



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**ESTUDIO DE LA VIDA ÚTIL
DE UN EXTRACTO DE
PESCADO TRATADO CON
ALTAS PRESIONES Y
TIMOL**

Alumno/a: Castro Baldoy, Jesús

Tutor/a: Prof.^a Dña. Rosario Lucas López
Dpto: Microbiología

Julio, 2019

Índice

1.- Introducción.....	1
1.1.- Tratamiento de alimentos con altas presiones	2
1.1.1.- Mecanismo y principios del HPP.....	2
1.1.2.- Efectos de las altas presiones sobre los microorganismos	6
1.1.3.- Factores que influyen en la sensibilidad de los microorganismos al tratamiento con altas presiones.....	10
1.1.4.- Efectos de las altas presiones en las cualidades de los alimentos	12
1.1.5.- Aplicación de las altas presiones al pescado	15
1.2.- Efecto antimicrobiano del timol	17
2.- Objetivos	20
3.- Materiales y métodos.....	21
2.1.- Preparación de medios	22
2.2.- Obtención y preparación del extracto.....	24
2.3.- Tratamientos y recuentos	25
4.- Resultados	28
3.1.- Tratamiento del extracto de pescado con alta presión hidrostática.....	29
3.2.- Tratamiento del extracto de pescado con alta presión hidrostática combinada con un antimicrobiano	32
5.- Discusión	35
6.- Conclusiones	38
7.- Bibliografía	39

Resumen: El tratamiento de los alimentos con alta presión es una técnica cada vez más eminente pues, a diferencia de los tratamientos térmicos, no altera la mayoría de características organolépticas y nutricionales que demandan los consumidores hoy en día. En este estudio, hemos determinado la vida útil de un extracto de pescado refrigerado durante una semana tratado exclusivamente con altas presiones hidrostáticas y en combinación de estas con un antimicrobiano, el timol. También se inoculó parte de las muestras con *Listeria innocua* para estudiar cómo afectan estos tratamientos a su seguridad alimentaria. Las muestras tratadas se sembraron en placas de Petri con medio general TSA y medio específico PALCAM para listerias. Los resultados obtenidos (recuento de colonias viables) demuestran que la combinación de las altas presiones y el timol son realmente efectivas. Por sí solas, presiones de 300 y 400 megapascals no reducen significativamente la carga microbiana del extracto de pescado imposibilitando su correcta conservación durante el tiempo aplicado. Sin embargo, los resultados de la combinación de estas presiones y timol al 1% fueron realmente exitosos, consiguiendo inhibir totalmente el crecimiento de microorganismos a lo largo de una semana. Por lo tanto, esta técnica tiene un gran potencial para extender la vida útil y mantener la seguridad microbiológica del pescado.

Palabras clave: Altas presiones hidrostáticas, Timol, Pescado, *Listeria innocua*

Abstract: The treatment of food with high pressure is an increasingly eminent technique because, unlike heat treatments, it does not alter most of the organoleptic and nutritional characteristics demanded by consumers today. In this study, we have determined the shelf life of a refrigerated fish extract for one week treated exclusively with high hydrostatic pressures and in combination with an antimicrobial, thymol. Some of the samples were also inoculated with *Listeria innocua* to study how these treatments affect their food safety. The treated samples were inoculated in Petri plates with general medium TSA and specific medium PALCAM for listerias. The results obtained (viable colony counts) show that the combination of high pressures and thymol are really effective. On their own, pressures of 300 and 400 megapascals do not significantly reduce the microbial load of the fish extract, making it impossible to preserve it correctly during the time applied. However, the results of the combination of these pressures and 1% thymol were really successful, achieving total inhibition of the growth of microorganisms over a week. Therefore, this technique has great potential to extend shelf life and maintain microbiological safety of fish.

Keywords: High-hydrostatic pressure, Thymol, Fish, *Listeria innocua*

1.- Introducción

Los consumidores de hoy en día son cada vez más exigentes y demandan productos de alta calidad, con características sensoriales y nutricionales adecuadas (textura, sabor, aroma, forma y color, contenido de calorías, vitaminas, etc.) y dan gran valor a los productos frescos o con apariencia fresca y poco procesados (Oey et al., 2008). Además, buscan productos seguros y naturales sin aditivos. La vida útil también tiene cada vez más protagonismo en la preferencia de un individuo por unos productos u otros. En consecuencia, los minoristas reportan un crecimiento de hasta un 30% en las ventas de alimentos frescos, refrigerados y saludables (Norton y Sun, 2008).

Todas estas demandas se están intentando cumplir sin comprometer la seguridad de los productos gracias al desarrollo de nuevas tecnologías de procesamiento y conservación en la industria alimentaria. Se espera que la industria alimentaria prevenga o reduzca los cambios negativos en la calidad de los alimentos a lo largo del tiempo desarrollando técnicas que proporcionen alimentos ricos en color, textura y sabor satisfaciendo los requisitos demandados por el consumidor.

Una de las técnicas más relevantes en la actualidad que es capaz de abordar la mayoría de estos desafíos y ser la gran alternativa a los métodos tradicionales de procesamiento son las altas presiones (Rastogi et al., 2007). El tratamiento a alta presión (en inglés: "high-pressure processing", HPP), también conocido como tratamiento a alta presión hidrostática (HHP) permite la producción de alimentos manteniendo sus propiedades organolépticas, nutricionales y su frescura a la vez que alargan su vida útil sin comprometer la seguridad microbiológica (Rendueles et al., 2011).

El pescado, al ser un producto muy perecedero y con unas características de gran valor en fresco, es uno de los principales focos de estudio para aplicación de las altas presiones. El HPP permite mantener el aspecto y los nutrientes del pescado aumentando notablemente su vida útil, algo que otras técnicas tradicionales no consiguen (Murchie et al., 2005). Es por ello que en este estudio nos vamos a centrar en determinar la vida útil de un extracto de pescado tras aplicarle altas presiones junto con otros métodos que pueden potenciar su efecto antimicrobiano, en este caso timol.

1.1.- Tratamiento de alimentos con altas presiones

El HPP es un método no térmico que se aplica a los alimentos en el cual estos son sometidos a presiones elevadas (entre 50 y 1000 megapascuales, MPa) para lograr la inactivación o destrucción de los microorganismos (Considine et al., 2008).

La primera toma de contacto con las altas presiones y los alimentos se remonta a hace más de un siglo, cuando Hite (1899) estudió los efectos de la presión en la conservación de la leche. Diseñó un sistema para aplicar una presión considerable que consistía en introducir un tubo de hojalata comprimible lleno de leche en el interior de un cilindro que se rellenaba de agua. Este cilindro estaba rodeado de bloques de acero para aguantar la presión que era aplicada desde la parte superior a través de un pistón o émbolo que comprimía el agua. Lógicamente la presión que conseguía con este sistema era insuficiente para tener resultados significativos y no solo tenía que aplicarla durante horas o incluso días, sino que también necesitaba combinarla con calor para conseguir esterilizar la leche. A partir de entonces el tema quedó olvidado hasta los años 80 donde reapareció por un aumento del interés de conseguir un tratamiento alternativo al térmico que no alterase tanto las características del alimento (Rivalain et al., 2010). Los problemas de ingeniería relacionados con la generación y contención repetida de las inmensas presiones en un recipiente apto para productos alimenticios se solucionó (Patterson, 2005). Se puso a disposición una gama de recipientes especializados en alta presión, basados en los que se utilizan habitualmente en la producción de polímeros, cerámicas y diamantes artificiales, y se reabrió la posibilidad de la producción comercial de alimentos tratados a alta presión.

1.1.1.- Mecanismo y principios del HPP

En un sistema típico de HPP, el producto se envasa en un recipiente flexible (generalmente una bolsa o botella de plástico) y se carga en una cámara de alta presión llena de un líquido transmisor de presión. Este fluido hidráulico (normalmente agua) se presuriza con una o varias bombas. Un equipo de altas presiones bien diseñado debe estar compuesto de una cámara de presión, cierres para sellar la cámara, un dispositivo

para mantener los cierres durante el procesamiento, bombas intensificadoras de alta presión, sistemas para monitorear y controlar la presión y la temperatura, un dispositivo de control de temperatura y un sistema de manejo de productos (Yaldagard et al., 2008). La presión se aplica durante un tiempo determinado, generalmente de 3 a 5 minutos (Rastogi et al., 2007). El proceso se inicia cargando los paquetes de comida en el recipiente y cerrando la parte superior de la cámara. Entonces el fluido de transmisión de presión es bombeado a la cámara y una vez que la presión deseada es alcanzada, se detiene el bombeo, se cierran las válvulas y la presión se mantiene sin más aporte de energía. La presión se transmite rápida y uniformemente en todo el fluido y en los alimentos. La alta presión se aplica de manera isostática para que todas las partes de los alimentos estén sometidas a la misma presión, a diferencia del procesamiento térmico en el que se establecen gradientes de temperatura (Patterson, 2005). Dado que la presión se transmite uniformemente (en todas las direcciones al mismo tiempo), los alimentos conservan su forma, incluso a presiones extremas. La presión se libera después de transcurrir un tiempo determinado de tratamiento y los paquetes de comida pueden ser descargados. En el caso de los líquidos, como los zumos de frutas o sopas de carne y pescado, el recipiente entero se puede llenar con el jugo, que se convierte en el propio fluido de transmisión de presión.



Figura 1: Equipo comercial para tratamiento a altas presiones (izquierda) modelo Wave 6000-55 (Mújica-Paz et al., 2011) y equipo de altas presiones para investigación usado en este estudio (derecha) modelo Iso-LabSystem FPG9400.922.

Existen dos tipos principales de sistemas de altas presiones: los sistemas discontinuos (por lotes) y los semicontinuos.

- Los sistemas por lotes son los más usados en la industria de procesamiento en alimentos. Este sistema es el que hemos usado en este ensayo. Puede utilizarse tanto para alimentos sólidos como líquidos. Concretamente, los productos se colocan en una cámara de alta presión, se cierra, se llena con un líquido transmisor de presión y se presuriza, ya sea bombeando el medio en el recipiente o reduciendo el volumen de la cámara de presión, por ejemplo, mediante el uso de un pistón. Como medio transmisor de presión se puede utilizar agua y soluciones alimentarias como aceite de ricino, aceite de silicona, benzoato de sodio, etanol y glicol (Smelt, 1998). La capacidad de este fluido para proteger la superficie interior de la corrosión, el rango de temperatura del proceso y la viscosidad del fluido bajo presión también se debe tener en cuenta al seleccionar el medio. Como ya sabemos antes de cargar en la cámara el alimento se debe empaquetar en un recipiente flexible. Los alimentos deben envasarse de manera que se adapten a una disminución del 10 - 20% en el volumen durante la presurización y un retorno al volumen original después de que se libere la presión. Una vez transcurrido el tiempo de espera requerido, el sistema se despresuriza, se abre el recipiente y se descargan los productos. El sistema es recargado con productos, ya sea por operadores o máquinas, dependiendo del grado de automatización posible (Ting y Marshall, 2002; Yaldagard et al., 2008). El tiempo total de presurización, mantenimiento y despresurización se denomina "tiempo de ciclo". La duración del ciclo y el factor de carga (es decir, el porcentaje del volumen del recipiente que se utiliza realmente para contener el producto envasado) determinan el rendimiento del sistema.
- Por otro lado tenemos los sistemas semicontinuos. Su uso se recomienda cuando el producto es bombeable (por ejemplo, zumo de fruta). Los actuales sistemas semicontinuos de tratamiento de líquidos utilizan un recipiente a presión con pistón de flotación libre para comprimir los alimentos líquidos. También se requiere un sistema adicional, una estación de llenado aséptico, para envasar los productos después del tratamiento (Ting y Marshall, 2002). El pistón se utiliza para dividir el recipiente en dos cámaras y separar así el producto del medio de

presión (una cámara se utiliza para los productos bombeables mientras que la segunda está llena de líquido transmisor de presión). El líquido tratado se descarga desde el recipiente a presión a un tanque de retención estéril a través de un puerto de descarga. Entonces los alimentos líquidos tratados pueden ser llenados asépticamente en recipientes preesterilizados. En la aplicación práctica, se pueden secuenciar múltiples unidades de modo que mientras se llena una unidad, otras se encuentran en varias etapas de operación.

Una vez alcanzada la presión deseada, no es necesaria energía adicional para mantenerla. Sin embargo, la acumulación de presión siempre está acompañada por un aumento de temperatura en el producto ya que se da un calentamiento adiabático (es decir, el fluido no intercambia calor con su entorno por lo tanto su T^a se ve incrementada) (Patazca et al., 2007). La magnitud de este aumento depende del tipo de presurización, el medio de presión, la tasa de presurización, la presión deseada, el recipiente y la temperatura inicial. Tomando agua como ejemplo, su temperatura aumenta en aproximadamente 3°C por 100 MPa a una temperatura inicial de 25°C y una tasa de presurización de 100 MPa/s (Buzrul et al., 2008). Los alimentos con bajo contenido en grasa y alto contenido en agua, como zumos y la leche, probablemente exhiben unos valores de calentamiento por compresión similares. Se pueden observar mayores aumentos de temperatura en productos que contienen una cantidad significativa de grasa, como la mantequilla. Cabe destacar que la tasa de aumento de la temperatura en los productos a base de agua generalmente se da simultáneamente a la variación de presión, mientras que los productos grasos pueden exhibir un retraso de 30-60 segundos antes de alcanzar su temperatura máxima en estos procesamientos a altas presiones (Knoerzer et al., 2010). En aplicaciones prácticas, la combinación de calentamiento adiabático y las presiones podría potencialmente usarse para la esterilización rápida de alimentos poco ácidos.

La técnica de las altas presiones se basa en dos principios científicos básicos (Norton y Sun, 2008):

1. El principio de Le Chatelier, que establece que, cuando un sistema en equilibrio se perturba, el sistema responde intentando minimizar esta perturbación. Esto significa que el HPP estimula las reacciones que dan lugar a una disminución en

el volumen y amortigua las reacciones que involucran un aumento en el volumen.

2. La regla isostática, que establece que la presión se transmite de manera instantánea y uniforme en una muestra bajo presión si la muestra está en contacto directo con el medio de presión o está herméticamente sellada en un paquete flexible que transmite presión. Por lo tanto, el tiempo necesario para el procesamiento a presión es independiente del tamaño de la muestra, al contrario que el procesamiento térmico.

Como ya hemos visto, los alimentos deben empaquetarse en un envase flexible al ser procesados a altas presiones, para compensar las posibles reducciones de volumen en los alimentos dentro del paquete. Por lo tanto es importante seleccionar un material adecuado y deben tenerse en cuenta factores como la seguridad del material, la posible formación de compuestos que influyen en el olor y el sabor del alimento y los efectos de la presión sobre las propiedades físicas y mecánicas de este material (Mensitieri et al., 2013). Como este material debe ser lo suficientemente flexible para transmitir presión y soportar un cambio de volumen, se excluyen el vidrio, el metal y el papel. Los materiales normalmente utilizados en el HPP son materiales poliméricos, plásticos (el tereftalato de polietileno, el polietileno, el polipropileno, el copolímero de etileno, alcohol vinílico...) (Juliano et al., 2010). Sus combinaciones también se utilizan generalmente como materiales de embalaje para el tratamiento de altas presiones.

1.1.2.- Efectos de las altas presiones sobre los microorganismos

El HPP es capaz de inactivar los microorganismos presentes en los alimentos. Además, este tratamiento es capaz de causar lesiones subletales a los microbios, lo cual es particularmente importante en cualquier método de conservación. Sin embargo, en unas condiciones favorables (como el almacenamiento prolongado en un sustrato adecuado) las células lesionadas pueden recuperarse y volver a crecer y reproducirse (Bajovic et al., 2012). En general, un nivel moderado de presión (10-50 MPa) disminuye la tasa de reproducción y el crecimiento de microorganismos, mientras que niveles más altos de presión dan lugar a la inactivación de estos microbios.

El tratamiento con altas presiones en las condiciones adecuadas puede dar lugar a la inactivación de las bacterias patógenas y de aquellas que deterioran los productos alimenticios. Las principales bacterias que causan la intoxicación alimentaria son *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Vibrio* spp. Entre ellos, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* son probablemente las tres especies más estudiadas en términos de uso del HPP (Rivalain et al., 2010). La inactivación de las bacterias se atribuye al daño en varios puntos de la célula. La membrana celular es el principal punto que dañan las altas presiones. Aunque se pueden obtener efectos significativos si se realiza un tratamiento apropiado (entre 300-600 MPa), la resistencia a la presión de las bacterias es muy variable, dependiendo de la especie bacteriana y del alimento involucrado. En general, las bacterias gram-negativas son menos resistentes a la presión que las bacterias gram-positivas, debido a las diferencias estructurales en la envoltura celular. Las bacterias tratadas con presión sufren una salida de ATP y material intracelular e incluso absorben una gran cantidad de colorantes celulares que normalmente no penetran en la célula (Ulmer et al., 2000). También se aprecia una reducción de la actividad de la F₀F₁ ATPasa (Smelt et al., 1994). Las bacterias en fase exponencial sufren inactivación por daños irreversibles en sus membranas (Mañas y Mackey, 2004). Sin embargo, aquellas en fase estacionaria son más resistentes a los tratamientos con presión por presentar una membrana más robusta. La pared celular no se ve tan afectada por las altas presiones, es por ello que la morfología apenas difiere al observarla a microscopía óptica aunque las lesiones sí se pueden ver a microscopía electrónica de barrido (Ritz et al., 2001) como algunas cicatrices o nódulos en las paredes celulares. Por otro lado, pese a que las altas presiones apenas afectan a los ácidos nucleicos ni a la estructura en hélice del ADN (por la resistencia de los enlaces de hidrógeno a las presiones), las enzimas que intervienen en la replicación y transcripción si se ven afectadas y estos procesos quedan interrumpidos. En las especies bacterianas *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *L. plantarum* las presiones provocan la condensación del material nuclear (Ritz et al., 2006).

Uno de los problemas y retos de los tratamientos con altas presiones son las esporas bacterianas. A presiones que son muy efectivas para inactivar a bacterias como hemos visto anteriormente, las esporas no sufren el más mínimo rasguño. Son extremadamente

resistentes a la alta presión, al igual que son resistentes a otros tratamientos físicos como la irradiación y el calor, pudiendo sobrevivir a tratamientos de más de 1000 MPa (Smelt, 1998). Hay una cierta variación entre las esporas de diferentes especies y también entre cepas de la misma especie. Por ejemplo, las esporas de *Clostridium botulinum* están entre las más resistentes a la presión (Reddy et al., 2003; Reddy et al., 2006). Sin embargo, se ha descubierto que las presiones relativamente bajas (por debajo de 200 MPa) pueden desencadenar la germinación de las esporas (Gould y Sale, 1970). Por ello se ha sugerido que las esporas podrían eliminarse aplicando presión en dos etapas. El primer tratamiento a baja presión activaría la germinación de las esporas, mientras que el segundo tratamiento, a una presión más alta, mataría las bacterias germinadas a partir de las esporas (Black et al., 2007). La alternancia entre presiones relativamente bajas y altas podría ser una forma de superar el problema de la resistencia de estas esporas. Sin embargo, el grado de germinación puede ser muy variable y una pequeña proporción de cada población de esporas parece permanecer resistente a la germinación inducida por la presión.

Otra solución que se ha postulado para el problema de las esporas es la combinación de las altas presiones con un tratamiento térmico. Los numerosos estudios que han respaldado el éxito de esta combinación han conseguido que se use para la producción comercial de alimentos de larga conservación y es el tema de varias patentes diseñadas para lograr la esterilización comercial de alimentos (Matser et al., 2004). Estos tratamientos utilizan una temperatura inicial inferior a 100°C y se aprovechan del calor generado gracias al calentamiento adiabático que se produce cuando el alimento es tratado con presión.

A parte de las bacterias, las altas presiones afectan a muchos otros microorganismos que podemos encontrar en la comida. En general, estos tratamientos son más efectivos en organismos con un mayor grado de complejidad estructural. Las levaduras y los mohos son más susceptibles a la presión que las bacterias y pueden inactivarse usando presiones relativamente bajas. Son un grupo importante de microorganismos que deterioran los alimentos y, aunque generalmente no son patógenos de los alimentos, es importante su control para conseguir una conservación duradera. Las levaduras se inactivan a alta presión de forma similar a las bacterias ya que tanto su membrana

celular como su morfología se ven afectadas al tratarlas (Rivalain et al., 2010). Además, las mitocondrias de las levaduras parece que pueden verse afectadas por el HPP, se da una liberación del citocromo C en las mitocondrias causando la muerte celular. En la mayoría de los casos, presiones de 300 a 400 MPa durante unos minutos son suficientes para inactivar la mayoría de las levaduras (Daryaei et al., 2008). En cuanto a los mohos, son más problemáticos porque, pese a que su micelio es muy sensible a las altas presiones, forman esporas que son mucho más resistentes. La mayoría de los mohos se inactivan a presiones entre 300 y 600 MPa (Chapman et al., 2007). No obstante, las esporas de algunos mohos pueden soportar presiones superiores a 600 MPa y requieren un tratamiento combinado de alta presión y T^a para deshacerse de ellas.

Las altas presiones también consiguen eliminar diversos parásitos transmitidos por los alimentos y basta con tratar el alimento a presiones en un rango más bajo. Los ooquistes de parásitos protozoarios como *Eimeria acervulina* y *Cryptosporidium parvum* pueden inactivarse fácilmente con un tratamiento de 340 a 550 MPa durante 3 minutos (Shearer et al., 2007). En cuanto a los nematodos, un HPP adecuado puede retrasar la embrionización de los huevos (alrededor de 400 MPa para *Trichuris vulpis* y 300 MPa para *Ascaris suum*) y presiones algo más altas pueden directamente matar estos nematodos por completo (Rosypal et al., 2011).

Los virus tienen una gran diversidad estructural. Es por ello que la resistencia a la presión de los virus transmitidos a través de los alimentos varía enormemente. En general, los virus envueltos son menos resistentes a la presión que los no envueltos (Kovač et al., 2010). El mecanismo de inactivación de los virus por altas presiones aún no se conoce completamente. Parece ser que el HPP puede desnaturalizar las proteínas de la cápside viral, impidiendo la unión de los virus a sus células huésped (Rendueles et al., 2011). Se ha comprobado que algunos virus transmitidos a través de los alimentos como el de la hepatitis A se puede inactivar tratándolo a 500 MPa durante 300 segundos (Grove et al., 2008) y a 400 MPa durante 95 segundos en el caso del adenovirus (Kovač et al., 2012).

Por último, cabe mencionar que los priones (proteínas infecciosas) también se pueden inactivar con altas presiones (alrededor de 800 MPa) pero, sólo en combinación con altas temperaturas (alrededor de 80°C) (Heindl et al., 2008).

1.1.3.- Factores que influyen en la sensibilidad de los microorganismos al tratamiento con altas presiones

Hay diversos factores intrínsecos y extrínsecos que pueden afectar a la resistencia a la presión de los microorganismos, por ejemplo la cepa a la que pertenece, etapa de crecimiento o la composición del alimento. Una buena comprensión de cómo influyen estos factores es esencial para optimizar el HPP y garantizar la seguridad microbiológica.

El pH del alimento a tratar es uno de los principales factores que afectan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Los microorganismos tienen un rango de pH en el que pueden crecer y un pH óptimo donde este crecimiento se ve más favorecido. En la mayoría de las especies la inactivación mejora y la recuperación celular es inhibida a pH ácido (Rendueles et al., 2011). Por ejemplo, la resistencia a la presión de *E. coli* O157:H7 en zumo de naranja depende del pH del propio zumo, el grado de inactivación aumenta a medida que el pH disminuye (Linton et al., 1999). La supervivencia de las bacterias de esta cepa post tratamiento con altas presiones también depende del pH. Sin embargo, ciertas levaduras alterantes del alimento son resistentes a pH ácido (Li et al., 2010). Además, se ha comprobado que mientras se ejerce la presión, el pH del alimento puede variar dependiendo de su composición. Cuando se libera la presión, el pH vuelve a su valor original. Sin embargo, no se sabe si estos cambios en el pH durante el tratamiento afectan a la supervivencia microbiana porque, como hemos visto, el pH y la presión pueden actuar de forma sinérgica, de manera que en alimentos en los que su pH disminuyese mientras se le ejerce presión podría fomentarse la inactivación microbiana (Patterson, 2005).

La actividad de agua (A_w) también influye a la hora de tratar con altas presiones un alimento. Se define generalmente como la cantidad de agua disponible para el crecimiento microbiano. La reducción de A_w parece proteger a los microbios contra la inactivación por HPP (Hayman et al., 2007). Se supone que una A_w baja puede conducir a la estabilización de las proteínas, previniendo así su desnaturalización y disminuyendo la eficacia de las altas presiones. Por ejemplo, la reducción de la A_w del

medio de 0,98 a 0,94 resultó en una mejor supervivencia de *Rhodotorula rubra* cuando se sometió a presiones entre 200 y 400 MPa durante 15 minutos (Oxen y Knorr, 1993). Sin embargo, la recuperación de las células lesionadas de forma subletal puede inhibirse a baja A_w , por lo que el efecto neto de A_w sobre la inactivación microbiana puede ser difícil de predecir en estos tratamientos.

Tanto la temperatura de crecimiento como la fase de crecimiento de los microorganismos pueden influir en la eficacia del HPP. Una temperatura de crecimiento superior puede aumentar la resistencia a la presión de los microorganismos, probablemente debido a la mayor flexibilidad que adquiere la membrana celular a altas temperaturas (McClements et al., 2001). Por otro lado, las células bacterianas de *E. coli* o *L. monocytogenes* en fase estacionaria son más resistentes a la presión que aquellas en la fase exponencial como ya mencionamos anteriormente.

Por supuesto la temperatura es un factor a tener en cuenta ya que su aumento generalmente ayuda a reducir la supervivencia de los microorganismos (Rendueles et al., 2011). La combinación del HPP y calor moderado no solo pueden acelerar la inactivación de los microorganismos, sino que también pueden reducir la temperatura requerida para su inactivación completa. Además, esta combinación puede ser la única vía para inactivar las esporas bacterianas o esporas de mohos.

Hay otros parámetros que están relacionados con el propio HPP (la magnitud de la presión, el tiempo que se mantiene la presión y las tasas de compresión y descompresión). En general, la eliminación de los microorganismos aumenta con la presión y el tiempo que esta es mantenida (Smelt, 1998). Cabe mencionar que hay resultados contradictorios con respecto a los efectos de las tasas de compresión y descompresión. Se descubrió que una compresión y descompresión lentas aumentan la eficacia de las altas presiones para inactivar las esporas bacterianas. Sin embargo, la compresión y descompresión rápidas mejoran la inactivación de las células bacterianas (Syed et al., 2012). Todo esto debe tenerse en cuenta pues una baja tasa de compresión aumentará el tiempo total del proceso afectando por tanto al rendimiento.

Los compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, lisozimas, lactoperoxidasas y aceites esenciales son elementos que tienen efectos sinérgicos al combinarlos con las

altas presiones. Estos se pueden adicionar de forma intencionada en el alimento o encontrarse de forma natural en él, por ejemplo hay bacterias del ácido láctico productoras de bacteriocina (Rodriguez et al., 2005; Ávila et al., 2010). La nisina y la lisozima se usan frecuentemente en combinación con el HHP. La nisina es un péptido que daña la membrana formando poros que afectan a su estabilidad y la lisozima tiene como diana la capa de peptidoglicano, hidrolizando los enlaces glicosídicos (Rao et al., 2016; Kalchayanand et al., 2004). El timol, usado en este ensayo, es uno de estos elementos que veremos de forma más detallada más adelante.

1.1.4.- Efectos de las altas presiones en las cualidades de los alimentos

El procesamiento a alta presión causa cambios mínimos en las características de los alimentos frescos ya que prescinde de la degradación térmica. En comparación con el tratamiento térmico, el HPP da como resultado alimentos con un sabor más fresco y una mejor apariencia, textura y características nutricionales (ver tabla 1). Las presiones utilizadas para procesar alimentos no suelen afectar a los enlaces covalentes (Patterson, 2005). Esto significa que tiene muy poco efecto sobre los compuestos de bajo peso molecular, como los compuestos que dan sabor, las vitaminas y los pigmentos. En consecuencia, la calidad de los alimentos tratados con HPP es muy similar a la de los productos frescos y la degradación de la calidad se ve más influenciada por el almacenamiento y la distribución posteriores que por el propio procesado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que pese a que el aumento de la presión generalmente aumenta la inactivación microbiana, presiones más elevadas pueden causar mayores niveles de desnaturalización de proteínas y otros cambios potencialmente perjudiciales en la calidad de los alimentos en comparación con un producto no procesado (Norton y Sun, 2008). La presión también brinda una oportunidad única para crear y controlar nuevas texturas en alimentos a base de proteínas o de almidón (Rivalain et al., 2010). En algunos casos, la presión se puede usar para formar geles de proteínas y aumentar la viscosidad sin usar calor.

Tabla 1: Mejoras en la calidad de varios elementos al ser tratados con altas presiones

Alimento	Tratamiento (MPa/min)	Resultado	Referencias
Puré de manzana	400/5	Retención de vitamina C, ácido ascórbico y fenoles	Landl et al. (2010)
Pechuga de pollo	400/15	Sin cambios de aroma, no hay oxidación de lípidos al reoxigenarse	Schindler et al. (2010)
Carne de cocodrilo	200/10	Bajo impacto sobre el color y la textura, aumenta ligeramente la ternura, no tiene efecto sobre el sabor.	Canto et al. (2012)
Salmón	135/5	Mantiene la textura, color y olor, mejora la consistencia y cohesión	Aubourg et al. 2013

Sin embargo, el tratamiento con altas presiones en ciertas condiciones puede alterar las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y funcionales de algunos compuestos de los alimentos, en particular las proteínas, los lípidos y el almidón (Liu et al., 2008). Estas modificaciones pueden considerarse beneficiosas o perjudiciales para la calidad de los alimentos.

El color es una característica muy importante para el consumidor en la mayoría de los productos. En frutas y verduras, un tratamiento con presión moderada no afecta al color, pero, combinar una gran presión y algo de temperatura puede afectar a los pigmentos vegetales. Por ejemplo, al tratar zumo de brócoli con alta presión y una T^a de 50°C se degradó su clorofila (Oey et al., 2008). Las altas presiones pueden afectar con más intensidad al color de la carne y los productos cárnicos, especialmente la carne roja fresca. Por ejemplo, provocan una disminución color rojo en la carne picada (Canto et al., 2012). Al envasar la carne al vacío con un eliminador de oxígeno se puede proteger el color de la carne y evitar este problema. En carne fresca el color afecta gravemente a la aceptación del consumidor y dificulta su venta, sin embargo, este efecto negativo de las altas presiones en el color de la carne se puede ignorar si las carnes se procesan en otros productos cárnicos (Bajovic et al., 2012). Las altas presiones también

dan lugar a cambios similares en el color de los productos cárnicos curados, aunque estos cambios se consideran más aceptables (Bak et al., 2012). En pescado, las altas presiones parecen alterar el enrojecimiento del producto dependiendo de la especie tratada. En algunas especies puede aumentar el enrojecimiento y en otras disminuye (Gómez-Estaca et al., 2009). Por otro lado, en productos semicocidos o cocidos, no se observa el efecto del HPP en el color, ya que sus proteínas ya han sido desnaturalizadas.

En cuanto a la textura de los productos tratados, la mayoría de los alimentos con elevada humedad permanecen sin cambios después del HPP. Sin embargo, los productos que contienen gas tratados con presión pueden sufrir cambios en color y textura debido al desplazamiento del gas y la infiltración de líquido (se da colapso mecánico de las bolsas de aire) (Tingy Marshall, 2002). Para alimentos que no contienen huecos con aire, el HPP generalmente produce un cambio mínimo o no permanente en la textura.

Es destacable el gran potencial que tienen las altas presiones como técnica para modificar la textura de ciertos productos alimenticios. El HPP puede inducir cambios deseables en la textura y estructura del producto. Por lo tanto, puede usarse para el desarrollo de nuevos productos o para aumentar la funcionalidad de algunos ingredientes. Por ejemplo, al tratar queso mozzarella a alta presión se mejoró su propiedad de fusión (O'Reilly et al., 2002). En la industria cárnica esta técnica tiene un prometedor futuro. El HPP aumenta la elasticidad y resistencia de la carne de pavo (Chan et al., 2011) y se puede utilizar para mejorar la calidad de la textura de las salchichas y lomos de cerdo (Ma y Ledward, 2013). El procesamiento con altas presiones también se utiliza en la producción de surimi y otros productos japoneses hechos de pescado picado debido a la gran calidad de los geles que genera la presión (Ohshima et al., 1993).

También es interesante mencionar que algunos estudios se han centrado en investigar la biodisponibilidad de los componentes de los alimentos tratados con altas presiones. Estos estudios tienen resultados diferentes, ya que el HPP depende de la magnitud de la presión, el tiempo de procesamiento y la temperatura de procesamiento. Por ello hay una gran variabilidad en la biodisponibilidad de los compuestos, ya sean iguales o diferentes (Briones-Labarca et al., 2011; Carbonell-Capella et al., 2013; Xia et al., 2017). Pero, lo que está claro es que el HPP en general tiene un efecto positivo en la

bioaccesibilidad de los nutrientes y compuestos de alimentos tratados a altas presiones (Evrendilek, 2018).

1.1.5.- Aplicación de las altas presiones al pescado

El pescado es un producto muy perecedero si no se procesa adecuadamente. Los tratamientos que tradicionalmente se han aplicado a este alimento, como el calor, son muy eficientes para generar productos seguros con una vida útil aceptable. Sin embargo, alteran las propiedades nutricionales, químicas y sensoriales comprometiendo su aceptación por parte de los consumidores. En contraste con los alimentos procesados térmicamente, los alimentos tratados con altas presiones conservan en gran medida la apariencia, el sabor, la textura y las cualidades nutricionales del pescado fresco. Además, los consumidores cada vez más exigen alimentos sin aditivos, mínimamente procesados, con propiedades nutritivas beneficiosas y con una vida útil prolongada (Murchie et al., 2005). Esto hace de las altas presiones una técnica cada vez más presente en el procesamiento de los productos marinos.

Aunque la microbiota presente en los peces y los mariscos depende de diferentes factores como el ambiente, la especie, sus hábitos alimenticios, etc., en general las bacterias gram-negativas predominan en el pescado y son las principales responsables de su deterioro (destacan *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreum*) (Ohshima et al., 1993). Como ya hemos visto, estas bacterias son más sensibles a las altas presiones, lo que hace al pescado un producto aún más atractivo al tratamiento con altas presiones (Gram y Huss, 2000). La inactivación de estas bacterias hace que en productos tratados con altas presiones predominen las bacterias gram-positivas, en particular las bacterias del ácido láctico. Aunque el HPP no puede eliminar las bacterias del ácido láctico, su número puede reducirse y su crecimiento puede retrasarse en el pescado (López-Caballero et al., 2000). Las altas presiones no solo son efectivas contra las bacterias que deterioran el pescado, también lo son contra bacterias patógenas de estos alimentos, como *L. monocytogenes* en salmón (Lakshmanan et al., 2003) o *L. monocytogenes* y *E.coli* en trucha arco iris (Mengden et al., 2015).

La aplicación de altas presiones tiene diversas ventajas en muchas especies de pescado respecto a otras técnicas de procesamiento. En pescados ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como la caballa, que es rica en omega 3, el HPP no disminuye los niveles de estos ácidos grasos ni compromete la calidad nutricional de este pescado con tratamientos de incluso 500 MPa entre 2 y 5 minutos (de Alba et al., 2019). No hay diferencia significativa entre salmones control y muestras tratadas con altas presiones en términos de perfil de ácidos grasos saturados, monoeno y PUFAs. Esto demuestra que el HPP es un proceso muy suave en cuanto a su efecto sobre los ácidos grasos (Yagiz et al., 2009).

Pese a todas las ventajas que hemos visto, hay algunos aspectos de este tratamiento en el pescado que hay que tener en cuenta. Al tratar el pescado con un rango alto de presión (normalmente más de 500 MPa) se ven alteradas características como la textura, dureza y tonalidad (Truong et al., 2015). El tejido muscular de los peces parece modificarse al tratarlos durante 5 minutos a 600 MPa, con fibras que parecen fusionadas y más compactas en comparación con los peces no tratados (Tsironi et al., 2019). Estudios sobre el bacalao y la caballa mostraron que el color de los filetes se aclaraba con el aumento de la presión (Ohshima et al., 1993). Al aplicar altas presiones a un nivel de 200 MPa durante 5 min en trucha, bacalao, carpa y abadejo se consigue una apariencia cocida (Matser et al., 2000). Estos cambios indeseados que puedan aparecer en la apariencia y textura de la carne de pescado debido al HPP debe minimizarse investigando de forma sistemática estos cambios de calidad y validando cuales son los parámetros para un procesamiento adecuado

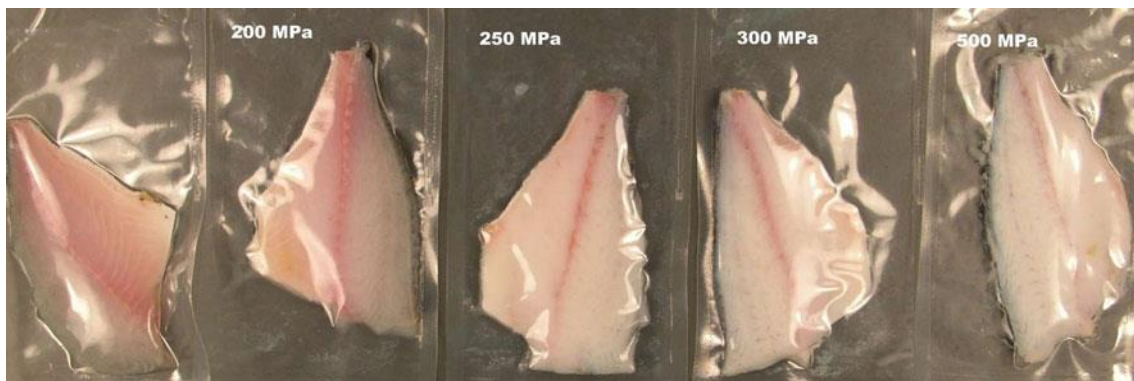


Figura 2: Cambio de color en filetes de dorada (*Sparus aurata*) al aplicar presión creciente (Campus, 2010)

Tabla 2: Efecto de las altas presiones en la textura y apariencia de distintos productos marinos

Pescado	Tratamiento (MPa/min)	Cambios visuales y de textura	Referencias
Anchoa	300/30	Aumento de la dureza y disminución de la firmeza	Ashie et al. (1997)
Bacalao	200-400/10	Endurecimiento	Matser et al. (2000)
Salmón	200/30	Mayor robustez y firmeza	Amanatidou et al. (2000)
Merluza	400/5	Apariencia cocida	Hurtado et al., (2000)
Langostino	400/10	Pardeamiento, opacidad muscular y aumento de la melanosis	López-Caballero et al. (2000)
Calamar	150-400/15	Enrojecimiento de la piel, blanqueamiento de los músculos	Paarup et al. (2002)

Las altas presiones se pueden combinar con otros tratamientos para obtener un efecto sinérgico o de barrera que potencie el efecto antimicrobiano. Por ejemplo, con películas de plástico funcionales activadas con extracto de orégano o romero (ricos en fenoles) (Gómez-Estaca et al., 2007) o con timol y enterocinas (Blázquez et al., 2018). En este estudio combinaremos las altas presiones con timol en extractos de pescado, como veremos más adelante. También se puede combinar con envasado al vacío, que puede extender la vida útil del pescado de 21 días (solo envasado al vacío) a 35 días si se combina con una presión de 400 MPa (López-Caballero et al., 2000). El número total de bacterias fue inferior a 5,5 log₁₀ UFC/g a los 35 días, lo que parece ser beneficioso para prolongar la frescura y evitar el deterioro.

1.2.- Efecto antimicrobiano del timol

Antiguamente muchos alimentos se conservaban aliñándolos con hierbas o sus aceites esenciales, ricos en compuestos fenólicos. El timol es un compuesto fenólico y uno de

los principales componentes del aceite esencial extraído del tomillo junto con el carvacrol (Evans y Martin, 2000). Se usa desde hace siglos en la conserva de diversos alimentos como un aditivo natural (Kim et al., 1995). Su efecto antimicrobiano y antifúngico se conoce bastante bien, pero hoy en día no es muy usado solo porque no garantiza una seguridad microbiológica adecuada a las concentraciones en que es añadido (su efecto depende de la concentración). Esto es así porque adicionar gran cantidad de timol, aunque potenciaría el efecto antimicrobiano, altera el sabor y olor del alimento en que se aplica, salvo en aquellos alimentos en los que se desea su sabor y aroma, como algunos quesos especiados (Cepeda et al., 2002). Es por ello que hoy en día su uso se centra en combinación con otros compuestos o técnicas por su efecto sinérgico a bajas concentraciones.

Lavar lechuga infectada de *Shigella sp.* con timol al 1% disminuye sus niveles por debajo del límite de detección, sin embargo, sus propiedades organolépticas se alteran pardeándose y tomando un olor fuerte (Bagamboula et al., 2004). Puede usarse en películas comestibles como agente activo para alargar la vida útil de frutas y verduras, aunque, como hemos mencionado ya, sus dosis de aplicación son a menudo organolépticamente inaceptables (Rúa et al., 2019). Este problema pasa inadvertido en productos como varitas de pescado y hamburguesas de bacalao, donde se usa como un ingrediente más que aporta matices al sabor característicos además de una gran inhibición de las bacterias que deterioran el pescado (Corbo et al., 2009)

Al usar solamente timol normalmente se obtiene un ligero efecto antimicrobiano que es insuficiente. Por ello se están desarrollando y estudiando distintas combinaciones de técnicas con el timol. Por ejemplo, al usar revestimientos funcionales con timol junto con el envasado en atmósfera modificada se consigue alargar la vida útil de las gambas peladas hasta 14 días cuando por sí solas en estas técnicas no llega a 5 días (Mastromatteo et al., 2010). En Pei et al. (2009) se observó un efecto sinérgico frente a *E. coli* al combinar el timol con otros compuestos fenólicos como el carvacrol y el eugenol. También se ha conseguido conservar filetes de platija al tratarlos con *Bifidobacterium bifidum* y timol a baja temperatura (entre 4 y 12 °C) mostrando un potente efecto sinérgico frente a las principales especies que deterioran el pescado fresco envasado (Altieri et al., 2005). Y por supuesto, hay varios estudios en los que se

ha combinado el timol con las altas presiones. En lonchas de jamón serrano contaminadas con *L. monocytogenes*, la combinación de timol al 1.25% y HPP a 450 MPa durante 10 minutos no tenía un gran efecto antimicrobiano sobre este patógeno al almacenarse a 4°C y 12°C durante 30 días (Pérez-Baltar et al., 2019). Sin embargo, en Blázquez et al. (2018) al tratar filetes de lubina con altas presiones, timol y la enterocina AS-48, consiguieron reducir notablemente el número de recuentos viables de bacterias mesófilas aerobias y retrasar el crecimiento bacteriano alargando así la vida útil de este pescado en refrigeración. Por ello, en este estudio queremos combinar sólo el HPP con el timol para así estimar cómo de eficaz es su sinergia y cuánto puede extenderse la vida útil del pescado con estas técnicas.

2.- Objetivos

El objetivo general de este trabajo es determinar la vida útil de un extracto de pescado al tratarlo con altas presiones y con la combinación de estas y timol al 1%.

Para ello se han planteado los siguientes objetivos:

- 1- Determinar cómo responde y evoluciona la viabilidad de la microbiota del pescado a estos tratamientos durante una semana en refrigeración.
- 2- Evaluar la seguridad alimentaria que ofrecen estos tratamientos, inoculando los extractos con *Listeria innocua*.
- 3- Analizar las diferencias que pueden surgir al aplicar 300 o 400 MPa, valorando cual sería el tratamiento más eficiente. Y la combinación de estos con un antimicrobiano.
- 4- Determinar si existe sinergia entre el HPP y el timol.

3.-Materiales y Métodos

Para realizar el ensayo hemos necesitado en primer lugar un filete de pescado del que obtendremos un extracto y la máquina de altas presiones hidrostáticas de la UJA donde éste va a ser tratado, concretamente en criotubos que rellenamos con el extracto. También se utilizaron cultivos de *Listeria innocua* y timol al 1% para realizar los distintos tratamientos. Posteriormente, para las siembras se usaron equipos e instrumentos básicos de un laboratorio de microbiología (asas de siembra, mechero bunsen, micropipetas, gradillas, estufa de incubación, autoclave, tubos, asas de Digralsky, matraces, cucharas...) además de numerosas placas de Petri con los medios preparados a partir de sus respectivos botes de medio deshidratado.

Para los tratamientos elegimos inocular *L. innocua* debido a su gran similitud con otras *Listerias* patógenas como *L. monocytogenes* (Buchrieser et al., 2003) para así comprobar que ocurriría al aplicar las altas presiones a patógenos que podemos encontrar en los alimentos de forma totalmente segura debido al carácter no patógeno de esta especie de *Listeria*. Además, es fácil de cultivar pues sobreviven y se multiplican en un amplio rango de Tª y pH siendo su Tª óptima de crecimiento entre 30 y 37°C (mesófilas) (Pine et al., 1989).

En cuanto a los medios de cultivo utilizados fueron dos, uno general (TSA) y otro específico para *Listeria* (PALCAM). También preparamos algunos tubos de TSB para el inóculo inicial de *L. innocua* y agua de peptona para la homogeneización del filete de pescado.

-El TSA (Trypticasein Soy Agar) es un medio general que se puede utilizar en el cultivo de bacterias poco exigentes como *Enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y otros microorganismos con similares requerimientos de crecimiento (Leavitt et al., 1955). Está referenciado en la Farmacopea Europea para el recuento total de aeróbicos y es utilizado en técnicas donde se busca la carga límite bacteriana. Así mismo se utiliza en análisis de aguas y alimentos. Uno de los usos habituales es el mantenimiento de subcultivos de cepas. Compuesto por: Hidrolizado pancreático de caseína, hidrolizado papaínico de harina de soja, cloruro sódico y agar.

El nitrógeno es aportado por las peptonas y caseína. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico.

-El PALCAM es un medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y la detección de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* a partir de alimentos y muestras clínicas. Este medio se basa en la fórmula de van Netten et al. (1989) quienes desarrollaron este medio selectivo y



Figura 3: Placas de TSA y PALCAM

diferencial para su uso en el aislamiento y recuento de las especies de *Listeria* a partir de muestras alimentarias. Suministra los nutrientes y cofactores necesarios para el crecimiento de esta bacteria. Se logra selectividad en el medio mediante la presencia de cloruro de litio, sulfato de polimixina B, acriflavina-HCl y ceftazidima, que inhibe el crecimiento de la mayoría de los organismos presentes en alimentos y muestras clínicas que no pertenecen al género *Listeria*. La diferenciación en el medio PALCAM se basa en la hidrólisis de esculina y la fermentación del manitol. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina, como lo demuestra el oscurecimiento del medio. El producto de la hidrólisis, la esculetina, reacciona con iones férricos hasta producir un complejo de marrón a negro (van Netten et al., 1989). A veces pueden crecer en este medio organismos diferentes, tales como los estafilococos o enterococos. 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*.

3.1.- Preparación de medios

Para empezar, se preparan todas las placas de los medios de cultivo TSA y PALCAM que más tarde necesitaremos para sembrar con los distintos tratamientos aplicados al



Figura 4: Preparación de matraces de TSA

extracto de pescado. Estos fueron preparados en matraces de 500 y 1000 ml a partir de medios deshidratados y siguiendo las proporciones indicadas en las instrucciones de cada bote. Se pesa la cantidad marcada y, una vez disuelto en agua con las proporciones correctas, los matraces se introducen en el autoclave para esterilizarlos. Al sacarlos y una vez enfriados a T^a ambiente, las placas de Petri se preparan vertiendo el medio fundido y estéril dentro de ellas y en un ambiente aséptico generado por el mechero Bunsen. En el caso del PALCAM, antes de verter los matraces se debe añadir a cada uno su

suplemento. Una vez las placas se han enfriado y solidificado se almacenan en la cámara frigorífica porque, pese a que pueden almacenarse a temperatura ambiente, es preferible hacerlo a bajas temperaturas para evitar la deshidratación y el consiguiente cambio en las concentraciones de sus componentes.



Figura 5: Matraces de TSA y PALCAM recién sacados del autoclave y listos para ser vertidos en placas de Petri

Simultáneamente, se preparan 5 tubos de TSB. Los vamos a utilizar para posteriormente sembrar *L. innocua* que necesitaremos para inocular los tratamientos que lo requieran.

3.2.- Obtención y preparación del extracto

Una vez tenemos listas las placas de Petri y todo el material que vamos a necesitar, el filete de pescado (en este caso merluza) debe ser homogeneizado y obtener un extracto a partir de él. Para ello el filete se introduce en una bolsa estéril junto con 200 ml de agua de peptona y se llevan al homogeneizador stomacher durante unos minutos. Mediante el aplastamiento y agitación que propician sus paletas, conseguimos mezclar y homogeneizar el pescado y el agua de peptona con una elevada recuperación de los microorganismos que contiene el filete.

A continuación, el extracto obtenido lo usamos para rellenar criotubos de 2 ml de capacidad hasta el borde, de manera que al cerrarlos no queden burbujas de aire. Esto es necesario para que al introducirlos en la máquina de altas presiones no estallen. A cada criotubo se le aplicará un tratamiento distinto para cada uno de los 4 días de ensayo. Son 5 tratamientos básicos que a su vez tienen dos divisiones, inoculados con *L. innocua* y sin inocular. En total 10 tratamientos distintos, por lo tanto, 40 criotubos (10 para cada uno de los días a ensayar). Estos tratamientos son:

x4 días (día 0, día 2, día 5 y día 7)					
	Sin tratar (control)	300 MPa	400 MPa	300 MPa + Timol 1%	400 MPa + Timol 1%
Sin <i>Listeria</i>	C-	1 -	2 -	3 -	4 -
Inóculo de <i>L. innocua</i>	C+	1 +	2 +	3 +	4 +

3.3.- Tratamientos y recuentos

Los criotubos del primer tratamiento **C** son los únicos que no van a introducirse en la máquina de altas presiones hidrostáticas porque no van a recibir un tratamiento como tal, nos van a servir de control. Los criotubos del tratamiento **3** y **4** que van a recibir una mezcla de altas presiones y timol, van a ser pipeteados con timol además del extracto de pescado antes de ser sometidos a las presiones. De igual manera todos los criotubos que lo requieran serán inoculados con *Listeria* pre-tratamiento con altas presiones. Esto debe realizarse en condiciones asépticas, bajo el mechero bunsen.

La duración del ensayo va a ser de 8 días, desde el primer día, el 0 hasta el último que será el 7. De estos sólo en 4 se van a realizar siembras, de manera que los criotubos preparados son almacenados en la cámara frigorífica hasta que sea el día especificado de su siembra. Los primeros criotubos justo tras ser tratados, los segundos a los dos días, y así sucesivamente de forma que veamos cómo evoluciona la conservación del extracto de pescado a lo largo de una semana.

El método de actuación a seguir cada día sería, en primer lugar, sacar los 10 criotubos correspondientes de la cámara frigorífica y preparar las placas de TSA y PALCAM que se van a sembrar con ellos. Con cada criotubo se van a sembrar mínimo dos placas, una de TSA y otra de PALCAM, aunque por lo general serán más pues habrá que realizar diluciones para poder tener un número de colonias adecuadas en el recuento. Por ello, el primer día se sembraron mayor número de placas para así establecer las diluciones en las que se iba a poder contar entre 30 y 300 colonias.:

-En las muestras inoculadas con *Listeria* y sin combinación de tratamientos (es decir, tratamientos 1, 2 y 3) con cada criotubo se sembró hasta la dilución 10^{-4} tanto en TSA como en PALCAM. Es decir 5 placas de TSA y 5 de PALCAM para cada criotubo. En los criotubos con tratamientos 4 y 5 solo se realizó hasta la dilución -1 pues era de esperar una menor carga bacteriana provocada por la acción conjunta de las presiones con el timol.

-Por otro lado, en las muestras que no se inoculó *Listeria* era de esperar una menor carga bacteriana por ello sólo se sembró hasta dilución -1 en TSA (2

placas por criotubo) y para el PALCAM no se realizaron diluciones pues asumimos que el pescado carecería de listerias y por lo tanto ninguna colonia crecería en este medio que es específico para ellas.

Conforme avanzábamos en el ensayo esto se fue afinando y cada vez era necesario sembrar menos placas, llegando a sembrar sólo dos diluciones en tratamientos donde el primer día se sembraron 4 o 5. Estas eran las dos diluciones donde veíamos que oscilaba el nº de colonias adecuadas para el recuento. Por ejemplo, si en el tratamiento número dos inoculado con *Listeria* se contaban alrededor de 120 colonias en la dilución -4, al siguiente día se siembran esta y la siguiente dilución, dado que lo esperado es que con el tiempo la carga bacteriana aumentase en los criotubos.

Todas estas diluciones se realizaron en tubos eppendorfs rellenos con solución salina. Se toman 0.1 ml con una micropipeta desde el criotubo a el primer eppendorf, se homogeniza y de nuevo se toman otros 0.1 ml cambiando la punta desde este eppendorf al siguiente, y así sucesivamente hasta tener todas las diluciones que requiera ese criotubo. Tanto esta preparación como la siembra se realizan lógicamente en las condiciones asépticas generadas por el mechero bunsen.

Para la siembra, se toman también 0,1 ml con una micropipeta y se vierten sobre la placa. Para la extensión del medio usamos asas de Digrafsky hasta que quede seco. Una vez sembradas y extendidas las placas de Petri se llevan a la estufa de 37°C y se almacenan un día. A las 24h se hace el recuento si han crecido lo suficiente las colonias. Si no se pueden contar bien se dejan crecer un día más.

El rotulado de las placas de Petri es muy importante para identificar rápidamente tus placas y tener claro a qué tratamiento y día pertenece cada una. Este rotulado se realizó de la siguiente forma:

-El primer número corresponde al día de ensayo: 0, 2, 5 o 7; en este caso el día 0 o inicial.

-La letra P corresponde a mi ensayo, sobre pescado, de forma que si esté sola corresponde a tratamientos sin *Listeria* y si está acompañada de una T corresponde a los inoculados con esta bacteria.

-El subíndice que acompaña a P o PT corresponde al tratamiento específico aplicado (C, 1, 2, 3 o 4)

-El número entre paréntesis hace referencia a la dilución (0, -1, -2, ...)

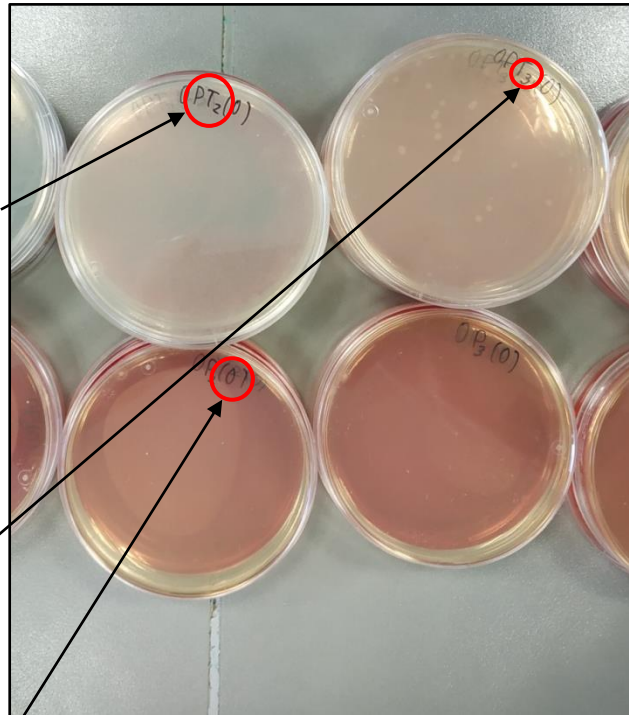


Figura 6: Rotulación de las placas de Petri

4.- Resultados

En general los resultados obtenidos son coherentes. Se han obtenido al multiplicar el número de colonias separadas de cada placa por la dilución correspondiente en la que han crecido y por 10, ya que la propia siembra es una dilución en sí pues se inoculan 0,1 ml de extracto en cada placa.

Los resultados obtenidos en las muestras control fueron, como era de esperar, los que más crecimiento bacteriano presentaban puesto que no fueron procesados con ninguna técnica. En todas las placas de medio PALCAM sembradas sin inóculo de *L. innocua* hubo ausencia de crecimiento, ya que este medio es específico para *Listeria* y el pescado supuestamente no estaba contaminado con este género bacteriano. La siembra de estas placas nos ha permitido corroborarlo y servir como control frente a los tratamientos que sí son inoculados con esta bacteria.

También se ha cumplido nuestra premisa de que en las placas del medio TSA el crecimiento siempre va a ser mayor que en su homólogo de PALCAM. Esto se debe a que, en el caso de las placas con *Listeria*, en el TSA la carga bacteriana es mayor pues se suma la microbiota del propio pescado con el inóculo de *L. innocua* mientras que en el medio PALCAM no crece la microbiota. En el caso de los tratamientos negativos, es decir, sin *L. innocua*, en el medio PALCAM no crece nada como acabamos de ver. Por lo tanto, siempre hay más crecimiento en TSA.

El paso de los días también se ve reflejado en los resultados. Hay un mayor crecimiento bacteriano en los últimos días en los tratamientos 1 y 2, debido a la recuperación y reproducción de aquellas células que sobrevivieron a estos tratamientos. Tanto *L. innocua* como la microbiota del pescado son capaces de crecer a la temperatura que se ha almacenado (refrigeración, entre 4°C y 8°C). Sin embargo, en el control con *Listeria* ocurre lo contrario, hay más crecimiento en los días 0 y 2 que en los días 5 y 7. En los tratamientos 1 y 2 también hay una pequeña disminución en el crecimiento del día 7 pero no parece significativo pues es del mismo orden de magnitud que el día 5.

4.1.- Tratamiento del extracto de pescado con alta presión hidrostática

Si nos fijamos en los resultados obtenidos reflejados en la tabla 3, los recuentos en la muestra control de extracto de pescado se encuentran entre 6 y 7 unidades logarítmicas en el medio general de cultivo TSA a lo largo de los 7 días de almacenamiento. No se detectaron listerias en el medio selectivo PALCAM. Cuando el extracto de pescado fue inoculado con *L. innocua* el recuento general subió ligeramente y si se pudo detectar las listerias en el medio selectivo en el orden de 7 u 8 unidades logarítmicas a lo largo de todo el experimento.

Tabla 3: Recuento del nº de bacterias viables en las placas de TSA y PALCAM sembradas en el control y el tratamiento 1 (300 MPa) expresado en UFC/ml

Control								
Día 0		Día 2		Día 5		Día 7		
TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC	
Sin <i>L. innocua</i> (-)	7x10 ⁶	0	8.6x10 ⁶	0	1.3x10 ⁷	0	8.4x10 ⁶	0
Con <i>L. innocua</i> (+)	8.9x10 ⁸	1.1x10 ⁸	9.6x10 ⁸	1.2x10 ⁸	3.8x10 ⁷	1.8x10 ⁷	2.9x10 ⁷	1.3x10 ⁷
Tratamiento 1 (300 MPa)								
Día 0		Día 2		Día 5		Día 7		
TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC	
Sin <i>L. innocua</i> (-)	9.4x10 ²	0	1.6x10 ³	0	1.9x10 ³	0	2.2x10 ⁴	0
Con <i>L. innocua</i> (+)	3x10 ⁷	3x10 ⁷	3.4x10 ⁷	3.2x10 ⁷	7.4x10 ⁷	2.4x10 ⁷	6.3x10 ⁷	3.1x10 ⁷

Cuando el extracto de pescado fue tratado por alta presión hidrostática a 300 MPa durante 5 minutos, en el caso de la muestra de extracto control se detectó un descenso en el crecimiento bacteriano de 3 o 4 unidades logarítmicas a lo largo del tiempo. Sin embargo en las muestras de extracto de pescado inoculadas con *L. innocua*, el descenso tanto en la microbiota total cómo en el medio selectivo fue mínimo, detectándose tan sólo el descenso de una unidad logarítmica en alguno de los días de ensayo.

Cuando las muestras fueron sometidas a un tratamiento de alta presión hidrostáticas de 400 MPa (tabla 4, tratamiento 2) si se observó un descenso importante en las muestras control, dónde el descenso fue superior los dos primeros días de ensayo, aunque el último día los recuentos ascendieron hasta 1.8×10^4 UFC. Si nos fijamos en las muestras de extracto de pescado tratadas con *L. innocua*, el tratamiento 2 fue más efectivo que el tratamiento 1. Los recuentos en el medio TSA se mantuvieron entre 10^5 y 10^6 a lo largo del ensayo y en el caso del medio selectivo PALCAM, se observó cómo en los primeros días el recuento había disminuido (la mitad del control en el día 2), pero luego en el día 5 y día 7 se fueron recuperando, quedando tan sólo a una unidad logarítmica menos que en las muestras control.

Tabla 4: Recuento del nº de bacterias viables en las placas de TSA y PALCAM sembradas en el tratamiento 2 (400 MPa) expresado en UFC/ml

Tratamiento 2 (400 MPa)								
Día 0		Día 2		Día 5		Día 7		
TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC	
Sin <i>L. innocua</i> (-)	3×10^1	0	7.6×10^2	0	3×10^3	0	1.8×10^4	0
Con <i>L. innocua</i> (+)	3.1×10^5	5×10^2	3.5×10^5	3×10^4	3.1×10^6	4.7×10^5	2.1×10^6	1.9×10^6

Si representamos gráficamente los dos tratamientos realizados (ver figura 7), en el caso de las muestras de extracto de pescado sin inocular, vemos cómo el tratamiento 2 a 400 MPa es más efectivo en el tiempo 0 y a dos días de ensayo, pero conforme aumentan los días de incubación los dos tratamientos son igual de efectivos frente a la microbiota del extracto de pescado.

TSA sin *L. innocua*

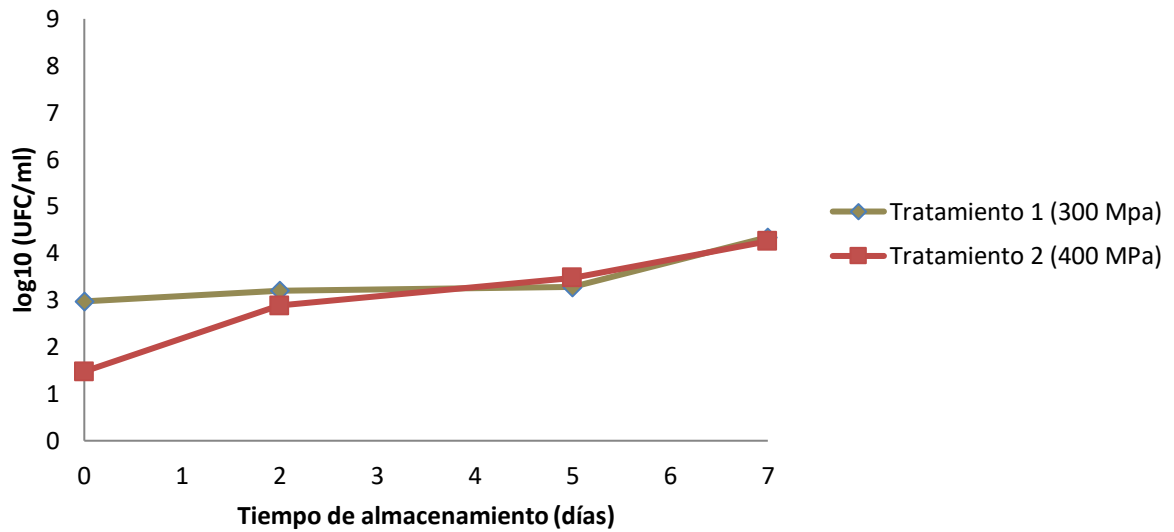


Figura 7: Cambios a lo largo de 7 días en el recuento de colonias de las placas de TSA sin *L. innocua* de los tratamientos 1 y 2 expresado en log₁₀(CFU/ml). Para que fuesen visualmente adecuadas, en esta y las siguientes gráficas se les ha aplicado a los datos el log₁₀

Si representamos gráficamente los resultados obtenidos en las muestras tratadas con listerias y sometidas a ambos tratamientos en TSA (ver figura 8), vemos cómo con el tratamiento 2 a 400 MPa se consigue una reducción del crecimiento de unas dos unidades logarítmicas a lo largo de todo el ensayo.

TSA con *L. innocua*

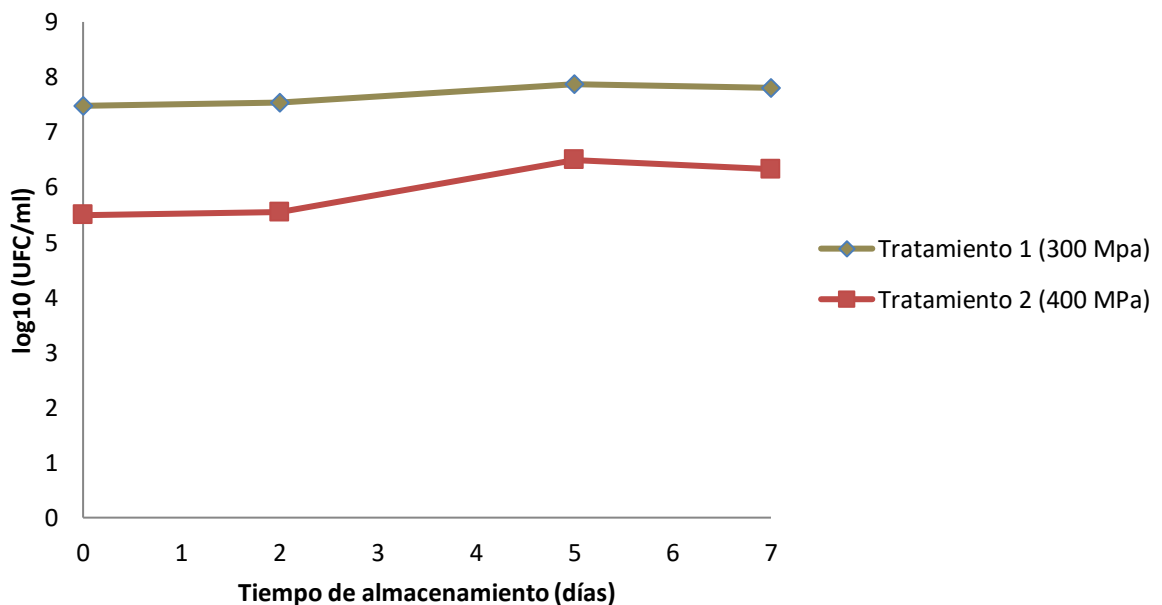


Figura 8: Cambios a lo largo de 7 días en el recuento de colonias de las placas de TSA con *L. innocua* de los tratamientos 1 y 2 expresado en log₁₀(CFU/ml).

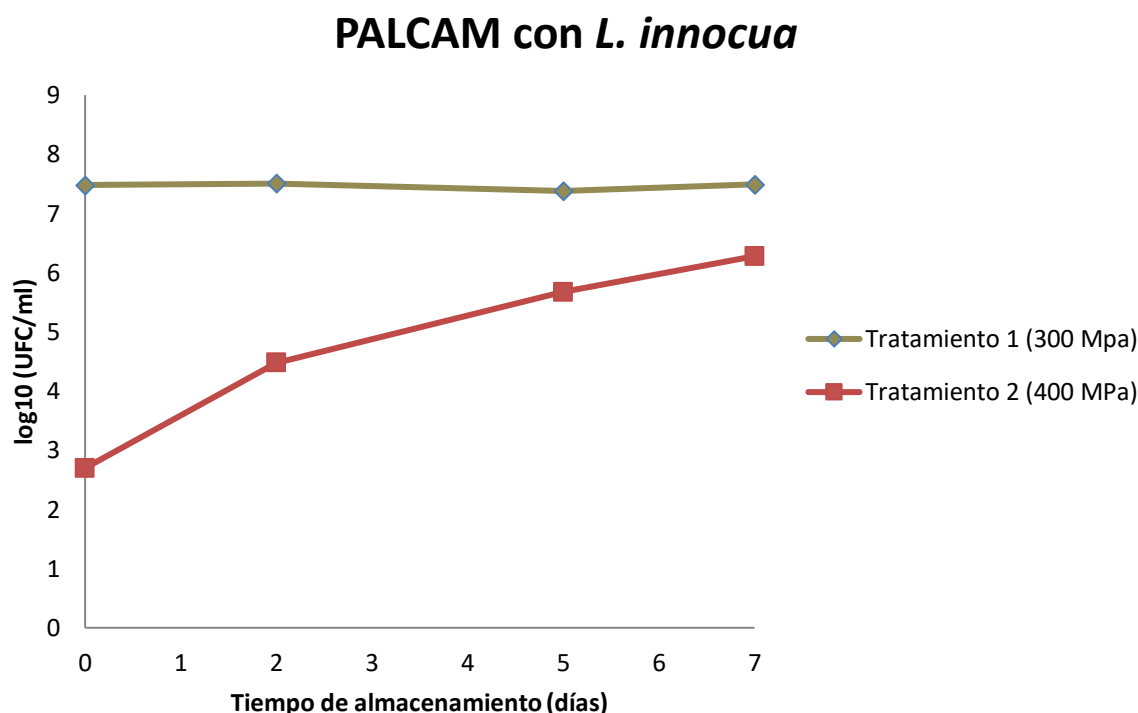


Figura 9: Cambios a lo largo de 7 días en el recuento de colonias de las placas de PALCAM con *L. innocua* de los tratamientos 1 y 2 expresado en log₁₀(CFU/ml).

En el caso del medio selectivo PALCAM, representado en la gráfica 9 y que nos indica el crecimiento de las listerias inoculadas que han sobrevivido a los dos tratamientos, observamos que el tratamiento 2 fue muy efectivo hasta los 5 días de incubación, a partir del quinto día la diferencia de los dos tratamientos fue tan sólo de alrededor de 2 unidades logarítmicas.

4.2.- Tratamiento del extracto de pescado con alta presión hidrostática combinada con un antimicrobiano

Para poder potenciar la acción de las altas presiones hidrostáticas observadas se combinaron con un antimicrobiano como es el timol, en nuestro caso al 1%.

Si nos fijamos en la tabla 5, no se detectó crecimiento ni en las muestras control ni en las muestras tratadas con *Listeria*. Los recuentos fueron 0 tanto en el medio general

TSA cómo en el medio selectivo PALCAM cuando las muestras fueron tratadas a 300 megapascuales y con un 1% de timol

Tabla 5: Recuento del n° de bacterias viables en las placas de TSA y PALCAM sembradas en el tratamiento 3 (300 MPa + timol 1%) expresado en UFC/ml

Tratamiento 3 (300 MPa + timol 1%)								
	Día 0		Día 2		Día 5		Día 7	
	TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC
Sin <i>L. innocua</i> (-)	0	0	0	0	0	0	10	0
Con <i>L. innocua</i> (+)	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 6: Recuento del n° de bacterias viables en las placas de TSA y PALCAM sembradas en el tratamiento 4 (400 MPa + timol 1%) expresado en UFC/ml

Tratamiento 4 (400 MPa + timol 1%)								
	Día 0		Día 2		Día 5		Día 7	
	TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC	TSA	PALC
Sin <i>L. innocua</i> (-)	0	0	0	0	0	0	0	0
Con <i>L. innocua</i> (+)	0	0	0	0	0	0	0	0

En el tratamiento 4, realizado a 400 megapascuales combinado con timol al 1% (tabla 6), al igual que en el caso anterior no se detecta crecimiento ni en el medio general TSA ni en el medio selectivo PALCAM en las muestras control y tratadas con *listeria*.

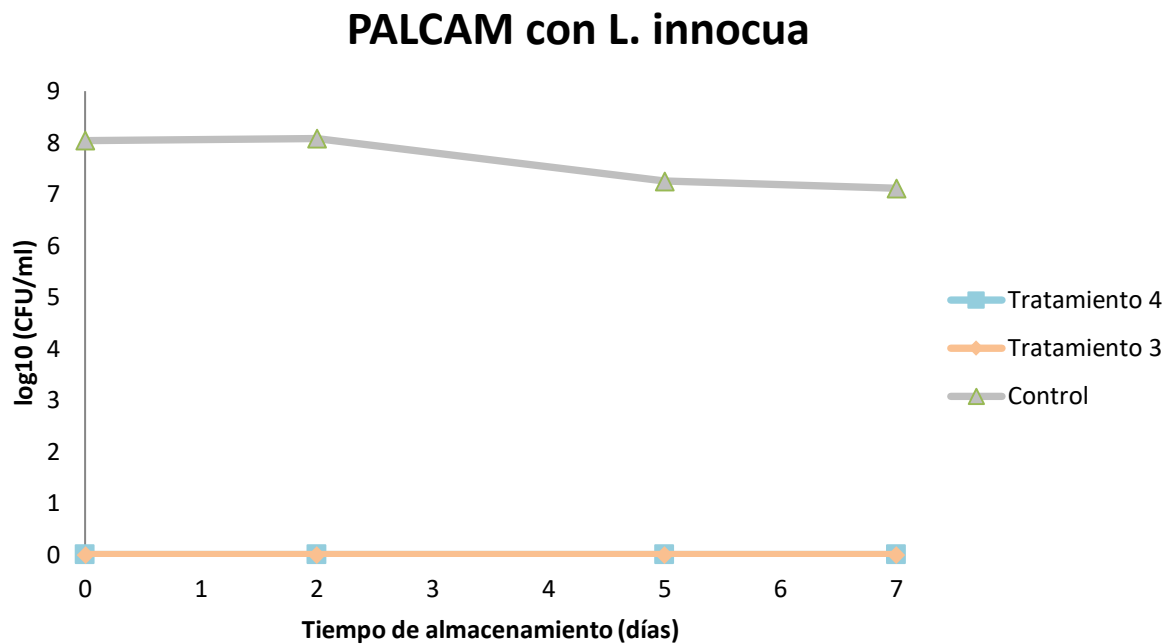


Figura 10: Cambios a lo largo de 7 días en el recuento de colonias de las placas de PALCAM con *L. innocua* de los tratamientos 3, 4 y control expresado en log₁₀(CFU/ml).

La figura 10 representa gráficamente los resultados obtenidos en los tratamientos 3, 4 y control tratados con listerias en el medio selectivo PALCAM. Se aprecia que tanto en el tratamiento 3 como en el 4, que combinan alta presión y timol al 1%, el efecto es máximo consiguiendo un recuento de 0 en ambas durante toda la semana, alrededor de 8 unidades logarítmicas inferiores respecto al control.

Lo más destacable de los tratamientos 3 y 4 (aparte de la ausencia de crecimiento generalizada que demuestra la gran sinergia entre las altas presiones y el timol) es las 10 unidades formadoras de colonias (UFC) en el TSA del día 7 del tratamiento 3 sin *Listeria*. Lo más probable es que haya habido una pequeña contaminación ya que en los días anteriores no crece nada. Otra posible explicación es que en esta combinación de técnicas sobrevivan algunas bacterias que simplemente tardan muchos más días en recuperarse. Esto sólo podría demostrarse reproduciendo el estudio pero con una mayor duración y así ver si tras una semana hay crecimiento.

5.- Discusión

Estos resultados demuestran, en primer lugar, el gran efecto antimicrobiano resultado de la combinación de las altas presiones (300 y 400 MPa) y el timol al 1%. El efecto sinérgico es tal que a lo largo de los 7 días del ensayo no se observa crecimiento ni en el tratamiento 3 ni en el 4 (exceptuando la placa del séptimo día en el tercer tratamiento antes mencionada). Tanto la microbiota del pescado como *L. innocua* son totalmente inhibidas con estos tratamientos, al menos en la semana de transcurso de este estudio. Es por ello que sería conveniente realizar otro estudio centrado en la combinación de estos tratamientos pero con una mayor duración para así determinar la verdadera vida útil que se puede conseguir con ellos. Con nuestros resultados podemos afirmar que la vida útil de este extracto de pescado es de al menos 7 días al ser procesado con los tratamientos 3 y 4.

Por otro lado, los tratamientos 1 y 2 (sólo HPP a 300 y 400 MPa) no nos servirían para extender la vida útil del extracto de pescado pues no reducen durante el tiempo suficiente la carga bacteriana. Es cierto que respecto al control, el primer día consiguen reducir el orden de magnitud de crecimiento microbiano en 4, pero a los pocos días las bacterias se recuperan y deteriorarían el producto. De esta manera aguantaría refrigerado un par de días más respecto a un pescado fresco, por lo tanto no sería rentable procesarlo así pues no alarga significativamente su vida útil.

Al comparar el efecto de los tratamientos de 300 y 400 MPa sobre la microbiota del extracto de pescado se puede apreciar que el segundo parece algo más efectivo durante los primeros días de estudio, reduciendo en casi dos el orden de magnitud del crecimiento microbiano respecto al tratamiento de 300 MPa. Lógicamente cuanto más presión se utilice más efectivo será el procesado. Sin embargo, a los dos días la carga microbiana se iguala en ambos tratamientos. Esto quiere decir que a su microbiota le cuesta lo mismo recuperarse a ambas presiones.

Sí se aprecia un resultado distinto en ambos tratamientos. En este caso el tratamiento 2 es claramente más efectivo, alrededor de dos órdenes de magnitud inferior al tratamiento 1 durante los 7 días. Como la microbiota a priori se debe comportar como

en las muestras control, esto significa que, para esta bacteria en concreto, la diferencia de presión (de 100 MPa) entre ambos tratamientos es significativa y reduce considerablemente su crecimiento. Prácticamente lo mismo se ve reflejado en el tratamiento 1 frente a las listerias, lo que corrobora que *L. innocua* es más sensible al aumentar la presión hasta 400 MPa. Sin embargo, pese a que estos tratamientos afectan en cierta medida a *L. innocua*, no garantizan una seguridad alimentaria adecuada en este extracto de pescado frente a *Listeria* porque sigue habiendo crecimiento de varios órdenes de magnitud.

Respecto al tratamiento 3 y 4, estos sí son adecuados para garantizar la seguridad alimentaria frente a listerias patógenas porque en ellos directamente no crece ni una sola de estas bacterias. En Ritz et al. (2001) no crecieron listerias al tratarlas sólo con 400 MPa. En nuestro tratamiento con sólo 400 MPa sí se da crecimiento porque, a diferencia de este estudio en el que las listerias se tratan en una solución tampón, nosotros tratamos un extracto de pescado con su propia microbiota y una matriz distinta que, como ya hemos visto, afectan al tratamiento. Factores como el pH, la propia matriz del alimento y la *Aw* afectan a la sensibilidad de los microorganismos al tratamiento con altas presiones (Rendueles et al., 2011). Es por ello que los resultados de este estudio podrían variar si se realizase sobre el filete de merluza y no sobre el extracto. Sería interesante estudiar estas diferencias entre el filete y el extracto ya que para una posible aplicación comercial sería más útil saber cómo afectan estos tratamientos al filete.

Otro aspecto a discutir es, viendo los resultados generales de este estudio, qué tratamiento es el más adecuado y el que debería usarse para procesar pescado. Con nuestro estudio no se podría establecer si uno es mejor que el otro porque, al no ser sobre el filete (que es lo que se comercializa), no podemos afirmar con certeza cuál es el óptimo. Por ejemplo, en base a nuestros resultados el mejor tratamiento sería la combinación de 400 MPa y timol ya que durante los 7 días no crece absolutamente nada y a priori aplicar más presión daría mejor rendimiento. Sin embargo, el tratamiento 3 da unos resultados representativamente idénticos al 4 y, como ya sabemos, una mayor presión podría alterar características del pescado como su textura o color. Es por ello que para los intereses comerciales, sobre el filete podría ser más adecuado el tratamiento

con menor presión. Por lo tanto hay lagunas que se deberían analizar en futuros estudios.

Prosiguiendo con el punto de vista comercial, hemos visto que el timol tiene una gran sinergia con las altas presiones y esta técnica tiene un gran potencial para aumentar la vida útil del pescado, pero no se ha tenido en cuenta cuánto llega a alterar el timol las propiedades organolépticas de éste. Ya hemos visto que el timol a estas concentraciones altera el sabor y aroma de varios alimentos (Corbo et al., 2009). Es por ello que en nuestro estudio decidimos combinar el timol con pescado y no otro alimento, pues este tiene un olor y sabor potentes que pensamos no podían ser encubiertos por el del timol o incluso que la combinación de sus sabores resultase agradable, dándole un toque de frescor al pescado. Sin embargo, se debería cuantificar como afecta realmente a las propiedades del pescado ya que, si este tratamiento se usa para mantener la frescura y características del pescado al mismo tiempo que alargamos su vida útil, no tiene sentido alterar estas cualidades que es lo que buscan los clientes. Otro enfoque sería, dado la gran sinergia vista aquí entre ambos, si a menores concentraciones de timol también se consiguen resultados similares. Así, otros futuros ensayos se podrían enfocar a determinar la concentración mínima de timol con el efecto antimicrobiano más eficiente.

Lo que sí cabe destacar es que la combinación del HPP y el timol tiene un efecto sorprendentemente eficaz y aún queda mucho que mejorar e investigar en torno a estos tratamientos alimentarios.

6.- Conclusiones

- Las altas presiones son la gran alternativa a los tratamientos térmicos pues son capaces de extender la vida útil de los alimentos en condiciones de gran seguridad conservando las propiedades organolépticas y nutricionales de los productos.
- Su aplicación en el pescado es de gran atractivo pues las características del pescado fresco tienen un gran valor, mayor que en otros productos.
- La combinación del HPP con timol al 1% tiene un potente efecto antimicrobiano y ofrece gran seguridad frente a listerias patógenas con lo cual permite extender la vida útil del producto considerablemente.
- Pese a que con este estudio no se ha podido esclarecer cómo este tratamiento combinado afectaría a las características del pescado, es indudable el gran potencial que tiene esta técnica aunque aún queda camino por recorrer para encontrar una aplicación rentable para la industria alimentaria.

7.- Bibliografía

- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A., & Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6), 1294–1302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02740.x>
- Amanatidou, A., Schlüter, O., Lemkau, K., Gorris, L. G. M., Smid, E. J., & Knorr, D. (2000). Effect of combined application of high pressure treatment and modified atmospheres on the shelf life of fresh Atlantic almon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(2), 87–98. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00007-2)
- Ashie, I. N. A., Simpson, B. K., & Ramaswamy, H. S. (1997). Changes in texture and microstructure of pressure-treated fish muscle tissue during chilled storage. *Journal of Muscle Foods*, 8(1), 13– 32. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.1997.tb00375.x>
- Aubourg, S. P., Rodríguez, A., Sierra, Y., Tabilo-Munizaga, G., & Pérez-Won, M. (2013). Sensory and Physical Changes in Chilled Farmed Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Effect of Previous Optimized Hydrostatic High-Pressure Conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1539–1549. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0799-4>
- Ávila, M., Garde, S., Gaya, P., Medina, M., & Nuñez, M. (2010). Effect of High-Pressure Treatment and a Bacteriocin-Producing Lactic Culture on the Proteolysis, Texture, and Taste of Hispánico Cheese. *Journal of Dairy Science*, 89(8), 2882–2893. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72561-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72561-9)
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- Bajovic, B., Bolumar, T., & Heinz, V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Science*, 92(3), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.024>

- Bak, K. H., Lindahl, G., Karlsson, A. H., Lloret, E., Ferrini, G., Arnau, J., & Orlien, V. (2012). High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat Science*, 90(3), 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.015>
- Bayindirli, A., Alpas, H., Bozoglu, F., & Hizal, M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control*, 17(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.002>
- Black, E. P., Setlow, P., Hocking, A. D., Stewart, C. M., Kelly, A. L., & Hoover, D. G. (2007). Response of Spores to Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, 103–119. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00021.x>
- Blázquez, I. O., Burgos, M. J. G., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., & 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. *Frontiers in Microbiology*, 9(314), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00314>
- Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., & Maureira, H. (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128(2), 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.074>
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P., Frangeul, L., ... Wehland, J. (2003). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: Clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35(3), 207–213. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00448-0](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00448-0)
- Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A., Bozoglu, F., & Demazeau, G. (2008). Compression heating of selected pressure transmitting fluids and liquid foods during high hydrostatic pressure treatment. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.08.014>

- Campus, M. (2010). High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood. *Food Engineering Reviews*, 2(4), 256–273. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9028-y>
- Canto, A. C. V. C. S., Lima, B. R. C. C., Cruz, A. G., Lázaro, C. A., Freitas, D. G. C., Faria, J. A. F., ... Silva, T. P. J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure on the color and texture parameters of refrigerated Caiman (*Caiman crocodilus yacare*) tail meat. *Meat Science*, 91(3), 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.023>
- Carbonell-Capella, J. M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2013). High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with Stevia rebaudiana Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.01.011>
- Cepeda, A., Vázquez, M. J., Fente, C., Vázquez, B. I., & Franco, C. M. (2002). Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1–2), 157–163. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00429-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00429-9)
- Chan, J. T. Y., Omana, D. A., & Betti, M. (2011). Application of high pressure processing to improve the functional properties of pale, soft, and exudative (PSE)-like turkey meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(3), 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.03.004>
- Chapman, B., Winley, E., Fong, A. S. W., Hocking, A. D., Stewart, C. M., & Buckle, K. A. (2007). Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(4), 531–534. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.011>
- Considine, K. M., Kelly, A. L., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Sleator, R. D. (2008). High-pressure processing - Effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, 281(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01084.x>
- Corbo, M. R., Di Giulio, S., Conte, A., Speranza, B., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. A. (2009). Thymol and modified atmosphere packaging to control microbiological spoilage in packed fresh cod hamburgers. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(8), 1553–1560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01822.x>

- Daryaei, H., Coventry, M. J., Versteeg, C., & Sherkat, F. (2008). Effect of high pressure treatment on starter bacteria and spoilage yeasts in fresh lactic curd cheese of bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.06.011>
- De Alba, M., Pérez-Andrés, J. M., Harrison, S. M., Brunton, N. P., Burgess, C. M., & Tiwari, B. K. (2019). High pressure processing on microbial inactivation, quality parameters and nutritional quality indices of mackerel fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 55, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.05.010>
- Evans, J. D., & Martin, S. A. (2000). Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology*, 41(5), 336–340. <https://doi.org/10.1007/s002840010145>
- Evrendilek, G. A. (2018). Effects of High Pressure Processing on Bioavailability of Food Components. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 8(2), 1–5 <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000676>
- Gómez-Estaca, J., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., López de Lacey, A., & Montero, P. (2009). High pressure technology as a tool to obtain high quality carpaccio and carpaccio-like products from fish. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.10.006>
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., & Gómez-Guillén, M. C. (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105(2), 511–520. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.006>
- Gould, G. W., & Sale, A. J. H. (1970). Initiation of Germination of Bacterial Spores by Hydrostatic Pressure. *Journal of General Microbiology*, 60(3), 335–346. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-3-335>
- Gram, L., & Huss, H. H. (2000). Flesh and processed fish and shellfish. In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The microbiological safety and quality of food*, 1, 472– 506.

- Grove, S. F., Forsyth, S., Wan, J., Coventry, J., Cole, M., Stewart, C. M., ... Lee, A. (2008). Inactivation of hepatitis A virus, poliovirus and a norovirus surrogate by high pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.006>
- Hayman, M. M., Anantheswaran, R. C., & Knabel, S. J. (2007). The effects of growth temperature and growth phase on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in whole milk subject to high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.019>
- Heindl, P., Garcia, A. F., Butz, P., Trierweiler, B., Voigt, H., Pfaff, E., & Tauscher, B. (2008). High pressure/temperature treatments to inactivate highly infectious prion subpopulations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(3), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.013>
- Hite, B. H. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull West Virginia Agricultural Experiment Station*, 146, 1–67.
- Hurtado, J. L., Montero, P., & Borderías, A. J. (2000). Extension of shelf life of chilled hake (*Merluccius capensis*) by high pressure. *Food Science and Technology International*, 6(3), 243–249. <https://doi.org/10.1177/108201320000600307>
- Ju, X. R., Gao, Y. L., Yao, M. L., & Qian, Y. (2008). Response of *Bacillus cereus* spores to high hydrostatic pressure and moderate heat. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2104–2112. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.011>
- Juliano, P., Koutchma, T., Sui, Q., Barbosa-Cánovas, G. V., & Sadler, G. (2010). Polymeric-Based Food Packaging for High-Pressure Processing. *Food Engineering Reviews*, 2(4), 274–297. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9026-0>
- Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A., & Ray, B. (2004). Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 91–98. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00324-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00324-6)

- Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. i. (1995). Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2839–2845. <https://doi.org/10.1021/jf00059a013>
- Knoerzer, K., Buckow, R., Sanguansri, P., & Versteeg, C. (2010). Adiabatic compression heating coefficients for high-pressure processing of water, propylene-glycol and mixtures - A combined experimental and numerical approach. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.017>
- Kovač, K., Bouwknecht, M., Diez-Valcarce, M., Raspor, P., Hernández, M., & Rodríguez-Lázaro, D. (2012). Evaluation of high hydrostatic pressure effect on human adenovirus using molecular methods and cell culture. *International Journal of Food Microbiology*, 157(3), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.006>
- Kovač, K., Diez-Valcarce, M., Hernandez, M., Raspor, P., & Rodríguez-Lázaro, D. (2010). High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses. *Trends in Food Science and Technology*, 21(11), 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.002>
- Kovač, K., Diez-Valcarce, M., Hernandez, M., Raspor, P., & Rodríguez-Lázaro, D. (2010). High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses. *Trends in Food Science and Technology*, 21(11), 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.002>
- Lakshmanan, R., Piggott, J. R., & Paterson, A. (2003). Potential applications of high pressure for improvement in salmon quality. *Trends in Food Science and Technology*, 14(9), 354–363. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00121-3)
- Landl, A., Abadias, M., Sárraga, C., Viñas, I., & Picouet, P. A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple purée product. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.09.001>
- Leavitt, J. M., Naidorf, I. J., & Shugaevsky, P. (1955). The undetected anaerobe in endodontics: a sensitive medium for detection of both aerobes and anaerobes. *The NY J. Dentist*. 25, 377-382.

- Li, L., Feng, L., Yi, J., Hua, C., Chen, F., Liao, X., ... Hu, X. (2010). High hydrostatic pressure inactivation of total aerobic bacteria, lactic acid bacteria, yeasts in sour Chinese cabbage. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 180–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.020>
- Linton, M., McClements, J. M. J., & Patterson, M. F. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during Storage in Pressure-Treated Orange Juice. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1038–1040. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.9.1038>
- Liu, Y., Selomulyo, V. O., & Zhou, W. (2008). Effect of high pressure on some physicochemical properties of several native starches. *Journal of Food Engineering*, 88(1), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.001>
- López-Caballero, M. E., Pérez-Mateos, M., Borderías, J. A., & Montero, P. (2000). Extension of the Shelf Life of Prawns (*Penaeus japonicus*) by Vacuum Packaging and High-Pressure Treatment. *Journal of Food Protection*, 63(10), 1381–1388. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.10.1381>
- Ma, H., & Ledward, D. A. (2013). High pressure processing of fresh meat - Is it worth it? *Meat Science*, 95(4), 897–903. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.025>
- Mañas, P., & Mackey, B. M. (2004). Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential -and stationary- phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1545–1554. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1545>
- Mastromatteo, M., Danza, A., Conte, A., Muratore, G., & Del Nobile, M. A. (2010). Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.002>
- Matser, A. M., Krebbers, B., Van Den Berg, R. W., & Bartels, P. V. (2004). Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.08.005>

- Matser, A. M., Stegeman, D., Kals, J., & Bartels, P. V. (2000). Effects of high pressure on colour and texture of fish. *High Pressure Research*, 19(1–6), 109–115. <https://doi.org/10.1080/08957950008202543>
- McClements, J. M. J., Patterson, M. F., & Linton, M. (2001). The Effect of Growth Stage and Growth Temperature on High Hydrostatic Pressure Inactivation of Some Psychrotrophic Bacteria in Milk. *Journal of Food Protection*, 64(4), 514–522. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.4.514>
- Mengden, R., Röhner, A., Sudhaus, N., & Klein, G. (2015). High-pressure processing of mild smoked rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*) and fresh European catfish fillets (*Silurus glanis*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.10.002>
- Mensitieri, G., Scherillo, G., & Iannace, S. (2013). Flexible packaging structures for high pressure treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.007>
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C. T., Welte-Chanes, J., & Torres, A. (2011). High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 969–985. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0543-5>
- Murchie, L. W., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., Linton, M., Patterson, M. F., Smiddy, M., & Kelly, A. L. (2005). High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(3), 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.04.001>
- Norton, T., & Sun, D. W. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2–34. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0007-0>
- O'Reilly, C. E., Murphy, P. M., Kelly, A. L., Guinee, T. P., Auty, M. A. E., & Beresford, T. P. (2002). The effect of high pressure treatment on the functional and rheological properties of Mozzarella cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(1), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(01\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00054-6)

- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(6), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.04.001>
- Ohshima, T., Ushio, H., & Koizumi, C. (1993). High-pressure processing of fish and fish products. *Trends in Food Science and Technology*, 4(11), 370–375. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90019-7](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90019-7)
- Oxen, P. & Knorr, D. (1993) Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Lebensm Wiss Technol*, 26(3), 220–223. <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1048>
- Paarup, T., Sanchez, J. A., Moral, A., Christensen, H., Bisgaard, M., & Gram, L. (2002). Sensory, chemical and bacteriological changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 941–950. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01604.x>
- Patazca, E., Koutchma, T., & Balasubramaniam, V. M. (2007). Quasi-adiabatic temperature increase during high pressure processing of selected foods. *Journal of Food Engineering*, 80(1), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.05.014>
- Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1400–1409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02564.x>
- Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P., & Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*, 74(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x>
- Pérez-Baltar, A., Serrano, A., Bravo, D., Montiel, R., & Medina, M. (2019). Combined Effect of High Pressure Processing with Enterocins or Thymol on the Inactivation of *Listeria monocytogenes* and the Characteristics of Sliced Dry-cured Ham. *Food and Bioprocess Technology*, 12(2), 288–297. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2212-4>

- Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B., & Daneshvar, M. I. (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 35(2), 245–254. <https://doi.org/10.1139/m89-037>
- Rao, L., Wang, Y., Chen, F., & Liao, X. (2016). The synergistic effect of high pressure CO₂ and nisin on inactivation of *Bacillus subtilis* spores in aqueous solutions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1507. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01507>
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69–112. <https://doi.org/10.1080/10408390600626420>
- Reddy, N. R., Solomon, H. M., Tetzloff, R. C., & Rhodehamel, E. J. (2003). Inactivation of *Clostridium botulinum* Type A Spores by High-Pressure Processing at Elevated Temperatures. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1402–1407. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.8.1402>
- Reddy, N. R., Tetzloff, R. C., Solomon, H. M., & Larkin, J. W. (2006). Inactivation of *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B spores by high pressure processing at moderate to elevated high temperatures. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7(3), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.03.002>
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., & Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1251–1260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.001>
- Ritz, M., Pilet, M. F., Jugiau, F., Rama, F., & Federighi, M. (2006). Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* using high-pressure treatments: Destruction or sublethal stress? *Letters in Applied Microbiology*, 42(4), 357–362. <https://doi.org/10.1111/j.1472765X.2006.01868.x>
- Ritz, M., Tholozan, J. L., Federighi, M., & Pilet, M. F. (2001). Morphological and Physiological Characterization of *Listeria monocytogenes* Subjected to High

Hydrostatic Pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2240–2247. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2240-2247.2001>

-Rivalain, N., Roquain, J., & Demazeau, G. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Advances*, 28(6), 659–672. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.001>

-Rodriguez, E., Arques, J. L., Nuñez, M., Gaya, P., & Medina, M. (2005). Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3399–3404. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3399-3404.2005>

-Rosypal, A. C., Zajac, A. M., Flick, G. J., Bowman, D. D., & Lindsay, D. S. (2011). High pressure processing treatment prevents embryonation of eggs of *Trichuris vulpis* and *Ascaris suum* and induces delay in development of eggs. *Veterinary Parasitology*, 181(2–4), 350–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.002>

-Rúa, J., del Valle, P., de Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., & García-Armesto, M. R. (2019). Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathogens and Disease*, XX(XX), 1–8. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2594>

-Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G., & Orlie, V. (2010). Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated. *Meat Science*, 86(2), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.036>

-Shearer, A. E. H., Wilkins, G. C., Jenkins, M. C., & Kniel, K. E. (2007). Effects of high hydrostatic pressure on *Eimeria acervulina* pathogenicity, immunogenicity and structural integrity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(2), 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.004>

-Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9(4), 152–158. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00030-2)

- Smelt, J. P. P. M., Rijke, A. G. F., & Hayhurst, A. (1994). Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Research*, 12(4–6), 199–203. <https://doi.org/10.1080/08957959408201658>
- Syed, Q. A., Reineke, K., Saldo, J., Buffa, M., Guamis, B., & Knorr, D. (2012). Effect of compression and decompression rates during high hydrostatic pressure processing on inactivation kinetics of bacterial spores at different temperatures. *Food Control*, 25(1), 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.061>
- Ting, E.Y. & Marshall, R.G. (2002). Production Issues Related To Uhp Food. *Engineering and Food for the 21st Century*, 44, 727-738. <https://doi.org/10.1201/9781420010169.ch44>.
- Truong, B. Q., Buckow, R., Stathopoulos, C. E., & Nguyen, M. H. (2015). Advances in High-Pressure Processing of Fish Muscles. *Food Engineering Reviews*, 7(2), 109–129. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9084-9>
- Tsironi, T., Anjos, L., Pinto, P. I. S., Dimopoulos, G., Santos, S., Santa, C., ... Power, D. (2019). High pressure processing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets and tools for flesh quality and shelf life monitoring. *Journal of Food Engineering*, 262, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.010>
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Ulmer, H. M., Herberhold, H., Fahsel, S., Gänzle, M. G., Winter, R., & Vogel, R. F. (2002). Effects of Pressure-Induced Membrane Phase Transitions on Inactivation of HorA, an ATP-Dependent Multidrug Resistance Transporter, in *Lactobacillus plantarum*. *Danish Veterinary and Agricultural Lib*, 68(3), 1088–1095. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1088>
- Ulmer, H. M., M. G. Gänzle, & R. F. Vogel. (2000). Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW 1.460. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3966–3973. <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.3966-3973.2000>

- Van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk, A., Curtis, G. D. W., & Mossel, D. A. A. (1989). Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 8(4), 299–316. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90001-9)
- Xia, Q., Wang, L., Xu, C., Mei, J., & Li, Y. (2017). Effects of germination and high hydrostatic pressure processing on mineral elements, amino acids and antioxidants in vitro bioaccessibility, as well as starch digestibility in brown rice (*Oryza sativa* L.). *Food Chemistry*, 214, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.114>
- Yagiz, Y., Kristinsson, H. G., Balaban, M. O., Welt, B. A., Ralat, M., & Marshall, M. R. (2009). Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. *Food Chemistry*, 116(4), 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.029>
- Yaldagard, M., Mortazavi, S. A., & Tabatabaie, F. (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7(16), 2739–2767. <https://doi.org/10.5897/AJB07.923>