



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**CONSERVACIÓN DE CARNE
MEDIANTE TRATAMIENTOS
COMBINADOS DE ALTAS
PRESIONES HIDROSTÁTICAS
Y NISINA**

Alumno/a: Granero Expósito, Laura María

Tutor/a: Grande Burgos, María José
Dpto: Microbiología

Julio, 2019

RESUMEN

A lo largo de los últimos años las preferencias de los consumidores han llevado a investigaciones en la aplicación de nuevas tecnologías y alternativas para desarrollar productos de mejor calidad y que no comprometan la seguridad alimentaria. Por ello las altas presiones hidrostáticas (HPP) han proporcionado un método alternativo, viable y económico a los procesos térmicos. El siguiente estudio se centra en determinar si los tratamientos de HPP a 300 MPa y 400 MPa combinados, o no, con nisina son eficaces en la reducción de microorganismos en carne, al igual que comprobar si son capaces de eliminar a patógenos como *Listeria*. Se puede observar que *Listeria innocua* es una bacteria muy resistente y que no basta un único tratamiento para poder eliminarla por completo, sino que el uso de tratamientos combinados de HPP junto con bioconservantes naturales como la nisina son los mecanismos más eficaces para su eliminación y en general, aumentan el periodo de vida útil del alimento.

Palabras clave: Bioconservación, nuevas tecnologías, altas presiones hidrostáticas (HPP), patógenos, conservantes naturales, Nisina.

ABSTRACT

Over the last few years, consumer preferences have led to research into the application of new technologies and alternatives to develop better quality products that do not compromise food safety. Therefore, high hydrostatic pressures processing (HPP) have provided an alternative, viable and economical to thermal processes. The following study focuses on determining whether HPP treatments at 300 MPa and 400 MPa combined, or not, with nisin are effective in reducing microorganisms in meat, as well as checking whether they are capable of eliminating pathogens such as *Listeria*. It can be observed that *Listeria innocua* is a very resistant bacterium and that a single treatment is not enough to eliminate it completely, but the use of combined treatments of HPP together with natural bioconservatives such as nisin are the most effective mechanisms for microorganism elimination and in general, they increase the useful life of the food.

Keywords: Bioconservation, new technologies, high hydrostatic pressures (HPP), pathogens, natural preservatives, Nisin

Tabla de contenido

MÁSTER EN AVANCES EN SEGURIDAD DE LOS ALIMENTOS	1
CENTRO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO	1
INTRODUCCIÓN	4
1. DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS A LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS	4
2. EXTENSIÓN POR EL MUNDO	4
3. DESCRIPCIÓN GENERAL, AVANCES Y BENEFICIOS	5
3.1. ALIMENTOS QUE DEBEMOS USAR PRINCIPALMENTE	7
3.2. ALERGIA	7
4. FUNCIONAMIENTO Y MECANISMO	8
4.1. TIPOS DE TRATAMIENTOS DE HPP	9
4.2. <i>NO ELIMINA TODAS LAS ESPORAS</i>	11
4.3. <i>NO ELIMINA TODOS LOS MICROORGANISMOS</i>	12
4.3.1. NISINA	13
4.3.2. LISTERIA	15
4.4. <i>TRATAMIENTO EN CARNES</i>	17
5. CALIDAD DE LOS ALIMENTOS TRATADOS CON HPP	18
6. VIABILIDAD ECONÓMICA DEL HPP	18
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
TIPO DE CARNE	20
MEDIOS UTILIZADOS	20
MEDIO TSA	20
MEDIO PALCAM	21
MEDIO TSB	22
AGUA DE PEPTONA	23
SOLUCIÓN SALINA	23
<i>LISTERIA INNOCUA</i>	24
NISINA	24
TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	24
MÁQUINA DE ALTAS PRESIONES	25
TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES (HPP)	26
INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS	28
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

INTRODUCCIÓN

1. De los tratamientos térmicos a las altas presiones hidrostáticas

Las preferencias de los consumidores a lo largo de los últimos años con los alimentos mínimamente procesados han llevado a los investigadores a centrarse en la aplicación de nuevas tecnologías y alternativas para desarrollar productos de mejor calidad sin comprometer la seguridad alimentaria (Kapetanakou et al., 2016). Los microbiólogos de alimentos han buscado modelos eficientes que puedan describir y predecir el crecimiento microbiano y sus consecuencias durante el almacenamiento de los alimentos (Baranyi y Roberts, 1994). El tratamiento térmico ha sido la base de la mayoría de los procesos que se aplican industrialmente para garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos y las nuevas tendencias de los consumidores han llevado la innovación tecnológica hacia alimentos mucho más saludables, nutritivos y convenientes (Malone et al., 2003). La mayoría de los alimentos que se procesan en la actualidad se tratan con calor para matar las bacterias y esto suele disminuir la calidad del producto. Los procesos que se realizan con la alta presión hidrostática proporcionan otro método para matar las bacterias de los alimentos sin perder la calidad sensorial o los nutrientes de éstos (Ramaswamy et al., 2004). El HPP es un método no térmico de conservación de alimentos que podría representar una alternativa a la pasteurización (Malone et al., 2003). Tiene una clara ventaja respecto a los tratamientos térmicos, ya que produce alimentos de calidad y valor nutricional superiores a los productos procesados térmicamente (Smelt, 1998). El tratamiento de HPP se remonta a la investigación de Hite en 1899, hace más de un siglo y ha sido considerado como uno de los más prometedores de la tecnología no térmica utilizada en alimentos (Knorr, 1993), y ha recibido una atención especial como alternativa viable económica y tecnológica a los procesos térmicos (Patterson, 2005).

2. Extensión por el mundo

Es un método de procesamiento que está creciendo debido a su capacidad demostrada para extender económicamente la vida útil y preservar la calidad de los alimentos, ya que no se aplica calor (Rastogi et al., 2007). El tratamiento de HPP es una técnica eficaz para destruir microorganismos e inactivar las enzimas para mejorar la seguridad de los alimentos. Por lo tanto, ya es una realidad en la industria alimentaria

y se ha extendido por todo el mundo (Bermúdez-Aguirre et al., 2011). Después del 2000, el número de máquinas de HPP instaladas para la industria alimentaria aumentó exponencialmente (Tonello et al., 2011). En estos momentos, el HPP se está utilizando en los Estados Unidos, Europa y Japón en una variedad selecta de alimentos de alto valor. En los Estados Unidos, Avure Technologies (Kent, WA) vende equipos de HPP de tamaño comercial (215 litros) y sistemas semicontínuos para el procesamiento de líquidos transparentes como los zumos, por lo que ya es un hecho que existen equipos a escala comercial disponibles (Ramaswamy et al., 2004). La mermelada fue uno de los primeros productos en ser comercializados después de un tratamiento de HPP, su éxito ha hecho que se comercialicen otros productos, como las jaleas y mariscos en Japón, las ostras y el guacamole en los Estados Unidos y los zumos de frutas en Francia, México y el Reino Unido (Smelt, 1998; Torres y Velázquez, 2005). Más recientemente, el HPP se ha extendido y ya incluye productos alimenticios como salsa, productos de arroz, pescado, kits de comidas (que contienen carnes y verduras cocidas tratadas a alta presión), productos de aves de corral y otras carnes listas para comer (Murchie et al., 2005; Goh et al., 2007). Los alimentos tratados con altas presiones actualmente se consideran alimentos novedosos ya que cumplen con dos criterios: se ha empleado un nuevo proceso de fabricación en su producción y su historia de consumo humano, hasta la fecha, ha sido mínima (Hogan et al., 2005).

3. Descripción general, avances y beneficios

El proceso de alta presión hidrostática (HPP) es un método de procesamiento de alimentos en el que estos se someten a presiones elevadas (aproximadamente 6000 atmósferas), con o sin la adición de calor, para lograr la inactivación microbiana o para conseguir alterar el alimento. El procesamiento por altas presiones puede llegar a causar cambios, aunque mínimos, en las características frescas de los alimentos cuando eliminamos la degradación térmica (Ramaswamy et al., 2004). De acuerdo con el principio de Le Chatelier, la presión hidrostática minimiza el volumen del material presurizado de manera homogénea. Como los enlaces covalentes no se rompen por la presión (Mozhaev et al., 1994), los componentes originales de los alimentos no se modifican en el proceso.

Tiene un gran potencial para producir alimentos con una vida útil más prolongada, como ya hemos mencionado en el punto anterior, al hacer que los productos alimenticios sean microbiológicamente más seguros y, por lo tanto, mejoran su calidad. Es un método que ha avanzado continuamente debido a un mejor diseño de la maquinaria y se ha convertido en un medio de fabricación comercialmente viable para lograr la inactivación microbiana. Por supuesto debemos tener en cuenta que en ocasiones conseguir la inactivación microbiana mediante HPP podría llegar a producir, y aumentar, cambios perjudiciales en el color de los alimentos, el sabor, el contenido nutricional y las propiedades sensoriales, si no se realiza una selección adecuada de la presión (Hendrickx et al., 1998; San Martín et al., 2002; Olsen et al., 2010; Buckow et al., 2013). El HPP solo afecta a los enlaces no covalentes (es decir, a los enlaces iónicos, hidrófobos e hidrógeno), lo que significa que las estructuras de proteínas primarias permanecen intactas, mientras que pueden ocurrir alteraciones en las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias desplegándose las proteínas (Ross et al., 2003; Rastogi et al., 2007). Pero si el tratamiento se hace de forma correcta no afecta a las vitaminas, aminoácidos, compuestos de sabor y otras moléculas pequeñas (Puppo et al. 2011). Esta tecnología emergente, como ya hemos dicho anteriormente, permite la reducción de microorganismos que originan el deterioro del alimento, pero puede mantenerse el nivel de población de la microbiota superviviente a niveles bajos durante el almacenamiento (Fuentes et al., 2010). La capacidad de destrucción o inactivación de los microorganismos por la alta presión hidrostática varía según el nivel de presión, el tiempo y la temperatura de presurización, el tipo de microorganismo y su etapa de crecimiento, así como la composición de los alimentos (principalmente según el pH y la actividad del agua) (Rosenthal y Silva, 1997; Calderón-Miranda et al., 1998). El tratamiento puede garantizar la destrucción de hasta 8 unidades logarítmicas en ciertos tipos de bacterias, sin llegar a alterar el sabor y el valor nutricional de los alimentos (Dogman y Erkmen, 2004).

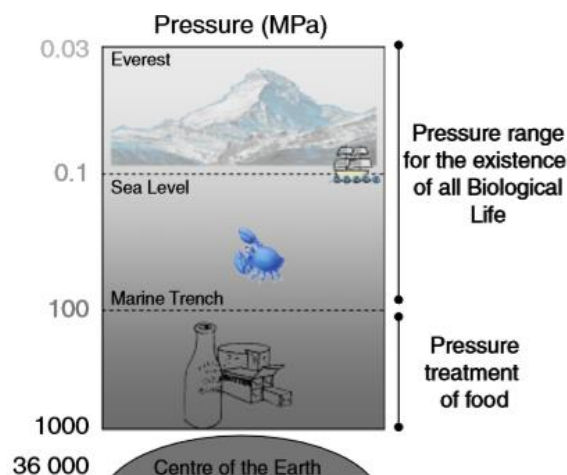


Imagen 1. Representación esquemática de las presiones utilizadas en HPP

3.1. Alimentos que debemos usar principalmente

Como cualquier otro método de procesamiento, el HPP no puede aplicarse universalmente a todos los tipos de alimentos. Los alimentos con un alto contenido de ácidos son candidatos idóneos para la tecnología HPP. Sin embargo, los productos poco ácidos, como las sopas, aún no están disponibles comercialmente debido a que aparecen limitaciones para matar las esporas (Ramaswamy et al., 2004). Lo que está claro es que esta capacidad para erradicar microorganismos independientemente de la geometría del producto y la necesidad de usar conservantes (Zhang y Mittal, 2008) hace que esta tecnología sea segura para el consumidor (Kruk et al., 2014).

3.2. Alergia

Hay estudios que han demostrado que el procesamiento de alimentos con tratamientos térmicos o de alta presión, pueden influir en la capacidad de unión a la IgE de las proteínas en los alimentos (Cabanillas et al. 2015). La alta presión hidrostática (HPP) puede modificar la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas y alterar algunas de las estructuras del epítipo, lo que puede reducir la alergenicidad y mejorar las propiedades funcionales de las proteínas de los alimentos (Puppo et al. 2011). Según Hu et al. (2011) la alta presión induce cambios conformacionales en las proteínas del maní y sus resultados explicaron que la unión de los alérgenos del maní a la IgE disminuyó al aumentar la presión. Peñas et al. (2011) descubrieron que en las semillas de soja tratadas con HPP, la alergenicidad de los brotes de soja también

disminuyó y además, este método con semillas de soja podría usarse para el procesamiento de brotes hipoalergénicos en la industria.

4. Funcionamiento y mecanismo

A diferencia de los antimicrobianos, que normalmente se aplican a la superficie de un producto alimenticio, el HPP funciona de acuerdo con el principio isostático, en el cual la presión aplicada a una muestra a través de un medio presurizado como el agua o el aceite es instantánea y uniforme a lo largo de la muestra, independientemente de su volumen o forma, inactivando los microorganismos en toda la muestra (Rastogi et al., 2007). La inactivación de microorganismos por HPP se ha atribuido a la muerte celular, por ejemplo, en el queso, se ha demostrado que el tratamiento conduce a una reorganización de las moléculas de agua alrededor de los iones, cambiando la cantidad de moléculas de agua libres y no unidas, que afectan al equilibrio mineral, a las interacciones de las enzimas y a la conformación de las proteínas, esto se traduce en una pérdida parcial de la integridad de la membrana citoplasmática (Knorr et al., 2006). Al igual que según Sangronis et al., (1997), quien confirma que se producen cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos en los microorganismos, y que afecta especialmente a sus membranas y paredes celulares. Además, tras el estudio de Calderón-Miranda et al., (1998) se sabe que aumenta la permeabilidad celular, se inhiben las reacciones y la producción de energía al desnaturalizar enzimas que son esenciales para el crecimiento y la reproducción de los microorganismos.

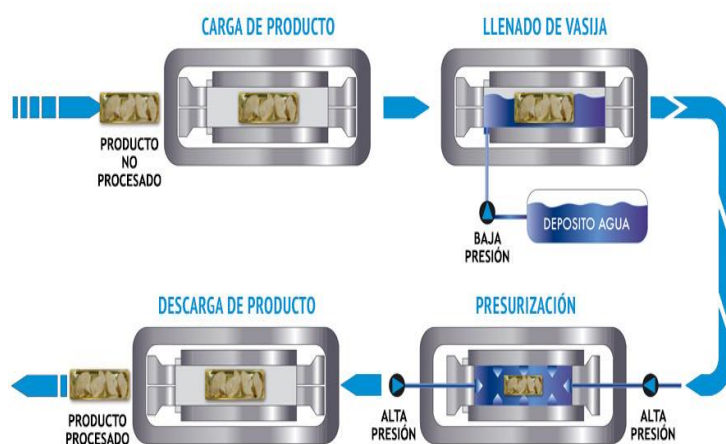


Imagen 2. Esquema de procesamiento en una máquina de HPP

4.1. Tipos de tratamientos de HPP

El tratamiento clásico HPP o HPP de un solo pulso (spHPP) consiste en ejercer presión sobre una muestra y mantenerla así durante un cierto período de tiempo para una posterior descompresión a presión atmosférica (Figura 3). Por otro lado, también puede ser posible aplicar sucesivamente altas presiones hidrostáticas de forma que exista más de un período de compresión, retención y descompresión (Figura 4). Este tipo de tratamiento se llama HPP de pulsos múltiples (mpHPP) (Schaschke, 2015).

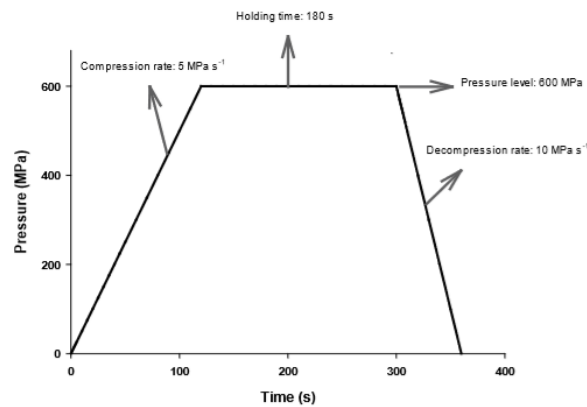


Imagen 3. Tratamiento clásico de un solo pulso spHPP

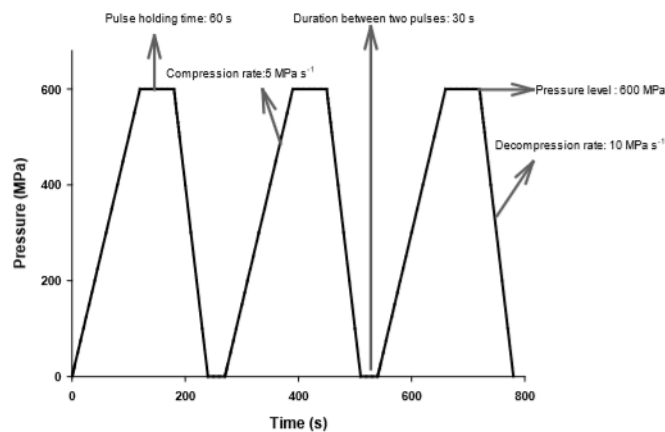


Imagen 4. Tratamiento de pulsos múltiples mpHPP

El tratamiento con mpHPP, durante el mismo tiempo de retención, es más efectivo que el tratamiento con spHPP para las enzimas (Curl and Jansen, 1949; Ludikhuyze et al., 1997), las células de levadura (Palou et al., 1998), las células bacterianas (Masschalck

et al., 2000; Rivalain et al., 2012) y la inactivación de las esporas bacterianas (Hayakawa et al., 1994; Ahn y Balasubramaniam, 2007). También se vio de que había una menor recuperación de *Escherichia coli* para el tratamiento con mpHPP en comparación con el tratamiento con spHPP (Pilavtepe-Çelik et al., 2011). Sin embargo, algunos investigadores arrojaron información sobre que el uso del tratamiento con mpHPP no inactivaba los virus (Kingsley et al., 2006) y las bacterias (López-Caballero et al., 2000; Yuste et al., 2001) en comparación con el tratamiento con spHPP. Se sabe que la presión, la temperatura y el tiempo son los parámetros de proceso más importantes del tratamiento con spHPP. Mientras que la presión y la temperatura son los parámetros más importantes para el tratamiento de mpHPP. Además, la duración del pulso, el número de pulsos, el tiempo sin presión (duración entre los pulsos), los tiempos de compresión y descompresión, y la forma del pulso (rampa, cuadrada, sinusoidal) también pueden afectar los resultados del tratamiento por mpHPP. El efecto de estos parámetros sobre la inactivación microbiana fue estudiado por Buzrul en 2014.

Puesto que este trabajo se centra en la carne, el mpHPP aplicado a la carne de aves de corral mostró que el tratamiento con mpHPP fue ligeramente mejor que el tratamiento con spHPP para los microorganismos psicrotrofos, pero el tratamiento con mpHPP no ofreció mejores resultados que el tratamiento con spHPP para los microorganismos mesófilos (Yuste et al., 2001; Yuste et al., 1998). Por otro lado, el uso del tratamiento con mpHPP demostró ser más adecuado para la inactivación de *E. coli* O157: H7 en carne molida (Morales et al., 2008) y *S. Enteritidis* en filetes de pechuga de pollo a presiones más altas (Morales et al., 2009)]. Morales et al., (2008) y Del Olmo et al., (2010) estudiaron el efecto de los tratamientos spHPP y mpHPP sobre el color y la textura de las empanadas de carne y los filetes de pechuga de pollo, respectivamente. Los cambios en el color y la textura de la carne molida causados por ambos tratamientos fueron similares.

Aunque nos encontramos con pruebas suficientes de que el tratamiento con mpHPP es una forma eficaz de inactivar los microorganismos y las enzimas, hasta la fecha no hay una aplicación comercial de dicho tratamiento. Una de las razones más importantes es que el tratamiento con mpHPP requiere una aplicación más larga y, por lo tanto, es

más costoso que el tratamiento con spHPP. Lo más probable es que se necesite un equipo de HPP más complejo que pueda soportar velocidades rápidas de compresión y descompresión (para reducir la duración total del tratamiento). A medida que la tecnología mejora, puede ser posible tener velocidades de compresión y descompresión más rápidas, por lo que se alcanzarían tiempos de tratamiento compatibles para las aplicaciones comerciales del mpHPP (Rivalain et al., 2012; Kingsley et al., 2006; Burzul, 2014; Burzul et al., 2009; Alemán et al., 1998).

4.2. No elimina todas las esporas

El HPP aún no se puede usar en productos poco ácidos como verduras, leche o sopas debido a la incapacidad de este proceso para destruir las esporas sin agregar calor. Sin embargo, se puede utilizar para prolongar la vida útil refrigerada de estos productos y para eliminar el riesgo de diversos patógenos transmitidos por los alimentos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria* (Ramaswamy et al., 2004). El uso de la alta presión como un método para la inactivación de las esporas en los alimentos ha sido ampliamente explorado desde finales de los años sesenta. Clouston y Wills (1969) fueron los primeros en reconocer el potencial de HPP para la inactivación de las esporas, identificaron que las altas presiones inician la germinación de las esporas de *Bacillus pumilus*. Dicha germinación sugirió la capacidad de HPP para hacer germinar y posteriormente inactivar las esporas a temperatura ambiente. Este tipo de tratamiento sería ideal ya que mantendría los aspectos sensoriales y nutricionales de los alimentos que a menudo se pierden por un proceso térmico tradicional.

Las esporas bacterianas son las más resistentes si las comparamos con las esporas de hongos y levaduras, y tienen el mayor potencial de crecimiento de toxinas que causan brotes en los alimentos. Por lo tanto son el principal blanco de los procesos de pasteurización y esterilización de alimentos (Evelyn y Silva, 2018a). El formador de esporas más peligroso en los alimentos bajos en ácido es *Clostridium botulinum* (Carlin et al., 2000a; Gould, 1999). Puede producir neurointoxicaciones (Brown, 2000). Se han llegado a utilizar temperaturas de 90 a 116 ° C combinadas con presiones de 500 a 700 MPa de 3 a 5 minutos para inactivar una serie de cepas esporuladas de *Clostridium botulinum*, según lo descrito por (Margosch et al., 2004a).

Las ascosporas de mohos resistentes al calor, como *Byssochlamys*, *Neosartorya* y *Talaromyces*, normalmente se consideran extremadamente resistentes a HPP (Smelt, 1998; Chapman et al., 2007). Desafortunadamente, la inactivación de las endosporas por HPP ha resultado ser un desafío mayor de lo esperado (Black et al., 2007b). Tradicionalmente, el procesamiento térmico a una temperatura relativamente alta (121°C o superior) es una forma eficiente de eliminar las esporas. Sin embargo, la alta temperatura compromete las propiedades organolépticas y causa algunos efectos perjudiciales para la calidad nutricional de los alimentos sensibles al calor. Las esporas de diferentes especies y cepas pueden tener resistencias muy diferentes a la HPP (Nakayama et al., 1996). La temperatura de esporulación, la presencia de germinantes (Van Opstal et al., 2004), el pH (Wuytack y Michiels, 2001) y la temperatura de tratamiento (Ananta et al., 2001) pueden afectar a la germinación y a la inactivación posterior de las esporas por HPP.

En los últimos años, los conocimientos de los diferentes mecanismos de germinación de esporas inducidas por la presión han aumentado. Varios estudios han confirmado dos mecanismos separados de germinación mediante HPP, uno a presiones relativamente bajas (100–300 MPa) que involucran receptores de nutrientes, y el otro a presiones más altas (400–800 MPa), que involucran la liberación de ácido dipicolínico (Wuytack et al., 1998; Paidhungat et al. 2002; Black et al 2005b, 2007b). A medida que se sabe más sobre la germinación inducida por la presión resulta más fácil diseñar procesos mucho más específicos para la inactivación de las esporas en los alimentos. Se podría decir que las esporas bacterianas germinan fácilmente bajo presión, en presencia de germinantes nutrientes, a pH neutro y a temperaturas >30°C.

4.3. No elimina todos los microorganismos

La alta presión es una técnica que se utiliza comercialmente para la conservación de productos alimenticios ácidos, ya que los alimentos con un pH cercano al neutro son un medio mejor para el crecimiento de microorganismos que sobrevivieron al tratamiento a presión (Smelt, 1998). El HPP no conduce necesariamente a la muerte celular sino a una lesión en las células que explica su posterior crecimiento después de que se haya realizado el tratamiento (Ritz et al., 2001; López-Pedemonte et al., 2007). Las células procariotas tienden a ser más resistentes a la presión que las eucariotas

(Patterson, 1999). En general, las bacterias gram-positivas son más resistentes al calor y la presión que las bacterias gram-negativas, y los cocos son más resistentes que las bacterias en forma de bastón. En comparación, las levaduras y los mohos son relativamente sensibles al HPP (Smelt, 1998).

Hay muchos factores que afectan la sensibilidad de los microorganismos a los tratamientos de HPP, incluida la magnitud de la presión, el tiempo y la temperatura de presurización, las especies y las cepas microbianas, la fase de crecimiento celular y el medio de suspensión. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli O157: H7* se encuentran entre los microorganismos más extensamente estudiados en cuanto a la inactivación por altas presiones (Styles et al., 1991; Mackey et al., 1994; Patterson y Kilpatrick, 1998; Berlin et al., 1999; Calik et al., 2002 ; Smiddy et al., 2005; Jofré et al., 2008)

Se han detectado diferencias en la resistencia a HPP entre diferentes cepas de *E. coli O157: H7* en suspensiones celulares (Alpas et al., 1999; Benito et al., 1999). Patterson et al., (1995), mostraron que *E. coli O157: H7* era más resistente a la presurización cuando se encontraba en leche UHT que en carne de ave. De acuerdo con Haubenetal et al., (1998), el calcio proporcionaría protección contra la inactivación por presión en *E. coli*, estas propiedades podemos encontrarlas en los alimentos con calcio como la leche.

Una de las posibilidades para lograr el aumento de la inactivación de bacterias en alimentos de baja acidez es usar la presión y combinarlo con factores antimicrobianos. Se sabe que la lisozima, la lactoperoxidasa, la lactoferrina, la lactoferricina, la nisina y la pediocina aumentan la efectividad del tratamiento de HPP en la inactivación de algunas bacterias. Además, la alta presión induce la permeabilización de la membrana externa en bacterias Gram-negativas y sensibiliza las células a la acción de bacteriocinas y lisozima (Masschalck et al., 2001; Nakimbugwe et al., 2006).

4.3.1. Nisina

Si disminuimos la intensidad del tratamiento de HPP reducimos el impacto producido en las propiedades de los alimentos, pero también se disminuirían sus efectos sobre la inactivación de los microorganismos. Por ello si aplicamos tratamientos de HPP de baja

intensidad combinándolos con antimicrobianos naturales probablemente habría un mayor efecto sobre la inactivación microbiana (Ortega et al., 2018). Chien et al., (2016, 2017) y Sheen et al., (2018) desarrollaron modelos lineales y no lineales que describían la inactivación de HPP en patógenos transmitidos por los alimentos en combinación con compuestos antimicrobianos y demostraron con éxito sus resultados.

La nisina es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* sp., la cual puede ser letal contra las bacterias gram-positivas, incluidas las especies formadoras de esporas *Clostridium* y *Bacillus*. Se ha utilizado como conservante de alimentos durante más de 50 años en una variedad de productos, incluidos quesos procesados y alimentos enlatados, donde su función principal es suprimir el crecimiento de esporas que inducen el deterioro (Delves-Broughton et al., 1996). Se ha descrito anteriormente que las combinaciones de HPP y nisina funcionan de forma conjunta para inactivar las bacterias gram-positivas y gram-negativas (Kalchayanand et al., 1998; Garcia-Graells et al., 1999; Black et al. 2005a). La nisina actúa sobre las bacterias gram-positivas formando poros en las membranas celulares (Ruhr y Sahl, 1985) o interrumpe la glucosilación uniéndose al lípido II, el cual es un precursor de la biogénesis de la pared celular (Wiedemann et al., 2001; Hasper et al., 2006). La combinación de nisina y HPP también mostró fuertes efectos contra *E. coli* (Steeg et al., 1999), que fueron más efectivos a bajas temperaturas. Además, la mortalidad de *E. coli* aumentó con la adición de nisina antes de los tratamientos de HPP en la leche (García-Graells et al., 1999) y en carne (Garriga et al., 2002). Steeg et al., (1999) estudiaron la inactivación sinérgica de algunas bacterias cuando se usó HPP en presencia de nisina a una temperatura de 10°C. El efecto de la nisina es mayor durante una reducción de la temperatura. Además, los datos de los que disponemos según diversos estudios mostraron un mayor nivel de inactivación microbiano con HPP a temperaturas bajo cero que en un rango de temperatura por encima de 0°C (Hashizume et al., 1995; Hayakawa et al., 1998; Moussa et al., 2006; Perrier-Cornet et al., 2005; Ponce et al., 1998; Reyns et al., 2000).

La nisina es una bacteriocina muy utilizada para productos cárnicos y está aprobada por la FDA para la reducción de *Listeria* spp. (Nilsson et al., 1997). Kang et al., (2014) informaron en su investigación que 10 µg de nisina / g era la concentración más

efectiva contra *L. monocytogenes* cuando se inoculó en salmón ahumado. Es más, la nisina no tuvo efecto en el aspecto, color, aroma o características de textura del salmón del Atlántico (Han et al., 2016).

4.3.2. *Listeria*

Listeria monocytogenes es una bacteria psicrotrófica, y es considerada una importante preocupación para la seguridad alimentaria en la industria debido a su capacidad para crecer y sobrevivir en diferentes tipos de alimentos bajo una amplia gama de condiciones ambientales (Das et al., 2016). Entre todas las especies de *Listeria*, solo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se han descrito como patógenos, la primera es la única especie de importancia para la salud pública ya que es un patógeno transmitido por los alimentos, mientras que la última no afecta a los humanos, siendo responsable del aborto en animales (Rocourt y Buchrieser, 2007). La incidencia de listeriosis varía entre 2,4 y 4,8 por millón de personas en diferentes países (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA 2016; Marder et al., 2017) y los síntomas más comunes son septicemia, meningitis o aborto. Estos casos tienen lugar en grupos de riesgo bien definidos, como por ejemplo a individuos inmunocomprometidos, ancianos, mujeres embarazadas y recién nacidos. Por ello es una preocupación importante para la industria alimentaria ya que en la Unión Europea, la listeriosis afectó a unas 2.200 personas en 2015, causando 270 muertes, el número más alto jamás informado en la UE. Los brotes de listeriosis están relacionados con el consumo de productos lácteos, incluidos los productos pasteurizados (EFSA, 2016; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, CDC, 2013).

Según los estudios de Lado y Yousef (2007), las temperaturas superiores a 50°C son letales para *L. monocytogenes*. Luego, la pasteurización eliminaría a *Listeria*, pero el patógeno puede volver a contaminar el alimento (en el caso de este estudio, el queso) después del tratamiento térmico por medio del entorno en el que se realiza el procesamiento o en las superficies que se encuentran en contacto con los alimentos, así como durante el proceso de fabricación de éste o en el posterior envasado. Además, en varias investigaciones se ha demostrado que *L. monocytogenes* puede sobrevivir durante largos períodos en plantas de producción de alimentos mediante la producción de biopelículas (Lado y Yousef, 2007; Cruz y Fletcher, 2012). Por ello

debemos tener muy en cuenta la contaminación de los alimentos listos para el consumo por *L. monocytogenes* durante las operaciones de procesamiento, ya que estos productos generalmente no se someten a tratamientos letales antes del consumo (Bover-Cid et al., 2015). El Reglamento Nº 2073/2005 de la Comisión Europea exige que los operadores de alimentos demuestren que los alimentos listos para el consumo no superan el límite de 100 UFC/g de esta bacteria durante su vida útil (Comisión Europea, 2005).

En las últimas dos décadas se ha puesto mucho empeño en optimizar y poner a punto el proceso comprendiendo así las cinéticas de inactivación de *L. monocytogenes* en alimentos procesados usando HPP (Bover-Cid et al., 2011; Chen, 2007b). Hay varios modelos predictivos disponibles para la inactivación por HPP de *L. monocytogenes* o *Listeria innocua*, un sustituto de *L. monocytogenes* en sistemas simulados de alimentos (Ates et al., 2016; Doona et al., 2012), ya sea en productos cárnicos (Bover-Cid et al., 2011, 2015; Carlez et al., 1993; Hereu et al., 2012; Lerasle et al., 2014; Rubio et al., 2018) o en peces (Ramaswamy et al., 2008). En una amplia variedad de productos alimenticios como guacamole, salsa, zumos de frutas, carnes, mariscos y quesos se demostró que la aplicación de HPP es un método eficaz para la inactivación de patógenos, como *L. monocytogenes* y organismos del deterioro en condiciones de temperatura ambiente (Rastogi et al., 2007; Zhang y Mittal, 2008; Van Hekken et al., 2013).

La aparición de *Listeria monocytogenes* en las instalaciones de producción de alimentos, especialmente en la industria cárnica, requiere un control y un enfoque constantes por parte de los manipuladores de alimentos y los gestores de riesgos (Buchanan et al., 2017). Los productos cárnicos con una vida útil relativamente larga, como las salchichas cocidas, el jamón cortado en lonchas y el salami fermentado, se incluyen principalmente entre los alimentos implicados en casos de listeriosis en todo el mundo (Nastasijevic et al., 2017). Algunos productos cárnicos tratados con HPP, como cortes de carne de cerdo y pollo, jamón entero y en lonchas, pavo, salchichas y chorizo, actualmente se encuentran en puntos de venta en España (Sun y Holley, 2010).

4.4. Tratamiento en carnes

En el sector cárnico, la aplicación de estos tratamientos está aumentando continuamente, en particular para mejorar la vida útil y la seguridad de los productos cocidos crudos y en rodajas (Khan et al., 2014). Cuando los productos cárnicos se almacenan en condiciones de refrigeración o microaerofílicas, como el envasado al vacío, las bacterias del ácido láctico muy a menudo predominan en el deterioro de la carne. Normalmente, el recuento inicial de bacterias del ácido láctico en productos cárnicos envasados al vacío es bajo, pero aumenta durante el almacenamiento en refrigerado y puede causar un deterioro evidente cuando el recuento alcanza de 7 a 8 log 10 UFC/g (Santos et al., 2005; Vermeiren et al., 2005).

Massaux et al. (1999) estudiaron la calidad de la carne de cerdo a la que se le realiza un tratamiento de alta presión hidrostática, pudieron ver que la congelación-descongelación bajo una presión de 100 MPa es el proceso más eficiente para la carne de cerdo, sin exudado, lo que reduce el tiempo de descongelación, la decoloración y el endurecimiento de la textura. Aunque aún no se sabe cómo serían los comportamientos de supervivencia que involucran a proteínas, grasas y otros ingredientes con HPP realizados a una presión (por ejemplo, de hasta 400 MPa) y baja temperatura (por ejemplo, - 15 ° C) por lo que se necesitan realizar más estudios.

El tratamiento a alta presión puede inducir la oxidación de lípidos en la carne, dependiendo del tiempo de procesamiento y especialmente del nivel de presión aplicado y el origen de la carne. La oxidación de lípidos inducida por el HPP en la carne se ha relacionado con una mayor accesibilidad del hierro de las hemoproteínas, la rotura de la membrana y la formación de radicales a alta presión (Bolumar et al., 2016). El uso de antioxidantes naturales de plantas (por ejemplo, extractos de romero y ajo) en productos cárnicos se ha demostrado que minimiza la oxidación de lípidos inducida por la presión en varios productos cárnicos (Alves et al., 2012; Bolumar, et al., 2016; Mariutti et al., 2008). Hay que tener en cuenta que los productos cárnicos son matrices complejas con diferentes propiedades físicas y composición química variada, los cuales influyen en la letalidad de los microorganismos durante el proceso de HPP. La combinación de los antimicrobianos naturales (por ejemplo, compuestos bioactivos de plantas) y los antioxidantes (compuestos fenólicos de plantas) a través de

diferentes mecanismos durante el HPP, pueden ser un medio eficaz e innovador para mejorar la estabilidad de los productos cárnicos procesados (Hygrieva y Pandey, 2016).

5. Calidad de los alimentos tratados con HPP

La calidad de los alimentos tratados con HPP es muy similar a la de los productos alimenticios frescos y la pérdida de calidad se ve más influida por el almacenamiento y la distribución posterior en lugar del tratamiento a alta presión (Ramaswamy et al., 2004).

Se ha demostrado que la apariencia y el color de los alimentos influyen significativamente en las ventas al consumidor. Puede llegar a producirse cierto grado de desnaturalización de las proteínas durante el tratamiento con HPP, como se ha dicho anteriormente, de ciertos alimentos con alto contenido de proteínas, pero los cambios resultantes en la funcionalidad física y/o los cambios en el color del producto crudo son mucho menores que los experimentados con las técnicas de procesamiento térmico de toda la vida (Hogan et al., 2005). De hecho, la desnaturalización de las proteínas puede ser reversible dependiendo de las condiciones del tratamiento (temperatura, tiempo y presión) y también del tipo de proteínas (Rastogi et al., 2007). Usando condiciones de HPP de 100–300 MPa, las proteínas generalmente, aunque no siempre, se desnaturalizan, disuelven o precipitan de manera reversible (Thakur y Nelson, 1998).

6. Viabilidad económica del HPP

El rendimiento del producto tiene una importancia económica muy elevada para los fabricantes de alimentos y el tratamiento con HPP en general proporciona un mayor rendimiento del producto alimenticio en comparación con el tratamiento térmico como se lleva viendo a lo largo de muchos estudios, y sus efectos dependen del tipo de producto y la intensidad del tratamiento (Hugas et al., 2002).

Una máquina de alta presión a escala comercial cuesta entre \$500,000 y \$2.5 millones de dólares dependiendo de la capacidad del equipo y el alcance de la automatización. Los productos procesados con altas presiones hidrostáticas pueden costar algo más

que los productos procesados térmicamente. Con dos máquinas de HPP de 215 litros, que operan bajo las condiciones típicas de procesamiento de alimentos, se puede lograr un rendimiento de aproximadamente 20 millones de libras al año. Y por supuesto, mientras que crece la demanda de equipos de HPP, el coste de capital y el coste de operación continuarán disminuyendo (Ramaswamy et al., 2004).

Según algunas estimaciones de la industria, tratar los alimentos a alta presión representa actualmente un mercado de \$2 mil millones. América del Norte (EE.UU., Canadá y México), Europa (España, Italia, Portugal, Francia, Reino Unido y Alemania), Australia y Asia (Japón, China y Corea del Sur) lideran la comercialización de tecnología de alta presión. La producción total de estos productos crece constantemente (Hewson, 2008). En 2008, se estima que 200.000 toneladas métricas/año (aproximadamente 450 millones de libras/año) estarán disponibles comercialmente en todo el mundo (Samson, 2008).

Hormel Foods, Kraft Foods, Perdue, Foster Farms y Wellshire Farms son ejemplos de procesadores de carne que han utilizado con éxito la tecnología para una amplia variedad de productos cárnicos, los cuales están listos para comer y mínimamente procesados. Varios procesadores de mariscos, como *Motivatit Seafoods*, también han empleado HPP para mejorar la seguridad alimentaria y la vida útil de los mariscos. Otros segmentos del mercado que emplean tratamiento a presión incluyen zumos, bebidas y productos vegetales (Samson, 2008).

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fundamentalmente son determinar si los tratamientos a altas presiones hidrostáticas (300 MPa y 400 MPa) combinados, o no, con nisina son eficaces en la reducción de los microorganismos en la carne, y ver si son capaces también de eliminar patógenos como *Listeria*, en este caso se utiliza *Listeria innocua* para una simulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de carne

En este trabajo se ha analizado una muestra de cinta de lomo de cerdo que proviene de una gran superficie comercial. Esta parte del animal es rica en proteínas y tiene menos grasas que otras carnes, además posee un alto contenido en nutrientes.

La carne fue tratada con agua de peptona, se introdujo tanto la carne como el agua de peptona en una bolsa y una vez ahí se comenzó a masajear la carne para que soltara las sustancias necesarias para formar el extracto de carne que posteriormente sería utilizado en el estudio.

Medios utilizados

Medio TSA

Es un medio general que permite el crecimiento y desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos, incluyendo bacterias aerobias y anaerobias. En este medio, la tripteína y la peptona de soja aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimidínicas, minerales y vitaminas. La peptona de soja es una fuente de hidratos de carbono que favorecen el crecimiento de gran cantidad de microorganismos muy diversos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es un agente solidificante.

Medio TSA	g/l
Tripteína	15
Peptona de soja	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

Tabla 1. Composición del medio de cultivo TSA

Medio PALCAM

Es un medio selectivo y diferencial para su uso en el aislamiento y recuento de las especies de *Listeria* a partir de muestras alimentarias. Normalmente se utiliza para detectar *Listeria monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales. La base de agar sangre Columbia suministra los nutrientes y cofactores necesarios para el crecimiento de *Listeria*. La selectividad en el medio se consigue mediante la presencia de cloruro de litio, sulfato de polimixina B, acriflavina-HCl y ceftazidima, ésta suprime el crecimiento de la mayoría de los microorganismos diferentes de las especies de *Listeria* presentes en la muestra. La diferenciación se basa mayormente en la hidrólisis de esculina y la fermentación del manitol. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina, es por eso que se oscurece el medio a su alrededor. Aunque a veces pueden crecer otro tipo de microorganismos como enterococos o estafilococos, por eso el manitol y el indicador de pH, el rojo fenol, se han añadido para diferenciar las cepas fermentadoras de manitol de las especies de *Listeria*.

Medio PALCAM	g/l
Bacto Columbia Blood Agar base	39
Manitol	10
Glucosa	0,5
Esculina	1
Citrato férrico de amonio	0,5
Cloruro de litio	15
Rojo fenol	0,08
Clorhidrato de acriflavina	0,005
Sulfato de poliximina B	0,01
Ceftazidima	0,008
Bacto Agar	2

Tabla 2. Composición del medio de cultivo PALCAM

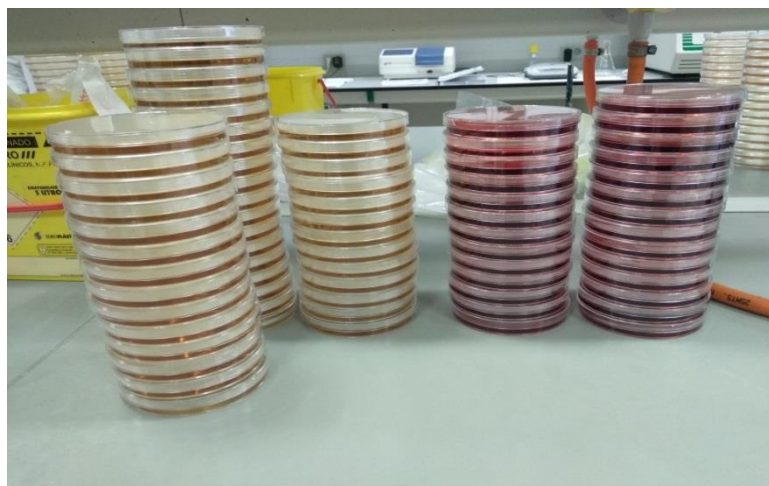


Imagen 5. Placas de TSA y PALCAM

Medio TSB

Este medio de cultivo tiene los mismos componentes que TSA, excepto el agente gelificante agar, por lo que se utiliza como medio líquido para crecimiento y enriquecimiento de uso general utilizado en procedimientos cualitativos para pruebas de esterilidad y para enriquecer y cultivar microorganismos. Es muy nutritivo y favorece el crecimiento de microorganismos como bacterias anaerobias facultativas y aerobias. Los digeridos enzimáticos de caseína y harina de soja proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas. La glucosa (dextrosa) sirve como fuente de energía. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico y el fosfato potásico dibásico actúa como tampón para controlar el pH.

Medio TSB	g/l
Bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína)	17
Bacto Soytone (digerido péptico de harina de soja)	3
Glucosa (dextrosa)	2,5
Cloruro sódico	5
Fosfato dipotásico de hidrógeno	2,5

Tabla 3. Composición del medio de cultivo TSB

Agua de peptona

Es un medio que se utiliza como diluyente y para enriquecer a bacterias a partir de alimentos. Se fundamenta en un enriquecimiento no selectivo, la peptona proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. También puede utilizarse como diluyente de muestras en reemplazo de solución fisiológica y como medio base para fermentación de hidratos de carbono.

Agua de Peptona	g/l
Peptona de carne	10
Cloruro de sodio	5

Tabla 4. Composición del medio de cultivo Agua de peptona

Solución salina

Es una solución estéril de cloruro de sodio al 0,9% (p/v) en agua. En microbiología se utiliza para diluir la concentración de células bacterianas con el fin de proporcionar una concentración más adecuada que nos permita un conteo en placa, analizar propiedades genéticas o metabólicas, lavar las células en preparación para su estudio o preparar inóculos normalizados.

Con los medios **TSA** y **PALCAM** se realizó un número abundante de placas para nuestros posteriores ensayos. Con el **Agua de Peptona** se preparó un matraz con unos 200 ml para tener suficiente y poder realizar una dilución con el extracto de carne. El medio **TSB** líquido es necesario para sembrar un cultivo overnight de *Listeria innocua*, por lo que preparamos alrededor de 60 ml que distribuimos en tubos. Y por último 800 ml de **Solución Salina**, necesaria para realizar diferentes diluciones a lo largo de todo el estudio. Todos los medios fueron esterilizados en el autoclave al igual que el material que se utilizó.

Listeria innocua

Listeria innocua es un microorganismo inocuo para el ser humano como su propio nombre indica, por ello se utiliza en ensayos en laboratorio en lugar de utilizar *Listeria monocytogenes*, la cual si es un patógeno. En nuestro caso, se inocularon 3 tubos de TSB con la bacteria *Listeria innocua* y se dejaron 24h en la estufa. Se utilizaron posteriormente para inocular algunas de nuestras muestras.

Nisina

La nisina es un antibiótico de origen natural, producido por una cepa de la bacteria *Streptococcus lactis*, en nuestro estudio fue utilizado como conservante alimenticio o aditivo. La nisina puede comprarse como un preparado comercial.

Tratamiento de las muestras

El extracto de carne se dividió en dos tubos Falcon, a uno de ellos se le inoculó *Listeria innocua* al 1% (CT), tanto el que tenía *Listeria* como el que no se dividieron en 25 ml cada uno, y a uno de los que no tenía *Listeria* se le adicionó nisina (CN) al igual que a uno de los que tenía *Listeria* (CTN). Quedando de la siguiente forma: un primer tubo solo con el extracto de carne (C), un segundo con extracto de carne y nisina (CN), un tercero con extracto de carne y *Listeria* (CT) y un cuarto con extracto de carne, *Listeria* y nisina (CTN).

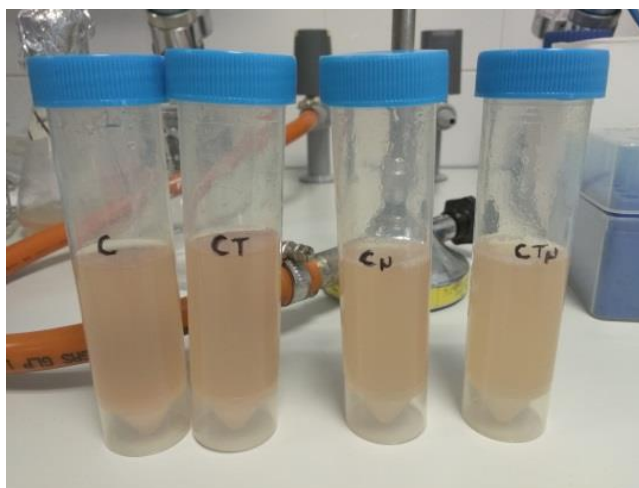


Imagen 6. Falcons con las diferentes muestras

Una vez claros las diferentes combinaciones de muestras creadas, lo que se hizo fue dividirlos en criotubos.

Cc, C1 y C2	Sin Listeria y Nisina
C3 y C4	Nisina
Tc, T1 y T2	Listeria
T3 y T4	Listeria+Nisina

Tabla 5. La nomenclatura según el tipo de muestra

Máquina de altas presiones

Las muestras tratadas por altas presiones han sido procesadas en un *equipo* Stanted Fluid Power High Pressure, modelo “Iso-Lab SystemFPG9400.922”, U.K. Este modelo trabaja a una presión máxima de 700 MPa (7000 Bar). El equipo está compuesto de:

- Canasta para muestras de 80 mm de diámetro × 50 cm de altura, donde podemos introducir las muestras para su tratamiento con alta presión.
- Cilindro de presión de doble cara y de acero forjado en níquel, aquí encontramos la solución acuosa estabilizante.
- Cámara de descompresión.
- Bomba de precarga intensificadora Stansted TC10W-0812 y bomba electro-hidráulica Stansted TC40H-1412. Fluido conductor de la bomba hidráulica Shell Tellus 22T.
- Fluidos de trabajo, el medio acuoso o agente presurizante que se utiliza es agua destilada con un porcentaje (5%) de propilenglicol, es un aceite usado como anticorrosivo y lubricante (Téllez-Luis et al., 2001). La mezcla es un estabilizante (anticongelante) la cual evita que el agua destilada se congele en el interior de la máquina y pueda ocasionar problemas.
- El equipo trabaja a temperatura ambiente entre 23 y 27 °C.



Imagen 7. Máquina de HPP de la Universidad de Jaén

Tratamiento de altas presiones (HPP)

Los criotubos también se dividieron según el tratamiento de altas presiones que iban a recibir y según las siembras en placa (medios TSA y PALCAM) de estos tratamientos que se realizarían los días posteriores para evaluar el crecimiento microbiano, los días considerados serían 0, 3, 5 y 7. Por lo tanto tuvimos que rellenar 40 criotubos en total, 10 para cada día con los diferentes tratamientos. Una vez que todos los criotubos se llenaron fueron separados según su tratamiento por alta presión y se envasaron al vacío en unas bolsas especiales.



Imagen 8. Criotubos marcados con cada tratamiento en bolsas

Los tratamientos con altas presiones consistieron en darle a las muestras seleccionadas una presión de 300 MPa y a las otras muestras seleccionadas para este tratamiento una presión de 400 MPa durante 5 minutos en ambos casos con la máquina de altas presiones.

Cc	Control
Tc	Control con Listeria
C1	300 MPa
T1	300 MPa+Listeria
C2	400 MPa
T2	400 MPa+Listeria
C3	300 MPa+Nisina
T3	300 MPa+Listeria+Nisina
C4	400 MPa+Nisina
T4	400 MPa+Listeria+Nisina

Tabla 6. La nomenclatura según el tipo de muestra y tratamiento que reciba



Imagen 9. Criotubos envasados al vacío para el tratamiento HPP

El primer día, justo después de los tratamientos se contabilizó como el día 0, ese día se sembraron diferentes diluciones de todas las muestras para los medios TSA y PALCAM, y así realizar un recuento general de microorganismos y detectar la presencia de *Listeria innocua* pasadas 24h. Los días 3, 5 y 7 se llevaron a cabo la misma metodología.

Interpretación de los datos

El número de colonias obtenidas por cada dilución se calcula como Unidades Formadoras de Colonias por ml con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias}}{\text{Factor de dilución}} \times 10 \times 10$$

El primer 10 es la dilución madre y el segundo 10 los 100 μl que se echaron en cada placa para sembrar.

RESULTADOS

Día 0

El día 0 fue considerado el día que se realizó el tratamiento de altas presiones. Algunas de las siembras que se realizaron en los medios TSA y PALCAM según diferentes diluciones fueron las siguientes:

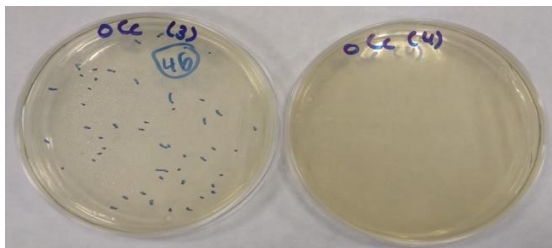


Imagen 10. Día 0, muestra Control recuento en TSA, diluciones 3 y 4. Se observa crecimiento en la dilución 3.

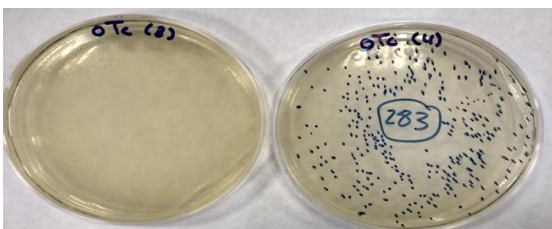


Imagen 11. Día 0, muestra inoculada con *Listeria* recuento en TSA, diluciones 3 y 4. Se observa crecimiento en la dilución 4.

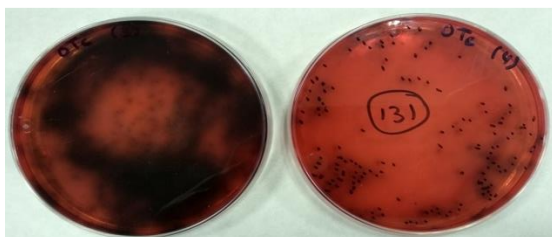


Imagen 12. Día 0, muestra inoculada con *Listeria* recuento en PALCAM, diluciones 3 y 4. Se observa crecimiento en ambas diluciones pero solo puede hacerse recuento en la dilución 4.



Imagen 13. Día 0, muestra inoculada con *Listeria* y con un tratamiento de HPP 300 MPa, recuento en TSA, observamos crecimiento en la dilución 4.

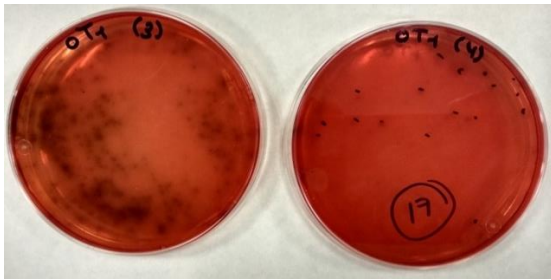


Imagen 14. Día 0, muestra inoculada con *Listeria* y tratada con HPP a 300 MPa recuento en PALCAM, diluciones 3 y 4. Observamos crecimiento en ambas

Día 0		
Tratamiento	TSA	PALCAM
Cc	$4,6 \times 10^6$	0
Tc	$2,83 \times 10^8$	$1,31 \times 10^8$
C1	3×10^4	0
T1	$6,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
C2	0	0
T2	0	0
C3	0	0
T3	0	0
C4	0	0
T4	0	0

Tabla 7. Resultados del recuento total de placas del día 0

Según la Tabla 7, podemos observar que encontramos crecimiento de microorganismos en los controles Cc y Tc (con *Listeria*), en Cc solo en el medio TSA y en Tc tanto en TSA como en PALCAM. También hay crecimiento en el tratamiento de altas presiones a 300 MPa (C1) en medio TSA y a 300 MPa muestras con *Listeria* (T1) tanto en el medio TSA como en PALCAM. En los demás tratamientos no encontramos crecimiento microbiano.

Día 3

Los resultados en imágenes según las diferentes siembras los 3 días posteriores al tratamiento de altas presiones fueron los siguientes:

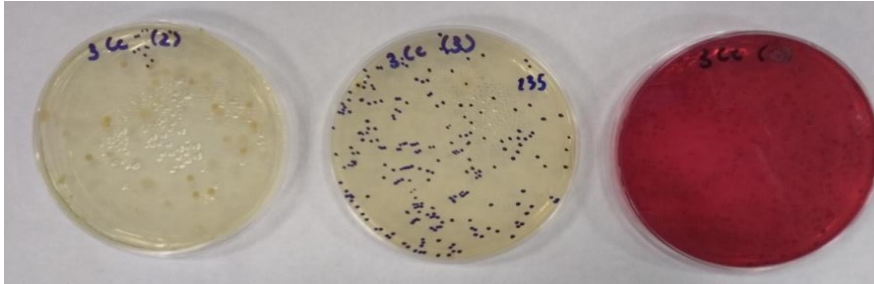


Imagen 15. Día 3, muestra Control (sin *Listeria* y sin adición de nisina) recuento en TSA y PALCAM, diluciones 2 y 3 en TSA y 0 en PALCAM. Se observa crecimiento en todas las placas de la imagen. En PALCAM el crecimiento observado no es de *Listeria*

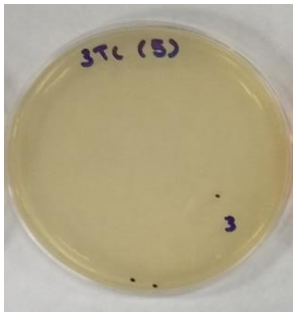


Imagen 16. Día 3, muestra inoculada con *Listeria*, recuento en TSA, dilución 5. Se observa crecimiento.

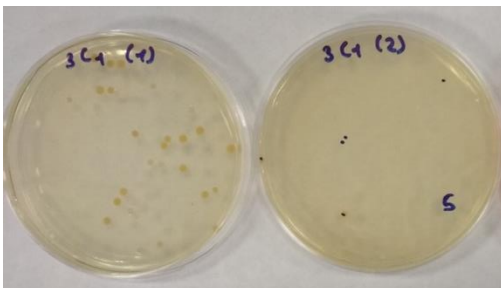


Imagen 17. Día 3, muestra control, tratamiento a 300 MPa de HPP en TSA, diluciones 1 y 2, crecimiento microbiano en ambas diluciones, se hace recuento en la dilución 2

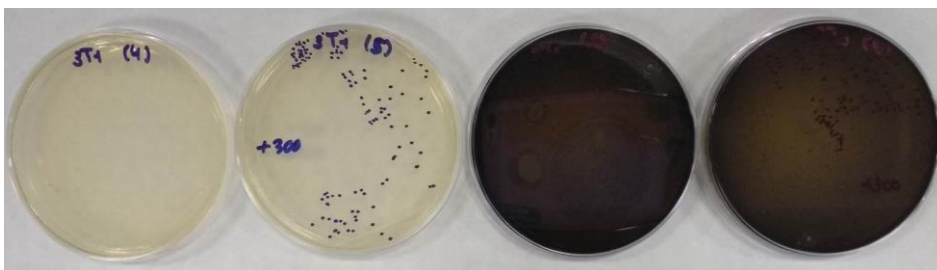


Imagen 18. Día 3, muestra inoculada con *Listeria* y tratada a 300 MPa de HPP recuento en TSA y PALCAM, diluciones 4 y 5 en TSA y diluciones 4 y 5 en PALCAM. Observamos crecimiento en todas las placas, ninguna es contable

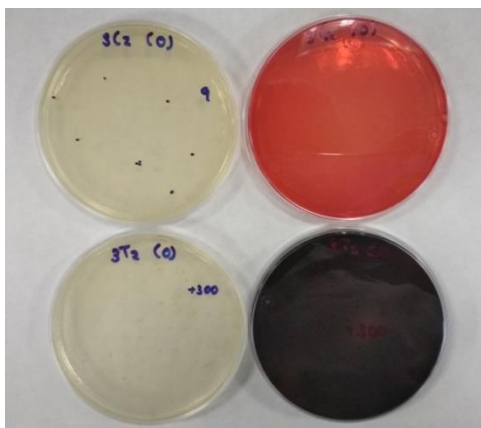


Imagen 19. Día 3, muestra control (C2), tratada a 400 MPa de HPP y muestra inoculada con *Listeria* (T2) en TSA y PALCAM, dilución 0 para todas las placas. Podemos observar crecimiento en todas menos en PALCAM de C2

Día 3		
Tratamiento	TSA	PALCAM
Cc	$2,53 \times 10^7$	0
Tc	3×10^7	3×10^6
C1	5×10^4	0
T1	3×10^4	3×10^8
C2	0	0
T2	3×10^4	3×10^4
C3	0	0
T3	0	0
C4	0	0
T4	0	0

Tabla 8. Resultados del recuento total de placas del día 3

Según la Tabla 8, podemos observar que encontramos crecimiento de microorganismos en los controles Cc y Tc (con *Listeria*), en Cc solo en el medio TSA. También hay crecimiento en el tratamiento de altas presiones a 300 MPa (C1) en el medio TSA y en el tratamiento a 300 MPa en muestras con *Listeria* (T1) en los medios TSA y PALCAM. En el tratamiento a 400 MPa para muestras con *Listeria* (T2) hay crecimiento tanto en TSA como en PALCAM. En los demás tratamientos no encontramos crecimiento microbiano.

Día 5

Los resultados en imágenes según las diferentes siembras los 5 días posteriores al tratamiento de altas presiones fueron los siguientes:

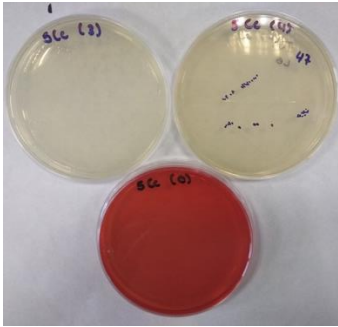


Imagen 20. Día 5, muestra Control (sin *Listeria* y nisina) en TSA y PALCAM, diluciones 3 y 4 para TSA y 0 para PALCAM. Podemos observar crecimiento en la dilución 4 de TSA.



Imagen 21. Día 5, muestra inoculada con *Listeria* en TSA, dilución 6 con crecimiento microbiano.

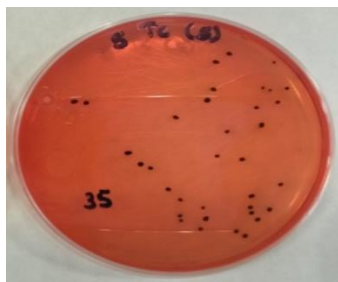


Imagen 22. Día 5, muestra inoculada con *Listeria* en medio PALCAM, dilución 5 con crecimiento

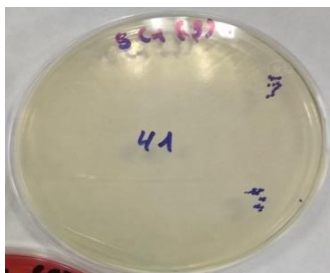


Imagen 23. Día 5, muestra control, tratamiento a 300 MPa de HPP en TSA, dilución 3 con crecimiento microbiano

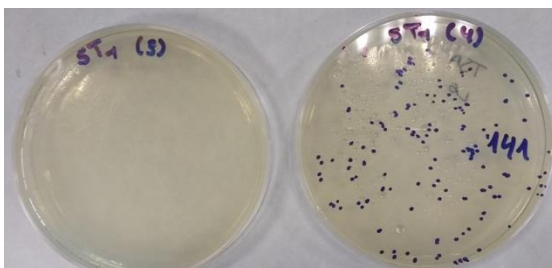


Imagen 24. Día 5, muestra inoculada con *Listeria* y tratamiento a 300 MPa, diluciones 3 y 4 en TSA.

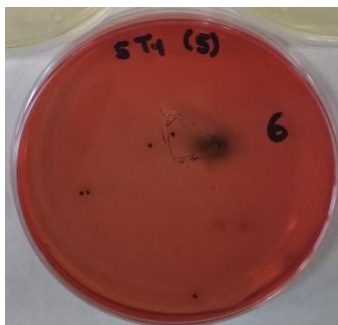


Imagen 25. Día 5, muestra inoculada con *Listeria*, tratamiento a 300 MPa, dilución 5 en Palcam con crecimiento microbiano

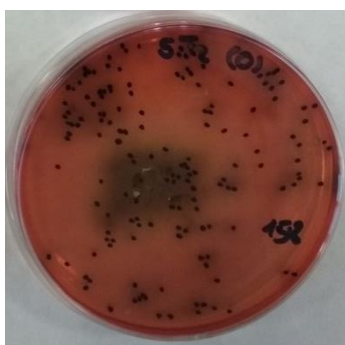


Imagen 26. Día 5, muestra inoculada con *Listeria* y tratamiento a 400 MPa, en PALCAM, dilución 0 con crecimiento microbiano

Día 5		
Tratamiento	TSA	PALCAM
Cc	$4,7 \times 10^7$	0
Tc	$2,09 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^8$
C1	$4,1 \times 10^6$	0
T1	$1,41 \times 10^8$	6×10^7
C2	0	0
T2	3×10^5	$1,58 \times 10^4$
C3	0	0
T3	0	0
C4	0	0
T4	0	0

Tabla 9. Resultados del recuento total de placas del día 5

Según la Tabla 9, podemos observar que encontramos crecimiento de microorganismos en los controles Cc y en muestras tratadas con *Listeria* Tc, en Cc solo en el medio TSA. También hay crecimiento en el tratamiento de altas presiones a 300 mPa (C1) en el medio TSA y en el tratamiento a 300 MPa con *Listeria* (T1) en los medios TSA y PALCAM. En el tratamiento a 400 MPa con *Listeria* (T2) hay crecimiento tanto en TSA como en PALCAM. En los demás tratamientos no encontramos crecimiento microbiano.

Día 7

Algunos de los resultados en imágenes según las diferentes siembras los 5 días posteriores al tratamiento de altas presiones fueron los siguientes:

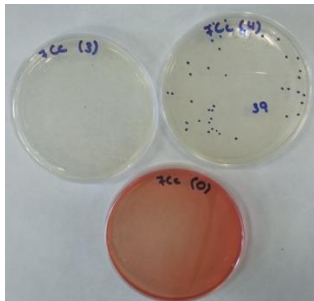


Imagen 27. Día 7, muestra Control (sin *Listeria* y nisina) en TSA y PALCAM, diluciones 3 y 4 de TSA y dilución 0 de PALCAM. Se observa crecimiento en las diluciones 3 y 4 de TSA, solo es contable la dilución 4

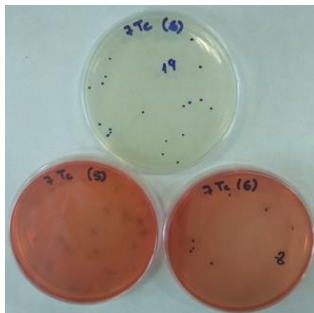


Imagen 28. Día 7, muestra inoculada con *Listeria* en TSA y PALCAM, dilución 6 en TSA y diluciones 5 y 6 en PALCAM, se cuenta la dilución 6

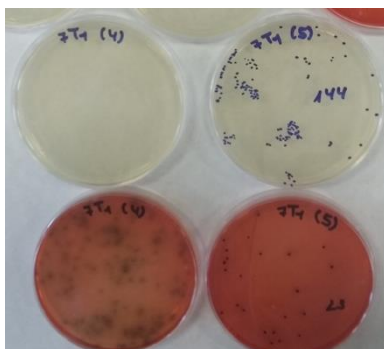


Imagen 29. Día 7, muestra inoculada con *Listeria* y tratamiento a 300 MPa en TSA y PALCAM, diluciones 4 y 5 para TSA y PALCAM, se cuenta en ambos medios la dilución 5

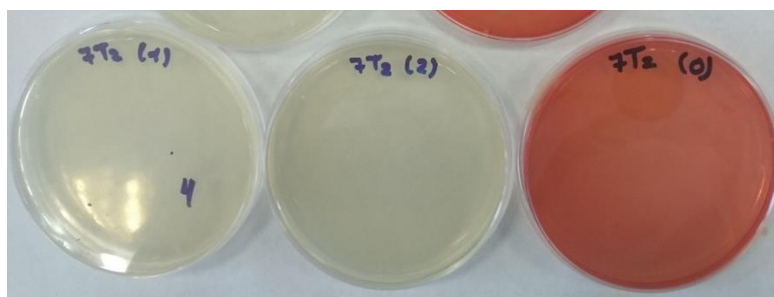


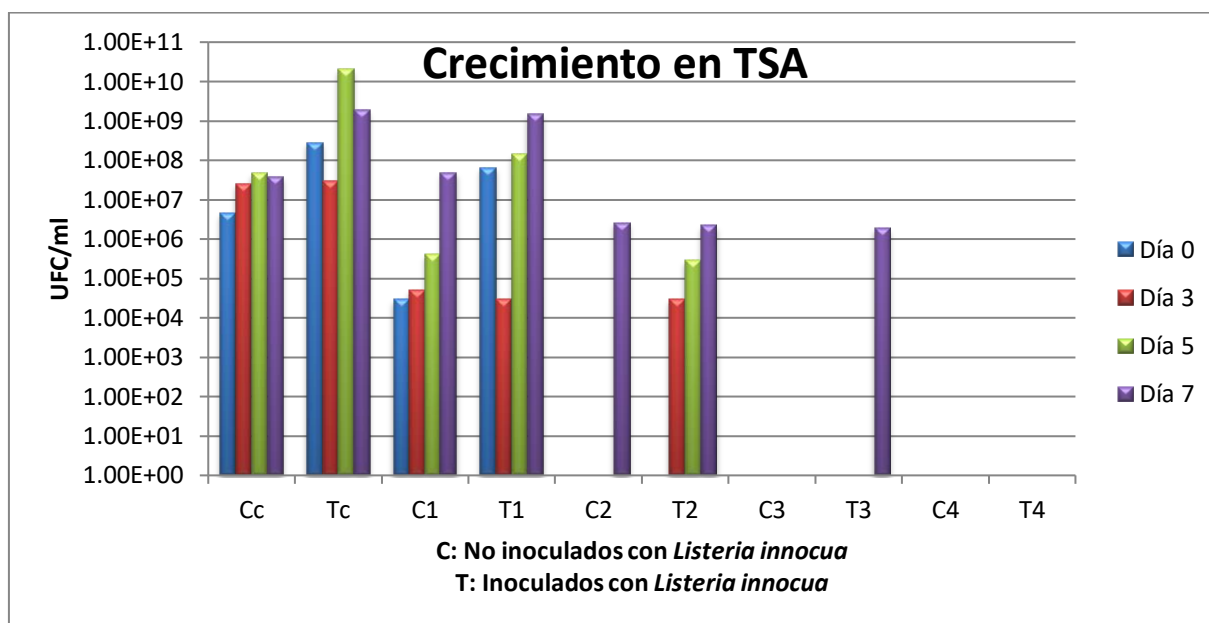
Imagen 30. Día 7, muestra inoculada con *Listeria* y tratamiento a 400 MPa en TSA y PALCAM, diluciones 1 y 2 en TSA y 0 en PALCAM, solo hay crecimiento en la dilución 1 de TSA

Día 7		
Tratamiento	TSA	PALCAM
Cc	$3,9 \times 10^7$	0
Tc	$1,9 \times 10^9$	8×10^8
C1	$4,8 \times 10^7$	0
T1	$1,44 \times 10^9$	$2,3 \times 10^8$
C2	$2,61 \times 10^6$	0
T2	$2,235 \times 10^6$	$1,925 \times 10^5$
C3	0	0
T3	$1,86 \times 10^6$	$1,55 \times 10^5$
C4	0	0
T4	0	0

Tabla 10. Resultados del recuento total de placas del día 7

Según la Tabla 10, encontramos crecimiento de microorganismos en los controles Cc y muestras con *Listeria* Tc, en Cc solo en el medio TSA. También hay crecimiento en el tratamiento de altas presiones a 300 MPa (C1) en el medio TSA y en el tratamiento a 300 MPa con *Listeria* (T1) en los medios TSA y PALCAM. En el tratamiento a 400 MPa (C2) hay crecimiento en TSA y en el tratamiento a 400 MPa con *Listeria* (T2) hay crecimiento tanto en TSA como en PALCAM. Además, en el tratamiento combinado de 300 MPa y nisina, para muestras inoculadas con *Listeria* (T3) también vemos crecimiento. En los demás tratamientos no encontramos crecimiento microbiano.

Comparación de los tratamientos a lo largo de los días en medio TSA Y PALCAM



Gráfica 1. Crecimiento total de microorganismos durante todos los días según tratamientos en el medio TSA

Según la Gráfica 1 observamos los siguientes datos:

Cc (Control): Del día 0 al día 5 vemos que existe un crecimiento de microorganismos y en el día 7 las UFC/ml apenas descienden, podríamos decir que se mantienen con el día 5.

Tc (muestra con *Listeria*): Aquí observamos que del día 0 al día 3 desciende el número de UFC/ml, el día 5 vuelve a aumentar el crecimiento de microorganismos y el día 7 desciende de nuevo.

C1 (Tratamiento a 300 MPa): Podemos ver que del día 0 al día 7 hay un crecimiento progresivo de los microorganismos.

T1 (muestra con *Listeria* y Tratamiento a 300 MPa): El día 3 las UFC/ml sufren un acusado descenso respecto al día 0 y en los días 5 y 7 observamos gran crecimiento de los microorganismos respecto al día 3.

C2 (Tratamiento a 400 MPa): No encontramos crecimiento microbiano hasta el día 7.

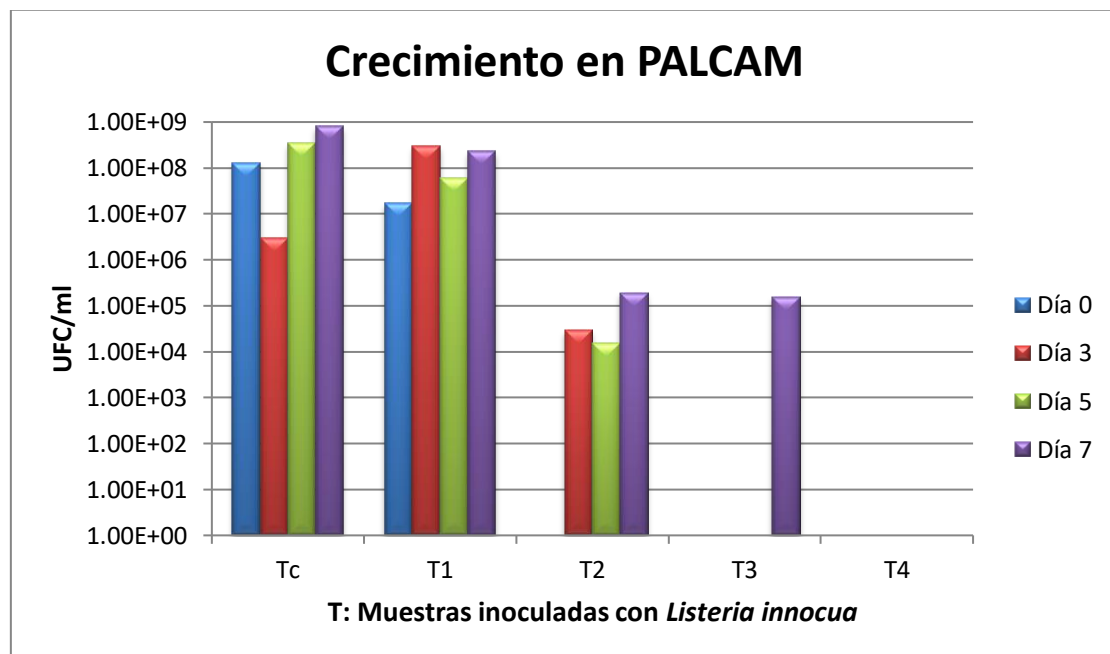
T2 (muestra con *Listeria* y Tratamiento a 400 MPa): Hasta el día 3 no hay crecimiento microbiano, en los días 5 y 7 vemos un crecimiento progresivo de las UFC/ml respecto al día 3.

C3 (Tratamiento a 300 MPa combinado con nisina): No hayamos crecimiento microbiano.

T3 (muestra con *Listeria* y Tratamiento a 300 MPa combinado con nisina): Solo encontramos microorganismos en el día 7.

C4 (Tratamiento a 400 MPa combinado con nisina): No hay crecimiento microbiano.

T4 (muestra con *Listeria* y Tratamiento a 400 MPa combinado con nisina): No se haya crecimiento microbiano.



Gráfica 2. Crecimiento total de microorganismos durante todos los días según tratamientos en el medio PALCAM

Según la Gráfica 2 observamos los siguientes datos:

Tc (muestra con *Listeria*): Del día 0 al día 3 observamos un descenso de las UFC/ml mientras que los días 5 y 7 presentan un aumento de las *Listerias* mayor que el día 0 sucesivamente.

T1 (muestra con *Listeria* y tratamiento HPP 300 MPa): Hay un crecimiento del número de *Listerias* del día 0 al día 3, posteriormente el día 5 observamos un descenso de éstas y en el día 7 nuevamente un aumento del número de UFC/ml.

T2 (muestra con *Listeria* y HPP 400 MPa): El día 0 no vemos *Listeria* en las placas, sin embargo, en el día 3 ya podemos observar crecimiento, que se mantiene con el día 5 y aumenta con el día 7.

T3 (muestra con *Listeria* y tratamiento combinado de HPP 300 MPa y nisina): Solo encontramos crecimiento el día 7.

T4 (muestra con *Listeria* y tratamiento combinado de HPP 400 MPa y nisina): No hay crecimiento de *Listeria*.

Las muestras Cc, C1, C2, C3 y C4 no se han añadido a la gráfica ya que al no estar inoculadas con *Listeria* no ha crecido nada en las placas PALCAM.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados hallados en otros estudios, después del tratamiento de altas presiones se reduce la población bacteriana, pero no se lesiona de forma letal a otros microorganismos, que luego pueden volver a crecer durante el almacenamiento. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con HPP debe ser combinado con otros métodos, como la alta o baja temperatura y los aditivos alimentarios, para lograr una mayor inocuidad microbiana en los alimentos (García-Graells et al., 1999; Wuytack et al., 2002).

En el medio TSA crecen los microorganismos que se encuentran de forma natural en la carne, por lo que en el control (Cc) donde no hemos llevado a cabo ningún tipo de tratamiento podemos ver como del día 0 al 5 hay un crecimiento progresivo debido al deterioro del alimento, hasta que en el día 7 se estabiliza el número de microorganismos y comienza a disminuir. Cuando el alimento es inoculado con *Listeria* observamos que respecto a Cc hay mayor número de (UFC/ml), esto probablemente se deba a que además de los microorganismos que normalmente encontramos en la carne hemos inoculado *Listeria*, al igual que en Cc el día 5 alcanza el mayor número de

microorganismos y a partir de ahí el número de microorganismos se estabiliza y va reduciéndose (día 7).

Cuando sometemos al alimento a un tratamiento con HPP a 300 MPa (C1) podemos deducir que es poco eficaz ya que no mata a los microorganismos y tiene lugar un crecimiento progresivo conforme avanza el tiempo. Si nos fijamos en la muestra T1, que es igual que C1 pero con *Listeria* inoculada, hay un mayor número de microorganismos por lo que podemos ver que aparece un cambio respecto a C1, sin embargo el día 3 el número de microorganismos desciende, posiblemente pueda deberse a que este tratamiento ha sido más efectivo a los 3 días. En general el alimento tratado con una presión de 300 MPa no es eficaz ni al principio ni a lo largo del tiempo.

En el tratamiento a 400 MPa (C2) no observamos crecimiento microbiano hasta el día 7 y si inoculamos *Listeria* (T2) vemos que solo es efectivo el día 0, seguramente *Listeria* sea más resistente a las altas presiones. Por lo tanto se puede decir que esta presión tampoco es efectiva pero se consigue eliminar mayor número de microorganismos que a 300 MPa.

Cuando a una presión de 300 MPa le incorporamos un tratamiento con nisina vemos que en el caso de C3 elimina todos los microorganismos, al menos, no se observa crecimiento a lo largo de los días (0-7). Pero en T3 donde hemos inoculado *Listeria* existe cierta resistencia que seguramente se deba a la de esta bacteria. En cuanto a este tratamiento deducimos que es bastante efectivo gracias al tratamiento combinado con nisina pero sigue sin ser efectivo totalmente para *Listeria*. En el tratamiento a 400 MPa combinado con nisina comprobamos que hay una gran efectividad ya que no encontramos crecimiento microbiano alguno en C4 y tampoco en T4 (con *Listeria*). Según el estudio de Lebow et al., (2017), la aplicación combinada de nisina (10 µg / g) y alta presión a 600 MPa en salmón ahumado tuvo mucho éxito, reduciendo *L. innocua* significativamente.

La cantidad de presión ejercida y el tiempo del tratamiento de HPP consigue la reducción de *L. monocytogenes* en carne como se demuestra en el estudio de Rubio et al., (2018). También Evert-Arriagada et al., (2018) coincide en que el nivel de presión aplicada es muy importante, la aplicación de tratamientos a 500 MPa y especialmente a 600 MPa sería eficaz para eliminar al microorganismo más resistente a un nivel que

no debería representar un riesgo para la salud. Y no solo eso, también tiene que ver el tipo de cepa que ha sido inoculada para el estudio, ya que en su trabajo con queso fresco comparan diferentes cepas de *Listeria*, por ello hay que tener en cuenta que usar cepas sustitutas como objetivo puede llegar a sobrestimar el efecto del tratamiento.

El medio PALCAM es selectivo para *Listeria* por lo que tan solo obtuvimos datos de recuentos en aquellas muestras en las que se le inoculó *Listeria*, eso quiere decir que en la microbiota original de la carne no había presencia de esta bacteria. En las muestras control con *Listeria* inoculada (Tc), obtenemos datos de (UFC/ml) muy similares a los obtenidos en medio TSA, también encontramos una bajada del número de microorganismos en el día 3 y una posterior subida en el día 5, en general son datos muy similares.

A 300 MPa (T1) empezamos a encontrar diferencias con el medio TSA, ya que observamos que del día 0 al día 3 hay crecimiento microbiano, y sin embargo en TSA decayó el crecimiento. Pasado el día 3, vemos que vuelve a decaer levemente el crecimiento y en el día 7 se vuelve a recuperar, por eso deducimos que para *Listeria* este tratamiento es muy poco eficaz o al menos no durante un largo periodo de tiempo superior a una semana.

A 400 MPa se aprecia que el número de (UFC/ml) es muy parecido al que aparece en el medio TSA, en ambos el día 0 no presenta crecimiento microbiano y hasta el día 3 no hay microorganismos. Los datos del día 3 en TSA y PALCAM son similares, pero en PALCAM hay un pequeño descenso de los microorganismos a diferencia de lo que ocurre en TSA, y además el día 7 vuelven a recuperarse, podemos decir que el tratamiento a 400 MPa elimina gran cantidad de *Listeria* pero no es lo suficientemente efectivo ya que vuelven a recuperarse y crecen a lo largo de los días.

A 300 MPa y con nisina (T3) se ve que tanto en TSA como en PALCAM ocurre exactamente lo mismo, solo que en TSA hay mayor número de UFC/ml, y en ambos casos hasta el día 7 no hay crecimiento microbiano, esto quiere decir que el tratamiento combinado de nisina y HPP de 300 MPa es bastante efectivo los primeros días pero no elimina a todos los microorganismos por lo que éstos terminan creciendo de nuevo.

Sin embargo, en el tratamiento combinado de nisina y HPP de 400 MPa se aprecian los mismos resultados en TSA y PALCAM, no existe crecimiento de microorganismos durante los 7 días, es decir, este tratamiento resulta ser el más eficaz de todos.

En general podemos decir que existen muchas similitudes en los datos obtenidos en TSA Y PALCAM y la mayor diferencia es que el número de UFC/ml varía, en PALCAM encontramos un menor número de microorganismos respecto a TSA (en las muestras inoculadas con *Listeria* T1,T2 y T3), lo cual es lógico, ya que en TSA no solo tenemos *Listeria*, sino también los microorganismos propios de la carne, pero hay que tener en cuenta que la diferencia de (UFC/ml) no es exagerada, los datos del medio PALCAM se acercan bastante a los del medio TSA, de ello podemos deducir el número de (UFC/ml) de *Listeria* es mucho más elevado al de los microorganismos que ya se encontraban en la carne si nos fijamos en los tratamientos control. Una vez llevados a cabo los diferentes tratamientos combinados con altas presiones y nisina también deducimos que *Listeria innocua* es una bacteria muy resistente y que no basta un único tratamiento para poder eliminarla por completo, sino que el uso de tratamientos combinados de HPP junto con bioconservantes naturales como la nisina, son los mecanismos más eficaces para su completa eliminación y aumento del periodo de vida útil del alimento como hemos podido comprobar en nuestro estudio. Liu et al., (2017) obtuvieron datos tras un tratamiento a 500 MPa durante 5 min para *E.coli*, *S. entérica*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* en leche descremada, se produjeron reducciones de manera muy diferente y se comparó la recuperación de todas las bacterias a lo largo de los días y se pudo observar que *S. aureus* fue más resistente que los otros microorganismos, seguido de *L. monocytogenes*, lo cual puede indicar que las bacterias Gram-positivas son más resistentes a las altas presiones debido a que sus paredes celulares tienen un mayor contenido de peptidoglicano.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento de HPP a 300 MPa durante 5 minutos no es eficaz, ya que a lo largo de los días aparece crecimiento microbiano en ambos medios.
2. El tratamiento de HPP a 400 MPa durante 5 minutos tampoco es eficaz aunque elimina mayor número de microorganismos que un tratamiento de HPP a 300 MPa.
3. Un tratamiento de HPP de 300 MPa durante 5 minutos combinado con un tratamiento de nisina presenta una mayor efectividad, pero sigue habiendo resistencia por parte de *Listeria innocua*.
4. Un tratamiento combinado de HPP de 400 MPa durante 5 minutos junto con un tratamiento de nisina prolonga la vida útil del alimento durante una semana.
5. Tras inocular *Listeria innocua* en el extracto de carne podemos observar que la resistencia de esta bacteria a los tratamientos con HPP es mayor que la que ofrecen el resto de microorganismos presentes en este alimento de forma natural, siendo necesario por tanto recurrir a tratamientos combinados de HPP y Nisina para eliminar a este patógeno por completo y aumentar la vida útil del alimento.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, J. y Balasubramaniam, V.M. (2007). Effects of inoculum level and pressure pulse on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores by pressure-assisted thermal processing. *J. Microbiol. Biotechnol*, 17, 616–623.
- Alemán, G.D., Ting, E.Y., Farkas, D.F., Mordre, S.C., Hawes, A.C.O. y Torres, J.A. (1998). Comparison of static and step-pulsed ultra-high pressure on the microbial stability of fresh cut pineapple. *J. Sci. Food Agric*, 76, 383–388.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P., y Ray, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4248–4251.
- Alves, A. B., Bragagnolo, N., da Silva, M.G., Skibsted, L.H., y Orlén, V. (2012). Antioxidant protection of high-pressure processed minced chicken meat by industrial tomato products. *Food and Bioprocess Processing*, 90(3), 499-505.
- Ananta, E., Heinz, V., Schluter, O. y Knorr, D. (2001). Kinetic studies on the inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2, 261–272.
- Ates, M.B., Rode, T.M., Skipnes, D., y Lekang, O.I. (2016). Modeling of *Listeria monocytogenes* inactivation by combined high-pressure and mild-temperature treatments in model soup. *European Food Research and Technology*, 242(2), 279–287.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (2016).
- Baranyi J. y Roberts T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol*, 23 (3-4), 277-94.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T. y Mackey., B. (1999). Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1564–1569.
- Berlin, D.L., Herson, D.S., Hicks, D.T. y Hoover, D.G. (1999). Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 65, 2776–2780.
- Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Cánovas, G.V. (2011). An update on high hydrostatic pressure, from laboratory to industrial applications. *Food Eng. Rev.* 3, 44–61.
- Black, E.P., Huppertz, T., Fitzgerald, G.F. y Kelly, A.L. (2007a). Baroprotection of vegetative bacteria by milk constituents: a study of *Listeria innocua*. *Int Dairy J*, 17, 104–110.
- Black, E.P., Kelly, A.L. y Fitzgerald, G.F. (2005a). The combined effect of high pressure and nisin on microorganisms in milk. *Innov Food Sci Emerg Technol* 6, 286–292.
- Black, E.P., Koziol-Dube, K., Guan, D., Wei, J., Setlow, B., Cortezzo, D.E., Hoover, D.G. y Setlow, P. (2005b). Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via activation of nutrient receptors by high pressure. *Appl Environ Microbiol.*, 71, 5879–5887.

- Black, E.P., Wei, J., Atluri, S., Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Hoover, D.G. y Setlow, P. (2007b). Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure. *J Appl Microbiol*, 101, 65–76.
- Bolumar, T., LaPena, D., Skibsted, L. H. y Orlén, V. (2016). Rosemary and oxygen scavenger in active packaging for prevention of high-pressure induced lipid oxidation in pork patties. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 26-33.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Aymerich, T. y Garriga, M. (2015). Modeling the protective effect of aw and fat content on the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *Food Research International*, 75, 194–199
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., y Aymerich, T. (2011). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology*, 28(4), 804–809.
- Brown, K. L. (2000). Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin*, 56(1), 158–171.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C. y Whiting, R.C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13.
- Buzrul, S. (2014). Multi-pulsed high hydrostatic pressure treatment of microorganisms: A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 26, 1–11.
- Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A. y Demazeau, G. (2009). Efficiency of pulse pressure treatment for inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk. *Eur. Food Res. Technol.*, 229, 127–131.
- Cabanillas, B., Cuadrado, C., Rodríguez, J., Hart, J., Burbano, C., Crespo, J.F y Novak, N. (2015). Potential changes in the allergenicity of three forms of peanut after thermal processing. *Food Chem*, 183, 18–25.
- Calderón-Miranda, M.L, González, M.F., Barbosa-Cánovas, G.V. y Swanson, B.G. (1998). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: Variables e inactivación microbiana. *Braz J Food Technol*, 1,3-11.
- Calik, H., Morrissey, M.T., Reno, P.W. y An, H. (2002). Effect of highpressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and Pacific oysters. *J Food Sci*, 67, 1507–1510.
- Carlez, A., Rosec, J.P., Richard, N. y Cheftel, J.C. (1993). High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *LWT - Food Science and Technology*.
- Carlin, F., Girardin, H., Peck, M.W., Stringer, S.C., Barker, G.C. y Martinez, A. (2000a). Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: A FAIR collaborative project. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2), 17–135.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, CDC, (2013)
- Chapman, B., Winley, E., Fong, A.S.W., Hocking, A.D., Stewart, C.M. y Buckle, K.A. (2007). Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. *Inn Food Sci Emerg Technol*, 8, 531–534.

- Chen, H. y Hoover, D.G. (2003). Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innov Food Sci Emerg* 4:25-34.
- Chien, S.Y., Sheen, S., Sommers, C.H. y Sheen, L.Y. (2016). Modeling the inactivation of intestinal pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 and uropathogenic *E. coli* in ground chicken by high pressure processing and thymol. *Front Microbiol*, 7, 920.
- Chien, S.Y., Sheen, S., Sommers, C.H. y Sheen, L.Y. (2017). Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and uropathogenic *E. coli* in ground beef by high pressure processing and citral. *Food Control*. 71, 371–375.
- Clouston, J.G. y Wills, P.A. (1969). Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilus* spores by hydrostatic pressure. *J Bacteriol* 97, 684–690.
- Comisión Europea, (2005).
- Cruz, C.D. y Fletcher, G.C. (2012). Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 26, 194-199.
- Curl, A.L. y Jansen, E.F. (1949). Effect of high pressures on trypsin and chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* 184, 45–54.
- Das, S., Lalitha, K. V., Joseph, G., Kamalakanth, C.K. y Bindu, J. (2016). High pressure destruction kinetics along with combined effect of potassium sorbate and high pressure against *Listeria monocytogenes* in Indian white prawn muscle. *Annals of Microbiology*, 66(1), 245–251.
- Del Olmo, A., Morales, P., Ávila, M., Calzada, J. y Nuñez, M. (2010). Effect of single-cycle and multiplecycle high-pressure treatments on the colour and texture of chicken breast fillets. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 441–444.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. y Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, 193–202.
- Dogman, C. y Erkmen, O. (2004). High pressure inactivation Kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juice. *J Food Eng* 62, 47-52.
- Doona, C. J., Feeherry, F. E., Ross, E. W. y Kustin, K. (2012). Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* by high-pressure processing: Pressure and temperature variation. *Journal of Food Science*, 77(8), M458–M465.
- Evelyn y Silva, F.V.M. (2018a). Inactivation of pathogenic microorganisms in foods by high pressure processing. In V.R. Rai, & J.A. Bai (Eds.). *Food safety and protection*, 343–378.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M. y Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Sci.*, 85, 506–514.
- García-Graells, C., Masschalck, B. y Michiels, C.W. (1999). Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high hydrostatic pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *J. Food Protec.* 62, 1248–1254. 9.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. y Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19, 509–518.

- Goh, E.L.C., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Buckle, K.A. y Fleet, G.H. (2007). Baroprotective effect of increased solute concentrations on yeast and moulds during high pressure processing. *InnFood Sci Emerg Technol*, 8, 535–542.
- Gould, G.W. (1999). Sous vide foods: Conclusions of an ECFF botulinum working party. *Food Control*, 10(1), 47–51.
- Han, D., Han, I. y Dawson, P. (2016). Combining modified atmosphere packaging and nisin to preserve Atlantic salmon. *J Food Prot* 6(1), 22.
- Hashizume, C., Kimura, K. y Hayashi, R. (1995). Kinetic analysis of yeast inactivation by high pressure treatment at low temperatures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1455-1458.
- Hasper, H.E., Kramer, N.E., Smith, J.L., Hillman, J.D., Zachariah, C. y Kuipers, O.P. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313, 1636–1637.
- Hayakawa, I., Kanno, T., Yoshiyama, K. y Fujio, Y. (1994). Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Sci.*, 59, 164–167.
- Hayakawa, K., Ueno, Y., Kawamura, S., Kato, T. y Hayashi, R. (1998). Microorganism inactivation using high pressure generation in sealed vessels under sub-zero temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 415-418.
- Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. y Bover-Cid, S. (2014). Analysing and modelling the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products after a high pressure treatment at 400 MPa. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 84-94.
- Hewson, G. (2008). Personal Communication. *Avure Technologies, Kent, WA*.
- Hogan, E., Kelly, A.L. y Sun, S.W. (2005). High pressure processing of foods: an overview. Emerging Technologies for Food Processing. *Sun Da Wen, ed*, 3-31.
- Hu, C., Chen, H., Gao, J., Luo, C., Ma, X. y Tong, P. (2011). High-pressure microfluidisation-induced changes in the antigenicity and conformation of allergen ara h 2 purified from chinese peanut. *J Sci Food Agric*, 91(7), 1304-1309.
- Hugas, M., Garriga, M. y Monfírt, J.M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Sci*, 62, 359–371.
- Hygreeva, D. y Pandey, M.C. (2016). Novel approaches in improving the quality and safety aspects of processed meat products through high pressure processing technology - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 175-185.
- Jofré, A., Garriga, M. y Aymerich, T. (2008). Inhibition of *Salmonella sp.* *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Sci*, 78, 53-59.
- Evert-Arriagada, K., Trujillo, A.J., Amador-Espejo, G.G. y Hernández-Herrero, M.M. (2018). High pressure processing effect on different *Listeria spp.* in a commercial starter-free fresh cheese. *Food Microbiology*, 481-486.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P. y Ray, B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Protec.*, 61, 425-431.

- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B. (1998). Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.* 15, 207-214. 19.
- Kang, J., Stasiewicz, M.J., Murray, D., Boor, K.J., Wiedmann, M. y Bergholz, T.M. (2014). Optimization of combinations of bactericidal and bacteriostatic treatments to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *Intl J Food Microbiol.*, 179, 1–9.
- Kapetanakou, A., Karyotis, D. y Skandamis, P.N. (2016). Control of *Listeria monocytogenes* by applying ethanol-based antimicrobial edible films on ham slices and microwave-reheated frankfurters. *Food Microbiol.*, 2016, 54, 80–90.
- Khan, M.A., Ali, S., Abid, M., Ahmad, H., Zhang, L., Tume, R.K., y Zhou, G. (2014). Enhanced texture, yield and safety of a ready-to-eat salted duck meat product using a high pressure-heat process. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 21, 50-57.
- Kingsley, D.H., Guan, D., Hoover, D.G. y Chen, H. (2006). Inactivation of Hepatitis A virus by high-pressure processing: The role of temperature and pressure oscillation. *J. Food Prot.* 69, 2454–2459.
- Knorr, D. (1993). Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 47,156-161.
- Knorr, D., Heinz, V., Buckow, R. (2006). High pressure application for food biopolymers. *Biochim Biophys Acta.*, 1764, 619-31.
- Kruk, Z.A., Kim, H.J., Kim, Y.J., Rutely, D.L., Jung, S., Lee, S.K. y Jo, C. (2014). Combined effects of high pressure processing and addition of soy sauce and olive oil on safety and quality characteristics of chicken breast meat. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 27, 256-265.
- Lado, B.H. y Yousef, A.E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. *E.T. Ryser, E. H. M. (Ed.), Listeria, listeriosis and food safety. CRC Press*, 157-214.
- Lebow, N., DesRocher, L., Younce, F., Zhu, M.-J., Ross, C. y Smith, D. (2017). Influence of High-Pressure Processing at Low Temperature and Nisin on *Listeria innocua*. Survival and sensory preference of dry-cured-cold-smoked salmon. *Journal of Food Science*, 82(12), 2977-2986.
- Lerasle, M., Guillou, S., Simonin, H., Anthoine, V., Chéret, R. y Federighi, 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 of Food Microbiology*, 186, 74-83.
- Liu, H.B, Li, P., Sun, C., Du, X.J, Zhang Y. y Wang, S. (2017) Inhibitor-Assisted High-Pressure Inactivation of Bacteria in Skim Milk. *Journal of food science*, 82(7), 1672-1681.
- López-Caballero, M.E., Pérez-Mateos, M., Montero, P. y Borderías, A.J. (2000). Oyster preservation by high-pressure treatment. *J. Food Prot.*, 63, 196–201.
- López-Pedemonte, T., Roig-Sagués, A., De Lamo, S., Hernández-Herrero, M. y Guamis, B. (2007). Reduction of counts of *Listeria monocytogenes* in cheese by means of high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.*, 24, 59-66.
- Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Weemaes, C.A. y Hendrickx, M.E. (1997). Kinetic parameters for pressure-temperature inactivation of *Bacillus subtilis* α -amylase under dynamic conditions. *Biotechnol. Prog.*, 13, 617–623.

- Mackey, B.M., Forestiere, K., Isaacs, N.S., Stenning, R. y Brooker, B. (1994). The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Lett Appl Microbiol.*, 19, 429–432.
- Malone, A. S., Wick, C., Shellhammer, T.H. y Courtney, P.D., (2003). High pressure effects on proteolytic and glycolytic enzymes involved in cheese manufacturing. *J. Dairy Sci.*, 86, 1139–1146.
- Marder, E.P., Cieslak, P.R., Cronquist, A.B., Dunn, J., Lathrop, S., Rabatsky-Ehr, T., Ryan, P., Smith, K., Tobin-D'Angelo, M., Vugia, D.J., Zansky, S., Holt, K.G., Wolpert, B.J., Lynch, M., Tauxe, R. y Geissler, A.L. (2017). Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2013–2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 66, 397–403.
- Margosch, D., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G. y Vogel, R.F. (2004a). Comparison of pressure and heat resistance of *Clostridium botulinum* and other endospores in mashed carrots. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2530–2537.
- Mariutti, L.R.B., Nogueira, G.C. y Bragagnolo, N. (2011). Lipid and cholesterol oxidation in chicken meat are inhibited by sage but not by garlic. *Journal of Food Science*, 76(6), C909-C915.
- Massaux, C., Béra, F., Steyer, B., Sindic, M., and Deroanne, C. (1999). “High hydrostatic pressure freezing and thawing of pork meat: quality preservation, processing times and high pressure treatment advantages,” in *Advanced in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, ed. H. Ludwig (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 485–488.
- Masschalck, B., García-Graells, C., Van Haver, E. y Michiels, C.W. (2000). Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 39-47.
- Masschalck, B., Van Houdt, R. y Michiels, Ch. (2001). High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 325-332.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E. y Michiels, Ch. (2001). Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denaturated lysozyme and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 339–344.
- Morales, P., Calzada, J., Ávila, M. y Nuñez, M. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by single-cycle and multiple-cycle high-pressure treatments. *J. Food Prot.*, 71, 811–815.
- Morales, P., Calzada, J., Rodríguez, B., de Paz, M. y Nuñez, M. (2009). Inactivation of *Salmonella Enteritidis* in chicken breast fillets by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Foodborne Path. Dis.*, 6, 577–581.
- Moussa, M., Perrier-Cornet, J.M. y Gervais, P. (2006). Synergistic and antagonistic effects of combined subzero temperature and high pressure on inactivation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 150-156.
- Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. y Balny, C. (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12(12), 493–501.

- Murchie, L.W., Cruz-Romero, M., Kerry, J.P., Linton, M., Patterson, M.F., Smiddy, M. y Kelly, A.L. (2005). High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Inn Food Sci Emerg Technol.*, 6, 257–270.
- Nakayama, A., Yano, Y., Kobayashi, S., Ishikawa, M. y Sakai, K. (1996). Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. *Appl Environ Microbiol.*, 62, 3897–3900.
- Nakimbugwe, D., Masschalck, B., Atanassova, M., Zewdie-Bosuner, A. y Michiels, C.W. (2006). Comparison of bactericidal activity of six lysozymes at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.*, 108, 355–363.
- Nastasijevic, I., Milanov, D., Velebit, B., Djordjevic, V., Swift, C., Painset, A., y Lakicevic, B. (2017). Tracking of *Listeria monocytogenes* in meat establishment using Whole Genome Sequencing as a food safety management tool: A proof of concept. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 157–164.
- Nilsson, L., Huss, H.H. y Gram, L. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int J Food Microbiol*, 38(2–3), 217–27.
- Ortega Blázquez, I., Grande Burgos, M.J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A. y Lucas, R. (2018). Treatment With High-Hydrostatic Pressure, Activated Film Packaging With Thymol Plus Enterocin AS-48, and Its Combination Modify the Bacterial Communities of Refrigerated Sea Bream (*Sparus aurata*) Fillets. *Front. Microbiol.*, 9, 314.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W.B., Hoover, D.G., Papfragkou, E. y Setlow, P. (2002). Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Appl Environ Microbiol* 68, 3172–3175.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welte-Chanes, J. y Swanson, B.G. (1998). Oscillatory high hydrostatic pressure inactivation of *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Food Prot.*, 61, 1213–1215.
- Patterson, M. (1999). High-pressure treatment of foods. *The Encyclopedia of Food Microbiology* (Robinson RK, Batt CA & Patel PD, eds), 1059–1065.
- Patterson, M.F. y Kilpatrick, D.J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation of pathogens in milk and poultry. *J Food Prot.*, 61, 432–436.
- Patterson, M.F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *J Appl Microbiol.*, 98, 1400–9.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R. y Gilmour, A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. *J. Food Prot.*, 58, 524–529.
- Peñas, E., Gomez, R., Frias, J., Baeza, M.L. y Vidal-Valverde, C. (2011). High hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products. *Food Chem.*, 125(2), 423–429.
- Perrier-Cornet, J.M., Tapin, S., Gaeta, S. y Gervais, P. (2005). High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* at subzero temperatures. *J. Biotech.*, 115, 405–412.
- Pilavtepe-Çelik, M., Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A. y Demazeau, G. (2011). Multi-pulsed high hydrostatic pressure treatment for inactivation and injury of *Escherichia Coli*. *J. Verbrauch. Lebensm.*, 6, 343–348.

- Ponce, E., Pla, R., Mor-Mur, M., Gervilla, R. y Guamis, B. (1998). Inactivation of *Listeria innocua* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure. *J. Food Protec.*, 61, 119-122. 33.
- Puppo, C., Chapleau, N., Speroni, F., De Lamballerie, M., Michel, F., Añón, M. C. y Anton, M. (2004). Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. *J Agric Food Chem.*, 52(6), 1564–1571.
- Puppo, M.C., Beaumal, V., Speroni, F., Lamballerie, M., Añón, M.C. y Anton, M. (2011). β -Conglycin soybean protein emulsions treated by combined temperatura-high-pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 25, 389-397.
- Ramaswamy, R., Balasubramaniam, V.M. y Kaletunc, Gonul. (2004). High Pressure Processing. *Fact Sheet for Food Processors*, 1, 1-3.
- Ramaswamy, H.S., Zaman, S.U. y Smith, J.P. (2008). High pressure destruction kinetics of *Escherichia coli* (O157:H7) and *Listeria monocytogenes* (Scott A) in a fish slurry. *Journal of Food Engineering*, 87(1), 99–106.
- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K. y Knorr, D., (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci.*, 47, 69-112.
- Reyns, K.M.F.A., Sootjens, C.C.F., Cornelis, K., Weemaes, C.A., Hendrickx E. y Michiels, C.W. (2000). Kinetic analysis and modeling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Int. J. Food Microbiol.*, 56, 199-210.
- Ritz, M., Tholozan, J.L., Federighi, M. y Pilet, M.F. (2001). Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microb.*, 67, 2240-7.
- Rivalain, N., Roquain, J., Boiron, J.M., Maurel, J.P., Largeteau, A., Ivanovic, Z. y Demazeau, G. (2012). High hydrostatic pressure treatment for the inactivation of *Staphylococcus aureus* in human blood plasma. *New Biotechnol.*, 29, 409–414.
- Rocourt, J. y Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position. In: E.T. Ryser, E. H. M. (Ed.), *Listeria, listeriosis and food safety*. *CRC Press.*, 1-20.
- Rosenthal, A., Silva, J.L. (1997). Alimentos sob pressão. *Engenharia de Alimentos.*, 14, 37-39.
- Ross, A.I.V., Griffiths, M.W., Mittal, G.S. y Deeth, H.C. (2003) Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol* 89, 125–138.
- Rubio, B., Possas, A., Rincón, F., García-Gímeno, R., Martínez, B. (2018). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation by high hydrostatic pressure processing in Spanish chorizo sausage. *Food Microbiology.*, 69, 18-24.
- Rubio, B., Possas, A., Rincón, F., García-Gímeno, R. M., y Martínez, B. (2018). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation by high hydrostatic pressure processing in Spanish chorizo sausage. *Food Microbiology*, 69, 18–24.
- Ruhr, E. y Sahl, H.G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 841–845.
- Samson, C.T. (2008). Personal communication. *Spain: NC Hyperbaric*.

- Sangronis, E., Pothakamury, U., Ramos, A.M., Ibraiz, A., Barbosa Cánovas, G.V. y Swanson, B.G. (1997). La alta presión hidrostática: Una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentaria*, 283, 33-43.
- Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H. y Bje Orkroth, J. (2005) Characterization and identification of lactic acid bacteria in "Morcilla de Burgos". *Int J Food Microbiol.*, 97, 285-296.
- Schaschke, C.J. (2005). Multi-Pulsed High Hydrostatic Pressure Treatment of Foods. *Foods*, 4, 173-183.
- Sheen, S., Huang, C.Y., Ramos, R., Chien, S.Y., Scullen, B., y Sommers, C. (2018). Lethality prediction for *Escherichia coli* O157:H7 and Uropathogenic *E. coli* in ground chicken treated with high pressure processing and trans-cinnamaldehyde. *J Food Sci.*, 83, 740-749.
- Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 152-158.
- Smiddy, M. y Kelly, A.L. (2005). High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Inn Food Sci Emerg Technol.*, 6, 257-270.
- Steeg, P.F., Hellemons, J.C y Kok, A.E. (1999). Synergistic actions of nisin, sublethal ultrahigh pressure, and reduced temperature on bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4148-4154.
- Styles, M.F., Hoover, D.G. y Farkas, D.F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J Food Sci.*, 56, 1404-1407.
- Sun, X.D. y Holley, R. A. (2010). High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products. *Journal of Food Science*, 75(1), R17-R23.
- Téllez Luis, S., Simal-Gandara, J., Vázquez, M., Ramírez de León, J. y Pérez-Lamela, C. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 3, 66-80.
- Thakur, B.R. y Nelson, P.E. (1998). High-pressure processing and preservation of foods. *Food Rev Int.*, 14, 427-447.
- Tonello, C., Zhang, H.Q., Barbosa-Cánovas, G.V., Balasubramaniam, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D.F. y Yuan, J.T.C. (2011). Case studies on high-pressure processing of foods. In *Nonthermal Processing Technologies for Food*. Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, London, UK, 36-50.
- Torres, J.A. y Velazquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *J Food Eng.*, 67, 95-112.
- Van Hekken, D.L., Tunick, M.H., Farkye, N.Y. y Tomasula, P.M. (2013). Effect of hydrostatic high-pressure processing on the chemical, functional, and rheological properties of starter-free Queso Fresco. *J Dairy Sci.*, 96, 6147-60.
- Van Opstal, I., Bagamboula, C.F., Vanmuysen, S.C.M., Wuytack, E.Y. y Michiels, C.W. (2004). Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. *Int J Food Microbiol.*, 92, 227-234.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V. y Debevere, J. (2005). In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *J Appl Microbiol.*, 98, 33-42.

- Wiedemann, I., Breukink, E., Van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G. y De Kruijff, B. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.*, 276, 1772–1779.
- Wuytack, E.Y., Diels, A.M. y Michiels, C.W. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol.*, 77(3), 205–12.
- Wuytack, E.Y. y Michiels, C.W. (2001). A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* at low pH. *Int J Food Microbiol.*, 64, 333–341.
- Wuytack, E.Y., Boven, S. y Michiels, C.W. (1998). Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Appl Environ Microbiol.*, 64, 3220–3224.
- Yuste, J., Mor-Mur, M., Capellas, M., Guamis, B. y Pla, R. (1998). Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. *Food Microbiol.*, 15, 407–414.
- Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., Sendra, E., Beltran, E. y Mor-Mur, M. (2001). Oscillatory high pressure processing applied to mechanically recovered poultry meat for bacterial inactivation. *J. Food Sci.*, 66, 482–484.
- Zhang, H. y Mittal, G.S. (2008). Effects of high-pressure processing (HPP) on bacterial spores: An overview. *Food Res. Int.*, 24, 330-351.