

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. März 2011 (03.03.2011)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/023739 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A23L 3/32 (2006.01) A23C 3/08 (2006.01)
A23L 3/3454 (2006.01) A23L 2/44 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01) A23L 2/50 (2006.01)
A23L 3/3481 (2006.01) A23C 3/07 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/062436

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. August 2010 (26.08.2010)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
09169053.7 31. August 2009 (31.08.2009) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): LANXESS Deutschland GmbH [DE/DE];
51369 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÄBKER, Rebecca
[DE/DE]; Limpericher Str. 194, 53225 Bonn (DE). RIT-
ZER, Edwin [DE/DE]; Domblick 14, 51381 Leverkusen
(DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: LANXESS Deutschland
GmbH; 51369 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: METHOD FOR PRESERVING FOOD

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR KONSERVIERUNG VON LEBENSMITTELN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing microbially stabilized food, characterized in that a food product containing a dialkyl dicarbonate is treated by means of electroporation.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung von mikrobiell stabilisierten Lebensmitteln dadurch gekennzeichnet, dass man ein Lebensmittel, enthaltend ein Dialkyldicarbonat mittels Elektroporation behandelt.



WO 2011/023739 A1

Verfahren zur Konservierung von Lebensmitteln

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mikrobiell stabilisierten Lebensmitteln, insbesondere Getränken mittels Elektroporation.

Die Kaltentkeimung von Getränken ist in der Literatur vielfach beschrieben. Sie kann einerseits über
5 chemische Zusätze wie Konservierungsmittel oder durch physikalische Verfahren wie thermische Sterilisation realisiert werden. Nachteile dieser Verfahren sind häufig unerwünschter Geschmack durch die Zusätze und/oder Zerstörung oder Veränderung von wichtigen Inhaltsstoffen beispielsweise durch die thermischen Verfahren.

Die Verwendung von Kombinationen von einzelnen Konservierungsmitteln für Getränke ist bereits
10 bekannt. So wird in US-A- 5738888 Natamycin zusammen mit Dimethyldicarbonat (DMDC) zur Sterilisation von Getränken verwendet. In US-A-6136356 bedarf es gar einer Kombination von 3 Konservierungsmitteln wie Natamycin, Sorbat und Dimethyldicarbonat, um akzeptable Stabilisierungsergebnisse zu erzielen.

Natamycin ist ein Antimykotikum, wirkt also von daher hauptsächlich gegen Pilze. Gegenüber
15 Gärhefen, die sich durch gefährlichen Kohlendioxidruckaufbau bis zum Zerplatzen von Glasflaschen als Getränkeschädlinge auszeichnen, hat es dagegen eine unzureichende Wirksamkeit.

Aus US-A-6803064 sind Ca-haltige Getränke beschrieben, die auch konserviert werden können, wobei alternativ ein oder mehrere Konservierungsmittel wie Sorbate, Benzoate oder DMDC oder
20 Pasteurisierungsverfahren wie PEF eingesetzt werden können. Beispielfhaft kommt jedoch lediglich eine Mischung von K-Benzoesäure und K-Sorbat im Verhältnis 26:7 zur Konservierung zum Einsatz.

Auf der Suche nach Produkt schonenden Verfahren ist in US-A-2005/0112251 die Kombination von Elektroporationsverfahren wie der Pulsed Electric Field (PEF) Methode in Kombination mit persistenten Fungiziden wie Natamycin oder Sorbat beschrieben.

25 Nachteilig bei diesem Verfahren ist allerdings, dass die persistenten Konservierungsmittel allen voran Sorbinsäure, in solch hohen Konzentrationen eingesetzt werden, dass sie in vielen Ländern die gesetzlichen Höchstmengen für spezielle Lebensmittel übersteigen. Trotz der hohen Einsatzmengen an Konservierungsmitteln wurde beim Schimmelpilz nur eine Sporeneinsaat von 10^2 KBE/ mL (siehe Beispiel 2) und bei der vegetativen Hefe eine Keimeinsaat von nur 10^4 KBE/ mL (siehe Beispiel 2)
30 untersucht. Insbesondere die schwache Wirkung von Natamycin gegenüber Gärhefen kann zu den oben beschriebenen Nachteilen führen.

Auch WO03/070026 beschreibt die Kombination von persistenten Fungiziden wie Natamycin oder Sorbat/Sorbinsäure in Kombination mit der PEF-Methode. Bevorzugt wird beispielhaft das Natamycin verwendet, das aber neben den oben beschriebenen Nachteilen auch in einigen Länder wie bspw. in Deutschland im Hinblick auf seinen Einsatz auch in der Humanmedizin für den Lebensmittelbereich nur für spezielle Wurst- und Käsesorten zugelassen ist.

Als weitere bevorzugte Fungizide wird Sorbat/Sorbinsäure genannt, das aber in sehr großen Mengen von 500-2000 ppm empfohlen wird und auch in den Beispielen mit 800 ppm sehr hoch dosiert wird. Die in WO03/070026 eingesetzten Konservierungsmittel sind daher entweder in Getränken entweder nicht erwünscht oder selbst in Kombination mit PEF sehr hoch dosiert einzusetzen. Ähnliches findet sich für Kombinationen von PEF und bspw. Nisin für bestimmte Bakterienstämme in Galvez A., et al: „Bacteriocin-based strategies for food biopreservation“ International Journal of Microbiology, 2007, Seiten 51-70.

In US2008/311259 wird eine ganz andere Art der Sterilisation die Hochdruckpasteurisierung bei Getränken beschrieben, bei der auch chemische Konservierungsmittel mitverwendet werden können. Nachteilig bei der Hochdruck-Pasteurisierung ist die lange Behandlungszeit unter Hochdruck, was für Getränke in großen Abfüllanlagen zu zeitintensiv ist.

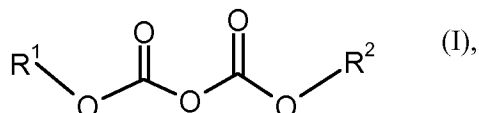
Aufgabe war es daher, ein Verfahren zur Stabilisierung von Lebensmitteln, insbesondere Getränken zu finden, das die beschriebenen Nachteile nicht aufweist und darüber hinaus nicht nur gegen Schimmelpilze und Hefen sondern auch gegen andere, vorzugsweise in Getränken vorkommenden Mikroorganismen eingesetzt werden kann.

Es wurde nun ein Verfahren zur Herstellung mikrobiell stabiler Lebensmittel, insbesondere Getränke gefunden, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein Lebensmittel, enthaltend Dialkyldicarbonat mittels Elektroporation behandelt.

Es wurde eine Wirkverstärkung gefunden, die überraschend ist. Während sich die Wirkung der auch oder ausschließlich an der Membran von Mikroorganismen reagierenden, persistenten Konservierungsmitteln wie Sorbate oder Natamycin durch den Einfluss von PEF verstärken lässt, wirkt DMDC erst nach dem Durchtritt durch die Membran im Inneren der Zelle durch Inaktivierung von Enzymen. Ein Prozess, der folglich nicht durch kurzzeitige, reversible Einflussnahme auf die Membran beeinflusst werden sollte. Die Wanderungsgeschwindigkeit von DMDC durch die Membran ist ungleich höher als die normalerweise im Millisekundenbereich liegende PEF Behandlung. Insofern war eine Wirkverstärkung nicht zu erwarten, wie bei den Konservierungsmitteln, die bereits an der Membranoberfläche ihre Wirkung entfalten (siehe auch

„Antimicrobials in Food“, P.M. Davidson, J.N. Sofos and A.L. Branen 2005, S. 49-50 (für Sorbate), S. 277 und 280 (für Natmycin) und S. 305 und 313 (für DMDC).,

Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Dialkyldicarbonat um eine Verbindung der Formel (I)



5 worin

R^1 und R^2 unabhängig voneinander für geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_8 -Alkyl, Cycloalkyl, C_2 - C_8 -Alkenyl, C_2 - C_8 -Alkynyl oder Benzyl stehen, welches jeweils gegebenenfalls ein- bis mehrfach, gleich oder verschieden substituiert ist durch Halogen, Nitro, Cyano, C_1 - C_6 -Alkoxy und/oder Dialkylamino, oder für Phenyl stehen, welches
10 gegebenenfalls ein bis mehrfach, gleich oder verschieden substituiert ist durch Halogen, Nitro, Cyano, Alkyl, Halogenalkyl, Alkoxy, Halogenalkoxy, Acyl, Acyloxy, Alkoxycarbonyl und/oder Carboxyl,

bevorzugt

R^1 und R^2 unabhängig voneinander für geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_8 -Alkyl, C_2 - C_8 -
15 Alkenyl oder Benzyl stehen,

besonders bevorzugt

R^1 und R^2 unabhängig voneinander für geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_5 -Alkyl, C_3 -Alkenyl
oder Benzyl stehen,

und ganz besonders bevorzugt

20 R^1 und R^2 unabhängig voneinander für Methyl, Ethyl, Isopropyl, tert.-Butyl, tert.-Amyl, Allyl
oder Benzyl stehen.

Ganz besonders bevorzugt ist als Dialkyldicarbonat Dimethyldicarbonat (DMDC).

Das Dialkyldicarbonat wird vorzugsweise in einer Menge von 1 bis 300 ppm, insbesondere von 10 bis 260 ppm, bezogen auf das Lebensmittel, insbesondere Getränk zugesetzt.

25 Die Substanzklasse der Dialkyldicarbonate hat die besondere Eigenschaft, in Kontakt mit entsprechenden (wässrigen) Lebensmitteln, insbesondere Getränken in die abgeleiteten Alkohole und

Kohlendioxid zu hydrolysieren. In Abhängigkeit von der Temperatur der Getränke während der Anwendung ist deshalb schon nach relativ kurzer Zeit die eigentlich aktive Substanz nicht mehr im Getränk vorhanden. Bei den üblichen Temperaturen der Kaltabfüllung von Getränken von 0 bis 25 °C ist dies nach einigen Stunden der Fall. Die Wirkung von Dialkyldicarbonaten durch verschiedene Methoden oder Kombinationen zu verbessern ist bereits in der Patentliteratur vielfach beschrieben
5 beispielsweise in DE-A-4434314, US-A-5738888, WO 200187096 oder US-A-2001046538.

Bei der Erfindung handelt es sich vorzugsweise um ein bei Raumtemperatur pumpbares Lebensmittel. Unter Lebensmittel werden im Rahmen der Erfindung Stoffe oder Erzeugnisse verstanden, die dazu bestimmt sind oder von denen nach vernünftigem Ermessen erwartet werden
10 kann, dass sie in verarbeitetem, teilweise verarbeitetem oder unverarbeitetem Zustand von Menschen aufgenommen werden. Zu „Lebensmitteln“ zählen auch Getränke, Kaugummi sowie alle Stoffe - einschließlich Wasser -, die dem Lebensmittel bei seiner Herstellung oder Ver- oder Bearbeitung absichtlich zugesetzt werden.

Besonders bevorzugte Lebensmittel sind Getränke, insbesondere Tee-basierte Getränke, einschließlich grünem Tee, schwarzem Tee sowie anderen Tee-Sorten, sowie um sauer eingestellte Getränke, insbesondere mit einem $\text{pH} \leq 4.2$, karbonisierte und nicht-carbonisierte alkoholfreie Erfrischungsgetränke, Fruchtsäfte, Fruchtnektare, Fruchtsaft-haltige Getränke, Frucht-zubereitungen, Weine, alkoholfreie Getränke, Ciders, Eistees, alkoholische Mischgetränke, aromatisierte Wässer oder Sportgetränke bzw. isotonische Getränke.

Weiterhin bevorzugt ist es, keine oder weitere antimikrobiell wirkende Stoffe, insbesondere persistente Konservierungsmittel, vorzugsweise ausgenommen Natamycin, mit zu verwenden. Es ist daher bevorzugt, dass dem zu behandelnden Lebensmittel, insbesondere Getränk weitere dieser Stoffe, insbesondere zusätzlich wenigstens ein weiteres antimikrobiell wirkendes Konservierungsmittel aus der Gruppe der polyenen Antimykotika, wie beispielsweise Nystatin,
25 Lucensomycin oder Amphotericin B, organischen Säuren, wie beispielsweise Benzoesäure, Sorbinsäure, Propionsäure, oder Milchsäure, Salze der genannten Säuren, wie beispielsweise Benzoate, Sorbate, Propionate oder Laktate Imidazole oder deren Salze, insbesondere Imazalil, Schwefeldioxid, EDTA und Lysozym zugegeben werden. Besonders bevorzugt sind Natriumbenzoat und Kaliumsorbit. Bevorzugt ist es im Fall einer Mitverwendung weiterer antimikrobiell wirkender
30 Konservierungsmittel solche einzusetzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzoesäure, Sorbinsäure, Propionsäure, oder Milchsäure, Salze der genannten Säuren, wie beispielsweise Benzoate, Sorbate, Propionate oder Laktate Imidazole oder deren Salze, insbesondere Imazalil, Schwefeldioxid, EDTA und Lysozym.

Ganz bevorzugt ist es im Fall einer Mitverwendung weiterer antimikrobiell wirkender Konservierungsmittel solche einzusetzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzoesäure, Sorbinsäure, Propionsäure, oder Milchsäure, Benzoate, insbesondere Natriumbenzoat, Sorbate, insbesondere Kaliumsorbat, Propionate und Laktate.

- 5 Besonders bevorzugt ist es im Fall einer Mitverwendung weiterer antimikrobiell wirkender Konservierungsmittel solche einzusetzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Natriumbenzoat und Kaliumsorbat.

Bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren bei dem keine weiteren antimikrobiell wirkenden Stoffe dem Lebensmittel zugegeben wird.

- 10 Vorzugsweise enthält das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zu behandelnde Lebensmittel, insbesondere Getränk wenigstens ein weiteres antimikrobiell wirkendes Konservierungsmittel, insbesondere eines aus der oben genannten Gruppe.

- Im Falle einer Mitverwendung von weiteren antimikrobiell wirkenden Stoffen werden diese vorzugsweise in einer Menge von (bei Salzen bezogen auf die freie Säure) 1 bis 2000 ppm, insbesondere von 25 bis 500 ppm, vorzugsweise 25 bis kleiner 500 ppm, bezogen auf das Lebensmittel, insbesondere Getränk eingesetzt.
- 15

- Die Zugabe der Dialkyldicarbonate, insbesondere von Dimethyldicarbonat erfolgt üblicherweise in flüssiger Form, portionsweise oder kontinuierlich zu dem Lebensmittel, insbesondere Getränk. Bevorzugt ist es, dass die Zugabe von Dialkyldicarbonat vorzugsweise kontinuierlich mittels einer Düse, insbesondere mit einem Druck von 0,1 bis 40bar, vorzugsweise von 0,5 bis 40 bar, insbesondere 10 bis 35 bar gegenüber dem Getränkedruck erfolgt. Insbesondere DMDC wird bevorzugt mittels einer Dosierpumpe über eine beheizte Düse, in den Getränkestrom verdüst. Verbesserungen entsprechender Pumpen wurden in der Patentliteratur beschrieben beispielsweise in der DE-A-2910328 oder in der DE-A-2930765. Verbesserungen der Düse bzw. der davor liegenden Mischkammer wurden beispielsweise in der DE-A-1557043 beschrieben. Entsprechende Dosiervorrichtungen bestehen üblicherweise aus Vorratsgefäßen, elektromagnetisch betriebener Dosierpumpe, Eindüsbereich und einem elektronisch gekoppelten induktiven Durchflussmessgerät, sowie selbstverständlich Ansaugvorrichtungen, Belüftung bzw. Temperierung, Verbindungen, Ventilen, Sensoren etc. samt verbindenden und steuernden Elektronikelementen. Die Dosierleistungen der Pumpen betragen üblicherweise 0,1 bis 20 Liter DMDC pro Stunde.
- 20
- 25
- 30

Die Zugabe von Dialkyldicarbonat, insbesondere DMDC zum Lebensmittel, insbesondere Getränk erfolgt vorzugsweise bei einer Temperatur von -5 bis 30°C, insbesondere bei 0 bis 25°C, besonders bevorzugt bei 5 bis 22°C.

Bei Mitverwendung von weiteren antimikrobiell wirkenden Stoffen kann diese entweder getrennt oder
5 gemeinsam mit dem Dimethyldicarbonat zum Getränk erfolgen.

Bevorzugt erfolgt nach der Zugabe des anderen antimikrobiell wirkenden Stoffes die Zugabe der Dialkyldicarbonatverbindung.

Aufgrund des Zerfalls der Dialkyldicarbonatverbindung im Lebensmittel, insbesondere Getränk ist es bevorzugt, nach der Zugabe der Dialkyldicarbonatverbindung die Elektroporation möglichst kurz
10 danach anzuschließen. So erfolgt bevorzugt weniger als 15 Minuten nach der Dialkyldicarbonat-Zugabe, vorzugsweise nach weniger als 5 Minuten, die Elektroporation. Die Elektroporation, insbesondere das als PEF (pulsed electric field) bekannte Verfahren, das auch als high intensity pulsed electric field bezeichnet wird, im Sinne der Erfindung ist ein Verfahren, das vorzugsweise dadurch gekennzeichnet ist, dass man gepulste elektrischer Felder auf das Lebensmittel einwirken
15 lässt. Verfahrensparameter sind primär die elektrische Feldstärke und der Elektroenergieeintrag.

Bei dem Elektroporations-Verfahren PEF werden Lebensmittel mit Hochspannungspulsen vorzugsweise mit Feldstärken von 0,5 bis 100 kV/cm zwischen zwei Elektroden behandelt. Das PEF-Verfahren wird vorzugsweise bei -10 bis 60 °C, insbesondere bei 15 bis 25°C durchgeführt. Das Lebensmittel ist dabei vorzugsweise für weniger als 1 s der Energie ausgesetzt, wobei die
20 Erhitzung des Lebensmittels minimiert wird. Im Gegensatz zu den thermischen Verfahren wird die PEF- Technologie als besseres Verfahren betrachtet, da hierdurch die sensorischen und physikalischen Eigenschaften von Lebensmitteln nicht oder nur kaum beeinflusst werden

Die hohe Feldstärke bei der PEF Technologie wird im allgemeinen dadurch erreicht, dass ein großer Teil der Energie in einer Kondensatorbank eines Gleichstromnetzteils gespeichert wird, welches sich
25 dann in Form von Hochspannungspulsen entlädt.

Beispiele solcher PEF-Geräte, bzw. der Beschreibung ihrer Funktionsweise können beispielsweise der DE-A-3413583 entnommen werden.

Bei der Elektroporation, insbesondere dem PEF-Verfahren kommen erfindungsgemäß vorzugsweise Energiedichten von 1 bis 1000 J/ml Lebensmittel, insbesondere Getränk zum Einsatz, vorzugsweise
30 15 bis 200 J/ml. Für das erfindungsgemäße Verfahren sind Feldstärken von vorzugsweise 0,5 bis

100 kV/cm, insbesondere 3 bis 50 kV/cm vorteilhaft. Die Frequenz der elektrischen Impulse beträgt vorzugsweise 10 bis 800 Hz, vorzugsweise 60 bis 500 Hz.

Die Dauer der Pulse (Pulsbreite) beträgt vorzugsweise 1 bis 100 μ s, insbesondere 5 bis 50 μ s.

Die Energiedichte ist dabei wie folgt definiert.

5

$$\text{Energiedichte} = \frac{3600 * \text{Wirkungsgrad} * \text{aufgenommene Leistung} [W]}{\text{Durchfluss} [l/h] * 1000}$$

Der Wirkungsgrad beträgt beispielsweise bei dem in den Beispielen eingesetzten Elcrack[®]-Gerät ca. 85 %. Die aufgenommene Leistung in Watt wurde während des Behandlungsverfahrens vom PEF-Gerät abgelesen. Der Durchfluss betrug 70 l/h.

10

Das behandelte Lebensmittel, insbesondere Getränk wird in der Regel in Abhängigkeit von dem Elektroenergieeintrag um ca. 1 bis 20°C erwärmt.

15

Besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren gegen folgende Stämme eingesetzt: Bakterien (z. B. *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Acetobacter* spp., *Gluconacetobacter* spp., *Alicyclobacillus* spp.), Hefen (z. B. *Saccharomyces* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Trichoderma* spp., *Candida* spp., *Brettanomyces* spp., *Pichia* spp.) und Schimmel (z. B. *Penicillium* spp., *Byssoschlamys* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.). Überraschenderweise wurde gefunden, dass das erfindungsgemäße Verfahren zu einer deutlichen Verbesserung der Entkeimung führt, was zur Folge hat, dass entweder höhere Anfangsverkeimungen von Getränken mit gleichen Mengen an Dialkyldicarbonat ggf. in Kombination mit persistenten Konservierungsmitteln bekämpft werden können oder bei normaler Verkeimung geringe Mengen bereits ausreichen.

20

25

Das erfindungsgemäße Verfahren hat somit den Vorteil Mikroorganismen effektiv zu bekämpfen, ohne bzw. ohne hohe und ggf. gar nicht zugelassene Mengen an persistenten Konservierungsmitteln auszukommen.

30

Zusätzlich wurde gefunden, dass Bakteriensporen und Bakterien, die Schleimbildner sind und somit in der Lage, Biofilme zu produzieren, welche große Probleme in der Lebensmittelindustrie darstellen (z.B. *Lactobacillus frigidus*) effektiv bekämpft werden können. Außerdem wurden endosporenbildende Bakterien am Beispiel von *Bacillus subtilis* untersucht. Endosporen sind Überdauerungsformen von Bakterien (z. B. *Bacillus*, *Clostridium*), die im Vergleich zu vegetativen

Bakterienzellen in der Regel 100°C mehrere Stunden überdauern können und erst nach einer mehrere Minuten langen Erhitzung auf 120°C sicher abgetötet werden. Auch gegen diese Mikroorganismen konnte das erfindungsgemäße Verfahren erfolgreich eingesetzt werden.

Beispiele:

In den folgenden Beispielen wurde für die PEF-Behandlung das Gerät Elcrack® des Deutschen Instituts für Lebensmitteltechnik e. V. eingesetzt.

Die Behandlungszelle des Gerätes hatte dabei einen Durchmesser von 5 mm und einen
5 Elektrodenabstand von 7 mm. Die Behandlung erfolgte bei unterschiedlichen Feldstärken und Energiedichten, wobei die Pulsbreite 20 µs und die Pulsfrequenz 400 Hz betrugen.

In den nachfolgenden Beispielen wurde jeweils klarem Apfelsaft unter Rühren mittels eines Propellerrührers eine Keim- bzw. Sporensuspension, dann nach ca. 3 Minuten ggf. weitere antimikrobiell wirksamen Stoffe und danach nach ca. 2 Minuten DMDC. Die Keim- bzw.
10 Sporensuspension wurde so zugesetzt, dass sich im Apfelsaft eine bestimmte Menge an Zellen in der Regel 10^3 bis 10^5 KBE/ mL befanden.

Der Apfelsaft wurde danach PEF behandelt (mit dem oben beschriebenen Elcrack® Gerät). Als weitere mikrobiell wirksame Stoffe kamen Natriumbenzoat bzw. Kaliumsorbat zum Einsatz.

Bei unterschiedlichen Energiedichten und Feldstärken wurden die in der Tabelle angegebenen
15 Temperaturen der endbehandelten Getränke festgestellt.

Als Maß für die Keimreduzierung wurde die mittlere logarithmische Keimreduzierung (MLK) bestimmt. Hierbei wird der Logarithmus der Überlebendkeimzahl vom Logarithmus der Anfangskeimzahl subtrahiert. Je höher der MLK-Wert, desto höher die Keimreduzierung und desto besser die Wirkung.

20 V steht für Vergleichsbeispiel

Die verwendeten Mikroorganismen waren die folgenden.

A: *Bacillus subtilis* DSM 347 (ATCC 6633)

B: *Penicillium roqueforti* DSM 1079 (ATCC 34908)

C: *Lactobacillus frigidus* DSM 6235

25 D: *Saccharomyces cerevisiae* DSM 70449 (ATCC 18824)

Tabelle:

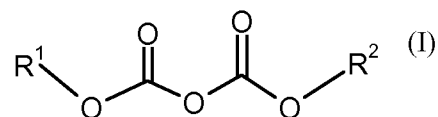
Bsp.	Mikroorganismus	[KBE/ mL]	Antimikrobiell wirkender Stoff/ Menge in ppm 1)	Feldstärke [kV/ cm]	Energiedichte [J/ mL]	Temperatur nach Behandlung	MLK/ Zeit 2)
A1	<i>Bacillus subtilis</i>	10 ³	DMDC/ 250	35	111	36°C	2.2/ 24 h
A2	„	10 ³	DMDC/ 250 Benzoat/ 150	35	110	36°C	3.0/ 24 h
A3	„	10 ³	DMDC/ 250 Sorbit/ 300	35	116	36°C	2.1/ 24 h
A4	„	10 ³	DMDC/ 250	15	23	25°C	1.4/ 24 h
A5	„	10 ³	DMDC/ 250	35	111	36°C	3.0/ 1 Woche
VA1	„	10 ³	Benzoat/ 150	35	111	36°C	2.0/ 24 h
VA2	„	10 ³	Sorbit/ 300	35	116	36°C	0.5/ 24 h
VA3	„	10 ³	- / -	35	111	36°C	2.7/ 1 Woche
VA4	„	10 ³	- / -	-	-	21°C	Keine; total verkeimt
B1	<i>Penicillium roqueforti</i>	10 ⁵	DMDC/ 250	30	94	32°C	mind. 7/ 24 h
B2	„	10 ⁵	DMDC/ 250 Benzoat/ 150	30	103	32°C	mind. 7/ 24 h
B3	„	10 ⁵	DMDC/ 250 Sorbit/ 300	30	104	32°C	mind. 7/ 24 h
B4	„	„	DMDC/ 250 Sorbit/ 300	30	104	32°C	mind. 7/ 4 Wochen
B5	„	„	DMDC/ 250	30	94	32°C	mind. 7/ 4 Wochen
VB1	„	10 ⁵	DMDC/ 250	-	-	21°C	6.4/ 24 h
VB2	„	10 ⁵	- / -	30	98	32°C	Kein; großes Keimwachstum/ 24 h
VB3	„	„	Benzoat/ 150	30	99	32°C	„
VB4	„	„	Sorbit/ 300	30	104	32°C	„
VB5	<i>Penicillium roqueforti</i>	10 ⁵	- / -	30	98	32°C	Keine; großes Keimwachstum/ 4 Wochen
C1	<i>Lactobacillus frigidus</i>	10 ⁵	DMDC/ 250	30	93	32°C	3.6/ 1 Woche
C2	„	„	DMDC/ 250 Benzoat / 150	30	92	32°C	3.5/ 1 Woche
C3	„	„	DMDC/ 250 Sorbit/ 300	30	91	32°C	3.6/ 1 Woche
VC1	„	„	DMDC/ 250	-	-	21°C	2.3 / 1 Woche
VC2	„	„	Benzoat/ 150	30	88	32°C	2.8/ 1 Woche
VC3	„	„	Sorbit/ 300	30	91	32°C	3.0/ 1 Woche
VC4	„	„	- / -	30	83	32°C	3.4/ 1 Woche
VC5	„	„	- / -	-	-	21°C	2.3 / 1 Woche
D1	<i>Saccharomyces cerivisiae</i>	10 ⁵	DMDC/ 250	5	3	22°C	min 7/ 24 h
D2	„	„	DMDC/ 250 Benzoat/ 150	5	3	22°C	min 7/ 24 h
D3	„	„	DMDC/ 250 Sorbit/ 300	5	3	22°C	min 7/ 24 h

VD1	„	„	- / -	5	2	22°C	Keine; großes Keimwachstum/ 24 h
VD2	„	„	Benzoat/ 150	5	3	22°C	„
VD3	„	„	Sorbat/ 300	5	6	22°C	„

- 1) Menge Sorbat und Benzoat sind jeweils als freie Säure angegeben
- 2) Für den Wert „mind. 7“ gilt: Die Keimeinsaat bei den vegetativen Zellen betrug 10^5 KBE/mL. Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden 100 mL der Probe membranfiltriert und analysiert, weshalb sich dann ein Wert von mind. 7 ergibt, da nichts gewachsen war.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von mikrobiell stabilisierten Lebensmitteln dadurch gekennzeichnet, dass man ein Lebensmittel, enthaltend ein Dialkyldicarbonat mittels
5 Elektroporation behandelt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Dialkyldicarbonat um eine Verbindung der Formel (I) handelt



worin

- 10 R^1 und R^2 unabhängig voneinander für geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_8 -Alkyl, Cycloalkyl, C_2 - C_8 -Alkenyl, C_2 - C_8 -Alkinyl oder Benzyl stehen, welches jeweils gegebenenfalls ein- bis mehrfach, gleich oder verschieden substituiert ist durch Halogen; Nitro; Cyano; C_1 - C_6 -Alkoxy; Dialkylamino; oder für
15 Phenyl stehen, welches gegebenenfalls ein bis mehrfach, gleich oder verschieden substituiert ist durch Halogen; Nitro; Cyano; Alkyl; Halogenalkyl; Alkoxy; Halogenalkoxy; Acyl; Acyloxy; Alkoxycarbonyl; Carboxyl,

bevorzugt

- 20 R^1 und R^2 unabhängig voneinander für geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_8 -Alkyl, C_2 - C_8 -Alkenyl oder Benzyl stehen,

besonders bevorzugt

- R^1 und R^2 unabhängig voneinander für geradkettiges oder verzweigtes C_1 - C_5 -Alkyl, C_3 -Alkenyl oder Benzyl stehen,

und ganz besonders bevorzugt

R^1 und R^2 unabhängig voneinander für Methyl, Ethyl, Isopropyl, tert.-Butyl, tert.-Amyl, Allyl oder Benzyl stehen.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Dialkyldicarbonat um Dimethyldicarbonat handelt.
- 5 4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Lebensmittel um ein Getränk handelt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Lebensmittel um Tee-basierte Getränke, einschließlich grünem Tee, schwarzem Tee sowie anderen Tee-Sorten, sowie um sauer eingestellte Getränke mit einem $\text{pH} \leq 4.2$, karbonisierte und nicht-carbonisierte alkoholfreie Erfrischungsgetränke, Fruchtsäfte, Fruchtnektare, Fruchtsaft-haltige Getränke, Fruchtzubereitungen, Weine, alkoholfreie Getränke, Ciders, Eistees, alkoholische Mischgetränke, aromatisierte Wässer, Sportgetränke oder isotonische Getränke handelt.
- 10 6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass dem zu behandelnden Lebensmittel zusätzlich ein weiteres antimikrobiell wirkendes Konservierungsmittel zugegeben wird.
- 15 7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass dem zu behandelnden Lebensmittel zusätzlich wenigstens ein weiteres antimikrobiell wirkendes Konservierungsmittel aus der Gruppe Benzoesäure, Benzoate, Sorbinsäure, Sorbate, Propionsäure, Propionate, Nisin, Schwefeldioxid, EDTA und Lysozym zugegeben wird.
- 20 8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die mittels Elektroporation ins Lebensmittel Getränk eingebrachte Energiedichte 1 bis 1000 J/ml beträgt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Elektroporation das pulsed electric field-Verfahren eingesetzt wird.
- 25 10. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Dialkyldicarbonat in einer Menge von 10 bis 250 ppm, bezogen auf das Lebensmittel, insbesondere Getränk zugesetzt wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/062436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A23L3/32 A23L3/3454 A23L3/3463 A23L3/3481 A23C3/08
 A23L2/44 A23L2/50 A23C3/07

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, FSTA, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/070026 A (DSM IP ASSETS BV [NL]; STARK JACOBUS [NL]; DUTREUX NICOLE LILIANE [NL]) 28 August 2003 (2003-08-28) cited in the application pages 1-6; claims 4,6,10,14-17; examples 4,7,10	1-10
Y	US 2008/311259 A1 (SINGH PREM S [US] ET AL) 18 December 2008 (2008-12-18) paragraphs [0009], [0011], [0025] - [0027]; claims 10,13	1-10
Y	US 6 136 356 A (BUNGER JOHN ROBERT [US] ET AL) 24 October 2000 (2000-10-24) cited in the application columns 4-5; claims; examples	1-10
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2010

Date of mailing of the international search report

29/09/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muller, Isabelle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/062436

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 738 888 A (CIRIGLIANO MICHAEL CHARLES [US] ET AL) 14 April 1998 (1998-04-14) cited in the application columns 2-4; claims 1,2,10,11 -----	1-10
Y	US 6 803 064 B1 (GIVEN PETER [US] ET AL) 12 October 2004 (2004-10-12) column 4, line 33 - column 5, line 6; claims 8,9,14,15 -----	1-10
A	GALVEZ A; ABRIQUEL H; LUCAS-LOPEZ R; BEN OMRAR N.: "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation" INTERNATIONAL JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 2007, pages 51-70, XP002556769 item 3.4; pages 58-60 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/062436

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03070026	A	28-08-2003	AU 2003210351 A1 BR 0307583 A US 2005112251 A1 ZA 200405946 A	09-09-2003 01-02-2005 26-05-2005 29-09-2005
US 2008311259	A1	18-12-2008	NONE	
US 6136356	A	24-10-2000	AU 6512898 A BR 9809000 A CA 2285462 A1 CN 1257409 A EP 0977499 A1 WO 9848649 A1 JP 2001523107 T US 2001046538 A1 US 6132787 A	24-11-1998 08-08-2000 05-11-1998 21-06-2000 09-02-2000 05-11-1998 20-11-2001 29-11-2001 17-10-2000
US 5738888	A	14-04-1998	NONE	
US 6803064	B1	12-10-2004	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/062436

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. A23L3/32 A23L3/3454 A23L3/3463 A23L3/3481 A23C3/08
A23L2/44 A23L2/50 A23C3/07

ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

A23L A23C

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, FSTA, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 03/070026 A (DSM IP ASSETS BV [NL]; STARK JACOBUS [NL]; DUTREUX NICOLE LILIANE [NL]) 28. August 2003 (2003-08-28) in der Anmeldung erwähnt Seiten 1-6; Ansprüche 4,6,10,14-17; Beispiele 4,7,10	1-10
Y	US 2008/311259 A1 (SINGH PREM S [US] ET AL) 18. Dezember 2008 (2008-12-18) Absätze [0009], [0011], [0025] - [0027]; Ansprüche 10,13	1-10
Y	US 6 136 356 A (BUNGER JOHN ROBERT [US] ET AL) 24. Oktober 2000 (2000-10-24) in der Anmeldung erwähnt Spalten 4-5; Ansprüche; Beispiele	1-10
	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. September 2010

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/09/2010

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Muller, Isabelle

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 738 888 A (CIRIGLIANO MICHAEL CHARLES [US] ET AL) 14. April 1998 (1998-04-14) in der Anmeldung erwähnt Spalten 2-4; Ansprüche 1,2,10,11 -----	1-10
Y	US 6 803 064 B1 (GIVEN PETER [US] ET AL) 12. Oktober 2004 (2004-10-12) Spalte 4, Zeile 33 - Spalte 5, Zeile 6; Ansprüche 8,9,14,15 -----	1-10
A	GALVEZ A; ABRIQUEL H; LUCAS-LOPEZ R; BEN OMRAR N.: "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation" INTERNATIONAL JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 2007, Seiten 51-70, XP002556769 item 3.4; Seiten 58-60 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/062436

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03070026	A	28-08-2003	AU 2003210351 A1 09-09-2003
			BR 0307583 A 01-02-2005
			US 2005112251 A1 26-05-2005
			ZA 200405946 A 29-09-2005
US 2008311259	A1	18-12-2008	KEINE
US 6136356	A	24-10-2000	AU 6512898 A 24-11-1998
			BR 9809000 A 08-08-2000
			CA 2285462 A1 05-11-1998
			CN 1257409 A 21-06-2000
			EP 0977499 A1 09-02-2000
			WO 9848649 A1 05-11-1998
			JP 2001523107 T 20-11-2001
			US 2001046538 A1 29-11-2001
			US 6132787 A 17-10-2000
US 5738888	A	14-04-1998	KEINE
US 6803064	B1	12-10-2004	KEINE