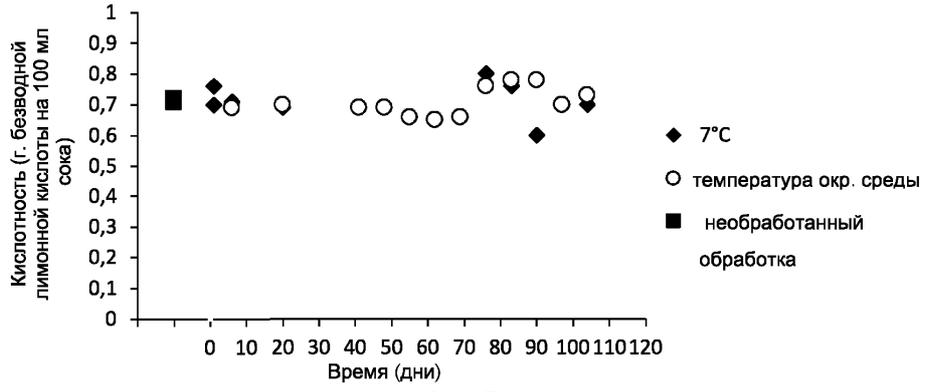
Фиг. 5А



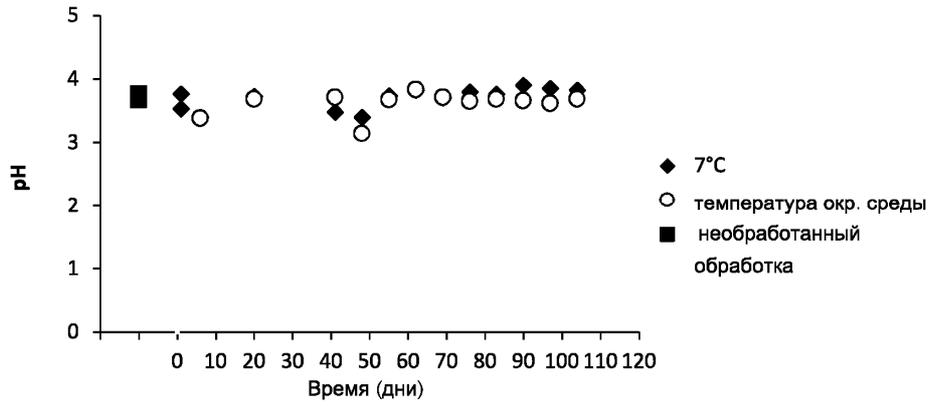
Фиг. 5В



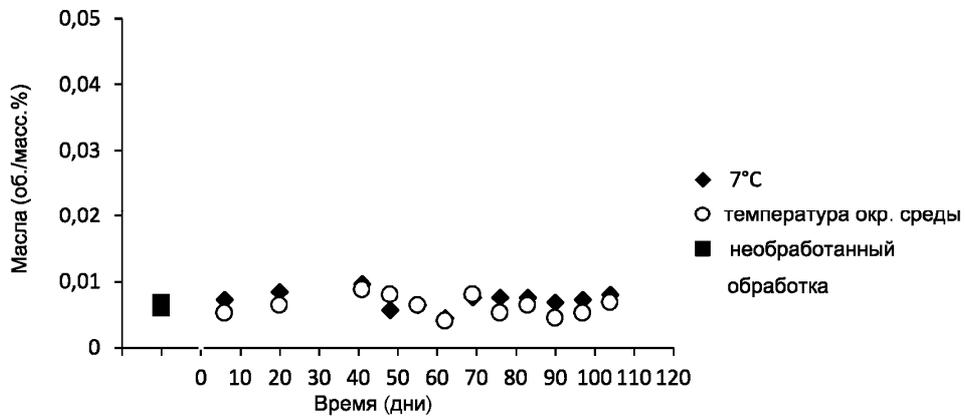
Фиг. 6



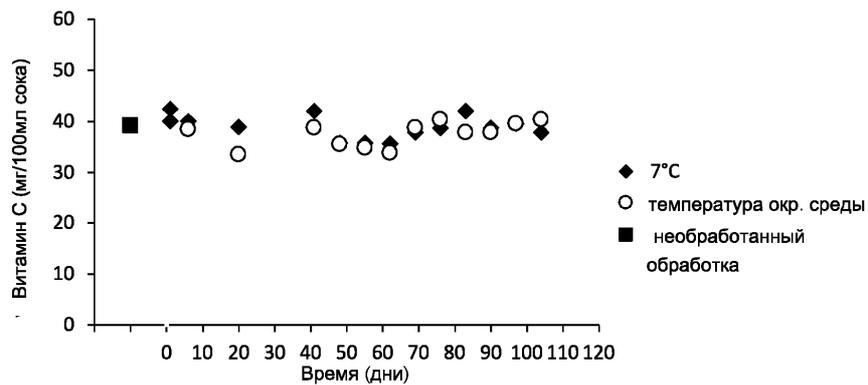
Фиг. 7



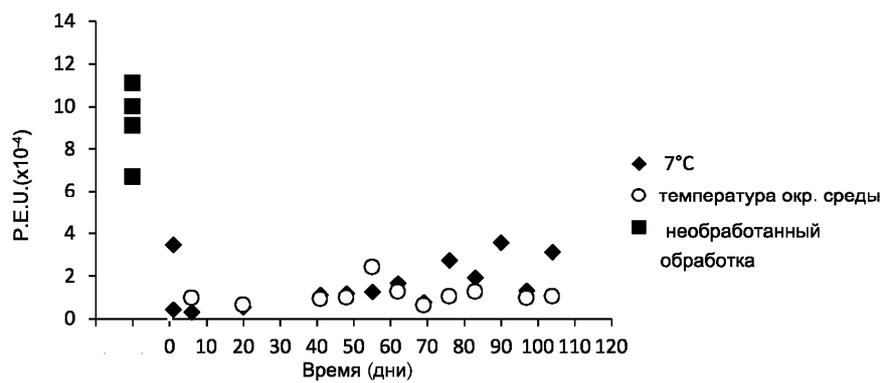
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

