



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS MEDIANTE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Alumno/a: Martínez Callejón, Ana

Tutor/a: Elena Ortega Morente y Rubén
Pérez Pulido

Dpto: Ciencias de la Salud

Julio, 2021

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Nuevas técnicas para el control de patógenos en alimentos	8
1.2 Procesado de alimentos por Altas Presiones Hidrostáticas.....	10
1.2.1 Ventajas, inconvenientes y limitaciones de la APH.....	11
1.3 Funcionamiento del sistema APH.....	14
1.4 Efectos del tratamiento por APH a nivel biológico	16
1.5 Principales patógenos que se encuentran en alimentos.....	19
1.6 Inactivación de microorganismos.....	21
1.7 Aplicaciones de la técnica APH en alimentación.	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo General.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 Inactivation of leuconostocs in cherimoya pulp by high hydrostatic pressure treatments applied singly or in combination with enterocin AS- 48.....	29
4.2 Changes in microbial diversity of brined green asparagus upon treatment with high hydrostatic pressure	32

4.3 Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by high-hydrostatic pressure.....	37
4.4 Effect of high pressure processing on the survival of Salmonella Enteritidis and shelf-life of chicken fillets.....	41
5. DISCUSIÓN	47
6. CONCLUSIONES	57
7. BIBLIOGRAFÍA	58

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

APH: Alta Presión Hidrostática

EBI: Instituto Europeo de Bioinformática

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETA: Enfermedad transmitida por alimentos

DMSO: Dimetilsulfóxido

HHP: High Hydrostatic Pressure

HPP: High pressure processing

MID: Identificador multiplex

MRS: Man-Rogosa-Sharp

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

OTU: Unidades taxonómicas operativas

PCA: Análisis de componentes principales

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado

PMA: Monoazida de propidio

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico

SRA: Sequence Read Archive

TSA: Agar triptona de soja

RESUMEN

A lo largo de los años, el interés de los consumidores por los alimentos "frescos" y "naturales" ha aumentado considerablemente. Esto se debe a que la evolución social conlleva una consecuente evolución de la industria en la que además, con el mercado global, los productos se viajan desde unos países a otros. El problema es que muchos alimentos se procesan y conservan con aditivos y productos químicos, lo cual no está bien visto por los consumidores. Por tanto, la demanda de productos naturales hace necesaria la aplicación de nuevos métodos de conservación que no afecten a las características físicas y organolépticas de los productos. Uno de estos métodos es la conservación de alimentos por alta presión, capaz de conservar, con un procesamiento mínimo, las características organolépticas y nutricionales de los productos, proporcionando al consumidor alimentos microbiológicamente seguros, ya que este método puede inactivar microorganismos patógenos (forma vegetativa) que se encuentran en la superficie de los alimentos, sin un aumento significativo de la temperatura de los mismos. Sin embargo, sería interesante conocer un poco más sobre este método de procesamiento, por lo que el objetivo principal de este trabajo consistió en destacar mediante una revisión bibliográfica, los aspectos positivos de los métodos de conservación alimentaria mediante altas presiones hidrostáticas, aplicados en el tratamiento de distintos alimentos, en estudios recientes.

ABSTRACT

Throughout the years, consumer interest in " fresh " and " natural " foods has increased greatly. This is because the social evolution goes with industry evolution too and in fact with the global market, all the products are providing from many countries to anothers.The problem is that many foods are processed and preserved with additives and chemicals, which are not well seen by the consumers. Therefore, demand for natural products made neccesary to apply new methods which don't affect physical and organoleptic product characteristic. One of these methods is the preservation of food by high pressure, which be able to preserve, with minimal processing, products organoleptic and nutritional characteristics, providing the consumer microbiologically safe food, because this method can inactivates pathogenic microorganisms (vegetative form) which are on the surface of food, without significative temperature food increase. However, it would be interesting to find out a little more about this processing method, so the main objective of this work was to note, through a bibliographic review, positive aspects of food preservation by high hydrostatic pressures applied in different food treatment in recent studies.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el interés de la población sobre la conservación de los alimentos ha experimentado grandes cambios, tanto es así que las distintas técnicas de conservación alimentaria que se aplican hoy en día, quedan englobadas dentro del concepto de Biotecnología Alimentaria referenciando, principalmente al conocimiento sobre la conservación alimentaria así como la utilización de técnicas de manipulación genética (tanto en animales como en semillas vegetales), y al uso de determinados microorganismos en este ámbito, con el fin de obtener una mejora en la producción alimentaria, incluyéndose dentro de este campo, aquellos procesos industriales implementados en la actualidad con el fin de aumentar la productividad, variedad y eficacia necesarias en la obtención de los alimentos que consumimos a diario (Blanco *et al.*, 2006). Así mismo, el estilo de vida y hábitos alimenticios actuales, entre otros muchos factores, han fomentado el interés por el desarrollo de nuevas tecnologías implicadas en una mejor elaboración, conservación y control alimentario (Señorans *et al.*, 2006).

Algunas de las principales medidas a tener en cuenta, en cuanto a la conservación de alimentos están estrechamente relacionadas con la prolongación de la vida útil del producto, pudiendo destacar aquellas que le proporcionan calidad nutricional y seguridad microbiológica en mayor medida, siendo imprescindible controlar los microorganismos alterantes de los productos destinados al consumidor para así evitar brotes que afecten a grandes poblaciones (Morcillo *et al.*, 2011).

Además, cabe destacar que en los últimos años, se ha detectado un gran interés por parte del consumidor en este tipo de características de los productos que consumen, las cuales destacan por resaltar dichos alimentos, que se asemejan en su mayoría a aquellos alimentos frescos y libres de químicos así como de aditivos, tan reclamados por el consumidor (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre., 2010). Concretamente, los productos más demandados en la actualidad corresponden a alimentos funcionales o alimentos biológicamente activos (Velázquez *et al.*, 2005).

1.1. Nuevas técnicas para el control de patógenos en alimentos

Debido a ese afán presente en la población cuya finalidad se basa en consumir los alimentos lo más “frescos” posible, a lo largo de los años, han ido apareciendo nuevas técnicas de conservación, que se centran principalmente en preservar la calidad del alimento, utilizando en mayor medida procesos no térmicos, los cuales se están considerando como un proceso complementario de los métodos de conservación tradicionales, o bien como una alternativa al uso de los mismos (Considine *et al.*, 2008). Dentro de las técnicas más utilizadas, se pueden destacar las siguientes:

- **Irradiación:** Esta técnica implica la utilización de radiaciones ionizantes induciendo determinados cambios tanto físicos como químicos, observables a nivel celular (Raventós *et al.*, 2003): En la Industria Alimentaria, el término “irradiación” va referido principalmente a tratamientos en los cuales, determinados

alimentos son expuestos a la acción de radiaciones ionizantes durante un determinado periodo de tiempo (Herrero y Romero de Ávila, 2006).

- **Pulsos eléctricos de alta intensidad de campo:** En esta técnica, se induce la ruptura de la pared celular, debido a la utilización de alto voltaje durante un breve periodo de tiempo (Raventós et al., 2003): Es una alternativa prometedora a la pasteurización convencional y entre los alimentos en los cuales este tratamiento ha demostrado una mayor efectividad, se destacan la leche, el huevo líquido, los zumos de frutas y los extractos de productos cárnicos (Herrero y Romero de Ávila, 2006).
- **Pulsos de luz:** Esta técnica emplea el uso de pulsos de luz de alta intensidad, con el objetivo de eliminar los posibles microorganismos contaminantes presentes en la superficie de determinados alimentos (Raventós et al., 2003). Uno de los efectos de este tratamiento es la capacidad de inducir cambios fototérmicos, así también cambios fotoquímicos, los cuales dan lugar a cambios en el ADN, membranas celulares y sistemas enzimáticos y de reparación (Herrero y Romero de Ávila, 2006).
- **Altas presiones hidrostáticas:** Esta técnica se caracteriza por la transmisión por medio de un fluido de la presión, la cual viaja

instantáneamente y de forma uniforme a través de dicho fluido hasta llegar al alimento que se está procesando, induciendo consecuentemente en las células un cambio en la permeabilidad de las membranas celulares (Raventós et al., 2003). Además, el efecto de esta tecnología puede promover una reducción de la síntesis de ADN, así como la desnaturalización de biopolímeros y/o proteínas, induciendo de igual forma a la inactivación de reacciones al desnaturalizarse las enzimas implicadas en las mismas por cambios en su estructura intramolecular. Afectando todo lo anterior a la viabilidad de los microorganismos que se encuentran en la superficie de los alimentos y pueden dar lugar a contaminaciones alimentarias (Herrero y Romero de Ávila, 2006).

1.2. Procesado de alimentos por Altas Presiones Hidrostáticas

El tratamiento de alimentos por la técnica de Alta Presión Hidrostática (APH) o High Hydrostatic Pressure (HHP), permite la conservación de forma efectiva de los alimentos, de forma que se observen más “frescos” como demanda el consumidor, además permite preservar la calidad correspondiente al color, sabor y aroma del producto en comparación con las tecnologías térmicas (Oey et al., 2008; García-Parra, y Ramírez., 2019), así como evitar el crecimiento de microorganismos o esporas inactivándolos y aumentando, con la ayuda de la refrigeración o el calor moderado, la vida útil del producto, sin causar la disminución de los nutrientes y la pérdida de sabor que se produce con la implementación de los procesos térmicos para la

conservación de alimentos (Torres y Velázquez, 2005; Velázquez *et al.*, 2002).

El tratamiento de alimentos por APH se basa en someterlos a un alto nivel de presión hidrostática, concretamente se usan magnitudes de 100-1000 MPa, administrándose durante unos pocos minutos de forma continua (Herrero y Romero de Ávila., 2006), reduciendo de esta forma la carga microbiana y posibilitando por ende la preservación de las características organolépticas del producto de forma efectiva, mejorando así la calidad del mismo y alargando su vida útil, conservando además los parámetros de calidad del producto original ya que es posible realizar dicho procedimiento en condiciones de temperatura ambiente, sin alterar ni la composición ni la actividad biológica del producto (Velázquez *et al.*, 2005).

1.2.1. Ventajas, inconvenientes y limitaciones de la APH

Esta técnica se trata de una novedosa alternativa al uso de los métodos de conservación tradicional como ya se ha comentado previamente y, por tanto, es necesario destacar qué características favorables y no favorables la acompañan (Téllez-Luis *et al.*, 2001 y Cheftel, 1995):

Ventajas:

- No se produce la deformación del alimento, ya que la presión se transmite de forma constante y continua, impidiéndose la formación de gradientes.
- Se necesita muy poco tiempo para procesar un alimento, ya que esta técnica no influye ni el volumen de la muestra ni su forma.
- Se mantiene el sabor y el color original del alimento, ya que no se produce la reacción de Maillard debido a las altas presiones
- No se produce el deterioro de nutrientes termolábiles, ni la alteración de compuestos de bajo peso molecular, los cuales suelen ser los principales responsables tanto del aroma como del sabor del producto.
- Utiliza energía limpia, evitando la producción de residuos que alteren el medio ambiente y además su uso conlleva poco gasto energético en comparación con otras técnicas.
- No es necesario complementar este tratamiento con aditivos alimentarios.
- Preserva las propiedades funcionales en los alimentos tratados con esta técnica.
- Requiere una limpieza muy simple y flexible, ya que se procesan muchos alimentos a la vez.

Inconvenientes:

- El empleo de esta técnica necesita una maquinaria costosa.

- No se puede aplicar a algunas frutas o verduras ya que podría ocasionar la pérdida de su aspecto original.
- En ocasiones se produce la alteración de la textura o de las propiedades reológicas en algunos alimentos tratados con dicha técnica.
- Debido a la novedad de esta técnica, el consumidor puede rechazarla por no confiar plenamente en el tratamiento.

Limitaciones

- La sensibilidad que presentan las bacterias difiere en función de la especie de las mismas. Además, es posible encontrar células con daños subletales, lo cual induce a estrés celular y conlleva a la adaptación de estos microorganismos al tratamiento de forma que la manera más efectiva de evitar su proliferación es manteniendo el pH y la temperatura a un nivel bajo.
- El tratamiento continuado de un alimento a altas presiones ofreciendo una exposición alargada en el tiempo, puede ocasionar como consecuencia la proliferación de microorganismos resistentes en los alimentos procesados, induciendo su inminente contaminación.
- Aunque se puede evitar la proliferación de microorganismos con este tratamiento, es necesario destacar que este método no es eficaz con las endosporas bacterianas, en las que se ha observado una clara resistencia a este tratamiento, pudiendo por

tanto contaminar el alimento si no se aplican otros métodos complementarios.

1.3. Funcionamiento del sistema APH

La técnica de APH utilizada para el procesamiento de alimentos, se basa en dos principios básicos, que son el principio de *Le Chatelier* y el Principio Isostático (Téllez-Luis et al., 2001):

- **Principio de *Le Chatelier*:** Según este principio, cualquier fenómeno en el que se produce una reducción de volumen, induce como consecuencia un aumento en la presión. De igual forma, si lo que se aprecia es un aumento en la presión, se producirá la disminución del volumen de la muestra (Cano *et al.*, 2006). El principio sigue la siguiente ecuación:

$$\ln k_{\text{cinética}} = \ln k_0 - \Delta V^\ddagger \cdot \frac{P}{RT}$$

En la que k es la constante de la reacción y ΔV^\ddagger el volumen de activación (estableciendo la relación existente entre la variación de volumen y el complejo activado junto con los reactivos) (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

- **Principio Isostático:** También se conoce como la Ley de Pascal, la cual refiere que la aplicación de una presión externa a un fluido que se encuentra en una cámara cerrada, es capaz de

transmitirse uniformemente por toda la extensión de la muestra.
(Herrero y Romero de Ávila, 2006).

Actualmente existen distintos equipos para realizar el procesado de alimentos utilizando el sistema de APH, concretamente, desde el punto de vista industrial, el tratamiento de los alimentos por este método, es llevado a cabo por medio de un proceso discontinuo o semicontinuo (Kiera *et al.*, 2008). Los sistemas de presurización semicontinuos normalmente se utilizan para el tratamiento de aquellos productos líquidos que no están envasados. Por lo tanto, en este tipo de sistemas, la presión suele comunicarse directamente por medio de un pistón móvil, envasándose el producto de forma aséptica una vez finalizada la presurización del mismo (Herrero y Romero de Ávila, 2006).

Cabe destacar que mediante este procedimiento, la única forma de tratar los alimentos sólidos es por medio de lotes, sin embargo, cuando se trata de productos líquidos, éstos pueden ser tratados tanto por un proceso continuo como por uno semicontinuo (Hogan *et al.*, 2005).

No obstante, aunque a menudo se utilicen los sistemas mencionados anteriormente, el más utilizado a nivel industrial es el sistema discontinuo donde se coloca el alimento a procesar, en un recipiente estéril (normalmente se utiliza una película de polivinilo o también pueden usarse películas de alcohol de etileno y vinilo los cuales son plásticos utilizados para recobrar el volumen inicial una vez realizada la

compresión previniendo de esta forma las deformaciones irreversibles) el cual una vez sellado al vacío se procede a su introducción en una cámara de presurización, la cual queda sellada con el medio que transmite la presión ejercida durante el procesado (Herrero y Romero de Ávila, 2006).

A continuación, el medio que transmite la presión queda comprimido alrededor del alimento a procesar gracias a la aplicación de presión, induciéndose por ende la reducción del volumen del producto, la cual puede variar en función de la presión o temperatura que se aplique durante el procesado (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). Una vez terminado este proceso, se procede a la descompresión en la cámara y posteriormente el alimento ya procesado sale de la cámara para poder introducir uno nuevo que se someterá al mismo procedimiento, iniciando un nuevo ciclo (Casp y Abril, 2008).

1.4. Efectos del tratamiento por APH a nivel biológico

La aplicación de altas presiones induce cambios morfológicos tanto en las células eucariotas como en las bacterias, así como también provoca modificaciones tanto bioquímicas como genéticas, al inactivar determinadas enzimas implicadas en los procesos de replicación y transcripción de ADN celular (Herrero y Romero de Ávila, 2006). Concretamente, se ha apreciado una clara reducción de la síntesis de ADN provocada por la técnica APH, relacionándose dicha actividad con la inactivación enzimática implicada en dicha síntesis. Sin embargo,

también se ha observado que la estabilidad del ADN no se ve alterada, ya que los enlaces de hidrógeno no se rompen por altas presiones (Tellez-Luis *et al.*, 2001).

Los cambios morfológicos producidos por la aplicación de APH en las células o bacterias dan lugar a distintos efectos, ya que tienen lugar la compresión de las vacuolas y el alargamiento celular, lo cual da lugar a separación de membrana y pared celular, contrayéndose esta última, dando lugar a la formación de poros y filamentos, además también se han observado cambios a nivel del núcleo y los orgánulos, entre otros muchos efectos (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre., 2010).

No obstante, es conveniente destacar que una de las causas de la sensibilidad de los microorganismos alterantes o contaminantes de los alimentos ante este tratamiento reside en la riqueza en lípidos y proteínas que alberga la membrana celular de dichos microorganismos, por lo que siempre y cuando se aplique el tratamiento por altas presiones a una intensidad óptima o adecuada, deberían obtenerse unos buenos resultados en cuanto a inactivación de microorganismos contaminantes en los productos (Casp y Abril, 2008). Siendo suficiente almacenar el alimento tratado con APH a bajas temperaturas de forma posterior a su procesado, para que no se alteren las propiedades sensoriales o nutricionales del producto (Zhou *et al.*, 2010).

No obstante y de la misma forma que afecta a los microorganismos presentes en la superficie de los alimentos, el tratamiento con altas presiones también puede provocar la alteración estructural de proteínas y polisacáridos, pudiendo ocasionar como consecuencia modificaciones en la textura y funcionalidad de los alimentos, así como también es capaz de provocar la desnaturalización de dichas proteínas, provocando a su vez alteraciones o modificaciones en el sabor o contenido graso de los alimentos debido a la presencia de radicales libres (Williams, 1994).

En este sentido, cabe destacar que en la industria alimentaria, los rangos permitidos tanto de presión como de temperatura solo son capaces de actuar sobre enlaces débiles, por lo que no se obtiene ningún efecto sobre los enlaces covalentes, lo cual implica que tanto los azúcares como las vitaminas no sufran alteraciones debido a los tratamientos por altas presiones, ya que se trata de moléculas pequeñas unidas solo por enlaces covalentes, sin embargo, en el caso de las proteínas y los polisacáridos, grandes macromoléculas, la ruptura de estos enlaces débiles ocasiona la pérdida de su estabilidad estructural promoviendo su desnaturalización (Casp y Abril, 2008).

No obstante, no siempre se produce la desnaturalización de las proteínas cuando se aplican altas presiones, más bien, éste fenómeno depende activamente del tipo de proteína que se encuentre en el alimento, así como de la presión aplicada en el tratamiento y de las condiciones a las que se someta el alimento en el transcurso del

procesado, siendo estos factores determinantes de que las proteínas precipiten por completo o por el contrario queden disueltas en el medio (Rastogi *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha observado que, de igual forma, la aplicación de altas presiones hidrostáticas afecta a las reacciones bioquímicas celulares, ya que las enzimas protagonistas de dichas reacciones son de naturaleza proteica, destacando por tanto que la aplicación de presiones relativamente bajas puede inducir la activación de enzimas monoméricas, mientras que la aplicación de presiones muy elevadas, puede inducir de forma opuesta, la inactivación de las enzimas (Hendrickx *et al.*, 1998).

No obstante, este hecho depende activamente al igual que en el caso de las proteínas, de la composición del medio, el pH, el tipo de enzima y su estructura, así como de la temperatura utilizada durante el procedimiento (Balny y Masson, 1993). Normalmente cuando se combina la aplicación de presión con una temperatura moderada, suele dar como resultado el aumento de la inactivación enzimática, aunque en ocasiones se ha observado el efecto contrario, produciéndose un aumento de la actividad enzimática (Hendrickx *et al.*, 1998).

1.5. Principales patógenos que se encuentran en alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) se consideran un gran inconveniente relativo a la salud, representando un problema de

salud pública a nivel mundial, y siendo transmitidas principalmente por el consumo de agua y alimentos contaminados por microorganismos o las toxinas producidas por los mismos (Kopper *et al.*, 2009). Como consecuencia de la infección alimentaria que producen dichos microorganismos, pueden apreciarse efectos negativos en la salud de los consumidores que van desde diarreas severas, hasta vómitos, meningitis e incluso en ocasiones muy graves, la muerte, estando implicados en estos efectos negativos principalmente especies como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (OMS., 2015).

De manera general se ha estimado que el consumo de alimentos contaminados que ocasiona la mayoría de las infecciones gastrointestinales, es responsable de la muerte de alrededor de 2,2 millones de personas al año, siendo necesario por tanto, destacar que ante la globalización existente en el mundo actual y el aumento inminente de las exportaciones e importaciones alimentarias, el riesgo de llevar a cabo una propagación mundial de patógenos en alimentos a través de las fronteras constituye un riesgo muy elevado a nivel mundial de cara a la salud pública, siendo necesaria la eliminación de dichos patógenos en el alimento mediante técnicas de preservación (Torrens *et al.*, 2015).

En los últimos veinte años, numerosos estudios de investigación han demostrado que la técnica del APH para tratamiento de alimentos puede

reducir el número de microorganismos patógenos presentes en alimentos, destacando fundamentalmente *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar *Enteritidis* (Daryaei *et al.*, 2016). Todos estos microorganismos, en conjunto con *Escherichia coli* O157: H7 se encuentran entre los más estudiados en términos de conservación mediante APH (Smiddy *et al.*, 2005; Jofré *et al.*, 2008).

1.6. Inactivación de microorganismos

Como ya se ha comentado previamente, mediante el tratamiento de los alimentos por la técnica de altas presiones, es posible inactivar los microorganismos superficiales que pueden contaminar los alimentos que van destinados al consumidor, aunque no todos los microorganismos presentan la misma sensibilidad a este tratamiento (Casp y Abril, 2008).

Concretamente, se podría afirmar que aquellas bacterias que presentan una mayor sensibilidad al tratamiento por APH son las bacterias Gram-negativas, aunque después de éstas se podrían destacar las levaduras y mohos, dejando en último lugar a las bacterias Gram-positivas, las cuales presentan una mayor resistencia a dicho tratamiento (son menos sensibles a este tratamiento y por ello su inactivación es más compleja), siendo necesaria su complementación con tratamientos más intensos (Patterson, 2005).

Sin embargo, el caso de la inactivación de las endosporas es el más complejo de todos, ya que éstas ofrecen una resistencia muy elevada al tratamiento por APH ya que se necesita una presión muy elevada (superior a 1200 MPa) (Knorr, 1995) para poder inactivarlas, la cual no es compatible con lo aplicado en alimentación ya que desnaturalizaría las proteínas y polisacáridos del alimento a consumir (Casp y Abril, 2008). Por ello, normalmente, se utiliza un procedimiento basado en la germinación de estas esporas a su forma de célula vegetativa, la cual puede ser inactivada a una presión mucho menor (entre 300 y 600 MPa) (Heinz y Knorr, 2001).

Cabe destacar que dicha inactivación se ve influida principalmente por la temperatura, aunque también influyen el pH y la fuerza iónica en menor medida (Cano et al., 2006). De tal modo que se ha observado una mayor inactivación de endosporas en pH neutro, ya que es el más favorable para la germinación de las mismas (Hayakawa et al., 1994).

De igual forma, en el caso de aquellos alimentos para consumo en crudo, es necesario destacar la importancia de los virus, los cuales son agentes infecciosos capaces de infectar a las verduras y moluscos destinados al consumidor (Baert *et al.*, 2009). En este caso, la sensibilidad de los virus ante el tratamiento de alimentos por APH es bastante variable, siendo por lo general, mucho más sensibles a este tratamiento los virus envueltos (Kovač *et al.*, 2010).

En último lugar, es necesario mencionar que, en el caso de infección por parásitos, la cual es muy frecuente en productos cárnicos y en el pescado, se ha constatado que dichos parásitos pueden ser inactivados de forma eficaz mediante la técnica de APH (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre., 2010).

1.7. Aplicaciones de la técnica APH en alimentación.

La técnica de conservación de alimentos por APH fue desarrollada en Japón en los años ochenta, y en 1990, se lanzó hacia el mercado el primer alimento tratado con APH, una mermelada que fue comercializada por una empresa de origen Japonés (Mertens, 1995). El éxito obtenido tras la comercialización de las mermeladas, hizo posible que el uso de esta técnica se extendiese a otros países y que en el año 1992, los primeros productos preservados a través de esta técnica fueran lanzados al mercado, por parte de países como Reino Unido, Alemania, Estados Unidos, España y Francia, principalmente (Guamis *et al.*, 2006; Kiera., *et al* 2008).

Algunas de las numerosas aplicaciones que ofrece la utilización de esta técnica en el ámbito alimentario son las siguientes (Mozhaev *et al.*, 1994; Ledward *et al.*, 1995; Téllez-Luis *et al.*, 2001):

- Pasteurización y esterilización del alimento.
- Inactivación o activación de determinadas enzimas con el fin de modificar reacciones bioquímicas que retardan o aceleran procesos de fermentación o maduración en los alimentos.
- Modificación o alteración de la estructura de las proteínas.
- Inducción de cambios en las distintas transiciones de fase.
- Extracción de diversos componentes alimentarios a elección (pectinas, pigmentos e incluso agua).
- Facilita la agregación de partículas en polvo o sólidos pequeños, con el fin de estructurar un determinado tipo de producto (barras).
- Evita de forma eficaz los fenómenos de oxidación lipídica y pardeamiento no enzimático.

No obstante, aunque las aplicaciones mencionadas anteriormente presentan un carácter general en cuanto al procesado de los alimentos desempeñado por la técnica de APH, dependiendo del alimento con el que se trabaje se pueden mencionar algunas aplicaciones más específicas:

- **Frutas, verduras y zumos:**

Normalmente, esta técnica se utiliza para la inactivación tanto de microorganismos como de determinadas enzimas de interés, con el fin de prolongar la vida media del producto y mejorar en la medida de lo posible sus propiedades organolépticas, nutricionales y sensoriales (Rastogi *et al.*, 2007). El pH ácido que

presentan determinadas frutas como los cítricos beneficia la inactivación de microorganismos contaminantes por APH y además, dificulta la germinación de las endosporas después del tratamiento, impidiendo dicho fenómeno en la mayoría de los casos (Casp y Abril, 2008). Además, los tratamientos por APH, preservan de forma adecuada el sabor del zumo, como si éste se encontrase recién exprimido, así como el contenido vitamínico total que presenta, aunque por el contrario, en otras frutas como son las peras, las manzanas y los caquis se obtienen efectos diferentes, ya que posiblemente se produzca el deterioro del producto, ablandándose su textura y oscureciéndose, debido a la activación de la enzima polifenoloxidasas tras el tratamiento de APH (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

- **Productos lácteos:**

En este caso, la APH se aplica con la finalidad de inactivar microorganismos como *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *S. aureus*, entre otros, cuya aparición es común en este tipo de producto, presentándose esta técnica como una alternativa eficaz a la pasteurización convencional (Rastogi *et al.*, 2007).

- **Productos cárnicos:**

En los tratamientos de APH que van destinados a productos cárnicos, las altas presiones a las que se somete el alimento, son capaces de generar entre otros muchos efectos, la ruptura de los

lisosomas, liberando así las proteasas almacenadas en el interior de los mismos hacia el citoplasma, quedando dispersas en él y permitiendo que éstas actúen de una forma mucho más efectiva frente a las proteínas que se han desnaturalizado por efecto del tratamiento con APH (Homma *et al.*, 1994), mejorando por tanto la digestión del producto por parte del consumidor y manteniendo un sabor y aroma frescos en la carne procesada con esta técnica (Guamis *et al.*, 2006).

- **Pescado crudo y marisco:**

El consumo de pescado o marisco crudo conlleva en su mayoría riesgos alimentarios relacionados con la contaminación por microorganismos, como es el caso de *Listeria monocytogenes* en productos ahumados (Velázquez *et al.*, 2005) o también la especie *Vibrio* (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*), la cual se ha constatado que es muy sensible a tratamientos por APH, favoreciendo dicho tratamiento su inactivación en productos de origen marino tales como ostras, en las que facilita tanto la apertura como la separación de la concha, y mejora su textura, sabor y color, otorgándole una apariencia mucho más apetecible para el consumidor (Murchie *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Destacar los aspectos positivos de los métodos de conservación alimentaria mediante altas presiones hidrostáticas en relación al tratamiento de distintos grupos de alimentos

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar los parámetros y equipos utilizados que ofrecen los resultados más favorables.
- ✓ Determinar la efectividad de la técnica de APH en alimentos cárnicos en comparación con frutas y verduras.
- ✓ Determinar el tratamiento más efectivo para la inactivación de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Al tratarse de una revisión Bibliográfica, en este caso los materiales y métodos utilizados residen en la búsqueda de artículos científicos en diversas bases de datos con el fin de recopilar la información pertinente a dicho tema, centrándose en los artículos publicados durante los últimos años para poder describir los avances que se han producido más recientemente con respecto a esta técnica en la actualidad. En este caso, se han utilizado distintas bases de datos, concretamente PubMed, Medline, Google Académico y Scielo. Así mismo, se han utilizado distintas palabras clave para filtrar la búsqueda, siendo éstas: *HHP (High Hydrostatic Pressure)* y *HPP, (High pressure processing) in food preservation*, filtrando los artículos por año de publicación desde el año 2001 en adelante (aunque algunos estudios publicados de forma anterior también han sido tenidos en cuenta, los artículos implicados en el apartado de resultados son los más próximos a la actualidad).

4. RESULTADOS

A continuación, en este apartado se comentarán los resultados obtenidos en cuatro estudios en los que se han realizado tratamientos en distintos tipos de alimentos, utilizando la metodología de la técnica de APH.

4.1. **Inactivation of leuconostocs in cherimoya pulp by high hydrostatic pressure treatments applied singly or in combination with enterocin AS-48. (Toledo del Árbol et al., 2016)**

En este estudio, se realizó un cóctel de *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gasicomitatum* y *Leuconostoc gelidum*, el cual fue inoculado en pulpa de chirimoya esterilizada en autoclave, siendo el producto de dicha mezcla tratado mediante altas presiones hidrostáticas durante 8 minutos (400, 500 o 600 MPa), además esta mezcla, también fue tratado con enterocina AS-48 (35 mg / g), en forma combinada con el tratamiento de altas presiones y de forma individual para observar las diferencias entre los tratamientos, así como el tratamiento más efectivo. Después de aplicar ambos tratamientos, las muestras se dividieron en dos grupos, siendo un grupo de muestras almacenado a una temperatura de 4^oC, durante un periodo de 30 días y otro grupo, almacenado a una temperatura de 22^oC, durante un periodo más corto, de 10 días.

Después de los tratamientos y su almacenamiento, las muestras se mezclaron con 10 ml de solución salina estéril y se homogeneizó el contenido durante dos minutos en bolsas stomacher. Se obtuvieron

diluciones seriadas de la suspensión obtenida en solución salina estéril, sembrándose posteriormente en agar MRS (Scharlab, Madrid) por triplicado, e incubándose a 22⁰ C durante un periodo de 48 horas. Para realizar el recuento de células viables una vez transcurrido dicho tiempo, se utilizó el número medio de colonias obtenidas en cada placa de MRS.

Para el tratamiento de las muestras mediante la técnica de AHP, se utilizó un equipo Stansted Fluid Power LTD HHP (SFP, Essex, Reino Unido), el cual contaba con un recipiente de 2,5 l con capacidad de operar en un rango de presión de 0 - 700 MPa. La velocidad de subida obtenida durante el tratamiento de APH fue de 75 MPa / min, y la descompresión se produjo de forma prácticamente instantánea. Además, para la presurización, se utilizó agua con propilenglicol añadido al 10% como fluido. Por último, cabe destacar que durante el transcurso de los tratamientos de APH, en el interior del recipiente la temperatura se mantuvo entre los 23 y 27⁰ C de una forma constante.

Para la realización del análisis estadístico de los resultados, se utilizó el programa Excel (Microsoft Corp., EE. UU.) con el fin de determinar los valores de Log (N) promedio de los distintos lotes de muestras duplicadas \pm las desviaciones estándar de los diferentes recuentos de células viables obtenidos para cada lote de muestras, realizándose además, con el programa Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphics Corp, EE. UU.) una prueba t pareada, utilizando un intervalo de

confianza del 95%, con el fin de determinar la significancia estadística establecida entre los tratamientos aplicados.

Finalmente, en los resultados obtenidos se pudo observar, que en los tratamientos de altas presiones, en los que se aplicó una presión de 400 y 500 MPa, se produjo una reducción notable en cuanto a la concentración de células viables, resultando en una disminución en 4,3 y 4,9 logaritmos. Además, cabe destacar que no se obtuvieron células viables a 600 MPa. Por otro lado, en el tratamiento con bacteriocina que fue aplicado después del tratamiento de alta presión con 400 y 500MPa se obtuvo, de forma adicional, una disminución de 0,6 a 0,9 logaritmos, reduciéndose aún más la concentración de células viables que se encontraban en la muestra y los recuentos de células viables durante el almacenamiento de las muestras.

En cuanto al recrecimiento bacteriano, en las muestras a las que se les aplicó alta presión hidrostática de 400 y 500 MPa, se obtuvo un retraso en el crecimiento de leuconostocs de 15 días, siendo en el caso del tratamiento de alta presión con 600 MPa de 30 días y encontrándose las muestras en ambos casos en unas condiciones de almacenamiento de refrigeración. Sin embargo, en aquellas muestras que se almacenaron a 22^oC, el recrecimiento bacteriano se produjo en el tercer día de almacenamiento para todas las muestras, independientemente del tratamiento utilizado previamente.

Con todo ello, los resultados obtenidos resaltan la utilidad del tratamiento de alta presión de 600 MPa durante un periodo de 8 minutos, para inactivar de forma eficiente el género *Leuconostoc* en la pulpa de la chirimoya.

4.2. Changes in microbial diversity of brined green asparagus upon treatment with high hydrostatic pressure (Toledo del Árbol et al., 2016)

En este estudio, con la finalidad de observar los cambios que se producían en la diversidad bacteriana en una muestra de espárragos verdes en salmuera, se utilizó la técnica de APH, aplicando en el tratamiento de las muestras una presión de 600 MPa, durante un periodo de 8 minutos, y almacenando posteriormente las muestras previamente tratadas en dos tandas, la primera a una temperatura de 4°C durante 30 días consecutivos y la segunda, a una temperatura de 22°C, durante un periodo de 10 días.

En la muestra de espárragos verdes estudiada, se observó una microbiota bacteriana compuesta por distintas especies microbianas, destacando las siguientes: Proteobacterias, en su mayoría *Pantoea* y *Pseudomonas*), *Firmicutes*, mayormente *Lactococcus* y *Enterococcus*), *Bacteroidetes* y Actinobacterias, aunque estos últimos se hallaron en cantidades mucho menores a los anteriores en las muestras.

Para el tratamiento de las muestras mediante la técnica de AHP, se utilizó un equipo Stansted Fluid Power LTD HHP (SFP, Essex, Reino

Unido), el cual contaba con un recipiente de 2,5 l con un sistema de bomba hidráulica y capacidad de operar en un rango de presión de hasta 700 MPa en un rango de temperatura de entre 23 y 27°C. La velocidad de subida obtenida durante el tratamiento de APH fue de 75 MPa / min, y la descompresión se produjo de forma prácticamente inmediata. Además, para la presurización, se utilizó agua destilada con propilenglicol añadido al 10% como fluido. De esta forma, las muestras de espárragos verdes en salmuera, fueron presurizadas a una presión de 600 MPa durante un periodo de tiempo de 8 min, a temperatura ambiente.

En cuanto al análisis de las muestras obtenidas, fueron homogeneizadas con una bolsa de Stomacher, y depositadas en un Eppendorf y dividida en dos pruebas, la primera de siembra y la segunda de análisis de ADN, con el objetivo de la determinación de la diversidad microbiana de las muestras. Para la siembra de la muestra en medio de cultivo, parte del homogeneizado, fue sometido a diluciones seriadas en solución salina al 0,85% estéril, para su posterior siembra en medio agar triptona de soja (TSA, Scharlab, Madrid), después las placas fueron incubadas a 30°C, durante un periodo de 24 horas para el posterior recuento de células viables contenidas en la muestra. La suspensión celular restante del homogeneizado obtenido con la bolsa Stomacher, fue utilizado para la extracción y análisis de ADN, con el fin de determinar la diversidad microbiana como ya se había comentado previamente.

Para llevar a cabo el análisis de ADN, las muestras fueron previamente tratadas con propidio monoazida (PMA™, Biotium, Reino Unido) con el

fin de bloquear la posterior amplificación por PCR del material genético de aquellas células muertas restantes. Posteriormente, se añadió una solución madre de 20 mM PMA disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) al 20%, incubándose después de ello las muestras durante un periodo de 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, con agitación para mejorar la penetración del reactivo. Una vez realizado este paso, las muestras se expusieron a la luz durante un periodo de 15 minutos, por medio de la utilización de un sistema de fotoactivación (Led-Active Blue, Ingenia Biosystems, Barcelona, España).

A continuación, se realizó una centrifugación a 12.000 rpm durante un periodo de 10 min, y tres lavados, siendo dos de ellos realizados con solución salina estéril y el último con agua estéril de grado molecular. Por último, el sedimento obtenido al finalizar dicho procedimiento fue utilizado para la obtención del ADN, el cual fue extraído por medio de un kit de ADN genómico bacteriano GenElute™ (Sigma-Aldrich, Madrid), siguiendo de forma detallada las instrucciones del fabricante y tanto su concentración, como la calidad del ADN de las muestras fueron medidas con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Reino Unido).

Para la amplificación del ADN, se utilizó una técnica consistente en una pirosecuenciación de las regiones variables V1-V3 del gen 16S rRNA, utilizando los cebadores Gray28f y Gray519r y amplificando un fragmento de 520 pb. En el caso del cebador directo, fueron incluidos adaptadores de secuenciación 454 (Roche, EE. UU.), así como un identificador multiplex (MID), en una secuencia específica de 10 pb para

cada una de las muestras. Posteriormente, con el objetivo de verificar el fragmento amplificado, se utilizó un gel de agarosa al 1,5%, con un marcador de peso molecular de 1 kb, sometido a electroforesis durante un periodo de 30 minutos a 100 V.

Una vez realizada la electroforesis, se llevó a cabo una doble purificación de los productos de PCR con el kit de purificación Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Milán, Italia) siendo cuantificados posteriormente por medio de la técnica QuantiFluor™ (Promega, Milán, Italia) con PicoGreen. Los amplicones de ADN obtenidos se combinaron en un solo tubo a una concentración equimolar. Además, se realizó una pirosecuenciación, la cual se realizó en una plataforma GS Junior (454 Life Sciences, Roche Diagnostics, Italia), utilizando química de titanio siguiendo las indicaciones establecidas por el fabricante.

Para el análisis de datos obtenidos, las lecturas sin procesar fueron filtradas con la tubería de procesamiento 454 y posteriormente, las secuencias resultantes fueron analizadas con el software QIIME 1.8.0. Las unidades taxonómicas operativas (OTU), definidas por una similitud del 97% fueron seleccionadas mediante el método Uclust, y las secuencias representativas se enviaron y clasificaron utilizando la base de datos de genes de ARNr 16S de Greengenes. La diversidad alfa y beta fue evaluada a través de QIIME y la comprobación de diferencias significativas presentes en los parámetros de diversidad alfa, se utilizó el script `compare_alpha_diversity.py` de QIIME.

En los resultados obtenidos después del tratamiento de las muestras, se pudo observar una reducción notable en cuanto a la concentración de células viables, resultando en una disminución de 3,6 logaritmos. Además, cabe destacar que durante el almacenamiento de las muestras a la temperatura de 4°C, no se produjo un aumento de la población residual superviviente. Aunque por el contrario, en el caso de las muestras almacenadas a la temperatura de 22°C, se observó un aumento en el número de bacterias viables en los recuentos realizados después del tercer día.

Cabe destacar que durante el almacenamiento en frío, de las muestras correspondientes a espárragos no tratados, se produjo una disminución en las células viables de Proteobacterias *Enterococcus* y *Lactococcus* respectivamente, mientras que se pudo observar de la misma forma, un aumento en el número de células viables de *Lactobacillus*. Sin embargo, en aquellas muestras de espárragos sin tratar que fueron almacenados a una temperatura de 22°C, la cantidad correspondiente a células viables de *Bacteroidetes* se redujo en comparación a la muestra control, produciéndose contrariamente un aumento de Proteobacterias.

En las muestras que fueron sometidas a tratamiento con APH se produjo una disminución en el número de proteobacterias viables, y ocurrió lo mismo durante el almacenamiento de las muestras tratadas a 4°C. Sin embargo, en los datos obtenidos para las muestras tratadas con APH y almacenadas a 22°C, se obtuvo una disminución en el recuento de *Pseudomonas* viables y un aumento en el recuento de *Bacteroidetes* y Enterobacterias viables.

Con todo ello, los resultados obtenidos resaltan el impacto generado por la técnica de APH en la dinámica de las poblaciones microbianas de las muestras de espárragos verdes en salmuera, durante el almacenamiento de las muestras tratadas en dicho estudio.

4.3. Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by high-hydrostatic pressure (Grande Burgos et al., 2017).

En este estudio, el principal objetivo consistió en determinar el efecto sobre la diversidad bacteriana del perejil, de dos tratamientos. En el primero de ellos, las muestras de perejil fueron cubiertas con una solución de pectina-EDTA, en cuyo contenido se encuentra la bacteriocina circular enterocina AS-48, mientras que en el segundo, se sometió a las muestras a un tratamiento AHP a una presión concreta de 600 MPa durante un periodo de 8 min. Las muestras de perejil tratadas por ambos métodos, fueron almacenadas a 5°C durante un periodo de 10 días. En ambos casos, se observó una disminución de células viables en 3,7 logaritmos y además se produjo un retraso en el crecimiento posterior de bacterias supervivientes durante el proceso de almacenamiento. Para el estudio de la diversidad bacteriana del perejil se utilizó un procedimiento de secuenciación de alto rendimiento (Illumina Miseq).

En cuanto al análisis de las muestras obtenidas, fueron homogeneizadas con una bolsa de Stomacher, dicha homogeneización fue depositada en un Eppendorf y dividida en dos pruebas, la primera de siembra y la

segunda de análisis de ADN, con el objetivo de la determinación de la diversidad microbiana de las muestras. Para la siembra de la muestra en medio de cultivo, parte del homogeneizado, fue sometido a diluciones seriadas de solución salina estéril, para su posterior siembra en medio agar triptona de soja (TSA, Scharlab, Madrid), después las placas fueron incubadas a 30°C, durante un periodo de 24 horas para el posterior recuento de células viables contenidas en la muestra. La suspensión celular restante del homogeneizado obtenido con la bolsa Stomacher, fue utilizado para la extracción y análisis de ADN, con el fin de determinar la diversidad microbiana como ya se había comentado previamente.

Para llevar a cabo el análisis de ADN, el homogeneizado restante se dividió en alícuotas de 5 ml y se centrifugaron a 600 x g durante 5 minutos con el objetivo de eliminar los restos sólidos del tejido vegetal. Después el sobrenadante se transfirió a una alícuota de 1,5 ml a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13.500 x g durante 5 min para recuperar las células microbianas, resuspendiendo el pellet en 0,5 ml de solución salina estéril. Posteriormente, se agregó propidio monoazida (PMA TM, Biotium, Reino Unido) para bloquear la posterior amplificación por PCR del material genético de células muertas y se procedió a la extracción del ADN de las células tratadas con PMA con un kit de ADN genómico bacteriano GenElute TM (Sigma Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, tanto la concentración como la calidad del ADN fueron medidas con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Reino Unido).

La secuencia de la región V3-V4 del gen rRNA 16S se llevó a cabo con la técnica Illumina. La concentración exacta de ADN en las muestras se determinó mediante un método fluorimétrico con reactivo Quant-IT PicoGreen (Thermo Fischer, Madrid, España) en un fluorómetro Quantifluor ST (Promega, Alcobendas, Madrid). Los cebadores de oligonucleótidos utilizados para la primera reacción de PCR fueron 16SV3-V4-CS1 y 16SV3-V4-CS2. Además, los productos PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa para determinar la calidad del procedimiento.

Después de la amplificación, los productos de PCR satisfactorios se limpiaron usando un procedimiento de purificación basada en perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.), y se procedió a realizar una segunda PCR para agregar un código de barras individual a cada muestra e incorporar secuencias específicas de Illumina en las bibliotecas de amplicones. En este punto, las bibliotecas individuales fueron debidamente analizadas utilizando un Bioanalyzer 2100 (Agilent, Madrid) para así poder estimar la concentración de los productos de PCR específicos.

Posteriormente y después de una segunda limpieza con perlas magnéticas, se midió la concentración exacta de la biblioteca mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando unos cebadores específicos de Illumina (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EE. UU.). Cabe destacar que la secuenciación de los pares de la biblioteca se realizó en un secuenciador Illumina MiSeq (San Diego, CA, EE. UU.), por medio del kit

de reactivos MiSeq (v3) con una longitud de lectura de 2 × 300 pares de bases (bp).

A continuación y después de la demultiplexación, las lecturas obtenidas al final y que fueron emparejadas, fueron unidas con el programa fastq-join ([https:// expressionanalysis.github.io/ea-utils/](https://expressionanalysis.github.io/ea-utils/)), asignándose a OTU en función de la similitud presentada por cada una con la base de datos NCBI nt, utilizando en dicha página la función BLASTN (Era7 Bioinformatics, Granada, España). Depositándose en última instancia los archivos de salida de secuenciación en el servicio Sequence Read Archive (SRA) correspondiente a la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), con el número de acceso PRJEB20528.

En cuanto al análisis bioestadístico, se realizó la prueba ANOVA bidireccional (Microsoft Excel) para el recuento de microorganismos viables después del tratamiento de las muestras. Por otro lado, los índices de biodiversidad de Shannon Wiever (H') y Simpson (D) fueron calculados por medio del programa Excel y los datos correspondientes a las OTU con abundancias relativas $\geq 1,5\%$ se analizaron mediante un análisis de componentes principales (PCA) con el coeficiente de correlación de Pearson (r ; $P < 0,05$) (versión de evaluación XLSTAT 2014 (2014.1.03, Addinsoft, Francia).

Como resultado de todo lo anterior, se obtuvo una composición de Proteobacterias en un 96,87% la mayoría, concretamente pertenecientes al género *Pseudomonas* en un 69,12%, al género *Rheinheimera* en un 8,56% y *Pantoea* en un 6,91%, respectivamente. Sin embargo, durante

el proceso de almacenamiento, se observó un aumento de *Bacteroidetes* (géneros *Flavobacterium* y *Sphingobacterium*) a un porcentaje de 26,66%.

También se pudo observar que después del tratamiento de recubrimiento de pectina-bacteriocina-EDTA, se indujo una disminución de Proteobacterias (63,75%) y un aumento de *Firmicutes* (34,70%). Aunque, se produjo el aumento de otros grupos de bacterias como los géneros *Salmonella*, *Acinetobacter* y *Shigella* durante las primeras horas del periodo de almacenamiento, aumentándose horas más tarde de igual forma, las Proteobacterias, siendo la mayoría *Pseudomonas*.

Con respecto al segundo tratamiento al que se sometieron las muestras de perejil, después de la aplicación de la técnica de APH se observó una disminución de Proteobacterias a 85,88%, así como un aumento de Actinobacterias a 8,01% y de *Firmicutes* en las primeras horas de almacenamiento. Además, solo se observó un aumento de abundancia relativa en las bacterias potencialmente patógenas como *Shigella* al final del almacenamiento de las muestras.

4.4. Effect of high pressure processing on the survival of *Salmonella* Enteritidis and shelf-life of chicken fillets (Argyri et al., 2018).

En este estudio, el principal objetivo consistió en realizar una evaluación sobre el efecto de la técnica de APH sobre la bacteria patógena *Salmonella ser.* Enteritidis, propia de la microbiota autóctona incluida en los filetes de pollo. Para realizar este estudio, se procedió al inóculo de

muestras de filetes de pollo con *Salmonella ser.* Enteritidis, concretamente, en el experimento se utilizó un cóctel de 3 cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis (FMCC B-56 PT4; FMCC B-57 PT7; ATCC 13076), el cual fue utilizado con las diluciones apropiadas para alcanzar 3 niveles finales de inóculo de aprox. 10^3 , 10^5 , 10^7 UFC / g en las muestras de filetes de pollo.

Una vez inoculados, las muestras se dispusieron al vacío, y se dividieron en dos tandas, una de las cuales se sometió a tratamiento de APH y otra que fue almacenada sin tratamiento previo con dicha técnica. Para ello se utilizó una presión de 500 MPa durante un periodo de 10 min y posteriormente el almacenamiento de todas las muestras se llevó a cabo en dos tandas de muestras tratadas con APH y no tratadas, una a la temperatura de 4°C y la otra a 12°C.

La presurización de las muestras se llevó a cabo a una temperatura ambiente de entre 18 y 20°C. La unidad de alta presión utilizada (Food Pressure Unit FPU 1.01, Resato International BV, Roden, Holanda) contenía un intensificador de presión, así como un sistema multivaso, constando éste último de un recipiente central con capacidad de 250 ml, así como una presión máxima de 1000 MPa y una temperatura máxima de 90°C para su funcionamiento. Además, cabe destacar que el fluido utilizado como transmisor de la presión fue poliglicol.

La velocidad de subida durante el tratamiento de las muestras fue de 100 MPa por 7 segundos aproximadamente y el tiempo de liberación de la presión tras el tratamiento de las muestras fue de 3 segundos.

En cuanto a la preparación de las muestras, se añadieron de forma aséptica, 25 g de muestra de los filetes de pollo a 50 ml de solución estéril de $\frac{1}{4}$ de Ringer y se homogeneizaron con una bolsa Stomacher (Stomacher 400 Circulator, Seward). Se obtuvieron diluciones seriadas de las suspensiones obtenidas después de la homogeneización y fueron sembradas en placas de agar selectivas y no selectivas, siendo los medios de agar seleccionados los siguientes:

- Agar Plate Count (CM0325, Oxoid), para los recuentos de microorganismos viables totales, incubados a una temperatura de 30°C durante un periodo de 48 a 72 h.
- Man-Rogosa-Sharp (MRS) (CM 0361, Oxoid), para LAB, ajustado a un pH de 5,7, incubado a una temperatura de 30°C durante un periodo de 48 a 72 h.
- Base de agar de cloranfenicol rosa de Bengala (LAB036 complementado con el suplemento selectivo X009, LAB M), para el cultivo de levaduras / mohos incubados a una temperatura de 25°C durante un periodo de 48 a 72 h.
- Agar de glucosa rojo violeta biliar (CM 0485, Oxoid) para el cultivo de *Enterobacteriaceae* incubado a una temperatura de 37°C durante un periodo de 24 h.

- Agar base de *Pseudomonas* (CM559 suplementado con suplemento selectivo CFC SR0103, OXOID), para *Pseudomonas* spp. incubadas a una temperatura de 25°C durante un periodo de 48 horas.
- Desoxicolato de xilosa lisina, XLD (CM 0469, Oxoid), para el cultivo de *Salmonella*, incubada a una temperatura de 37°C durante un periodo de 16 a 18 h.

Se realizó de igual forma un análisis de las muestras de carne de pollo durante todo el proceso de almacenamiento con el fin de garantizar la ausencia de 3 patógenos importantes que usualmente contaminan de forma natural la carne de pollo, siendo éstos patógenos los siguientes: *Salmonella* spp., cuya presencia es común en muestras no inoculadas, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp.

La técnica de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) fue aplicada con el fin de mantener un control sobre la supervivencia y distribución de las cepas de *Salmonella* inoculadas en las muestras control y las muestras que fueron tratadas con la técnica de APH durante el almacenamiento de las mismas a las temperaturas de 4 y 20°C.

Para llevar a cabo la evaluación sensorial de las muestras durante el almacenamiento, se utilizó siguiendo un panel sensorial compuesto por cinco miembros de personal de laboratorio debidamente capacitados. Dicha evaluación se realizó con luz artificial y a temperatura ambiente,

teniendo en cuenta el olor, sabor y color de las muestras, siendo dichas cualidades puntuadas entre 1,5, 2 y 2,5 y clasificándose como apto o no para consumo.

En cuanto al análisis estadístico de las muestras, se utilizaron de forma independiente dos lotes de filetes de pollo y cada experimento fue realizado por triplicado. Los resultados recogidos a partir de las muestras fueron analizados con un análisis de la varianza (ANOVA) y con el fin de determinar la existencia o no de diferencias significativas entre los resultados obtenidos se utilizó el programa Statistica v.5.0.

Para el recuento de los microorganismos viables en las muestras como *S. Enteritidis*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* bacterias del ácido láctico, y poblaciones de levaduras / mohos, se llevó a cabo la evaluación en paralelo del análisis molecular de las muestras, así como de la evaluación sensorial de muestras no inoculadas.

El tratamiento con APH, indujo una disminución del número de patógenos, el cual quedó situado por debajo del límite de detección del método de enumeración (0,48 log UFC / g), de forma totalmente independiente de la inoculación de una cantidad u otra. Sin embargo, sí que se observó un cambio en el comportamiento de la población bacteriana de las muestras durante el almacenado a distinta temperatura con respecto al inóculo, de tal forma que en el caso de un grado alto de

inóculo se observó un aumento de la población bacteriana en las muestras tratadas con APH y almacenadas posteriormente a la temperatura de 12 ° C. Por el contrario, en aquellas muestras en las que se realizó un inóculo bajo, no fue posible la detección del patógeno después de los primeros días de almacenamiento, en concreto el segundo día para las muestras almacenadas a 4°C.

En cuanto al grado de supervivencia de las cepas de *Salmonella* en las muestras de filete de pollo, cabe destacar que fue evaluada mediante la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado, demostrando que el grado de supervivencia de las diferentes cepas de *Salmonella* era dependiente del inóculo aplicado en las muestras y de la temperatura de almacenamiento de las mismas. Por último es necesario resaltar que el principal microorganismo superviviente tras someter las muestras a la técnica de APH y además resultó como especie dominante en los rebrotes durante el almacenamiento fue *Br. thermosphacta*.

5. DISCUSIÓN

El consumo de alimentos en la actualidad, se ha vuelto cada vez más selectivo, ya que los consumidores han incrementado la demanda de alimentos que visualmente tienen características que asemejan el producto a un alimento natural, dichas características lo hacen parecer más fresco y saludable, lejos de los alimentos procesados que están siendo cada vez más criticados a ojos de la sociedad, por su alto contenido en conservantes químicos sintéticos. Todo ello implica, que el consumidor aunque no sea plenamente consciente de ello, busca aquellos alimentos más seguros en cuanto a la ausencia de microorganismos se refiere, y de mayor calidad. Debido a todo ello, han surgido nuevas tecnologías para el tratamiento de los alimentos con el objetivo de prolongar su vida útil y hacerlo más apetecible para el consumidor, englobando una mejora en su elaboración, y conservación, así como también el control de dichos alimentos (Señorans et al., 2006).

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en esta industria es la existencia de microorganismos patógenos, capaces de contaminar los alimentos y afectar negativamente a la salud del consumidor, por esta razón resulta de especial importancia detectar de forma inmediata y eficaz dichos microorganismos y evitar brotes que afecten al consumidor en gran medida, así como diseñar diversas estrategias que impidan el crecimiento de estos microorganismos o retrasen un posible recrecimiento de microorganismos inactivados previamente (Morcillo et al., 2011).

Es muy común que se den intoxicaciones alimentarias por presencia de *Listeria*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, siendo esta última capaz de producir enterotoxinas termoestables, además de ser resistente a múltiples antibióticos, implicando intoxicaciones graves en humanos. Para inactivar dichos microorganismos o reducir su supervivencia, uno de los métodos prometedores en la actualidad es el tratamiento de APH (Gálvez et al., 2008).

En nuestro primer estudio se ha podido comprobar que se necesitó aplicar una presión de 600 MPa para conseguir una disminución de 6 logaritmos en el cóctel de leuconostocs que fue inoculado en las muestras de pulpa de chirimoya analizadas en dicho estudio. Además, cabe destacar que el efecto de la adición de enterocina AS-48 a 35 mg / g fue limitado en relación a la inactivación de leuconostocs, lo cual ocurrió de forma bastante probable en consecuencia a la aplicación de un inóculo bacteriano elevado o bien pudo deberse a la interacción de la bacteriocina con la matriz del alimento.

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que la eficacia de la enterocina AS-48 es dependiente de diversos factores, como por ejemplo es el caso de la bacteria diana y del sistema alimentario implicado (Abriouel, Lucas, Ben Omar, Valdivia y Galvez, 2010). Además, en estudios anteriores se demostró que el tratamiento combinado de APH (600 MPa, 8 min) y enterocina AS-48 (50 mg / g) mejoró de forma eficaz la inactivación de *Staphylococcus aureus* en arroz con leche (Pérez-Pulido, Toledo del Arbol, Grande-Burgos, y Galvez, 2012).

Sin embargo, a pesar de que en este estudio el efecto producido por la enterocina AS-48 sobre la inactivación microbiana fue reducido, ésta indujo un efecto positivo en relación a la obtención de un recuento microbiano menor, comparado con los tratamientos por APH con posterior almacenamiento en frío, realizados de forma individual.

De igual forma, durante el almacenamiento a 22°C se obtuvo un mayor retraso en el crecimiento microbiano en aquellas muestras que fueron tratadas a una presión de 600 MPa en combinación con el tratamiento de la bacteriocina en comparación con el tratamiento individual de APH de las muestras. Dichos resultados reflejan el potencial de los tratamientos que aplican la técnica de APH con el fin de inactivar y establecer un control sobre los leuconostocs en la pulpa de chirimoya, así como también reflejan que la bacteriocina es capaz de inducir un retraso en la aparición de recrecimientos durante el almacenamiento de alimentos tratados previamente con el método de APH.

En el segundo estudio, se puede observar cómo un tratamiento con APH a 600 MPa durante un periodo de 8 min podría mantener estables los espárragos verdes en salmuera durante un periodo de un mes, almacenado en condiciones de frío. Además, los resultados de los experimentos en que habían sido almacenados a una temperatura de 22°C sugirieron que los espárragos tratados podrían soportar de igual forma una exposición limitada a condiciones de elevada temperatura por periodos cortos de tiempo, no superiores a un día de duración, debido a la probabilidad de recrecimiento bacteriano.

Para determinar la microbiota de los espárragos verdes se utilizó el método de pirosecuenciación del gen de ARNr 16S con el objetivo de determinar el impacto inducido por el tratamiento con APH en las poblaciones microbianas del alimento analizado.

No obstante, es necesario destacar que esta técnica ha sido aplicada en muy pocos estudios hasta la fecha (Pérez Pulido et al., 2015). Además hay que resaltar que las muestras se trataron con monoazida de propidio (PMA) de forma previa a la extracción del ADN para así evitar la interferencia del ADN de células muertas en la amplificación, la cual era necesaria para realizar la pirosecuenciación. Este paso, permite que la PCR discrimine de forma cuantitativa entre aquellas células que están vivas y las que no (Nocker et al., 2007).

Por otro lado, de entre todas las OTU que fueron detectadas en las muestras de espárragos verdes contaminados de forma artificial con su propia microbiota superficial, el grupo predominante fue *Enterobacteriaceae*, destacando concretamente los géneros *Rahnella*, *Serratia* *Pantoea*, *Escherichia*, *Erwinia* y *Raoultella*, las cuales predominaron de igual forma durante el almacenamiento de las muestras, aunque la diferencia relativa encontrada fue dependiente de cada muestra.

Sin embargo, en el caso de la abundancia relativa de OTU pertenecientes al género *Pseudomonas*, ésta se mantuvo en valores altos durante el almacenamiento de los controles en frío, y en valores bajos en los controles almacenados a la temperatura de 22°C , así como en el almacenamiento de las muestras tratadas con APH.

En relación a los resultados obtenidos, la disminución de la abundancia relativa observada en *Enterobacteriaceae* debido a APH sugiere que este grupo de bacterias gramnegativas podría presentar una mayor sensibilidad al tratamiento que Bacteroidetes y Firmicutes. Además, se no se observó rebrote de *Enterobacteriaceae* en el almacenamiento en frío, pero sí lo hubo en Bacteroidetes, destacando fundamentalmente *Flavobacteriaceae* las cuales son bacterias naturales del suelo y el agua y están implicadas en la descomposición de biopolímeros (Bernardet y Nakagawa, 2006).

No obstante, la actividad metabólica que presentan en el caso de los espárragos refrigerados, parece encontrarse limitada debido a estas bajas temperaturas en conjunto con una menor disponibilidad de oxígeno. En cuanto a los Firmicutes de Fam. *Enterococcaceae* y Fam. *Streptococcaceae* no se detectó un aumento importante en relación a la abundancia relativa de las muestras tratadas con APH, aunque éste si fue evidente en aquellas muestras almacenadas a 22°C, indicando ésto que casi de forma exclusiva, muy pocos grupos microbianos fueron capaces de proliferar tras el tratamiento con APH.

Las esporas producidas por *Clostridium*, en ocasiones son causantes de promover cambios en la calidad sensorial de los alimentos (producción de ácido butírico, olores pútridos, etc.), así como la aceleración de su deterioro, dando lugar a grandes pérdidas económicas (Brown, 2000). Ya que las esporas son más difíciles de eliminar con el tratamiento de APH, se esperarían resultados afines a esta afirmación, sin embargo, la abundancia relativa de *Clostridium* sp. no superó el 5% en las muestras de espárragos verdes tratados con APH y almacenados a temperatura ambiente.

De forma resumida, se puede destacar que el tratamiento con APH a 600 MPa durante 8 minutos fue capaz de prolongar la vida útil de los espárragos en salmuera durante el almacenamiento en frío. Además, los resultados reflejan que la carga microbiana de los espárragos verdes es de unos 2 logaritmos menor que la obtenida en las muestras contaminadas de forma artificial, analizadas en dicho estudio, siendo indicativo de una menor supervivencia de microorganismos en las muestras tratadas previamente con APH.

En los resultados del tercer estudio queda reflejado que el perejil picado contenía una elevada carga microbiana de *Proteobacterias* del género *Pseudomonas*, en las cuales se produjo una reducción en la abundancia relativa durante la conservación en frío, mientras que la abundancia relativa de Bacteroidetes, destacando *Flavobacterium* y *Sphingobacterium* aumentó en condiciones de refrigeración, lo cual podría explicarse por la ausencia de nutrientes debida a las condiciones de almacenamiento, ya que el predominio de *Pseudomonas* pudo promover dicho fenómeno, o bien inducir la acumulación de productos metabólicos finales tóxicos.

La aplicación del recubrimiento de pectina-bacteriocina-EDTA fue capaz de inducir una disminución en los recuentos de microorganismos viables y además pudo retrasar los recrecimientos hasta el último periodo del almacenamiento de las muestras. En este paso, la enterocina AS-48 es capaz de actuar sobre la membrana citoplásmica bacteriana de bacterias Gram positivas principalmente (Grande-Burgos et al., 2014).

Posteriormente se produjo una disminución de la abundancia relativa de *Pseudomonas* mientras que en el caso de *Salmonella* y *Shigella* se produjo el efecto contrario, dando como resultado un aumento en la abundancia relativa de las mismas. Cabe destacar que *Acinetobacter* desplazó a ambas a partir del tercer día de almacenamiento, pero ello no descarta una posible intoxicación alimentaria inducida por estos microorganismos.

Probablemente este aumento en la abundancia relativa de *Acinetobacter* fue promovido por su capacidad para utilizar acetato como única fuente de carbono, (Baumann., 1968). Aunque cabe destacar que la mayoría de las especies de *Acinetobacter* son organismos ambientales no patógenos, existen determinadas especies adaptadas a entornos clínicos, que son las actuales causantes de graves problemas de salud en hospitales (Wong et al., 2017).

En cuanto a los resultados obtenidos con el tratamiento de APH, se obtuvo tanto una reducción en el número de microorganismos viables y un retraso en el crecimiento bacteriano de las muestras pretratadas durante el almacenamiento en frío. Aunque *Pseudomonas* tuvo la mayor reducción en abundancia relativa tras el tratamiento de las muestras con APH, se observó la prevalencia de otros grupos bacterianos, siendo *Sphingomonas* y *Rahnella* los predominantes y sugiriendo por tanto, una menor sensibilidad al tratamiento por APH.

A pesar de esto, la abundancia relativa de *Pseudomonas* aumentó durante los primeros días de almacenamiento, aunque volvió a verse mermada más adelante, probablemente por la limitación de nutrientes disponibles o por la

competencia con otros grupos bacterianos, siendo *Enterobacter* más abundante en este punto, mientras que también se vieron reducidas las abundancias relativas de *Salmonella* y *Shigella* hasta el día 10 de almacenamiento.

En el cuarto y último estudio, su principal objetivo fue realizar una evaluación sobre el efecto del tratamiento de APH sobre *Salmonella* ser. Enteritidis, en filetes de pollo. Según los resultados obtenidos la supervivencia de las diferentes cepas de *Salmonella* fue altamente dependiente de las condiciones del inóculo aplicado, así como de la temperatura aplicada en el almacenamiento de las muestras. El tratamiento con APH, indujo una disminución del número de patógenos, quedando situado por debajo del límite de detección del método de enumeración (0,48 log UFC / g).

En un estudio anterior, se informó del efecto de los tratamientos de APH de ciclo único y múltiple (300-400MPa) durante un periodo de entre 0 y 20 minutos, con respecto a la supervivencia de *Salmonella* Enteritidis en filetes de pechuga de pollo (Morales et al., 2009). Unos años más tarde, también se observó que en la pechuga de pollo tratada con una presión de 400 MPa / 1 min, se produjo una reducción de 4 log en los recuentos de *Salmonella*. (Tanuwong et al., 2012).

Se produjo además un cambio en el comportamiento de la población bacteriana de las muestras durante el almacenado a distinta temperatura con respecto al inóculo, de tal forma que en el caso de un grado alto de

inóculo se observó un aumento de la población bacteriana en las muestras tratadas con APH y almacenadas posteriormente a la temperatura de 12°C, probablemente debido a las condiciones de temperatura ambiente.

Por el contrario, en aquellas muestras en las que se realizó un inóculo bajo, no fue posible la detección del patógeno después de los primeros días de almacenamiento, en concreto el segundo día para las muestras almacenadas a 4°C, probablemente debido a que la baja temperatura retrasa el crecimiento de *Salmonella* (Lerasle et al., 2014). En otro estudio anterior, se informó de que la población de *S. Enteritidis* en jamón cocido disminuyó ~ 5 log UFC / g después de la aplicación de APH a una presión de 450 MPa durante 5 minutos, no aumentando la población de *Salmonella* de forma significativa durante los primeros 35 días de almacenamiento a 4°C, pero sí que lo hizo a una temperatura superior, de 10°C (Montiel et al., 2015).

Por último, cabe destacar que el principal microorganismo superviviente tras someter las muestras a la técnica de APH y dominante en los rebrotes durante el almacenamiento fue *Br. thermosphacta*, probablemente debido a la competición con otros microorganismos y a la ausencia total de atmósfera gaseosa, dando ambos factores como resultado un cambio de la microbiota dominante de gramnegativas que cede dicho dominio del medio a las especies grampositivas, siendo las más abundantes en estos casos las bacterias del ácido láctico y *Br. thermosphacta* (Stanbridge y Davies, 1998). Con todo ello, se podría deducir que el tratamiento con la técnica de APH

fue capaz de aumentar la vida útil del producto, en este caso los filetes de pollo, de forma segura para el consumidor para un almacenamiento de 6 días a 4°C o bien, a un almacenamiento de 2 días a 12°C.

6. CONCLUSIONES

- Se puede constatar que los resultados más favorables a lo largo de los 4 estudios son aquellos, consecuencia de la aplicación de una presión de 600 Mpa durante un periodo de 7-8 min y a una temperatura de entre 23 y 27°C. En este caso, se han utilizado un equipo de altas presiones con capacidad de 2,5 litros y pudiendo operar hasta 700 Mpa alcanzando una temperatura de hasta 90°C, por lo que ambos sería perfectamente válidos a la hora de obtener resultados favorables.
- La efectividad de inactivación de microorganismos tras el tratamiento con altas presiones es notable tanto para frutas y verduras como para productos cárnicos, el problema se presenta en la posterior conservación de dichos alimentos en los días posteriores. Se ha constatado que en el caso de los rebrotes, en frutas y verduras es menos usual que proliferen bacterias potencialmente patógenas aunque sí pueden proliferar Enterobacterias y firmicutes. Sin embargo, en alimentos cárnicos es más común el rebrote por *Br. Thermospacta*.
- Se ha observado que en todos los estudios la inactivación bacteriana ha sido notable, aunque se ha producido una reducción de especies gram negativas en mayor medida (Proteobacterias, *Pseudomonas* y *Salmonella*). También es necesario destacar que en aquellos alimentos que fueron tratados con bacteriocina en combinación con la APH los resultados fueron más duraderos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., y Galvez, A., 2010. Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2, 77- 89.

Argyri, A. A., Papadopoulou, O. S., Nisiotou, A., Tassou, C. C., y Chorianopoulos, N., 2018. Effect of high pressure processing on the survival of *Salmonella Enteritidis* and shelf-life of chicken fillets. *Food Microbiology*, 70, 55–64.

Baert, L., Debevere, J., Uyttendaele, M., 2009. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 83-94.

Balny, C., y Masson, P., 1993. Effect of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9, 611–613.

Barbosa-Cánovas, G.V., Bermúdez-Aguirre, D., 2010. Procesamiento no térmico de los alimentos: Nonthermal processing of food. *Scntia Agropecuaria*, 1, 81-93.

Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E., Swanson, B.G., 1998. Efectos biológicos y aplicaciones de los campos eléctricos pulsados

para la conservación de alimentos. En: Conservación no térmica de alimentos. Zaragoza, España: Acribia S.A.

Baumann, P., 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *Journal of Bacteriology*, 96, 39–42.

Bernardet, J. F., Nakagawa, Y. 2006. An introduction to the family Flavobacteriaceae. En: *The Prokaryotes (Vol. 7): Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria* (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Eds.), pp. 455–480. Springer.

Blanco Fuentes, C.A., Gómez Pallares, M., Ronda Balbás, F., Caballero Calvo, P.A., 2006. Técnicas avanzadas de procesado y conservación de alimentos. Universidad de Valladolid: Secretariado de Publicaciones e Intercambio Editorial.

Brown, K.L., 2000. Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin*, 56, 158–171.

Cano, M.P., De Ancos, B., Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., 2006. Tecnología de altas presiones para la conservación de alimentos. Capítulo 3. En: (Blanco Fuentes, C.A., Gómez Pallares, M., Ronda Balbás, F., Caballero Calvo, P.A., Eds.). Técnicas avanzadas de procesado y conservación de alimentos. Universidad de Valladolid: Secretariado de Publicaciones e Intercambio Editorial.

Casp Vanaclocha, A., y Abril Requena, J., 2008. Proceso de conservación de alimentos. España: Mundi-Prensa.

Cheftel, J.C., 1995. High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, 1, 75–90.

Considine, K.M., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Sleator, R.D., 2008. High-pressure processing – effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, 281, 1–9.

Daryaei, H., Yousef, A.E., y Balasubramaniam, V.M., 2016. Microbiological aspects of high-pressure processing of food: inactivation of microbial vegetative cells and spores. In *High pressure processing of food*. Springer, New York, NY. 271- 294.

Galvez, A., Lucas-Lopez, R., Abriouel, H., Valdivia, E., y Ben Omar, N., 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 125-152.

García-Parra, J., y Ramírez, R., 2019. New Preservations Technologies: Hydrostatic High Pressure Processing and High Pressure Thermal Processing. In *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2018, ISBN 9780081005965, Encyclopedia.

Grande Burgos, M. J., Perez-Pulido, R., Lopez Aguayo, M. C., Galvez, A., y Lucas, R., 2014. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (12), 22706-22727.

Grande Burgos, M. J., Lopez Aguayo, M. C., Perez-Pulido, R., Galvez, A., y Lucas, R., 2017. Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by high-hydrostatic pressure. *Food Research International*, 99, 91–97.

Guamis, B., Trujillo, T., Ferragut, V., Daoudy, L., 2006. Aplicaciones de las altas presiones en la industria alimentaria. Capítulo 4. En: (Blanco Fuentes, C.A., Gómez Pallares, M., Ronda Balbás, F., Caballero Calvo, P.A. Eds.). *Técnicas avanzadas de procesado y conservación de alimentos*. Universidad de Valladolid: Secretariado de Publicaciones e Intercambio Editorial.

Hayakawa, I., Kanno, T., Tomita, M., Fujio, Y., 1994. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. *Journal of Food Science*, 59, 159–163.

Heinz, V., Knorr, D., 2001. Effects of high pressure on spores. In: (Hendrickx, M.E.G., Knorr, D. Eds.). *Ultra High Pressure treatments of foods*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van der Broeck, I., Weemaes, C., 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 197–203.

Herrero, A.M., Romero de Ávila, M.D., 2006. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 50, 71–74.

Homma, N.; Ikeuchi, Y.; Suzuki, A., 1994. Effects of high pressure treatment on the proteolytic enzymes in meat. *Meat Science*, 38, 219–228.

Hogan, E., Kelly, A.L., y Sun, D.W., 2005. Procesamiento de alta presión de los alimentos: una descripción general. *Tecnologías emergentes para el procesamiento de alimentos* (Sun Da Wen, ed), pp. 3-31. Prensa académica.

Jofré, A., Garriga, M., Aymerich, T., 2008. Inhibition of *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science*, 78, 53–59.

Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M., 2009. Improvement of the food safety of low acid fermented sausages by enterocins A and B and high pressure. *Food Control*, 20, 179– 184.

Kiera M. Considine, Alan L. Kelly, Gerald F. Fitzgerald, Colin Hill, Roy D. Sleator., 2008. High-pressure processing – effects on microbial food safety and food quality, *FEMS Microbiology Letters*, 281 (1), 1–9.

Kopper G., Calderon G., Gutierrez G., 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Roma: FAO 2009; 195 p.

Knorr, D., 1993. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 47, 156–161.

Knorr, D., 1995. High pressure processing of foods. En: (Ledward, D.A.; Johnson, D.E.; Earnshaw, R.G.; Hasting, A.P.G. Eds.), United Kingdom: Nottingham University Press.

Kovač, K., Diez-Valcarce, M., Hernandez, M., Raspor, P., Rodríguez-Lázaro, D., 2010. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 558–568.

Ledward, D.A., Johnston, D.E., Earnshaw, R.G., Hasting, A.P.M., 1995. En: (High pressure processing – The potential. High pressure processing of foods. Ed), Nottingham University Press.

Lerasle, M., Guillou, S., Simonin, H., Anthoine, V., Chéret, R., Federighi, M., Membré, J.-M., 2014. Assessment of Salmonella and Listeria monocytogenes level in ready-to-cook poultry meat: Effect of various high pressure treatments and potassium lactate concentrations. *International Journal in Food Microbiology*, 186, 74–83.

Mertens, B., 1995. Tratamiento de alimentos con presión hidrostática: equipos y procesamiento. *Nuevos métodos de conservación de alimentos* (Gould EW, Eds.), pp. 135-158. Blackie Academic y Professional, Londres, Reino Unido.

Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Medina, M., 2015. Reuterin, lactoperoxidase, lactoferrin and high hydrostatic pressure on the inactivation of food-borne pathogens in cooked ham. *Food Control*. 51, 122-128.

Morales, P., Calzada, J., Rodríguez, B., De Paz, M., Nuñez, M., 2009. Inactivation of Salmonella Enteritidis in chicken breast fillets by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Foodborne Pathology Disease*, 6, 577-581.

Morcillo Ortega, G., Cortés Rubio, E., García López, J.L., 2011. *Biología y Alimentación*. Madrid, España: Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED).

Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C., 1994. Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12, 493–501.

Murchie, L.W., Cruz-Romero, M., Kerry, J.P., Linton, M., Patterson, M.F., Smiddy, M., Kelly, A.L. 2005. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 257–270.

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M., & Camper, A. K., 2007. Use propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5111–5117.

Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., Hendrickx, M. 2008b. Effect of high pressure processing on colour, texture and flavor of fruits and vegetables bases food products. A review *Trends in Food Science & Technology*, 19, (6), 300-328.

Organización Mundial de la Salud (OMS)., 2015. Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Recuperado el 28 de mayo de 2021 de:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200047/1/WHO_FOS_15.02_spa.pdf.

Patterson, M.F., 2005. Microbiology of pressure-treated foods: A Review. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1400–1409.

Perez-Pulido, R., Toledo del Arbol, J., Grande-Burgos, M. J., y Galvez, A., 2012. Bactericidal effects of high hydrostatic pressure treatment singly or in combination with natural antimicrobials on *Staphylococcus aureus* in rice pudding. *Food Control*, 28, 19-24.

Pérez Pulido, R., Toledo, J., Grande, M. J., Gálvez, A., y Lucas, R., 2015. Analysis of the effect of high hydrostatic pressure treatment and enterocin AS-48 addition on the bacterial communities of cherimoya pulp. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 62–69.

Rastogi, N.K., Raghavaro, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M.M., Niranjan, K., Knorr, D., 2007. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 69–112.

Raventós, M., 2017. *Industria alimentaria: tecnologías emergentes*. Barcelona. ES: Universitat Politècnica de Catalunya, 2003. ProQuest ebrary. Web. 21 February 2017.

Señorans, F.J., Ibañez, E., y Cifuentes, A., 2006. New Trends in Food Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (5), 507-526.

Smiddy M, O'Gorman L, Sleator RD, Kerry JP, Patterson MF, Kelly AL y Hill C., 2005. Mayor resistencia a la alta presión de las bacterias en las ostras

que en el tampón. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 83–90.

Stanbridge, L.H., Davies, A.R., 1998. The microbiology of chill stored meat. En: (Davies, A.R., Board, R.G. Eds.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 174–219.

Tananuwong, K., Chitsakun, T., Tattiyakul, J., 2012. Effects of high-pressure processing on inactivation of *Salmonella Typhimurium*, eating quality, and microstructure of raw chicken breast fillets. *Journal in Food Science*, 77, E321-E327.

Toledo del Árbol, J., Pérez Pulido, R., Grande Burgos, M. J., Gálvez, A. y Lucas, R., 2016. Inactivation of leuconostocs in cherimoya pulp by high hydrostatic pressure treatments applied singly or in combination with enterocin AS-48. *Food Science and Technology* 65, 1054-1058

Toledo del Árbol, J., Pérez Pulido, R., La Storia, A., Grande Burgos, M. J., Lucas, R., Ercolini, D., y Gálvez, A., 2016. Changes in microbial diversity of brined green asparagus upon treatment with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 1–8.

Torres, J.A., Velázquez, G., 2005. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67, 95–112.

Torrens H.R., Argilagos G.B., Cabrera M.S., Valdés J.B., Sáez S.M., Viera G.G., 2015. Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 16 (8), 1-27.

Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M., Simal-Gándara, J., 2001. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 3, 66–80.

Velázquez, G., Gandhi, K., Torres, J.A., 2002. Hydrostatic pressure processing: a review. Biotam, 12, 71–78.

Velázquez, G., Vázquez, P., Vázquez, M., J.A. Torres., 2005. Avances en el procesado de alimentos por alta presión Advances in the food processing by high pressure Avances no procesado de alimentos por alta presión. Ciencia y tecnología alimentaria, 4 (5), 353-367.

Williams, A., 1994. New technologies in food processing: Part II. Nutrition and Food Science, 1, 20–23.

Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., y Spellberg, B., 2017. Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: A century of challenges. Clinical Microbiology Reviews, 30 (1), 409–447.

Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y., 2010. Preservation technologies for fresh meat
– A review. *Meat Science*, 86, 119–128.