

LA STABILIZZAZIONE DEGLI ALIMENTI MEDIANTE IL CALORE

L'APPERTIZZAZIONE

Tra i procedimenti di conservazione degli alimenti quello che consiste nell'inserirli in un recipiente chiuso ermeticamente, e nel sottoporli ad un riscaldamento che assicuri la distruzione o l' inattivazione dei microrganismi e degli enzimi suscettibili di alterarli, è uno dei più impiegati.

APPERTIZZAZIONE

ideata all'inizio dell' 800 da Nicolas Appert più di 50 anni prima delle scoperte di Pasteur e della nascita della microbiologia

Per prodotti “*appertizzati*” si intendono quelle derrate alimentari deperibili di origine vegetale o animale, la cui conservazione è assicurata dall'impiego combinato del confezionamento in **recipiente ermetico** ai gas ed ai microrganismi e del successivo **trattamento con calore**. Questo trattamento deve avere per effetto la distruzione e l'inibizione totale sia degli **enzimi** che dei **microrganismi** e delle loro **tossine**, la cui presenza o proliferazione potrebbe alterare la derrata o renderla inadatta all'alimentazione umana.

- Un primo trattamento termico che si effettua sulle materie prime che hanno subito le prime operazioni di preparazione alla lavorazione quali cernita, pulitura e lavaggio, pelatura, taglio, ecc. è il:

BLANCHING O SCOTTATURA

➤ questo trattamento ha lo scopo principale di distruggere enzimi e microrganismi non termoresistenti per garantire la stabilità del prodotto nei riguardi delle alterazioni più rapide ed immediate.

Es: - la disattivazione termica degli enzimi pectolitici nella preparazione delle passate di pomodoro
- la disattivazione degli enzimi che possono provocare imbrunimenti nella preparazione di conserve di frutta e ortaggi.

- Dopo il "blanching" il processo può essere condotto in due diversi modi:
1. condizionando il prodotto in contenitori ermetici e sottoponendolo poi a trattamento termico
 2. trattando il prodotto allo stato sfuso e condizionandolo poi a freddo, eventualmente in condizioni asettiche, in contenitori sterili.



CONFEZIONAMENTO
ASETTICO

Il trattamento termico può essere realizzato in modo da garantire una stabilità limitata nel tempo o, invece, una stabilità limitata molto lunga, fino a diversi anni

➤ Dipendentemente dalle temperature utilizzate si distinguono (distinzione tecnica):

1. La pastorizzazione: ottenuta a temperature \leq a 100 °C consente la distruzione di **forme microbiche non sporigene e di enzimi termolabili**. Porta ad una conservazione limitata nel tempo, nel caso di prodotti non acidi (pH > 4.5); per prodotti acidi (pH < 4.5), nei quali non è possibile lo sviluppo di forme microbiche sporigene, la conservabilità non si differenzia da quella di un prodotto sterilizzato.
2. La sterilizzazione: condotta a temperature > di 100° C, fino a 150°C. Ha per scopo la **distruzione di tutti i microrganismi ed enzimi**. Un prodotto sterilizzato può essere conservato per tempi molto lunghi, anche anni, purché venga garantito il perfetto isolamento del prodotto dalle contaminazioni dell'ambiente.

➤ I processi di *pastorizzazione* e di *sterilizzazione* sono condotti secondo principi del tutto analoghi, e in particolare sulla conoscenza delle caratteristiche di resistenza termica di forme vegetative e spore microbiche.

LA DISTRUZIONE DEI MICROORGANISMI PER MEZZO DEL CALORE

L'esperienza mostra che a una data temperatura sufficientemente elevata da esercitare un effetto nocivo o mortale, la distruzione dei microrganismi per mezzo del calore, ad esempio di una popolazione di spore in sospensione omogenea in un mezzo, può essere data da:

$$dN / dt = - k N$$

N = concentrazione microbica (numero di microrganismi viventi per unità di peso o di volume)

k = costante di velocità della distruzione (sec⁻¹)

t = tempo

- il segno negativo indica che si tratta di una diminuzione, cioè N diminuisce all'aumentare del tempo t;
- dN / dt rappresenta la variazione del numero delle cellule batteriche (spore, forme vegetative) rispetto al tempo;
- k nelle date condizioni del mezzo (*pH, temperatura, composizione, ecc.*) dà una misura della **facilità di distruzione**.

Si nota che la distruzione dei microrganismi è direttamente proporzionale al numero dei microrganismi presenti
→ → **cinetica di reazione del 1° ordine** rispetto a questo numero.

L'equazione $dN / dt = - kN$ può essere integrata nei limiti:

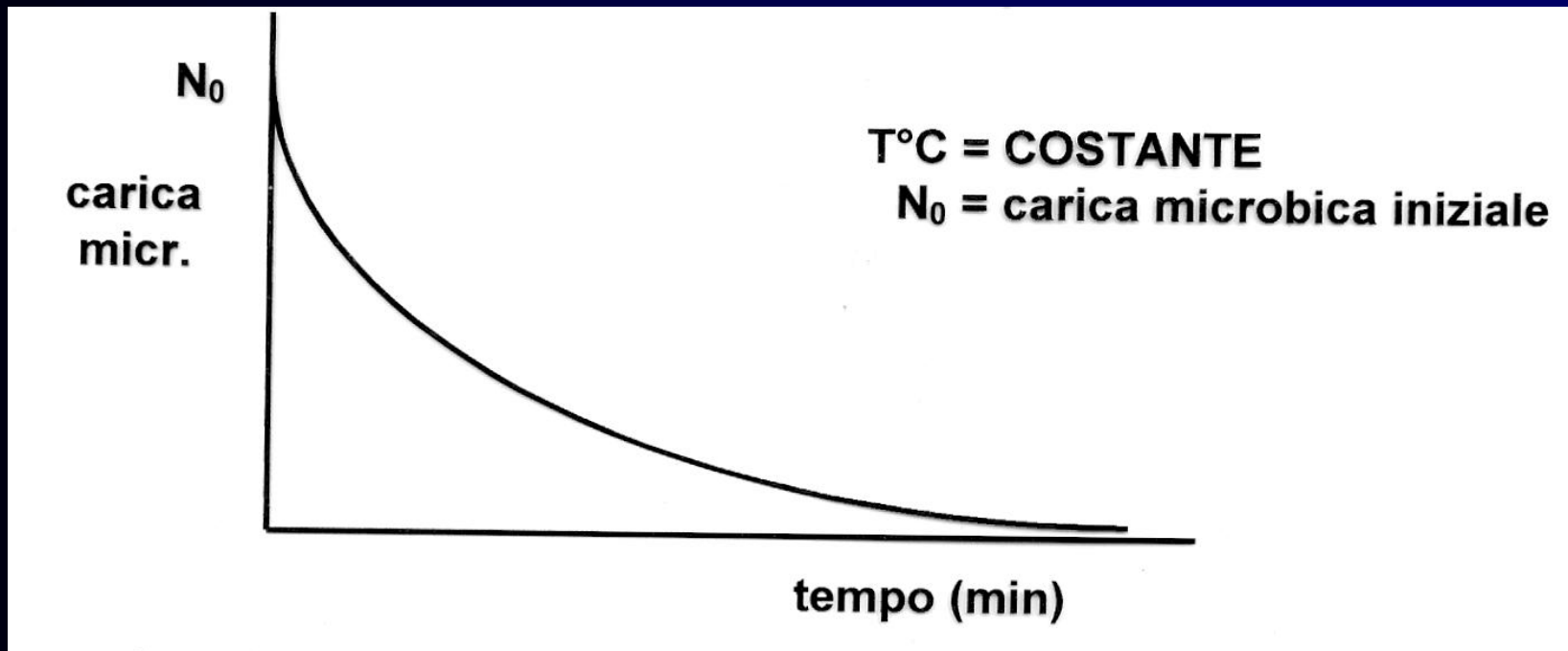
$N = N_0$ per $t = 0$ e

$N = N$ per $t = t$

ottenendo:

$$N = N_0 e^{-k t}$$

che da origine alla **curva di decremento esponenziale**:



- il grafico mostra che in teoria non si raggiunge mai la sterilità assoluta (sterilità commerciale, 12 MBC). In pratica si ragiona in termini di probabilità (1 confezione inquinata su 10^{12} confezioni).
- la probabilità di trovare ancora dei microrganismi viventi diventa estremamente bassa via via e nella misura in cui il trattamento termico viene prolungato.

Passando ai logaritmi naturali

$$\ln N/N_0 = -k t$$

e passando ai logaritmi decimali

$$\log N/N_0 = -k t / 2,303$$

↓
e

➤ questa relazione permette di calcolare la concentrazione microbica **N** che risulta dall'applicazione di una temperatura letale per un tempo t , noti la concentrazione iniziale N_0 ed il valore della costante di velocità k .

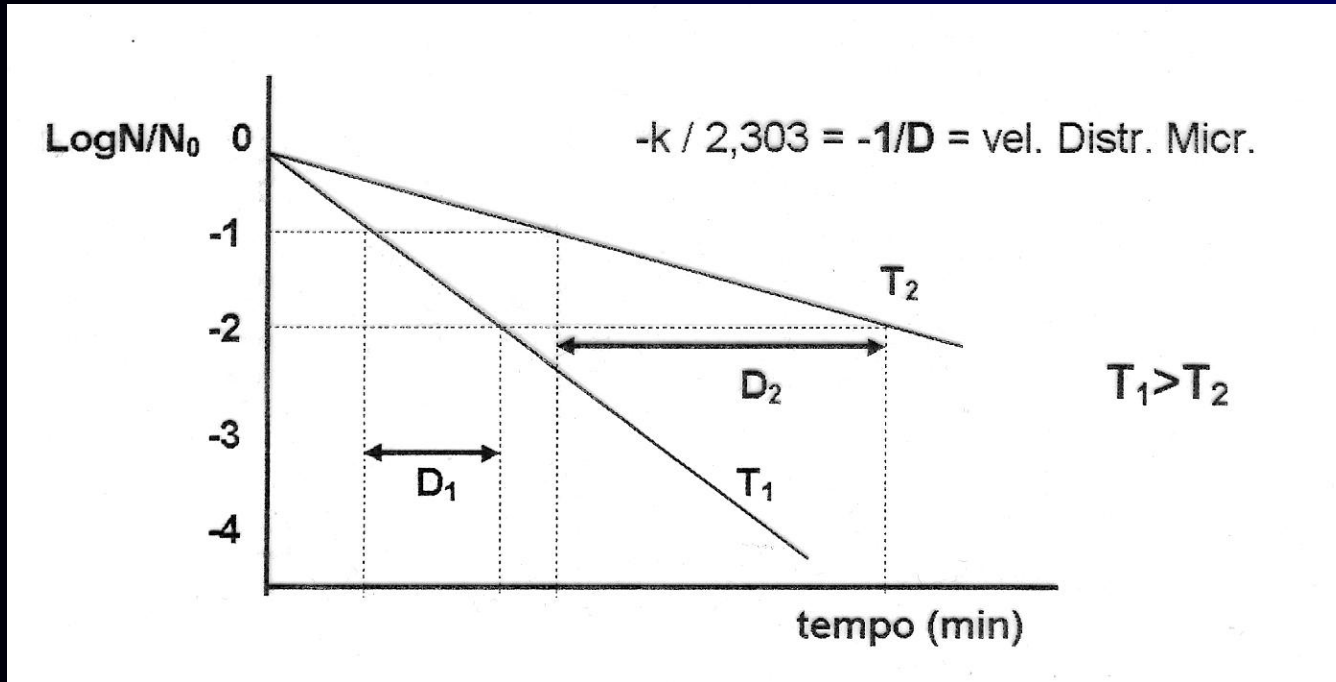
ponendo $k / 2,303 = 1 / D$

dove D sarà anch'essa una costante


$$\log N = \log N_0 - (t / D)$$

(1^a legge di BIGELOW)

Quest' ultima equazione rappresenta una retta in un grafico $\log N = f(t)$ o anche $\log N/N_0 = f(t)$.

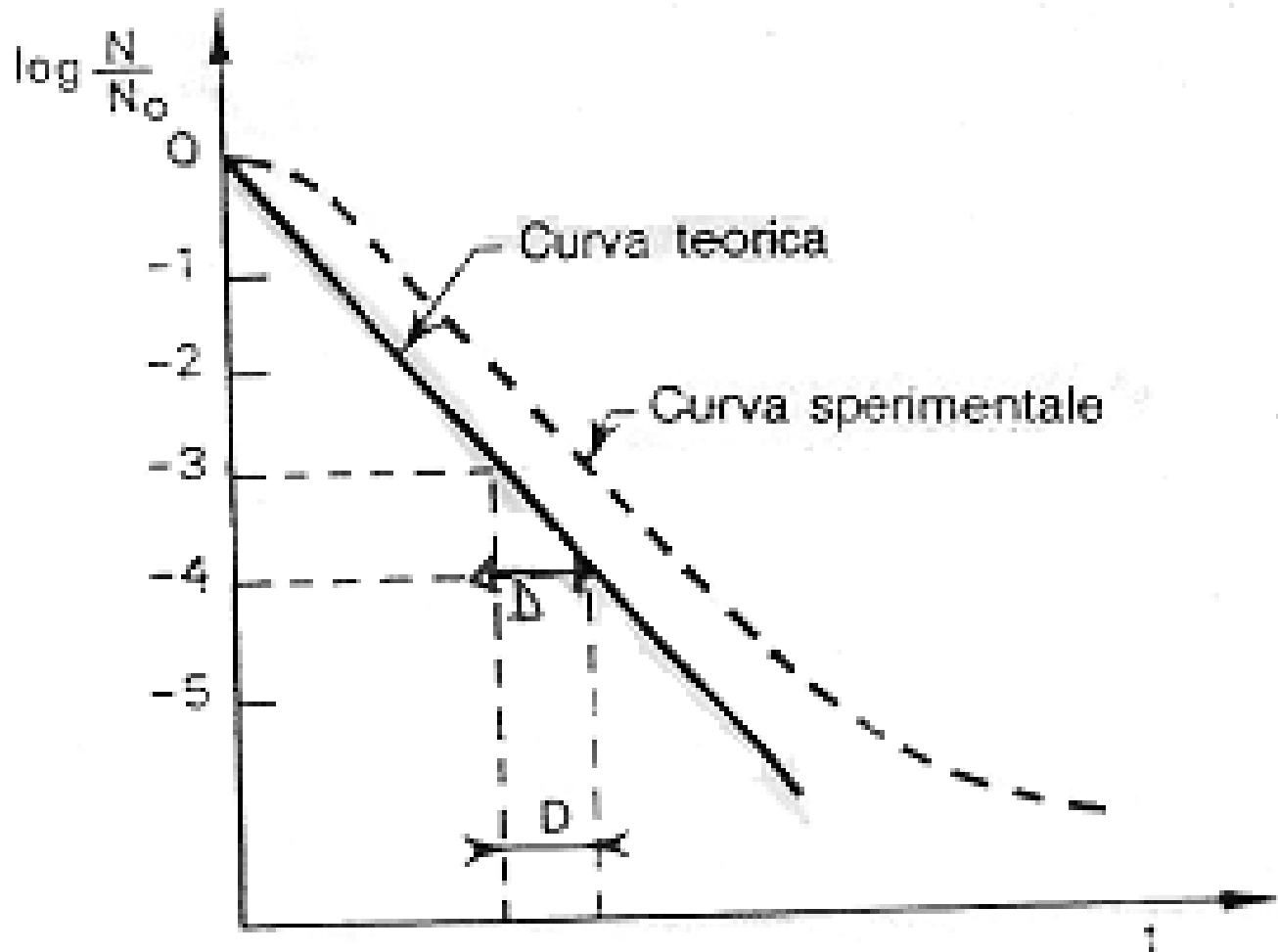


N / N_0 è l'ordinata all'origine
coeff.angolare: $-1/D$
ovvero $-k / 2,303$.

➤ Il risultato del trattamento termico, a parità delle altre condizioni, dipenderà dalla carica microbica iniziale

dalla 1^a legge di Bigelow si deduce che:

$$t = D \log N_0 / N$$



Essa viene chiamata **curva di sopravvivenza** poiché N è il numero di microrganismi in vita al tempo t , cioè sopravvissuti al riscaldamento, mentre il valore D corrisponde al tempo che risulta necessario - ad una data temperatura - per ridurre del 90% il numero di microrganismi presenti all'inizio (del tempo D).

ad es. da $N/N_0 = 10^{-3}$ a $N/N_0 = 10^{-4}$

Il valore D è chiamato **tempo di riduzione decimale.**

➤ Si può affermare che la velocità relativa k di distruzione è legata a D dalla relazione:

$$- 1 / D = - k / 2,303$$

D = TEMPO DI RIDUZIONE DECIMALE

Tempo di esposizione alla temperatura T necessario per ridurre di 10 volte (90%) cioè 1 ciclo logaritmico una data concentrazione microbica

D è TEMPERATURA DIPENDENTE

➤ Caso delle conserve alimentari

In determinate condizioni prodotto, carica batterica iniziale, dimensioni della scatola, ecc., il trattamento termico viene stabilito in modo che la probabilità di trovare ancora una scatola che contenga ancora un batterio vivente sia sufficientemente bassa da rendere il rischio praticamente trascurabile.

Un margine di rischio largamente sufficiente consiste nel trattamento termico che è capace di ridurre di $1 / 10^{12}$ il numero di spore inizialmente presenti del ceppo di *Clostridium botulinum* (MBC).



specie batterica **patogena** più resistente tra quelle mai isolate. Essa produce una tossina che invece è termolabile - non resiste infatti ad un riscaldamento per alcuni minuti a 100 °C.

Altre specie presentano spore più resistenti al calore, ma non sono né patogene né tossigene, tutt' al più darebbero luogo ad un' alterazione - oltre tutto abbastanza evidente - del prodotto.

Una riduzione da 10^{12} a 1 del numero di spore di *C. botulinum* corrisponde ad una riduzione da 10^5 a 1 del numero di spore di *C. sporogenes* del ceppo PA 3679



ceppo viene spesso utilizzato come microrganismo indicatore nella messa a punto dei parametri di sterilizzazione di una conserva.

Nella pratica i trattamenti termici applicati sono in genere sensibilmente più forti del minimo determinato, si cerca cioè non tanto la *sterilità assoluta*, impossibile da raggiungere ma un livello di sicurezza che garantisca la **salubrità** del prodotto da introdurre in commercio: tale livello viene detto **STERILITA' PRATICA O COMMERCIALE**.

Questo concetto riveste una grande importanza sul piano pratico ed indica che ***il risultato di un trattamento termico, a parità delle altre condizioni, dipenderà dalla carica microbica iniziale.***

Da ciò consegue la necessità che essa sia la più bassa possibile, e non superi certi limiti, pena l'insufficienza del trattamento termico applicato.

La carica microbica risulta molto variabile da una *derrata* all'altra, oppure da una *partita* ad un'altra di una stessa *derrata*. E' questa variabilità che nella pratica obbliga ad adottare margini di sicurezza nel trattamento relativamente ampi.

N.B. alcuni ingredienti, utilizzati nelle preparazioni alimentari, come *zucchero, farine, amidi, sale, spezie* spesso presentano cariche microbiche molto elevate tanto da rendere quasi impossibile il trattamento sterilizzante delle conserve in cui sono aggiunti.

Queste considerazioni valgono comunque per le conserve *poco acide* (o "non acide", cioè con pH 4,5); i prodotti acidi sono da un lato facili da sterilizzare, e dall'altro presentano un ambiente non adatto allo sviluppo del *C. botulinum*

SOPRAVVIVENZA E MORTE DEI MICRORGANISMI

➤ Dall' andamento logaritmico - $N = N_0 e^{-kt}$ - di distruzione dei microrganismi con il calore si deduce che *non è possibile, in teoria, uccidere tutti gli individui di una popolazione microbica, ma ottenere soltanto un grande livello di riduzione decimale.*

Si ha quindi a che fare con una definizione di carattere **statistico**



sarebbe cioè più corretto esprimersi in termini di probabilità di sopravvivenza.

➤ L'esperienza mostra che le spore di una stessa sospensione rivelano una resistenza più o meno grande a seconda della composizione del mezzo nel quale sono inseminate, se sottoposte in identiche condizioni a riscaldamenti più o meno lunghi.

Tab. VII.1.3.1.1 - *Effetto del mezzo d'inseminazione sulla sopravvivenza di spore di Bacillus natto riscaldate a 100°C in un tampone fosfato M115, pH 7,0; 70⁷ spore/ml.*

| Mezzo di inseminazione | Durata del riscaldamento 100°C | |
|---------------------------------------|--|---------------------|
| | che permette la sopravvivenza (minuti) | mortale (minuti) |
| Brodo nutritivo | 10 | 12 |
| d ₀ + 0,00005% di glucosio | 10 | 12 |
| d ₀ + 0,0005% di glucosio | 16 | 18 |
| d ₀ + 0,01% di glucosio | 18 | 20 |
| d ₀ + 0,1% di glucosio | 20 | 22 |
| d ₀ + 0,5% di glucosio | 20 | 22 |
| d ₀ + estratto di lievito | 20 | 22 |
| d ₀ + estratto di fegato | 20 | 22 |
| d ₀ + tioglicolato di Na | 10 | 12 |
| d ₀ + cisteina | 10 | 12 |

Da M. Amaha e K. Sakaguchi J. Gen. Appl. Microbiol. 1957, 3, 163.

I risultati di tali esperienze mostrano che, nel corso del trattamento termico, i batteri, o per lo meno le loro spore, perdono successivamente, per gradi, la capacità di utilizzare questo o quel nutrimento, o di trovare in un mezzo le fonti di energia necessarie al loro metabolismo.

Effetto della temperatura sulla cinetica di distruzione termica dei microrganismi

- *La velocità di distruzione di un microrganismo aumenta con l'aumentare della temperatura*



la durata del trattamento termico necessario ad ottenere la pastorizzazione o la sterilizzazione di un prodotto è tanto maggiore quanto più bassa è la temperatura.

- Bigelow dimostrò - intorno al 1920 - che il tempo di sterilizzazione di un prodotto - o il tempo di riduzione decimale D varia con la temperatura secondo una relazione di tipo esponenziale come la seguente:

$$D = a e^{-bT}$$



a e b sono delle costanti

T è la temperatura del trattamento.

→ esiste quindi una relazione esponenziale tra la temperatura e la velocità di distruzione dei microrganismi

A due diverse temperature si avrà:

$$D_1 = a e^{-bT_1} \quad \text{e} \quad D_2 = a e^{-bT_2}$$

cioè

$$\ln D_1 = \ln a - bT_1 \quad \text{e} \quad \ln D_2 = \ln a - bT_2$$

sottraendo dalla prima relazione la seconda:

$$\ln D_1 / D_2 = b (T_2 - T_1) \quad \text{e passando ai logaritmi decimali}$$

$$\log D_1 / D_2 = b / 2,303 (T_2 - T_1) \quad \text{e ponendo } \mathbf{2,303 / b = Z} \quad \text{si avrà}$$

$$\boxed{\log D_1 / D_2 = (T_2 - T_1) / Z}$$

(Il legge di Bigelow)

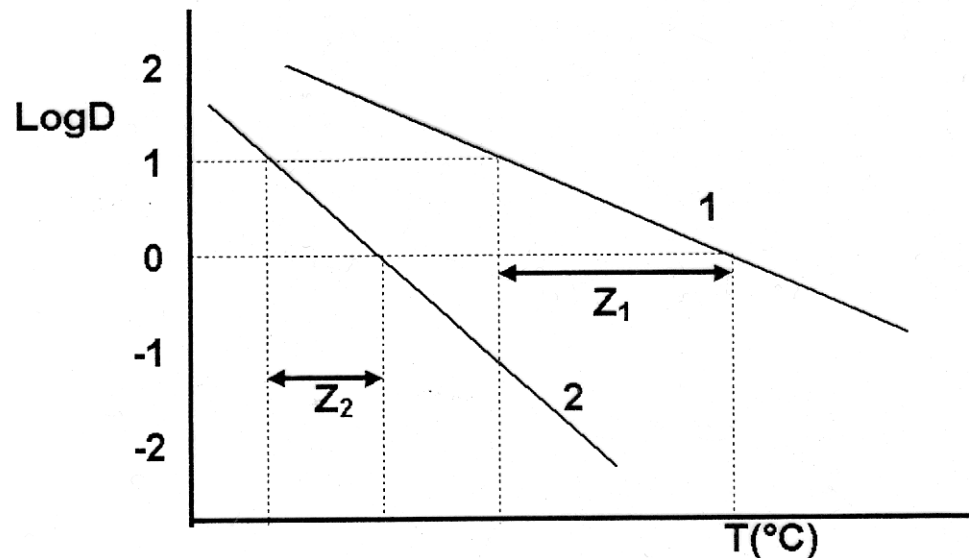
La II^a legge di Bigelow permette quindi di calcolare il valore D_2 a qualunque temperatura T_2 conoscendo il valore di D_1 ad una temperatura di riferimento T_1 .

Portando in grafico
per un dato microrganismo, in un dato substrato
il log D o di t - tempo di trattamento - in funzione della temperatura
si ottiene una retta



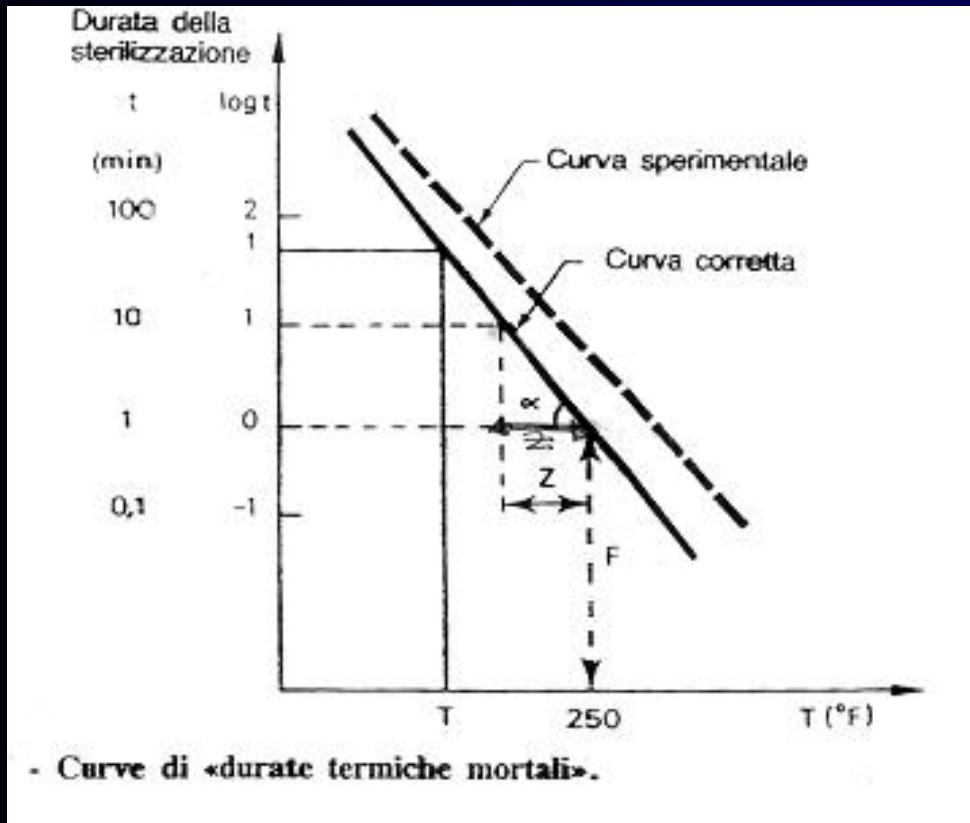
**RETTA DI DISTRUZIONE
TERMICA**
TDT (Thermal Death time)

il cui coefficiente angolare è $1/Z$ ovvero $b/2,303$



RETTA DI DISTRUZIONE TERMICA

TDT (Thermal Death Time)
o curve tempo-temperatura



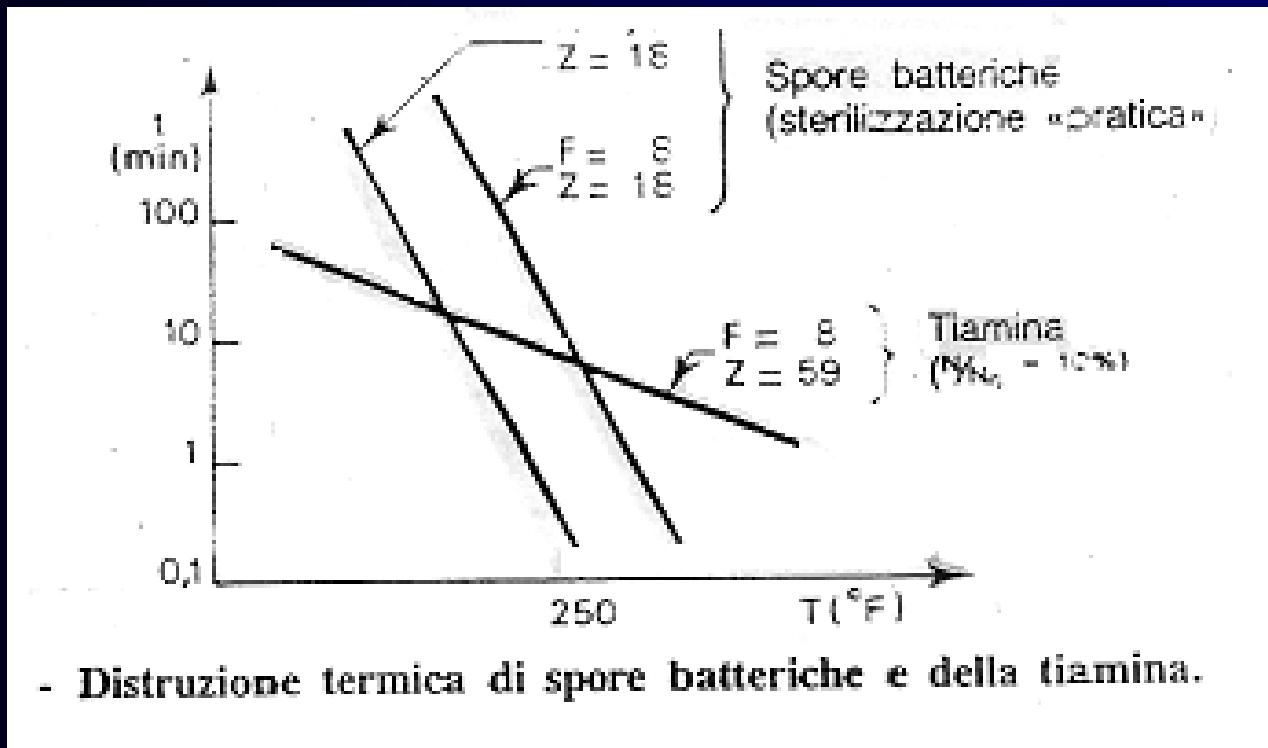
➤ Essendo la pendenza della curva di distruzione termica uguale a $1/Z$, si vede che **più Z è grande, minore è la pendenza della curva, cioè minore è la sensibilità di un microrganismo** - o la sensibilità di una data reazione chimica - ad un innalzamento di temperatura.

Z = variazione della temperatura di processo necessario per diminuire il valore di D di 10 volte (1 ciclo logaritmico)

- *Il valore di "z" rappresenta l'aumento di temperatura che determina una accelerazione di 10 volte della velocità di distruzione termica del microrganismo, o che permette alla retta di attraversare un ciclo logaritmico.*
- *In altri termini un aumento di temperatura di Z gradi riduce il valore di D o del tempo di sterilizzazione ad 1/10.*
 - Z permette di calcolare i tempi di sterilizzazione alle diverse temperature.
- **Per microrganismi diversi, diversi sono i valori di Z**

➤ per le spore di numerosi batteri il valore di z - tra i 100 e i 140 °C - è di circa 10 °C (18 °F), ciò significa che per un aumento di 10 °C il TDT diminuisce 10 volte; per le forme vegetative z risulta essere dell'ordine dei 4-5 °C.

➤ nel caso di enzimi e vitamine (reazioni chimiche), la stessa variazione di 10 °C comporta o un raddoppio o una triplicazione della velocità di reazione: z quindi risulta molto più grande.



- Distruzione termica di spore batteriche e della tiamina.

Es: si abbia $T_1 = 100 \text{ }^\circ\text{C}$; $D_1 = 10^2 \text{ sec.}$
 $T_2 = 110 \text{ }^\circ\text{C}$; $D_2 = 10 \text{ sec.}$

Applichiamo la II^a equazione di Bigelow:

$$\text{Log } D_1/D_2 = (T_2 - T_1)/Z$$

➤ caso dei microrganismi $\log 10^2 / 10 = (110 - 100) / z$
 $z = 10 \text{ }^\circ\text{C}$

➤ caso delle reazioni chimiche $D_1 / D_2 \approx 2$ $\log 2 = 10 / z$
 $z \approx 30 \text{ }^\circ\text{C}$

La II^a legge di Bigelow rappresenta un modo di espressione diverso della equazione di Arrhenius:

$$k = A e^{-Ea/RT}$$

$$\ln K = -Ea/RT + \ln A$$

dove:

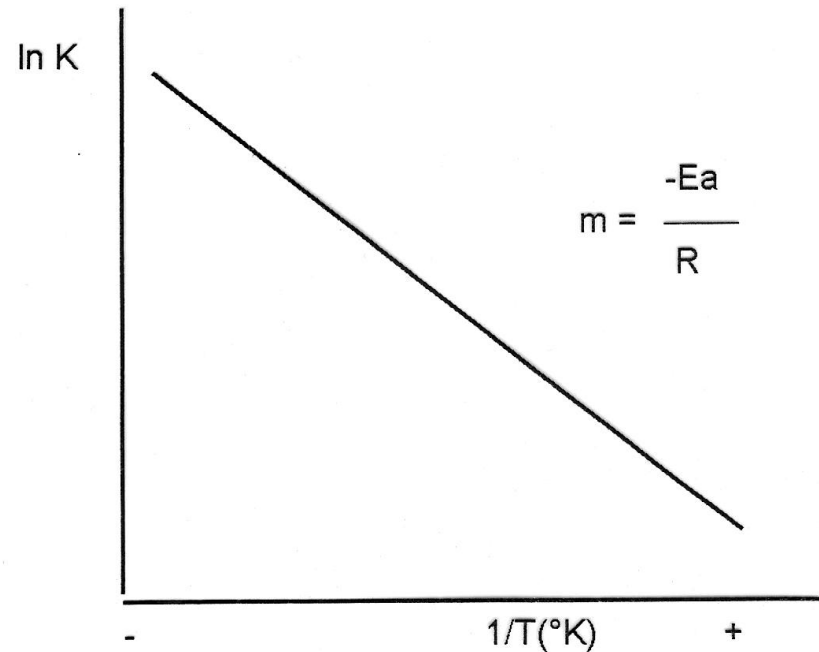
K = costante di velocità

Ea = energia di attivazione

R = costante dei gas (1,987 cal / mole)

T = temperatura (°K)

A = costante (legata al tipo di reazione)



$$k = A e^{-Ea/RT}$$

integrata tra T1 e T2 diventa:

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

dove k_1 e k_2 sono le *velocità relative di distruzione alle temperature* T_1 e T_2 ; mentre il rapporto k_2/k_1 è chiamato *coefficiente di temperatura* della reazione tra T_1 e T_2 , calcolato in genere per l'intervallo di 10°C e designato con **Q10**.

La relazione esistente tra l'equazione di Arrhenius e la II legge di Bigelow, per intervalli limitati di temperatura (20-30°C), è:

$$\ln \frac{D1}{D2} = \frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T1} - \frac{1}{T2} \right)$$

essendo $D1 = 2,303 / k1$ e $D2 = 2,303 / k2$;

➤ passando ai log decimali si ha:

$$\log D1/D2 = Ea / R \cdot 2,303 (T2-T1/ T1 \cdot T2)$$

e confrontando tale equazione con la II equazione di Bigelow si ottiene:

$$z = (2,303 R / Ea) T1 \cdot T2$$



relazione che stabilisce un legame tra il valore di z e l'energia di attivazione del processo di distruzione termica dei microrganismi.

Effetto del pH del mezzo (tampone fosfato M/15) sulla resistenza al calore (115°C) di spore di *C. sporogenes* (10^4 spore / ml).

pH

**Durata massima di riscaldamento
che permette la sopravvivenza
(minuti)**

5,0

9

5,7

12

6,0

15

6,6

21

7,0

25

7,5

20

8,2

15

- F_0 indica il numero di minuti in cui a 121°C viene raggiunto un effetto letale equivalente alla somma degli effetti letali dell'intero processi di appertizzazione.
- Il valore F_0 dipende dal valore Z del microrganismo considerato per cui è necessario specificare il valore Z quando si determina il valore di F_0 .

- Valori di F_0 tipici:
- 3 - 6 min per vegetali in salamoia
 - 4 - 5 min per zuppe
 - 12 -15 min per carne con salsa.

□ Dalla curva di morte termica si può ricavare la seguente relazione:

$$\frac{\log t - \log F}{250 - T} = \frac{1}{Z} = \text{pendenza della retta}$$

da cui $\log \frac{t}{F} = \frac{250 - T}{Z} \rightarrow F = t \cdot 10$

➤ Questa ultima equazione permette di calcolare da un dato valore di F ad una temperatura determinata presa come base la durata di un **trattamento termico equivalente** ad ogni altra temperatura.

Il *tempo* necessario ad ottenere un certo grado di sterilità varia quindi in funzione della *temperatura*; questa relazione si esprime attraverso il TDT Tempo di Morte Termica che definisce il "tempo necessario ad uccidere un microrganismo ad una data temperatura, in particolari condizioni".

QUINDI



Un trattamento termico di distruzione di un microrganismo è correttamente definito da due valori:

1. la durata "F" in minuti, necessaria per ottenere a 250 °F la sterilità pratica;
2. il numero "Z" di gradi Fahrenheit che corrisponde all'attraversamento di un ciclo logaritmico, cioè necessari a diminuire il TDT di un fattore 10, o di ridurre del 90% la durata della sterilizzazione.

Se lo scopo principale della sterilizzazione è quello di distruggere i microrganismi e inattivare gli enzimi esiste comunque l'esigenza di non alterare il prodotto.

E' necessario quindi **ottimizzare il rapporto**

TEMPO/TEMPERATURA

Si è constatato che un dato aumento di temperatura accelera molto di più la velocità di distruzione termica dei microrganismi che non la velocità delle reazioni chimiche che danneggiano il prodotto.

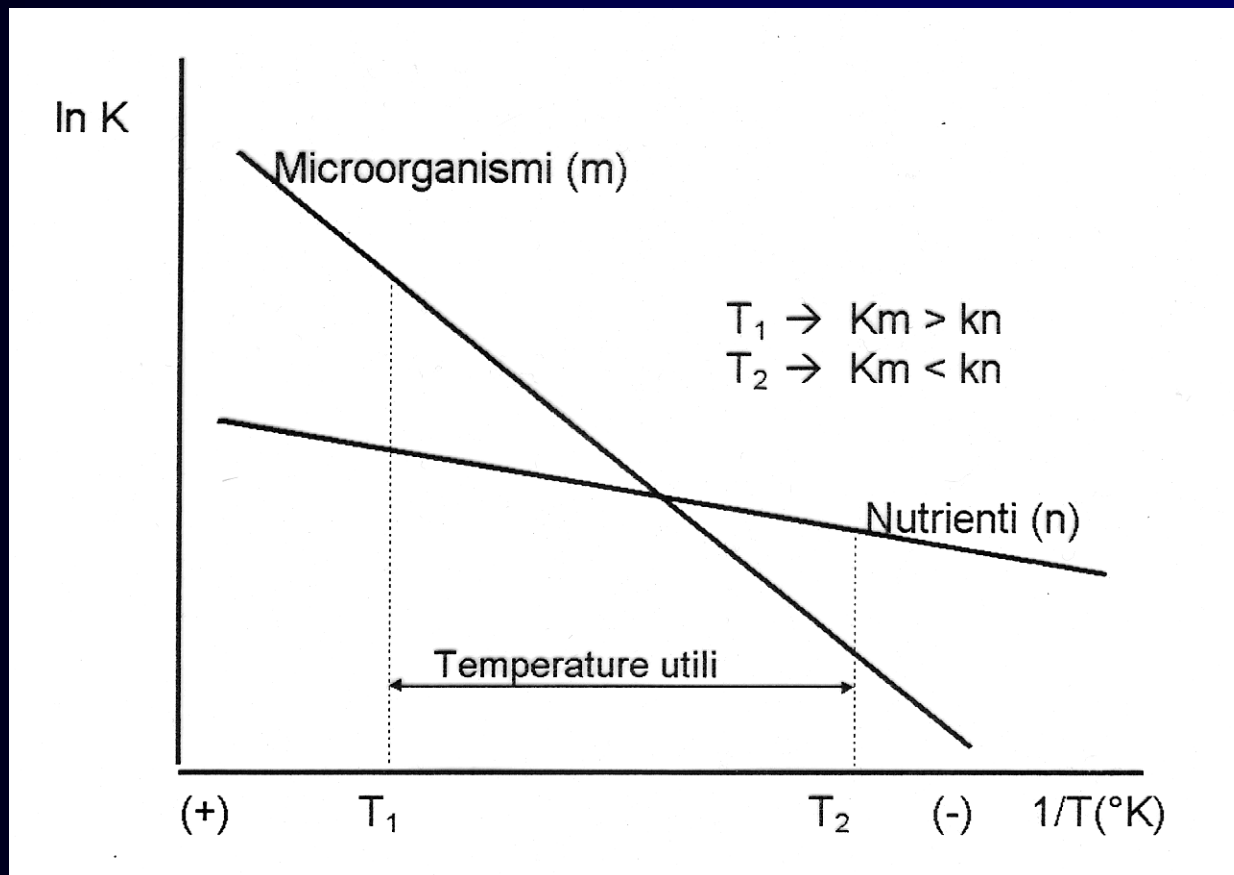
quindi il processo è tanto migliore quanto più viene condotto a **TEMPERATURE ELVATE** e per **TEMPI BREVI** (HTST - UHT - VHT)

Al variare di K (velocità di distruzione dei microrganismi) si modifica il tempo richiesto per ottenere lo stesso effetto (stesso livello di distruzione)



Concetto di

TRATTAMENTI TERMICI EQUIVALENTI



Le differenze di E_a tra la distruzione dei microrganismi e quella dei nutrienti possono essere utilizzate al fine di:

- Operare in ZONE in cui la velocità di distruzione microbica sia di gran lunga maggiore di quella dei nutrienti



*ottimizzazione del processo minimizzando gli effetti indesiderati
(UHT ; HTST)*

FATTORI CHE INFLUENZANO LA RESISTENZA TERMICA DEI MICRORGANISMI

Tipo di microrganismo

Differenti specie e ceppi mostrano un'ampia variabilità di resistenza al calore. Le spore sono molto più resistenti delle cellule vegetative.

Tempi di riduzione decimale a 250°F (121°C) per le spore di alcuni batteri

| | D250 in minuti |
|---|----------------|
| - <i>Bacillus stearothermophilus</i> (FS 1518) | da 4 a 5 |
| - <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> | da 3 a 4 |
| - <i>Clostridium nigrificans</i> | da 2 a 3 |
| - <i>Clostridium sporogenes</i> (PA 3679) | 1,5 |
| - <i>Clostridium botulinum</i> (Tipi A e B) | da 0,1 a 0,2 |
| - <i>Bacillus coagulans</i> (<i>B. thermoacidurans</i>) | da 0,01 a 0,07 |

Per permettere comparazioni valide occorre che le determinazioni siano effettuate in identiche condizioni. In più si consideri che:

- i valori di D non informano sulla resistenza ad altre temperature
- conoscenza del parametro Z della curva di distruzione termica.

Condizione di crescita

Durante la moltiplicazione cellulare o la formazione delle spore.

- Temperatura (*le spore prodotte a temperature più alte sono più resistenti*);
- età della coltura;
- mezzo di coltura.

Condizioni durante il trattamento termico

- pH dell'alimento;
- aw;
- composizione dell'alimento: proteine, grassi ed alta concentrazione in saccarosio aumentano la resistenza termica.

PENETRAZIONE DEL CALORE E PARAMETRI DI STERILIZZAZIONE

- Il calore viene trasmesso dal vapore o dall'acqua sotto pressione.
- in genere il coefficiente superficiale di trasmissione del calore è molto alto e quindi non è un fattore limitante dell'operazione.

Fattori che influenzano la velocità di penetrazione del calore negli alimenti

1. Tipo di prodotto: - alimenti liquidi convezione
- alimenti solidi conduzione

N.B. In genere gli alimenti presentano bassa conduttività termica. La misurazione della velocità di penetrazione del calore avviene attraverso l'utilizzo di **termocoppie** che registrano le temperature.

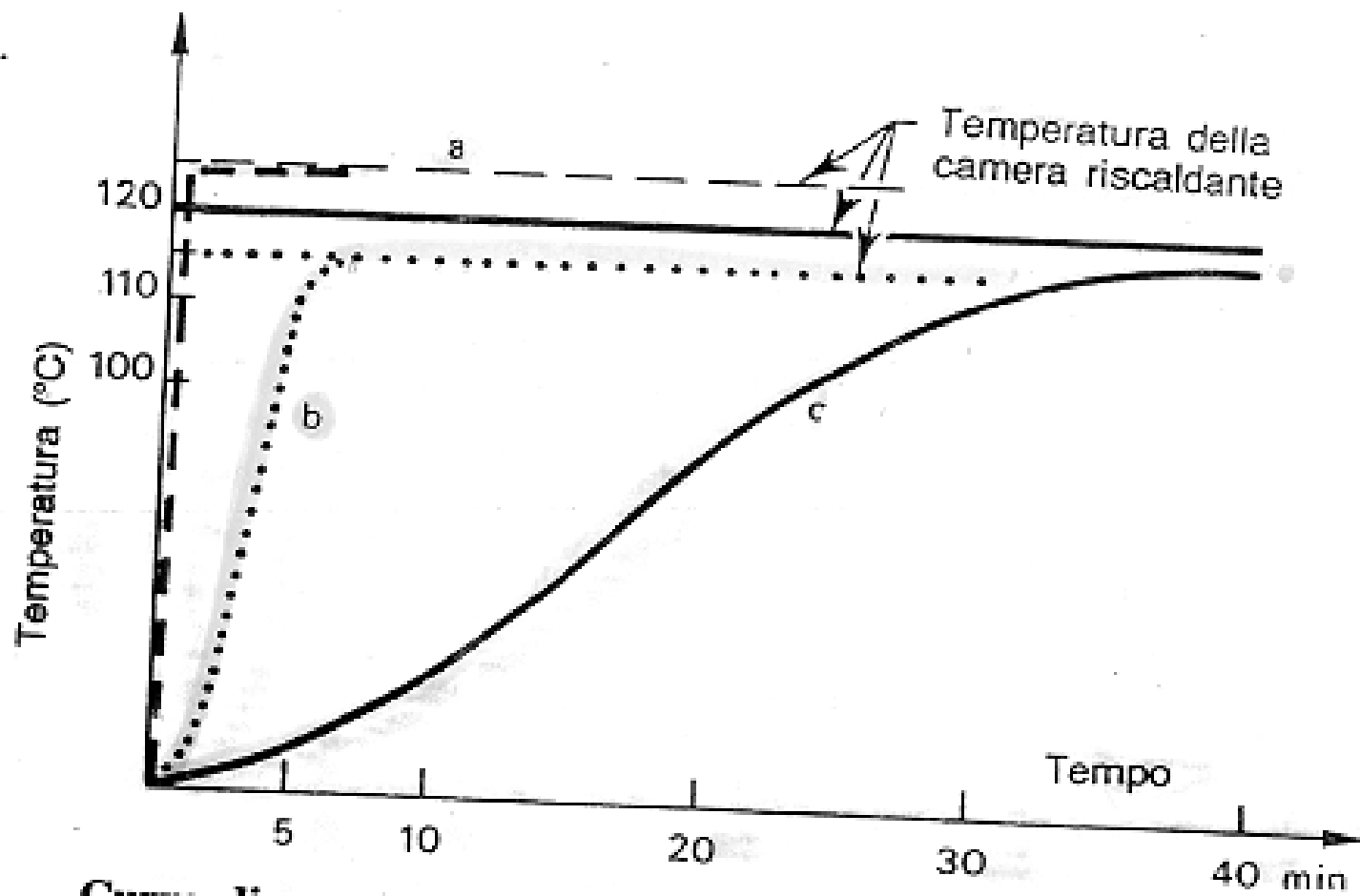
2. Dimensione del contenitore

3. Agitazione del contenitore: l'agitazione con capovolgimento o con altri metodi aumenta l'efficacia della convezione naturale e quindi la velocità di penetrazione del calore in alimenti viscosi o semisolidi.

4. Forma del contenitore

5. Tipo di contenitore: cioè materiale di cui è costituito (vetro, metallo, plastica)

6. Temperatura del mezzo riscaldante: maggiore è il gradiente termico maggiore è la velocità di penetrazione.



Curve di penetrazione del calore.

Table 10.1 — Purpose of pasteurisation for different foods

| Food | Main purpose | Subsidiary purpose | Minimum processing conditions ^a |
|--------------------------------|--|--|---|
| <i>pH</i> < 4.5 Fruit juice | Enzyme inactivation (pectinesterase and polygalacturonase) | Destruction of spoilage microorganisms (yeasts, fungi) | 65 °C for 30 min; 77 °C for 1 min; 88 °C for 15 s |
| Beer | Destruction of spoilage micro-organisms (wild yeasts, <i>Lactobacillus</i> species), and residual yeasts (<i>Saccharomyces</i> species) | — | 65–68 °C for 20 min (in bottle); 72–75 °C for 1–4 min at 900–1000 kPa |
| <i>pH</i> > 4.5 Milk | Destruction of pathogens: <i>Brucella abortis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , (<i>Coxiella burnettii</i> ^b) | Destruction of spoilage micro-organisms and enzymes | 63 °C for 30 min; 71.5 °C for 15 s |
| Liquid egg | Destruction of pathogens <i>Salmonella seftenburg</i> | Destruction of spoilage micro-organisms | 64.4 °C for 2.5 min 60°C for 3.5 min |
| Ice cream | Destruction of pathogens | Destruction of spoilage micro-organism | 65 °C for 30 min; 71 °C for 10 min; 80 °C for 15 s |

^aFollowed by rapid cooling to 3–7 °C.

^b*Rickettsia* organism which causes Q fever.

Adapted from Fricker (1984), Wiggins and Barclay (1984), Lund (1975), and Hammid-Samimi and Swartzel (1984).