

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

MORGANA ZIMMERMANN

**RESISTÊNCIA DE ESPOROS DE *Byssochlamys fulva* E
Bacillus coagulans EM POLPA DE TOMATE SOB
CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS, NÃO ISOTÉRMICAS E
DE ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Gláucia M. F. Aragão

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zimmermann, Morgana

Resistência de esporos de *Byssochlamys fulva* e *Bacillus coagulans* em polpa de tomate sob condições isotérmicas, não isotérmicas e de altas pressões hidrostáticas [tese] / Morgana Zimmermann ; orientador, Gláucia Maria Falcão de Aragão - Florianópolis, SC, 2012.
165 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Microbiologia Preditiva. I. Aragão, Gláucia Maria Falcão de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de tomate destinado à produção industrial e o maior consumidor de produtos de tomate da América do Sul. Sendo assim, a qualidade da matéria-prima deve ser garantida de forma a se obter um produto que atenda aos padrões de segurança. Bactérias e fungos podem ser potenciais contaminantes de produtos de tomate, podendo apresentar contaminações por fungos e bactérias formadoras de esporos, como o gênero *Byssochlamys* spp. e *Bacillus coagulans*. Portanto, o amplo conhecimento do comportamento destes microrganismos submetidos a processos de inativação é relevante para a constante melhoria dos tratamentos de esterilização, a fim de garantir a segurança e a qualidade de produtos de tomate sujeitos à contaminação por microrganismos termorresistentes. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi determinar a resistência de esporos de *Byssochlamys fulva* IOC 4518 e *Bacillus coagulans* ATCC 7050 em polpa de tomate comercial, sob condições isotérmicas, não isotérmicas e de altas pressões hidrostáticas. Primeiramente, um estudo sobre a idade e temperatura de esporulação destes microrganismos foi realizado para verificar as condições de maior termorresistência, sendo 30 e 84 dias a 30 °C para esporos de *B. fulva* e 10, 20 e 30 dias a 37, 45 e 50 °C para esporos de *B. coagulans*. Os fatores analisados não influenciaram a termorresistência de esporos de *B. coagulans*, sendo seus esporos produzidos nas condições de 10 dias e 37 °C. Porém, os esporos de *B. fulva* foram mais termorresistentes quando obtidos a 84 dias a 30 °C, sendo estas condições adotadas para o cultivo da suspensão de esporos. A partir deste estudo, a termorresistência de esporos de *B. fulva* (90 a 100 °C) e *B. coagulans* (95 a 105 °C) foi verificada em polpa de tomate ajustada para 4 e 10 °Brix, utilizando a metodologia de tubo TDT (tempo de morte térmica). Como já esperado, a temperatura influenciou nos parâmetros de inativação, sendo que o teor de sólidos solúveis não apresentou influência significativa ($p > 0,05$) sobre estes parâmetros, para ambos os microrganismos, dentro da faixa estudada. Como neste estudo os esporos de *B. coagulans* apresentaram maior termorresistência, estes foram utilizados para a sequência do trabalho. A fim de verificar se diferentes metodologias influenciariam nos parâmetros de inativação de esporos de *B. coagulans*, um estudo da resistência térmica (95 a 120 °C) de esporos deste microrganismo em polpa de tomate a 4 °Brix, utilizando as metodologias de tubo capilar e tubo TDT, foi realizado e os resultados obtidos foram comparados. A inativação térmica em tubo capilar apresentou, além das fases de ombro

e exponencial de destruição que haviam sido observadas na metodologia em tubo TDT, uma cauda que permaneceu, pelo menos, os 60 minutos de experimento. Com os dados obtidos através do estudo da inativação térmica dos esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate a 4 °Brix, utilizando o método de tubo capilar, a predição da inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições de temperatura variáveis foi realizada com a aplicação de modelo não isotérmico e o modelo foi validado. A cinética das curvas de inativação preditas e observadas foi similar, apresentando o mesmo comportamento (ombro, exponencial e cauda). Finalmente, a resistência de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate a 4 °Brix foi analisada com o uso de alta pressão hidrostática combinada com temperatura. Pressões de 300 a 600 MPa e temperaturas de 50 e 60 °C foram testadas por períodos de 1 a 39 minutos. Houve a formação de duas fases, sendo estas bastante pronunciadas quando pressões de 300 a 450 MPa foram aplicadas, para ambas as temperaturas. Os modelos preditivos estabelecidos neste trabalho são relevantes para estimar o comportamento de microrganismos formadores de esporos em produtos de tomate, dentro dos limites analisados, podendo contribuir para a melhoria dos tratamentos utilizados pela indústria, a fim de garantir a segurança e qualidade dos produtos, diminuindo assim os riscos à saúde do consumidor e trazendo benefícios econômicos para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: Inativação microbiana, *Bacillus coagulans*, *Byssochlamys fulva*, polpa de tomate, parâmetros cinéticos.

ABSTRACT

Brazil is considered the largest producer of tomatoes for the industry and the largest consumer of tomato products in South America. Therefore, the quality of the tomatoes should be ensured in order to obtain a high quality product. Bacteria and moulds may be a potential contaminant of tomato products, which may present contamination of spore-forming microorganisms, such as *Byssochlamys* spp. and *Bacillus coagulans*. Therefore, the extensive knowledge of these microorganisms behavior undergoes to inactivation process is relevant to the continuous improvement of the processes to guarantee the safety and quality of tomato products. Accordingly, the aim of this study was to determine the resistance of *Byssochlamys fulva* IOC 4518 and *Bacillus coagulans* ATCC 7050 spores in commercial tomato pulp, under isothermal, non-isothermal and high hydrostatic pressure conditions. Firstly, a study of the influence of different ages (30 and 84 days old at 30 °C) on the heat resistance of *B. fulva*; and different ages (10, 20, and 30 days old) and sporulation temperatures (37, 45, and 50 °C) on the heat resistance of *B. coagulans* were evaluated. The analyzed factors did not influence the heat resistance of *B. coagulans* spores and the spores were produced at 37 °C for 10 days. However, *B. fulva* spores were more heat resistant when cultivated for 84 days at 30 °C being these conditions used to produce the spores' suspension. From this study, the heat resistance of *B. coagulans* (95 to 105 °C) and *B. fulva* (90 to 100 °C) spores were analyzed in tomato pulp adjusted to 4 and 10 °Brix, using the TDT (thermal death time) tube methodology. As expected, the inactivation parameters were influenced by the temperature, and the soluble solids showed no significant influence ($p > 0.05$) on these parameters, for both microorganisms in the studied range. As *B. coagulans* spores presented higher heat resistance, these were used for the following studies. To verify whether different methodologies would influence the inactivation parameters of the *B. coagulans* spores, the heat resistance (95 to 120 °C) of this bacteria spores in tomato pulp at 4 °Brix using capillary and TDT tubes were realized, and the experimental data were compared. The thermal inactivation in capillary tube showed, apart from the shoulder and the exponential phase as observed in TDT tube, a tail that remained at least up to 60 minutes of the experiment. Throughout the isothermal inactivation data of *B. coagulans* spores in tomato pulp at 4 °Brix using capillary method the spores inactivation kinetics under varying temperatures could be predicted by the non-isothermal model. The non-isothermal model was validated with experimental inactivation data of

B. coagulans spores in tomato pulp at 4 °Brix, using capillary tube method. Similar behavior was observed between observed and predicted inactivation kinetics (shoulder, exponential and tail phases). Lastly, the combined effect of HHP and temperature on *B. coagulans* spore survival in tomato pulp at 4 °Brix was evaluated. Pressures from 300 to 600 MPa and temperatures of 50 and 60 °C were applied from 1 to 39 minutes. There was a two phases formation and these were greatly pronounced when pressures from 300 to 450 MPa was applied, for both temperatures studied. The predictive models established in this study are relevant to estimate the behavior of spore-forming microorganisms in tomato products, in the studied range. The findings can contribute to improve the efficiency of treatments applied by the industries to ensure the quality and safety of the food products, and so reducing the consumer health risks and bringing economic benefits to the food industry.

Keywords: Microbial inactivation, *Bacillus coagulans*, *Byssochlamys fulva*, tomato pulp, kinetic parameters.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2.1. Ilustração das curvas de inativação microbiana normalmente observadas na literatura. | 31 |
| Figura 3.1. Ilustração de tubos TDT preenchidos com polpa de tomate inoculada e selados. | 40 |
| Figura 3.2. Ilustração de tubos capilares preenchidos com polpa de tomate inoculada e selados. | 45 |
| Figura 3.3. Ilustração do microtubo de polipropileno utilizado para os experimentos de HHP e temperatura, preenchidos com polpa de tomate inoculada e envolto com parafilme. | 50 |
| Figura 3.4. Equipamento de alta pressão hidrostática do departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Rutgers. | 52 |
| Figura 4.1. Curvas de sobreviventes de esporos de <i>B. coagulans</i> em todas as condições analisadas. | 67 |
| Figura 4.2. Curvas de sobreviventes de esporos de <i>B. fulva</i> para 30 e 84 dias de incubação a 30 °C. | 68 |
| Figura 4.3. Curvas de sobreviventes (log UFC/mL) de esporos de <i>B. fulva</i> em polpa de tomate a 4 °Brix e 10 °Brix, usando a metodologia do tubo TDT. | 70 |
| Figura 4.4. Influência da temperatura de processo sobre os parâmetros primários de inativação térmica de esporos de <i>B. fulva</i> em polpa de tomate com diferentes teores de sólidos solúveis. | 74 |
| Figura 4.5. Curvas de sobreviventes (log UFC/mL) de esporos de <i>B. coagulans</i> em polpa de tomate a 10 °Brix, usando metodologia do tubo TDT. | 95 |

Figura 4.6. Influência da temperatura sobre os parâmetros primários de inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate ajustada para 10 °Brix, usando o método do tubo TDT. 98

Figura 4.7. Curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições isotérmicas (95 e 105 °C) e não isotérmicas (95 a 105 °C) de temperatura..... 115

Figura 4.8. Curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições isotérmicas (A - 95 e 100 °C e B - 95 e 100 °C) e não isotérmicas (A - 95 – 98 °C e B - 99 – 102 °C) de temperatura..... 116

Figura 4.9. Curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições isotérmicas (A - 100 e 105 °C e B - 95 e 100 °C) e não isotérmicas (A - 102 – 105 °C e B - 95 – 100 °C) de temperatura..... 116

Figura 4.10. Curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições isotérmicas (A - 100 e 105 °C e B - 95 e 105 °C) e não isotérmicas (A - 100 – 105 °C e B - 95 – 105 °C) de temperatura..... 117

Figura 4.11. Ajuste dos modelos secundários descrevendo a influência da pressão sobre os parâmetros do modelo primário..... 135

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1. Perfil de temperatura não isotérmicas aplicadas nos tratamentos de inativação de esporos de <i>B. coagulans</i> | 49 |
| Tabela 4.1. Parâmetros estatísticos e parâmetros obtidos para o ajuste do modelo Ombro + log-linear aos dados experimentais de estudo da resistência de esporos de <i>B. coagulans</i> para todas as condições de esporulação analisadas..... | 66 |
| Tabela 4.2. Parâmetros estatísticos e parâmetros obtidos para o ajuste do modelo Ombro + log-linear aos dados experimentais de estudo da resistência de esporos de <i>B. fulva</i> para 30 e 84 dias a 30 °C..... | 66 |
| Tabela 4.3. Parâmetros obtidos pelo ajuste do modelo primário de Weibull aos dados experimentais de inativação térmica de esporos de <i>B. fulva</i> em polpa de tomate a 4 e 10 °Brix | 70 |
| Tabela 4.4. Valores de <i>ARD</i> obtidos com o ajuste do modelo de Weibull sobre os dados experimentais da inativação térmica de esporos de <i>B. fulva</i> em polpa de tomate a 4 e 10 °Brix usando o método do tubo TDT, em todas as temperaturas analisadas e os valores dos parâmetros estatísticos do ajuste do modelo..... | 71 |
| Tabela 4.5. Parâmetros do modelo primário de inativação térmica de esporos de <i>B. coagulans</i> em polpa de tomate ajustada para 10 °Brix, usando a metodologia do tubo TDT para todas as temperaturas analisadas | 95 |
| Tabela 4.6. Comparação da influência do teor de sólidos solúveis da polpa de tomate (4 e 10 °Brix) sobre o <i>ARD</i> de inativação térmica de esporos de <i>B. coagulans</i> usando o método do tubo TDT, para todas as temperaturas analisadas. Apresentação dos parâmetros estatísticos com o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais | 96 |

Tabela 4.7. Coeficientes de determinação (r^2) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários para descreverem a influência da pressão nos parâmetros $k_{\max 1}$ e $k_{\max 2}$ da inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate. 134

NOMENCLATURA

- 1-*f* - fração da população microbiana que é considerada resistente ao tratamento submetido
- 4RD/4DR - tempo para obter 4 reduções decimais no número de microrganismos
- a* / *a'* / *b* / *b'* / *c* / *d* / *g* / *h* / *j* / *m* / *p* - parâmetros empíricos das equações
- HHP - alta pressão hidrostática
- APPCC - análise de perigos e pontos críticos de controle
- BOD - demanda bioquímica de oxigênio
- D - tempo necessário para reduzir em 90 % a população de microrganismos
- DP/SD - desvio padrão
- e* - número de Euler
- f* - população de microrganismo sensível ao tratamento submetido
- GLP/LPG - gás liquefeito de petróleo
- i* - intervalo de temperatura constante do perfil de temperatura não isotérmico
- k_{max} - velocidade específica de inativação microbiana
- L* / *Sl* - comprimento do ombro de uma curva de inativação
- MEA - ágar extrato de malte
- MSE - erro médio quadrático
- n* - número de graus de liberdade
- N*(*t*) - população de microrganismos (UFC/mL)
- N_0 - população inicial do microrganismo (UFC/mL)
- N_{res} - população residual microbiana
- ODE - equação diferencial ordinária
- p* - fator de forma da curva do modelo
- PDA - ágar dextrose de batata
- r^2 - coeficiente de determinação
- T*(*t*) - perfil de temperatura em função do tempo *t*
- TDA - ágar tripton dextrosado
- TDT - tempo de morte térmica
- UFC/CFU - unidade formadora de colônia
- δ - fator de localização
- ε - parâmetro do modelo primário a ser analisado
- ω - pressão (MPa) ou temperatura (°C)
- ω_{min} - pressão ou temperatura mínima de inativação ou coeficiente do modelo

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO..... | 16 |
| CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 20 |
| 2.1. Tomate | 20 |
| 2.1.1. Polpa de tomate | 21 |
| 2.2. Tratamento térmico | 22 |
| 2.3. Alta pressão hidrostática | 23 |
| 2.4. Microrganismos de importância na contaminação de tomate | 25 |
| 2.4.1. Fungos termorresistentes..... | 25 |
| 2.4.1.1. <i>Byssochlamys fulva</i> | 26 |
| 2.4.2. Bactérias termorresistentes..... | 27 |
| 2.4.2.1. <i>Bacillus coagulans</i> | 27 |
| 2.5. Fatores que influenciam na resistência de microrganismos | 28 |
| 2.5.1. Idade e temperatura de formação dos esporos..... | 28 |
| 2.5.2. Teor de sólidos solúveis do meio de aquecimento | 29 |
| 2.6. Microbiologia preditiva..... | 29 |
| 2.7. Modelos matemáticos que descrevem a inativação microbiana..... | 30 |
| 2.7.1. Modelos primários | 30 |
| 2.7.2. Modelos secundários..... | 33 |
| 2.7.3. Modelos não isotérmicos..... | 34 |
| 2.8. Validação dos modelos | 35 |
| CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 3.1. Influência da idade e temperatura de esporulação sobre a resistência térmica de esporos de <i>Bacillus coagulans</i> e <i>Byssochlamys fulva</i> em meio ácido..... | 37 |
| 3.1.1. Produção de esporos de <i>B. coagulans</i> | 37 |
| 3.1.2. Produção de esporos de <i>B. fulva</i> | 38 |
| 3.1.3. Meios de aquecimento utilizados nos ensaios para determinação da resistência de esporos de <i>B. coagulans</i> e <i>B. fulva</i> | 39 |
| 3.1.4. Tratamento térmico de esporos de <i>B. coagulans</i> e <i>B. fulva</i> | 39 |
| 3.1.5. Modelagem da inativação microbiana..... | 40 |
| 3.1.6. Análise estatística dos parâmetros de inativação | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Inativação térmica de esporos de <i>Byssochlamys fulva</i> em polpa de tomate com diferentes teores de sólidos solúveis | 42 |
| 3.2.1. Produção de esporos de <i>B. fulva</i> | 42 |
| 3.2.2. Meios de aquecimento para o estudo da resistência térmica | 42 |
| 3.2.3. Tratamento térmico a temperaturas constantes para esporos de <i>B. fulva</i> | 42 |
| 3.2.4. Modelagem primária da inativação microbiana | 42 |
| 3.2.5. Influência do teor de sólidos solúveis e da temperatura sobre os parâmetros de inativação | 43 |
| 3.2.6. Modelagem secundária dos parâmetros de inativação..... | 43 |
| 3.3. Determinação de parâmetros de inativação térmica de esporos de <i>Bacillus coagulans</i> em polpa de tomate pelos métodos de tubos TDT e capilar..... | 44 |
| 3.3.1. Produção de esporos de <i>B. coagulans</i> | 44 |
| 3.3.2. Meios de aquecimento para o estudo da resistência térmica | 44 |
| 3.3.3. Tratamento isotérmico de esporos de <i>B. coagulans</i> | 44 |
| 3.3.4. Modelagem primária da inativação microbiana | 45 |
| 3.3.5. Influência do teor de sólidos solúveis e temperatura sobre os parâmetros de resistência térmica | 46 |
| 3.3.6. Modelagem secundária dos parâmetros de inativação..... | 46 |
| 3.4. Predição e validação do modelo de inativação de esporos de <i>Bacillus coagulans</i> sob condições não isotérmicas | 47 |
| 3.4.1. Predição da inativação não isotérmica de esporos de <i>B. coagulans</i> | 47 |
| 3.4.2. Dados isotérmicos utilizados para a predição da inativação não isotérmica | 47 |
| 3.4.3. Validação do modelo não isotérmico | 47 |
| 3.4.3.1. Produção de esporos de <i>B. coagulans</i> | 48 |
| 3.4.3.2. Meios de aquecimento para o estudo da resistência térmica | 48 |
| 3.4.3.3. Tratamentos não isotérmicos de inativação de esporos de <i>B. coagulans</i> | 48 |
| 3.4.3.4. Perfis de temperatura não isotérmicos..... | 48 |
| 3.5. Inativação de esporos de <i>Bacillus coagulans</i> em polpa de tomate pelo uso combinado de alta pressão hidrostática e moderada temperatura..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.1. Produção de esporos de <i>B. coagulans</i> | 50 |
| 3.5.2. Meio de tratamento utilizado para o estudo da resistência | 50 |
| 3.5.3. Tratamento de HHP e temperatura sobre a inativação e esporos de <i>B. coagulans</i> | 50 |
| 3.5.4. Equipamento de HHP..... | 51 |
| 3.5.5. Modelagem primária da inativação microbiana | 52 |
| 3.5.6. Modelagem secundária da influência da pressão sobre os parâmetros primários de inativação | 52 |
| CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 4.1. Influência da idade e temperatura de esporulação na resistência térmica de esporos de <i>Bacillus coagulans</i> e <i>Byssochlamys</i> <i>fulva</i> em meio ácido | 54 |
| 4.1.1. <i>Microorganism thermal resistance in acid foods as influenced by sporulation factors</i> | 54 |
| 4.1.2. Resultados complementares | 65 |
| 4.1.2.1. Influência da idade e temperatura de esporulação na resistência térmica de esporos dos microrganismos..... | 65 |
| 4.2. Inativação térmica de esporos de <i>Byssochlamys fulva</i> em polpa de tomate com diferentes teores de sólidos solúveis..... | 69 |
| 4.2.1. Resistência térmica de esporos de <i>Byssochlamys fulva</i> em polpa de tomate | 69 |
| 4.2.2. Análise estatística da influência dos fatores analisados sobre os parâmetros de resistência térmica de esporos de <i>B. fulva</i> | 72 |
| 4.2.3. Modelagem secundária da influência da temperatura de aquecimento sobre os parâmetros de inativação de esporos de <i>B. fulva</i> em polpa de tomate | 73 |
| 4.3. Determinação de parâmetros de inativação térmica de esporos de <i>Bacillus coagulans</i> em polpa de tomate pelos métodos de tubos TDT e capilar | 76 |
| 4.3.1. <i>Comparative effect of different test methodologies on B. coagulans spores inactivation kinetics in acid food under isothermal conditions</i> | 77 |
| 4.3.2. Resultados complementares | 94 |
| 4.4. Predição e validação do modelo de inativação de esporos de <i>Bacillus coagulans</i> sob condições não isotérmicas..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| 4.4.1. <i>Prediction of Bacillus coagulans spores inactivation in tomato pulp under non-isothermal heat treatments</i> | 99 |
| 4.4.2. Resultados complementares | 114 |
| 4.5. Inativação de esporos de <i>Bacillus coagulans</i> em polpa de tomate pelo uso combinado de alta pressão hidrostática e moderada temperatura | 118 |
| 4.5.1. <i>Modeling the inactivation of Bacillus coagulans spores in tomato pulp from the combined effect of high pressure and moderate temperature</i> | 118 |
| 4.5.2. Resultados complementares | 133 |
| CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES | 136 |
| CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 138 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Alimentos ácidos, como produtos à base de tomate, submetidos a processos de esterilização comumente aplicados pela indústria podem estar sujeitos à contaminação por fungos filamentosos e bactérias provenientes da resistência aos processos térmicos e/ou da contaminação cruzada, uma vez que esses microrganismos são contaminantes naturais do solo e da água.

Algumas características dos microrganismos são fundamentais para determinar a ocorrência de contaminação nos alimentos. A capacidade de formar esporos com elevada termorresistência e a capacidade de sobreviver em meio com baixo pH favorecem alguns microrganismos que, indesejavelmente, podem chegar ao produto final, deteriorando-o e causando prejuízos econômicos e à saúde do consumidor (BRACKETT, 2001).

Dentre os fatores que podem influenciar a resistência de esporos de microrganismos, destacam-se a atividade de água, pH, teor de sólidos solúveis, adição de conservantes, conteúdo de nutrientes, idade dos esporos e temperatura de produção dos esporos (GONZÁLEZ et al., 1999; CEVIZ et al., 2009; MILLER et al., 2009a).

Os esporos de fungos filamentosos termorresistentes podem sobreviver às temperaturas geralmente utilizadas nos processos de produção de polpas, extratos e molhos de tomate, dependendo do tempo de processo empregado. Além disso, estes fungos são produtores de micotoxinas como a patulina, produzida por *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea*. O crescimento de fungos filamentosos termorresistentes causa a elevação do pH dos alimentos para valores em que a germinação e sobrevivência de esporos de *Clostridium botulinum* se torna possível (MASSAGUER, 2004). *Byssochlamys fulva* tem sido reportado na literatura como contaminante de produtos de tomate (SPOTTI et al., 1992; KOTZEKIDOU, 1997).

Esporos de *Bacillus coagulans* são comumente envolvidos na deterioração de produtos vegetais processados devido à sua capacidade de germinar e crescer em pH em torno de 4,5 (MALLIDIS et al., 1990; LUCAS et al., 2006), além de sobreviverem às temperaturas de processo geralmente aplicadas pela indústria. O crescimento desta bactéria em produtos enlatados causa deterioração “*flat-sour*”, que se caracteriza pela acidificação acentuada do meio, sem formação de gás carbônico (De CLERCK et al., 2004). Este tipo de deterioração é muito difícil de

ser identificada pelo consumidor, pois não há estufamento da embalagem.

Para a garantia da qualidade e segurança de produtos alimentícios sujeitos a contaminação por microrganismos termorresistentes faz-se necessária a constante melhoria e inovação nos tratamentos de esterilização utilizados pela indústria. O uso de calor continua sendo um dos métodos mais utilizados. Porém, a aplicação de tratamentos térmicos isolados para a inativação de microrganismos termorresistentes requer muitas vezes tratamentos térmicos rigorosos, o que pode levar a prejuízos organolépticos e nutricionais do produto. A aplicação de metodologias alternativas utilizadas isoladamente, como a alta pressão hidrostática, ou combinadas a tratamentos térmicos, tem sido bastante difundido nos últimos anos.

A necessidade de garantir a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos tem estimulado, além da inovação em tratamentos alternativos de esterilização, a aplicação da microbiologia preditiva. No campo da pesquisa, há um crescente interesse na microbiologia preditiva para o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevem o crescimento e/ou inativação de microrganismos patogênicos, produtores de toxinas e deteriorantes em alimentos. Na microbiologia preditiva, o comportamento dos microrganismos é quantitativamente descrito através do crescimento celular, usando modelos matemáticos que possibilitam a descrição do comportamento dos microrganismos em função de parâmetros ambientais (BRUL et al., 2008).

A modelagem matemática geralmente utiliza condições constantes, como temperatura, pH, entre outros, para determinar os valores dos parâmetros cinéticos de inativação. No entanto, tais condições nem sempre se mantêm constantes durante o processamento e armazenamento de alimentos. Devido a isto, a modelagem matemática tem sido direcionada para a obtenção de modelos dinâmicos, ou seja, modelos que permitem prever a segurança ou a vida útil dos alimentos sob condições variáveis (PELEG, 2006). Para que os modelos possam ser aplicados a alimentos processados e armazenados em condições reais, é necessário considerar o efeito das mudanças das variáveis externas sobre o crescimento e/ou a inativação microbiana, a fim de se obter previsões mais precisas em relação à segurança microbiológica e a vida útil dos mesmos (CAYRÈ et al., 2004; CORRADINI et al., 2005).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a resistência de esporos de *Byssochlamys fulva* e *Bacillus coagulans*, utilizando polpa de tomate comercial como meio de aquecimento, sob

condições isotérmicas, não isotérmicas e de altas pressões hidrostáticas. Para se atingir este objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a influência da idade de esporos e da temperatura de esporulação de *B. fulva* IOC 4518 e *B. coagulans* ATCC 7050 na termorresistência dos esporos destes microrganismos.
- Obter os parâmetros de inativação microbiana através da comparação e seleção de modelos primários.
- Analisar a influência do teor de sólidos solúveis da polpa de tomate (4 e 10 °Brix) e das temperaturas de inativação sobre a resistência térmica de esporos de *B. coagulans* (95, 97, 100, 103 e 105 °C) e *B. fulva* (90, 92, 95, 97 e 100 °C), utilizando o método do tubo TDT.
- Determinar a resistência térmica de esporos de *B. coagulans* (95, 97, 100, 103 e 105 °C) em polpa de tomate a 4 °Brix, utilizando o método de tubo capilar e comparar os resultados obtidos com o método do tubo TDT.
- Utilizar as equações dos modelos secundários obtidos para prever a inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições de temperatura variáveis, através da aplicação do modelo não isotérmico de Gompertz-modificado.
- Validar o modelo não isotérmico obtido através da comparação dos dados preditos com os dados experimentais da inativação não isotérmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate a 4 °Brix, utilizando o método do tubo capilar.
- Determinar a resistência de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate a 4 °Brix através do uso combinado de alta pressão hidrostática (300, 400, 450, 500, 550 e 600 MPa) e temperatura (50 e 60 °C).
- Obter as equações dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura ou da pressão sobre os parâmetros primários de inativação para cada estudo isolado.

Este trabalho está estruturado em capítulos, sendo a introdução aqui apresentada (Capítulo 1), uma revisão da literatura apresentada no Capítulo 2, abordando os assuntos referentes ao tema de estudo. No Capítulo 3 estão descritos o material e os métodos utilizados na elaboração do trabalho, estando divididos em cinco subitens conforme a apresentação dos resultados, sendo que os itens 3.1, 3.2 e parte do item 3.3 foram desenvolvidos no laboratório de Engenharia Bioquímica da

Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, SC, Brasil e parte do item 3.3 e os itens 3.4 e 3.5 foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Preditiva da Universidade Rutgers, em New Brunswick, NJ, Estados Unidos. Os resultados e discussão estão apresentados no Capítulo 4, sendo divididos em cinco subitens conforme o estudo abordado. O item 4.1 apresenta a influência de fatores ambientais sobre a resistência térmica de esporos de *B. coagulans* e *B. fulva* em meio ácido. O item 4.2 apresenta a termorresistência de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate com diferentes teores de sólidos solúveis. A inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate pelos métodos de tubos TDT e capilar está apresentada no item 4.3. O item 4.4 apresenta os resultados preditos e observados da inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições não isotérmicas. No item 4.5, está apresentada a inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate pelo uso combinado de alta pressão e temperatura. No Capítulo 5 estão apresentadas as conclusões e no Capítulo 6 está apresentada a lista das referências bibliográficas consultadas.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tomate

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das culturas mais importantes e populares na área das horticulturas. O tomateiro foi introduzido na Europa pela Espanha, vindo do México, entre 1524 e 1554 e inicialmente era utilizado somente como planta ornamental, por ser sua fruta atribuída como tóxica, o que retardou seu uso culinário (FILGUEIRA, 2001).

A composição química do tomate varia em função da variedade, estado de maturação e condições de produção, como temperatura, fertilização e irrigação (BARRINGER, 2004). De uma maneira geral, o tomate maduro é composto principalmente por água, representando cerca de 94 % do total dos seus constituintes. Os 6 % restantes correspondem à matéria seca, sendo esta constituída por 50 % de açúcares solúveis (predominando a frutose e a glicose), 25 % de ácidos orgânicos (cítrico e málico), aminoácidos dicarboxílicos, lipídios e minerais, e 25 % de sólidos insolúveis em álcool, que incluem proteínas, substâncias pécticas, celulose e hemicelulose (ROCA, 2009).

O consumo *per capita* global do tomate tem aumentado devido a seu versátil uso na culinária, bem como às suas características nutricionais e reconhecidas propriedades funcionais (LEÓN-SÁNCHEZ et al., 2009), como fonte de antioxidantes, vitaminas (YILMAZ, 2001; CAUSSE et al., 2003) e licopeno, que foi considerado como uma substância ativa para a redução da incidência de câncer de próstata (GIOVANNUCCI, 2005; ELLINGER et al., 2006) e doenças cardiovasculares (AGARWA; RAO, 2000). Esta fruta é amplamente usada como salada e ingrediente em alimentos preparados como sucos, sopas, polpas, extratos, tomate inteiro em conserva e molhos prontos para o consumo (CAMARGO et al., 2006; KAUR et al., 2008).

A produção mundial de tomate no ano de 2010 foi de 129,6 milhões de toneladas, com o Brasil ocupando a oitava posição no *ranking* (FAO, 2009). O Brasil é o maior produtor de tomate para processamento industrial e o maior consumidor de produtos derivados de tomate da América do Sul (EMBRAPA, 2006). Uma análise do mercado de tomate no Brasil, feita por Sato (2005), indica que, no período 1996 a 2002, o consumo de extratos e polpas deteve aproximadamente 65 % desse mercado, com participação semelhante,

enquanto os molhos participaram com aproximadamente 24 % e os catchups com 11 %.

2.1.1. Polpa de tomate

Alimentos processados são apresentados como uma forma prática de fornecimento contínuo de alimentos, independentemente da sazonalidade e da disponibilidade de matérias-primas. Por ser o tomate um produto que possui vida útil curta, o seu processamento, logo após a colheita, permite que sua polpa possa ser comercializada na forma de extrato, polpa, molhos e catchup (SILVA; GIORDANO, 2000).

A polpa de tomate é obtida através da extração e refinação do tomate previamente triturado e aquecido, com a finalidade de separar a pele e as sementes do restante da polpa. Pelo fato de a polpa possuir baixa concentração de sólidos após esta etapa, a sua evaporação é efetuada até a concentração desejada, sendo então envasada ou destinada para o processamento de produtos à base de tomate. A polpa também pode ser estocada nas concentrações de 18 a 33 °Brix até o preparo de sub-produtos (MINAMI; FONSECA, 1982).

Para suprir a demanda de alimentos de uma população mundialmente crescente, cada vez mais a vida útil dos alimentos deve ser preservada e prolongada. Este fato traz a necessidade do aumento e da melhoria de métodos de conservação de alimentos (THAKUR; SINGH, 1995). Alterações indesejadas podem ocorrer em produtos de tomate, e estas alterações estão relacionadas aos aspectos microbiológicos, enzimáticos, ocorrência de reações químicas, e também, devido às alterações físicas que comprometem suas características sensoriais.

Segundo Pacheco e Massaguer (2004), contaminações eventuais por fungos e bactérias em produtos derivados de tomate que são envasados assepticamente têm sido observadas no Brasil, levando à necessidade de se detectar a causa destas contaminações e encontrar alternativas para controlá-las. A ocorrência de fungos e bactérias em produtos envasados assepticamente tem levantado questões relacionadas aos procedimentos higiênicos e de qualidade, utilizados na produção de polpa de tomate (BAGLIONI et al., 1999). Sendo assim, o conhecimento aprofundado sobre a resistência de esporos destes microrganismos em produtos de tomate é relevante, a fim de contribuir na melhoria dos tratamentos de esterilização já aplicados pela indústria e/ou na implantação de novas tecnologias.

O tratamento térmico é um método amplamente utilizado na conservação de alimentos processados e tem como principal objetivo a destruição de células vegetativas e esporos. A microflora de polpa de tomate processada é relativamente restrita, porém pode apresentar microrganismos de grande resistência térmica. Portanto, a presença de microrganismos termorresistentes tem estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de processos alternativos de destruição de microrganismos associado com os tratamentos térmicos (LUCAS et al., 2006; SALLEH-MACK; ROBERTS, 2007).

Uma grande tendência relacionada à conservação de alimentos tem sido a tecnologia de métodos combinados, baseada na utilização combinada de duas ou mais técnicas de conservação, como tratamento térmico, alteração do pH, modificação do teor de sólidos, uso de alta pressão hidrostática, aplicação de pulsos elétricos, entre outros, promovendo a estabilidade do alimento (ROSS et al., 2003; AHN et al., 2007).

2.2. Tratamento térmico

O conceito de processamento térmico, inicialmente empregado apenas para alimentos enlatados, já percorreu um extenso caminho desde que Bigelow et al. (1920) desenvolveram a primeira base científica para o cálculo dos parâmetros mínimos de esterilização necessários para garantir a segurança microbiológica e extensão da vida útil de alimentos. O processamento térmico constitui na aplicação de tratamento a temperatura moderada ou alta por tempo suficiente para destruir os microrganismos importantes para a saúde pública (patogênicos ou produtores de toxinas) ou responsáveis pela deterioração dos alimentos (AWUAH et al., 2007)

Melhorias na qualidade e segurança dos alimentos processados vêm alcançando níveis elevados devido às exigências dos órgãos regulatórios sobre os fabricantes e através das legislações nacionais e internacionais que fazem cumprir padrões de qualidade que garantem a segurança e a qualidade nutricional dos produtos processados. Além disso, as exigências por parte dos consumidores por alimentos de alto valor agregado têm impulsionado a indústria na busca de melhorias no processamento dos alimentos (AWUAH et al., 2007).

O tempo e temperatura necessários para o processamento adequado dos alimentos são dependentes da composição do produto a ser processado, como pH, acidez, atividade de água e concentração de

sal (PERIAGO et al., 1998). Outro fator que também é fundamental é o microrganismo alvo do processamento.

O tratamento térmico continua sendo um dos métodos mais eficientes e aplicados na indústria de alimentos a fim de garantir a segurança microbiológica e extensão da vida útil dos produtos (GHANI et al., 2001). Porém, a inativação de microrganismos termorresistentes por tratamento térmico requer elevados valores de tempo e temperatura, podendo prejudicar consideravelmente as características organolépticas e nutricionais do produto final. Sendo assim, a combinação de processo térmico com tecnologias inovadoras vem sendo aplicada na indústria alimentícia, tal como a alta pressão hidrostática que vem ganhando grande destaque na pesquisa e na aplicação.

2.3. Alta pressão hidrostática

A aplicação de processamento de alimentos por alta pressão hidrostática (HHP) é relativamente recente e está sendo utilizado com a finalidade de melhorar a qualidade e a segurança dos produtos, bem como estender a vida útil dos mesmos. Este processo pode ser aplicado em alimentos líquidos ou sólidos, que são submetidos a pressões de até 1200 MPa (MARGOSCH et al., 2006), normalmente à temperatura ambiente, podendo ser empregadas também temperaturas elevadas, como 121°C (CLARK, 2006). A alta pressão causa mudanças morfológicas, bioquímicas e genéticas nos microrganismos, além de provocarem mudanças no funcionamento e na reprodução dos microrganismos (CHEFTEL, 1992).

Em geral, os microrganismos nas formas vegetativas podem ser inativados a pressões entre 400 e 600 MPa, à temperatura ambiente. Por outro lado, microrganismos com formas esporuladas são mais resistentes a HHP, como já é conhecido para outros processos de inativação (VERCAMMEN et al., 2012). Para a inativação efetiva de esporos, a HHP necessita ser combinada com moderadas a altas temperaturas (AHN et al., 2007; VERCAMMEN et al., 2012). O tratamento de HHP também pode ser empregado para induzir a germinação de esporos (NAKAYAMA et al., 1996; SMELT, 2002) e as células vegetativas resultantes podem ser inativadas por um segundo tratamento, como o calor (VERCAMMEN et al., 2012).

Além do uso combinado de HHP e temperatura ser efetivo na inativação de esporos, tratamentos combinados visam reduzir o custo dos processos devido à redução da carga energética requerida para a realização dos mesmos (ROSS et al., 2003). Os processos de HHP são

normalmente realizados em batelada, consistindo por uma fase de compressão, onde a pressão é elevada até o nível desejado, seguido pela manutenção desta pressão durante o tempo desejado, e finalmente a pressão é reduzida à pressão ambiente (KHURANA; KARWE, 2009). Processos de homogeneização por alta pressão também têm sido empregados para a inativação microbiana, sendo um processo contínuo que basicamente força o fluxo do produto através do orifício da válvula de homogeneização a uma velocidade muito elevada, causando a ruptura das células (CAMPOS et al., 2003).

O processo de HHP pode inativar microrganismos e enzimas sem provocar consideráveis alterações nos parâmetros de qualidade dos alimentos (SOYSAL et al., 2004; FULLADOSA et al., 2012). Além de manter o sabor, o aroma e o valor nutricional dos alimentos, o processo de HHP pode ser aplicado a diferentes volumes de produto pois o tempo de exposição à pressão aplicada independe do seu volume, tamanho e geometria, uma vez que a pressão age instantaneamente e uniformemente sobre o alimento (KHURANA; KARWE, 2009).

Vercammen et al. (2012) estudaram a inativação de esporos de *A. acidoterrestis* e *B. coagulans* pela aplicação de HHP (100 – 800 MPa) a temperaturas de até 60 °C e os autores relataram que a maior parte dos esporos foram inativados quando os experimentos foram conduzidos a 60 °C. Cléry-Barraud et al. (2004) estudaram a cinética de inativação de esporos de *B. anthracis* expostos a pressões de 280 a 500 MPa combinadas com temperaturas de 20 a 75 °C. Os autores encontraram que o efeito combinado da pressão com temperatura resultou na completa destruição dos esporos da bactéria, com valores de D de 4 minutos para processo de 500 MPa a 75 °C. A inativação de esporos de *Clostridium botulinum* e *B. amyloliquefaciens* pelo efeito combinado de pressão (0,1 a 1.400 MPa) e temperatura (70 a 120 °C) foi determinada por Margosch et al. (2006). Os autores relataram que o aumento da pressão de 600 para 1.400 MPa e da temperatura de 90 para 110 °C, provocou um aumento da inativação de esporos do microrganismo. Ferreira et al. (2009) estudaram a inativação de esporos de *Byssochlamys nivea* em suco de abacaxi por ciclos de pressão de 500 e 600 MPa e temperaturas de 20 a 90 °C, e encontraram que os ascosporos foram inativados à pressão de 600 MPa a 90 °C por 5 minutos.

Diversos estudos sobre a eficiência da HHP na inativação de uma grande variedade de microrganismos estão disponíveis na literatura. Porém, por ser uma tecnologia relativamente nova se comparada com o uso do calor, mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos aplicados à HHP, bem como a sua eficácia quando combinada com

tratamentos tradicionais de conservação são necessários para que novas estratégias possam ser desenvolvidas com uma sólida base científica (BARBOSA-CANOVAS et al., 1998).

2.4. Microrganismos de importância na contaminação de tomate

Tomate é um produto altamente perecível e susceptível à ação de microrganismos, como bactérias (WHITE, 1951) e fungos (BISHOP et al., 1982) que são responsáveis por grandes perdas do produto e de seus derivados. A melhoria da qualidade de produtos processados de tomate é uma questão prioritária para a segurança dos consumidores (CONCINA et al., 2009).

Várias espécies de microrganismos podem sobreviver em alimentos ácidos, como os derivados de tomate, suportando mesmo os tratamentos térmicos normalmente empregados pela indústria. Microrganismos formadores de esporos são um problema comum na indústria de alimentos, porque são frequentemente encontrados em diversas frutas e vegetais *in natura*, e seus esporos exigem tratamentos mais intensos para a inativação, se comparados às células vegetativas (LUCAS et al., 2006).

Segundo pesquisa realizada por Matos et al. (2002), os primeiros relatos sobre a ocorrência de fungos termorresistentes foi feita por Olliver e Rendle (1934), que verificaram que a deterioração de vários produtos de frutas foi atribuída ao fungo *Byssochlamys fulva*. Mais tarde, *B. fulva* e *B. nivea* foram detectados como deteriorantes em outros produtos vegetais ácidos, sendo também isolados de produtos de frutas *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* (ARAGÃO, 1989; BAGLIONI et al., 1999).

Durante muitos anos, acreditou-se que os esporos de bactérias não seriam capazes de germinar e reproduzir suas células vegetativas em alimentos ácidos, como os produtos de tomate. Porém, algumas espécies, como *Bacillus coagulans*, são capazes de se desenvolver em meios ácidos (SPLITTSTOESSER et al., 1994).

2.4.1. Fungos termorresistentes

Pertencentes à classe dos ascomicetos, os fungos termorresistentes produzem esporos, conhecidos também como ascósporos, que são capazes de sobreviver a temperaturas normalmente utilizadas durante os processos de pasteurização de produtos processados (TOURNAS, 1994; PIECKOVÁ et al., 1994).

Como a maioria dos esporos dos fungos termorresistentes se apresenta em estado de dormência, estes precisam primeiramente ser ativados, permitindo a germinação. A ativação é realizada pela aplicação de um choque mecânico ou térmico, sendo a aplicação de calor o tratamento mais usualmente empregado na prática laboratorial (TOURNAS, 1994; BAGLIONI et al., 1999). Além de deteriorante, muitas espécies de fungos termorresistentes são capazes de produzir micotoxinas, como a patulina, produzida por *Byssochlamys fulva*, causando consideráveis problemas para a saúde pública (TOURNAS, 1994; HOCKING; PITT, 2001; TANIWAKI et al., 2009).

2.4.1.1. *Byssochlamys fulva*

O gênero *Byssochlamys* apresenta duas espécies economicamente importantes (*B. nivea* e *B. fulva*), que causam deterioração de frutas e produtos de frutas e estão entre os fungos termorresistentes mais comumente associados com a deterioração destes produtos, mesmo quando submetidos a tratamentos térmicos (TOURNAS; 1994; HOCKING; PITT, 2001).

Os ascósporos de *B. fulva* são estruturas transparentes, normalmente ovais e lisas, com dimensões que variam de 2,8 - 4,0 a 3,4 - 5,6 μm (PITT; HOCKING, 1999). A temperatura ótima de crescimento desse fungo está entre 30 °C e 37 °C (TOURNAS, 1994; PITT; HOCKING, 1999).

O gênero *Byssochlamys* possui capacidade de produção de micotoxinas como a patulina, ácido bissoclâmico, bissotoxina A, assimetrina e variotina (BEUCHAT; RICE, 1979; HOCKING; PITT, 2001; PUEL et al., 2007). A patulina é considerada tóxica para plantas, microrganismos e animais, sendo extremamente nociva à saúde humana (MORALES et al., 2007). Além disso, o crescimento deste fungo nos alimentos pode acarretar na elevação do pH para valores que podem permitir a germinação e a sobrevivência de esporos de *Clostridium botulinum* (FIELDS et al., 1977; ANDERSON, 1984; PACHECO; MASSAGUER, 2004). Assim sendo, o desenvolvimento deste microrganismo em produtos à base de tomate é um eminente risco à saúde pública.

Alguns estudos demonstraram a contaminação de produtos comerciais por *B. fulva*. Kikoku et al. (2008) isolaram fungos deste gênero de *blueberries* congeladas e Aragão (1989) de polpa de morango. Baglioni et al. (1999), em estudo sobre a ocorrência de fungos termorresistentes no processamento asséptico de polpa de tomate,

encontraram cinquenta linhagens de fungos, entre eles *B. fulva*, com predomínio na matéria-prima e na água de pré-lavagem e transporte. Kotzekidou (1997) isolou vinte culturas de fungos filamentosos termorresistentes em pasta de tomate enlatada e entre as cepas isoladas, foram identificados ascósporos de três linhagens de *B. fulva*.

2.4.2. Bactérias termorresistentes

Nas bactérias termorresistentes a formação de endósporos ocorre quando as condições do meio de crescimento são inadequadas para a continuidade da vida ou duplicação celular. Esporos bacterianos, como esporos de *B. coagulans*, possuem a capacidade de acumular minerais e ácidos dipicolínico (ácido piridina-2,6-dicarboxílico; DPA), contribuindo para a estabilidade do esporo e a resistência ao calor, à radiação ultravioleta, à alta pressão, à desidratação e à ação de desinfetantes, estabilizando macromoléculas como ácidos nucléicos e proteínas (ATRIH; FOSTER, 2002).

2.4.2.1. *Bacillus coagulans*

B. coagulans foi primeiramente descrito em 1915 por Hammer, que isolou este microrganismo de leite enlatado e deteriorado (De CLERCK et al., 2004). Esta bactéria é deteriorante de alimentos, sendo ligeiramente acidófila e termo-tolerante, causando grande preocupação para a indústria processadora de alimentos ácidos e acidificados (LUCAS et al., 2006). Este microrganismo é um termofílico produtor de ácido láctico, que tem sido caracterizado como causa da deterioração *flat-sour*, ou seja, provoca contaminação sem formação de gás carbônico e estufamento da embalagem (De CLERCK et al., 2004). São encontrados abundantemente no solo e devido à sua capacidade de formar esporos e suportar condições ambientais variáveis, adaptam-se facilmente em diversos ambientes (PRIEST, 1993; STECCHINI et al., 2009).

As células de *B. coagulans* são Gram-positivas e anaeróbias facultativas, apresentando diâmetro entre 0,6 a 1,0 µm. O crescimento desta bactéria pode ocorrer entre 30 e 61 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento situada entre 37 e 45 °C. O pH ótimo para crescimento é de 7, podendo crescer em pH entre 4 e 11 (De CLERCK et al., 2004). *B. coagulans* é uma bactéria frequentemente isolada de frutas e vegetais enlatados que apresentam pH em torno de 4 (BRACKETT, 2001), mas é especialmente isolada em produtos de tomate com pH entre 4 e 5 (MALLIDIS et al., 1990; LUCAS et al., 2006).

2.5. Fatores que influenciam na resistência de microrganismos

Vários fatores são considerados importantes na determinação da resistência de microrganismos. Dentre eles estão a atividade de água, pH, teor de sólidos solúveis do produto, adição de conservantes, conteúdo de nutrientes, idade e temperatura de produção dos esporos (GONZÁLEZ et al., 1999; CEVIZ et al., 2009; MILLER et al., 2009a). Dentre os fatores citados na literatura como importantes na determinação da resistência térmica de microrganismos, serão abordados neste trabalho a idade dos esporos, a temperatura de formação dos esporos e o teor de sólidos solúveis do meio de aquecimento utilizado no processo de inativação dos microrganismos.

2.5.1. Idade e temperatura de formação dos esporos

O tamanho, a forma e ornamentação dos esporos de microrganismos variam com o tipo, a espécie, a cepa e a condição do meio onde foram formados. A produção de esporos é dependente tanto de fatores genéticos e da linhagem do microrganismo, quanto de fatores externos, como temperatura e o meio de crescimento. Outros fatores como a idade dos esporos, definido como o tempo em que o esporo permanece à determinado ambiente, também podem ser relevantes (TOURNAS, 1994; DANTIGNY et al., 2009).

Alguns estudos indicam que a temperatura em que os esporos são formados influencia na sua resistência térmica. Porém, uma tendência geral sobre este fenômeno não pode ser projetada. Alguns autores verificaram que as temperaturas mais altas utilizadas na formação de esporos bacterianos, considerando a faixa de crescimento do microrganismo em questão, os tornaram mais termorresistentes (RASO et al., 1995; GONZÁLEZ et al., 1999; SLOGO; ARAGÃO, 2006; GARCIA et al., 2010), enquanto outros autores não detectaram influência deste parâmetro na resistência térmica de esporos (ALCOCK; BROWN, 1985; ENGEL; TEUBER, 1991; PALOP et al., 1999).

A idade dos esporos é citada na literatura como um dos fatores que pode influenciar no seu crescimento e inativação. Segundo Slongo et al. (2005), a variação da idade dos ascósporos de *Neosartorya fischeri* de 1 para 3 meses provocou um aumento estatisticamente significativo na resistência térmica desse fungo. Zimmermann et al. (2011a), estudando cinco idades de formação de esporos de *B. nivea* entre 30 a 90 dias, utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento, constataram que a idade dos esporos não influenciou o tempo de crescimento desse microrganismo.

2.5.2. Teor de sólidos solúveis do meio de aquecimento

Alguns pesquisadores indicam que o aumento da concentração de sólidos solúveis no meio de aquecimento exerce efeito protetor sobre os esporos de microrganismos, ou seja, torna-os mais termorresistentes (KING JÚNIOR; WHITEHAND, 1990; TOURNAS; TRAXLER, 1994). Entretanto, outros estudos não detectaram o mesmo efeito deste fator na termorresistência de esporos (MALDONADO et al., 2008; CEVIZ et al., 2009).

Conforme estudo realizado por Silva et al. (1999), o teor de sólidos solúveis (5 a 60 °Brix) influenciou no valor de D (tempo necessário para reduzir em 90 % a população inicial de microrganismos) de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculado em caldo de extrato de malte quando temperaturas na faixa de 85 a 97 °C foram aplicadas. Ceviz et al. (2009), estudando a influência do teor de sólidos solúveis (10 e 20 °Brix) sobre o valor de D de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja, suco de abacaxi e caldo de extrato de malte, encontraram que o teor de sólidos solúveis não afetou na resistência térmica deste microrganismo.

2.6. Microbiologia preditiva

A utilização de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou por volta de 1920. Porém, a partir de 1983, o potencial da microbiologia preditiva começou a atrair considerável interesse na área da pesquisa (ROSS; McMEEKIN, 1994). Schaffner e Labuza (1997) definem a microbiologia preditiva como uma união da microbiologia de alimentos, da engenharia e da estatística com a finalidade de prever o comportamento microbiano nos alimentos (MAFART, 2005).

Com a finalidade de se determinar a vida útil de um produto alimentício, a microbiologia preditiva tem sido amplamente utilizada para prever o crescimento e/ou a inativação de microrganismos. Modelos preditivos são importantes ferramentas na gestão da segurança de alimentos, fornecendo uma base científica para alimentar os sistemas de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) e avaliação de riscos microbianos (McMEEKIN et al., 2006).

Os modelos preditivos são aplicados como ferramenta de investigação e avaliação do desenvolvimento de novos produtos, na fase de produção, armazenamento e distribuição, podendo assim, definir a vida útil dos produtos alimentícios (GIANNUZZI et al., 1998). A modelagem preditiva proporciona um caminho rápido e ainda

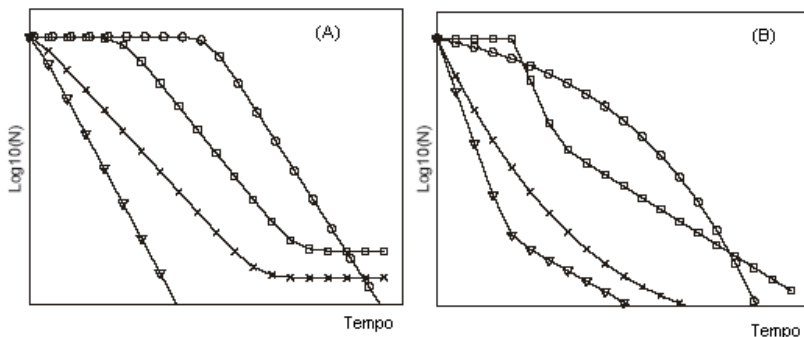
relativamente econômico para se obter dados confiáveis de crescimento, inativação e sobrevivência microbiana.

2.7. Modelos matemáticos que descrevem a inativação microbiana

A microbiologia preditiva utiliza modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos, com a finalidade de prever o comportamento microbiano nos alimentos em diferentes condições ambientais (BRUL et al., 2008). O desenvolvimento destes modelos é baseado nas características dos alimentos e nas condições que ocorrem durante o processamento e armazenamento, com o objetivo de estimar com segurança, a qualidade microbiológica destes produtos (PSOMAS et al., 2011). Os modelos matemáticos que formam a microbiologia preditiva podem ser classificados como modelos primários e secundários. Os modelos primários descrevem mudanças no número de microrganismos, ou outras respostas microbianas, em função do tempo. Os modelos secundários descrevem como as respostas dos parâmetros dos modelos primários variam em função de outros parâmetros, como temperatura, atmosfera que envolve o alimento, acidez, atividade de água, teor de sal, entre outros (WHITING; BUCHANAN, 1993; JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003).

2.7.1. Modelos primários

A inativação microbiana tem sido tradicionalmente assumida como cinética de primeira ordem (PELEG, 2003; McKELLAR; LU, 2004). Entretanto, nos últimos anos, modelos de inativação microbiana não-log-lineares têm sido frequentemente apresentados na literatura e são usados para descrever a cinética de crescimento e inativação de uma ampla variedade de microrganismos, com o mais variado comportamento (PELEG; COLE, 1998; PELEG, 2003; GEERAERD et al., 2005; VALDRAMIDIS et al, 2006), como ilustrado na Figura 2.1.



Fonte: GEERAERD; VALDRAMIDIS (2005)

Figura 2.1. Ilustração das curvas de inativação microbiana normalmente observadas na literatura. A - log-linear (Δ); log-linear + cauda (\times); sigmoidal (\square); ombro + log-linear (\circ). B – bifásica (Δ); côncava (\times); ombro + bifásica (\square); convexa (\circ)

Entre os modelos primários comumente utilizados para descrever a inativação de microrganismos, serão destacados neste estudo os modelos de Weibull, Bifásico, Gompertz-modificado e Ombro + log-linear.

O clássico modelo de Weibull (Equação 2.1), descrito por Mafart e colaboradores (2002), tem como vantagem a sua simplicidade matemática e a grande flexibilidade. Este modelo pode ser usado para descrever curvas de sobreviventes de microrganismos que apresentam variação no comportamento com a temperatura de processo. Quando $p > 1$, as curvas apresentam concavidades voltadas para baixo, indicando que o tempo para inativar um mesmo número de microrganismos diminui progressivamente. Quando $p < 1$, as curvas apresentam concavidades voltadas para cima, assumindo que a população microbiana reduz rapidamente. Porém, à medida que o processo de destruição ocorre, uma cauda é formada, indicando que a população residual é altamente resistente (PELEG, 2006; ARAGAO et al., 2007). Este modelo também pode ser usado para descrever curvas de sobreviventes log-lineares, sendo $p = 1$.

$$N(t) = N_0 - (t/\delta)^p \quad (2.1)$$

sendo $N(t)$ a população de microrganismos (UFC/mL) no instante t (tempo), N_0 a população inicial do microrganismo (UFC/mL), p o fator de forma, e δ o fator de localização.

O modelo Bifásico (Equação 2.2) descrito por Cerf (1977) assume a existência de duas sub-populações, apresentando cada inativação isoladamente como sendo cinética de primeira ordem, das quais cada sub-população assume sua própria velocidade de inativação k_{\max} .

$$N(t) = N_0 + (f \exp(-k_{\max 1} \cdot t) + (1-f) \cdot \exp(-k_{\max 2} \cdot t)) \quad (2.2)$$

sendo que $N(t)$, N_0 e t têm o mesmo significado da Equação 2.1, f é considerado a população sensível ao tratamento, e $1-f$ é a fração da população que é considerada resistente ao tratamento, sendo $k_{\max 1}$ (min^{-1}) e $k_{\max 2}$ (min^{-1}) as velocidades específicas de inativação das duas populações, respectivamente.

O modelo de Gompertz foi primeiramente utilizado para descrever curvas de crescimento microbiano. Porém, pela versatilidade deste modelo em expressar formas sigmoidais, este modelo foi reparametrizado para descrever curvas de inativação microbiana. Gil e colaboradores (2006) reparametrizaram o modelo de Gompertz-modificado como descrito na Equação 2.3. O modelo apresenta três parâmetros, dos quais descreve um ombro no período inicial da curva, seguido pela fase log-linear de inativação até a formação de cauda, sendo esta última considerada a população residual de microrganismos altamente resistente (GIL et al., 2011).

$$N(t) = N_0 + (N_{\text{res}} - N_0) \exp\left\{-\exp\left[\frac{-k_{\max} \cdot e}{(N_{\text{res}} - N_0)}(L - t) + 1\right]\right\} \quad (2.3)$$

sendo que $N(t)$, N_0 e t têm o mesmo significado da Equação 2.1, N_{res} descreve a população residual microbiana, k_{\max} representa a velocidade específica de inativação (min^{-1}), e é o número de Euler, e L representa o comprimento do ombro (min).

O modelo Ombro + log-linear (Equação 2.4), descrito por Geeraerd et al. (2000), pode descrever curvas de inativação de microrganismos que apresentam resistência distinta, com aparecimento de ombro anteriormente à fase exponencial de inativação. Este modelo tem a vantagem de estimar um comportamento log-linear com ou sem ombro, apresentando uma transição suave entre as fases de ombro e log-linear (GEERAERD et al., 2005).

$$N(t) = N_0 \cdot \exp(-k_{\max} \cdot t) \cdot \frac{\exp(k_{\max} \cdot Sl)}{1 + (\exp(k_{\max} \cdot Sl) - 1) \cdot \exp(-k_{\max} \cdot t)} \quad (2.4)$$

sendo que $N(t)$, N_0 e t têm o mesmo significado da Equação 2.1, k_{\max} representa a velocidade específica de inativação (min^{-1}), Sl representa o comprimento do ombro (min).

2.7.2. Modelos secundários

Os modelos secundários descrevem a influência da temperatura, ou outro fator como pressão e atividade de água, sobre os parâmetros dos modelos primários. Os modelos Tipo Arrhenius (Equação 2.5) e da Raiz Quadrada (Equação 2.6) são comumente utilizados para descrever o comportamento dos parâmetros dos modelos primários com a temperatura, ou outro fator ambiental (McMEEKIN; ROSS, 2002; KOSEKI; YAMAMOTO, 2007). Além destes clássicos modelos, Corradini e Peleg (2005) demonstraram que modelos empíricos, como equações Exponencial (Equação 2.7), da Potência (Equação 2.8) e Linear (Equação 2.9) podem ser aplicadas para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com as condições analisadas.

$$\ln \varepsilon = a \left(\frac{1}{\omega} \right) + b \quad (2.5)$$

$$\sqrt{\varepsilon} = c(\omega - \omega_{\min}) \quad (2.6)$$

$$\varepsilon = d \cdot \exp(g \cdot \omega) \quad (2.7)$$

$$\varepsilon = h \cdot \omega^j \quad (2.8)$$

$$\varepsilon = m \cdot \omega + q \quad (2.9)$$

sendo que ε representa o parâmetro do modelo primário a ser analisado, a , b , c , d , g , h , j , m e q representam os parâmetros empíricos das equações, ω representa a pressão (MPa) ou a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), e ω_{\min} representa a pressão ou temperatura mínima de inativação ou coeficiente do modelo.

2.7.3. Modelos não isotérmicos

Um grande número de modelos matemáticos mostra o efeito da temperatura, ou de outros fatores extrínsecos, sobre os parâmetros cinéticos de crescimento e/ou inativação de microrganismos distintos e são construídos supondo que estes fatores se mantêm constantes com o tempo (GIANNUZZI, et al., 1998; DEVLIEGHERE, et al., 1998). Entretanto, tem-se observado que condições como temperatura e pressão de processo, pH e atividade de água dos alimentos, não se mantêm constantes durante a produção e o armazenamento. Devido à isso, a modelagem matemática pode ser direcionada para a obtenção de modelos não isotérmicos (dinâmicos), ou seja, modelos que permitam prever e assegurar a vida útil dos alimentos em condições variáveis de processamento e armazenamento (Van IMPE et al., 1995; CAYRÉ et al., 2004; CORRADINI et al., 2005).

Segundo Corradini e Peleg (2005), os modelos primários e secundários, derivados de dados de inativação isotérmica, podem ser utilizados como base para prever a inativação microbiana sobre variadas condições não isotérmicas. Assim, muitos pesquisadores têm desenvolvido modelos matemáticos que levam em consideração a variação da temperatura, ou de outros fatores extrínsecos sobre a inativação e/ou crescimento microbiano (Van IMPE et al., 1995; KOUTSOUMANIS, 2001; VALDRAMIDIS et al., 2006).

Peleg e Pechina (2000) propuseram um modelo não isotérmico de inativação microbiana baseado em um modelo primário qualquer. Considerando uma inativação microbiana sendo adequadamente descrita pelo modelo primário de Gompertz-modificado, a obtenção do modelo não isotérmico segue os passos das Equações 2.10 a 2.12. Primeiramente, a Equação 2.10 é a versão reescrita da Equação 2.3.

$$y(t) = y_0 + (y_{\text{res}} - y_0) \exp \left[\left\{ -\exp \left(\frac{-k_{\text{max}} \cdot e}{(y_{\text{res}} - y_0)} (L - t) + 1 \right) \right\} \right] \quad (2.10)$$

onde $y(t) = \log(N(t))$, $y_0 = \log(N_0)$, $y_{\text{res}} = \log(N_{\text{res}})$.

De acordo com este modelo, o tempo que corresponde a qualquer dado número de sobreviventes é chamado t^* , o qual foi isolado da Equação 2.10 e está expresso pela equação 2.11.

$$t^* = L - \left(\frac{y_{\text{res}} - y_0}{-k_{\text{max}} \cdot e} \right) \left[\left\{ \ln \left(\ln \left(\frac{y_{\text{res}} - y_0}{y - y_0} \right) \right) \right\} - 1 \right] \quad (2.11)$$

A Equação 2.11 é substituída na derivada da Equação 2.10, obtendo-se a equação diferencial ordinária (ODE) não isotérmica, representada pela Equação 2.12.

$$\frac{dy(t)}{dt} = -k_{max} [T(t)].e.exp \left[\left\{ -exp \left(\frac{-k_{max} [T(t)].e}{(y_{res} [T(t)] - y_0)} (L[T(t)] - t^*) + 1 \right) \right\} - \left(\frac{-k_{max} [T(t)].e}{(y_{res} [T(t)] - y_0)} (L[T(t)] - t^*) + 1 \right) \right] \quad (2.12)$$

A Equação 2.12 pode ser resolvida numericamente com auxílio de um *software* como o Matlab. O perfil de temperatura T(t) e as equações obtidas com os modelos secundários, representando a variação dos parâmetros do modelo com a temperatura, devem ser fornecidos ao *software*. Como resultado, é possível prever a inativação microbiana com o tempo, considerando variável a temperatura de processo.

Os perfis de temperatura utilizados podem, por exemplo, reproduzir processamentos térmicos aplicados na indústria. A utilização destes perfis não é apenas útil para planejar processos, mas também para assegurar a correção de falhas mecânicas e técnicas, de onde os perfis não isotérmicos podem ser resultantes (PELEG, 2006). Exemplos mais comuns de sistema não isotérmico no processamento de alimentos seriam o rompimento do fornecimento de energia (CORRADINI et al., 2005) e a variação de temperatura que ocorre dentro do tubo de retenção de trocadores de calor. Levar em consideração estas variações é de extrema importância, principalmente quando se trata da determinação da vida útil dos alimentos, ou seja, variações que parecem sutis no processamento e podem comprometer a segurança e a qualidade destes produtos.

2.8. Validação dos modelos

Na microbiologia preditiva, a qualidade do ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais, bem como a comparação do desempenho de diferentes modelos aplicados necessitam ser validados por técnicas estatísticas apropriadas (McCLURE et al., 1994). Os parâmetros estatísticos mais comumente utilizados são o coeficiente de determinação (r^2) e o erro médio quadrático (MSE).

O primeiro indicador da confiabilidade de um modelo é o r^2 , que descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva. O r^2 varia entre a e 1 e quanto maior o valor, melhor é a predição do modelo.

O índice MSE (Equação 2.13) é uma medida da variabilidade residual, ou seja, descreve o quanto os valores preditos estão próximos dos valores observados. O MSE varia entre 0 e 1 e quanto mais próximo de zero é este índice, melhor é o ajuste do modelo.

$$\text{MSE} = \sum \frac{(\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predito}})^2}{n} \quad (2.13)$$

onde n é o número de graus de liberdade (o número de pontos experimentais menos o número de parâmetros do modelo).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Influência da idade e temperatura de esporulação sobre a resistência térmica de esporos de *Bacillus coagulans* e *Byssoschlamys fulva* em meio ácido

3.1.1. Produção de esporos de *B. coagulans*

Uma análise prévia da resistência térmica das cepas ATCC 12245 e ATCC 7050 de *Bacillus coagulans* foi realizada para verificar a mais termorresistente. As cepas foram obtidas na coleção de culturas da Fundação André Tosello, Campinas/SP, sendo a cepa ATCC 7050 a mais termorresistente e conseqüentemente, selecionada para a produção da suspensão de esporos de *B. coagulans*.

Visando analisar a influência da idade e da temperatura de esporulação de esporos de *B. coagulans*, diferentes condições de incubação foram testadas. Idades de 10, 20 e 30 dias e temperaturas de esporulação de 37, 45 e 50 °C foram analisadas, sendo esta a faixa ideal de temperatura para o crescimento desta bactéria (De CLERCK et al., 2004).

O inóculo foi preparado primeiramente com uma pré-cultura cultivada por 24 h a 37 °C em caldo nutriente (Biolife, Milão, Itália). A esporulação foi conduzida em placas de Petri contendo ágar nutriente (Biolife, Milão, Itália), acrescido de 5 ppm de sulfato de manganês (Vetec), conforme metodologia descrita por Pacheco e Massaguer (2004), nas condições de idade e temperatura de estudo. Decorridos os tempos desejados, adicionou-se 5 mL de água destilada estéril a cada placa, raspando-se a superfície para a remoção de esporos. A suspensão de esporo foi removida das placas, filtrada em dupla camada de gaze estéril e centrifugada a 3500 rpm (2.000 g) por 15 minutos. Este procedimento foi repetido por pelo menos três vezes até constatação microscópica da ausência de hifas, realizada através de coloração de esporos usando a técnica de Wirtz-Conklin (HENDRICKSON; KRENZ, 1991). Ao final, foi realizada a resuspensão de esporos em água estéril, sendo a suspensão mantida sob refrigeração a 4 °C até a utilização.

Para determinar a concentração de esporos na suspensão foram preparadas diluições decimais em água peptonada 0,1 % estéril, seguida de semeadura em profundidade em meio ágar tripton dextrosado (TDA). A incubação das placas foi realizada a 37 °C por 3 dias em câmara BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio - Marca Tecnal, TE390). Decorrido este período, realizou-se a enumeração de colônias,

expressa em UFC/mL. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.1.2. Produção de esporos de *B. fulva*

As cepas CCT 0056 e IOC 4518 de *Byssochlamys fulva* foram previamente analisadas para a escolha da mais termorresistente. A cepa CCT 0056 foi obtida na coleção de culturas da Fundação André Tosello, Campinas/SP e a cepa IOC 4518 foi isolada por Salomão et al. (2008) e obtida do laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina. A cepa IOC 4518 foi a mais termorresistente e consequentemente, selecionada a produção da suspensão de esporos de *B. fulva* utilizada na execução deste trabalho.

Na análise da influência da idade dos esporos de *B. fulva* na resistência térmica, dois diferentes tempos de incubação foram testados, sendo 30 e 84 dias. A temperatura de incubação foi de 30 °C, sendo esta temperatura a ótima de crescimento deste microrganismo (TOURNAS, 1994; PITT; HOCKING, 1999).

Para a produção da suspensão de esporos foi realizado um pré-inóculo do fungo por 7 dias à temperatura de 30 °C, incubados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA), conforme descrito por Zimmermann et al. (2011b). Após este período, adicionou-se 5 mL de água destilada estéril a cada placa e raspando-se a superfície para a obtenção dos esporos. Com o auxílio de um *swab*, esta suspensão foi estriada em novas placas contendo ágar extrato de malte (MEA) e as placas foram incubadas à temperatura de 30 °C durante os tempos desejados. Decorrido os tempos de incubação, adicionou-se 5 mL de água destilada estéril a cada placa, raspou-se a superfície para a remoção dos esporos. A suspensão de esporos foi filtrada através de dupla camada de gaze estéril e centrifugada a 3500 rpm (2000 g) por 15 minutos. Este procedimento foi repetido por pelo menos três vezes, até a constatação microscópica da ausência de hifas. Ao final, foi realizada a resuspensão de esporos em água estéril e a suspensão mantida sob refrigeração a 4 °C até a utilização.

Para determinar a concentração de esporos na suspensão, foi primeiramente realizado a ativação dos esporos a 80 °C por 10 minutos, segundo a metodologia utilizada por Salomão et al. (2011). Diluições apropriadas foram realizadas em água destilada estéril e semeadas por profundidade em PDA adicionado de 50 mg/L de Rosa de Bengala e acidificado com solução de ácido tartárico 10 % até obter pH 3,5. A incubação das placas foi realizada a 30 °C por 2 dias em câmara BOD (Marca Tecnal, TE390). Decorrido este período, a enumeração de

colônias foi obtida e expressa em UFC/mL. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.1.3. Meios de aquecimento utilizados nos ensaios para determinação da resistência de esporos de *B. coagulans* e *B. fulva*

Solução de glicose a 4 °Brix foi utilizada como meio de aquecimento para o tratamento térmico de *B. coagulans*. Com o auxílio de um refratômetro digital (Marca Reichert, AR200), a amostra foi preparada, ajustando-se o teor de sólidos solúveis para o valor desejado, através de diluição de glicose anidra em água destilada. As amostras foram tratadas termicamente a 121 °C por 15 minutos, não havendo alteração do teor de sólidos solúveis após o tratamento.

Para o tratamento térmico de *B. fulva*, polpa de tomate concentrada apresentando inicialmente pH 4,3 e 30 °Brix, foi utilizada como meio de aquecimento. O teor de sólidos solúveis da amostra foi ajustado para 4 °Brix através de adição de água destilada estéril, utilizando-se refratômetro digital (Marca Reichert, AR200) para auxiliar no ajuste.

3.1.4. Tratamento térmico de esporos de *B. coagulans* e *B. fulva*

A concentração inicial de esporos dos microrganismos em estudo foi de 10^6 esporos de *B. coagulans* por mililitro de solução de glicose a 4 °Brix e de 10^5 esporos de *B. fulva* por mililitro de polpa de tomate a 4 °Brix. Os ensaios de resistência térmica foram realizados utilizando o método de tubo TDT selado (STUMBO, 1973). Tubos TDT de vidro, medindo 8 mm de diâmetro externo, 120 mm de comprimento e 1 mm de espessura de parede, foram preenchidos com 2,3 mL da solução inicial definida para cada microrganismo (Figura 3.1), com auxílio de seringa graduada com agulha estéreis. Os tubos foram selados com o auxílio de um maçarico, utilizando gás liquefeito de petróleo (GLP) e oxigênio (O_2). Os tubos selados foram submersos em banho termostático (Dist, DI-B0-1000, $\pm 0,2$ °C) contendo óleo de silicone, nas temperaturas de 100 °C para *B. coagulans* e 85 °C para *B. fulva*. O tempo de subida até a temperatura desejada foi de 110 s para temperaturas de 90 a 95 °C e 120 s para temperaturas de 97 a 105 °C, segundo estudo realizado por Miorelli (2009) utilizando o método de tubo TDT apresentando as mesmas dimensões dos tubos utilizados neste estudo, e preenchidos com polpa de tomate.



Figura 3.1. Ilustração de tubos TDT preenchidos com polpa de tomate inoculada e selados

Em cada intervalo de tempo pré-determinado, 1 tubo TDT foi retirado do banho e imediatamente resfriado em banho de gelo por aproximadamente 1 minuto. Após este tempo, cada tubo TDT foi aberto assepticamente com o auxílio de um diamante cortador de vidro. Uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada tubo e adicionada em tubo de diluição contendo 9 mL de água peptonada estéril 0,1 % para estudos com *B. coagulans* e água destilada estéril para estudos com *B. fulva*. Após subsequentes diluições decimais, realizou-se uma semeadura em meio TDA para *B. coagulans* e meio PDA para *B. fulva*, sendo este último acidificado com solução de ácido tartárico 10 % (pH do meio 3,5), contendo 50 mg/L de Rosa de Bengala para inibir o espalhamento das colônias. As placas foram incubadas a 37 °C por 3 dias para *B. coagulans* e a 30 °C por 2 dias para *B. fulva*, sendo quantificado o número de sobreviventes. Cada experimento foi individualmente analisado em duplicata.

3.1.5. Modelagem da inativação microbiana

Para a modelagem das curvas de inativação dos microrganismos em estudo, os modelos primários de inativação Ombro + log-linear (GEERAERD et al., 2000) e Weibull (MAFART et al., 2002) foram selecionados segundo as características das curvas de inativação obtidas e ajustados aos dados experimentais, tendo o auxílio do *software* Matlab (MathWorks Inc, Natick, USA). Baseado nos parâmetros estatísticos r^2 e MSE, o modelo que apresentou o melhor desempenho foi selecionado para a obtenção dos parâmetros primários de inativação térmica dos microrganismos.

3.1.6. Análise estatística dos parâmetros de inativação

Os parâmetros primários de inativação obtidos pelo ajuste do modelo foram submetidos à análise estatística segundo a ANOVA, através do uso do *software* Minitab 14.1, a um nível de confiança de 95 %. O índice estatístico p-valor foi analisado a fim de verificar se estes parâmetros foram influenciados pelas variáveis em estudo (idade de esporos e temperatura de esporulação).

A análise do p-valor determina se o parâmetro analisado é estatisticamente significativo ao nível de significância definido, sendo que neste trabalho o nível foi de 0,05.

3.2. Inativação térmica de esporos de *Byssochlamys fulva* em polpa de tomate com diferentes teores de sólidos solúveis

3.2.1. Produção de esporos de *B. fulva*

Para o estudo da resistência térmica de esporos de *B. fulva* IOC 4518 a temperaturas constantes (90 a 100 °C), foram adotadas as condições de maior termorresistência de idade de esporos resultantes do estudo referente ao item 3.1.

Os esporos de *B. fulva* foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.1.2, sendo adotada a condição de maior termorresistência.

3.2.2. Meios de aquecimento para o estudo da resistência térmica

Para o tratamento térmico de esporos de *B. fulva*, foi utilizado como meio de aquecimento polpa de tomate concentrada, que inicialmente apresentou pH 4,3 e 30 °Brix, ajustada para teores de sólidos solúveis de 4 e 10 °Brix, sendo esta faixa de sólidos solúveis baseada no padrão de identidade e qualidade deste produto.

As amostras foram ajustadas assepticamente para os teores de sólidos solúveis estudados, adicionando-se água destilada estéril e tendo o auxílio de um refratômetro digital (Marca Reichert, AR200) para a verificação dos teores.

3.2.3. Tratamento térmico a temperaturas constantes para esporos de *B. fulva*

A concentração inicial de esporos de *B. fulva* foi de 10^5 esporos por mililitro de polpa de tomate ajustadas conforme descrito no item 3.2.2. Os ensaios de resistência térmica foram realizados utilizando a mesma metodologia descrita no item 3.1.4, sendo que os tubos selados foram submersos em banho termostático contendo óleo de silicone, nas temperaturas de 90, 92, 95, 97 e 100 °C.

3.2.4. Modelagem primária da inativação microbiana

Os modelos de inativação de Weibull e Ombro + log-linear foram selecionados segundo as características das curvas de inativação obtidas e ajustados aos dados experimentais de inativação. A escolha do modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais da inativação de esporos de *B. fulva*, foi baseada nos valores dos parâmetros estatísticos r^2 e MSE.

3.2.5. Influência do teor de sólidos solúveis e da temperatura sobre os parâmetros de inativação

Os parâmetros primários de inativação obtidos pelo ajuste do modelo foram submetidos à análise estatística, conforme descrito no item 3.1.6, a fim de avaliar a influência do teor de sólidos solúveis e da temperatura sobre os parâmetros de inativação térmica de esporos de *B. fulva*, analisados em tubo TDT.

3.2.6. Modelagem secundária dos parâmetros de inativação

Após a obtenção dos parâmetros primários de inativação, os modelos secundários da Raiz Quadrada, Tipo Arrhenius e os modelos empíricos da Potência e Exponencial foram aplicados para descreverem a influência dos fatores (teor de sólidos solúveis e temperatura) que apresentaram influência estatisticamente significativa sobre parâmetros de inativação de esporos de *B. fulva*. A forma da curva obtida através da representação gráfica do ajuste dos modelos e a análise dos valores do parâmetro estatístico r^2 foram analisadas para a escolha do modelo matemático secundário mais adequado (CORRADINI; PELEG, 2005). O *software* Matlab foi utilizado para o desenvolvimento dos cálculos nesta etapa.

3.3. Determinação de parâmetros de inativação térmica de esporos de *Bacillus coagulans* em polpa de tomate pelos métodos de tubos TDT e capilar

3.3.1. Produção de esporos de *B. coagulans*

Para o estudo da resistência térmica de esporos de *B. coagulans* ATCC 7050 a temperaturas constantes, foram adotadas as condições de maior termorresistência de temperatura de esporulação e idade de esporos resultantes do estudo referente ao item 3.1.

Esporos de *B. coagulans* foram produzidos conforme metodologia descrita no item 3.1.1, sendo adotadas as condições de maior termorresistência.

3.3.2. Meios de aquecimento para o estudo da resistência térmica

Polpa de tomate ajustada para 4 °Brix foi utilizada como amostra no tratamento térmico de esporos de *B. coagulans*. Para o preparado da amostra, seguiu-se a mesma metodologia descrita no item 3.2.2.

3.3.3. Tratamento isotérmico de esporos de *B. coagulans*

A concentração inicial da amostra foi de 10⁶ esporos de *B. coagulans* por mililitro de polpa de tomate ajustadas para 4 e 10 °Brix. Os ensaios de resistência térmica foram realizados utilizando a mesma metodologia descrita no item 3.1.4, sendo que os tratamentos térmicos foram realizados em tubos TDT e capilares.

A metodologia utilizada para os testes em tubos TDT foi a mesma descrita no item 3.1.4, sendo os tubos selados submersos em banho termostático contendo óleo de silicone, nas temperaturas de 95, 97, 100, 103 e 105 °C.

Para a metodologia utilizada nos testes com tubos capilares, a concentração de esporos de *B. coagulans* foi a mesma utilizada para a metodologia dos tubos TDT. Porém, a polpa de tomate foi ajustada para 4 °Brix. Tubos capilares de vidro (Pyrex®) medindo 100 mm de comprimento, 1,5 mm de diâmetro interno e 0,2 mm de parede foram preenchidos por capilaridade com a polpa de tomate já inoculada (Figura 3.2). Os tubos foram selados com o auxílio de um maçarico utilizando gás liquefeito de petróleo (GLP) e oxigênio (O₂), sendo este procedimento cuidadosamente realizado para não haver aquecimento da polpa de tomate. Os tubos selados foram depositados em grades específicas para tubos e submersos em banho termostático (Neslab, RTE-221, ± 0.01 °C) contendo óleo de silicone, nas temperaturas de 95,

97, 100, 103, 105, 110 e 120 °C. O tempo de subida foi desprezado, uma vez que tubos capilares atingem a temperatura na qual são submetidos quase que instantaneamente (HUANG, 2009; Van ZUIJLEN et al., 2010).



Figura 3.2. Ilustração de tubos capilares preenchidos com polpa de tomate inoculada e selados

Em cada intervalo de tempo pré-determinado, 2 tubos capilares foram retirados do banho e imediatamente resfriado em banho de gelo por aproximadamente 1 minuto. Após o tratamento térmico, os tubos capilares foram inseridos em etanol 95 % para a redução do nível de contaminação e secados em papel absorvente estéril. Os tubos referentes a cada tempo de amostragem foram abertos com o auxílio de um alicate e o conteúdo depositado em placas de Petri estéreis. Uma alíquota de 5 μL foi adicionada em tubo de diluição contendo 4,5 mL de água peptonada estéril 0,1 %, seguindo a realização de diluições decimais e semeadura em meio TDA. As placas foram incubadas a 37 °C por 3 dias para a quantificação do número de sobreviventes. Cada experimento foi individualmente analisado em duplicata.

3.3.4. Modelagem primária da inativação microbiana

Os modelos de inativação Weibull, Ombro + log-linear, Ombro + log-linear + cauda, Weibull + cauda e Gompertz-modificado foram selecionados segundo as características das curvas de inativação obtidas para cada metodologia utilizada (tubos TDT e capilares) e ajustados aos dados experimentais dos microrganismos em estudo. A escolha do modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais, baseada nos valores dos parâmetros estatísticos r^2 e MSE, foi realizada para a obtenção dos parâmetros de inativação de esporos dos microrganismos analisados.

3.3.5. Influência do teor de sólidos solúveis e temperatura sobre os parâmetros de resistência térmica

Os parâmetros primários de inativação obtidos pelo ajuste do modelo foram submetidos à análise estatística conforme descrita no item 3.1.6., para avaliar a influência do teor de sólidos solúveis e da temperatura sobre a inativação térmica de esporos de *B. coagulans*, analisados em tubo TDT.

3.3.6. Modelagem secundária dos parâmetros de inativação

A aplicação dos modelos secundários sobre os parâmetros primários de inativação seguiram a metodologia descrita no item 3.2.8.

3.4. Predição e validação do modelo de inativação de esporos de *Bacillus coagulans* sob condições não isotérmicas

3.4.1. Predição da inativação não isotérmica de esporos de *B. coagulans*

A predição das curvas de inativação de esporos de *B. coagulans*, sob condição de temperaturas variáveis foi realizada tendo o auxílio do *software* Matlab. De acordo com as cinéticas de inativação obtidas no estudo da termorresistência de esporos de *B. coagulans*, descrito na seção 4.3 do capítulo 4, o modelo não isotérmico proposto por Peleg e Penchina (2000) utilizado neste estudo foi baseado na equação primária de inativação de Gompertz-modificado (Equação 2.9 do item 2.7.3).

Os perfis de temperatura foram descritos por adequadas equações segmentadas (uso de cláusulas “*if*”) e linear. As equações dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre os parâmetros primários de inativação foram obtidas dos resultados da inativação isotérmica de esporos de *B. coagulans* que estão apresentados no item 4.3 do capítulo 4. Inserindo as equações na equação não isotérmica (Equação 2.11 do item 2.7.3), obtém-se a predição da inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições de temperatura variáveis. Esta equação foi resolvida numericamente com auxílio do *software* Matlab, utilizando-se o procedimento ODE (função *ode23*). As curvas de inativação preditas pelo modelo foram validadas com as curvas de inativação obtidas experimentalmente, conforme descrito no item 3.4.3.

3.4.2. Dados isotérmicos utilizados para a predição da inativação não isotérmica

A base de dados utilizada para a predição das curvas de inativação sob condições não isotérmicas foram obtidas dos resultados dos experimentos isotérmicos, apresentados ao longo da seção 4.3 do capítulo 4, para a inativação de esporos de *B. coagulans* realizada com o uso do método do tubo capilar.

Detalhes da metodologia utilizada para a realização dos experimentos isotérmicos podem ser obtidos ao longo da seção 3.3.

3.4.3. Validação do modelo não isotérmico

Inativação não isotérmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate ajustada para 4 °Brix, utilizando a metodologia de tubos

capilares foi realizada para a validação do modelo não isotérmico utilizado neste estudo.

3.4.3.1. Produção de esporos de *B. coagulans*

Os esporos de *B. coagulans* foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.3.1.

3.4.3.2. Meios de aquecimento para o estudo da resistência térmica

Para o tratamento térmico de esporos de *B. coagulans* sob condições não isotérmicas foi utilizado polpa de tomate ajustada para 4 °Brix, sendo a metodologia utilizada no preparo da amostra descrita no item 3.2.2.

3.4.3.3. Tratamentos não isotérmicos de inativação de esporos de *B. coagulans*

Os experimentos não isotérmicos seguiram os mesmos passos utilizados nos experimentos isotérmicos de inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate 4 °Brix, seguindo a metodologia do tubo capilar, conforme descrito no item 3.3.3. Porém, perfis de temperatura não isotérmicos foram empregados nos processos experimentais, variando numa faixa entre 95 e 105 °C.

3.4.3.4. Perfis de temperatura não isotérmicos

Considerando as oscilações de temperatura que podem ocorrer na indústria alimentícia durante o processo produtivo, sete diferentes perfis de temperatura, na faixa de 95 e 105 °C foram aplicados nos tratamentos de inativação de esporos de *B. coagulans*. As temperaturas de 110 e 120 °C não foram estudadas devido a dificuldade de se obter pontos experimentais nesta faixa de temperatura para os experimentos não isotérmicos. Os perfis de temperatura estudados estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Perfil de temperatura não isotérmicas aplicadas nos tratamentos de inativação de esporos de *B. coagulans*

| Perfil | Temperatura (°C) |
|--------|------------------|
| 1 | 95 - 105 |
| 2 | 95 - 98 |
| 3 | 99 - 102 |
| 4 | 102 - 105 |
| 5 | 95 - 100 |
| 6 | 100 - 105 |
| 7 | 95 - 105 |

Os experimentos foram realizados utilizando-se dois banhos de óleo termostáticos (Neslab, RTE-221 e RTE-17, ± 0.01 °C, Thermo Scientific) para os perfis de temperatura segmentados e um banho de óleo (RTE-17, ± 0.01 °C, Thermo Scientific) acoplado de um controlador digital programável de temperatura (Neslab RPC touchscreen controller) para o perfil de temperatura linear.

Para o tratamento com perfil linear (perfil 1) a temperatura foi programada para aumentar linearmente de 95 para 105 °C em 7 minutos de experimento. O perfil de temperatura foi registrado a cada 2 segundos por um *data logger* (OM-CP-RTDTEMP101, Omega Engineering), que foi inserido no banho de óleo acoplado a um tubo capilar. Para os perfis de temperatura segmentados (perfil 2 a 7), os tubos capilares, depositados em uma grade de tubos, foram introduzidos em um dos banhos de óleo previamente aquecido, sendo que em cada intervalo de coleta das amostras, a grade de tubos era trocada de banho, o qual estava com a outra temperatura já ajustada, seguindo assim sucessivamente, até completar o tempo total do experimento. Uma das duplicatas dos experimentos realizados para cada perfil foi mantida até o tempo de 60 minutos, a fim de verificar o comportamento da cauda. O tempo de subida foi desprezado, uma vez que tubos capilares atingem a temperatura na qual são submetidos quase que instantaneamente (HUANG, 2009; Van ZUIJLEN et al., 2010).

3.5. Inativação de esporos de *Bacillus coagulans* em polpa de tomate pelo uso combinado de alta pressão hidrostática e moderada temperatura

3.5.1. Produção de esporos de *B. coagulans*

Os esporos de *B. coagulans* foram obtidos de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.1.

3.5.2. Meio de tratamento utilizado para o estudo da resistência

A metodologia utilizada para o preparo da polpa de tomate utilizada nos experimentos de alta pressão hidrostática (HHP) e temperatura segue como a descrita no item 3.3.2, sendo o teor de sólidos solúveis da amostra ajustado para 4 °Brix.

3.5.3. Tratamento de HHP e temperatura sobre a inativação e esporos de *B. coagulans*

A concentração inicial da polpa de tomate foi de 10^7 esporos de *B. coagulans* por mililitro da amostra ajustada para 4 °Brix. Os experimentos de barorresistência combinado com temperatura foram conduzidos em microtubos de polipropileno, com capacidade de 0.7 mL (Fisherbrand). Os tubos foram completamente preenchidos com a polpa de tomate já inoculada, individualmente envoltos com parafilme (Figura 3.3) e introduzidos no vaso do equipamento de HHP. Diferentes pressões, temperaturas e tempos de processo foram aplicados, dependendo do tratamento desejado.



Figura 3.3. Ilustração do microtubo de polipropileno utilizado para os experimentos de HHP e temperatura, preenchidos com polpa de tomate inoculada e envolto com parafilme

Pressões de 300, 400, 450, 500, 550 e 600 MPa foram aplicadas com tempos de processo de até 39 minutos, dependendo da pressão analisada. Pressões combinadas com temperatura de 50 e 60 °C foram estudadas, sendo considerada a média da temperatura durante o tempo de processo. A temperatura inicial do fluido transmissor de pressão foi controlada considerando-se um aquecimento de compressão de aproximadamente 3 °C/100 MPa. A temperatura da jaqueta de água do vaso do equipamento também foi controlada, a fim de se obter a média da temperatura de estudo no final do processo. A despressurização do equipamento foi de aproximadamente 2 segundos, sendo que após este processo, as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo e armazenadas a 4 °C por no máximo 6 horas até a contagem das células sobreviventes.

Para a contagem das células viáveis, 0,5 mL da polpa de tomate de cada tubo foi diluído em tubos de diluição contendo 4,5 mL de água peptonada estéril 0,1 %, seguindo por diluições decimais e semeadura em meio TDA. As placas foram incubadas a 37 °C por 3 dias para a quantificação do número de sobreviventes. Cada experimento foi individualmente analisado em duplicata.

3.5.4. Equipamento de HHP

O equipamento de alta pressão hidrostática (Elmhurst Research Inc., Albany, NY) utilizado para este estudo está instalado na planta piloto do departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Rutgers (New Brunswick, NJ, EUA) e pode ser visualizado na Figura 3.4. O equipamento possui um vaso de 10 L de capacidade e utiliza água como fluido pressurizador. Este vaso possui medidas internas de 82,3 cm de comprimento e 14,2 cm de diâmetro e externas de 109 cm de comprimento e 44,5 cm de diâmetro, possuindo capacidade máxima de operação de 690 MPa e 80 °C. O controle da pressão e do tempo de processo é realizado por um painel digital acoplado ao equipamento. A temperatura é previamente ajustada por um banho de água externo, equipado com um espiral de aquecimento, que aquece a camisa do vaso de aço durante a noite, a fim de equilibrar a temperatura de processo durante os experimentos. Além disso, um reservatório externo de água, com capacidade de 13 L foi utilizado para pré-aquecer a água até a temperatura desejada, sendo esta utilizada em cada troca de amostra experimental.

A temperatura da água no vaso do equipamento pôde ser visualizada no painel controlador da pressão durante todo o

procedimento, sendo obtida por três termopares do tipo K que se encontravam distribuídos ao longo do vaso, com distância de 1 cm da parede interna. A pressão do processo foi medida utilizando um transdutor. A pressurização, tempo de processo e despressurização foram registrados por um sistema de aquisição de dados. Um tempo médio de 180 segundos foi registrado como o tempo de subida do equipamento quando uma pressão de 600 MPa era definida (KHURANA; KARWE, 2009), sendo a despressurização do equipamento quase que instantânea.



Figura 3.4. Equipamento de alta pressão hidrostática do departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Rutgers

3.5.5. Modelagem primária da inativação microbiana

Os modelos de inativação de Weibull, Log-linear + cauda e Bifásico foram selecionados segundo as características das curvas de inativação obtidas e ajustados aos dados experimentais da inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate ajustada para 4 °Brix. O modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais, baseada nos valores dos parâmetros estatísticos r^2 e MSE, foi selecionado para a obtenção dos parâmetros de inativação de esporos do microrganismo analisado.

3.5.6. Modelagem secundária da influência da pressão sobre os parâmetros primários de inativação

Após a obtenção dos parâmetros primários de inativação, os modelos secundários da Raiz Quadrada, Tipo Arrhenius e os modelos

empíricos da Potência e Exponencial, foram aplicados para descreverem a influência da pressão sobre estes parâmetros. A forma da curva obtida através da representação gráfica do ajuste dos modelos e a análise dos valores do parâmetro estatístico r^2 foram analisadas para a escolha do modelo matemático secundário mais adequado (CORRADINI; PELEG, 2005). O *software* Matlab foi utilizado para o desenvolvimento dos cálculos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência da idade e temperatura de esporulação na resistência térmica de esporos de *Bacillus coagulans* e *Byssoschlamys fulva* em meio ácido

O estado fisiológico dos microrganismos pode influenciar na resposta microbiana quando submetidos a tratamentos de inativação. Em condições reais, os esporos são produzidos nas mais variadas condições, podendo sofrer condições de estresse antes da germinação (DANTIGNY; NANGUY, 2009).

Estudos indicam que o estado fisiológico dos esporos é influenciado pelo pH do meio de esporulação, tempo de incubação (idade) e temperatura de formação dos esporos, entre outros fatores (DIJKTERHUIS; TEUNISSEN, 2004; SLONGO; ARAGÃO, 2006; DANTIGNY; NANGUY, 2009). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resistência térmica de esporos de *B. coagulans* e *B. fulva* obtidos em diferentes condições. Os esporos de *B. coagulans* foram incubados por 10, 20 e 30 dias nas temperaturas de 37, 45 e 50 °C. Esporos de *B. fulva* foram incubados a 37 °C por 30 e 84 dias. Os resultados são apresentados na forma de artigo (item 4.1.1) e como resultados complementares (item 4.1.2).

4.1.1. Microorganism thermal resistance in acid foods as influenced by sporulation factors

ABSTRACT

The influence of different ages (10, 20, and 30 days old) and sporulation temperatures (37, 45, and 50 °C) on the heat resistance of *Bacillus coagulans*; and different ages (30 and 84 days old at 30 °C) on the heat resistance of *Byssoschlamys fulva* were evaluated in the present study. Log-linear + shoulder and Weibull models were chosen to fit the experimental data. The “time for 4 decimal reductions” (*4DR*) was used to compare spores’ heat resistance and it was submitted to an analysis of variance (ANOVA) with confidence of 95 % ($p < 0.05$). The sporulation conditions of *B. coagulans* did not show statistical influence on *4DR*. However, spore age of *B. fulva* showed a statistical difference for *4DR*, significantly improving the heat resistance when microorganism spore age changed from 30 to 84 days.

PRACTICAL APPLICATIONS

B. coagulans and *B. fulva* are significant food spoilage microorganisms capable of surviving under low pH conditions. They are generally found in fruit and vegetable products, and can spoil canned food. The literature shows that the heat resistance of microorganisms may be influenced by the sporulation conditions, but there is no general trend for that. For *B. coagulans* and *B. fulva* there is still no consensus about whether sporulation conditions influence heat resistance. Therefore, the heat resistance of *B. coagulans* and *B. fulva* was investigated as influenced by spore ages and sporulation temperatures. The findings of the study indicate that the influence of environmental factors on spores' heat resistance may vary according to the strain and species of microorganisms, which must be taken into account in the design of the heat treatment.

Keywords: *Bacillus coagulans*, *Byssoschlamys fulva*, heat resistance, sporulation temperature, spore age.

INTRODUCTION

The ability to form spores with high thermal resistance and the ability to survive at low pH media allow some unwanted pathogenic or spoilage microorganisms to reach the final product. Among these microorganisms, *Bacillus coagulans* and *Byssoschlamys fulva* are considered significant contaminants of acid products, such as tomato-based products (Kotzekidou 1997; Baglioni et al. 1999; Panagou et al. 2010).

B. coagulans is a spore-forming bacterium that can cause “flat sour” spoilage in canned food, which is a drastic acidification of the media due to fermentation without gas formation (Lucas et al. 2006). *B. fulva* is an ascospore-forming mould characterized by flavor alteration, gas production, phase separation, and production of visible mycelium (Pitt and Hocking 1999; Jay and Anderson 2001). This mould is capable of growing under reduced oxygen tension causing substantial deterioration of canned fruit, which remains undetected until the can is opened (Taniwaki et al. 2009).

Spore-forming microorganisms are a common problem in the food industry because they are frequently found in many raw materials and they require more intense treatments for inactivation than vegetative cells. Consequently, higher processing cost and lower product quality are generated (Lucas et al. 2006).

Heat resistance of microorganisms is influenced by many different environmental factors, besides the genetic component. Some environmental factors, such as pH, which has been widely investigated, can be easily controlled and modified in the industrial processes. Other factors, such as sporulation temperature, which changes according to the geographic area and season, cannot be controlled, and therefore have been much less investigated (Palop, et al. 1999a).

Studies indicate that the temperature under which spores are formed influences the heat resistance of the microorganism, although a general trend cannot be drawn. While some authors have found that spores produced at high temperatures are more heat resistant than those produced at low temperatures (Raso et al. 1995; Baweja et al. 2008; Garcia et al. 2010), others have not detected any influence of this factor on thermal resistance (Alcock and Brown 1985; González et al. 1999; Palop et al. 1999b).

Spore age is another factor that can influence the microorganism's heat resistance. In developing processes to inactivate heat resistant spores in shelf-stable food products, the impact of spore age must be considered, since spores contaminating fruit products are most likely to have come from soil, and may be of varying maturities. Slongo et al. (2005), in their study on *Neosartorya fischeri*, found that the three-month-old spores were more heat resistant than the one-month-old ones. However, according to our knowledge, the effect of different spore ages of bacteria such as *B. coagulans* is still unknown.

The concept of log-linear behavior of the survivor curves, first demonstrated by Bigelow (1921), has served well the food industry in general and the canning industry in particular for establishing the concept D (decimal reduction time). The problem is that this concept can be assumed only when survivor curves have a log-linear behavior. The kinetics of spore thermal inactivation is often more complex than a log-linear inactivation, and shoulder and/or tailing have been observed and mathematically modeled (Xiong et al. 1999). These behaviors have been found by various authors during the inactivation of several microorganisms (Geeraerd et al. 2000; Fernández et al. 2002; Buzrul 2007; Stecchini et al. 2009).

Thermal resistance characteristics of food-spoilage microorganisms are important to determine the design of thermal processes used to preserve food products (Ceviz et al. 2009); and only a limited number of studies have been carried out to determine thermal resistance characteristics of *B. coagulans* and *B. fulva*. Therefore, more

studies must be carried out, especially to determine their thermal resistance characteristics under several conditions.

Since spores are produced *in vitro* under optimum conditions and such conditions are indefinite when the spores are in the environment, the aim of this study was to analyze the influence of sporulation conditions at different spore ages and different incubation temperatures on the heat resistance of *Bacillus coagulans* and *Byssochlamys fulva*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and Spore Production

Bacillus coagulans ATCC 7050 used in this study was obtained from André Tosello Foundation, in Campinas, SP, Brazil. *Byssochlamys fulva* IOC 4518 (IOC - Oswaldo Cruz Institute) was isolated in the Food Biochemistry Laboratory of the Federal University of Santa Catarina by Salomão et al. (2008).

Cells of *B. coagulans* were pre-cultivated at 37 °C for 48 h in nutrient broth (NB, Biolife, Italy). The cells were inoculated on plates containing nutrient agar (NA, Biolife, Italy) supplemented with sporulation salt (MnSO₄, 5 ppm), according to Pacheco and Massaguer (2004). According to the literature (Baker et al. 1953), the temperature range for *B. coagulans* growth is 30 °C to 61 °C. Intending to work within this range, plates were incubated randomly at 37, 45, and 50 °C for 10, 20, and 30 days for each temperature.

B. fulva cells were pre-cultivated at 30 °C for 7 days in potato dextrose agar (PDA, Himedia Laboratories, Mumbai, IND) according to Zimmermann et al. (2011). The colonies were suspended in sterile distilled water and used to inoculate new plates with malt extract agar (MEA, Difco Laboratories, USA). Plates were incubated for 30 and 84 days at 30 °C, which was the ideal sporulation temperature of this microorganism found in the literature (Tournas 1994; Pitt and Hocking 1999).

After each desired age, spores were harvested by flooding the plate surfaces with 5 mL sterile distilled water and the spores were gently rubbed from the surface with a sterile rubber rod. The spore suspensions were filtered through layers of gauze and centrifuged at 2,000 g for 15 minutes. The suspensions were washed three times with 5 mL sterile distilled water, followed by centrifugation. *B. fulva* sporulation was assessed by microscope and *B. coagulans* sporulation by the Wirtz-Conklin technique (Hendrickson and Krenz, 1991). The

final precipitates were resuspended in a small volume of sterile distilled water and stored at 4 °C for future use.

Spore concentration of *B. coagulans* was determined by serial dilutions in sterile bacteriology peptone 0.1 % solution and pour plating in dextrose tryptone agar (DTA, Biolife, Italy). The colonies were counted after three days being incubated at 37 °C.

B. fulva spore concentration was determined by serial dilutions in sterile distilled water and pour plating in PDA, supplemented with 50 mg/L Bengal rose and a 100 g/L tartaric acid solution until reaching pH 3.5, according to Baglioni et al. (1999). The colonies were counted after incubated at 30 °C for two days.

Heat Treatment

Thermal resistance trials were conducted in a 4 °Brix glucose solution with initial concentration of 10^6 spores/mL of *B. coagulans*; and 4 °Brix tomato pulp with initial concentration of 10^5 spores/mL of *B. fulva*. The thermal death time (TDT) tubes were filled with 2.3 mL of the inoculated media and were then sealed with O₂/LPG (liquefied petroleum gas). The TDT tubes were heated in a thermostatically controlled oil bath (Dist, DI-B0-1000, ± 0.2 °C) at 100 °C for *B. coagulans* and 85 °C for *B. fulva*. The come-up time was previously defined and the procedure started when the required temperature was reached. At each desired time interval, a tube was removed and immediately cooled in ice water for one minute. 1 mL of the solution of each TDT tube was diluted in 9 mL of sterile 0.1 % bacteriology peptone solution for *B. coagulans* and sterile distilled water for *B. fulva* to determine the survival curves. Serial dilutions were pour plated in DTA for *B. coagulans* and PDA supplemented with Bengal Rose and tartaric acid solution for *B. fulva*. The number of colonies was determined after three days being incubated at 37 °C for *B. coagulans* and after two days being incubated at 30 °C for *B. fulva*. All experiments were performed in duplicate.

Modeling of Thermal Inactivation Kinetics

According to inactivation curve shapes previously obtained, the primary models Log-linear + shoulder (Geeraerd et al. 2000), and Weibull (Mafart et al. 2002) models were applied, and based on statistic parameters r^2 and MSE, the model which presented the best fit of the experimental data was selected. The Matlab software (MathWorks Inc,

Natick, USA) was used to estimate inactivation parameters. R^2 represents the fraction of the variation that is explained. The higher the r^2 value, the better the data are predicted by the model. The Mean Square Error (MSE) describes the error of the model compared to the experimental data. The closer to zero, the better the fit is.

Statistical Analysis

The parameter estimated by the model in all different studied conditions was submitted to analysis of variance (ANOVA) using the Minitab 14.1 software with the confidence level of 95 %. These analysis were performed to study the influence of sporulation condition factors of each microorganism on its heat resistance, measured by the “time for 4 decimal reductions” (*4DR*) of the chosen model.

RESULTS

Inactivation curves of *B. coagulans* and *B. fulva* obtained in this study to analyze the influence of spore age and sporulation temperature had shoulder formation followed by linear reduction. Among the fit of Log-linear + shoulder and Weibull models to the experimental data, the statistical parameters r^2 and MSE were considered; and Log-linear + shoulder model showed the best fit, as well as the highest r^2 and lowest MSE values (data not shown). The Log-linear + shoulder model is described in Eq. 1.

$$N(t) = N_0 \cdot \exp(-k_{\max} \cdot t) \cdot \left(\frac{\exp(k_{\max} \cdot Sl)}{1 + (\exp(k_{\max} \cdot Sl) - 1) \cdot \exp(-k_{\max} \cdot t)} \right) \quad (1)$$

where, $N(t)$ is the cell concentration (CFU/mL) after a treatment time t (s or min), N_0 is the cell concentration (CFU/mL) in the time 0, Sl is the shoulder length (s or min), and k_{\max} is the maximum inactivation rate (s^{-1} or min^{-1}).

The *4DR* was analyzed in order to compare the heat resistance of *B. coagulans* and *B. fulva* according to the variation of spore ages and sporulation temperatures. The *4DR* obtained with the fitting of the primary model as well as the corresponding r^2 and MSE values for all studied situations of *B. coagulans* and *B. fulva* are illustrated in Table 1.

TABLE 1. The *4DR* (s) and the corresponding r^2 and MSE values obtained through Log-linear + shoulder model for *B. coagulans* and *B. fulva* spores analyzed in different sporulation conditions. The average of duplicates as well as their respective standard deviation are shown

| Microorganism | Temperature (°C) | Age (days) | <i>4DR</i> (s) ± SD | r^2 | MSE |
|---------------------|------------------|------------|---------------------|-------|------|
| <i>B. coagulans</i> | 37 | 10 | 122.0 ± 17.0 | 0.919 | 0.28 |
| | | 20 | 87.5 ± 7.8 | 0.973 | 0.20 |
| | | 30 | 109.5 ± 4.9 | 0.969 | 0.13 |
| | 45 | 10 | 102.0 ± 25.5 | 0.937 | 0.14 |
| | | 20 | 90.5 ± 3.5 | 0.900 | 0.49 |
| | | 30 | 95.0 ± 5.7 | 0.975 | 0.24 |
| | 50 | 10 | 83.0 ± 0.0 | 0.964 | 0.17 |
| | | 20 | 90.5 ± 0.7 | 0.956 | 0.13 |
| | | 30 | 97.0 ± 0.0 | 0.976 | 0.16 |
| <i>B. fulva</i> | 30 | 30 | 131.5 ± 0.7 | 0.990 | 0.03 |
| | | 84 | 211.5 ± 3.53 | 0.990 | 0.02 |

SD - standard deviation

The increase of sporulation temperature and incubation time of *B. coagulans* did not interfere considerably on the value of the *4DR*. When the temperature was adjusted to 45 °C, the microorganism took 102, 90.5, and 95 seconds to reach *4DR* when the incubation times were 10, 20, and 30 days, respectively. These findings show that increasing the incubation time from 10 to 30 days at the same sporulation temperature did not considerably influence on heat resistance of *B. coagulans*. The same situation was found when the incubation temperature was changed. For example, the times found to reach *4DR* at 20 days of incubation were 87.5, 90.5, and 90.5 when the incubation temperatures were 37, 45, and 50 °C, respectively. To confirm whether the sporulation temperature and incubation time were not significant on the heat resistance of *B. coagulans* spores, analysis of variance with a significance level of $p < 0.05$ were performed.

The interaction of the *4DR* with the sporulation temperatures and the spore ages analyzed confirmed that *B. coagulans* heat resistance was not statistically influenced by these factors. The p-values found for the interaction of sporulation temperature and spore age with the *4DR* were 0.13 and 0.25, respectively.

Heat resistance of *B. fulva* was greatly influenced by the increase in spore age from 30 to 84 days. The *4DR* increased from approximately 131 seconds to approximately 211 seconds when the spore age increased from 30 to 84 days of incubation. These findings were confirmed by analysis of variance with a significance level of $p < 0.05$.

The interaction of the *4DR* with the spore ages analyzed confirmed that *B. fulva* heat resistance was statistically influenced by this factor, showing a p-value of 0.01.

DISCUSSION

Although the classic first-order inactivation model has been successfully used in the canning industry in the past, it may lead to difficulties in the present trend in the food industry to use minimal processing to achieve better food quality. Palop et al. (1997), studying *B. coagulans* strain in buffered peptone water at different pH values, found non-linear behavior of survival curves. Buzrul (2007) has shown in his study that the Weibull model is better than the classic D value. Sant'Ana et al. (2009), modeling *Byssochlamys fulva* IOC 4518 inactivation kinetics in clarified apple juice, found that the inactivation kinetic behavior was not log-linear, with the presence of a shoulder followed by a fall in the survivor counts. In the present study, the survivor curves of *B. coagulans* and *B. fulva* did not show linear behavior and Log-linear + shoulder model performed a good fit to the survival curves, showing latency time before decreasing the population size.

The influence of the sporulation temperature (37 to 50 °C) was not observed for *B. coagulans* heat resistance, since no statistically significant differences ($p < 0.05$) were detected among the *4DR* obtained. Palop et al. (1999a) found that some mesophilic and thermophilic species investigated in their study showed an increase in heat resistance as a consequence of the increase in sporulation temperature; however, the heat resistance of *Bacillus cereus* was not significantly influenced by the sporulation temperature. González et al. (1999) studying the sporulation temperature of *Bacillus cereus* ATCC 7004 in the range of 20 and 45 °C and inoculated in Roux bottles containing nutrient agar supplemented with 1 ppm of Mn^{2+} added as manganese sulphate, found that most heat resistant spores were obtained at 35 °C. Garcia et al. (2010) analyzing *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures in a nutrient-rich chemically defined sporulation medium designated MSM medium and inoculated with luria broth overnight-subcultures to a final concentration of 0.5 % found that sporulation temperature had a significant impact on the bacteria spores' heat resistance properties, with cells sporulated at low temperatures showing significantly lower thermal resistance. The difference between the results presented in the current study and that

found in the literature could be explained by the different methodologies applied and microorganism' strains used for determining the heat resistance. Palop et al. (1999a) concluded that sporulation temperature is a factor that can have a strong influence on heat resistance of microorganisms at any treatment temperature. However, the response to this factor seems to be a behavior inherent to each species of microorganism and temperature range of the process analyzed.

Spore age of *B. coagulans* did not show a statistically significant difference ($p < 0.05$) among the *4DR* obtained, while the same factor analyzed for *B. fulva* showed a statistically significant difference for this same parameter. Dantigny and Nanguy (2009) concluded that the influence of the spore age on heat resistance seems to be strain dependent. Slongo et al. (2005) analyzing the effect of temperature and age of ascospores of *Neosartorya fischeri* in papaya juices found that ascospores cultivated for 3 months were more heat resistant than those cultivated for 1 month. Coll and Negron (1991) found that spore age of 2, 10, and 16 months old did not affect heat resistance for *Bacillus macerans* when they calculated the decimal reduction times of this bacteria at 100 °C in acidic ripe plantain puree. As far as we know, there is little data available in the literature regarding the heat resistance behavior of bacteria at different spore ages.

The findings obtained in this study indicate that merely knowing the sporulation temperature and spore age, in the studied range, are not enough to ensure the increase of thermal resistance of *B. coagulans* spores. However, the results showed ascospore age increases the thermal resistance of *B. fulva* ascospores when the ascospore age increases from 30 to 84 days. It is substantial to consider that these factors along with other environmental factors could contribute to the increase of heat resistance of *B. coagulans* spores.

In conclusion, the influence of spore age and sporulation temperature on heat resistance of the spores may vary with the strain and species of microorganisms investigated.

REFERENCES

- Alcock, S.J. and Brown, K.L. 1985. Heat resistance of P.A. 3679 (NCIB 8053) and other isolated of *Clostridium* sporogenes. In *Fundamental and Applied Aspects of Bacterial Spores* (G.J. Dring, G.W. Gould and D.J. Ellar, eds.) pp. 61-73, Academic Press, London.

- Baglioni, F., Gumerato, H.F. and Massaguer, P.R. 1999. Ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 19 (2), p. 258-263.
- Baker, H., Sobotka, H. and Hunter, S.H. 1953. Growth requirements of some thermophilic and mesophilic bacilli. *J. Gen. Microbiol.* 9, 485-493.
- Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G.P., Kurupati, R.K., Ganguli, M., Chaudhury, N.K., Sen, S., Das, T.K., Gade, W.N. and Singh, Y. 2008. Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Arch. Microbiol.* 189, 71-79.
- Bigelow, W.D. 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. of Infectious Diseases*, 29, 528-536.
- Buzrul, S. 2007. A suitable model of microbial survival curves for beer pasteurization. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 1330-1336.
- Ceviz, G., Tulek, Y. and Con, A.H. 2009. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different heating media. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1770-1777.
- Coll, F.F. and Negron, S.L. 1991. Spore age and its effect on thermal-resistance of *Bacillus coagulans* and *Bacillus macerans* in acid ripe plantain puree. *J. Agr. Univ. Puert. Rico* 75 (3), 205-211.
- Dantigny, P. and Nanguy, S.P.M. 2009. Significance of the physiological state of fungal spores. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 16-20.
- Fernández, A., Collado, J., Cunha, L.M., Ócio, M.J. and Martínez, A. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 147-153.
- Garcia, D., Van Der Voort, M. and Abee, T. 2010. Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 146-153.
- Geeraerd. A.H., Herremans, C.H. and Van Impe, J.F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int. J. Food Microbiol* 59, 185-209.
- González, L., López, M., Martínez, S., Bernardo, A. and González, J. 1999. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *Int. Journal of Food Microbiol.* 51, 81-84.

- Hendrickson, D. A. and Krenz, M. M. 1991. Reagents and Stains. In *Manual of Clinical Microbiology* (A. Balows, W.J., Hausler, K.L.Jr., Herrmann, H.D., Isenberg and H.J., Shadomy, eds.) pp. 1289-1314, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Jay, S. and Anderson, J. 2001. Fruit juice and related products. In *Spoilage of processed foods: causes and diagnosis* (C.J. Moir, C. Andrew-Kabilafkas, G. Arnold, B.M. Cox, A.D. Hocking, I. Jenson, eds.) pp. 187-197, Australian Institute of Food Science and Technology Inc, Waterloo, NSW Australia.
- Kotzekidou, P. 1997. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. *J. Food Sci.* 62 (2), 410-412.
- Lucas, R., Grande, M.J., Abriouel, H., MAQUEDA, M., BEN OMAR, N., VALDIVIA E., Martínez-Canamero, M. and Gálvez, A. 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1774-1781.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. and Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 107-113.
- Pacheco, C.P. and Massaguer, P.R. 2004. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. *J. Food Process Eng.* 27, 449-463.
- Palop, A., Mañas, P. and Condón, S. 1999a. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *J. Food Saf.* 19, 57-72.
- Palop, A., Marco, A., Raso, J., Sala, F.J. and Condón, S. 1997. Survival of heated *B. coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 25-30.
- Palop, A., Sala, F.J. and Condón, S. 1999b. Heat resistance of native and demineralized spores of *B. subtilis* sporulated at different temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (3), 1316-1319.
- Panagou, E.Z., Chelonas, S., Chatzipavlidis, I. and Nychas, C.E. 2010. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea*. *Food Microbiol.* 27, 618-627.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. Maryland: Aspen Publishers Inc., Gaithersburg.

- Raso, J., Palop, A., Bayarte, M., Condón, S. and Sala, F. 1995. Influence of sporulation on the heat resistance of a strain of *B. licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). *J. of Food Microbiol.* *12*, 357-361.
- Salomão, B.C.M., Massaguer, P.R. and Aragão, G.M.F. 2008. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* *28*, 116-121.
- Sant'ana, A.S., Rosenthal, A. and Massaguer, P.R. 2009. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *J. Appl. Microbiol.* *107*, 197-209.
- Slongo, A.P., Miorelli, S. and Aragão, G.M.F. 2005. Influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão. *Alimentos e Nutrição* *16* (4), 377-387.
- Stecchini, M.L., Spaziani, M., Del Torre, M. and Pacor, S. 2009. *Bacillus cereus* cell and spore properties as influenced by the microstructure of the medium. *J. Appl. Microbiol.* *106*, 1838-1848.
- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I. and Fleet, G.H. 2009. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* *132*, 100-108.
- Tournas, V. 1994. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. *Crit. Rev. Microbiol.* *20* (4), 243-263.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A.E. and Sheard, M.A. 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. *Int. J. Food Microbiol.* *46*, 45-55.
- Zimmermann, M., Miorelli, S., Massaguer, P.R. and Aragão, G.M.F. 2011. Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. *LWT Food Sci. Technol.* *44*, 239-243.

4.1.2. Resultados complementares

4.1.2.1. Influência da idade e temperatura de esporulação na resistência térmica de esporos dos microrganismos

O artigo apresentado no item 4.1.1 abordou o *4RD* (tempo para obter 4 reduções decimais) dos esporos dos microrganismos em estudo e em cada situação de idade e temperatura de esporulação analisados. Os parâmetros Sl e k_{max} que também são obtidos pelo ajuste do modelo Ombro + log-linear, bem como os valores de r^2 para cada situação

analisada para *B. coagulans* e *B. fulva*, estão apresentados como resultados complementares e podem ser visualizados nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

Tabela 4.1. Parâmetros estatísticos e parâmetros obtidos para o ajuste do modelo Ombro + log-linear aos dados experimentais de estudo da resistência de esporos de *B. coagulans* para todas as condições de esporulação analisadas.

| Temperatura (°C) | Idade (dias) | SI (s) | k_{\max} (s ⁻¹) | r^2 |
|------------------|--------------|--------|-------------------------------|-------|
| 37 | 10 | 22 | 0,08 | 0,938 |
| | | 17 | 0,10 | 0,900 |
| | 20 | 37 | 0,16 | 0,931 |
| | | 30 | 0,18 | 0,943 |
| | 30 | 18 | 0,10 | 0,969 |
| | | 20 | 0,11 | 0,959 |
| 45 | 10 | 29 | 0,10 | 0,974 |
| | | 24 | 0,15 | 0,972 |
| | 20 | 35 | 0,16 | 0,975 |
| | | 29 | 0,16 | 0,826 |
| | 30 | 24 | 0,14 | 0,928 |
| | | 38 | 0,15 | 0,984 |
| 50 | 10 | 15 | 0,14 | 0,992 |
| | | 10 | 0,13 | 0,946 |
| | 20 | 16 | 0,13 | 0,984 |
| | | 8 | 0,11 | 0,967 |
| | 30 | 40 | 0,16 | 0,969 |
| | | 33 | 0,15 | 0,983 |

Tabela 4.2. Parâmetros estatísticos e parâmetros obtidos para o ajuste do modelo Ombro + log-linear aos dados experimentais de estudo da resistência de esporos de *B. fulva* para 30 e 84 dias a 30 °C.

| Idade (dias) | SI (s) | k_{\max} (s ⁻¹) | r^2 |
|--------------|--------|-------------------------------|-------|
| 30 | 32 | 0,09 | 0,990 |
| | 30 | 0,09 | 0,990 |
| 84 | 18 | 0,05 | 0,989 |
| | 22 | 0,05 | 0,991 |

Os perfis do ajuste do modelo Ombro + log-linear aos dados experimentais de resistência de esporos de *B. coagulans* e *B. fulva* em todas as condições analisadas, estão apresentadas nas Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente. Para melhor visualização dos perfis de inativação, uma curva entre as duplicatas analisadas foi selecionada para cada condição de estudo.

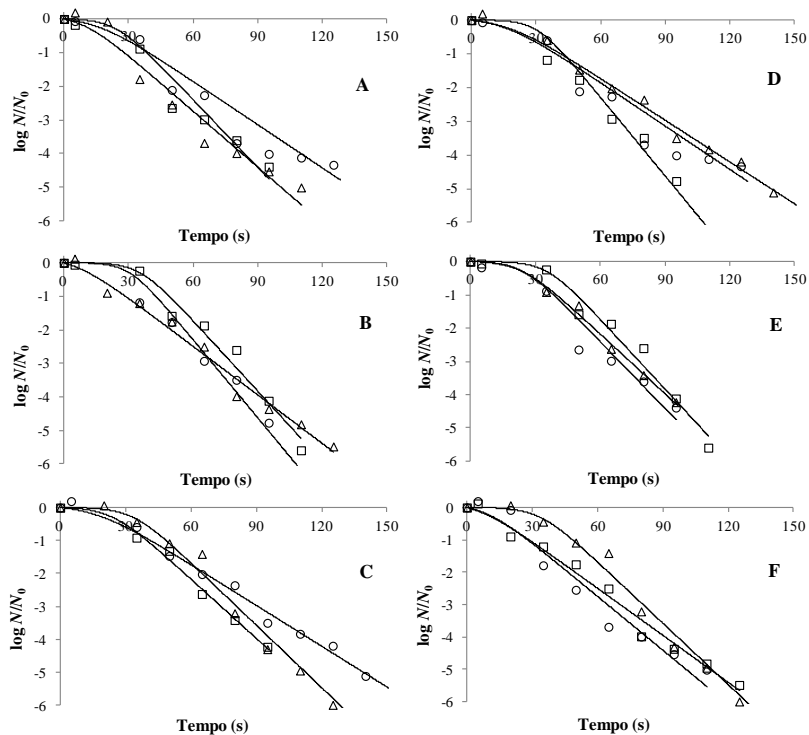


Figura 4.1. Curvas de sobreviventes de esporos de *B. coagulans* em todas as condições analisadas. Comparação das temperaturas de incubação para 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias, sendo os pontos experimentais representando as temperaturas de incubação de 37 (○), 45 (□) e 50 (△) °C. Comparação da idade dos esporos a 37 (D), 45 (E) e 50 (F) °C, sendo os pontos experimentais representando as temperaturas de incubação de 10 (□), 20 (○) e 30 (△) dias. A curva contínua (–) representa o ajuste do modelo aos dados experimentais

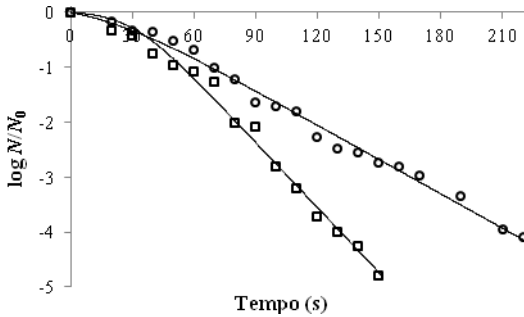


Figura 4.2. Curvas de sobreviventes de esporos de *B. fulva* para 30 (□) e 84 (○) dias de incubação a 30 °C. A curva contínua (–) representa o ajuste do modelo aos dados experimentais

Através da figura 4.1 pode-se verificar que a idade e a temperatura de incubação dos esporos não influenciou a resistência térmica de esporos de *B. coagulans* dentro da faixa de idade (10 a 30 dias) e temperatura (37 a 50 °C) analisadas, apresentando curvas de inativação praticamente sobrepostas. Contrariamente, a idade do esporo apresentou influência sobre a resistência de esporos de *B. fulva* quando variou de 30 para 84 dias a 30 °C, como pode ser claramente visualizado através da figura 4.2.

4.2. Inativação térmica de esporos de *Byssochlamys fulva* em polpa de tomate com diferentes teores de sólidos solúveis.

Durante a produção de alimentos, é importante que medidas adequadas sejam tomadas para garantir a estabilidade e segurança durante a vida útil do produto. O estudo do comportamento dos microrganismos contaminantes de alimentos é de grande valia para a eficiente determinação do processo térmico a ser empregado (CEVIZ et al., 2009). A completa destruição microbiana nem sempre é possível durante os processos de esterilização geralmente aplicados pela indústria, devido à presença de esporos microbianos. A principal preocupação com a presença destas formas esporuladas, além de serem altamente resistentes ao calor, é a capacidade de alguns gêneros, como *Byssochlamys* spp., crescerem em ambientes com baixa tensão de oxigênio (PITT; HOCKING, 1999).

Estudos indicam que a tolerância dos fungos termorresistentes aos processamentos térmicos depende da espécie e/ou cepa do microrganismo e da composição do meio de aquecimento (RAJASHEKHARA et al., 1996; KOTZEKIDOU 1997), como a presença de ácidos orgânicos, teor de sólidos solúveis, tipos de meios de aquecimento e a presença de conservantes (SLONGO et al., 2005; MILLER et al., 2009b). O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência térmica de esporos de *B. fulva*, produzidos conforme definido na seção 4.1, submetidos a diferentes temperaturas e teores de sólidos solúveis do meio de aquecimento. Temperaturas de 90, 92, 95, 97 e 100 °C foram avaliadas utilizando como meio de aquecimento polpa de tomate ajustada para 4 e 10 °Brix, sendo os resultados apresentados a seguir.

4.2.1. Resistência térmica de esporos de *Byssochlamys fulva* em polpa de tomate

A cinética das curvas de inativação de esporos de *B. fulva* obtidas com o uso da polpa de tomate ajustada para 4 e 10 °Brix, bem como o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais podem ser visualizadas na Figura 4.3, a fim de verificar o comportamento do microrganismo nas diferentes temperaturas analisadas. Para melhor visualização, a curva de maior resistência das duplicatas analisadas é apresentada para cada situação de temperatura estudada, sendo esta considerada a de maior risco para a indústria.

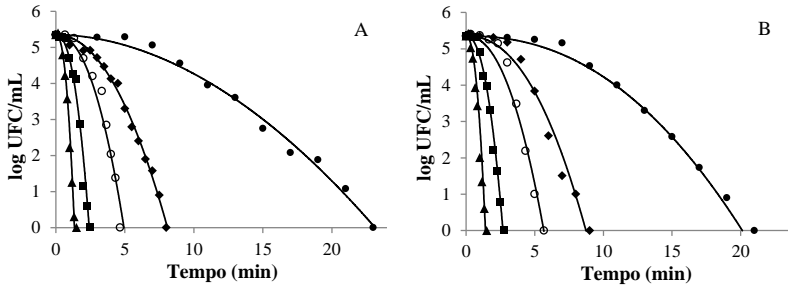


Figura 4.3. Curvas de sobreviventes (log UFC/mL) de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate a 4 °Brix (A) e 10 °Brix (B), usando a metodologia do tubo TDT, nas temperaturas de 90 (●), 92 (◆), 95 (○), 97 (■) e 100 (▲) °C. A curva contínua (—) representa o ajuste do modelo de Weibull

Através da Figura 4.3, pode-se observar que a temperatura de aquecimento influenciou a termoresistência de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate, ajustada com diferentes teores de sólidos solúveis. Pode-se também identificar, através da mesma figura, a presença de ombro, indicando que, por certo período de tempo, a aplicação de calor pode não apresentar modificação na população microbiana inicial. A extensão do ombro foi maior quanto menor a temperatura de aquecimento aplicada no processo, sendo que em temperaturas elevadas, as curvas de inativação tenderam à linearidade.

A média dos valores dos parâmetros δ e p , obtidos através do ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais de inativação térmica de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate ajustada para 4 e 10 °Brix, com os respectivos desvios padrões, podem ser visualizadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Parâmetros obtidos pelo ajuste do modelo primário de Weibull aos dados experimentais de inativação térmica de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate a 4 e 10 °Brix

| Temperatura (°C) | 4 °Brix | | 10 °Brix | |
|------------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | $\delta \pm DP$ | $p \pm DP$ | $\delta \pm DP$ | $p \pm DP$ |
| 90 | 9,23 ± 0,52 | 1,90 ± 0,01 | 9,07 ± 0,61 | 2,24 ± 0,01 |
| 92 | 3,83 ± 0,28 | 2,06 ± 0,04 | 4,00 ± 0,17 | 2,25 ± 0,01 |
| 95 | 2,38 ± 0,10 | 2,25 ± 0,05 | 2,59 ± 0,09 | 2,26 ± 0,06 |
| 97 | 1,26 ± 0,07 | 2,33 ± 0,02 | 1,24 ± 0,07 | 2,27 ± 0,01 |
| 100 | 0,64 ± 0,02 | 2,41 ± 0,10 | 0,67 ± 0,01 | 2,27 ± 0,03 |

DP - desvio padrão das duplicatas

Para verificar o comportamento do microrganismo na polpa de tomate ajustada com diferentes teores de sólidos solúveis, o *4RD*, obtido através do ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais da inativação térmica de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate ajustada para 4 e 10 °Brix, está apresentado na Tabela 4.4. Os parâmetros estatísticos r^2 e MSE obtidos com o ajuste do modelo primário de inativação também são apresentados.

Tabela 4.4. Valores de *4RD* obtidos com o ajuste do modelo de Weibull sobre os dados experimentais da inativação térmica de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate a 4 e 10 °Brix usando o método do tubo TDT, em todas as temperaturas analisadas e os valores dos parâmetros estatísticos do ajuste do modelo

| Temperatura (°C) | 4 °Brix | | | 10 °Brix | | |
|------------------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| | <i>4RD</i> (min) | r^2 | MSE | <i>4RD</i> (min) | r^2 | MSE |
| 90 | 17,07 | 0,990 | 0,037 | 14,09 | 0,973 | 0,080 |
| | 15,81 | 0,948 | 0,185 | 15,53 | 0,987 | 0,044 |
| 92 | 6,91 | 0,956 | 0,153 | 6,31 | 0,969 | 0,135 |
| | 6,13 | 0,994 | 0,018 | 6,74 | 0,977 | 0,097 |
| 95 | 3,80 | 0,967 | 0,113 | 4,07 | 0,946 | 0,178 |
| | 3,97 | 0,951 | 0,196 | 4,36 | 0,976 | 0,099 |
| 97 | 1,89 | 0,972 | 0,131 | 1,93 | 0,975 | 0,094 |
| | 2,04 | 0,945 | 0,335 | 2,08 | 0,991 | 0,035 |
| 100 | 0,98 | 0,913 | 0,395 | 1,10 | 0,952 | 0,234 |
| | 1,05 | 0,936 | 0,262 | 1,09 | 0,949 | 0,216 |

A análise do comportamento do *4RD* permite observar que a termorresistência de esporos de *B. fulva* sofreram influência da temperatura de aquecimento, mas se comportam de maneira análoga sob a variação do teor de sólidos solúveis (Tabela 4.4). Como já esperado, é possível observar que o aumento da temperatura de tratamento resultou na diminuição do *4RD* para ambos os teores de sólidos solúveis analisados. Quando houve uma variação da temperatura de 90 para 92 °C, por exemplo, o *4RD* na inativação de esporos de *B. fulva* reduziu em aproximadamente 60 % para polpa de tomate ajustada em ambos os teores de sólidos solúveis. Para a variação do teor de sólidos solúveis da polpa de tomate não observou-se diferença nos valores obtidos para o *4RD*. Quando a polpa de tomate passou de 4 para 10 °Brix na temperatura de processo de 97 °C, por exemplo, o *4RD* apresentou uma variação aproximada de 2 %.

4.2.2. Análise estatística da influência dos fatores analisados sobre os parâmetros de resistência térmica de esporos de *B. fulva*

Para confirmar a influência da temperatura de processo e do teor de sólidos solúveis, os parâmetros de inativação térmica de esporos de *B. fulva* foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). O valor do parâmetro estatístico foi obtido com auxílio do *software* Minitab 14.1.

A análise estatística indicou que o teor de sólidos solúveis, nas concentrações analisadas, não influenciou na resistência térmica de esporos de *B. fulva*, apresentando valor de p igual a 0,93, 0,97 e 0,31 para *4RD*, δ e p , respectivamente. Contrariamente, a temperatura de processo influenciou a termorresistência dos esporos deste microrganismo dentro da faixa analisada, apresentando valor de p igual a 0,01 para *4RD* e o parâmetro δ e valor de 0,02 para o parâmetro p .

Na maior parte dos processos utilizados na indústria de alimentos, a temperatura tem sido considerada o fator de maior relevância na inativação de microrganismos. Neste estudo, a temperatura de aquecimento apresentou influência estatisticamente significativa ($p < 0,05$) sobre todos os parâmetros cinéticos de inativação térmica de *B. fulva* em polpa de tomate, dentro da faixa estudada. Sant'Ana e colaboradores (2009), estudando a inativação térmica de *B. fulva*, obtiveram os maiores valores de tempo para atingir uma redução decimal nas menores temperaturas de aquecimento analisadas. Laroche et al. (2005), estudando a termorresistência de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum*, reportaram que ao elevarem a temperatura de aquecimento, obtiveram maior destruição dos microrganismos. Miller et al. (2009b) estudando a resistência térmica de diferentes cepas de *Listeria innocua* em caldo nutriente, encontraram que a temperatura influenciou significativamente a termorresistência do microrganismo.

Em relação ao teor de sólidos solúveis, Slongo et al. (2005), estudando a resistência térmica de ascósporos de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão, com *ratio* ($^{\circ}$ Brix/acidez) de 26, 46 e 66, encontraram que o fungo apresentou menor resistência térmica no suco de mamão com baixos valores de *ratio*. Porém, os autores não investigaram a influência do teor de sólidos solúveis ou da acidez do meio isoladamente. Kotzekidou (1997) isolou diversas cepas de fungos termorresistentes de pasta de tomate enlatada e, avaliando a resistência térmica de duas cepas de *B. nivea*, três de *B. fulva*, e quatro de *N. fischeri*, encontrou que todas as cepas analisadas foram mais resistentes ao calor quando estudadas em suco de tomate do que quando analisadas

em tampão fosfato. O fato dos resultados do presente estudo mostrarem que não houve influência do teor de sólidos solúveis sobre a termorresistência de esporos de *B. fulva* pode ser devido a vários fatores, entre eles a faixa de Brix analisada, que se limitou ao padrão de identidade e qualidade estabelecido para este produto.

4.2.3. Modelagem secundária da influência da temperatura de aquecimento sobre os parâmetros de inativação de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate

Para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros do modelo primário de inativação de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate a 4 e 10 °Brix, os modelos secundários da Raiz Quadrada e Tipo Arrhenius, bem como os modelos empíricos Exponencial, Linear e da Potência, foram ajustados. O modelo que apresentou o melhor ajuste para cada parâmetro, baseado no valor de r^2 , foi selecionado.

Os modelos secundários que melhor descreveram a influência da temperatura sobre os parâmetros δ e p e o $4RD$ para as polpas de tomate a 4 e 10 °Brix foram o da Raiz Quadrada e o Exponencial. As curvas dos modelos com as respectivas equações que descrevem a influência da temperatura sobre os parâmetros primários de inativação e os valores de r^2 estão apresentados na Figura 4.4.

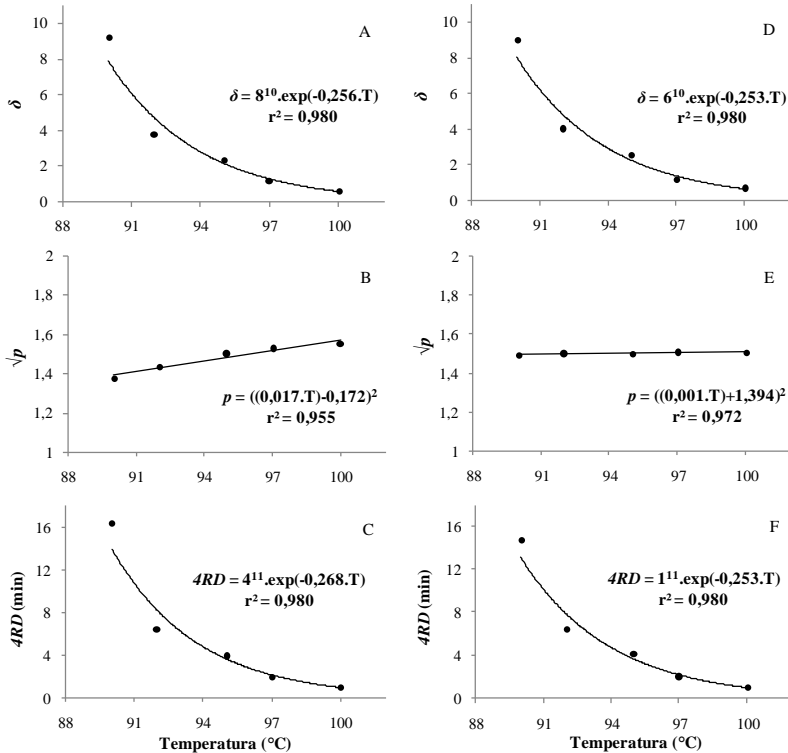


Figura 4.4. Influência da temperatura de processo sobre os parâmetros primários de inativação térmica de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate com diferentes teores de sólidos solúveis. A, B e C – modelos (–) Exponencial, da Raiz Quadrada e Exponencial para os parâmetros (●) δ e p e o $4RD$, respectivamente, em polpa de tomate ajustada para 4 °Brix; D, E e F – modelos (–) Exponencial, Raiz Quadrada e Exponencial para os parâmetros (●) δ e p e o $4RD$, respectivamente, em polpa de tomate ajustada para 10 °Brix

Baseado nos valores de r^2 e na análise visual da Figura 4.4, os modelos secundários da Raiz Quadrada e Exponencial apresentaram bom ajuste aos dados, podendo assim prever a variação da temperatura de aquecimento de esporos de *B. fulva* em polpa de tomate sobre os parâmetros cinéticos de inativação δ e p e o $4RD$ dentro da faixa de temperatura analisada.

As variações de temperatura de aquecimento em situações reais de processamento de alimentos são comumente observadas e foi mostrado neste estudo que pequenas diferenças na temperatura de processo (variação de 90 para 92 °C, por exemplo) influenciaram no

tempo necessário para alcançar $4RD$ de inativação de esporos de *B. fulva*, demonstrando a importância de um controle rigoroso da temperatura de processo para a inativação microbiana. Fica evidente a diferença no tempo de inativação de esporos de *B. fulva* quando o produto é processado com uma pequena diferença na temperatura de processo. Logo, o conhecimento aprofundado da inativação térmica de microrganismos, quando há variações de temperatura é imprescindível para prever o comportamento microbiano na ocorrência de desvios de processo.

4.3. Determinação de parâmetros de inativação térmica de esporos de *Bacillus coagulans* em polpa de tomate pelos métodos de tubos TDT e capilar

O estudo da inativação de microrganismos é necessário para determinar a resistência dos esporos, a fim de melhorar a eficiência dos processos térmicos empregados pelas indústrias processadoras de alimentos (CHUNG et al., 2008). São vários os fatores que influenciam a determinação dos parâmetros de inativação microbiana e entre eles pode-se destacar a metodologia para determinação destes parâmetros (AL-HOLY et al., 2004).

Instrumentos normalmente utilizados para determinar a termorresistência de microrganismos incluem tubos TDT, latas, frascos de três bocas e tubos capilares. O material utilizado depende do tipo de produto a ser testado, como a acidez e a textura do alimento, sendo importante a escolha de um método adequado para a eficiência do processo térmico aplicado (CHUNG et al., 2008). A grande maioria dos estudos emprega o método mais adequado ao tipo de alimento e/ou meio de cultura utilizado na determinação da termorresistência microbiana. Porém, pesquisas comparando estas diferentes metodologias aplicadas a um mesmo estudo de inativação microbiana ainda são escassas na literatura.

O objetivo deste estudo foi, primeiramente, avaliar a resistência térmica de esporos de *B. coagulans* submetidos a diferentes temperaturas de processo e teores de sólidos solúveis da polpa de tomate, em condições isotérmicas e não isotérmicas. Condições isotérmicas foram avaliadas a 95, 97, 100, 103 e 105 °C utilizando como meio de aquecimento polpa de tomate ajustada para 4 e 10 °Brix usando o método de tubo TDT. A fim de utilizar uma metodologia para o estudo não isotérmico onde o tempo de subida pudesse ser desprezado, o método do tubo capilar foi adotado. Com a realização dos primeiros experimentos de inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em tubo capilar, observou-se que as curvas de inativação apresentavam comportamento distinto às curvas obtidas quando utilizando o método de tubo TDT. Deste modo, o estudo de comparação da inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate a 4 °Brix utilizando diferentes metodologias foi realizado e está apresentado na forma de artigo (item 4.3.1). Os resultados da inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate a 10 °Brix utilizando o método do tubo TDT estão apresentados como resultados complementares no item 4.3.2.

4.3.1. Comparative effect of different test methodologies on *B. coagulans* spores inactivation kinetics in acid food under isothermal conditions.

Abstract

Heat resistant microorganisms are an ongoing challenge to the food industry. Studies of thermal inactivation kinetics are necessary to develop thermal processes, ensuring safe and shelf stable foods. Various factors may influence the heat resistance of microorganisms including type and strain of microorganisms; environmental influences during formation of cells or spores; environmental factors during heat exposure, such as water activity, pH, soluble solids; and the equipment and test tools used to perform the heat process. Tools used for those processes include thermal death time (TDT) tubes, TDT cans; capillary tubes and/or sealed plastic pouches. The choice of the appropriate test method can be critical to accurate determination of microorganism heat resistance. In an attempt to analyze the influence of different test tools used on the heat inactivation processes, this study aimed to define the isothermal inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores in tomato pulp at different temperatures, and compare the inactivation of this bacterium when TDT and capillary tube methods were used. Temperature ranges from 95 to 120 °C were studied and inactivation kinetic parameters were estimated through the application of primary Weibull and Gompertz-inspired models. TDT inactivation curves consisted of a shoulder and a linear decline, while capillary method inactivation curves consisted of a shoulder, a linear decline and a long tail. A classical secondary model was used to describe the influence of the temperature on spore inactivation parameters. The results showed test methods are at least as important in determining thermal processes as the microorganisms and media used.

Keywords

Bacillus coagulans, thermal inactivation, capillary tube, TDT tube, tomato pulp.

1. Introduction

Bacillus coagulans is an acidophilic, facultative anaerobic and spore forming bacterium known for spoiling canned fruits and vegetables, especially tomato products (García et al., 2003; Milly et al., 2007). It is able to germinate and grow at a pH as low as 4 (Doyle et al.,

2001; Lucas et al., 2006). This microorganism has been a concern to the food industry for frequently causing “flat sour spoilage”, where the lactic acids produced without gas formation (Lucas et al., 2006). *B. coagulans* spores are extremely heat resistant, which has led to the use of this microorganism to develop and evaluate thermal process of low acid products in the food industry (Palop et al., 1999).

It has traditionally been assumed that the concentration of foodborne microorganisms decreases log-linearly with the application of heat over time. However, inactivation behavior exhibiting an initial delay (commonly called a shoulder) prior to exponential decline and/or a decrease in the inactivation rate after a certain point (commonly called tailing) has been shown repeatedly (Cerf, 1977; Huang, 2009; McKellar and Lu, 2004; Mendes et al., 2011). When these phenomena exist, survival models that provide good parameter estimates of the experimental data should be used (Albert and Mafart, 2005). Particular categories of practical models and equations that describe these varieties of inactivation profiles can be found in the literature (Albert and Mafart, 2005; Geeraerd et al., 2005; Iciek et al., 2006; Miller et al., 2010).

A number of factors may be considered when determining conditions needed for commercial sterility and optimal quality. Some conditions noted as relevant in the literature are: knowledge of microorganisms present in the medium as well as their inactivation behavior; physiological state of cells; and the chemical and physical characteristics of the medium in which spores and/or vegetative cells are suspended (Atrih and Foster, 2002; Iciek et al., 2006; Ray, 2004). Physiological states of a spore population can differ significantly in heat resistance and are commonly referred to as activated, dormant and super dormant. Activated spores are more sensitive to unfavorable environmental conditions than dormant spores (Setlow, 2003). When only activated spores are present, thermal treatment will readily cause inactivation, usually presenting as a log-linear inactivation curve. On the other hand, when dormant spores are present, curves will be sigmoidal, showing a residual and very heat resistant sub-population (Iciek et al., 2006). Besides those factors noted above, different methodologies as applied under the same study conditions have also been noted as potential influencers of the kinetic behavior patterns of microorganisms (Fujikawa et al., 2000), although the literature is quite sparse in this respect.

The method used to inactivate the microorganisms depends on the type of food product being tested, as pH, state of the medium (e.g. liquid, semi-solid, etc.) and the temperature applied during the heat

process must all be considered. The choice of an appropriate method is essential to a precise determination of a microorganisms' heat resistance (Chung et al., 2008). For example: Chung et al. (2008) developed a novel aluminum test cell in a hermetically sealed 1mL cavity to evaluate the heat resistance of bacterial spores when heated at temperatures above 100 °C and compared the performance against capillary and aluminum thermal death time tube methods while Van Zuijlen et al. (2010) determined isothermal survival curves of bacteria spores using capillary tube technique and thermoresistometer, and Al-holy et al. (2004) studied the thermal inactivation of *Listeria innocua* in salmon caviar using conventional glass and novel aluminum thermal-death-time tubes.

The aims of this study were to determine the isothermal resistance of *B. coagulans* spores in commercial tomato pulp at different temperatures, and evaluate if different test methods used to measure thermal inactivation would influence the results. Primary model parameters were obtained through statistical analysis of inactivation data and secondary models were developed to describe the influence of inactivation temperature on primary model parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Bacteria strain and spores production

The strain of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 used to perform this study was obtained from André Tosello Foundation (Campinas, SP, Brazil). The original *B. coagulans* acquired in slant agar was taken from its culture and pre-cultivated at 37 °C for 48 h in nutrient broth (Difco, Becton, Dickinson and Company, USA). The pre-culture was used to inoculate nutrient agar (Biolife, Italy) supplemented with sporulation salt (MnSO₄, 5 ppm), according to Pacheco and Massaguer (2004), and incubated at 37 °C for 10 days to stimulate sporulation. Spores were harvested by rubbing the agar surface with a sterile rubber rod in the presence of sterile distilled water. Layers of sterile gauze were used to filter the spore suspension which was then centrifuged at 2000 g at 4 °C for 15 minutes. The suspension was washed with sterile distilled water and centrifuged again, three consecutive times. The Wirtz-Conklin technique (Hendrickson and Krenz, 1991) was used to assess sporulation, and spore suspensions were stored at 4 °C for future use.

The concentration of viable spores in the suspension was quantified by serial dilutions in sterile bacteriology peptone solution

0.1% and plated on Dextrose Tryptone Agar (DTA-Difco, Becton, Dickinson and Company, USA). After 3 days at 37 °C, the colonies were counted and the spore concentration was determined.

2.2. Heat resistance tests

Thermal studies of *B. coagulans* spores were carried out in two different systems: glass thermal death time (TDT) tubes and glass capillary tubes. Tomato pulp (pH 4.3) with soluble solids adjusted to 4 °Brix containing an initial concentration of 10^6 spores/mL was used for all experiments.

2.2.1. TDT tubes

B. coagulans heat resistant experiments using TDT glass tubes were carried out in Pyrex® tubes with 120 mm of length, 6 mm of internal diameter and 1 mm wall thickness. The previously sterilized tubes were filled with 2.3 mL of the inoculated heating medium and the tubes were sealed using a blowtorch (O_2 /liquefied gas of petroleum – LGP). The TDT tubes were heated in a circulating thermostatically controlled oil bath (Dist, DI-B0-1000, ± 0.2 °C) at temperatures of 95, 97, 100, 103 and 105 °C. The come-up time was 110 s for 95 °C and 120 s for temperatures from 97 to 105 °C. Tubes were completely immersed in the oil bath. At each pre-defined time interval, one TDT tube was removed, and immediately cooled in ice water for one minute. One mL of the contents each TDT tube was diluted in 9 mL of sterile bacteriology peptone solution 0.1% to determine spore survival. Serial dilutions were pour-plated on DTA and colonies were counted after 3 days at 37 °C. All experiments were performed in duplicate.

2.2.2. Capillary tubes

The thermal resistance of *B. coagulans* spores in capillary tubes was carried out in Pyrex® capillary tubes, 100 mm in length, 1.5 mm internal diameter with 0.2 mm of wall thickness. The pre-sterilized tubes were filled with inoculated tomato pulp by capillary action. The tubes were manually sealed using a blowtorch (O_2 /liquified gas of petroleum – LGP) and caution was taken to avoid heating the cell suspension. Immediately after sealing, capillary tubes were suspended in a test tube rack and placed into a circulating thermostatically controlled oil bath (Neslab, RTE-221, ± 0.01 °C) at desired temperature: 95, 97, 100, 103, 105, 110 or 120 °C. The tubes were completely immersed in the oil bath

and the come-up time for capillary tubes was not taken into account since for this methodology, the temperature is reached almost instantaneously (Van Zuijlen et al., 2010). At each pre-determined time interval, two capillary tubes were removed from the oil bath and immediately cooled in an ice water bath. The tubes were dipped in 95% ethanol to control any surface contamination and the residual ethanol was then dried on sterile filter paper. The ends of the capillary tube were cut using sterile pliers and the contents were diluted in 0.1% sterile peptone solution and then pour plated on DTA and colonies were enumerated after 3 days at 37 °C. All experiments were performed in duplicate.

2.3. Data analysis

2.3.1. Primary models

Primary models were fitted to the survival curves and the best fitting models chosen to obtain kinetic parameters that best described the heat resistance of *B. coagulans* spores. The models applied were the classical Weibull (Mafart et al., 2002), Log-linear + shoulder (Geeraerd et al., 2000), Log-linear + shoulder + tail (Geeraerd et al., 2000), Weibull + tail (Albert and Mafart, 2005) and Gompertz-inspired (Gil et al., 2006) models. These models were implemented and the parameters were estimated using Matlab software(MathWorks Inc, Natick, USA).

The goodness of fit of the primary models was analyzed by Coefficient of Determination (r^2) and Mean Square Error (MSE). R^2 represents the fraction of the variation that is explained, where the higher the value, the better the data are predicted by the model. The MSE describes the error of the model compared to the experimental data, where the closer to zero, the better the fit.

The primary Weibull and Log-linear + shoulder models were applied to TDT tube *B. coagulans* spore inactivation data and best fit was the Weibull (equation 1) model described by Mafart et al. (2002).

$$\log N(t) = \log N_0 - (t/\delta)^p \quad (1)$$

where, $N(t)$ is the number of surviving spores (CFU/mL) after the time (t (min)) of treatment, N_0 is the spores concentration (CFU/mL) at the beginning of the treatment ($t = 0$ min), δ is the location factor, and p is the shape parameter and corresponds to a concave upward survival curve if $n < 1$, concave downward if $n > 1$ and linear if $n = 1$.

Capillary tube *B. coagulans* spores inactivation data were modeled by the primary Log-linear + shoulder + tail, Weibull + tail and Gompertz-inspired models. The Gompertz-inspired (equation 2) model, described by Gil et al. (2006) yielded the best fit of the experimental data.

$$\log N(t) = \log N_0 + \log(N_{\text{res}} - N_0) \exp\left\{-\exp\left[\frac{-k_{\text{max}} \cdot e}{\log(N_{\text{res}} - N_0)}(L - t) + 1\right]\right\} \quad (2)$$

where, $N(t)$ and N_0 are the same meaning as the equation 01, L is the shoulder length (min), k_{max} is the maximum inactivation rate (1/min) and N_{res} is the residual population (tail).

2.3.2. Secondary models

The secondary Arrhenius and Square Root models, as well as empirical Exponential, Linear and Power models were compared to describe the influence of inactivation temperature on primary model parameters of *B. coagulans* spores in tomato pulp. The models that performed the best fit based on r^2 values were selected for this study. The secondary models were fitted using Microsoft Excel (Redmond, WA) software.

The secondary Square Root model (equation 3), proposed by Ratkowsky et al. (1982), was selected to describe the influence of the temperature on primary model parameters when TDT and capillary methods were used.

$$\sqrt{\varepsilon} = b(T - T_{\text{min}}) \quad (3)$$

where b is a constant; T is the temperature ($^{\circ}\text{C}$); T_{min} is the conceptual minimum temperature ($^{\circ}\text{C}$) for microbial inactivation; and ε corresponds to the parameter of interest of the primary model.

3. Results

3.1. Heat resistance of *B. coagulans* spores determined in TDT tube

Thermal inactivation of *B. coagulans* spores in tomato pulp using the TDT method was measured at temperatures from 95 to 105 $^{\circ}\text{C}$, and the fit of Weibull model to experimental data can be seen in Fig. 1. For clarity, only one inactivation curve of duplicate for each temperature analyzed is shown in the figure, although curves were always similar. The parameters δ and p estimated by the primary model and the average

of the duplicate values with respective standard deviation can be visualized in the Table 1.

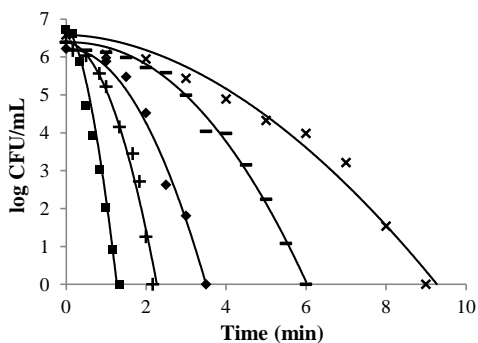


Fig. 1. Inactivation kinetics of *B. coagulans* spores in TDT tube at temperatures of 95 (x), 97 (-), 100 (♦), 103 (+) and 105 (■) °C. Lines (-) represent the fit of Weibull model

Table 1. Estimated primary model parameters of the inactivation of *B. coagulans* spores in TDT tube for all temperatures studied

| Temperature (°C) | $\delta \pm \text{SD}$ | $p \pm \text{SD}$ |
|------------------|------------------------|-------------------|
| 95 | 3.93 ± 0.04 | 2.42 ± 0.16 |
| 97 | 2.78 ± 0.31 | 2.22 ± 0.07 |
| 100 | 1.36 ± 0.11 | 2.04 ± 0.02 |
| 103 | 0.86 ± 0.05 | 1.95 ± 0.05 |
| 105 | 0.41 ± 0.01 | 1.74 ± 0.06 |

SD - standard deviation of duplicates

Inactivation curves of *B. coagulans* spores using TDT method at the studied temperature range exhibited a shoulder prior to exponential decline. The Weibull model describes the inactivation kinetics of the bacteria very well, as can be seen in Fig. 1. According to the Table 1, when the temperature of the process was increased, the values of the model parameters δ and p decreased. This means that at higher process temperatures, narrower shoulder periods and higher inactivation rates occur. Also, as the parameter p is higher than 1, the inactivation curves are convex in shape.

3.3. Heat resistance of *B. coagulans* spores determined in capillary tube

The inactivation kinetics of *B. coagulans* spores in tomato pulp using capillary method were studied at temperatures from 95 to 120 °C;

and the fit of Gompertz-inspired model to the obtained experimental data can be seen in Fig. 2. As tailing was observed during the initial inactivation experiments, at least one replicate at each temperature was followed for up to 60 minutes in order to certify the resistant population continues to survive. For clarity, the inactivation kinetics up to 10 min for a single replicate for each temperature analyzed are shown in Fig. 2. The thermal inactivation parameters L and k_{\max} were estimated by the fitting of the primary model and the average of the duplicate values with the respective standard deviations can be seen in Table 2.

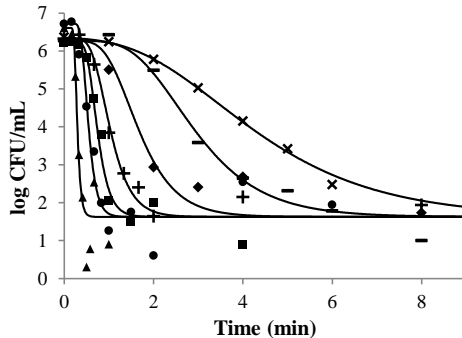


Fig. 2. Inactivation kinetics of *B. coagulans* spores in capillary tube at temperatures of 95 (x), 97 (-), 100 (♦), 103 (+), 105 (■), 110 (●) and 120 (▲) °C. Lines (-) represent the fit of Gompertz-inspired model. Experiments were performed up to 60 min; and curves are shown up to 10 min for better visualization of the microorganism kinetics

Table 2. Estimated primary model parameter of the inactivation of *B. coagulans* spores in capillary tube for all temperatures studied. The parameter N_{res} of Gompertz-inspired model was considered constant (1.6 CFU/mL)

| Temperature (°C) | $L \pm \text{SD}$ (min) | $k_{\max} \pm \text{SD}$ (min ⁻¹) |
|------------------|-------------------------|---|
| 95 | 1.54 ± 0.04 | 0.99 ± 0.12 |
| 97 | 1.44 ± 0.10 | 1.71 ± 0.03 |
| 100 | 0.87 ± 0.03 | 3.32 ± 0.39 |
| 103 | 0.59 ± 0.01 | 5.75 ± 0.37 |
| 105 | 0.49 ± 0.01 | 9.62 ± 0.53 |
| 110 | 0.33 ± 0.04 | 14.53 ± 0.67 |
| 120 | 0.21 ± 0.11 | 33.73 ± 0.75 |

SD - standard deviation of duplicates

Thermal inactivation of *B. coagulans* spores in tomato pulp using the capillary tube method showed a clear shoulder prior to the exponential inactivation, followed by tailing. As temperature increased, the shoulder length (L) decreased and the maximum inactivation rate (k_{\max}) increased (Table 2). The parameter L varied from 0.21 to 1.54 min when the temperature changed from 120 to 95 °C, respectively. The k_{\max} parameter presented a substantial variation when the temperature passed from the minimum to the maximum rate, presenting values from 0.99 to 33.73 1/min, respectively. The parameter N_{res} , that estimates the resistant population of the microorganism, presented a continuous tail to all experiments; therefore, the N_{res} was considered constant (1.6 CFU/mL) assuming the average of the parameter values obtained over all temperatures analyzed. These data shows the significant influence of the temperature on the inactivation of *B. coagulans* spores.

3.4. Comparison of TDT and capillary methods

TDT and capillary methods are commonly used to determine microbial inactivation of liquid or low viscosity samples. TDT method has the advantage that the tubes are easier to handle when compared to the capillary method. However, the come-up time can be disregarded when the capillary method is used due to the efficient transfer of thermal energy. When TDT tubes are used, a come-up time of 110 s for temperature of 95 °C and 120 s for other temperatures is typical.

Table 3 shows the estimated time to reach 4 decimal reductions ($4DR$) for all studied temperatures for TDT and capillary methods obtained through primary models fitting, as well as the statistical parameters of the models: r^2 and MSE.

Table 3. Comparison of the estimated $4DR$ of *B. coagulans* spores in TDT and capillary tubes for all temperatures studied; and the statistical indices r^2 and MSE of the Weibull and Gompertz-inspired models fitting to the experimental data.

| Temperature (°C) | TDT tube | | | Capillary tube | | |
|------------------|---------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|
| | Weibull model | | | Gompertz-inspired model | | |
| | $4DR$ (min) | r^2 | MSE | $4DR$ (min) | r^2 | MSE |
| 95 | 6.7 | 0.965 | 0.126 | 6.1 | 0.971 | 0.094 |
| | 7.2 | 0.958 | 0.185 | 6.9 | 0.970 | 0.113 |
| 97 | 4.9 | 0.994 | 0.030 | 4.2 | 0.968 | 0.146 |
| | 5.6 | 0.990 | 0.080 | 4.5 | 0.920 | 0.328 |
| 100 | 2.6 | 0.985 | 0.057 | 2.2 | 0.826 | 0.533 |
| | 2.8 | 0.986 | 0.076 | 2.5 | 0.891 | 0.271 |
| 103 | 1.8 | 0.980 | 0.099 | 1.4 | 0.955 | 0.241 |
| | 1.7 | 0.939 | 0.364 | 1.5 | 0.890 | 0.507 |
| 105 | 0.9 | 0.978 | 0.105 | 1.0 | 0.958 | 0.203 |
| | 0.9 | 0.974 | 0.156 | 1.0 | 0.971 | 0.137 |
| 110 | – | – | – | 0.6 | 0.880 | 0.613 |
| | – | – | – | 0.7 | 0.928 | 0.318 |
| 120 | – | – | – | 0.3 | 0.926 | 0.351 |
| | – | – | – | 0.4 | 0.881 | 0.585 |

The $4DR$ presented similar values to both methods applied in the thermal inactivation of *B. coagulans* spores in tomato pulp. However, the $4DR$ values were slightly lower in almost all temperatures studied by the capillary method. As an example, the average of $4DR$ in TDT and capillary tubes at 100 °C were 2.7 and 2.4 min, respectively. Through visual inspection of the curves (Fig. 1 and 2), the goodness of fit of the primary modeling approach to both TDT and capillary method data can be seen. The statistical parameters obtained through primary Weibull model fitting confirmed good fits to experimental data since MSE values were close to 0 and r^2 values were higher than 0.93 for all curves. The statistical parameters obtained through primary Gompertz-inspired model were not as high. This does not mean the model did not perform well; but the fact that the experiments have shown very long tails means that the estimation of the parameter N_{res} underestimates the values of statistical parameters.

3.5. Secondary models

The temperature dependence of Weibull model parameters (δ and p) and $4DR$, and Gompertz-inspired model parameters (L and k_{\max}) and $4DR$ are shown in Fig. 3 and Fig. 4, respectively. Equations obtained from secondary model fit are shown in Table 4 for both Weibull and Gompertz-inspired parameters.

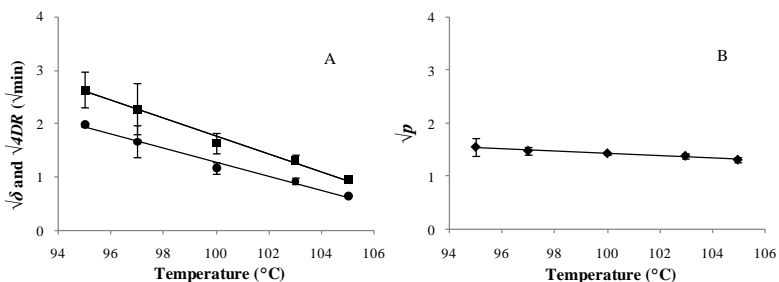


Fig. 3. Relation of the temperature and parameters of primary Weibull model of *B. coagulans* spores inactivation. Fig. 1-A corresponds to δ (●) and $4DR$ (■), and Fig. 1-B corresponds to p (◆). Lines (–) represent the fitting of the secondary Square Root model

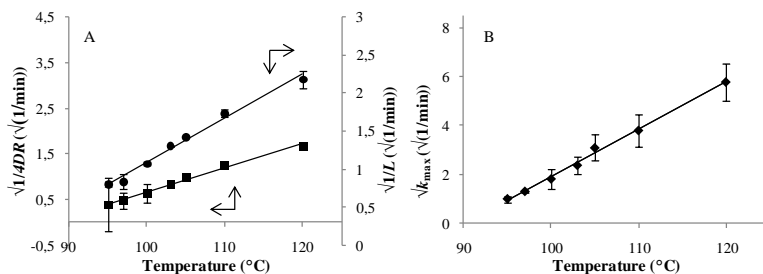


Fig. 4. Relation of the temperature and parameters of primary Gompertz-inspired model of *B. coagulans* spores inactivation. Fig. 1-A corresponds to L (●) and $4DR$ (■), and Fig. 1-B corresponds to k_{\max} (◆). Lines (–) represent the fit of the secondary Square Root model

Table 4. Secondary model equations representing the relation of the parameters of Weibull and Gompertz-inspired models and temperature on the thermal inactivation of *B. coagulans* spores in TDT and capillary tubes

| Method | Parameter | Equation | r ² |
|-----------|---------------------------------|------------------------------------|----------------|
| TDT | δ | $\sqrt{\delta} = -0.131(T+14.40)$ | 0.986 |
| | p | $\sqrt{p} = -0.022(T+3.59)$ | 0.967 |
| | $4DR$ (min) | $\sqrt{4DR} = -0.166(T+18.38)$ | 0.989 |
| Capillary | L (min) | $\sqrt{1/L} = 0.058(T-81.16)$ | 0.967 |
| | k_{\max} (min ⁻¹) | $\sqrt{k_{\max}} = 0.195(T-90.18)$ | 0.997 |
| | $4DR$ (min) | $\sqrt{1/4DR} = 0.053(T-87.43)$ | 0.997 |

The influence of temperature on Weibull parameters δ and p and $4DR$ (Fig. 3) and Gompertz-inspired parameters L and k_{\max} and $4DR$ (Fig. 4), in general, show good fits with the secondary Square Root model. The statistical parameters r^2 were higher than 0.96, as can be seen in Table 4. It is generally understood that such experiments should have a large number of data points to find meaningful secondary models to describe the effect of temperature on the inactivation kinetics parameters. The slight discrepancies between the parameters' temperature dependence and secondary model fitting (as can be seen in Figs. 3 and 4), may be due to the difficulty of obtaining more experimental data during the fast transition of shoulder to exponential phases of the inactivation experiments.

4. Discussion

As shown in Fig. 1, inactivation curves of *B. coagulans* spore in tomato pulp using TDT method were described well by the Weibull model (Table 3). All inactivation curves showed a downward concavity ($p > 1$), and in the case of the Weibull model, the parameter $p > 1$ indicates that the remaining microbial cells became gradually more susceptible to the heat over time (Van Boekel, 2002). This result is confirmed when using the TDT method, where *B. coagulans* spores were reduced to below detection limits from the initial population of 10^6 CFU/mL. The δ (Table 1) and $4DR$ (Table 3) values decreased with the increasing of the temperature of the process, where δ expresses resistance of the microorganism to the treatment (Unluturk et al., 2010).

Inactivation curves of *B. coagulans* spores in tomato pulp using capillary method were described by Gompertz-inspired model, as shown in Fig. 2. Temperature had a negative effect on the parameters L and

$4DR$, and a positive effect on k_{\max} ; higher temperatures yielding narrower shoulders and higher inactivation rates. N_{res} expresses the resistant population of microbial spores and it was considered constant in the present study for all temperatures analyzed. The Gompertz-inspired model is versatile and describes kinetics with complete sigmoidal shape very well (Gil et al., 2011).

Shoulder and exponential phases followed similar inactivation patterns for both TDT and capillary methods in Figs. 1 and 2, which is further confirmed by evaluation of $4DR$ parameter (Table 3). Fujikawa et al. (2000) found similar results when comparing heat inactivation of *Aspergillus niger* spores in capillary (91 μL of sample) and test tube (2.5 mL of sample) methods. Chung et al. (2008) compared the thermal resistance of *Clostridium sporogenes* in phosphate buffer using aluminum test cells (1 mL of sample), capillary (25 μL of sample) and aluminum tubes (1 mL of sample) and found that the average of D_{121} values obtained from log-linear portions of the survivor curves were not significantly different ($p > 0.05$). However, Schuman et al. (1997), when studying decimal reduction times (D values) of *Aeromonas hydrophila* in liquid whole egg using capillary and test tube methods found larger apparent D values ($p \leq 0.05$) using test tubes than those obtained using capillary tube. Van Zuijlen et al. (2010), when studying isothermal survival curves of *Bacillus sporothermodurans* spores in distilled water at temperatures up to 125 °C showed that the microorganism was more resistant in capillary tube (45 μL of sample) than in a thermoresistometer (350 mL of sample). These authors also stated that survival curves showed shoulders in all inactivation curves. As noted above, inactivation curves showing shoulders are quite commonly reported, especially in the last 15 years (Haberbeck et al., 2012; Islam et al., 2006; Miller et al., 2009; Palop et al., 1997).

Distinct differences were observed in *B. coagulans* spore inactivation curves during the final portion of the thermal process when both TDT and capillary methods were compared (Figs. 1 and 2). When the capillary method was used, a tail was seen to last for at least 60 min of thermal process for all temperatures studied; this behavior was not observed for the TDT method. Inactivation of *B. coagulans* spores to below detection limit occurred when TDT method was used.

Some authors have previously reported tails on heat inactivation curves when comparing test methods, but the interesting fact is that in these cases, tails showed up when test tube were used, not when capillary tubes were used, in direct contrast to in this study. Nonlinear survivor curves with tail formation were found by Schuman et al.

(1997), studying heat inactivation of *Aeromonas hydrophila* at 48, 51, and 54 °C in liquid whole egg, using conventional capped test tube. No tails were found when capillary tubes were used for the same study conditions. Furukawa et al. (2005), when studying the clumping effect of *B. coagulans*, *B. cereus* and *B. licheniformis* spores as a result of heat treatment, observed the formation of tails after 30 min of treatment at 85 °C when they used the test tube method (2.5 mL sample). In a study by Fujikawa and Itoh (1996), tails occurred when 60 °C temperatures were used to study the heat inactivation of *Aspergillus niger* spores in phosphate-citrate buffer, using test tubes (3.5 mL of sample) and periods longer than 60 min. To confirm the results found by Fujikawa and Itoh (1996), Fujikawa et al. (2000) compared characteristics of capillary (91 µL of sample) and test tubes (2.5 mL of sample) on the thermal inactivation kinetic of *Aspergillus niger* spores at temperatures of 60 °C. The authors observed tails when test tubes were used, however, since the test tubes were not completely immersed in the water bath, the authors also studied if there would be tails when the inner test tube walls were not contaminated with the microorganism. Their results led these authors to conclude that tails only occur when the inner test tube walls are contaminated with the microorganism tested. Hence, Fujikawa et al. (2000) concluded that the tails found by Fujikawa and Itoh (1996) were artificially induced.

It is not clear if the results found in this study using the capillary method represent a true result or one artificially induced by the method. It is interesting that we observed tailing under contrasting conditions to those seen on other reported studies and this points the way toward future studies that may shed light on the underlying mechanism at work here. It may be that the *B. coagulans* spores are showing what is known as the adaptive responses of bacteria, where a more resistant portion of the spore population shows different inactivation kinetics. This adaptation of bacteria can result in situations where food is unsafe or spoiled (Brul and Coote, 1999). The implications of microbial adaptation are known and can be demonstrated by phenomena such as acid tolerance response, changing of membrane fluidity, transformation into a dormant state and adaptive mutations (O'Driscoll et al., 1996; Van Derlinden et al., 2011). Despite the well-known nature of microbial adaptation in food microbiology, experiments that explore the influence of experimental methodologies on such phenomena are still scarce and attempts to compare the effect of different test methods on observed microbial behavior have not been fully investigated. Additional research that explores the effect of experimental method using a more mechanistic

approach is needed. Such research will result in more precise predictions of thermal inactivation of heat resistant microorganisms needed to insure control of food pathogens and spoilage microorganisms throughout the food chain.

Acknowledgments

Morgana Zimmermann gratefully acknowledges the financial support provided by Capes Foundation (Brazil).

References

- Albert, I., Mafart, P., 2005. A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 100, 197-211.
- Al-holy, M., Quinde, Z., Guan, D., Tang, J., Rasco, B., 2004. Thermal inactivation of *Listeria innocua* in salmon (*Oncorhynchus keta*) caviar using conventional glass and novel aluminum thermal-death-time tubes. *Journal of Food Protection* 67, 383-386.
- Atrih, A., Foster, S. J., 2002. Bacterial endospores the ultimate survivors. *International Dairy Journal* 12, 217-223.
- Brul, S., Coote, P., 1999. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms – a review. *International Journal of Food Microbiology* 50, 1-17.
- Cerf, O., 1977. A review: tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology* 42, 1-19.
- Chung, H. J., Birla, S. L., Tang, J., 2008. Performance evaluation of aluminum test cell designed for determining the heat resistance of bacterial spores in foods. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1351-1359.
- Doyle, M., Beuchat, L. R., Montville, T. J., 2001. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, second ed. Washington, DC.
- Fujikawa, H., Itoh, T., 1996. Tailing of thermal inactivation curve of *Aspergillus niger* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3745-3749.
- Fujikawa, H., Morozumi, S., Smerage, G. H., Teixeira, A. A., 2000. Comparison of capillary and test tube procedures for analysis of thermal inactivation kinetics of mold spores. *Journal of Food Protection* 63, 1404-1409.

- Furukawa, S. T., Narisawa, N., Watanabe, T., Kawarai, T., Myozen, K., Okazaki, S., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2005. Formation of the spore clumps during heat treatment increases the heat resistance of bacterial spores. *International Journal of Food Microbiology* 102, 107-111.
- García, M. T., Ben Omar, N., Lucas, R., Pérez-Pulido, R., Castro, A., Grande, M. J., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2003. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiology* 20, 533-536.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., Van Impe, J. F., 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 59, 185-209.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, J. F., Van Impe, J. F., 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102, 95-105.
- Gil, M. M., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M., 2006. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 76, 89-94.
- Gil, M. M., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M., 2011. On the use of the Gompertz model to predict microbial thermal inactivation under isothermal and non-isothermal conditions. *Food Engineering Reviews* 3, 17-25.
- Haberbeck, L. U., Riehl, C. A. S., Salomão, B. C. M., Aragão, G. M. F., 2012. *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *LWT - Food Science and Technology* 46, 267-273.
- Hendrickson, D. A., Krenz, M. M., 1991. Reagents and Stains. In: Balows, A., Hausler, W. J., Herrmann Jr., K. L., Isenberg, H. D., Shadomy, H. J. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, fifth ed. Washington D.C., 1289-1314.
- Huang, L., 2009. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 90, 380-387.
- Iciek, J., Papiewska, A., Molska, M., 2006. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. *Journal of Food Engineering* 77, 406-410.
- Islam, M. S., Inoue, A., Igura, N., Shimoda, M., Hayakawa, I., 2006. Inactivation of *Bacillus* spores by the combination of moderate heat and low hydrostatic pressure in ketchup and potage. *International Journal of Food Microbiology* 107, 124-130.

- Lucas, R., Grande, M. J., Abriouel, H., Maqueda, M., Ben Omar, N., Valdivia, E., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1774-1781.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107-113.
- McKellar, R. C., Lu, X., 2004. Modeling Microbial Response in Food. CRC series in contemporary food science, first ed. Washington, D.C.
- Mendes, G. C., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M., 2011. Modeling the inactivation of *Bacillus subtilis* spores by ethylene oxide processing. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38, 1535-1543.
- Miller, F. A., Ramos, B., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., Silva, C. L. M., 2010. Comparison of recovery methods for the enumeration of injured *Listeria innocua* cells under isothermal and non-isothermal treatments. *Food Microbiology* 27, 1112-1120.
- Miller, F. A., Ramos, B., Gil, M. M., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., Silva, C. L. M., 2009. Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology* 133, 121-128.
- Milly, P. J., Toledo, R. T., Harrison, M. A., Armstead, D., 2007. Inactivation of food spoilage microorganisms by hydrodynamic cavitation to achieve pasteurization and sterilization of fluid foods. *Journal of Food Science* 72, 414-422.
- O'Driscoll, B., Gahan, C. G. M., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1693-1698.
- Pacheco, C. P., Massaguer, P. R., 2004. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. *Journal of Food Process Engineering* 27, 449-463.
- Palop, A., Marco, A., Raso, J., Sala, F. J., Condón, S., 1997. Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. *International Journal of Food Microbiology* 38, 25-30.
- Palop, A., Raso J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F. J., 1999. Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology* 46, 243-249.

- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A., Ball, A., 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* 149, 1-5.
- Ray, B., 2004. *Fundamental food microbiology*, third ed. Florida.
- Schuman, J. D., Sheldon, B. W., Foegeding, P. M., 1997. Thermal resistance of *Aeromonas hydrophila* in liquid whole egg. *Journal of Food Protection* 60, 231-236.
- Setlow P., 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* 6, 550-556.
- Unluturk, S., Atilgan, M. R., Baysal, A. H., Unluturk, M. S., 2010. Modeling inactivation kinetics of liquid egg white exposed to UV-C irradiation. *International Journal of Food Microbiology* 142, 341-347.
- Van Boekel, M., 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 74, 139-159.
- Van Derlinden, E., Boons, K., Van Impe, J. F., 2011. *Escherichia coli* population heterogeneity: subpopulation dynamics at super-optimal temperatures. *Food Microbiology* 28, 667-677.
- Van Zuijlen, A., Periago, P. M., Amézquita, A., Palop, A., Brul, S., Fernández, P. S., 2010. Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores: putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilization. *Food Research International* 43, 1895-1901.

4.3.2. Resultados complementares

A cinética das curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate a 10 °Brix, utilizando o método de tubo TDT, bem como o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais podem ser visualizados na Figura 4.5. Para melhor visualização, a curva de maior termorresistência das duplicatas é apresentada para cada situação de temperatura estudada.

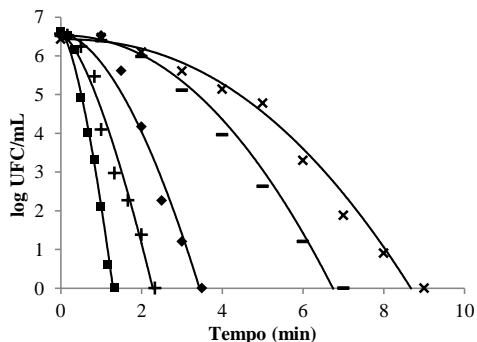


Figura 4.5. Curvas de sobreviventes (log UFC/mL) de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate a 10 °Brix, usando metodologia do tubo TDT, nas temperaturas de 95 (x), 97 (-), 100 (♦), 103 (+) e 105 (■) °C. As curvas contínuas (-) representam o ajuste do modelo de Weibull

A média dos valores dos parâmetros δ e p , obtidos através do ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais de inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate ajustada para 10 °Brix, com os respectivos desvios padrões, podem ser visualizadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Parâmetros do modelo primário de inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate ajustada para 10 °Brix, usando a metodologia do tubo TDT para todas as temperaturas analisadas

| Temperatura (°C) | $\delta \pm SD$ | $p \pm SD$ |
|------------------|-----------------|-------------|
| 95 | 3,64 ± 0,17 | 2,21 ± 0,03 |
| 97 | 2,64 ± 0,17 | 2,13 ± 0,03 |
| 100 | 1,12 ± 0,09 | 1,81 ± 0,06 |
| 103 | 0,70 ± 0,08 | 1,61 ± 0,18 |
| 105 | 0,39 ± 0,03 | 1,59 ± 0,12 |

SD - desvio padrão das duplicatas

O *4RD* (tempo para obter 4 reduções decimais) obtido através do ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais da inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate ajustada para 10 °Brix está apresentado na Tabela 4.6. Os parâmetros estatísticos r^2 e MSE obtidos com o ajuste do modelo primário de inativação também são apresentados. Para melhor compreensão da influência do teor de sólidos solúveis sobre a resistência de esporos de *B. coagulans*, os valores do *4RD* obtidos para a polpa de tomate ajustada para 4 °Brix, já

apresentados na seção 4.3.1, serão novamente apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Comparação da influência do teor de sólidos solúveis da polpa de tomate (4 e 10 °Brix) sobre o *4RD* de inativação térmica de esporos de *B. coagulans* usando o método do tubo TDT, para todas as temperaturas analisadas. Apresentação dos parâmetros estatísticos com o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais

| Temperatura (°C) | 4 °Brix | | | 10 °Brix | | |
|---------------------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| | <i>4DR</i> (min) | r^2 | MSE | <i>4DR</i> (min) | r^2 | MSE |
| 95 | 6,73 | 0,965 | 0,126 | 6,63 | 0,956 | 0,153 |
| | 7,21 | 0,958 | 0,185 | 7,01 | 0,989 | 0,072 |
| 97 | 4,86 | 0,994 | 0,030 | 4,81 | 0,997 | 0,017 |
| | 5,55 | 0,990 | 0,080 | 5,34 | 0,995 | 0,033 |
| 100 | 2,55 | 0,985 | 0,057 | 2,23 | 0,981 | 0,121 |
| | 2,82 | 0,986 | 0,076 | 2,59 | 0,971 | 0,205 |
| 103 | 1,81 | 0,980 | 0,099 | 1,68 | 0,978 | 0,114 |
| | 1,69 | 0,939 | 0,364 | 1,63 | 0,977 | 0,137 |
| 105 | 0,90 | 0,978 | 0,105 | 0,94 | 0,990 | 0,051 |
| | 0,93 | 0,974 | 0,156 | 0,93 | 0,991 | 0,063 |

A análise do comportamento do *4RD* (Tabela 4.6) permite observar que a termorresistência de esporos de *B. coagulans* sofreu influência da temperatura de aquecimento, mas se comportam de maneira análoga sob a variação do teor de sólidos solúveis, dentro da faixa estudada. Como esperado, é possível observar que o aumento da temperatura de tratamento resultou na diminuição do *4RD* para ambos os teores de sólidos solúveis analisados.

Miller et al. (2009a), estudando a inativação de *Listeria innocua* em uma faixa de temperatura de 52,5 a 65 °C, encontraram que a temperatura influenciou a termorresistência deste microrganismo. Silva et al. (1999), estudando a influência da temperatura de aquecimento, do teor de sólidos solúveis e do pH na inativação térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, encontraram que a temperatura foi o fator com maior impacto sobre o valor de D, concluindo que uma pequena elevação da temperatura de processo, provocou uma redução considerável no valor de D.

Silva et al. (1999), estudando a influência do teor de sólidos solúveis na inativação térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, reportaram que o valor de D apresentou um leve aumento com o

aumento do teor de sólidos solúveis, principalmente a baixas temperaturas, mas que em temperaturas próximas a 97 °C, o efeito da variação do teor de sólidos solúveis não foi observado. Maldonado et al. (2008), estudando a termorresistência de esporos de *A. acidoterrestris* em suco clarificado (50 °Brix) e suco não-clarificado (68 °Brix) de limão, não encontraram diferença significativa na inativação do microrganismo conforme a variação do teor de sólidos solúveis, quando aquecidos a 82 °C com pH ajustado em 2,28. Porém, Salleh-Mack e Roberts (2007), estudando o efeito da inativação de *Escherichia coli* ATCC 25922 através do uso de ultrassom sugeriram que maiores teores de sólidos solúveis influenciaram na eficiência da inativação microbiana, onde a amostra controle com 0 g de glicose/100 mL água levou 9 minutos para alcançar 5 reduções decimais, enquanto que a amostra com 12 g/100 mL levou 11 minutos para alcançar o mesmo número de reduções decimais.

Para confirmar a influência da temperatura de processo e do teor de sólidos solúveis, os parâmetros de inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em tubo TDT foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). O valor do parâmetro estatístico foi obtido através do uso do *software* Minitab 14.1.

A análise estatística confirmou que o teor de sólidos solúveis, dentro da faixa analisada, não influenciou a resistência térmica de esporos de *B. coagulans* em tubo TDT, apresentando valor de p igual a 0,91, 0,78 e 0,11 para $4RD$, δ e p , respectivamente. Contrariamente, a variação da temperatura de processo influenciou a termorresistência de esporos de *B. coagulans*, dentro da faixa analisada, apresentando valor de p igual a 0,01 para δ , p e $4RD$.

Para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros do modelo primário de inativação de esporos de *B. coagulans*, os modelos secundários da Raiz Quadrada e Arrhenius, bem como os modelos empíricos Exponencial, Linear e da Potência, foram ajustados. O modelo que apresentou o melhor ajuste para cada parâmetro, baseado no valor de r^2 foi selecionado.

Os modelos secundários que melhor descreveram a influência da temperatura sobre o $4RD$ e os parâmetros δ e p foram da Raiz Quadrada e Exponencial. As curvas dos modelos com as respectivas equações que descrevem a influência da temperatura sobre os parâmetros primários de inativação e valores de r^2 estão apresentados na Figura 4.6.

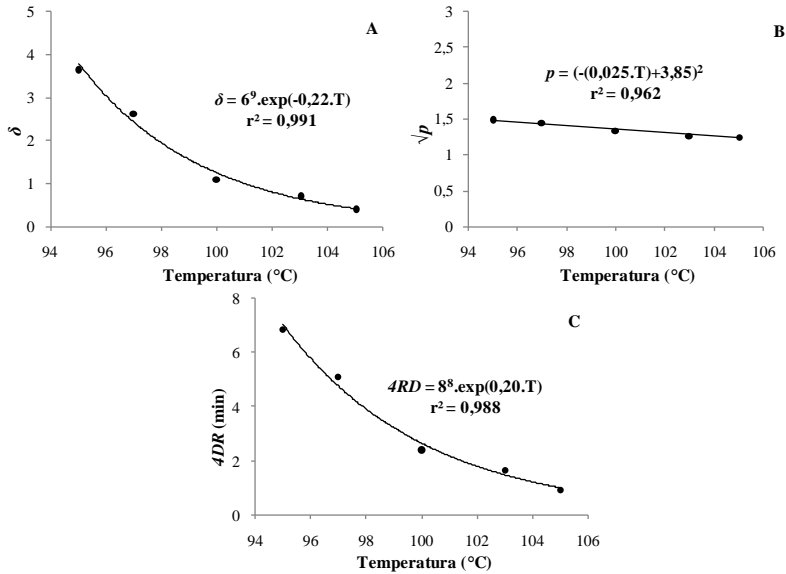


Figura 4.6. Influência da temperatura sobre os parâmetros primários de inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate ajustada para 10 °Brix, usando o método do tubo TDT. A - modelo Exponencial para o parâmetro δ ; B - modelo da Raiz Quadrada para o parâmetro p ; C - modelo Exponencial para o $4RD$. A curva contínua (—) representa o ajuste do modelo e pontos (●) são os dados experimentais

Baseado nos valores de r^2 e na análise visual da Figura 4.6, os modelos secundários da Raiz Quadrada e Exponencial apresentaram bom ajuste aos dados experimentais, podendo assim prever a variação da temperatura de aquecimento de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate sobre o $4RD$ e os parâmetros cinéticos de inativação δ e p , dentro da faixa de temperatura analisada.

4.4. Predição e validação do modelo de inativação de esporos de *Bacillus coagulans* sob condições não isotérmicas

O tratamento térmico continua sendo o método mais utilizado na conservação de alimentos, reduzindo significativamente o número de células microbianas do produto. Porém, muitos dos processos térmicos aplicados pela indústria sofrem flutuações de temperatura que normalmente não são consideradas durante os cálculos de resistência dos microrganismos (PELEG, 2006).

Os tratamentos de esterilização geralmente são determinados levando em conta informações baseadas em estudos de inativação microbiana em condições isotérmicas. Entretanto, para garantir a segurança microbiológica do alimento, é necessário considerar as variações de temperatura que podem ocorrer durante todo o processamento do produto. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: prever a inativação de esporos de *B. coagulans* através de um modelo não isotérmico de inativação, utilizando os dados isotérmicos obtidos em estudo prévio; e validar este modelo com dados da inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate ajustada em 4 °Brix, obtidos experimentalmente simulando variações de temperatura que podem ocorrer na indústria durante o processamento térmico de alimentos. Os resultados são apresentados na forma de artigo (item 4.4.1) e resultados complementares (item 4.4.2).

4.4.1. Prediction of *Bacillus coagulans* spores inactivation in tomato pulp under non-isothermal heat treatments

Abstract

Published inactivation curves of *Bacillus coagulans* spores in tomato pulp treated in capillary tube at isothermal temperatures in the range of 95 and 120 °C had sigmoidal characteristics. The experimental data could be well described mathematically by Gompertz-inspired model and the parameters' dependence temperature were described by the Square Root model. Based on these outcomes, non-isothermal inactivation under oscillating temperature profiles could be predicted. Assuming that the momentary inactivation rate is the isothermal rate at the momentary temperature at a time that corresponds to the momentary survival ratio, the survival curves under non-isothermal conditions could be constructed by solving a differential equation, as proposed by Peleg and Penchina (2000). The non-isothermal model was validated with experimental inactivation data of *B. coagulans* spores in tomato pulp

using capillary tube at seven different dynamic temperature profiles, in the range from 95 to 105 °C. There was an agreement, although not perfect, between the predicted and observed survival ratios. The results indicated that the proposed non-isothermal model largely depend of the isothermal parameters' dependence temperature ratio to predict accurately non-isothermal microbial inactivation.

Keywords: *Bacillus coagulans*, predictive microbiology, non-isothermal inactivation, dynamic model.

1. Introduction

Canned fruit and vegetable have been widely consumed for many decades as an alternative of food availability during all seasons of the year. To warranty the shelf life of these products, sterility processes as acidification and thermal treatment are applied. However, spore forming microorganisms as *Bacillus coagulans* can tolerate those treatments and proliferate in the products causing spoilage and consequently, great economic losses to the industry (Palop et al., 1999).

B. coagulans is a spore-forming, thermotolerant and slightly acidophilic bacterium known as 'flat-sour' spoilage microorganism due to the production of lactic acid without gas formation (De Clerck et al., 2004). This bacterium is able to germinate and grow in acid products as canned fruit and vegetable (Brackett, 2001), especially in tomato products (Rodrigo et al., 1990; García et al., 2003) in pH values between 4 and 4.5 (Mallidis et al., 1990).

Food processes are applied with the purpose to control spoilage and/or pathogenic microorganisms, being the temperature the major stressing factor used. Thermal processes are efficient for reducing and/or eliminating microorganisms when conveniently applied; and the efficiency of this process is generally assumed when the temperature profile is static. However, fluctuation of temperature in the industry can happen during the thermal processes and it may vary extensively throughout the complete production and distribution of the products (Van Impe et al., 1995). This heating up during the processes usually is not considered in microorganism heat resistance calculations (Miller et al., 2010). Therefore, the knowledge and understanding of the microorganisms inactivation behavior submitted a thermal treatment, being influenced by temperature variation during the thermal processes are essential for design, calculation and optimization of the process (Peleg, 2006).

Predictive microbiology has been greatly applied to design models used to describe and predict a number of microbiological behaviors in food products, combining experimental data, microbiological knowledge, and mathematical techniques (Mafart, 2005). Primary models are used to describe isothermal inactivation according to time. The temperature dependence on primary model parameters is described by secondary models (Van Impe et al., 1995; Koutsoumanis, 2001; Valdramidis et al. 2006). Non-isothermal models are the result of a temperature profile expression incorporated into the inactivation kinetic equation. These models are used to predict the microbial inactivation profile under dynamic condition (Corradini and Peleg, 2009) and validated through experimental data obtained under realistic time-temperature conditions (Valdramidis et al., 2006). The efficiency of the predictions will primarily depend on the quality of the isothermal inactivation data, which will also depend on the number of temperatures studied and the gap between them. Consequently, the use of meaningful secondary models will require not only highly reproducible of isothermal data but also that they be obtained at as many temperatures as possible within the range of interest (Corradini and Peleg, 2005).

The objectives of this study were: (i) to predict inactivation kinetics of *B. coagulans* as influenced by different dynamic temperature profiles using dynamic models proposed by Peleg and Penchina (2000), and (ii) to validate the model comparing the predict values with experimental data obtained through *B. coagulans* inactivation in tomato pulp under identical realistic temperature profiles.

2. Theoretical Background

Thermal processes applied for food preservation have been established based upon the kinetics of microbial inactivation with reference to the target microorganism for a known time–temperature history. The microbial inactivation kinetics can vary from a linear to a sigmoidal tendency, depending on the experimental conditions and microorganism (Miller et al., 2010). The inactivation Gompertz-inspired model (Eq. 1), reparametrized by Gil et al. (2006), is able to describe the sigmoidal pattern under static temperature:

$$y(t) = y_0 + (y_{res} - y_0) \exp \left[\left\{ -\exp \left(\frac{-k_{max} \cdot e}{y_{res} - y_0} (L - t) + 1 \right) \right\} \right] \quad (1)$$

where $y(t)$ is the logarithmic microbial cell concentration at a certain process time; y_0 and y_{res} indicate initial and residual logarithmic microbial cell density, respectively; L is the shoulder length; e is the Euler's number; and k_{max} is the maximum inactivation rate.

Secondary models are used to describe the parameter dependence of primary models with the temperature (Whiting and Buchanan, 1993). Ratkowsky et al. (1982) proposed the Square Root model (Eq. 2) which describes this dependence with a linear relation, and this model has been used as secondary model by many authors (Van Impe et al., 1995; Miller et al., 2011; Psomas et al., 2011).

$$\sqrt{\varepsilon} = b(\omega - \omega_{min}) \quad (2)$$

where ε is the parameters of the isothermal primary model, ω is the temperature ($^{\circ}\text{C}$), ω_{min} is the theoretical minimal temperature of inactivation ($^{\circ}\text{C}$), and b is an empirical parameter.

To predict microbial inactivation under time-varying temperature, non-isothermal models should be used. Peleg and Pechina (2000) have proposed a non-isothermal model which takes a primary model for the prediction of the inactivation kinetic. According to the approach of this model, the time that corresponds to any given survival ratio, defined as t^* , is the inverse of the isothermal model. In this study, t^* is represented in the Eq. 3, which was isolated from Gompertz-inspired model (Eq. 1).

$$t^* = L - \left(\frac{y_{res} - y_0}{-k_{max} \cdot e} \right) \left[\left\{ \ln \left(\ln \left(\frac{y_{res} - y_0}{y - y_0} \right) \right) \right\} - 1 \right] \quad (3)$$

Under non-isothermal conditions, where the temperature varies, the model's parameters k_{max} , L and y_{res} also become functions of time. Incorporating t^* into the derivate of primary model equation (Eq. 1), which depends on the temperature profile, yields the non-isothermal rate equation (Eq. 4).

$$\frac{dy(t)}{dt} = -k_{max} [T(t)] \cdot e \cdot \exp \left[\left\{ -\exp \left(\frac{-k_{max} [T(t)] \cdot e}{(y_{res} [T(t)] - y_0)} (L[T(t)] - t^*) + 1 \right) \right\} - \left(\frac{-k_{max} [T(t)] \cdot e}{(y_{res} [T(t)] - y_0)} (L[T(t)] - t^*) + 1 \right) \right] \quad (4)$$

This differential equation (Eq. 4) can be solved numerically by different methods, e.g. Runge-Kutta method.

3. Experimental

3.1. Published isothermal data

Isothermal inactivation data sets of *B. coagulans* spores acquired from a preview research (item 4.3.1) served as a database to predict *B. coagulans* spores inactivation under time-varying temperature. As the issue here is a non-isothermal study, we do not detail the isothermal experimental procedure, which can be seen in the original publication. Briefly, isothermal experiments were performed similarly to the non-isothermal experiments, which are described in the item 3.3.1 of this manuscript. Temperatures of 95, 97, 100, 103, 105, 110 and 120 °C were analyzed to isothermal experiments. The isothermal parameters, described by Gompertz-inspired model (Eq. 1) followed sigmoidal inactivation kinetics. The temperature dependent parameters L and k_{\max} were described by the Square Root model and the model fittings and mathematical expressions are shown in the Fig. 1-A and B, respectively. y_0 and y_{res} were fixed.

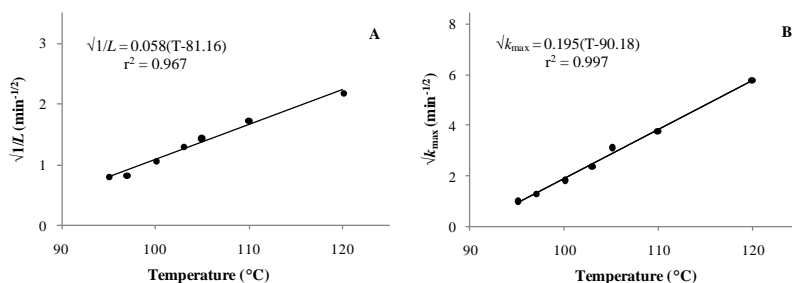


Fig. 1. Relation of temperature and parameters of primary Gompertz-inspired model of *B. coagulans* spores isothermal inactivation for L (A) and k_{\max} (B) parameters. Points (●) represent the parameters data and lines (–) represent the fit of the secondary Square Root model.

The parameter y_0 was fixed as the average of the initial concentration of experiments realized in the same temperature profile. The parameter y_{res} was considered constant with the value fixed in 1.6 logarithms, considering the tail for all isothermal curves was long as 60 minutes of experiment.

3.2. Validation of the dynamic model

Dynamic heating experiments were designed to validate the non-isothermal inactivation model used in this study.

3.2.1. Microorganism and spore preparation

To obtain the spore suspension, *B. coagulans* ATCC7050 cells were pre-cultivated in nutrient broth (Difco, Becton, Dickinson and Company, USA) at 37 °C for 48 h. Plates containing nutrient agar (Biolife, Italy) supplemented with sporulation salt (MnSO_4 , 5 ppm), according to Pacheco and Massaguer (2004), were used as sporulation medium. Solidified plates were inoculated with that pre-culture and incubated at 37 °C for 10 days to permit the bacterium sporulation. Spores were harvested by scratching the agar surface with a sterile rubber rod and sterile distilled water. The spores suspension were filtered by layers of sterile gauze and it was then centrifuged were used to filter the spores suspension and then it was centrifuged three times at 2000 g for 15 minutes at 4 °C. After each centrifugation, the pellet containing the spores was resuspended in sterile distilled water. Spore coloration using Wirtz-Conklin technique (Hendrickson and Krenz, 1991) was applied to evaluate the microorganism sporulation. The final spore suspension was stored at 4 °C until use.

Spores suspension was quantified by serial dilutions in sterile bacteriology peptone solution 0.1 % pours plated in Dextrose Tryptone Agar (DTA-Difco, Becton, Dickinson and Company, USA). After incubation at 37 °C for 3 days, the grown colonies were counted and the spores' concentration was determined.

3.2.2. Inactivation of *B. coagulans* spores under dynamic heating

B. coagulans spores tests were carried out in capillary glass tubes (Pyrex[®], 100 mm length, 1.5 mm internal diameter and 0.2 mm wall thickness). Tomato pulp (pH 4.3) adjusted to 4 °Brix was used as treatment medium, being added of an initial microbial concentration of 10^6 spores/mL. The preview sterilized tubes were carefully filled with inoculated medium by capillarity and were then manually sealed using a blowtorch (O_2 /liquified gas of petroleum – LGP). Caution was taken to avoid heating the cell suspension. The tubes were suspended in a test tube rack and, immediately after sealing, they were completely immersed into the oil baths at desired temperature profiles. After predetermined sampling intervals, two capillary tubes were taken out from the oil bath and immediately cooled in iced water. The tubes were placed in 95 % ethanol to reduce the level of surface contamination and the residual ethanol was then dried on sterile filter paper. The tubes ends were cute using sterile plier and the inoculated tomato pulp was expelled in a sterile count plate. Non-isothermal survival curves were determined

by diluting 5 μL of the treated sample in 4.5 mL of sterile bacteriology peptone solution 0.1 % followed by serial dilutions and pour plated in DTA. After 3 days at 37 °C, the colonies were enumerated. All experiments were performed in duplicate.

3.2.3. Dynamic temperature profile

Considering the oscillations of temperature that can occur during the food process, non-isothermal experiments were studied in seven different temperature profiles in the ranges from 95 to 105 °C, being named from profile 1 to profile 7, as shown in Figs. 2 and 3. The temperatures of 110 and 120 °C were not analyzed in non-isothermal study for the reason that the time intervals among the samples must be very short, making it difficult to perform the non-isothermal experimental of this study. Experiments were led in circulating thermostatically controlled oil baths (Neslab, RTE-221 and RTE-17, ± 0.01 °C, Thermo Scientific) at desired temperature profiles. The oil bath used to linear profile was coupled by a programmable temperature controller accessory (Neslab RPC touchscreen controller).

To profile linear (profile 1) the temperature was programmed to increase linearly from 95 to 105 °C, in 7 min, being the temperature profile recorded every 2 sec by a data recorder (OM-CP-RTDTEMP101, Omega Engineering), which was placed in the oil bath attached on a capillary tube. Other temperature profiles (profiles 2 to 7) were performed using two oil baths in the same time, where the two different temperatures were fixed, one in each oil bath. The capillary tubes were swiftly changed from bath to bath in the interval of each sample withdrawal. The come-up time was not considered since in capillary tube the temperature is reached almost instantaneously (Huang, 2009; Van Zuijlen et al., 2010).

3.3. Prediction of *B. coagulans* spores inactivation during dynamic heating

The temperature profiles designed for non-isothermal microbial inactivation of *B. coagulans* spores were described by appropriate linear and segmented (use of “if” clauses) equations. The expressions of temperature dependent parameters of the primary model (secondary models), as well as the expression of temperature history for each non-isothermal profile were inserted into the non-isothermal Gompertz-inspired equation (Eq. 4) and it was solved numerically by means of an ODE procedure (ode23 function) of Matlab software (MathWorks Inc,

Natick, USA). The predicted inactivation curves were compared to the experimental non-isothermal inactivation ones.

4. Results

This study predicted non-isothermal inactivation of *B. coagulans* spores under non-isothermal conditions based on isothermal inactivation data obtained from Zimmermann et al. (2012). Throughout these data, it was possible to establish a non-isothermal model to predict the behavior of this microorganism under time-varying temperature conditions. The temperature range of the non-isothermal profiles was within the studied range of the isothermal conditions (95 to 120 °C). Fig. 2 and Fig. 3 (top) show predicted non-isothermal inactivation curves for temperature profiles 1 to 4 and 5 to 7, respectively, as well as the respective experimental non-isothermal inactivation data of *B. coagulans* spores in tomato pulp, in duplicate. Temperature profile is also shown in the same figures (bottom), corresponding for each inactivation profile.

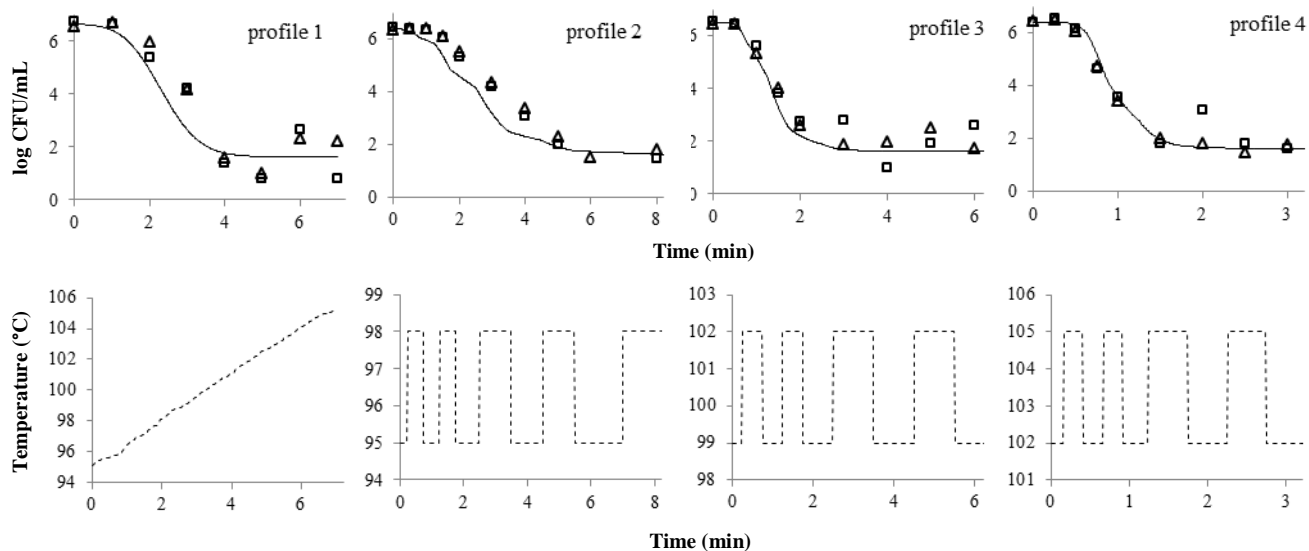


Fig. 2. Top - Inactivation kinetics of *B. coagulans* spores in tomato pulp under various oscillation temperature conditions. The points (\square and Δ) are experimental data (duplicate) and the lines (—) are the predicted inactivation kinetics using Eq. 4 as a model. Bottom – non-isothermal temperature profiles (1 to 4).

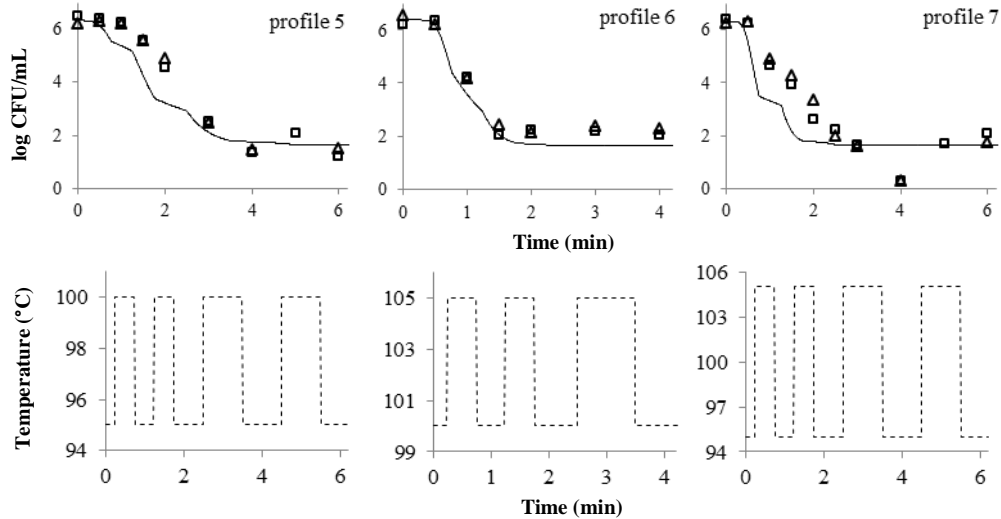


Fig. 3. Top - Inactivation kinetics of *B. coagulans* spores in tomato pulp under various oscillation temperature conditions. The points (□ and Δ) are experimental data (duplicate) and the lines (—) are the predicted inactivation kinetics using Eq. 4 as a model. Bottom – non-isothermal temperature profiles (5 to 7).

Inactivation kinetics predicted when temperature profiles 3, 4 and 6 were applied (Fig. 2 and 3) showed very similar behavior that correspondent observed ones. We can observe that these 3 temperature profiles are in the range of the higher temperature analyzed (99-105 °C). On the other hand, the profiles that did not presented very good predictions are in the range of the lower temperature analyzed (95-100 °C). We can observe that in the temperature range of the profile 2 (95 to 98 °C) and profile 5 (95 to 100 °C), the secondary model presented a good fitting on the parameters' dependence temperature for k_{\max} data. However, the same could not be observed for the parameter L . Accordingly, the underprediction of the non-isothermal model occurred in the beginning of the fitting, thus, making the exponential phase being faster than that to experimental ones, but following the same behavior for that phase on both predicted and observed situations.

Slightly overestimation of predicted inactivation kinetics related to experimental data could be observed for some of temperature profiles analyzed. However, despite of the predicted kinetics being faster than the experimental survival curves in most of the temperature profiles studied, the non-isothermal model's predictions followed the general kinetic of the survival pattern with shoulder, exponential and tailing phases. Due to the sigmoidal kinetic found to isothermal inactivation, a precise model fitting on inactivation data can be difficult to be establish (McKellar and Lu, 2004).

Among the seven temperature profiles studied in the present research, the profile 4 was the only one that the non-isothermal model presented slightly underestimation on the observed non-isothermal data, although insignificant (Fig. 2). Observing the Fig. 1, the isothermal temperature dependent parameter L was underpredicted by the secondary model fitting in the profile 4 temperature range (102 to 105 °C), explaining that overestimation of the predicted non-isothermal kinetic.

The worst prediction could be visualized for profile 7 (Fig. 2) where the model predicted faster inactivation than that actually recorded. This discrepancy between predicted and observed kinetics can be explained due the fact that this profile runs through all over the secondary model range that included temperature rate analyzed for non-isothermal inactivation (Fig. 1). Although the profile 1 follows the same temperature range of profile 7, that one presented a bit better prediction of non-isothermal model when compared with the corresponding experimental data.

5. Discussion

Thermal processes are normally necessary to assurance safety and long stable of food products. To be effective, a heat process needs to guarantee that the product had been exposed to a sufficiently high temperature for a sufficient time to destroy the target microorganisms. Although the heating processes of the industry are mostly designed considering static temperatures, a faulty controller can cause significant temperature oscillations (Peleg, 2006). Therefore, the temperature histories analyzed in this research simulate real fluctuations which can occur during the food processing in the industry. The study of non-isothermal models, simulating those temperature oscillation profiles is particularly useful in the assessment of the impact of accidents and unexpected interruptions in the temperature process on the residual survival ratio of the target microorganisms (Peleg, 2006).

The non-isothermal inactivation model proposed by Peleg and Penchina (2000) was validated in the current study by comparing the non-isothermal experimental data analyzed under seven proposed temperature profiles with the non-isothermal data estimated by the model. The slight discrepancy between predicted and observed inactivation kinetics can be attributed to a number of reasons. Estimated parameters of the primary model may not afford sharp fitting due to the sigmoidal shape of the isothermal inactivation kinetics. The fact is that fast transition between shoulder and exponential phases of *B. coagulans* spores inactivation come to be hard having additional number of experimental data during isothermal inactivation. The potential variability of the secondary model's parameters is also a case in point (Peleg, 2006). The temperature dependence on the parameters L and k_{\max} varied in a way that made it difficult to find appropriate 'smooth' secondary model, thus making non-isothermal model predict the inactivation kinetics with slight discrepancy in some cases. However, in the condition that temperature profile encompassed a temperature range in which isothermal temperature dependent parameters were well described by secondary model, the non-isothermal model estimated very well the inactivation kinetic. Hence, the non-isothermal inactivation kinetics estimated by Gompertz-inspired model using the methodology proposed by Peleg and Penchina (2000) showed being effective to predict inactivation of *B. coagulans* spores under time-varying temperature.

Periago et al. (2004) estimated the survival curves of the heat resistant spores of *Bacillus sporothermodurans* IC4 in two non-

isothermal heat treatments using the procedure originally proposed by Peleg and Pechina (2000). The authors validated the model by comparing the predicted curves with experimental survival ones; and found there was a general agreement, although not perfect, between the predicted and experimentally observed survival ratios. Mattick et al. (2001) also studied the applicability of the non-isothermal model proposed by Peleg and Pechina (2000) and its underlying assumptions was tested with a series of eight experiments in which the *Salmonella* cells, in sugar-rich media, were heated at various rates to selected temperatures in the range of 65 to 80 °C and then cooled. The authors verified that in all the experiments, there was an agreement between the predicted and observed survival curves. Haberbeck et al. (2012) tested the applicability of the non-isothermal model also proposed by Peleg and Pechina (2000), comparing the estimated kinetics with experimental ones obtained with *B. coagulans* spore inactivation in nutrient broth, added with 400 ppm of oregano essential oil and heat treated under two non-isothermal temperature profiles, ranging from 90 to 95 °C. A slight overestimation of experimental data by the model was observed by the authors.

Non-isothermal simulations can help to evaluate the efficacy of remedial measures in the industry processes once the survival ratio has been estimated. It measures like elevating the temperature and/or prolonging the holding time may come to guarantee safety and shelf stable of food products (Peleg, 2006). The non-isothermal prediction accomplished in this study was closer to the real processing conditions which confirm that the mathematical procedure proposed by Peleg and Pechina (2000) is adequate to estimate *B. coagulans* spores inactivation. However, in general, non-isothermal model's applicability may be further tested and reconfirmed for safely be applied by the food industry.

Acknowledgments

Morgana Zimmermann gratefully acknowledges the financial support provided by the Capes Foundation (Brazil).

References

- Brackett, R. E. (2001). Fruits, vegetables, and grains. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology, fundamentals and frontiers* (pp. 127–138). Washington, DC: ASM Press.

- Corradini, M. G., Peleg, M. (2005). Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. *Journal of Applied Microbiology*, 99, p. 187-200.
- Corradini, M. G., Peleg, M. (2009). Dynamic model of heat inactivation kinetics for bacterial adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2590-2597.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N. A., DeVos, P. (2004). Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 50-60.
- García, M. T., Ben Omar, N., Lucas, R., Pérez-Pulido, R., Castro, A., Grande, M. J., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. (2003). Antimicrobial activity of enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiology*, 20, 533-536.
- Gil, M. M., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M., (2006). A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. *Journal of Food Engineering*, 76, 89-94.
- Haberbeck, L. U., Dannenhauer, C. E., Salomão, B. C. M., Aragão, G. M. F. (2012). Thermochemical non-isothermal inactivation of *Bacillus coagulans* spores in nutrient broth with oregano essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation* (in press).
- Hendrickson, D. A., Krenz, M. M. (1991). Reagents and Stains. In Balows, A., Hausler, W. J., Herrmann, K. L. Jr., Isenberg, H. D., Shadomy, H. J. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. (pp. 1289-1314). Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Huang, L. (2009). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions. *Journal of Food Engineering*, 90, 380-387.
- Koutsoumanis, K. (2001). Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1821-1829.
- Mafart, P. (2005). Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 239-251.
- Mallidis, C. G., Frantzeskakis, P., Balatsouras, G., Katsabotxakis, C. (1990). Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *International Journal of Food Science and Technology*, 25, 442-448.

- Mattick, K. L., Legan, J. D., Humphrey, T. J., Peleg M. (2001). Calculating *Salmonella* inactivation in nonisothermal heat treatments from isothermal nonlinear survival curves. *Journal of Food Protection*, 64, 606-13.
- McKellar, R. C., Lu, X. (2004). *Modeling microbial response in food*. CRC series in contemporary food science, 1st ed. Washington, D.C.
- Miller, F. A., Ramos, B. F., Gil, M. M., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., Silva, C. L. M. (2011). Heat inactivation of *Listeria innocua* in broth and food products under non-isothermal conditions. *Food Control*, 22, 20-26.
- Miller, F. A., Ramos, B., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., Silva, C. L. M. (2010). Comparison of recovery methods for the enumeration of injured *Listeria innocua* cells under isothermal and non-isothermal treatments. *Food Microbiology*, 27, 1112-1120.
- Pacheco, C. P., Massaguer, P. R. (2004). Biological validation of tomato pulp continuous heat process. *Journal of Food Process Engineering*, 27, 449-463.
- Palop A., Raso J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J. (1999). Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 243-249.
- Peleg, M. (2006). *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation*. Boca Raton: Taylor & Francis, 417p. ISBN 0849336457.
- Peleg, M., Pechina, C. M. (2000). Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 40, 159-172.
- Periago, P. M., Van Zuijlen, A., Fernandez, P. S., Klapwijk, P. M., ter Steeg, P. F., Corradini, M. G., Peleg, M., (2004). Estimation of the non-isothermal inactivation patterns of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores in soups from their isothermal survival data. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 205-218.
- Psomas, A. N., Nychas, G. J., Haroutounian, S. A., Skandamis, P. N. (2011). Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. *Computers and Electronics in Agriculture*, 76, 119-129.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A., Ball. A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149, 1-5.

- Rodrigo, M., Martínez, A., Sanchis, J., Trama, J., Giner, V. (1990). Determination of hot-fill-hold-cool process specifications for crushed tomatoes. *Journal of Food Science*, 55, 1029-1032.
- Valdramidis, V. P., Geeraerd, A. H., Bernaerts, K., Van Impe, J. F. (2006). Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: The case of microbial heat resistance induction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 80–87.
- Van Impe, J. F., Bart, M. N., Schellekens, M., Martens, T., Baerdemaeker, J. A. (1995). Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 227-249.
- Van Zuijlen, A., Periago, P. M., Amézquita, A., Palop, A., Brul, S., Fernández, P. S. (2010). Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores: putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilization. *Food Research International*, 43, 1895-1901.
- Whiting, R. C., Buchanan, R. L. (1993). A classification of models in predictive microbiology - a reply to K. R. Davey. *Food Microbiology*, 10, 175-177.
- Zimmermann, M., Miorelli, S., Schaffner, D. W., Aragão, G. M. F. (2012). Comparative effect of different methodologies to determine *B. coagulans* spores inactivation kinetics in acid food under isothermal conditions. Artigo a ser submetido para a revista “International Journal of Food Microbiology”.

4.4.2. Resultados complementares

Para aplicação do modelo não isotérmico foi necessário descrever os perfis de temperatura utilizados na realização dos experimentos não isotérmicos, simulando condições de flutuação de temperatura que podem ocorrer na indústria processadora de alimentos.

Os dados experimentais obtidos da variação linear da temperatura contra o tempo ($T(t)$) foram aproximados por uma função linear, que é apresentada na Equação 4.1.

$$T(t) = a'.t + b' \quad (4.1)$$

sendo que a' e b' são coeficientes obtidos por aproximação da equação aos dados experimentais.

Para a variação entre duas temperaturas fixas, foram programados ciclos de repetição “*if*”, ilustrado no esquema abaixo:

$$\text{If: } t_i < t \leq t_{i+1}; T = T_i$$

sendo que i ($i \geq 0$) corresponde a cada mudança de temperatura aplicada no experimento. Por exemplo, se em um experimento foram aplicadas variações entre as temperaturas 95 e 105 °C, iniciando em 95 °C a cada 5 minutos, o perfil de temperatura resultante é:

$$\text{if } 0 < t \leq 5, \quad T = 95; \text{ if } 5 < t < 10, \quad T = 105; \text{ if } 10 < t \leq 15, \quad T = 95$$

e assim sucessivamente até completar o tempo de estudo pré-determinado.

As figuras apresentadas no item 4.4.1 do artigo apresentam as curvas de inativação não isotérmica predita e as observadas para cada perfil de temperatura analisado. Para comparação destas curvas com as curvas obtidas do estudo de inativação dos esporos de *B. coagulans* em condições isotérmicas, as curvas serão novamente apresentadas para cada faixa de temperatura estudada, como ilustrado a seguir.

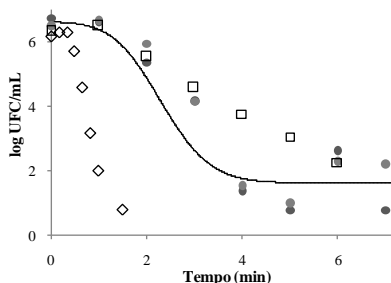


Figura 4.7. Curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições isotérmicas e não isotérmicas de temperatura. A curva contínua (—) representa a predição do modelo não isotérmico; pontos (●) e (●) representam duplicatas de experimentos não isotérmicos com perfil de temperatura linear (95 a 105 °C) e pontos (□) e (◇) representam experimentos isotérmicos a 95 e 105 °C, respectivamente.

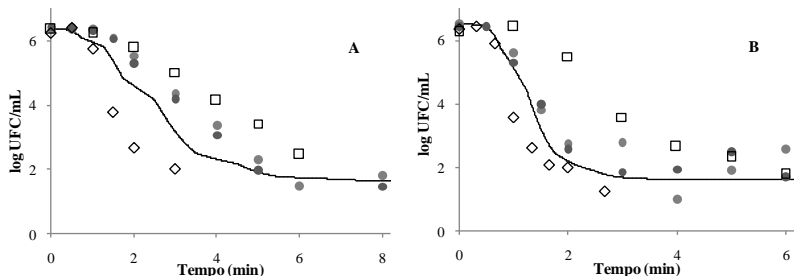


Figura 4.8. Curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições isotérmicas e não isotérmicas de temperatura. A curva contínua (–) representa a predição do modelo não isotérmico; dados (●) e (●) representam experimentos não isotérmicos; A – representa dados do perfil de temperatura 95 - 98 °C, dados (□) e (◇) representam duplicata de experimentos isotérmicos a 95 e 100 °C, respectivamente; B – representa o perfil de temperatura 99 - 102 °C, dados (□) e (◇) representam experimentos isotérmicos a 97 e 103 °C, respectivamente.

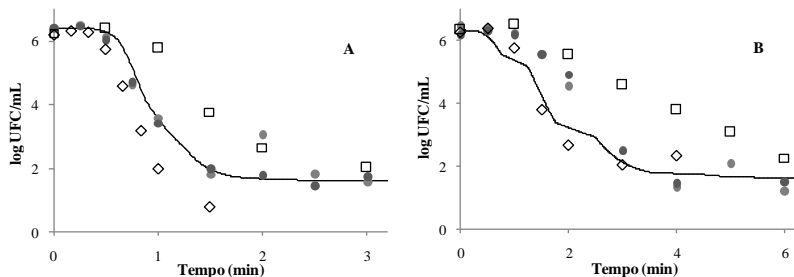


Figura 4.9. Curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições isotérmicas e não isotérmicas de temperatura. A curva contínua (–) representa a predição do modelo não isotérmico; dados (●) e (●) representam experimentos não isotérmicos; A – perfil de temperatura 102 - 105 °C, dados (□) e (◇) representam duplicata de experimentos isotérmicos a 100 e 105 °C, respectivamente; B – perfil de temperatura 95 - 100 °C, dados (□) e (◇) representam experimentos isotérmicos a 95 e 100 °C, respectivamente.

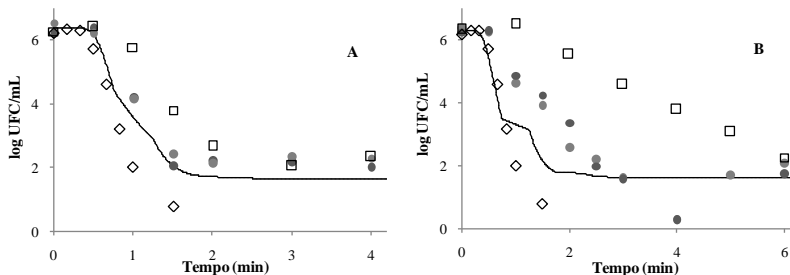


Figura 4.10. Curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* sob condições isotérmicas e não isotérmicas de temperatura. A curva contínua (—) representa a predição do modelo não isotérmico; dados (●) e (●) representam experimentos não isotérmicos; A – perfil de temperatura 100 - 105 °C, dados (□) e (◇) representam duplicata de experimentos isotérmicos a 100 e 105 °C, respectivamente; B – perfil de temperatura 95 - 105 °C, dados (□) e (◇) representam experimentos isotérmicos a 95 e 105 °C, respectivamente.

Como se pode observar nas figuras 4.7 a 4.10, as curvas de inativação de esporos de *B. coagulans* obtidas sob condições não isotérmicas apresentaram comportamentos similares às curvas de inativação obtidas em condições isotérmicas, ou seja, a formação de ombro anteriormente a fase exponencial de inativação, seguido por cauda. Estes resultados indicam que os processos térmicos, incluindo os trocadores de calor devem ser bastante precisos.

4.5. Inativação de esporos de *Bacillus coagulans* em polpa de tomate pelo uso combinado de alta pressão hidrostática e moderada temperatura

Uma nova geração de tratamentos alternativos e inovadores focando a inativação e/ou redução da carga microbiológica indesejada em alimentos vêm ganhando atenção da indústria processadora nos últimos anos. O método de conservação microbiana ainda mais amplamente utilizado na indústria é o tratamento térmico (ICIEK et al., 2006). Porém, com o crescente foco de microrganismos termorresistentes na indústria processadora e a busca por tecnologias capazes de minimizar os danos térmicos causados nos alimentos, o uso de alta pressão hidrostática (HHP) vem ganhando interesse por parte da pesquisa e da indústria (JORDAN et al., 2001; KOSEKI; YAMAMOTO, 2007).

A HHP é uma poderosa ferramenta empregada para garantir a qualidade microbiológica de alimentos, alterando em menor extensão o sabor, a cor, e os nutrientes destes produtos, se comparado com os tratamentos convencionais (SAN MARTÍN et al., 2002; SOYSAL et al., 2004). O uso individual da HHP é eficiente para eliminar formas vegetativas de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos, sendo o uso combinado com temperatura eficiente para inativar esporos (MALLIDIS; DRIZOU, 1991; ROBERTS; HOOVER, 1996). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso combinado de HHP com elevada temperatura sobre a inativação de esporos de *B. coagulans* inoculados em polpa de tomate a 4 °Brix. Pressões de 300, 350, 400, 450, 500 e 600 MPa combinadas com temperaturas de 50 e 60 °C foram testadas e os resultados são apresentados na forma de artigo (item 4.5.1) e resultados complementares (4.5.2).

4.5.1. Modeling the inactivation of *Bacillus coagulans* spores in tomato pulp from the combined effect of high pressure and moderate temperature

Abstract

Aim: The present study evaluated the combined effect of high pressure processing (HHP) and moderate temperature on *B. coagulans* spore survival in tomato pulp.

Methods and Results: Pressures from 300 to 600 MPa and temperatures of 50 and 60 °C were applied. Inactivation kinetic parameters were obtained through the application of a primary biphasic model and

classical secondary models to describe the influence of pressure and temperature on spore inactivation. Processes of 300 MPa combined with temperatures of 50 and 60 °C showed 2 and 2.4 log reductions, respectively, after 15 minutes of treatment. For processes at 600 MPa and 50 or 60 °C temperatures with the same holding time, the reductions were 3.1 and 5.7 log reductions, respectively.

Conclusions: These findings illustrate the improved efficiency of HHP with the application of moderate temperatures on the inactivation of *B. coagulans* spores, and how variations in pressure and temperature impact the effectiveness of the process.

Significance and Impact of Study: The use of HHP for spore inactivation represents a considerable improvement in relation to other available methods of spore inactivation and could be of interest for food preservation in the food industry. Results shown in this study may help in the design of processes for food preservation based on HHP technology.

Keywords

Bacillus coagulans, inactivation, high hydrostatic pressure, temperature, tomato pulp.

1. Introduction

High hydrostatic pressure is a relatively new and attractive technology used to produce high quality and microbiologically safe food products, while also extending product shelf life (Khurana and Karwe, 2009). The application of HHP has recently increased as more studies continue to indicate that this process can inactivate microorganisms without significantly altering a products organoleptic or nutritional qualities (Cheftel, 1992; Doona et al., 2005). A single HHP treatment effectively kills vegetative cells (Islam et al., 2006), but HHP treatment at room temperature is typically not sufficient to inactivate endospore-forming bacteria (San Martín et al., 2002). Endospores of the genera *Bacillus* and *Clostridium* can withstand pressures greater than 1,000 MPa at 25 °C (San Martín et al., 2002).

The endospores of *Bacillus coagulans* are very resistant to destruction and can generally tolerate applications of environmental stresses such as low pH, antimicrobial chemicals or heat. When such treatments are at sufficient levels to cause spore inactivation, they tend to have a negative effect on the nutritional and/or organoleptic quality of

the food. HHP processes at moderate temperatures (above room temperature) have been effectively applied to inactivate microorganism endospores in food products with minimal undesirable side effects (Ananta et al., 2001; Wuytack and Michiels, 2001; Gao et al., 2005).

B. coagulans is a heat resistant bacterium of significant concern to the acidified processed food industry. It is responsible for causing “flat sour” spoilage of canned foods due to the production of lactic acid without gas formation (De Clerck et al., 2004; Lucas et al., 2006). *B. coagulans* spores are able to germinate and grow at pH values as low as 4, and can be of great concern in spoilage canned vegetables (Brackett, 2001) and fruit products, especially in tomatoes (Rodrigo et al., 1990; García et al., 2003). Thermal inactivation of *B. coagulans* in food products has been studied extensively (Palop et al., 1999; Pacheco and Massaguer, 2004), but the effect of HHP on *B. coagulans* spores is poorly characterized.

Predictive microbiology combines microbial knowledge, experimental data and mathematical techniques to construct mathematical models that can describe and predict microbial behavior (Van Derlinden et al., 2011). Research indicates that the inactivation kinetics of bacterial spores by HHP do not follow first-order kinetics and are generally non-log-linear curves with tailing plots (Koseki and Yamamoto, 2007; Wang et al., 2009). Several non-log-linear model (e.g. Weibull, Log-linear, Log-linear + tail and Biphasic), have been applied to the study of HHP spores inactivation kinetics (Ahn et al., 2007; Pilavtepe-Çelik et al., 2009; Wang et al., 2009; Hereu et al., 2011). Secondary models (e.g. empirical polynomial, Arrhenius and Square Root), have been used to describe the effect of environmental factors on microbial inactivation (Koseki and Yamamoto, 2007; Pilavtepe-Çelik et al., 2009).

The aim of this study was to model the efficiency of the combined effect of HHP and moderate temperature on the inactivation of *B. coagulans* spores in tomato pulp. Inactivation kinetic parameters obtained through the fit of primary models to experimental data and secondary models were established to describe the influence of HHP and moderate temperature on primary model parameters.

2. Material and methods

2.1. Microorganism and spores production

Bacillus coagulans ATCC 7050 used in this work was obtained from André Tosello Foundation, in Campinas, SP, Brazil. Cells of *B. coagulans* were pre-cultured at 37 °C for 48 h in nutrient broth (Difco, Becton, Dickinson and Company, USA). Thereafter, the colonies were suspended in sterile distilled water and used to inoculate nutrient agar (Biolife, Italy) supplemented with 5 ppm MnSO₄, as per Pacheco and Massaguer (2004). Plates were incubated at 37 °C for 10 days to permit sporulation. The nutrient agar surface was flooded with 5 mL sterile distilled water and the agar surface rubbed gently with a sterile rubber rod to harvest the spores. The spore suspension was filtered through several layers of sterile gauze and centrifuged at 2000 g for 15 minutes. The suspension was washed three times with 5 mL of sterile distilled water and re-centrifuged. Sporulation was assessed by using the Wirtz-Conklin technique (Hendrickson and Krenz, 1991). The final precipitate was re-suspended in a small volume of sterile distilled water and stored in amber glass under refrigeration at 4 °C for future use.

The concentration of *B. coagulans* spores was determined by serial dilutions in sterile bacteriology peptone 0.1% solution pour plated on Tryptone Dextrose Agar (TDA-Difco, Becton, Dickinson and Company, USA). The plates were incubated at 37 °C for 3 days before enumeration.

2.2 High hydrostatic pressure with moderate temperature treatment

HHP experiments were conducted in vials (Fisher brand, locking-lid microcentrifuge tubes with Polypropylene snap-capvials) filled with tomato pulp at pH 4.3 adjusted to 4 °Brix. Inoculated (10^6 spores mL⁻¹) tomato pulp was added to each vial such that it was filled completely (~0.7 mL). Vials were closed and individually wrapped with parafilm. The vials were placed in a 10 L vessel (details below) and subjected to different pressures, temperatures and holding times using preheated water as the pressure-transmitting fluid.

Pressures of 300, 400, 450, 500, 550 and 600 MPa and process-holding times of up to 39 min were applied, depending on the pressure. Pressure holding time did not include the pressure come-up or depressurization times. Product temperatures of 50 and 60 °C were targeted, where the temperature represented the estimated average temperature of the product during the holding time. The initial

temperature of the pressure transmitting fluid was adjusted assuming a compression heating increase of ~ 3 °C/100 MPa. The vessel water jacket temperature was also controlled in order to target the desired temperature at the end of the process. After depressurization, the samples were cooled in an ice bath and stored at 4 °C up to 6 h prior to enumeration.

To determine the number of surviving spores, 0.5 mL of the medium from each vial was diluted in 4.5 mL of sterile 0.1% bacteriology peptone solution and the dilutions were pour plated using TDA as growth medium. Plates were incubated at 37 °C for 3 days and colonies enumerated. All HHP experiments were performed twice on separate days.

2.3. Experimental Facility

A high hydrostatic pressure processing unit (Elmhurst Research Inc., Albany, NY) at Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA was used to perform the experiments. The HHP processing unit was comprised of a 10 L stainless steel vessel, with an overall length of 109 cm and the external diameter of 44.5 cm. Water was used as the pressure-transmitting medium. The water input to the vessel was through the top fitting. A typical pressure come-up time was 180 seconds for 600 MPa (Khurana and Karwe, 2009) and the pressure release time was almost instantaneous.

An external water bath with a heating coil was used to preheat the vessel mass overnight to equilibrate it at the desired temperature before starting the experiments. A 13 L external tank preheated the water to the desired temperature just prior to the experiment.

The water temperature in the vessel during the process was measured with three type-K thermocouples in high-pressure tubing, located in the pressure chamber at three different depths. The pressure in the system was measured using a transducer. Pressurization, pressure hold, and depressurization were recorded by a data acquisition system.

2.4. Mathematical primary models

Matlab software was used to model inactivation kinetics. A screening of the literature to select primary models used to perform microbial inactivation was conducted and models such as Log-linear + tail (Hereu et al., 2011), Weibull (Ahn et al., 2007; Pilavtepe-Çelik et

al., 2009; Wang et al., 2009; Hereu et al., 2011) and Biphasic (Hereu et al., 2011; Pacheco et al., 2011) were considered.

The goodness of fit of the primary models was analysed by Correlation Coefficient (r^2) and Mean Square Error (MSE). R^2 represents the fraction of the variation that is explained. The higher the r^2 value, the better the data are predicted by the model. The Mean Square Error (MSE) describes the error of the model compared to the experimental data. The closer MSE is to zero, the better the fit.

Among the fit of the related models, the statistical parameters r^2 and MSE were considered; and the biphasic model presented the best fit to the experimental data as well as the highest r^2 and lowest MSE values. The biphasic model shape is commonly used to describe situations with the presence of two distinct sub-populations. The first portion of the kinetic curve is assumed to represent the sensitive portion of the microorganism population and the second portion is assumed to represent the portion more resistant. Equation 1 describes Biphasic model.

$$\log \frac{N}{N_0} = \log(f \exp(-k_{\max 1} \cdot t) + (1-f) \cdot \exp(-k_{\max 2} \cdot t)) \quad (1)$$

where N represents the number of surviving spores (CFU mL⁻¹) after time t (min); N_0 is the initial level of *B. coagulans* spores (CFU mL⁻¹) at the beginning of treatment time ($t = 0$); f is the fraction of the initial population that was destroyed according to the first specific inactivation rate $k_{\max 1}$ (min⁻¹); and $(1-f)$ is the fraction of the population that was destroyed according to the second specific inactivation rate $k_{\max 2}$ (min⁻¹).

2.5. Secondary models

Secondary models described the influence of pressure on primary model parameters for *B. coagulans* spore inactivation in tomato pulp. The classical Arrhenius and Square Root models, as well as empirical models (exponential, linear and power), were screened, and the models that had the best fit were selected for further study. The correlation coefficients (r^2) were used to choose the best model fit and the Arrhenius (Equation 2) and exponential (Equation 3) models were selected.

$$\ln \varepsilon = a \left(\frac{1}{p} \right) + b \quad (2)$$

where the empirical parameters of the equation are a and b ; p corresponds to the pressure analysed; and ε corresponds to the parameter of interest of the primary model (f , $k_{\max 1}$ or $k_{\max 2}$).

$$\varepsilon = a' \cdot \exp(b' \cdot p) \quad (3)$$

where the parameters ε and p have the same meaning described for equation 2 and a' and b' are regression parameters.

3. Results

3.1. Primary model kinetics of *B. coagulans* inactivation by HHP

The inactivation kinetics of *B. coagulans* spores by HHP (300 to 600 MPa) with temperatures of 50 and 60 °C are presented in Fig. 1 and 2, respectively. One inactivation curve (selected from the duplicate experiments) was chosen as an example for each pressure and temperature studied.

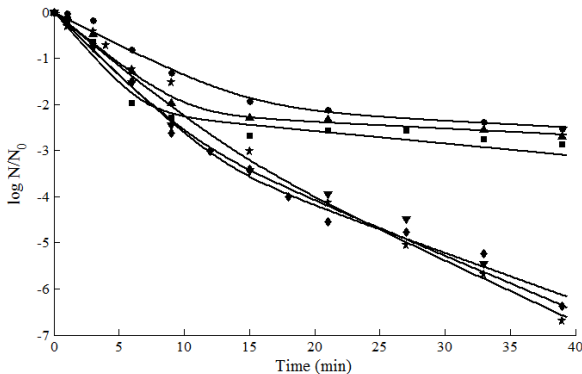


Fig. 1. Inactivation kinetics of *B. coagulans* spores by HHP of 300 MPa (●), 400 MPa (▲), 450 MPa (■), 500 MPa (◆), 550 MPa (*) and 600 MPa (▼) at 50 °C. Lines represent the Biphasic model fit.

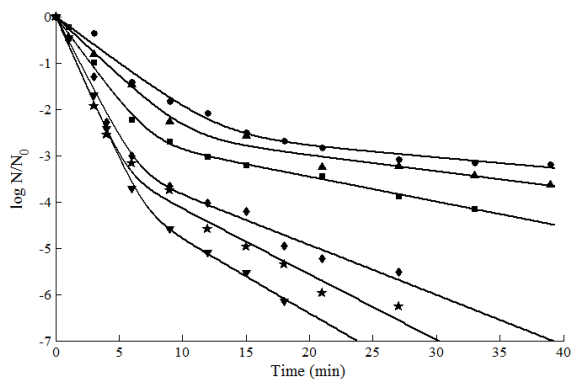


Fig. 2. Inactivation kinetics of *B. coagulans* spores by HHP of 300 MPa (●), 400 MPa (▲), 450 MPa (■), 500 MPa (◆), 550 MPa (*) and 600 MPa (▼) at 60 °C. Lines represent the Biphasic model fit.

Inactivation curves of *B. coagulans* in tomato pulp obtained in this study were biphasic, and presented two inactivation rates in most situations (Fig. 1 and Fig. 2). Interestingly in experiments at both 50 and 60 °C, the pattern of inactivation is different for experiments at lower pressures 300 - 450 MPa that for those at higher pressures 500 - 600 MPa. The parameters of the primary Biphasic model f , $k_{\max 1}$ and $k_{\max 2}$ as well as the corresponding r^2 and MSE values for all studied pressures are shown in Table 1. The values of r^2 (close to 1) and low MSE indices show that the model fits the experimental data well (Table 1).

Table 1. Biphasic model parameters of *B. coagulans* inactivation in tomato pulp at 50 and 60 °C for all studied pressures.

| <i>p</i> (MPa) | T (°C) | <i>f</i> | $k_{\max 1}$ (min ⁻¹) | $k_{\max 2}$ (min ⁻¹) | <i>r</i> ² | MSE |
|----------------|--------|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------|
| 300 | 50 | 0.99 | 0.33 | 0.03 | 0.988 | 0.017 |
| | | 0.99 | 0.39 | 0.04 | 0.997 | 0.003 |
| | 60 | 0.99 | 0.48 | 0.08 | 0.972 | 0.040 |
| | | 1.00 | 0.47 | 0.06 | 0.988 | 0.019 |
| 400 | 50 | 0.99 | 0.52 | 0.03 | 0.992 | 0.013 |
| | | 0.98 | 0.56 | 0.06 | 0.984 | 0.016 |
| | 60 | 1.00 | 0.60 | 0.08 | 0.990 | 0.026 |
| | | 1.00 | 0.68 | 0.07 | 0.989 | 0.018 |
| 450 | 50 | 0.99 | 0.74 | 0.06 | 0.973 | 0.035 |
| | | 0.98 | 0.49 | 0.06 | 0.966 | 0.044 |
| | 60 | 1.00 | 0.86 | 0.12 | 0.997 | 0.008 |
| | | 0.99 | 0.72 | 0.17 | 0.996 | 0.015 |
| 500 | 50 | 1.00 | 0.81 | 0.22 | 0.985 | 0.043 |
| | | 0.99 | 0.63 | 0.23 | 0.992 | 0.042 |
| | 60 | 1.00 | 1.21 | 0.25 | 0.993 | 0.034 |
| | | 1.00 | 1.23 | 0.23 | 0.992 | 0.036 |
| 550 | 50 | 0.97 | 0.55 | 0.30 | 0.992 | 0.048 |
| | | 1.00 | 0.47 | 0.21 | 0.987 | 0.074 |
| | 60 | 1.00 | 1.44 | 0.33 | 0.993 | 0.071 |
| | | 1.00 | 1.29 | 0.33 | 0.988 | 0.068 |
| 600 | 50 | 0.98 | 0.52 | 0.24 | 0.973 | 0.071 |
| | | 0.98 | 0.65 | 0.28 | 0.987 | 0.045 |
| | 60 | 1.00 | 1.42 | 0.37 | 0.998 | 0.010 |
| | | 1.00 | 1.43 | 0.45 | 0.996 | 0.022 |

At 50 °C (Fig. 1), *B. coagulans* spores presented a considerable change in inactivation rate after 10 min at lower pressures (300-450 MPa), while the change in inactivation rate was much less pronounced at higher pressures (500-600 MPa). When the temperature was 60 °C (Fig. 2), the specific inactivation rates $k_{\max 1}$ and $k_{\max 2}$ of *B. coagulans* in tomato pulp increased with increasing pressures. For this temperature, the increase of pressure influenced both specific inactivation rates - $k_{\max 1}$ and $k_{\max 2}$.

The specific inactivation rates of the experiments at 60 °C were higher than those treated with 50 °C, at the same pressure. It should also be noted that stronger tailing occurred in the experiments treated with lower pressures (300 - 450 MPa) at both process temperatures; however, the trend is especially clear at 50 °C (Fig. 1 and Fig. 2).

Table 2 summarizes the decimal reduction of *B. coagulans* spores after 15 minutes of holding time over all pressures analysed with 50 and 60 °C. This holding time was chosen since it was common to all

combinations of temperature and pressure studied. A pressure of 300 MPa and temperature of 50 °C resulted in a 2.0 log reduction after 15 min of holding (Table 2). Using the same pressure, but increasing the temperature to 60 °C, a slightly greater log reduction was obtained (2.4). In contrast, a pressure of 600 MPa at 50 °C caused a 3.1 log reduction of *B. coagulans* spores, whereas increasing the temperature to 60 °C, resulted in an increase in the log reduction to 5.7.

Table 2. log reduction of *B. coagulans* spores in tomato pulp obtained in a holding time of 15 minutes for pressures (*p*) from 300 to 600 MPa and temperatures of 50 and 60 °C.

| <i>p</i> (MPa) | log reduction - 15 min holding time | | | |
|----------------|-------------------------------------|-----|-------|-----|
| | 50 °C | SD | 60 °C | SD |
| 300 | 2.0 | 0.1 | 2.4 | 0.2 |
| 400 | 2.2 | 0.1 | 2.7 | 0.2 |
| 450 | 2.5 | 0.3 | 3.1 | 0.2 |
| 500 | 3.7 | 0.4 | 4.0 | 0.3 |
| 550 | 2.8 | 0.3 | 5.0 | 0.1 |
| 600 | 3.1 | 0.5 | 5.7 | 0.2 |

SD - Standard deviation of duplicates

3.2. Secondary models

The secondary model equations and the corresponding r^2 values for each situation are presented in Table 3. The parameter *f* (fraction of the initial population destroyed in the first phase) at 50 and 60 °C was essentially constant with the pressure variation and their values were fixed at 0.987 and 0.996, respectively. The secondary model that presented the best fit for the relationship of pressure and parameter $k_{\max 1}$ at 50 °C was the Arrhenius model; although, the fit is relatively poor ($r^2=0.5674$; Table 3). On the other hand, the influence of pressure variation on $k_{\max 1}$ at 60 °C and $k_{\max 2}$ at 50 and 60 °C was best fit with the Exponential model, presenting good r^2 values, as demonstrated in Table 3.

Table 3. Equations describing the relation of Biphasic model parameters ($k_{\max 1}$ and $k_{\max 2}$) and pressure on the inactivation of *B. coagulans* spores in tomato pulp, obtained by fitting the secondary models.

| Parameter | Temperature | Model | Equation | r^2 |
|------------------------------------|-------------|-------------|---|-------|
| $k_{\max 1}$ (min^{-1}) | 50 °C | Arrhenius | $\ln(k_{\max 1}) = -285.39(1/p) + 0.0349$ | 0.567 |
| $k_{\max 2}$ (min^{-1}) | | Exponential | $k_{\max 2} = 0.0027 \exp(0.0079p)$ | 0.852 |
| $k_{\max 1}$ (min^{-1}) | 60 °C | Exponential | $k_{\max 1} = 0.1348 \exp(0.0041p)$ | 0.949 |
| $k_{\max 2}$ (min^{-1}) | | Exponential | $k_{\max 2} = 0.0074 \exp(0.0067p)$ | 0.932 |

4. Discussion

Inactivation of *B. coagulans* spores in tomato pulp by HHP at moderate temperatures did not follow first-order kinetics, but instead clearly showed nonlinear behaviour as described by the Biphasic model (Fig. 1 and 2). Other published data on microbial inactivation by HHP also showed nonlinear kinetics. *Listeria monocytogenes* CTC1034 on sliced cooked ham at treated by pressures from 300 to 800 MPa for various treatment times (0.1 up to 900 sec) showed nonlinear inactivation (Hereu et al., 2011). These authors showed that the Log-linear + tail model was the most appropriate to their study and this model was statistically superior ($p < 0.05$) to the Biphasic model. Cléry-Barraud et al. (2004) studied the inactivation kinetics of *B. anthracis* spores exposed to pressures from 280-500 MPa from 10 min to 6 h, combined with temperatures ranging from 20 to 75 °C. These authors found that at 45 and 75 °C, the kinetics of pressure inactivation of *B. anthracis* were biphasic and could be described using at least two exponential terms. Ahn et al. (2007), studying spore inactivation of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* in deionized water, subjected to various pressure (0.1 and 700 MPa) and heat (105 and 121 °C) combinations, found spores subjected to 700 MPa and 105 °C exhibited rapid initial inactivation, followed by moderate inactivation, and a characteristic tailing during extended pressure holding time. However, spores treated at 700 MPa and 121 °C were inactivated below detection limits (up to 7–8 log spore mL^{-1}) after 1 min of process, and exhibit was biphasic inactivation. Voldrich et al. (2004) analysed the effect of high pressure treatment (300 to 600 MPa) on ascospores of the mold *Talaromyces avellaneus* in apple juice (pH 3.45) and found approximately 1.5 and 2.0 log reductions after 20 and 60 min of treatment, respectively, when 600 MPa and 17 °C were applied. These

researchers showed higher log reduction of the ascospores happened in the first few minutes of the process, followed by a considerable decrease of the inactivation rate after 20 min of the treatment. Margosch et al. (2006), studying the effects of combined pressure (0.1 to 1,400 MPa) and temperature (70 to 120 °C) treatments on the *Clostridium botulinum* spores inactivation observed a strong tailing for pressurized samples at 100 °C, 110 °C and 120 °C. These researchers pointed out that inactivation curves with tail formation indicate a small fraction of the spore population may be extremely resistant to pressure (Margosch et al., 2006).

One unique aspect of the behaviour of *B. coagulans* spores in tomato pulp observed in our study was the distinct change in the shape of the nonlinear curve, depending upon the pressures used. At both 50 and 60 °C a shift in the inactivation kinetics was observed between 450 and 500 MPa. At 450 MPa and below, the $k_{\max 2}$ was quite pronounced, while at pressures of 500 MPa and above the difference in the kinetics between the first and second specific inactivation rate was less pronounced. Similarly, Wang et al. (2009) found considerable reduction in spore viability when pressure increased from 400 to 600 MPa, at the same initial temperature when studying the combined effect of high pressure and moderate heat on the inactivation of *B. coagulans* spores in phosphate buffer and whole milk. In any case, it is clear that the causes and mechanisms related to tailing are still not well understood and deserve further study (Peleg and Cole, 2000; Van Boekel, 2002; Margosch et al., 2006).

The HHP treatments at high pressures showed a remarkable difference in the inactivation kinetics when the process temperature changed from 50 to 60 °C, showing a strong temperature dependence in the inactivation of *B. coagulans* spores in tomato pulp when combined with pressure. Vercammen et al. (2012) analysed the inactivation of *B. coagulans* spores in tomato sauce (pH 4.2 and 5.0) and buffers (pH 4.0, 5.0 and 7.0). The authors found that none of the treatments in buffers at 40 °C caused any significant inactivation, except at 800 MPa in pH 4.0 buffer were close to 1 log inactivation; and the results of the treatments in tomato sauce at 40 °C were similar as in buffer. When HHP treatment was conducted at 60 °C in tomato sauce (pH 4.2) the inactivation resulted in up to 2.0 log reductions.

Secondary model were used here to describe the relationship between pressure and the inactivation parameters f , $k_{\max 1}$ and $k_{\max 2}$ of *B. coagulans* spores in tomato pulp. Other researchers have also used

secondary model for the effect of HHP and temperature on microbial inactivation. Osman (2009) has also used Arrhenius model to analyse the relationship between pressure and the parameters of modified Gompertz model on the inactivation of *Salmonella typhimurium* under HHP (200 to 350 MPa) at different temperatures (15 to 45 °C) in tryptone soy broth.

B. coagulans is a spore-forming bacterium able to survive and germinate in acidic foods, with the potential to cause potentially large economic losses to the food industry. The behaviour of its spores must be considered in the design of processing systems for acidic foods. Research here and elsewhere has shown that HHP treatment has promise for the control of *B. coagulans* and other spore-forming organisms. The research presented here shows that the combination of HHP at moderate temperatures can inactivate significant quantities of *B. coagulans* spores in tomato pulp products. The application of HPP should be considered by the food industry as one means to insure the microbiological and organoleptic quality of their products.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Mukund V. Karwe for kindly allowing the use of the HHP unit for this study as well his entire laboratory group support, in particular Meenakshi Khurana and Tanya D'Souza for their great help. Morgana Zimmermann gratefully acknowledges the financial support provided by the Capes Foundation (Brazil).

References

- Ahn, J., Balasubramaniam, V.M., and Yousef, A.E. (2007) Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. *Int J Food Microbiol* **113**, 321-329.
- Ananta, E., Heinz, V., Schlüter, O., and Knorr, D. (2001) Kinetic studies on high pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, **2**, 261-272.
- Brackett, R.E. (2001) Fruits, vegetables, and grains. In *Food microbiology, fundamentals and frontiers* ed. Doyle, M. P. Beuchat, L. R., and Montville, T. J. pp. 127–138. Washington, DC: ASM Press.

- Cheftel, J. C. (1992) Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In High Pressure Biotechnology ed. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., and Masson, P. pp. 195-205. London: John Libbey and Co. Ltd.
- Cléry-Barraud, C., Gaubert, A., Masson, P., and Vidal, D. (2004) Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Appl Environ Microbiol* **70**, 635-637.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N.A., and DeVos, P. (2004). Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Syst Appl Microbiol* **27**, 50-60.
- Doona, C.J., Feeherry, F.E., and Ross, E.W. (2005) A quasi-chemical model for the growth and death of microorganisms in foods by non-thermal and high-pressure processing. *Int J Food Microbiol* **100**, 21-32.
- Gao, Y., Wang, Y., and Jiang, H. (2005) Effect of high pressure and mild heat on *Staphylococcus aureus* in milk using response surface methodology. *Process Biochem* **40**, 1849-1854.
- García, M.T., Ben Omar, N., Lucas, R., Pérez-Pulido, R., Castro, A., Grande, M.J., Martínez-Cañamero, M., and Gálvez, A. (2003) Antimicrobial activity of enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiol* **20**, 533-536.
- Hendrickson, D.A., Krenz, M.M. (1991) Reagents and Stains. In Manual of Clinical Microbiology ed. Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L.Jr., Isenberg, H.D., and Shadomy, H.J. pp. 1289-1314, 5th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T., and Bover-Cid, S. (2011) Modelling the high pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* on cooked ham. 7th International Conference on Predictive Modelling of Food Quality and Safety - 7ICPMF, pp. 182-185, September, 12-15th, Dublin, Ireland.
- Islam, M.S., Inoue, A., Igura, N., Shimoda, M., and Hayakawa, I. (2006) Inactivation of *Bacillus* spores by the combination of moderate heat and low hydrostatic pressure in ketchup and potage. *Int J Food Microbiol* **107**, 124-130.
- Khurana, M., and Karwe, M.V. (2009) Numerical Prediction of Temperature Distribution and Measurement of Temperature in a High Hydrostatic Pressure Food Processor. *Food Bioprocess Tech* **2**, 279-290.

- Koseki, S., and Yamamoto, K. (2007) A novel approach to predicting microbial inactivation kinetics during high pressure processing. *Int J Food Microbiol* **116**, 275-282.
- Lucas, R., Grande, M.J., Abriouel, H., Maqueda, M., Ben Omar, N., Valdivia, E., Martínez-Cafamero, M., and Gálvez, A. (2006) Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem Toxicol* **44**, 1774-1781.
- Margosch, D., Ehrmann, M.A., Buckow, R., Heinz, V., Vogel, R.F., and Gänzle, M.G. (2006) High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3476-3481.
- Osman, E. (2009) Mathematical modeling of *Salmonella typhimurium* inactivation under high hydrostatic pressure at different temperatures. *Food Bioprod Process* **87**, 68-73.
- Pacheco, C.P., and Massaguer, P.R. (2004) Biological validation of tomato pulp continuous heat process. *J Food Process Engin* **27**, 449-463.
- Pacheco, C.P., Silva, A. R., and Massaguer, P.R. (2011) Modeling inactivation of *Leuconostoc mesenteroides* in dextran added to dairy ingredients 7th International Conference on Predictive Modelling of Food Quality and Safety - 7ICPMF, pp. 461-464, September, 12-15th, Dublin, Ireland.
- Palop A., Raso J., Pagán, R., Condón, S., and Sala, F.J. (1999) Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *Int J Food Microbiol* **46**, 243-249.
- Peleg, M., and Cole, M.B. (2000) Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatment. *J Food Prot* **63**, 190-195.
- Pilavtepe-Çelik, M., Buzrul, S., Alpas, H., and Bozoglu, F. (2009) Development of a new mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure in carrot juice and peptone water. *J Food Eng* **90**, 388-394.
- Rodrigo, M., Martínez, A., Sanchis, J., Trama, J., and Giner, V. (1990) Determination of hot-fill-hold-cool process specifications for crushed tomatoes. *J Food Sci* **55**, 1029-1032.
- San Martín, M.F., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. (2002) Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci Nutr* **42**, 627-645.

- Van Boekel, M.A.J.S. (2002) On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int J Food Microbiol* **74**, 139-159.
- Van Derlinden, E., Boons, K., and Van Impe, J.F. (2011) *Escherichia coli* population heterogeneity: Subpopulation dynamics at super-optimal temperatures. *Food Microbiol* **28**, 667-677.
- Vercammen, A., Vivijs, B., Lurquin, I., and Michiels, W. (2012) Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *Int J Food Microbiol* **152**, 162 - 167
- Voldrich, M., Dobiás, J., Tichá, L., Cerovský, M., and Krátká, J. (2004) Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. *J Food Eng* **61**, 541-543.
- Wang, B.S., Li, B.S., Zeng, Q.X., Huang, J., Ruan, Z., Zhu, Z.W., and Li, L. (2009) Inactivation kinetics and reduction of *Bacillus coagulans* spore by the combination of high pressure and moderate heat. *J Food Process Eng* **32**, 692-708.
- Wuytack, E.Y., and Michiels, C.W. (2001) A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. *Int J Food Microbiol* **64**, 333-341.

4.5.2. Resultados complementares

A escolha dos modelos secundários que melhor descreveram a influência da pressão nos parâmetros primários de inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate foi baseada nos valores de r^2 , obtidos pelo ajuste dos cinco modelos, como apresentado na Tabela 4.7. O parâmetro f foi considerado constante para ambas as temperaturas de estudo.

Tabela 4.7. Coeficientes de determinação (r^2) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários para descreverem a influência da pressão nos parâmetros $k_{\max 1}$ e $k_{\max 2}$ da inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate.

| Modelo | Coeficiente de correlação - r^2 | | | |
|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 50 °C | | 60 °C | |
| | $k_{\max 1}$ (min ⁻¹) | $k_{\max 2}$ (min ⁻¹) | $k_{\max 1}$ (min ⁻¹) | $k_{\max 2}$ (min ⁻¹) |
| Arrhenius | 0,567 | 0,767 | 0,905 | 0,830 |
| Raiz Quadrada | 0,370 | 0,825 | 0,940 | 0,922 |
| Linear | 0,338 | 0,805 | 0,926 | 0,895 |
| Exponencial | 0,400 | 0,852 | 0,949 | 0,932 |
| Potência | 0,487 | 0,821 | 0,939 | 0,892 |

Como observado na Tabela 4.7, o modelo Tipo Arrhenius apresentou o maior r^2 para $k_{\max 1}$ à temperatura de 50 °C. Para o parâmetro $k_{\max 2}$ a 50 °C e os parâmetros $k_{\max 1}$ e $k_{\max 2}$ a 60 °C, o modelo Exponencial apresentou maiores valores de r^2 .

O ajuste dos modelos secundários selecionados descrevendo a influência da variação da pressão sobre os parâmetros $k_{\max 1}$ e $k_{\max 2}$, para ambas as temperaturas estudadas na inativação de esporos de *B. coagulans* está apresentado na Figura 4.11.

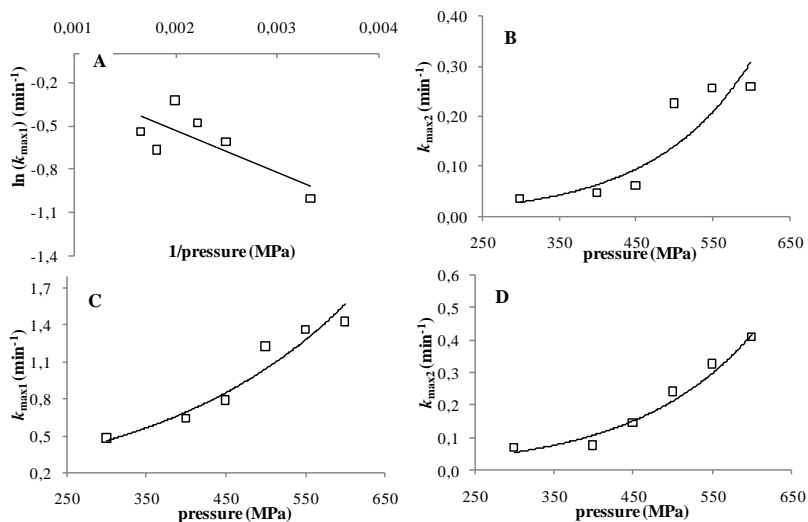


Figura 4.11. Ajuste dos modelos secundários descrevendo a influência da pressão sobre os parâmetros do modelo primário. A – Tipo Arrhenius para $k_{\max 1}$ a 50°C ; B – Exponencial para $k_{\max 2}$ a 50°C ; C – Exponencial para $k_{\max 1}$ a 60°C ; D – Exponencial para $k_{\max 2}$ a 60°C . As curvas contínuas () representam o ajuste do modelo e pontos (□) são os dados experimentais.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Através deste estudo, que teve como objetivo geral determinar a resistência de esporos de *Byssoschlamys fulva* IOC 4518 e *Bacillus coagulans* ATCC 7050, utilizando polpa de tomate comercial como meio de aquecimento, sob condições isotérmicas, não isotérmicas e de altas pressões hidrostáticas, foi possível concluir:

- A idade dos esporos e a temperatura de incubação de *B. coagulans* não influenciaram estatisticamente ($p > 0,05$) a termorresistência desta bactéria. Porém, a idade de esporos de *B. fulva* influenciou estatisticamente ($p < 0,05$) a termorresistência deste fungo. Entretanto, o tempo em que os esporos de *B. fulva* permanecem no ambiente influencia consideravelmente a sua termorresistência.
- Foram obtidos parâmetros de inativação de esporos de *B. fulva* e *B. coagulans* a partir do ajuste de diferentes modelos primários (Weibull, Bifásico, Gompertz-modificado e Ombro + log-linear) cuja seleção foi fundamentada em parâmetros estatísticos adequados, conforme a cinética da curva de sobreviventes obtida em cada estudo (aquecimento e/ou alta pressão).
- A resistência térmica de esporos de *B. fulva* e *B. coagulans* não foi estatisticamente influenciada ($p > 0,05$) pelo teor de sólidos solúveis da polpa de tomate, dentro da faixa analisada (4 e 10 °Brix). Porém, como esperado, a temperatura de aquecimento apresentou influência estatística ($p < 0,05$) nos parâmetros do modelo de inativação para *B. coagulans* (95 a 105 °C) e *B. fulva* (90 a 100 °C) dentro das faixas de temperatura analisadas.
- A comparação da cinética de inativação térmica de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate 4 °Brix, quando as metodologias dos tubos TDT e capilar foram usadas, mostrou que a cinética de inativação térmica deste microrganismo depende da metodologia empregada para a sua determinação.
- A influência da temperatura e da pressão hidrostática sobre o processo de inativação de esporos de *B. fulva* e *B. coagulans* foi adequadamente descrita pelos modelos secundários da Raiz Quadrada e Tipo Arrhenius e pelo modelo empírico Exponencial, servindo para estimar os parâmetros primários de inativação microbiana, considerando as faixas de temperatura e de pressão hidrostática analisadas.

- A metodologia proposta por Peleg e Penchina (2000) para modelos não isotérmicos utilizada para prever a inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate, usando o método do tubo capilar, mostrou que o modelo não isotérmico empregado pode ser utilizado para prever a inativação dos esporos desta bactéria sob condições não isotérmicas, considerando a faixa de temperatura analisada (95 a 105 °C).
- O uso da alta pressão hidrostática combinada com temperatura mostrou ser efetivo na inativação de esporos de *B. coagulans* em polpa de tomate, evidenciando que a aplicação desta nova tecnologia deve ser considerada pela indústria para conservar a qualidade microbiológica do produto além de ser uma tecnologia conhecida por preservar as qualidades organolépticas do mesmo.

Este trabalho traz importantes contribuições para a indústria processadora de produtos à base de tomate, fornecendo dados que contribuirão para a melhoria dos processos de qualidade aplicados na indústria, a fim de prolongar a vida útil dos alimentos bem como manter a segurança dos mesmos frente a microrganismos termorresistentes e grandes responsáveis pela contaminação de produtos ácidos enlatados.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWA, I. A.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canadian Medical Association Journal**, v.163, p.739-744, 2000.

AHN, J.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; YOUSEF, A. E. Inactivation kinetics of selected aerobic and anaerobic bacterial spores by pressure-assisted thermal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 321-329, 2007.

ALCOCK, S. J.; BROWN, K. L. **Heat resistance of P.A. 3679 (NCIB 8053) and other isolated of *Clostridium sporogenes***. In: DRING, G. J.; GOULD, G. W.; ELLAR, D. J. Fundamental and applied aspects of bacterial spores. Academic Press, p. 61-73, 1985. London, UK.

AL-HOLY, M.; QUINDE, Z.; GUAN, D.; TANG, J.; RASCO, B. Thermal inactivation of *Listeria innocua* in salmon (*Oncorhynchus keta*) caviar using conventional glass and novel aluminum thermal-death-time tubes. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 2, p. 383-386, 2004.

ANDERSON, R. E. Growth and corresponding elevation of tomato juice pH by *Bacillus coagulans*. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 2, p. 647-649, 1984.

ARAGÃO, G. M. F. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango**. Campinas, SP, 1989, 139 pp. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

ARAGAO, G. M. F.; CORRADINI, M. G.; NORMAND, M. D.; PELEG, M. Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 243-257, 2007.

- ATRIH, A.; FOSTER, S. J. Bacterial endospores are the ultimate survivors. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 217–233, 2002.
- AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 584-602, 2007.
- BAGLIONI, F.; GUMERATO, H. F.; MASSAGUER, P. R. Ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, 1999.
- BARBOSA-CANOVAS, G. V.; POTHAKAMURY, U. R.; PALOU, E.; SWANSON, B. G. **Nonthermal preservation of foods**. Marcel Dekker, 1998. New York, USA.
- BARRINGER, S.; **Frozen tomatoes**. In: HUI, Y.; GHAZALA, S.; GRAHAM, D. (Eds.), *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*. Marcel Dekker, INC, p. 293-308, 2004. New York, USA.
- BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssoschlamys spp.* and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v. 25, p. 237-289, 1979.
- BIGELOW, W. D.; BOHART, G. S.; RICHARDSON, A. C.; BALL, C. O. **Heat Penetration in Processing Canned Foods** Bulletin 16-L, 1920. National Canners Association, Research Laboratory, Washington, DC.
- BISHOP, R. H.; DUNCAN, C. L.; EVANCHO, G. M.; YOUNG, H. Estimation of fungal contamination in tomato products by a chemical assay for chitin. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 437-444, 1982.
- BRACKETT, R. E. Fruits, vegetables, and grains. In: DOYLE, M.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. ASM Press, p. 1 27-138, 2001. Washington, DC, USA.

- BRUL, S.; MENSONIDES, F. I. C.; HELLINGWERF, K. J.; MATTOS, M. J. T. Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 16–2, 2008.
- CAMARGO, F. P.; ALVES, H. S.; CAMARGO FILHO, W. P.; NIRLENE; VILELA, J. **Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas**. Informações Econômicas - SP. v.36, n.11, 2006.
- CAMPOS, F. P.; DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Techonology**, v. 6,n. 2, p. 351-357, 2003.
- CAUSSE, M.; BURET, M.; ROBINI, K.; VERSCHAVE, P. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2342-2350, 2003.
- CAYRÈ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. **Modelo dinámico para el crecimiento de bacterias lácticas sobre emulsiones cárnicas**. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: E-072, 2004. Universidad Nacional del Nordeste, Chaco, ARG.
- CERF, O. Tailing of survival curves of bacterial spores – a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 42, p. 1-19, 1977.
- CEVIZ, G.; TULEK, Y.; CON, A. H. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different heating media. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1770-1777, 2009.
- CHEFTEL, J. C. **Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview**. In: BALNY, C.; HAYASHI, R.; HEREMANS, K.; MASSON, P. (Eds.), High Pressure Biotechnology, Colloque INSERM. John Libbey and Co. Ltd., London, p. 195-205, 1992.

- CHUNG, H. J.; BIRLA, S. L.; TANG, J. Performance evaluation of aluminum test cell designed for determining the heat resistance of bacterial spores in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1351-1359, 2008.
- CLARK, J. P. High pressure processing research continues. **Food Technology**, v. 60, p. 64-65, 2006.
- CLÉRY-BARRAUD, C.; GAUBERT, A.; MASSON, P.; VIDAL, D. Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 635-637, 2004.
- CONCINA, I.; FALASCONI, M.; GOBBI, E.; BIANCHI, F.; MUSCI, M.; MATTAROZZI, M.; PARDO, M.; MANGIA, A.; CARERI, M.; SBERVEGLIERI, G. Early detection of microbial contamination in processed tomatoes by electronic nose. **Food Control**, v. 20, p. 873-880, 2009.
- CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 187-200, 2005.
- CORRADINI, M. G.; NORMAND, M. D.; PELEG M. Calculating the efficacy of heat sterilization processes. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 59-69, 2005.
- DANTIGNY, P.; NANGUY, S. P. M. Significance of the physiological state of fungal spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 16-20, 2009.
- De CLERCK, E., RODRIGUEZ-DIAZ, M., FORSYTH, G., LEBBE, L., LOGAN, N.A. and DE VOS, P. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 50-60, 2004.
- De VECCHI, E.; DRAGO, L. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabelling? **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 1, p. 3-10, 2006.

- DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. Concentration of predict carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 105-113, 1998.
- DIKTERHUIS, J.; TEUNISSEN, P. G. M. Dormant ascospores of *Talaromyces macrosporus* are activated to germinate after treatment with ultra high pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 162-169, 2004.
- ELLINGER, S.; ELLINGER, J.; STEHLE, P. Tomatoes, tomato products and lycopene in the prevention of a prostate cancer: do we have the evidence from intervention. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 9, 722-727, 2006.
- EMBRAPA. **Cultivo de tomate para industrialização**. Embrapa Hortaliças, Sistemas de produção 1^a - 2^a edição, Dez. 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em 19 abr. 2010.
- ENGEL, G.; TEUBER, M. Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 225-234, 1991.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Yearbook 2009**. Disponível em: <<http://fao.org>>. Acesso em 19 abr. 2010.
- FERREIRA, E. H. R.; ROSENTHAL, A; CALADO, V.; SARAIVA, J.; MENDO, S. *Byssochlamys nivea* inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 664-669, 2009.
- FIELDS, M. L.; ZAMORA, A. F.; BRADSHER, M. Microbiological analysis of home- canned tomatoes and green beans. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 931-934, 1977.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Novo manual de olericultura, 2 ed., 412 pp., 2001. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- FULLADOSA, E.; SALA, X.; GOU, P.; GARRIGA, M.; ARNAU, J. K-lactate and high pressure effects on the safety and quality of restructured hams. **Meat Science**, v. 91, p. 56-61, 2012.
- GARCIA, D.; VAN DER VOORT, M.; ABEE, T. Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 146–153, 2010.
- GEERAERD, A. H.; HERREMANS, C. H.; VAN IMPE, J. F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 185-209, 2000.
- GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, J. F.; VAN IMPE, J. F. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 95-105, 2005.
- GHANI, A. G. A.; FARID, M. M.; CHEN, X. D.; RICHARDS, P. Thermal sterilization of canned food in a 3-D pouch using computational fluid dynamics. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 147-156, 2001.
- GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 101-110, 1998.
- GIL, M. M.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 89-94, 2006.
- GIL, M. M.; MILLER, F. A.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. On the use of the Gompertz model to predict microbial thermal inactivation under isothermal and non-isothermal conditions. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p. 17-25, 2011.

- GIOVANNUCCI, E. Tomato products, lycopene, and prostate cancer: a review of the epidemiological literature. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 2030S-2031S, 2005.
- GONZÁLEZ, L.; LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, S., BERNARDO, A.; GONZALES, J. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 81–84, 1999.
- HAMMER, B. W. Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. **Iowa Agricultural Experiment Station Research Bulletin**, v. 19, p. 119-131, 1915.
- HENDRICKSON, D. A.; KRENZ, M. M. **Reagents and Stains**. In Balows, A, HAUSLER, W. J.; HERRMANN, K. L. JR.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 5 ed., p. 1289-1314, 1991. American Society for Microbiology. Washington, DC, USA.
- HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Moulds. In: Moir, C. J.; Andrew-Kabilafkas, C.; Arnold, G.; Cox, B. M.; Hocking, A. D.; Jenson, I. **Spoilage of Processed Foods: Causes and Diagnosis**. AIFST Inc. (NSW Branch) Food Microbiology Group, Australia, p. 361–381, 2001.
- HOROWITZ-WLASSOWA, L. M.; NOWOTELNOW, N. W. Über eine sporogenes Milchsäurebakterienart, *Lactobacillus sporogenes* n. sp. **Zentralb. F. Bakt. II Abt.**, v. 87, p. 331, 1932.
- HUANG, L. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 380-387, 2009.
- ICIEK, J.; PAPIEWSKA, A.; MOLSKA, M. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 406-410, 2006.
- JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive microbiology: a review. **Biocontrol Science**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2003.

- JORDAN, S. L.; PASCUAL, C.; BRACEY, E.; MACKEY, B. M. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 463-469, 2001.
- KAUR, D.; WANI, A. A.; OBEROI, D. P. S.; SOGI, D. S. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 108, p. 711-718, 2008.
- KHURANA, M.; KARWE, M. V. Numerical prediction of temperature distribution and measurement of temperature in a high hydrostatic pressure food processor. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, p. 279-290, 2009.
- KIKOKU, Y.; TAGASHIRA, N.; NAKANO, H. Heat resistance of fungi isolated from frozen blueberries. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 10, p. 2030-2035, 2008.
- KING JÚNIOR, A. D.; WHITEHAND, L. C. Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 830-836, 1990.
- KOSEKI, S.; YAMAMOTO, K. A novel approach to predicting microbial inactivation kinetics during high pressure processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 275-282, 2007.
- KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from tomato paste. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 410-413, 1997.
- KOUTSOUMANIS, K. Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1821-1829, 2001.
- LAROCHE, C.; FINE, F.; GERVAIS, P. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 307-315, 2005.

- LEÓN-SÁNCHEZ, F. D.; PELAYO-ZALDÍVAR, C.; RIVERA-CABRERA, F.; PONCE-VALADEZ, M.; ÁVILA-ALEJANDRE, X.; FERNÁNDEZ, F. J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; PÉREZ-FLORES, L. J. Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 54, p. 93-100, 2009.
- LUCAS, R.; GRANDE, M. J.; ABRIOUEL, H.; MAQUEDA, M.; BEN OMAR, N.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-CANÁMERO, M.; GÁLVEZ, A. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1774-1781, 2006.
- MAFART, P. Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 239-251, 2005.
- MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 107-113, 2002.
- MALDONADO, M. C.; BELFIORE, E. C.; NAVARRO, E. A. R. Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 141-144, 2008.
- MALLIDIS, C. G.; DRIZOU, D. Effect of simultaneous application of heat and pressure on the survival of bacterial spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 285-288, 1991.
- MALLIDIS, C. G.; FRANTZESKAKIS, P.; BALATSOURAS, G.; KATSABOTXAKIS, C. Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 25, p. 442-448, 1990.

- MARGOSCH, D.; EHRMANN, M. A.; BUCKOW, R.; HEINZ, V.; VOGEL, R. F.; GÄNZLE, M. G. High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p.3476-3481, 2006.
- MATOS, A. V.; ROSENTHAL, A.; COSTA, S. D. O.; BONNET, A. A.; FARIAS, A. X.; MASSAGUER, P. R.; PACHECO, C. P. P. **Quantificação de fungos de elevada e baixa termorresistência em linha de “esterilização comercial” e envase asséptico de suco de maracujá.** Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2002; XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura; Belém; Brasil. Meio digital.
- McCLURE, P. J.; BLACKBURN, C.; COLE, W.; CURTIS, M. B. JONES, P. S.; LEGAN, J. E.; OGDEN, J. D.; PECK, K. M. W.; ROBERTS, T. A.; SUTHERLAND, J. P.; WALKER, S. J. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food MicroModel Approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.265-275, 1994.
- McKELLAR, R. C.; LU, X. **Modeling Microbial Responses in Food.** CRC Series in Contemporary Food Science, Boca Raton, 1. ed., 2004. Washington, DC, USA.
- McMEEKIN, T. A.; BARANYI, J.; BOWMAN, J.; DALGAARD, P.; KIRK, M.; ROSS, T.; SCHMID, S.; ZWIETERING, M. H. Information systems in food safety management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 181–194, 2006.
- McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a Knowledge-based framework or change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 133-153, 2002.
- McMEEKIN, T.; BOWMAN, J.; McQUESTIN, O.; MELLEFONT, L., ROSS, T.; TAMPLIN, M. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 2-9, 2008.

- MILLER, F. A.; RAMOS, B.; GIL, M. M.; BRANDÃO, T. R. S.; TEIXEIRA, P.; SILVA, C. L. M. Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 121-128, 2009a.
- MILLER, F. A.; GIL, M. M.; BRANDÃO, T. R. S.; TEIXEIRA, P.; SILVA, C. L. M. Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: Influence of strain and growth phase. **Food Control**, v. 20, p. 1151-1157, 2009b.
- MINAMI, K; FONSECA, H. **Tomate: Produção Pré-Processamento e Transformações Agroindustrial**, FEALQ, 1982. Piracicaba, SP.
- MIORELLI, S. **Determinação dos parâmetros de resistência térmica de micro-organismos contaminantes de alimentos ácidos**. 1 v. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis – Santa Catarina, 2009.
- MORALES, H.; MARÍN, S.; CENTELLES, X.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical control point for patulin accumulation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 260–265, 2007.
- NAKAYAMA, A.; YANO, Y.; KOBAYASHI, S.; ISHIKAWA, M.; SAKAI, K. Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3897-3900, 1996.
- OLLIVER, M.; RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. studies on *Byssoschlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of Society Chem. Ind.**, v. 53, p. 166T, 1934.
- PACHECO, C. P.; MASSAGUER, P. R. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. **Journal of Food Process Engineering**, v. 27, p. 449–463, 2004.

- PALOP, A.; SALA, F. J.; CONDÓN, S. Heat resistance of native and demineralized spores of *B. subtilis* sporulated at different temperatures. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1316-1319, 1999.
- PELEG, M. **Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation**. Boca Raton: Taylor & Francis, 417p., 2006. ISBN 0849336457.
- PELEG, M. Calculation of the non-isothermal inactivation patterns of microbes having sigmoidal isothermal semi-logarithmic survival curves. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 645-658, 2003.
- PELEG, M.; PENCHINA, C. M. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 159-172, 2000.
- PELEG, M; COLE; M. B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Critical Review Food Science**, v. 38, p. 353-380, 1998.
- PERIAGO, P. M.; FERNÁNDEZ, P. S.; OCIO, M. J.; MARTÍNEZ, A. A predictive model to describe sensitization of heat treated *Bacillus stearothermophilus* spores to NaCl. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A**, v. 206, p. 58-62, 1998.
- PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D.; JESENSKÁ, Z. Heat resistant fungi isolated from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 22, p. 297-299, 1994.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2 ed., 1999. Maryland: Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD, USA.
- PRIEST, F. G. **Systematics and ecology of Bacillus**. In: HOCH, J. A.; LOSICK, R. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. ASM Press, 1993. Washington, DC, USA.

- PSOMAS, A. N.; NYCHAS, G. J.; HAROUTOUNIAN, S. A.; SKANDAMIS, P. N. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 76, p. 119-129, 2011.
- PUEL, O.; TADRIST, S.; DELAFORGE, M.; OSWALD, I. P.; LEBRIHI, A. The inability of *Byssoschlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoepoxydon dehydrogenase genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 131-139, 2007.
- RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S. Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 337-340, 1996.
- RASO, J.; PALOP, A.; BAYARTE, M.; CONDÓN, S.; SALA, F. Influence of sporulation on the heat resistance of a strain of *B. licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). **Food Microbiology**, v. 12, p. 357-361, 1995.
- ROBERTS, C. M.; HOOVER, D. G. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 363-368, 1996.
- ROCA, M. G. G. **Valorização do tomate nacional. Extracção de licopeno por CO₂ supercrítico a partir de repiso de tomate.** 1 v. Dissertação (mestrado), - Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa – Portugal, 2009.
- ROSS, A. I. V.; GRIFFITH, M. W.; MITTAL, G. S.; DEETH, H. C. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 125-138, 2003.

- ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 241-264, 1994.
- SALLEH-MACK, S. Z.; ROBERTS, J. S. Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 323-329, 2007.
- SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 116-121, 2008.
- SALOMÃO, B. C. M.; MÜLLER, C.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Aplicação de dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético para redução de esporos de *Penicillium expansum*, *Byssochlamys fulva* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* na superfície de maçãs e em soluções aquosas. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 2, p. 219-230, 2011.
- SAN MARTÍN, M. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Food processing by high hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 46, 627-645, 2002.
- SANT'ANA, A. S.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 197-209, 2009.
- SATO, G. S. **Uma análise da estrutura de mercado de derivados de tomate no Brasil**. In: Palestra sobre semana do administrador - SEMAD, v. 25, 2005, Universidade Estadual de Maringá, PR.
- SCHAFFNER, D. W.; LABUZA, T. P. Predictive microbiology: where are we and where are we going? **Food Technology**, v. 51, p. 95-99, 1997.

- SILVA, F. M.; GIBBS, P.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 95-103, 1999.
- SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. X. **Tomate para processamento industrial**. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. Brasília, DF.
- SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. Factors affecting the thermal inactivation of *Neosartorya fisheri* in pineapple and papaya nectars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 312-316, 2006.
- SLONGO, A. P.; MIORELLI, S.; ARAGÃO, G. M. F. Influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fisheri* em suco de mamão. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 377-387, 2005.
- SMELT, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p.152-158, 2002.
- SOYSAL, Ç.; SÖYLEMEZ, Z.; BOZOGLU, F. Effect of high hydrostatic pressure and temperature on carrot peroxidase inactivation. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 152-156, 2004.
- SPLITTSTOESSER, D. F.; CHUREY, J. J.; LEE, C. Y. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacteria isolated from fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 7, p. 1080-1083, 1994.
- SPOTTI, E.; QUINTARALLA, S.; MUTTI, P. Contaminazione da spore fungine termoresistenti di frutta, pomodoro e loro derivati. **Industria Conserve**, v. 67, p. 421-425, 1992.

- STECCHINI, M. L.; SPAZIANI, M.; DEL TORRE, M.; PACOR, S. *Bacillus cereus* cell and spore properties as influenced by the micro-structure of the medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1838-1848, 2009.
- STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing**. 2 ed., 1973. Academic Press, New York, NY, USA.
- TANIWAKI, M. H.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; FLEET, G. H. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 100-108, 2009.
- THAKUR, B. R.; SINGH, R. K. Combination processes in food irradiation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 7-10, 1995.
- TOURNAS, V. Heat resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v. 20, p. 243-263, 1994.
- TOURNAS, V.; TRAXLER, R. W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 814-816, 1994.
- VALDRAMIDIS, V. P.; GEERAERD, A. H.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J. F. Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: The case of microbial heat resistance induction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 80-87, 2006.
- VAN BOEKEL, M. A. J. S. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 139-159, 2002.
- VAN IMPE, J. F.; BART, M. N.; SCHELLEKENS, M.; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. A. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 227-249, 1995.

- VAN ZUIJLEN, A.; PERIAGO, P. M.; AMÉZQUITA, A.; PALOP, A.; BRUL, S.; FERNÁNDEZ, P. S. Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilization. **Food Research International**, v. 43, p. 1895-1901, 2010.
- VERCAMMEN, A.; VIVIJS, B.; LURQUIN, I.; MICHIELS, C. W. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 162-167, 2012.
- WHITE, L. S. Spoilage bacteria in tomato products. **Journal of Food Science**, v. 16, p. 1-6, 1951.
- WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A. Classification of Models for Predictive Microbiology. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175-177, 1993.
- YILMAZ, E. The chemistry of fresh tomato flavor. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**., v. 25, p. 149-155, 2001.
- ZIMMERMANN, M.; MIORELLI, S.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Growth of *Byssoschlamys nivea* in pineapple juice under the effect of water activity and ascospore age. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 203-210, 2011a.
- ZIMMERMANN, M.; MIORELLI, S.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 239-243, 2011b.