



UNIVERSIDAD DE JAÉN

CENTRO: FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO: CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

INCREMENTO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA
MEDIANTE TRATAMIENTOS HIPERBÁRICOS
EN ALIMENTOS PASTEURIZADOS *SOUS VIDE*
CON REDUCIDO PROCESAMIENTO TÉRMICO

PRESENTADA POR:
DIEGO PÉREZ ALCALÁ

DIRIGIDA POR:
Dr. ANTONIO GÁLVEZ DEL POSTIGO RUIZ
Dra. ROSARIO LUCAS LÓPEZ
Dr. RUBÉN PÉREZ PULIDO

JAÉN, JULIO de 2023

ISBN:

IN MEMORIAM...

A. ALCALÁ
N. PARTERA

NECESARIAMENTE AGRADECIDO...

A LA EXTRAORDINARIA CALIDAD HUMANA
DE LOS DIRECTORES DE ESTE TRABAJO

AL AUXILIO OMNÍMODO E INFATIGABLE DE
MÓNICA PARRAS

RESUMEN

Fundamentalmente, en este trabajo se pretendió evaluar la calidad microbiológica que proporcionan las formulaciones usuales de cocción *sous vide* (SV) en elaboraciones con distintos tipos de materias primas (vegetal, carne y pescado); así como determinar si, en aquellos casos en que el grado de higienización alcanzado no permite la conservación refrigerada del producto (SV en cocción directa, o bajo el umbral térmico de seguridad), dicha imposibilidad se podría revertir mediante la aplicación adicional de tratamientos con altas presiones hidrostáticas (HPP).

Conforme a lo expuesto, se realizaron tres elaboraciones en cocción SV (de distintas intensidades según naturaleza del alimento); efectuando un doble ensayo en los casos de carne y pescado:

- Judías verdes con jamón y cebolla: SV (90 °C, 1h 45')
- Pierna de cordero en su jugo: SV₁ (67.5 °C, 8h) y SV₂ (65 °C, 24h)
- Lomo de bacalao al pilpil: SV₁ (57.1 °C, 30') y SV₂ (52 °C, 20')



Las muestras sometidas a tales tratamientos térmicos conformaron el grupo control o de referencia, frente a las que recibieron adicionalmente algún tipo de procesamiento hiperbárico. Con objeto de inferir la influencia de los distintos parámetros de presurización sobre la eficiencia higienizante del tratamiento HHP, se ensayaron diversas combinaciones de presión hidrostática, temperatura de la cámara de presurización y tiempo de retención.

El análisis microbiológico se realizó sobre los géneros bacterianos especificados en los criterios microbiológicos que establecen las normativas aplicables para este tipo de alimentos; de modo que sus resultados obtenidos se pudieran extrapolar a términos de vida útil del producto.

La frecuencia de muestreo fue idéntica en todos los ensayos durante el primer mes de almacenamiento (días 0, 3, 7, 14 y 30); difiriendo según ensayo a partir de entonces, tanto su frecuencia (mensual en los más prolongados: judías y cordero_2; quincenal en los restantes), así como el período total de análisis (de 60 días para los ensayos preliminares, hasta 270 días en los de mayor duración).

Se comprobó que el tratamiento SV de las judías suponía, por sí solo, un excelente método de conservación: permitiendo que las muestras control mantuvieran recuentos de células viables bajo el umbral de detección en la totalidad de los medios a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento (270 días).

En el caso del cordero se constató la importancia de la relación temperatura-tiempo en la efectividad higienizante de la cocción SV: se estimó una vida útil de 60 días para las muestras control del ensayo preliminar (mayor temperatura, menor tiempo); mientras que las muestras presurizadas mantenían los recuentos de células viables por debajo del límite de detección en todos los medios a tiempo t_{60} . Sin embargo, en el segundo ensayo (con

temperatura ligeramente inferior, y tiempo mucho más prolongado), la cocción SV permitió que las muestras control proporcionaran recuentos viables bajo el umbral de detección durante 270 días en todos los medios.

En el ensayo preliminar de bacalao (de cierta intensidad relativa: $SV_1 \approx 57^\circ\text{C}$, 30') se estimó que la vida útil de las muestras control no superaba los 45 días; alcanzando los 60 días en las muestras con presurización adicional. En el segundo ensayo, sin embargo, el decremento en temperatura y tiempo (SV_2 : 52°C , 20') supondría que las muestras control registrarán recuentos de enterobacterias a tiempo t_0 al límite de la aceptabilidad. Escenario que mejoró hasta acercarse a 45 días de vida útil, en el caso de las muestras presurizadas sometidas al tratamiento HHP de menor intensidad (300 MPa, 50°C , 8'); o, extendiéndose hasta los 70 días, en aquellas muestras que se procesaron con la presurización más intensa (600 MPa, 50°C , 8').

En este último ensayo se estudió, asimismo, tanto la diversidad bacteriana presente en las diferentes muestras, como la dinámica de sus poblaciones durante el período de almacenamiento refrigerado. Dicho estudio se realizó mediante secuenciación masiva o HTS (acrónimo anglosajón de *High-Throughput Sequencing*); técnica que permitió valorar el impacto de los distintos tratamientos (térmicos e hiperbáricos) sobre las comunidades microbianas de los substratos alimentarios.

Salvo excepciones puntuales y muy minoritarias, en las diversas muestras y a lo largo de la duración del estudio, las poblaciones bacterianas estuvieron compuestas por los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes*. En las muestras control, las mayores abundancias relativas correspondieron a las familias *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Burkholderiaceae* durante el almacenamiento temprano; que darían paso a *Pseudomonadaceae*, para predominar en



el almacenamiento tardío *Enterobacteriaceae* y *Carnobacteriaceae*. Mientras que en las muestras presurizadas se observaron durante el almacenamiento temprano (con cierta variación según la intensidad del tratamiento) mayores abundancias relativas de las familias *Burkholderiaceae*, *Bacillaceae* o *Vibrionaceae*; prevaleciendo en la segunda mitad del período de muestreo las familias acidolácticas (*Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae* y *Aerococcaceae*).

► Palabras clave: cocción *sous vide*, calidad microbiológica, extensión de vida útil, altas presiones hidrostáticas, diversidad bacteriana (*sous vide cooking, microbiological quality, shelf life extensión, high hydrostatic pressure, bacterial diversity*).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. TECNOLOGÍA DE BARRERAS O DE MÉTODOS COMBINADOS.....	24
1.1.1. RADIACIÓN IONIZANTE	28
1.1.2. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA DE ONDA CORTA	30
1.1.3. BACTERIOCINAS Y BACTERIOFAGOS	31
1.1.4. CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS.....	33
1.1.5. OZONIZACIÓN	34
1.1.6. ENVASADO EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS	36
1.1.7. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES.....	39
1.1.8. CAMPOS MAGNÉTICOS OSCILANTES	41
1.1.9. PLASMA FRÍO ATMOSFÉRICO.....	43
1.2. TRATAMIENTOS TÉRMICOS	48
1.2.1. RADIOFRECUENCIAS	48
1.2.2. CALENTAMIENTO ÓHMICO	50
1.2.3. RADIACIÓN DE MICROONDAS.....	52
1.2.4. RADIACIÓN INFRARROJA.....	54
1.2.5. ESTERILIZACIÓN	56
1.2.6. PASTEURIZACIÓN	58
1.2.7. TÉCNICAS CLÁSICAS DE COCINADO	60
1.2.8. PASTEURIZACIÓN POR COCCIÓN <i>SOUS VIDE</i>	66
1.2.8.1. FUNDAMENTOS DE LA PASTEURIZACIÓN <i>SOUS VIDE</i>	67
1.2.8.2. MODALIDADES DE COCCIÓN <i>SOUS VIDE</i>	71
1.2.8.3. COCCIÓN <i>SOUS VIDE</i> BAJO EL UMBRAL TÉRMICO DE SEGURIDAD	76



1.3. TRATAMIENTOS VACUOMÉTRICOS E HIPERBÁRICOS	81
1.3.1. TÉCNICA <i>COOK VIDE</i>	81
1.3.2. LIOFILIZACIÓN	83
1.3.3. ULTRASONIDOS Y MANOSONICACIÓN	86
1.3.4. ALTAS PRESIONES DINÁMICAS.....	90
1.3.5. ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.....	92
1.3.5.1. DESCRIPCIÓN Y FUNDAMENTOS DEL TRATAMIENTO HHP.....	93
1.3.5.2. HIGIENIZACIÓN MEDIANTE PROCESADO HHP.....	95
1.3.5.3. TRANSFORMACIONES NUTRICIONALES Y ORGANOLÉPTICAS POR HPP	99
1.4. MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA	107
1.4.1. NORMATIVA VIGENTE.....	107
1.4.2. MICROORGANISMOS ALTERANTES Y PATÓGENOS.....	111
1.4.2.1. AGENTES ALTERANTES.....	111
1.4.2.2. PRINCIPALES PATÓGENOS ALIMENTARIOS.....	114
1.5. CALIDAD MICROBIOLÓGICA vs CALIDAD GASTRONÓMICA	133
1.5.1. UNA HIPÓTESIS DE TRABAJO	133
1.5.2. UNA COMBINACIÓN ENTRE MUCHAS POSIBLES.....	136
1.5.3. TECNOLOGÍA HPP: ACTUALIDAD Y TENDENCIAS	137
1.5.4. INICIACIÓN AL ANÁLISIS SENSORIAL DE ALIMENTOS.....	144
2. OBJETIVOS	149
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	155
3.1. PROCESADO PREVIO DE LAS MATERIAS PRIMAS	158
3.1.1. ELABORACIÓN_A: JUDÍAS VERDES.....	158
3.1.2. ELABORACIÓN_B: PIERNA DE CORDERO.....	159
3.1.3. ELABORACIÓN_C: LOMO DE BACALAO	160
3.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	163
3.3. TRATAMIENTO TÉRMICO DE LAS MUESTRAS.....	164
3.3.1. PASTEURIZACIÓN SV DE LAS JUDÍAS.....	164
3.3.2. PASTEURIZACIÓN SV DEL CORDERO	165
3.3.3. COCCIÓN SV DEL BACALAO	166

3.4. PROCESAMIENTO HIPERBÁRICO DE LAS MUESTRAS.....	168
3.4.1. TRATAMIENTO HHP DE LAS JUDÍAS	168
3.4.2. TRATAMIENTO HHP DEL CORDERO	169
3.4.3. TRATAMIENTO HHP DEL BACALAO	169
3.5. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	171
3.6. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	176
3.6.1. SIEMBRA EN PLACA Y RECUENTO DE COLONIAS	176
3.6.2. ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD	178
3.6.2.1. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	179
3.6.2.2. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN.....	181
3.7. VALORACIÓN SENSORIAL DE LAS ELABORACIONES	183
4. RESULTADOS.....	189
4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	192
4.1.1. JUDÍAS VERDES: ENSAYO JUD_1	193
4.1.2. CORDERO: ENSAYOS COR_1 Y COR_2.....	195
4.1.3. BACALAO: ENSAYOS BAC_1 Y BAC_2.....	198
4.2. ESTUDIO DE DIVERSIDAD BACTERIANA	208
4.3. RESULTADOS ADICIONALES	215
4.3.1. VARIACIÓN DEL pH DE LAS MUESTRAS.....	215
4.3.2. OTROS RESULTADOS	219
4.4. APRECIACIONES ORGANOLÉPTICAS.....	222
4.4.1. TEST TRIANGULAR.....	223
4.4.2. TEST DE COMPARACIÓN ENTRE PARES.....	226
5. DISCUSIÓN	231
6. CONCLUSIONES.....	269
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	275

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. Tipos de radiación del espectro electromagnético	29
ILUSTRACIÓN 2. Mecanismo de electroporación.....	34
ILUSTRACIÓN 3. Esquema de un generador de plasma frío DBD.....	45
ILUSTRACIÓN 4. Rango IR de uso industrial	55
ILUSTRACIÓN 5. Clasificación de las técnicas culinarias clásicas.....	61
ILUSTRACIÓN 6. Diagrama de flujo en cocción indirecta SV	72
ILUSTRACIÓN 7. Diagrama de flujo en cocción directa SV	73
ILUSTRACIÓN 8. Diagrama P-T del agua	84
ILUSTRACIÓN 9. Espectro sonoro.....	86
ILUSTRACIÓN 10. Fenomenología turbulenta en flujos HDP	91
ILUSTRACIÓN 11. Diagrama de componentes de un equipo HPP	94
ILUSTRACIÓN 12. Pared celular: diferencias estructurales	96
ILUSTRACIÓN 13. Fases de crecimiento microbiano en un sistema cerrado	97
ILUSTRACIÓN 14. Efecto de la presión sobre la pared celular	99
ILUSTRACIÓN 15. Efectos HPP (600 MPa, 3') sobre los gránulos de almidón de patata	103
ILUSTRACIÓN 16. Extracción de carne de marisco mediante HPP.....	140
ILUSTRACIÓN 17. Equipos HPP fabricados por Hiperbaric.....	142
ILUSTRACIÓN 18. Procesado previo de las judías verdes.....	159
ILUSTRACIÓN 19. Procesado previo del cordero.....	160
ILUSTRACIÓN 20. Procesado previo del bacalao	162
ILUSTRACIÓN 21. Envasadora Sammic SE-204.....	163
ILUSTRACIÓN 22. Envasado de muestras.....	163
ILUSTRACIÓN 23. Röner Garhe SV-pro.....	164

ILUSTRACIÓN 24. Equipo HHP Stansted Fluid Power LTD	168
ILUSTRACIÓN 25. Fotorreactividad del PMA.....	179
ILUSTRACIÓN 26. Análisis sensorial de muestras.....	184
ILUSTRACIÓN 27. Análisis sensorial: Formulario test triangular	185
ILUSTRACIÓN 28. Análisis sensorial: Formulario comparación entre pares	187
ILUSTRACIÓN 29. Código de colores según calidad microbiológica.....	192
ILUSTRACIÓN 30. Bacilos Gram+ en TSA a t_{45} COR_1	220
ILUSTRACIÓN 31. Cocos Gram+ en TSA a t_{30} BAC_1	221
ILUSTRACIÓN 32. Género <i>Vulcaniibacterium</i> NCBI	247
ILUSTRACIÓN 33. Estado de latencia celular en <i>Acinetobacter spp.</i>	250



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Propiedades de algunos polímeros empleados en envases	68
TABLA 2. Relación tiempo-temperatura en cocción directa SV de pescados	78
TABLA 3. Barorresistencia orientativa de algunas enzimas	102
TABLA 4. Criterios microbiológicos comidas preparadas grupo B	109
TABLA 5. Clasificación de <i>C. perfringens</i> por producción de toxinas	119
TABLA 6. Evolución taxonómica	121
TABLA 7. Empresas con servicio tolling en 2019 (por países)	141
TABLA 8. Empresas con servicio tolling en España 2021.....	142
TABLA 9. Estimación de costes de procesado HPP según capacidad del equipo	143
TABLA 10. Parametrización de los tratamientos aplicados en los distintos ensayos.....	170
TABLA 11. Formulación y procedimiento medio TSA (Agar soja y triptona).....	171
TABLA 12. Formulación y procedimiento medio MC (Agar MacConkey).....	172
TABLA 13. Formulación y procedimiento medio PALCAM	173
TABLA 14. Formulación y procedimiento medio BGA (Agar verde brillante)	174
TABLA 15. Formulación y procedimiento medio BP (Agar Baird Parker)	175
TABLA 16. Tiempo de muestreo en los distintos ensayos.....	177
TABLA 17. Análisis sensorial: Escala numérica de comparación	186
TABLA 18. Recuentos de células viables en muestras control JUD_1	193
TABLA 19. Recuentos de células viables en muestras presurizadas JUD_1.A y JUD_1.B.....	194
TABLA 20. Recuentos de células viables en COR_1: muestras control vs HPP.....	195
TABLA 21. Recuentos de células viables en COR_2: muestras control vs HPP.....	197
TABLA 22. Recuentos de células viables en muestras control BAC_1.....	199
TABLA 23. Recuentos de células viables en muestras presurizadas BAC_1	200

TABLA 24. Recuentos de células viables en muestras control BAC_2.....	202
TABLA 25. Recuentos células viables en muestras presurizadas BAC_2.D	202
TABLA 26. Recuentos células viables en muestras presurizadas BAC_2.C.....	202
TABLA 27. Recuentos células viables en muestras presurizadas BAC_2.B	203
TABLA 28. Recuentos células viables en muestras presurizadas BAC_2.A	203
TABLA 29. Índices de diversidad α y número de OTUs (nivel género) en BAC_2	208
TABLA 30. Pendientes rectas de regresión pH distintos ensayos	216
TABLA 31. Lecturas de pH en muestras JUD_1	218
TABLA 32. Lecturas de pH en muestras COR_2.....	219
TABLA 33. Lecturas de pH en muestras BAC_2.....	219
TABLA 34. Resumen formularios test triangular en JUD_1.....	223
TABLA 35. Resumen formularios test triangular en COR_1&COR_2	224
TABLA 36. Resumen formularios test triangular en BAC_1&BAC_2	225
TABLA 37. Resumen formularios test comparación entre pares en JUD_1.....	226
TABLA 38. Resumen formularios test comparación entre pares en COR_1&COR_2.....	227
TABLA 39. Resumen formularios test comparación entre pares en BAC_1&BAC_2	228
TABLA 40. Calidad microbiológica (log UFC) a t_{60} ensayos cordero	238
TABLA 41. Resumen vida útil ensayos bacalao	242

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Principales zoonosis en EU 2019.....	117
GRÁFICO 2. Expansión del procesado industrial HHP	138
GRÁFICO 3. Tecnologías no térmicas más empleadas en 2020	138
GRÁFICO 4. Tecnología HPP por sectores	139
GRÁFICO 5. Evolución microbiológica de las muestras en JUD_1.....	194
GRÁFICO 6. Evolución de mesófilos aerobios en COR_1: muestras control vs HPP	196
GRÁFICO 7. Recuentos de enterobacterias en COR_1: muestras control vs HPP.....	196
GRÁFICO 8. Evolución microbiológica de las muestras en CORD_2.....	197
GRÁFICO 9. Comparativa de recuentos de aerobios mesófilos en COR_1 y COR_2	198
GRÁFICO 10. Evolución de mesófilos aerobios en BAC_1: muestras control vs presurizadas.....	201
GRÁFICO 11. Evolución de mesófilos aerobios en BAC_1: muestras control vs presurizadas.....	201
GRÁFICO 12. Recuentos de enterobacterias en BAC_1: muestras control vs presurizadas	201
GRÁFICO 13. Evolución de aerobios mesófilos en BAC_2.....	203
GRÁFICO 14. Evolución de enterobacterias en BAC_2.....	204
GRÁFICO 15. Comparativa de la variación paramétrica HPP (Δ Presión) en BAC_2	205
GRÁFICO 16. Comparativa de la variación paramétrica HHP (Δ Temperatura) en BAC_2.....	205
GRÁFICO 17. Comparativa de la variación paramétrica HHP (Δ tiempo) en BAC_2	206
GRÁFICO 18. Comparativa de recuentos de aerobios mesófilos en BAC_1 y BAC_2.....	206
GRÁFICO 19. Comparativa de recuentos de enterobacterias en BAC_1 y BAC_2	207
GRÁFICO 20. Abundancias microbianas relativas (por filos) en muestras BAC_2	209
GRÁFICO 21. Abundancias microbianas relativas (por familias) en muestras BAC_2.....	211
GRÁFICO 22. Abundancias microbianas relativas (por géneros) en muestras BAC_2	213
GRÁFICO 23. Análisis de coordenadas principales BAC_2	214

GRÁFICO 24. Tendencia pH en muestras JUD_1	215
GRÁFICO 25. Tendencia pH en muestras COR_2	217
GRÁFICO 26. Tendencia pH en muestras BAC_2.....	218
GRÁFICO 27. Comparativa test triangular (SV vs HHP y ≠HHP) en JUD_1	223
GRÁFICO 28. Comparativa test triangular (SV vs HHP y ≠HHP) en COR_1&COR_2	224
GRÁFICO 29. Comparativa test triangular (SV vs HHP y ≠HHP) en BAC_1&BAC_2.....	225
GRÁFICO 30. Comparativa test entre pares (SV vs HHP y ≠HHP) en JUD_1.....	226
GRÁFICO 31. Comparativa test entre pares (SV vs HHP y ≠HHP) en COR_1&COR_2	228
GRÁFICO 32. Comparativa test entre pares (SV vs HHP y ≠HHP) en BAC_1&BAC_2.....	229
GRÁFICO 33. Valoración sensorial judías verdes con tratamiento SV a distintas intensidades	236
GRÁFICO 34. Rangos térmicos de crecimiento de patógenos alimentarios	237



1. INTRODUCCIÓN

*Cualquiera que sea la forma de preparar un riñón de buey,
nunca resultará un plato delicado. Más vale que las personas
exigentes prescindan de él.*

Auguste Escoffier (1934)

Una de las acepciones, acaso la de mayor amplitud semántica, entre las que propone el Diccionario de la Real Academia de la Lengua para el término *Gastronomía* es: *Conjunto de los platos y usos culinarios propios de un determinado lugar* (Real Academia Española, 2020). Un significado éste que se halla estrecha e implícitamente vinculado a una amplia serie de aspectos previos que, en distinta medida, lo moldean y condicionan; como pueden ser, entre otros: las características geográficas, climatológicas y medioambientales de la zona (que determinarán, al cabo, sus recursos agropecuarios y/o pesqueros), diversos rasgos idiosincrásicos (temperamento, creatividad, carácter...), o manifestaciones de índole puramente social, que se conjugan en una región y a través del tiempo para conformar patrimonio, cultura y tradición.

Prueba de que la gastronomía implica mucho más que una simple reunión en torno a una mesa con buena comida es la catalogación como *Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad* que la UNESCO reconoce a diversas tradiciones gastronómicas. Entre ellas, la más representativa y cercana: la dieta mediterránea; reconocimiento éste que aúna

prácticas agrícolas, ganaderas y pesqueras, métodos de conservación, cocinado y consumo de alimentos (Fusté-Forné, 2016).

No obstante, más allá de representar un rasgo diferenciador de un territorio, una expresión cultural o acaso el arte más efímero que se conoce, la gastronomía supone, ante todo, una fuente de fruición tan amplia como diversa: capaz no sólo de dulcificar la rudimentaria e imperativa necesidad en que converge toda la fisiología de la deglución, sino también de conmover las más recónditas instancias del ánimo a través de una estimulación impredecible del paladar o, incluso, satisfacer complejas exigencias grupales inherentes a la morfología social del individuo.

Es conocida la sentencia popular que afirma: *En redor de una mesa bien provista se acercan aun los pareceres más opuestos*. Esta capacidad de acercamiento que presenta la gastronomía, este magnetismo, por así decirlo, constituye actualmente un importante factor comercial para sector turístico, tras constatarse en los últimos años un considerable crecimiento de la demanda de aquellos destinos que cuentan con una sugestiva oferta gastronómica (ya sea como un valor adicional o como principal reclamo). Es decir, existe una relación directa entre el atractivo y la competitividad de un destino turístico concreto y la excelencia de sus recursos gastronómicos (Reyes Uribe, Guerra Ávalos, & Quintero Villa, 2017). En las últimas décadas, distintos autores coinciden en este hecho: la gastronomía no sólo es uno de los principales motores de desarrollo turístico (Di Clemente, Hernández Mogollón, & López-Guzmán, 2014), no sólo representa un reclamo de primer orden, sino que condiciona hasta el modo en que el viajero percibe su propia experiencia vacacional (Kivela & Crotts, 2006). La alimentación como una forma de placer hace posible la conceptualización de la gastronomía como principio de segmentación del mercado turístico, ya que el visitante, mayoritariamente, se muestra interesado por la cultura local,

por la comida autóctona y demanda, en general, productos diferentes a los que consume de forma habitual (Nunes dos Santos, 2007). Se estima que la gastronomía es una de las principales motivaciones en la elección de destino para el 15% de los viajeros (Berbel-Pineda, Palacios-Florencio, Ramírez-Hurtado, & Santos-Roldán, 2019). Por otra parte, el turismo gastronómico o culinario se revela como un excelente instrumento de desarrollo regional sostenible; de especial importancia en áreas rurales que precisan una reestructuración económica ante la pérdida o menoscabo de sus fuentes de ingresos tradicionales, donde se dinamizan otros sectores productivos (manufactura, agricultura, ganadería, servicios, etc) en torno a este tipo de industria, preservándose simultáneamente sus identidades locales (Hall & Sharples, 2003).

Cada día es más aceptado, tanto por instituciones académicas como empresariales, la existencia de una profunda sinergia entre el turismo y la gastronomía; evidenciándose que la transformación de la industria turística se orienta decididamente hacia un mercado de emociones, en el cual la gastronomía desempeña un papel primordial (Ortega Rosell, Sánchez Martín, & Hernández Mogollón, 2012). Tendencia ésta a tener en consideración, esencialmente, por el volumen económico asociado a este sector: el turismo generó en España en 2018 una riqueza equivalente al 11,7% de su Producto Interior Bruto (Instituto Nacional de Estadística, 2019); estimándose que un turista promedio destina alrededor de una cuarta parte del coste de su viaje a alimentación y bebida.

Precisamente, a la par que el efecto incontenible de la globalización tiende a homogeneizar valores, gustos y costumbres en todo el planeta, como contrapartida, cada día en mayor medida, el viajero busca la peculiaridad, la diferencia, la rareza del endemismo. Fenómeno reparatorio que se traduce en un mayor acercamiento, en un interés creciente por el folclore del territorio que se visita, por su acervo tradicional, por

las distintas expresiones de su herencia popular (Mak, Lumbers, & Eves, 2012). En este sentido, pocos elementos patrimoniales consiguen identificar a una región tan rápida, profunda y genuinamente como lo hace su gastronomía.

Ante esta dinámica de la demanda, en un sector con tan importante volumen de negocio, consecuentemente, todos los agentes del espectro turístico (desde organismos públicos de fomento y promoción, hasta entidades empresariales de índole muy diversa: turoperadores, agrupaciones hoteleras, gremios de restauración...), tienden a adaptar sus estrategias de posicionamiento en el mercado de modo que se visibilicen y pongan en valor todos los recursos gastronómicos de la zona que se pretende promocionar; buscando, claro está, una significativa potenciación del atractivo del destino ofertado (Seyitoğlu & Ivanov, 2020).

Por otro lado, conviene resaltar que una característica constitutiva del hecho gastronómico es su carácter integrador, su capacidad para anexas, adecuar y asimilar todo elemento (ya sea materia prima, procedimiento o concepción) al que el transcurso del tiempo y las tendencias sociales llegan a conferir cierto grado de habitualidad. Basta una somera revisión diacrónica de la significación que han tenido los diversos elementos que la gastronomía fue incorporando a lo largo del tiempo, para reconocer la extraordinaria trascendencia del proceso de tecnificación y cimentación científica que experimenta actualmente la cocina profesional (cuyos efectos, debido a los nuevos mecanismos de información y comunicación, se difunden hasta ámbitos domésticos con una celeridad sin precedentes). Situación ésta que ha desencadenado la mayor revolución del concepto de la restauración que se ha conocido nunca.

El binomio ciencia-gastronomía se revela, sin duda alguna, como una unión netamente simbiótica: su base técnica ha dado lugar a destacadas corrientes culinarias,

desarrollándose sincrónicamente diversas subdisciplinas bromatológicas que han adquirido, a su vez, identidad propia. Una fusión muy afortunada, que no sólo está permitiendo una asombrosa innovación en texturas, sabores y presentación de las elaboraciones, sino también la popularización de procesos especializados. Combinación que, en general, está posibilitando una mejor comprensión de la fenomenología alimentaria y contribuyendo, en definitiva, a la erradicación de buena parte de la aleatoriedad que la cocina ha acumulado durante siglos de desarrollo puramente empírico (This, 2003).

A nivel profesional, la cocina clásica, hasta cierto punto hermética, neofóbica e incluso refractaria a tendencias innovadoras, basada en la repetición y la observancia de sus propios fundamentos, ha evolucionado hacia una estructura multidimensional (científico-técnica, económica, social, ética, estética...) que se expande hacia nuevos campos del conocimiento, hacia un espacio donde convergen procesos interdisciplinares y se generan e intercambian conocimientos técnicos de índole muy diversa (Martínez de Albéniz, 2018). Una profunda renovación que, no obstante, se produce sin ruptura con sus cimientos tradicionales. Los platos del repertorio clásico, de hecho, han sido objeto de un recurrente versionado, de reiteradas adaptaciones y modificaciones (con variantes en su texturizado, sus técnicas de cocción o presentación). De modo que el acervo culinario ha constituido un inmejorable repositorio de fórmulas, y esta serie de reinterpretaciones de los clásicos, tan sólo, un respetuoso tributo a la tradición. Pues, en definitiva, la actividad culinaria moderna, sin olvidar la cantidad de factores que en ella intervienen (y a riesgo de incurrir en reduccionismo), podría decirse, implica un elaborado equilibrio entre la herencia de los fogones y las recientes versatilidades tecnológicas (Garcés-Rimón, Sandoval, Molina, López-Fandiño, & Miguel, 2016).



La gastronomía de vanguardia, ciertamente, ha evolucionado de una cocina basada en productos hacia una cocina basada en procesos; esto es, donde el *proceso* (cómo se cocina o cómo se va a degustar) cobra mayor relevancia que el propio *producto* (qué se elabora o qué se come). La cocina actual se orienta, claramente, hacia una formulación de complejidad progresiva donde la creatividad se convierte en un desempeño primordial, en el principal valor diferenciador frente a una reñida competencia y, al mismo tiempo, en un factor de lujo, en una medida de la calidad del resultado que se lanza al mercado (Otero, 2017). Otros autores destacan, asimismo, la importancia que ha cobrado el elemento creativo en la fenomenología culinaria de los establecimientos de alta gama. Ya que la revalorización del *proceso* frente al *producto* exige una constante revisión del modo en que se implementan y combinan los recursos disponibles. Requiere, si se desea mantener un óptimo nivel competitivo, una incesante capacidad de transformación y mejora, una innovación continua. Y el substrato esencial que permite el desarrollo de cualquier género de innovación es, precisamente, la creatividad (Vargas-Sánchez & López-Guzmán, 2018).

Como se reseñó anteriormente, la proyección de la moderna gastronomía abarca un gran número de ámbitos. Acaso, determinados aspectos, como son sus vertientes técnica, comercial o estética, puedan contribuir de manera preponderante a perfilar una definición social de cuanto representa el fenómeno culinario actualmente. Sin embargo, la alta cocina se acrecienta a través de otras dimensiones que, si bien poseen menor visibilidad mediática, no por ello resultan carentes de una gran significación. Prueba de ello podrían ser, más allá de la búsqueda de sabores, diseños o texturas fascinantes, la preocupación por el impacto nutricional que supone el empleo de nuevos procedimientos e ingredientes, de nuevas técnicas y combinaciones; es decir, un concepto de gastronomía que no sólo se centra en sensaciones, sino que pretende que éstas resulten compatibles con equilibrio

nutricional y salud (Navarro, Serrano, Lasa, Aduriz, & Ayo, 2012). O la sensibilización sobre la necesidad de fomentar una economía sostenible, de promover el consumo de materias primas y productos de cercanía que redunden en el desarrollo local, como un pequeño compromiso sumativo capaz de prevenir grandes desequilibrios futuros (Ascorbe Landa, 2018).

Sin embargo, la componente científico-técnica adquirida en las últimas décadas por las expresiones más sofisticadas de la cocina (etiquétense éstas a voluntad: *vanguardista, creativa, tecnoemocional, molecular, modernista, de fusión...*), en ningún caso las equipara o asemeja a las disciplinas científicas de carácter propiamente alimentario (Bromatología, Ingeniería Alimentaria o Ciencia y Tecnología de los Alimentos). Especialidades éstas que emplean las ciencias biológicas y fisicoquímicas y la ingeniería para estudiar la naturaleza de los alimentos, las causas de su deterioro, así como los principios subyacentes en el procesamiento y mejora de los alimentos para el consumo público (Spence & Youssef, 2018). Las ciencias alimentarias se ocupan, principalmente, de la producción de alimentos a escala industrial, de preservar sus propiedades nutricionales y garantizar su inocuidad (Barham, y otros, 2010). Por el contrario, por avanzado que haya sido el grado tecnificación de una cocina, su actividad productiva no se puede reducir a un procedimiento puramente científico; la cocina siempre contendrá cierta dosis esencial de intuición e imprevisibilidad, un germen de apasionamiento propio de las artes y de disciplinas que en alguna medida participan de ellas.

1.1. TECNOLOGÍA DE BARRERAS O DE MÉTODOS COMBINADOS

Los modelos operativos de la industria alimentaria siempre han representado un claro referente para la restauración colectiva. Ésta, en alguna medida, siempre ha tendido a la incorporación de metodologías, utensilios e ingredientes industriales a su sistema productivo. Transferencia que, en ciertos casos, tras una adecuada adaptación, se ha hecho extensiva a la restauración comercial; llegando, en ocasiones, incluso a popularizarse a través de versiones y formatos domésticos. Influencia ésta que, en rigor, resulta un flujo bidireccional, un intercambio efectivo; puesto que cualquier actividad productiva, al cabo, se halla esencialmente condicionada por las preferencias de la demanda social. Interacción a la que ya se aludiera en el inicio de esta introducción.

En las últimas décadas, indudablemente, esta transferencia se ha intensificado de manera muy considerable (en volumen y velocidad): pruebas de ello son el sensacional proceso de tecnificación que experimenta la moderna restauración o la extraordinaria adaptación del sector alimentario a las nuevas necesidades doméstico-familiares. La propia técnica que vertebra este estudio (la cocción *sous vide*) representa otro claro ejemplo: su práctica se ha hecho accesible a cualquier hogar (la maquinaria que requiere, desde hace algunos años, se comercializa en versiones *amateur* y semiprofesionales, a unos precios bastante asequibles).

Pese a su heterogeneidad, existe una evidente interdependencia entre los distintos ámbitos de producción culinaria. Acaso, el objeto mismo de esta investigación, en ciertos aspectos, pueda deslocalizarse entre la restauración comercial y la industria alimentaria. Esta interrelación de sectores, con su diversidad de concepciones y planteamientos, debe

suponer, precisamente, un enriquecimiento de las conclusiones de este trabajo, nunca un problema añadido. No obstante, cada ámbito posee sus propias especificidades, y sería conveniente resaltar que únicamente en la industria alimentaria se aplican procesos de alta estandarización y métodos netamente científicos; que en su seno surgen y se desarrollan la mayor parte de los proyectos de innovación técnico-gastronómica...; que representa, en definitiva, un entorno óptimo para iniciar cualquier trabajo de investigación alimentaria.

Un objetivo continuo de la industria alimentaria es la implementación de mejoras en el procesamiento productivo que preserven y realcen las cualidades organolépticas de los alimentos, garantizando al mismo tiempo la seguridad de su consumo (Domínguez-Hernández, Salaseviciene, & Ertbjerg, 2018). Objetivo éste que ha de asociarse, entre otros aspectos, a una incuestionable evolución en los hábitos alimentarios durante las últimas décadas y, en concreto, a la creciente demanda de los denominados alimentos *ready to eat* (productos de V gama); entre los cuales convendría destacar aquellos que hacen de su calidad gastronómica un elemento diferenciador frente a otros artículos de su clase existentes en el mercado.

Tales mejoras en la metodología productiva no sólo repercuten substantivamente sobre la calidad y la seguridad de los alimentos, sino que asimismo afectan de forma significativa a su durabilidad. Un incremento en la vida útil del producto que supone, a su vez, mayor tiempo de disponibilidad de consumo y posibilidad de acceso a mercados más distantes. Lo cual, en el ámbito económico, se traduce en una reducción de los costes por deterioro de producto, así como en un crecimiento de la facturación por expansión de mercado.

En este sentido, una de las mejores alternativas que puede adoptar la industria alimentaria (sin duda la más simple), capaz de satisfacer la demanda generada por los

consumidores de este tipo de alimentos, probablemente sea la técnica *sous vide* (Kato, y otros, 2016). Técnica que tan sólo con una moderada pasteurización busca un adecuado equilibrio entre la preservación de la calidad nutricional y organoléptica del producto y la eficiencia de la higienización derivada del tratamiento térmico.

Sin embargo, el uso exclusivo de dicha técnica como método de conservación plantea considerables limitaciones: por cuanto la preservación de la calidad gastronómica se obtiene fundamentalmente a expensas de una atenuación en la intensidad del tratamiento térmico; atenuación que lleva asociada un decremento de la calidad microbiológica del producto y, por tanto, de su seguridad alimentaria y de su longevidad comercial. Razón ésta que obliga a los sectores productivos de alimentos de V gama al desarrollo de metodologías que integran distintas técnicas de conservación. Especialmente, cuando se opta por minimizar el tratamiento térmico en favor de la palatabilidad y otros atributos sensoriales del producto final; debiendo, en consecuencia, incrementar su vida útil mediante otras vías.

En definitiva, la seguridad microbiológica y la estabilidad de la mayoría de los alimentos están basadas en la aplicación de una serie de factores de conservación denominados *obstáculos* o *barreras*; la técnica de aplicación secuenciada de los diferentes obstáculos recibe el nombre de *tecnología de barreras* (Pundir & Murtaza, 2015). Esta hibridación de procesos también es conocida como *tecnología de métodos combinados* (Leistner, 1994).

La tecnología de barreras supone una combinación inteligente de obstáculos que garantiza la seguridad y la estabilidad microbiológica de los productos alimentarios, prolongando su calidad organoléptica y nutricional, así como la viabilidad económica de éstos (Leistner, 2000). Es decir, la aplicación de esta tecnología exige el ajuste de dos o más parámetros de conservación a un nivel óptimo, de modo que se alcance una máxima

letalidad microbiológica, viéndose afectadas mínimamente las cualidades organolépticas del alimento. Entraña, en última instancia, una aplicación dosificada de tecnologías bien conocidas que interactúan sinérgicamente para controlar la seguridad y la calidad organoléptica y nutricional del producto resultante (Singh & Shalini, 2014).

Estos obstáculos pueden ser de muy diversa naturaleza; desde técnicas empleadas de forma tradicional, como tratamientos térmicos, reducción de la actividad de agua (a_w), descenso de pH, adición de sustancias conservantes o inoculación de microorganismos competitivos, hasta sofisticadas aplicaciones de innovación tecnológica: inactivación fotodinámica, altas presiones hidrostáticas, aplicación de ultrasonidos, envasado en atmósferas modificadas o recubrimientos comestibles, entre otros (Gayán, Torres, & Paredes-Sabya, 2012). Si bien la secuenciación de tales tratamientos pretende controlar cualquier forma de deterioro en la calidad de los alimentos, su prioridad fundamental siempre será minimizar el potencial de aparición y crecimiento de microorganismos tanto patógenos como alterantes (Pundir & Murtaza, 2015).

Los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos compensatorios que contrarrestan los efectos adversos producidos por las perturbaciones de su entorno, de modo que los parámetros esenciales de su fisiología celular puedan mantenerse dentro de un rango de relativa estabilidad. La autorregulación que ejercen tales mecanismos se denomina *homeostasis*. Por su parte, la secuencia de procesos que emplea la tecnología de barreras no supone sino una sucesión de tensiones de moderada intensidad, e índole diversa, que persiguen un menoscabo sumativo de la integridad celular de los microorganismos. Constatándose que la alteración de las condiciones del entorno celular mediante la aplicación de distintos factores de conservación requiere un considerable esfuerzo de reparación homeostática; exigencia ésta con un importante coste energético,

que conduce fatalmente al *agotamiento metabólico* de la célula vegetativa. Asimismo, se ha podido constatar que la eficiencia de los procedimientos de conservación decrece cuando se aumenta demasiado la intensidad de éstos, ya que un estrés excesivo induce una síntesis de proteínas de choque como respuesta de supervivencia; lo que se traduce, cuando los daños resultan subletales, en microorganismos más resistentes y virulentos. Se comprueba, en definitiva, que la mayor eficacia en la conservación de alimentos se consigue al aplicar diversos tratamientos de una intensidad moderada, que inciden sinérgicamente sobre varias dianas fisiológicas, perturbando (de forma simultánea o secuencial) diferentes sistemas que resultan esenciales para la viabilidad celular. Estrategia ésta denominada *multitarget preservation* (Gómez, Welte-Chanes, & Alzamora, 2011).

Como se ha indicado, actualmente, la industria alimentaria emplea un amplio espectro de técnicas de barrera (más de un centenar); por tanto, la combinatoria posible en el diseño de metodologías de conservación permite un enorme número de variantes (Singh & Shalini, 2014). En este estudio experimental se combinarán únicamente dos tipos de barreras: térmicas e hiperbáricas. Cuyos fundamentos y características se expondrán en epígrafes subsiguientes.

No obstante, antes se describirán someramente, a modo de compilación preambular, algunas de las técnicas de barrera que hoy día aplica la industria alimentaria.

1.1.1. RADIACIÓN IONIZANTE

Según el Codex Alimentarius, únicamente está permitida la irradiación comercial de alimentos con tres tipos de partículas: rayos gamma de alta energía, rayos X y electrones acelerados. Estos tipos de radiación corresponden a la zona más energética del espectro electromagnético. Su aplicación produce daños severos en el ADN de los microorganismos,

causando su disfunción celular. Producen, por tanto, un considerable efecto higienizante sobre los alimentos irradiados. Destacable, asimismo, resulta su capacidad de penetración: tanto los rayos X como los rayos Γ extienden su acción hasta varios de centímetros bajo la superficie del alimento (Muredzi, 2014).

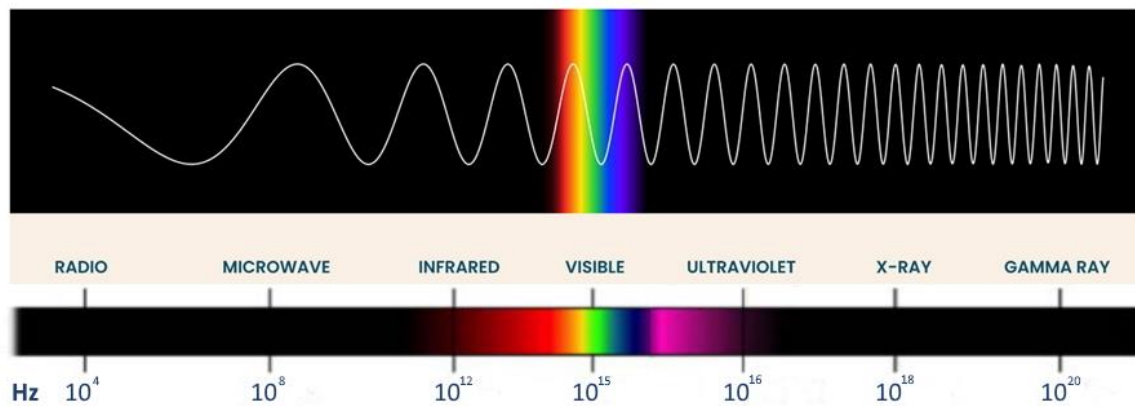


ILUSTRACIÓN 1. Tipos de radiación del espectro electromagnético

Adaptado de: (<https://hubblesite.org>)

Esta técnica no sólo mejora notablemente la calidad microbiológica del alimento, prolongando así su vida útil, sino que también conoce otras aplicaciones según el tipo de alimento de se trate; como son: desinsectar (legumbres o cereales), retrasar la maduración (frutas y hortalizas), o inhibir la germinación (tubérculos y bulbos). Todo ello sin que se vean afectados de manera significativa los atributos sensoriales de los alimentos. Otra de sus ventajas reside en la irradiación de alimentos envasados (envase estanco); con lo que se obtiene una conservación duradera tras el tratamiento. Una tecnología ésta que, según la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la FAO (Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), resulta segura para el procesamiento de productos alimentarios siempre que se apliquen las dosis de radiación adecuadas; siendo la radiación máxima permitida de 10 kilograys (Maherani, y otros, 2016).

Durante largo tiempo, esta tecnología se ha aplicado a especias, condimentos y otros productos deshidratados que precisaban una higienización en seco y libre de residuos;

obteniendo una satisfactoria eliminación de formas vegetativas bacterianas, esporas, levaduras y mohos, sin un impacto negativo sobre las propiedades organolépticas del producto. No obstante, la irradiación de productos perecederos como carne, pescados o mariscos, está encontrando ciertas dificultades para convertirse en una realidad comercial significativa, ya que la percepción general del consumidor asocia este tipo de radiaciones con algún peligro para su salud (Muredzi, 2014).

Si un determinado producto alimentario ha sido irradiado o, en alguna proporción contiene ingredientes irradiados, deberá figurar en su etiquetado alguna de las siguientes inscripciones: irradiado o tratado con radiación ionizante (Dielh, 2002).

1.1.2. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA DE ONDA CORTA

La técnica de fotoinactivación ultravioleta (UV) es un método físico en el cual el agente germicida es la energía de radiación. Resulta altamente eficaz en la inactivación de una gran variedad de microorganismos (bacterias, virus, protozoos, mohos y levaduras). Su energía, esencialmente, provoca daños irreparables sobre los ácidos nucleicos (ADN/ARN), las membranas y la actividad enzimática de las células. El nivel de máxima absorbancia del ADN (es decir, el mayor índice de letalidad) se produce con radiaciones de longitud de onda de unos 260 nm; considerándose un rango óptimo entre 250 y 270 nanómetros (Hijnen, Beerendonk, & Medema, 2006).

Se trata de un tratamiento seco y frío, que no genera ningún residuo químico ni subproducto indeseable que pueda alterar las características organolépticas del alimento. Tampoco produce radiactividad residual (como es el caso de la radiación ionizante). Posee un alto poder de penetración, y su coste resulta relativamente bajo (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004).

Sin embargo, una de las principales limitaciones de esta técnica es su aplicabilidad: únicamente es efectiva en las superficies de los alimentos o en líquidos transparentes. Asimismo, el alimento a tratar debe ubicarse lo más cerca posible de la fuente de radiación. Por otra parte, conviene ajustar tiempos e intensidades de radiación en función del tipo de alimento a tratar, ya que dosis de radiación UV excesivamente altas podrían acarrear cierto menoscabo de las propiedades nutritivas del alimento, así como algún deterioro de su aspecto. Los alimentos tratados con esta técnica deben mantenerse refrigerados y en envases opacos, con el fin de prevenir la reactivación con luz visible (azul-violeta: 330-480 nm) de aquellos microorganismos que permanecen en un estado subletal tras la radiación UV (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004).

1.1.3. BACTERIOCINAS Y BACTERIÓFAGOS

Las bacteriocinas son sustancias de naturaleza proteica (concretamente, péptidos de síntesis ribosómica) que poseen una localizada acción bactericida. Buen número de las bacterias grampositivas tienen la capacidad de generar esta clase de compuestos; lo cual les confiere una ventaja selectiva frente a sus competidores. Las bacteriocinas mejor conocidas son las producidas por bacterias acidolácticas (BAL), debido a su uso potencial en la industria alimentaria como bioconservantes. De hecho, actualmente, el único agente antimicrobiano natural autorizado como bioconservante para uso alimentario (E234) es la nisina (generada por *Lactococcus lactis*); cuya actividad se restringe considerablemente al aplicarse fuera de entornos ácidos. Por tanto, supondría un avance notable para la investigación alimentaria el hallazgo (y su validación legislativa) de otras bacteriocinas que se muestren estables en un extenso rango de temperaturas y pH, presentando a la par un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Abriouel, Franz, Ben Omar, & Gálvez del

Postigo Ruiz, 2011). Existen muchas bacterias candidatas (BAL) que generan péptidos con interesantes espectros de inhibición (pediocina PA-1/AcH, lacticina 3147, entre otras) (Grande Burgos, Cobo Molinos, Gálvez del Postigo Ruiz, & Pérez Pulido, 2015).

Las bacteriocinas se pueden incorporar al alimento como un concentrado o sustancia que se aísla previamente de su cepa productora (preparación *ex situ*), es decir, como un aditivo o ingrediente con propiedades conservantes; o bien, pueden generarse en el propio alimento mediante la inoculación del microorganismo que produce la bacteriocina en condiciones que favorezca su síntesis (producción *in situ*). Por otra parte, las bacteriocinas de más amplio espectro se emplearían como un conservante de efecto genérico, mientras que aquellas bacteriocinas con espectro reducido se destinarían a la inhibición selectiva de determinados patógenos alimentarios, sin actuar sobre la microbiota beneficiosa o banal que pueda contener el alimento (Gálvez del Postigo Ruiz, Abriouel, Lucas López, & Ben Omar, 2007).

Otra alternativa en cuanto a bioconservación alimentaria son los bacteriófagos. Se trata de virus que, como indica su propia denominación, atacan a determinadas bacterias provocando su lisis celular. Esta inactivación bacteriana resulta muy específica (a nivel cepa y especie), por lo que su actividad no produce un impacto de consideración sobre el resto de la población microbiana presente en el alimento. Su acción invasiva en ningún caso se extiende a células eucariotas; por lo que se consideran seguros. Así lo dictamina la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que avala la inocuidad para el ser humano de alimentos tratados con bacteriófagos específicos para determinados patógenos alimentarios (Grande Burgos, Cobo Molinos, Gálvez del Postigo Ruiz, & Pérez Pulido, 2015).

1.1.4. CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS

El procesamiento de alimentos mediante campos eléctricos pulsados (PEF) es una tecnología de inactivación microbiana de carácter no térmico que, con una adecuada relación intensidad de campo eléctrico y tiempo de aplicación, consigue una importante reducción de la población de bacterias en forma vegetativa, sin un apreciable deterioro de la calidad del producto tratado (Altuntas, Evrendilek, Sangun, & Zhang, 2010).

En dicha técnica, esencialmente, el alimento se hace pasar a través de una cámara de tratamiento, entre dos electrodos, a los que se aplica una diferencia de potencial de forma intermitente, produciéndose un campo eléctrico de alta intensidad (puede variar entre los 10 y 50 kV.cm⁻¹) y muy corta duración (del orden del microsegundo). Para maximizar la eficiencia higienizante del procedimiento, y mantener la calidad del producto, es necesario adecuar la intensidad y duración del campo, así como el número de pulsos que se aplican, a las propiedades de la matriz alimentaria y las características de su microbiota (Gerlach, y otros, 2008). Asimismo, el diseño de la cámara ha de garantizar la distribución homogénea del campo eléctrico, de modo que el tratamiento resulte altamente uniforme en todo su volumen; de lo contrario, podrían llegar a producirse incrementos térmicos localizados de naturaleza óhmica, que desvirtuarían la calidad organoléptica del producto (Toepfl, Heinz, & Knorr, 2007).

Se ha constatado que por encima de una determinada intensidad de campo eléctrico (umbral crítico: en torno a 15 kV.cm⁻¹), se producen importantes alteraciones estructurales en la membrana celular de las bacterias. Fenómeno éste, denominado *electroporación*, que supone un drástico aumento de la permeabilidad de la membrana. Una porosidad con un diámetro y una densidad de distribución proporcionales a la intensidad y la duración del campo aplicado. Dicha permeabilización obedece a una acumulación de carga libre (en

presencia de campo) en las superficies interna y externa de la pared celular (cargas de signo opuesto) (Siemer, Aganovic, Toepfl, & Heinz, 2014); las cuales, por atracción electrostática, ejercen una presión que llega a perforar la membrana, provocando la muerte celular (Mañas & Pagán, 2005).

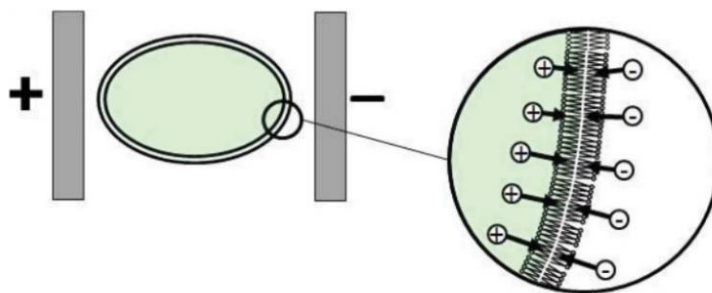


ILUSTRACIÓN 2. *Mecanismo de electroporación*

Obtenido de: (Siemer, Aganovic, Toepfl, & Heinz, 2014)

1.1.5. OZONIZACIÓN

El ozono es una molécula triatómica (O_3), modificación alotrópica del oxígeno. A temperatura ambiente, permanece en estado gaseoso y es parcialmente soluble en agua. Resulta altamente reactivo: se trata del oxidante más energético empleado en aplicaciones alimentarias. Tanto en estado gaseoso como en disolución acuosa, muestra un gran poder desinfectante: capaz de inhibir bacterias (ciertas esporas inclusive), levaduras, mohos, virus y protozoos (en suspensiones celulares, incluso a muy bajas concentraciones y en reducido tiempo de exposición). También se muestra eficaz en la eliminación de micotoxinas y residuos de plaguicidas. Habiéndose constatado que su acción germicida no sólo resulta proporcional a la concentración de gas y al tiempo de exposición, sino que también se incrementa con el aumento de la temperatura y de la humedad relativa (Kim, Yousef, & Dave, 1999).

El mecanismo de inactivación microbiana del ozono guarda relación con su reactividad, produciendo la oxidación de determinadas moléculas, esenciales para la viabilidad celular; a saber: lípidos insaturados de la membrana (o lipopolisacáridos, en el caso de bacterias gramnegativas), enzimas intracelulares (deshidrogenasa, en particular) o material genético (ADN y ARN). Oxidación que, en síntesis, provoca daños en la membrana, fuga de contenido intracelular y la muerte del microorganismo. Sin embargo, la sensibilidad al ozono varía según el tipo de célula: en general, las esporas presentan mayor resistencia que las formas vegetativas; así como las bacterias gramnegativas son inactivadas con más facilidad que las grampositivas (Jegadeeshwar, Vijay Shankar, Premkumar, & Ranganathan, 2017). Asimismo, las levaduras se muestran más sensibles a la ozonización que los mohos; mientras que la inactivación de virus exige tratamientos aún más intensos o prolongados que los anteriores.

La concentración de ozono (gaseoso o en dilución acuosa) necesaria para alcanzar un determinado grado de higienización de un alimento variará considerablemente en función de sus propiedades; influirán factores como su composición o la textura y uniformidad de su superficie: de tal modo que, una matriz rica en grasa requerirá mayor concentración de ozono que una matriz glucídica, o un alimento rugoso, perforado o irregular, reducirá su carga microbiana en menor medida que otro con superficie lisa. Esta variabilidad del efecto que tiene la ozonización sobre el alimento, no sólo es de orden microbiológico, también se extiende a la calidad sensorial del producto procesado. Así, un tratamiento inadecuado (concentración de ozono o tiempo de aplicación excesivos) puede acarrear el deterioro oxidativo de la superficie del alimento, su decoloración y la aparición de sabores y olores indeseables (Kim, Yousef, & Dave, 1999). Asimismo, unos parámetros de ozonización poco

ajustados podrían alterar otras características del alimento, como su contenido fenólico, o incluso sus propiedades reológicas (Torres, y otros, 2011).

1.1.6. ENVASADO EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Fundamentalmente, el objetivo del MAP (acrónimo del inglés *Modified Atmosphere Packaging*) es prolongar la vida útil del alimento envasado, evitando o retardando posibles decrementos de su calidad nutricional y organoléptica. Para conseguir tal propósito, esta técnica de envasado intenta minimizar las alteraciones indeseables de órdenes fisiológico y fisicoquímico que pueda sufrir el alimento, controlando el crecimiento bacteriano interno e impidiendo cualquier contaminación exterior. Para ello reemplaza el aire atmosférico por una combinación específica de gases estériles que se adecúa a las características propias de cada tipo de alimento. Principalmente, estos gases son nitrógeno y oxígeno moleculares (N_2 y O_2) y dióxido de carbono (CO_2); cada uno con unas propiedades que determinan su función y presencia en las distintas mezclas de gases MAP (Flodgaard, y otros, 2005):

- El nitrógeno molecular (N_2) es un gas inerte e insípido, de baja solubilidad; previene la oxidación del producto por desplazamiento del oxígeno y mantiene la presión interna del envase, evitando que colapse. Inhibe el crecimiento de microorganismos aerobios.
- El oxígeno molecular (O_2) es ligeramente soluble en agua y posee un gran poder oxidante. Puede, en consecuencia, causar distintas reacciones indeseables en el alimento envasado: pérdida de su coloración natural, enranciamiento de lípidos, una maduración acelerada y, naturalmente, el incremento de microorganismos aerobios. El oxígeno acarrea tantos inconvenientes que únicamente se incorpora a la mezcla MAP en aquellos casos en que su presencia resulta imprescindible. El más relevante lo representan las carnes rojas (IV gama); producto éste que, generalmente, se envasa con una mezcla rica en oxígeno

(80% O₂ + 20% CO₂), con el propósito de mantener el color rojo brillante de la oximioglobina de la carne: factor que el consumidor relaciona con la idea de carne fresca de buena calidad (Lagerstedt, Lundström, & Lindahl, 2011). Asimismo, las frutas y hortalizas crudas, cuyo metabolismo oxidativo precisa un aporte de oxígeno, son otro caso en que la atmósfera de envasado debe contener O₂; ésta vez, en proporción mucho más reducida (entre 1-10 %).

- El dióxido de carbono (CO₂) es moderadamente lipo e hidrosoluble, resultando su solubilidad inversamente proporcional a la temperatura. Propende, por tanto, al colapso del envase. Ejerce un considerable efecto bacteriostático por disminución de pH del medio.

Aunque en ocasiones también podrían incorporarse gases adicionales, con efecto específico y en porcentaje reducido; como pueden ser:

- El monóxido de carbono (CO), como el precedente, un gas con capacidad germicida. Resulta tóxico para el ser humano; por lo que su empleo debe restringirse a un contenido porcentual inferior al 1 % de la atmósfera. Sin embargo, pese a su peligrosidad, presenta interesantes aplicaciones como sustituto del oxígeno en envasado de carnes rojas: en condiciones anaerobias (mezcla MAP: 0,4 % CO + 30% CO₂ + resto N₂) se constata que pequeñas concentraciones (entre 0,3 % y 0,5 %) de monóxido de carbono son suficientes para mantener un intenso color rojo en la carne envasada y conservada a temperatura de refrigeración (Restrepo Flórez & Patiño Gómez, 2008), (McMillin, 2008). Sin embargo, la legislación vigente (Reglamento UE 1130/2011, de 11 de noviembre) no autoriza el uso alimentario de este gas en la Unión Europea.

- El dióxido de azufre (SO₂) es un gas irritante, de cierta toxicidad, lo que obliga a reducir su empleo a pequeñas concentraciones. Ejerce una apreciable acción antioxidante, que lo convierte en un eficaz inhibidor de las reacciones de pardeamiento enzimático de frutas o de la melanosis en crustáceos. Muestra, asimismo, buena actividad antifúngica.

▪ El argón atómico (Ar) es el más abundante de los gases nobles; y, como todos ellos, no es reactivo. Resulta, por tanto, un buen sustituto del nitrógeno; aunque de mayor coste. Es dos más soluble en agua que el nitrógeno, y de mayor densidad que éste.

En general, la prolongación efectiva de vida útil debido al envasado MAP dependerá, entre otros factores, de la idoneidad de la mezcla de gases empleada. Dado que gran parte del deterioro alimentario es producido por bacterias aerobias, una concentración óptima de CO₂ en la mezcla MAP garantizará, por sí misma, una mejora en la durabilidad del producto. En esencia, la actividad antibacteriana de este gas radica en su solubilidad doble (lipo/hidro), que le permite penetrar la membrana celular, diluirse en el citoplasma y bajar su pH (formando ácido carbónico), imposibilitando distintos procesos del metabolismo microbiano. No obstante, ni esta técnica puede prescindir del oxígeno en todas sus mezclas (insustituible en determinados productos, como se ha indicado), ni el dióxido de carbono está libre de inconvenientes (colapso del envase, acidificación del alimento o proliferación de anaerobios). Por tanto, la eficacia de este tipo de envasado no sólo dependerá de una apropiada combinación de gases, también requerirá una correcta manipulación del género (que minimice su carga microbiana inicial), así como un riguroso mantenimiento de cadena de frío (Flodgaard, y otros, 2005).

Sin embargo, el envase es el elemento, de cuantos se ensamblan en esta técnica, que posee una expectativa de mejora más amplia. Se emplean envases de polímeros con efecto *alta barrera* (que minimiza la difusión de gases envase-entorno) para aquellos productos que sólo presentan una reducida actividad enzimática, donde la composición inicial de la atmósfera MAP no sufre cambios significativos. Mientras que en el caso de alimentos con una actividad metabólica de consideración (vegetales frescos o, en menor medida, carnes y pescados crudos) la atmósfera inicial pronto se ve alterada como consecuencia de dicho

metabolismo (caso de los vegetales: absorción O_2 y emisión $CO_2 + H_2O_{vapor}$); lo que requiere un laminado polimérico de permeabilidad selectiva (que permita la entrada de las especies absorbidas y la salida de las emitidas), para evitar la asfixia y prematura senescencia del producto (García Iglesias, Gago Cabezas, & Fernández Nuevo, 2006).

Si bien la permeabilidad selectiva del envase permite mantener concentraciones de gases parecidas a las de partida durante el estocaje, más sofisticadas resultan las soluciones que ofrece el denominado *envasado activo*. En síntesis, esta evolución del envase incorpora distintas sustancias que se activan por reacción con subproductos generados por el propio alimento, con el fin de equilibrar la atmósfera del envase. La función de estas sustancias puede ser muy variable: absorber o generar O_2 o CO_2 , absorber C_2H_4 (etileno), o regular el grado de humedad, entre otras (Zhou, Xu, & Liu, 2010); (Rostami, y otros, 2016). Mayor tecnificación aún presenta el *envasado inteligente*, capaz de monitorear distintas variables del proceso de conservación del alimento y ofrecer ciertas informaciones: proliferación bacteriana, presencia de gases indeseables, rango térmico o rotura de la cadena de frío (García Iglesias, Gago Cabezas, & Fernández Nuevo, 2006).

1.1.7. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Mediante esta técnica el producto queda envuelto en una película biopolimérica que mejora su apariencia, preserva su integridad e incrementa tanto su resistencia mecánica como su seguridad microbiológica, prolongando su vida útil (Murmu & Mishra, 2017). Tales recubrimientos son biodegradables y aptos para uso alimentario. Aunque sus formulaciones pueden ser muy variables en función del alimento al que se apliquen, suponen una matriz macromolecular multicomponente de gran poder cohesivo. Emplean, generalmente, una base de proteínas, lípidos o polisacáridos que se combinan con una



serie de sustancias de acción específica (agentes antioxidantes, tensoactivos, emulsionantes, antimicrobianos o plastificantes, entre otros) (Escobar Hernández, Márquez Cardozo, Restrepo Flores, Cano Salazar, & Patiño Gómez, 2014). Se aplican a una gran variedad de alimentos: vegetales frescos, pescados y mariscos, carnes, frutos secos, panadería y repostería o productos lácteos.

Las películas elaboradas a partir de proteínas animales y vegetales (colágeno, caseína, gelatina, gluten, proteína de soja, albumina de huevo...) presentan gran permeabilidad al vapor de agua, tanto por la naturaleza hidrófila de proteína como por la incorporación de agentes que confieran flexibilidad a la envoltura (como glicerol o sorbitol). En general, poseen buenas propiedades de barrera frente al oxígeno. Sin embargo, su aplicación en carnes y pescados crudos puede originar alguna interacción con las enzimas proteolíticas de éstos (Gennadios, Hanna, & Kurth, 1997). Las envolturas lipídicas se elaboran a base de ceras, aceites vegetales, sebos y mantecas, a los que se incorporan celulosas modificadas con el fin de fortalecer su estructura; ofrecen una baja permeabilidad al vapor de agua, lo que minimiza pérdidas de peso por deshidratación. En cuanto a las películas de polisacáridos, principalmente, éstas se obtienen de estructuras glucídicas como pectinas, carragenanos, celulosas, quitosano o derivados del almidón; resultan muy apropiadas para alimentos con actividad metabólica (como vegetales frescos), puesto que permiten la difusión de gases; al igual que las proteicas, resultan permeables al vapor de agua. Incorporan, asimismo, agentes que refuerzan su resistencia mecánica, y sustancias diversas que pueden variar desde antimicrobianos o antioxidantes hasta saborizantes (García Iglesias, Gago Cabezas, & Fernández Nuevo, 2006).

La aplicación de estas envolturas puede efectuarse mediante distintos métodos. La elección se realiza en función de las propiedades de la película que se emplea y de la

morfología del alimento a recubrir. La inmersión es el método de mayor simplicidad y de menor coste, que proporciona además una buena cobertura de superficies irregulares; sin embargo, presenta inconvenientes como la dilución progresiva de la solución de remojo, o la aparición gradual de partículas residuales y microorganismos en dicha solución durante el proceso. El baño o glaseado es un método que se emplea con envolturas de viscosidad apropiada y productos de base estable. Otro método muy extendido es la pulverización, que permite una gran uniformidad de la película, así como el control de su espesor, sin riesgo de contaminación cruzada. Método éste que ha evolucionado hacia la denominada *pulverización electrostática*, de mayor eficiencia: esencialmente, se trata de aplicar una carga negativa a las microgotas (que provoca mayor atomización) y cargar positivamente el alimento, consiguiéndose una acentuación del efecto envolvente (Zhong, Cavender, & Zhao, 2014).

1.1.8. CAMPOS MAGNÉTICOS OSCILANTES

La tecnología de campos magnéticos oscilantes (OMF, como acrónimo anglosajón de *Oscillating Magnetic Fields*) supone una potencial alternativa a los métodos térmicos para la inactivación microbiana y la desnaturalización de enzimas en alimentos, tanto frescos como cocinados (Khouryieh, 2021). Sin embargo, la determinación de los distintos factores que intervienen en esta inhibición y la medida en que cada uno lo hace, aún no han sido suficientemente estudiadas.

Esencialmente, esta técnica somete al alimento a un campo magnético variable (de una frecuencia entre 50 y 500 hercios), aplicado mediante secuencias pulsadas (de 1 a 100 pulsos) de una corta duración (entre 25 y 100 milisegundos), y en un considerable rango de intensidades (de 5 a 50 teslas) (Fernández-Molina, Barbosa-Cánovas, & Swanson, 2001). Se

pueden obtener campos de hasta 3 T de intensidad con una bobina de cobre y un núcleo de hierro (electroimán resistivo); para intensidades de hasta 20 T, en cambio, se emplean bobinas superconductoras (filamentos de niobio-titanio o niobio-estaño en una matriz de cobre), que tienen un consumo energético mucho menor y un tamaño más reducido, si bien, deben refrigerarse en baños de nitrógeno o helio líquidos; para campos aún más intensos, decaen las propiedades superconductoras de estos solenoides, siendo necesaria la combinación de ambos tipos de bobinas y su refrigeración por agua (Grigemo-Miguel, Soliva-Fortuny, Barbosa-Cánovas, & Martín-Belloso, 2011).

Las células están constituidas por un gran número de sustancias (soluciones iónicas, ácidos nucleicos, macromoléculas proteicas, fosfoglicéridos, agua...) que se muestran, en mayor o menor grado, susceptibles a los campos magnéticos; la reiterada reorientación de estos componentes magnetoactivos podría ocasionar tensiones anisótropas capaces de romper enlaces de ADN, cambiar la deriva iónica a través de la membrana citoplasmática, dañar proteínas esenciales para la supervivencia celular, o provocar otros perjuicios críticos (Farkas, 2007).

La aplicación del campo magnético sobre el alimento no produce un incremento significativo de la temperatura de éste; como tampoco implica un deterioro apreciable en su calidad nutricional (Lipiec, Janas, Barabasz, Pysz, & Pisulewski, 2005). Alcanzándose unas tasas de inactivación microbiana de cierta consideración sin menoscabo de las propiedades sensoriales del producto (Sari, Bambang, & Sumarlan, 2012).

Sin embargo, se constata que el alcance de los efectos germicidas de esta tecnología varía significativamente dependiendo de las condiciones específicas en que se aplique. Factores como la intensidad del campo magnético, el número de pulsos, su frecuencia y duración, las características del producto (grosor, resistividad eléctrica, temperatura...), los

tipos microbianos presentes en el alimento o la fase de crecimiento en que éstos se hallan, podrían influir decisivamente en la tasa de inactivación que se consigue. Relaciones causa-efecto que aún no se conocen adecuadamente (Grigelmo-Miguel, Soliva-Fortuny, Barbosa-Cánovas, & Martin-Belloso, 2011).

1.1.9. PLASMA FRÍO ATMOSFÉRICO

El plasma es el estado de agregación de la materia más energizado; se puede obtener, por tanto, suministrando energía a un volumen de gas que, previamente, resultaba en su conjunto eléctricamente neutro. En consecuencia, el grado de ionización que se alcance dependerá, entre otros factores, del tipo de gas (o mezcla de gases) de que se trate, de la cantidad de energía que se le aporte, y de las condiciones de presión en que esto ocurra (Bárdos & Baránková, 2010). En general, un plasma estará compuesto por moléculas y átomos en estado neutro, y por especies derivadas del proceso energizante, como radicales y otros subproductos metaestables, iones, electrones y fotones (Xu, Garner, Tao, & Keener, 2017). Un plasma, en definitiva, es un escenario de excitación energética: cuando la energía decae se acaba produciendo una recombinación de las cargas y, al cabo, vuelve a ser un gas ordinario.

Se constata que las partículas más ligeras y móviles (electrones) captan y transportan la energía transferida al plasma con mucha más eficiencia que las especies más pesadas (iones y moléculas neutras). Por otra parte, la presión a la que se halle sometido el plasma condicionará la frecuencia de colisión entre sus partículas: a mayor presión, mayor número colisiones; lo que se traducirá en una mayor homogeneidad en la distribución de la energía y, por tanto, en un equilibrio térmico local (Bárdos & Baránková, 2010). Este concepto sirve de base para una clasificación de los plasmas: aquellos que se hallan en equilibrio térmico

local (plasmas calientes), y los que no alcanzan dicho equilibrio (plasmas fríos) (Ehlbeck, y otros, 2011). Hasta hace unas décadas, la tecnología sólo permitía generar plasmas fríos a presiones de vacío; lo cual aparejaba un coste y una complejidad instrumental que no hacía posible su aplicación en la industria alimentaria. Actualmente, existen equipos sencillos y que no requieren una gran inversión, que alcanzan altas tasas de inactivación microbiana con tratamientos de corta duración, y que trabajan con plasmas fríos generados a presión atmosférica (*Atmospheric Cold Plasma*; ACP en su acrónimo anglosajón) (Solenó Wilches, 2015).

La energización del gas se realiza mediante un campo electromagnético. Dicho campo ha de poseer intensidad y frecuencia suficientemente altas: intensidad que proporcione la energía necesaria para generar un plasma (una densidad típica de especies ionizadas en un ACP está entre 10^{11} - 10^{16} iones/cm³; si se considera que dicho volumen alberga en torno a 10^{19} moléculas y átomos, el porcentaje ionizado no superaría un 0.1 %); y una frecuencia de oscilación del campo que no puedan seguir las partículas de mayor peso (lo que aumenta la temperatura de los electrones, pero apenas afecta a la temperatura iónica) (Bárdos & Baránková, 2010). Este estado de no equilibrio térmico se traduce en una temperatura del plasma de en torno a 25°C. Existen numerosos diseños de fuentes de plasma atmosférico (matrices de plasma, sistemas de cátodo hueco, descarga de microondas, chorro de plasma...), pero el más empleado es el sistema de descarga de barrera dieléctrica (DBD); que, esencialmente, supone la aplicación de una gran diferencia de potencial entre dos electrodos cubiertos (al menos uno de ellos) con una barrera aislante para evitar la ruptura dieléctrica del plasma. Las diferencias de potencial que se aplican para generar este tipo de plasmas pueden ir desde unos pocos miles de voltios hasta más de cien mil; mientras que las frecuencias de los campos pueden alcanzar órdenes de 10^4 Hz (Ojha, y otros, 2021).

PLASMA FRÍO DE DESCARGA DE BARRERA DIELECTRICA (DBD)

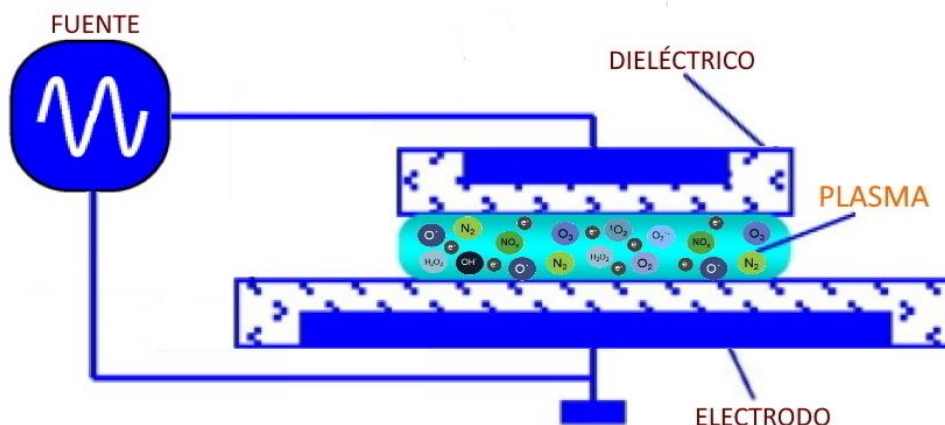


ILUSTRACIÓN 3. Esquema de un generador de plasma frío DBD

Adaptación de: (Bárdos & Baránková, 2010) y (Ojha, y otros, 2021)

Los gases generadores de plasma pueden ser muy diversos, desde aire hasta gases nobles. En cualquier caso, su poderosa actividad germicida parece residir tanto en la acción de radicales, especies metaestables y otros subproductos de la intensa reactividad de los plasmas, como en la energía radiada en la desexcitación atómica (con abundante emisión en el ultravioleta). En el caso del plasma generado con aire se origina una larga serie de reacciones en cadena que dan lugar a distintas especies reactivas de nitrógeno y oxígeno: óxido nitroso (NO), iones nitrito (NO_2^-) e iones nitrato (NO_3^-) (Ojha, y otros, 2021), ozono (O_3), oxígeno atómico (O) y radicales hidroxilo (OH); y, en presencia de agua, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aniones superóxido (O_2^-), y radicales hidroperóxido (OOH). Especies que muestran, tanto individual como sinérgicamente, un gran potencial reactivo con la mayor parte de los componentes celulares (modificación química de ADN, oxidación de ácidos grasos y aminoácidos, rotura de uniones peptídicas...) (Surowsky, Schlüter, & Knorr, 2015). Hecho que, combinado con la gran actividad antimicrobiana de la luz ultravioleta de onda corta (véase epígrafe 1.1.2), confiere a esta tecnología una extraordinaria capacidad de higienización.

Cierto es que buena parte de las especies químicas generadas durante la energización del plasma poseen una vida media bastante corta; algunas otras, sin embargo, presentan mayor perdurabilidad. Esta circunstancia posibilita que no sólo resulte eficaz la aplicación directa del plasma sobre el alimento, sino que líquidos o gases (agua o aire, por lo común) tratados previamente con plasma retengan, a su vez, cierta capacidad germicida. Por lo que se constata que el tratamiento indirecto de alimentos mediante agua activada por plasma aún proporciona una importante inactivación bacteriana; ya que las especies más efímeras (OH , O_2^- , $\text{NO}\dots$) dan lugar a otras con mayor vida media (NO_2^- , NO_3^- , $\text{H}_2\text{O}_2\dots$), entre los que se generan isómeros inestables de éstos (como es el caso del peroxinitrito: ONOO^-) muy reactivos con las biomoléculas celulares (Qian, y otros, 2019). El sistema de descarga de barrera dieléctrica permite, asimismo, una importante reducción microbiana en alimentos envasados, con unos tiempos de tratamiento realmente cortos (del orden de segundos o minutos) (Ziuzina, Patil, Cullen, Keener, & Bourke, 2014).

Primordialmente, su eficacia higienizante aumenta con el tiempo de tratamiento y con la intensidad del campo que genera el plasma (entre otros factores que en diferente medida puedan influir en tal propiedad). Con una óptima parametrización, puede inactivar desde mohos y levaduras hasta formas de resistencia bacteriana. Dada su naturaleza no térmica, pueden obtenerse alimentos muy seguros con un deterioro sensorial y nutricional de escasa relevancia (López, y otros, 2019). Sin embargo, esta calidad se halla condicionada sustancialmente por la fuente de plasma empleada, o lo que es lo mismo, por la tipología de las especies químicas generadas y por su reactividad sobre la matriz alimentaria (Umair, y otros, 2019).

Definitivamente, la tecnología de plasma frío atmosférico representa una apuesta de futuro: su procesado aún a sencillez, eficacia, rapidez y bajo coste. Su mayor inconveniente

acaso sea la complejidad de su química: donde intervienen un gran número de variables (energía del plasma, combinación de gases que lo generan, método y tiempo de aplicación, composición del alimento...), que condicionan en distinto grado el enorme número de especies que participan en el proceso, su reactividad, productos, reacciones secundarias... Una química extraordinariamente extensa y diversa que se desarrolla en cortos intervalos de tiempo; que requerirá, al cabo, una adecuada comprensión antes de que las autoridades en materia de seguridad alimentaria regulen y validen sus procesos mediante normativa específica (Ojha, y otros, 2021).

1.2. TRATAMIENTOS TÉRMICOS

En la precedente compilación de técnicas se ha omitido deliberadamente cualquier método de preservación del alimento que implique calor (tratamientos térmicos) o presión no atmosférica (procedimientos vacuométricos e hiperbáricos). El motivo de esta omisión, según se indicó, no es otro que tratar tales modalidades separadamente; puesto que, a fin de cuentas, son el fundamento de este trabajo.

Sin embargo, como se verá a continuación, el repertorio de técnicas de barrera con carácter térmico de que dispone la industria alimentaria no se circunscribe estrictamente a los tratamientos calóricos que se emplean en la cocina tradicional. Se presentan, acto seguido, algunos de estos procesos de aplicación exclusivamente industrial; antes de hacer revisión sumaria de los métodos culinarios convencionales, y concluir esta sección con una presentación algo más detallada de la técnica de cocción *sous vide*.

1.2.1. RADIOFRECUENCIAS

El calentamiento por radiofrecuencias (RF), también conocido como *calentamiento dieléctrico capacitativo*, hace uso de la radiación con mayor longitud de onda del espectro electromagnético; esto es, la menos energética (en el extremo opuesto del espectro se sitúan las radiaciones ionizantes, que se abordaron en la sección 1.2). El rango de las radiofrecuencias se extiende de 1 a 300 MHz; si bien, para no interferir con sistemas de telecomunicación, únicamente está permitido el empleo de frecuencias muy específicas, hallándose entre 10 y 50 MHz aquellas que se destinan a uso industrial (Tang, Chan, & Wang, 2004).

El calentamiento por radiofrecuencia, al igual que el producido por radiación de microondas (MW), difiere de los métodos convencionales en su mecanismo de transferencia calórica. Dada la baja energía de la radiación RF, el calor no se transmite al alimento debido a un considerable gradiente de temperatura o por fenómenos de naturaleza convectiva o conductiva: el calentamiento se produce por la alternancia del campo electromagnético asociado a la onda RF (si su frecuencia es 30 MHz, el campo cambiará su polaridad 30 millones de veces cada segundo). Oscilación electrostática ésta que provoca una incesantemente migración de los iones en disolución presentes en el alimento (efecto denominado *despolarización iónica*), así como la continua rotación de sus moléculas polares (también conocido como *rotación de dipolos*). Agitación de partículas que, en definitiva, se traduce en intensas fricciones y en un incremento de la temperatura (Marra, Zhang, & Lyng, 2009).

Esencialmente, la configuración de un dispositivo de calentamiento RF consta de un generador de frecuencia adecuada conectado a dos placas paralelas, entre las cuales se dispone el alimento (dichas placas realizan la función de las armaduras de un condensador, mientras que el alimento representa el dieléctrico). La diferencia de potencial generada entre las placas conlleva la aparición de un campo eléctrico, responsable del calentamiento del producto por el mecanismo que se describe en el párrafo anterior. Las propiedades dieléctricas del alimento, por tanto, condicionarán la intensidad del campo que se puede aplicar sin ruptura dieléctrica del sistema capacitor (García-Mosqueda, Cerón-García, Salas Araiza, & Sosa-Morales, 2016).

Al igual que ocurre con otras electrotecnologías (como es el caso de la radiación MW), su acción calefactora se origina en el interior del alimento, provocando un calentamiento volumétrico. Por otra parte, dado que en el interior del alimento la atenuación que sufre la

radiación es inversamente proporcional a su longitud de onda, la técnica RF resulta muy penetrante: lo que hace que el calor se distribuya uniforme y eficientemente, incluso en materias primas de gran tamaño. Su moderado consumo energético permite, asimismo, una importante reducción de los costes de producción (Piyasena, Dussault, Koutchma, Ramaswamy, & Awuah, 2003).

No obstante, la implantación de esta técnica se halla poco extendida. La información disponible acerca de las propiedades dieléctricas de los alimentos en el rango de las radiofrecuencias es aún bastante limitada; por tanto, no se ha estudiado adecuadamente su eficacia en la inactivación de microorganismos, sus efectos en términos de vida útil del producto, o el impacto que supone sobre la calidad organoléptica de éste (Marra, Zhang, & Lyng, 2009).

1.2.2. CALENTAMIENTO ÓHMICO

El calentamiento óhmico (OH en su acrónimo anglosajón *Ohmic Heating*), técnica que también se conoce como *calentamiento electroconductor*, resulta aplicable a productos con cierto contenido en agua y electrolitos. Requisito éste imprescindible para hacer pasar a través del alimento una corriente eléctrica alterna, la cual incrementará su temperatura (Imai, Uemura, Ishida, Yoshizaki, & Noguchi, 1995).

El fundamento de la técnica OH es la disipación de energía eléctrica en calor; y ésta resulta proporcional a la conductividad eléctrica del alimento y al cuadrado de la intensidad del campo (siendo la conductividad una función de la temperatura, de la sustancia que se calienta y del método empleado). De donde se deduce que, a una intensidad de campo dada, ya que la conductividad aumenta con la temperatura, el calentamiento óhmico multiplica su eficacia (en un factor igual al cuadrado de la intensidad de campo) según se

eleva la temperatura. En aquellos medios con una aceptable homogeneidad conductiva el calentamiento se alcanza uniformemente; resultando las velocidades de cesión energética (rapidez con que se produce dicho calentamiento) extremadamente altas (Sastry, 2004). Lo que se traduce en menor tiempo de procesamiento y en un mayor rendimiento productivo. Características que posibilitan su implementación en diversas aplicaciones de la industria alimentaria. Se emplea eficazmente en la pasteurización de alimentos bombeables (leche, ovoproductos, zumos de fruta...), o en la higienización de productos con alta viscosidad; sin deterioro apreciable de los atributos organolépticos y las propiedades nutricionales de los alimentos tratados. Sin embargo, en aquellos productos que presentan una conductividad heterogénea el calentamiento OH presenta una distribución irregular (Yildiz Turp, Sengun, Kendirci, & Icier, 2013).

Principalmente, los mecanismos de inactivación microbiana del calentamiento OH son de naturaleza térmica, por tanto, su tasa de inactivación es comparable a la producida por tratamientos térmicos convencionales de una intensidad semejante. Sin embargo, se observa una ligera reducción de los tiempos de inactivación (tiempo necesario para reducir una unidad logarítmica una determinada población microbiana) en los tratamientos OH frente a los convencionales. Resultado que se atribuye a la presencia de un campo eléctrico de muy baja frecuencia (según países, la corriente alterna es de 50 o 60 Hz), lo que favorece una acumulación de carga superficial en la pared celular, originándose una diferencia de potencial que incrementa la permeabilidad de la membrana citoplasmática (efecto de leve electroporación) (Camargo Knirsch, Alves dos Santos, Martins de Oliveira, & Vessoni Penna, 2010). Asimismo, un aumento de la intensidad de la corriente eléctrica (esto es, una mayor diferencia de potencial) mejora la eficacia inhibidora del calentamiento óhmico (Moreno, y otros, 2014).

Esencialmente, el dispositivo calefactor OH cuenta con una cámara de calentamiento, dotada de dos o más electrodos, distribuidos en conveniencia a la morfología del alimento a tratar, de modo que se facilite la transmisión de la corriente eléctrica. Tales electrodos se hallan conectados a un generador de corriente alterna (50-60 Hz). Se distingue entre sistemas de flujo continuo y sistemas estáticos, según el acceso del producto a la cámara de calentamiento se produzca de forma continua o discreta; generalmente, destinados a alimentos líquidos los sistemas continuos, y a sólidos los estáticos (Sakr & Liu, 2014).

1.2.3. RADIACIÓN DE MICROONDAS

Bajo esta denominación se incluyen todas aquellas radiaciones con una frecuencia comprendida entre 300 MHz y 300 GHz (Ahmed & Ramaswamy, 2007). Sin embargo, pese a la amplitud de dicho rango, la industria alimentaria emplea únicamente dos frecuencias en sus tratamientos con microondas (MW): 915 ± 13 MHz y 2450 ± 50 MHz (tan sólo con esta última, 2.45 GHz, se comercializan aparatos domésticos). A nivel industrial, por contra, la radiación de menor frecuencia (915 MHz) es la que se utiliza mayoritariamente. Ello se debe a su mayor profundidad de penetración (es decir, sufre una menor atenuación en el interior del alimento); lo que supone un calentamiento más uniforme y eficiente (Coronel, Simunovic, Sandeep, & Kumar, 2008).

El mecanismo del calentamiento MW es de idéntica naturaleza al producido por las radiofrecuencias (epígrafe 1.2.1, donde ya se estableció cierto paralelismo con la radiación de microondas). En este caso, el campo electromagnético posee mayor frecuencia que en RF, lo que intensifica los efectos de *rotación de dipolos* y *despolarización iónica* (descritos en el citado epígrafe). Si bien ambos efectos provocan fricciones y generan energía calórica (Hossan, Byun, & Dutta, 2010), la importancia de su contribución variará según sea la

frecuencia del campo: mientras que a frecuencias inferiores a 1GHz (caso RF) el efecto predominante era el de despolarización iónica, con frecuencias superiores a 1 GHz el efecto más contributivo al calentamiento es la rotación de dipolos (Chandrasekaran, Ramanathan, & Basak, 2013). Asimismo, como ya se apuntara, la atenuación que experimenta la radiación en el medio resulta inversamente proporcional a su longitud de onda; por tanto, los tratamientos MW resultarán, en general, menos penetrantes que los RF. Dejando a un lado la comparativa, son diversos los factores que van a determinar la distribución del calor en la aplicación de microondas a un alimento; entre éstos, sus propiedades dieléctricas juegan un papel fundamental: una matriz con alta pérdida dieléctrica (como puede ser el caso de alimentos con un considerable porcentaje de humedad) resultará buen absorbente de la radiación MW, facilitando un calentamiento más eficiente. No obstante, junto a su composición, influirán en distinta medida otros parámetros como volumen, morfología, y densidad del producto, o incluso la disposición de éste en el interior del horno (Içier & Baysal, 2004).

Sin duda alguna, la aplicación doméstica de los tratamientos MW (2.45 MHz) ha popularizado enormemente esta técnica en las últimas décadas: hoy día, un dispositivo de calentamiento por microondas es tan habitual como un frigorífico en la cocina de cualquier hogar. Esencialmente, su sistema calefactor consta de un generador de campo (magnetron o klistron) y una cabina, que resulta hermética para la radiación MW; donde ésta se refleja aleatoriamente hasta incidir sobre un medio absorbente (el alimento). A nivel industrial, sobre todo en el caso de fluidos, se emplean sistemas continuos. El éxito de esta tecnología ha radicado en su capacidad para proporcionar una alta tasa de calentamiento con una reducción significativa de tiempo. A lo que se podría añadir una operativa bastante simple, la seguridad de su manejo, un bajo mantenimiento, fácil limpieza y un coste asequible;

presentando, en general, una aceptable retención de los parámetros cualitativos de los alimentos, tanto sensoriales como nutricionales (Salazar-González, San Martín-González, López-Malo, & Sosa-Morales, 2012).

Inequívocamente, como cualquier tratamiento térmico, la radiación MW se muestra eficaz en la inactivación de microorganismos y la desactivación enzimática. Sin embargo, como ocurre con otras electrotecnologías (caso análogo se plantea en el epígrafe anterior), en la tasa de inactivación podría haber una contribución no térmica, debida a la presencia del campo electromagnético y sus efectos sobre la permeabilidad de la pared de las células microbianas (Kozempel, Cook, Scullen, & Annous, 2000). Más allá del mecanismo que lo justifique, comparativamente, los tratamientos MW alcanzan mejores tasas de inactivación que los tratamientos térmicos convencionales, a una misma temperatura (Chandrasekaran, Ramanathan, & Basak, 2013).

1.2.4. RADIACIÓN INFRARROJA

Según se ha visto, desde las radiaciones ionizantes (rayos Γ y X, o ultravioleta lejano) hasta las menos energéticas del espectro (microondas o radiofrecuencias), todas tienen algún tipo de aplicación en la industria alimentaria. El infrarrojo (IR) no es una excepción: de hecho, esta energía fue la primera que empleó el ser humano con fines alimentarios; muy probablemente, allá por la noche de los tiempos. Y así debió de ser por el hecho incontrovertible de que cualquier tipo de materia emite energía de forma proporcional a su temperatura (ley de Stefan-Boltzmann), por la propia cinética de las partículas que la componen. Radiación térmica de la materia que se produce en frecuencias del infrarrojo, en gran medida (variando ligeramente su distribución en función de la temperatura del cuerpo emisor). Por tanto, se podría decir que una técnica ancestral, como la desecación

de alimentos, ya utilizaba una fuente de infrarrojos (la radiación solar) para la inactivación microbiana y el incremento de la vida útil del producto.

El rango de radiación IR abarca longitudes de onda desde 1 mm hasta $0.78\ \mu\text{m}$. Si bien, su uso industrial ($30\ \mu\text{m} \geq \lambda \geq 2.5\ \mu\text{m}$) excluye una buena parte del infrarrojo cercano.

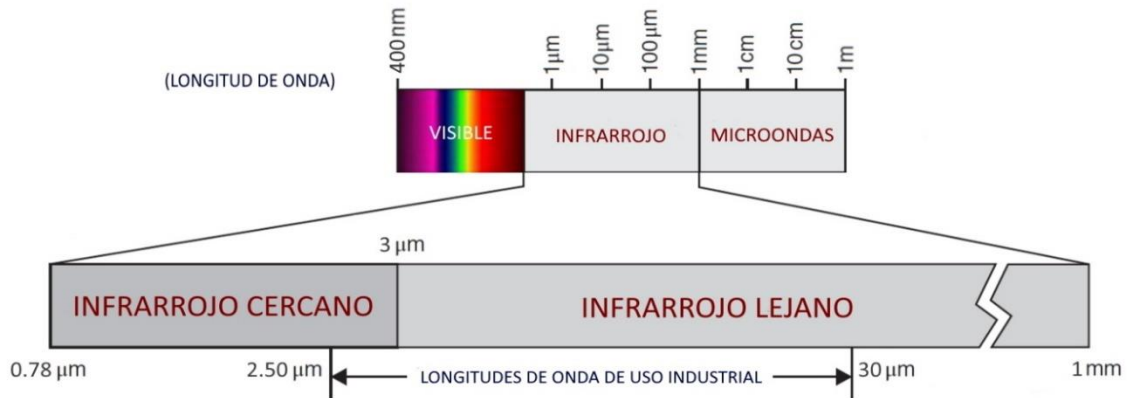


ILUSTRACIÓN 4. Rango IR de uso industrial

Adaptado de: (Das & Das, 2014)

En este intervalo espectral, tanto el agua como diversas moléculas orgánicas (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) presentan franjas de fuerte absorción; todas ellas en las proximidades del infrarrojo cercano (concentradas, principalmente, entre $3\text{--}10\ \mu\text{m}$). Una circunstancia que, sumada a escasa absorción IR del aire, confiere a este tipo de radiación un efecto calefactor sobre los alimentos de alta eficiencia (con tasa de calentamiento y tiempo de respuesta muy superiores a los de sistemas de conducción térmica o convección de aire) (Das & Das, 2014).

La radiación IR encuentra diversas aplicaciones en la industria alimentaria, desde la deshidratación o el tostado (las más extendidas) hasta el horneado, la pasteurización o la esterilización. Las cuales, dado el limitado poder de penetración de esta técnica fuera de las franjas de gran absorbancia, obtienen sus mejores resultados en sólidos con poco grosor o líquidos (donde el calor se propaga convectivamente hacia el interior del producto). Por

tanto, a nivel superficial y en grosores milimétricos muestra gran eficacia en la inactivación de bacterias (incluidas las esporas), levaduras y mohos. El efecto térmico del infrarrojo desnaturaliza diverso material proteico, tanto de la pared como del interior (citoplasma, ribosomas, nucleóide...), imposibilitando la viabilidad celular (Krishnamurthy, Khurana, Soojin, Irudayaraj, & Demirci, 2008).

La fuente de los generadores de IR, según la longitud de onda en que emitan, puede alcanzar temperaturas de hasta 2200 °C (en caso de IR de onda corta). Dicha fuente suele hallarse alojada en un reflector, que intensifica su acción radiativa (Das & Das, 2014).

1.2.5. ESTERILIZACIÓN

En sentido estricto, la esterilización implica una completa inactivación microbiana (en cualquiera de sus formas) presentes en el alimento. Un tratamiento con tales garantías requiere, necesariamente, un envasado hermético y alcanzar una temperatura de al menos 120 °C (en su punto más frío); sólo así se podría hablar de alimento totalmente aséptico, médicamente esterilizado. Lo más parecido que produce la industria alimentaria son las conservas enlatadas; y se hallan lejos de ese nivel de asepsia. Concretamente, el tipo de procesamiento térmico que se aplica en el sector alimentario se denomina *esterilización comercial* (Teixeira, 2014).

Una perfecta esterilización térmica del alimento resulta inviable: la total destrucción de su población microbiana traería consigo la desnaturalización nutricional del producto. Por tanto, la finalidad de la esterilización comercial es la aplicación de un tratamiento térmico sobre el alimento, antes o después de su envasado en recipiente hermético, de tal intensidad que queden inactivados la totalidad de los microorganismos patógenos para el ser humano que pudiera contener, así como aquellos que pudieran proliferar en el

alimento en condiciones de almacenamiento no refrigerado. Se establece que un alimento alcanza su esterilización comercial mediante la aplicación de un tratamiento térmico de tiempo e intensidad determinados, si la doceava parte de ese tiempo (a igual intensidad térmica) resulta suficiente para reducir en una unidad logarítmica su población microbiana inicial (Alvarado, y otros, 2009).

En el diseño eficiente de un tratamiento de esterilización comercial, por tanto, se deben considerar una serie de factores, como son: la composición de la matriz, su pH, los posibles microorganismos presentes, o el tipo de envase. Prestando especial cuidado, ya que el envasado implica un vacío parcial (condiciones próximas a la anaerobiosis), a los substratos de poca acidez ($\text{pH} > 4.6$), donde podría proliferar *Clostridium botulinum* (de esporulación termorresistente y una fatal toxicidad). Así como considerar la cinética de alteración nutricional que puede sufrir el alimento (Teixeira, 2014).

Actualmente, pese a la gran variedad de técnicas que ha incorporado la industria en las últimas décadas, la esterilización comercial continúa siendo la técnica de preservación alimentaria con mayor volumen de aplicación (Augusto, Pinheiro, Tribst, & Cristianini, 2009). Como se ha reseñado, se distinguen dos tipos procesos, según el orden en que se aplique el tratamiento térmico al producto: enlatado tradicional (esterilización después del el envasado) y procesamiento aséptico (envasado tras la esterilización). Este segundo caso, generalmente aplicado a líquidos, requiere una rigurosa asepsia durante el proceso de envasado y sellado; lo que, a cambio de una mejora de la calidad organoléptica y nutricional por reducción del impacto térmico, supone un incremento de costes (Alvarado, y otros, 2009). En ambos tipos de procesos, los mecanismos de transferencia calórica variarán en función del estado de agregación del alimento: en líquidos resultarán predominantemente convectivos, mientras que en sólidos serán de naturaleza conductiva; produciéndose una

participación de los dos (convección y conducción), ya sea alternada o sincrónicamente, en alimentos con densidad heterogénea, o que presentan más de una fase (Erdoğdu, Uyar, & Palazoğlu, 2010).

1.2.6. PASTEURIZACIÓN

Las incuestionables ventajas que reporta la esterilización (gran garantía higiénica, una prolongada vida útil y condiciones de estocaje poco exigentes) también conllevan, sin embargo, algún inconveniente: la estabilización que gana el producto al aplicarle un tratamiento térmico (inactivación enzimática y microbiana) corre paralela al deterioro de sus características (tanto nutricionales como organolépticas). Por así decirlo, cuanto más aséptico, más insustancial. En este punto, la pasteurización representa una solución de equilibrio: supone un procesamiento térmico de menor intensidad, más respetuoso con las propiedades del alimento, y que incrementa relativamente su vida útil (Osorio, Villareal, Mejía, & Cerón, 2013).

Una acertada reducción de tiempo-temperatura en el tratamiento térmico permitirá minimizar la alteración de la calidad del alimento (desnaturalización de proteínas, pérdida de compuestos volátiles, oxidación de lípidos, destrucción de vitaminas termolábiles, transformación de pigmentos...), a la vez que se consigue una higienización aceptable (Lan, y otros, 2010). En la elección del tratamiento de pasteurización que mejor se adecúe a cada alimento se deben considerar desde su composición hasta los atributos sensoriales que ha de conservar el producto final; valoración que, asimismo, debe tener en cuenta cómo se produce la transferencia de calor (a través del sustrato alimentario y del material de envasado), de modo que el calentamiento sea rápido y uniforme, y el proceso maximice su eficacia (Moraga, Torres, Guarda, & Galotto, 2013).

En consecuencia, la pasteurización no tiene capacidad para eliminar la totalidad de los microorganismos vegetativos (ni mucho menos sus posibles esporas). Por tanto, los productos pasteurizados requieran la profilaxis preventiva de una correcta manipulación previa; así como un posterior almacenamiento refrigerado, que ralentice el desarrollo de los microorganismos viables presentes en el alimento, los cuales causarían el deterioro del producto (en el mejor de los casos). Dado el amplio rango de intensidades que abarcan los tratamientos de pasteurización, la vida útil que pueden proporcionar resulta muy variable: desde varios días hasta algunas semanas (Teixeira, 2014).

En rigor, la aplicación de esta técnica abarcaría desde una pasteurización extrema, con temperaturas cercanas a las que emplea la esterilización comercial, hasta una suave pasteurización, cuya cota térmica inferior variaría según tipo de producto (por inactivación de mesófilos específicos, desnaturalización de proteínas o desactivación enzimática), con temperaturas del orden de 60-65 °C. Habitualmente, por tanto, se han distinguido distintos métodos de esta técnica; a saber:

- La denominada *ultrapasteurización* o método UHT (de su acrónimo anglosajón *Ultra High Temperature*). Procedimiento extremadamente severo que aplica temperaturas muy altas (135-140 °C) durante unos segundos (2-10''). Tras su envasado aséptico, el producto no precisa refrigeración y ofrece una prolongada vida útil. Propiamente, no se trata de una pasteurización, sino de una esterilización comercial.
- La pasteurización HTST (*High Temperature Short Time*); que, como indican sus siglas, combina temperaturas moderadamente altas (71-75 °C) con cortos intervalos de tiempo (15 segundos).
- La pasteurización LTLT (*Low Temperature Long Time*). Sistema que alarga el tiempo de aplicación del tratamiento (30 minutos) y reduce la temperatura (63-66 °C). Tanto este

método como el anterior suministran productos que, como se ha indicado, requieren un almacenamiento refrigerado (Pérez-Reyes & Sosa-Morales, 2013).

Ciertamente, la pasteurización industrial ha ido evolucionando hacia tratamientos de menor agresividad térmica, buscando (desde el lado de la seguridad) una alteración mínima de las características del producto. Una tendencia que, como se comprobará en próximos epígrafes, se ha acentuado con la incorporación de esta técnica a la restauración comercial; donde los tiempos de los tratamientos pueden prolongarse varios días y las temperaturas, en determinados casos, volverse peligrosamente benignas (del orden de 45-50 °C).

1.2.7. TÉCNICAS CLÁSICAS DE COCINADO

En esencia, cocinar es transmitir calor a los alimentos. Esta transferencia energética se lleva a cabo a través de tres mecanismos: conducción, convección y radiación; que, generalmente, actúan combinados. Tales mecanismos, sintéticamente, podrían describirse como (McGee, 2017):

- La conducción se asocia a los estados de agregación con mayor densidad (sólidos y líquidos, principalmente); obedece a interacciones moleculares, por medio de las cuales, una partícula con un elevado nivel de energía cederá parte de ésta a otras partículas circundantes menos energéticas (gradiente térmico). Se producirá, por tanto, en el interior de una sustancia, o entre dos medios que se hallen en contacto físico.

- La convección suma al fenómeno microscópico de la conducción (transferencia de energía entre partículas adyacentes) un desplazamiento local de la materia (macroscópico); esto es, una región localmente más energética (con mayor temperatura) experimenta un movimiento ascendente por diferencia de densidad relativa con su entorno. Requiere, por tanto, que se trate de un fluido (líquido o gas).

▪ La radiación, por el contrario, es un fenómeno universal y omnipresente (como se indicó en el epígrafe 1.2.4. *Radiación infrarroja*): toda la materia emite radiación térmica de forma continua, y no necesita ningún medio material para su propagación (de hecho, es en el vacío donde se propaga más eficientemente). Esta energía calórica es proporcional a la temperatura del cuerpo emisor y, mayoritariamente, posee una longitud de onda del infrarrojo.

Una clasificación de las técnicas culinarias tradicionales atendiendo a la naturaleza del sustrato a través del cual se transmite el calor al alimento (Caracuel García, 2008) ofrece el resultado que se muestra el siguiente diagrama:



ILUSTRACIÓN 5. Clasificación de las técnicas culinarias clásicas

Elaboración propia a partir de la tipificación de: (Caracuel García, 2008)

Donde se aprecia que buen número de técnicas clásicas emplean un sustrato líquido, ya sea graso o acuoso. Esto se debe, por una parte, a que el mecanismo de transmisión de calor predominante en los líquidos es la convección (de mayor eficiencia que los fenómenos conductivos o radiativos) y, por otro lado, a que fluidos como el agua o el aceite (la primera, especialmente) presentan un calor específico muy superior al del aire. Si a ello se suma la

posibilidad de dilución de solutos sólidos y una rápida difusión de sustancias, sin duda, los líquidos suponen un sustrato inmejorable para cocinar (especialmente, cuando los medios técnicos resultan limitados).

La clasificación anterior distingue, en el caso de sustratos *no líquidos*, entre medios *directos* (aquellos en que el principal mecanismo de transmisión calórica es la conducción), y medios *indirectos* (donde el calor, esencialmente, se transfiere por radiación).

Tras estas aclaraciones se procede a una enumeración descriptiva de las técnicas más habituales de la cocina clásica (ya que alguna de ellas se empleará en la preparación de las muestras de este estudio):

- *Escaldado y blanqueado*: Tratamiento que supone la inmersión del alimento en agua hirviendo (al natural o ligeramente sazonada) durante un espacio de tiempo muy corto, con distintos propósitos: cocinado parcial, eliminación de sabores o aromas no deseables, o facilidad de pelado, entre otros (Institut Paul Bocuse, 2015).

- *Hervido*: Cocción completa del alimento que se realiza por inmersión en un líquido acuoso en ebullición vigorosa, sazonado o no, según aplicación (Roca & Brugués, 2017).

- *Escalfado*: Al igual que en el caso precedente, se trata de una cocción completa del alimento que se realiza por inmersión en un líquido acuoso; sin embargo, éste debe hallarse a una temperatura muy próxima a la de ebullición, sin romper a hervir. El líquido de cocción puede sazonarse y, si se destina a alimentos proteicos de cierta fragilidad, acidularse con vinagre o zumo de limón (Larousse Gastronomique, 2015).

En las tres técnicas citadas, el calor se transfiere por convección en el líquido acuoso, y por conducción desde la superficie del alimento hacia su interior.

- *Cocción por vapor*: Técnica que, genuinamente, implica el cocinado del alimento en el interior de un recipiente tapado, dispuesto sobre una rejilla elevada que emerge de un

líquido acuoso en ebullición pausada, donde se genera una atmósfera vaporosa que puede estar convenientemente aromatizada (Larousse Gastronomique, 2015). En este caso, es la convección del vapor de agua la que calienta la superficie del alimento, con la energía extra del calor latente de condensación (McGee, 2017).

- *Salteado*: Procedimiento éste que, por lo general, se destina a alimentos de calibre reducido, con el propósito de dorar su superficie y cocinarlos total o parcialmente; lo que requiere un poco de aceite y gran intensidad de fogón (Caracuel García, 2008). En este proceso la transferencia de energía se produce por conducción, desde la superficie apenas engrasada de la sartén, que puede alcanzar temperaturas superiores a 220 °C (McGee, 2017).

- *Fritura*: Supone la cocción del alimento por inmersión en aceite a gran temperatura (180-200 °C); lo que produce una deshidratación parcial de su superficie, y la consiguiente formación de una capa crujiente. Al igual que ocurría en el caso de la inmersión en líquido acuoso, es la convección el mecanismo responsable de la transferencia calórica hasta la superficie del alimento, mientras que la cocción de su interior se realiza por conducción (Alvis, Cortés, & Páez, 2009).

- *Confitado*: Una formulación de esta técnica (en pastelería sus procedimientos son muy distintos) implica la cocción del alimento por inmersión en grasa (aceites vegetales, aromatizados o no, mantecas o grasas animales) a temperatura suave (entre 50 °C y 90 °C, dependiendo del producto). Sus mecanismos de transferencia son idénticos al caso anterior (Roca & Brugués, 2017).

- *Rehogado*: Cocción del alimento que se realiza en recipiente tapado, a fuego suave y con poca grasa, añadiéndose en ocasiones algún líquido acuoso (en reducida proporción), o apareciendo éste por exudación de jugos del propio alimento. Al tratarse de un proceso

que se realiza con bajo nivel de evaporación, no genera en el alimento (salvo en cocciones muy prolongadas) reacciones de coloración o dorado (Larousse Gastronomique, 2015).

Asimismo, es la convección el principal fenómeno de transporte energético.

- *Sofrito*: Este tipo de cocción se destina normalmente a vegetales troceados; al igual que el rehogado, también se realiza a fuego suave y con poca grasa; pero a diferencia de aquél, no se tapa para que el agua de vegetación se evapore, y el producto adquiera cierto grado de coloración (Larousse Gastronomique, 2015). Hasta que dicha evaporación se hace patente, el mecanismo convectivo es el predominante; mientras que en la fase final del proceso (dorado del producto) la conducción cobra relevancia.

- *Estofado*: Se trata de una cocción que se realiza en recipiente tapado, a fuego suave, y en un medio esencialmente acuoso donde el alimento apenas queda sumergido (es decir, el líquido de cocción no es demasiado abundante) (Rabasó & Aneiros, 1970). Generalmente supone una cocción prolongada que combina géneros de distinta naturaleza (vegetales, carnes o pescados), que pueden ser sometidos a algún tratamiento previo (blanqueado salteado, rehogado o sofrito) (Escoffier, 1989).

- *Breseado* (también denominado *braseado*): Supone la cocción del alimento en un recipiente hermético (con salida de vapor) denominado *brasera*, que recibe calor uniforme por toda su superficie (originariamente, se cubría de rescoldos). Esta técnica se emplea con géneros duros, que previamente se habrán sometido a salteado, sofrito o rehogado con vegetales y algún vino. La cocción del alimento (suave y prolongada) debe producirse en una atmósfera vaporosa (en ningún caso el alimento debe quedar sumergido en un líquido) (Myhrvold, Young, & Bilet, 2015).

Esta técnica, al igual que el estofado, supone la combinación de otras técnicas que se han descrito anteriormente. Los mecanismos de transporte calórico en cada etapa serán

los propios de cada una de las técnicas que se combinan. En el caso del breseado (sin duda, la técnica de mayor complejidad), al recibir la brasera un calentamiento isótropo, habría que considerar además la contribución sumativa de la radiación de sus paredes y tapa.

- *Plancha*: Cocción que se realiza por contacto del alimento con una placa metálica (de acero o hierro colado) a elevada temperatura ($T \approx 300\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Larousse Gastronomique, 2015). El mecanismo de transporte energético, en este caso, es puramente conductivo.

- *Baño maría*: La cocción del alimento se realiza en un recipiente que se encuentra en contacto con un baño de agua caliente; ésta, indirectamente, transfiere su temperatura al alimento; actuando, en baños sin termostato, como un limitador térmico ($T_{\text{máx}} = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Roca & Brugués, 2017). Al igual que en el caso anterior, en esta técnica el calor se transfiere por conducción.

- *Horneado*: La elevada temperatura del seno del horno, donde se sitúa el alimento, es responsable de su cocción. En esta técnica el calor llega al alimento por la contribución de varios mecanismos; a saber: el aire caliente del horno le transfiere calor por convección; a su vez, las paredes internas también participan en su calentamiento, en este caso, por radiación; mientras que la base del alimento (que no ha recibido ni radiación ni convección, por hallarse en contacto directo con la bandeja de horneado), obtendrá por conducción su aporte calórico (Pérez-Reyes & Sosa-Morales, 2013).

- *Parrilla*: La cocción del alimento se realiza en una rejilla metálica situada sobre una intensa fuente de calor (brasas, originariamente). Fuente ésta que (ya se trate de brasas, resistencia eléctrica o piedra volcánica) proporciona una fuerte emisión infrarroja, principal responsable del calentamiento del alimento (McGee, 2017).

- *Gratinado*: Dorado superficial que se produce en el alimento al colocarlo bajo una intensa fuente de radiación infrarroja (como puede ser la resistencia eléctrica de un grill o

una salamandra). Su finalidad, aparte de aportar color y sabor a la elaboración, es obtener una fina capa crujiente (que normalmente se consigue con queso o miga de pan). Como ocurre en la parrilla, se trata de una transmisión de calor esencialmente radiativa; dada la gran proximidad del alimento y la fuente de infrarrojos, y la escasa capacidad conductora del aire (Myhrvold, Young, & Bilet, 2015).

- *Glaseado*: Técnica que, como ocurría en el confitado, se puede referir a diferentes procedimientos. La formulación que aquí se considera se asemeja al gratinado en cierto modo. Como aquélla, esta técnica es un acabado, una cocción secundaria; e, igualmente, se procede situando el alimento bajo una fuente de infrarrojos. Sólo que a diferencia del gratinado, aquí se persigue un abrillantado superficial, ligeramente dorado (para ello se emplean napados a base de huevo y mantequilla) (Roca & Brugués, 2017). Asimismo, se trata de un calentamiento radiativo.

1.2.8. PASTEURIZACIÓN POR COCCIÓN *SOUS VIDE*

Al tratarse de una variante de la técnica que recoge el epígrafe 1.2.6. *Pasteurización*, participa, en consecuencia, de buena parte de sus características generales. Sin embargo, la pasteurización SV presenta singularidades de gran interés, tanto que se convertirán en el eje principal en torno al que orbite este trabajo.

Según se refirió anteriormente, sería muy difícil delimitar con exactitud el intervalo de temperaturas que representan el dominio de la pasteurización. En su extremo superior, esta indeterminación nunca va a representar un problema de seguridad (todo lo contrario); y sus temperaturas máximas de aplicación siempre quedarán de algún modo acotadas por distintos referentes (esterilización comercial, punto de ebullición del agua...); reduciéndose el asunto, en el peor de los casos, a una mera cuestión de nomenclatura, tan sólo a una

desacertada elección en el nombre del proceso. En su acotación inferior, sin embargo, la no concreción de una temperatura mínima de pasteurización podría acarrear problemas mucho más gravosos: ciertamente, la pretensión de una continua mejora en la calidad sensorial del producto conlleva un progresivo descenso térmico en los tratamientos que se le aplican; una tendencia en la no se sabe bien en qué punto el calor transmitido al alimento agota su capacidad pasteurizadora, volviéndose una fuente de calor suave e inofensiva (que tanto favorece el desarrollo de microorganismos mesófilos). Problemática ésta que puede plantearse en cierto tipo de elaboraciones culinarias que se ejecutan mediante cocción *sous vide*. Técnica que se describe seguidamente.

1.2.8.1. FUNDAMENTOS DE LA PASTEURIZACIÓN *SOUS VIDE*

La cocción SV o cocción al vacío es un tipo de tratamiento térmico mediante el cual alimentos crudos (o combinaciones de alimentos crudos y preelaborados) se someten a unas condiciones controladas de temperatura y tiempo, en el interior de bolsas de plástico termoestables de las que se ha extraído el aire (Schellekens, 1996).

No obstante, para que este método de cocinado (cocción SV) se transforme en una técnica de conservación (pasteurización SV) sería necesario complementar el tratamiento térmico con un adecuado enfriamiento ulterior. Pudiéndose resumir la secuencia completa de este tipo de pasteurización como: proceso mediante el cual los alimentos crudos se envasan al vacío en recipientes estables al calor, se cocinan a una temperatura controlada durante un tiempo específico, y se enfrían sin dilación alguna, antes de su almacenamiento refrigerado (Ayub & Ahmad, 2019).

Dado que esta técnica aplica temperaturas suaves o moderadas, resulta primordial que el alimento posea una reducida carga microbiana al iniciar su cocción; ello se traduce

en el uso de mercancías muy frescas, y en una máxima higiene en la manipulación de la materia prima (Roca & Brugués, 2003).

Existen envases de cocción en diferentes formatos (bolsas, barquetas, gastrovacs...) que se adecúan a los distintos sistemas de producción. Asimismo, los polímeros empleados en estos envases presentan distintas propiedades que determinarán su idoneidad según los procesos que deban soportar (conservación, tanto en frío positivo como negativo, atmósfera modificada o algún tipo de tratamiento térmico).

MATERIAL	SELLABLE	TERMOSELLABLE	FLEXIBILIDAD	RIGIDEZ	BARRERA O ₂	BARRERA H ₂ O	PROPIEDAD TEMPERATURA MÁXIMA (°C)
POLIETILENO (PE)	●	●	●			●	100
POLIETILENO ALTA DENSIDAD (HDPE)	●	●	●	●		●	120
POLIPROPILENO (PP)	●	●	●	●		●	135
POLIPROPILENO ORIENTADO (OPP)			●			●	125
POLIAMIDA (PA)		●	●		●		135
POLIAMIDA ORIENTADA (OPA)			●		●		135
POLIESTIRENO (PS)		●		●			85
POLIESTIRENO ORIENTADO (OPS)		●		●			-
POLIESTIRENO EXPANDIDO (EPS)							-
POLIÉSTER (PET)		●	●				135
POLIÉSTER BIORIENTADO (BOPET)			●				135
POLIÉSTER CRISTALINO (CPET)		●	●				> 200
POLIÉSTER AMORFO (APET)		●		●	●	●	-
POLICLORURO DE VINILO (PVC)		●		●	●	●	-
SURLYN	●	●	●			●	70
ETILENO ALCOHOL VINÍLICO (EVOH)		●			●		125
CLORURO DE POLIVINILIDENO (PVDC)		●			●		135

TABLA 1. *Propiedades de algunos polímeros empleados en envases*

Adaptación de: (Del Valle, 2016)

En la restauración comercial, el envase más habitual para cocción al vacío es la bolsa. Los materiales con que están hechas deben, en consecuencia, resultar resistentes al calor y presentar escasa permeabilidad a los gases. Las características concretas que se precisan de un determinado plástico se obtienen mediante la superposición de capas de distintos

polímeros, conformando una estructura laminada donde se complementan aditivamente sus propiedades. Así, las bolsas de cocción más simples suelen ser una combinación de dos láminas: una exterior de polipropileno (PP) y una interior de poliamida (PA); de modo que ambos polímeros aportan individualmente gran resistencia tanto mecánica como térmica, y complementan sus permeabilidades para ejercer conjuntamente una barrera óptima (mientras que el polipropileno presenta bastante permeabilidad al oxígeno y gran barrera frente al vapor de agua, la poliamida es permeable al agua, pero con una alta barrera al oxígeno) (Ares-Pernas, 2006). Bolsas de cocción más específicas, como son las retráctiles, combinan un mayor número de láminas y otros polímeros, como el polietileno de alta densidad (HDPE) o el copolímero de etileno y alcohol vinílico (EVOH); siendo este último el que le confiere sus propiedades de retracción térmica. Otros films alimentarios multicapa empleados en envasado MAP llegan a combinar hasta once láminas (Del Valle, 2016).

La obtención de un óptimo grado de vacío en el envasado requiere que el producto se halle suficientemente frío. Un hecho éste que se manifiesta con su mayor certidumbre en el caso del envasado de un líquido acuoso. Como es sabido, la temperatura de ebullición de un líquido es aquella en que su presión de vapor se iguala con la presión del medio; y, por otra parte, la presión de vapor del líquido aumenta con su temperatura. Por tanto, si la presión interior de la campana de vacío disminuye a medida que la bomba extrae aire, cuanto mayor sea la temperatura del líquido (o sea, su presión de vapor) antes se igualarán los valores de ambas presiones, produciéndose la ebullición del líquido. Un menor tiempo de extracción de aire significa menor grado de vacío; ya que la ebullición interrumpiría el proceso por desbordamiento de la bolsa. Una vez sellada la bolsa, la presión residual en su interior suele estar entre 10^{-2} y 10^{-3} atmósferas; es decir, usualmente, en el envasado de la

técnica *sous vide* se practica un grado de vacío de entre un 99% y un 99,9%. Lo que supone un entorno de cocción prácticamente anaeróbico.

En un volumen de producción pequeño-mediano, resulta habitual que la cocción se lleve a cabo en hornos de convección forzada de vapor, o bien en baños de circulación de agua (baño maría). Ambas maquinarias poseen su lado ventajoso: mientras que los hornos permiten un mayor volumen de trabajo, presentan el inconveniente de no garantizar un tratamiento térmico suficientemente uniforme; por contra, la limitada producción de los baños se genera en un medio de gran homogeneidad térmica, dada la gran eficiencia de la circulación del agua y la precisión de sus termostatos, que responden a oscilaciones de temperatura del orden de $\pm 0,1$ °C (Baldwin, 2012). En volúmenes de producción de una envergadura muy superior (industria alimentaria o grandes cáterings) las pasteurizaciones de este género se realizan en autoclave; una maquinaria ésta que permite, asimismo, tanto la esterilización como el enfriamiento del producto (Díaz, Nieto, Bañón, & Garrido, 2009).

Para que el alimento alcance un determinado grado de pasteurización, como ya se ha dicho, no sólo es necesario que el tratamiento al que se somete posea cierta intensidad, en tiempo y temperatura (aspecto éste que se abordará en el siguiente epígrafe); requiere también un rápido enfriamiento. Concretamente, dicho descenso térmico ha de conseguir que el alimento alcance una temperatura no superior a 3 °C (en corazón de producto) en menos de 90 minutos desde que finaliza su cocinado ($T_{cp} \leq 3$ °C, $t_{m\acute{a}x} = 90'$; siendo T_{cp} : la temperatura en corazón de producto, esto es, la temperatura del punto de calentamiento más tardío, o más interno geométricamente) (Roca & Brugués, 2003). Este enfriamiento rápido se lleva a cabo en abatidores térmicos: máquinas de circulación de aire forzado de baja temperatura. No obstante, al estar envasado el producto en alta barrera, en caso de necesidad, el enfriamiento también se puede realizar en baño de hielo.

Ciertamente, los fundamentos de este tipo de cocción, así como su práctica, se han extendido y popularizado considerablemente en las dos últimas décadas; haciendo que el termostato de precisión adaptable a distintos recipientes (róner) o el baño de circulación agua, la envasadora de vacío y el abatidor de temperatura se hayan vuelto conceptos y aparatos muy corrientes en las cocinas de un gran número de restaurantes (Sánchez del Pulgar, Gázquez, & Ruiz-Carrascal, 2012); incluso, de no pocas cocinas domésticas.

1.2.8.2. MODALIDADES DE COCCIÓN *SOUS VIDE*

Naturalmente, la intensidad del tratamiento térmico que se aplique a cada alimento (relación tiempo-temperatura) irá en concordancia con la naturaleza de éste: mientras que las celulosas y fibras vegetales de las legumbres exigirán temperaturas propias de la cocción tradicional (Roca & Brugués, 2003), entre 55 y 60 °C se habrán desnaturalizado las proteínas miofibrilares de una carne (Yu, Morton, Clerens, & Dyer, 2017).

En rigor, únicamente en aquellas cocciones en que se alcancen 65 °C en corazón de producto durante un tiempo igual o superior a 20 minutos ($T_{cp} \geq 65\text{ °C}$ durante $t \geq 20'$), la técnica de cocción *sous vide* representa un método de conservación, puesto que conlleva una pasteurización del alimento (Roca & Brugués, 2003). Por tanto, considerando como criterio de clasificación esta garantía de higienización (es decir, si el tratamiento térmico produce, o no, un grado de pasteurización del producto que permita su almacenamiento), la técnica *sous vide* presenta dos variantes:

- Cocción *indirecta* (que garantiza un determinado grado de pasteurización y, por tanto, la posibilidad de conservación y almacenaje del producto).
- Cocción *directa* o *inmediata* (donde los niveles de higienización térmica que se alcanzan sólo permiten un consumo inmediato del alimento) (Baldwin, 2012).

COCCIÓN INDIRECTA *SOUS VIDE*



ILUSTRACIÓN 6. Diagrama de flujo en cocción indirecta SV

Adaptación de: (Roca y Brugués, 2003)

El diagrama anterior sintetiza la secuenciación de fases en la modalidad de cocción indirecta. El primer paso (*preelaboración*) incluye, desde un posible lavado y porcionado del alimento, hasta la preparación, si procede, de algún líquido de gobierno o base de cocción (complementos que se añaden con distintos fines; puede tratarse de una salsa o aceite aromatizado, o un salteado de vegetales). En caso de incorporarse al alimento alguna base de cocción, ésta se habrá enfriado debidamente antes de pasar a la fase de *envasado*. Tanto la intensidad como la duración del tratamiento térmico se determinarán en función del tipo de alimento; resultando la *cocción*, en cualquier caso, de intensidad suficiente para que todos los puntos del alimento alcancen, como mínimo, la temperatura de seguridad ($T_{\text{seguridad}} = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$). Una vez se ha cocinado el producto, seguidamente, debe procederse a su *abatimiento térmico* (en el plazo y forma indicados). En este punto, el alimento se halla pasteurizado, y listo para su *conservación* en almacenamiento refrigerado ($T_{\text{stock}} = 3\text{-}5\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Ibarra, y otros, 2013); estando su vida útil determinada por la intensidad del tratamiento

térmico y la naturaleza del producto. Su *regeneración* (recuperación de temperatura de servicio) se llevará a cabo según el procedimiento más conveniente.

Sin embargo, la cocción *sous vide*, dado el rango de temperaturas que aplica, no proporciona ningún tipo de dorado superficial ni, en consecuencia, los sabores asociados a ese rustido o tostado. Para solventar este inconveniente, se emplea un procedimiento en dos etapas: antes o después del tratamiento *sous vide*, se combina con un método tradicional más intenso (plancha, salteado, gratinado...), que sí produce coloración en el alimento (Ruiz-Carrascal, Roldán, Refolio, Pérez-Palacios, & Antequera, 2018). Dicho desdoblamiento (usualmente, denominado *dobles cocción*), de aplicarse, se secuenciaría según se indica en la *Ilustración 5*.

COCCIÓN DIRECTA *SOUS VIDE*



ILUSTRACIÓN 7. Diagrama de flujo en cocción directa SV

Adaptación de: (Roca y Brugués, 2003)

Sin embargo, como se muestra en el diagrama de la modalidad de cocción directa, el *servicio* del alimento debe realizarse inmediatamente después de su tratamiento térmico. Esta necesaria contigüidad obedece, claro está, a un insuficiente procesamiento térmico del alimento ($T_{\text{cocción directa}} < 65\text{ }^{\circ}\text{C}$); es decir, a su deficiente garantía de inocuidad. Si bien,

existen algunas excepciones a esta regla: tal es el caso de la cocción de ciertos alimentos (foie de pato y oca, carnes rojas *saignants*...) en que una ligera reducción en la intensidad del tratamiento térmico ($60\text{ }^{\circ}\text{C} \leq T_{\text{cocción}} < 65\text{ }^{\circ}\text{C}$) representa una sustancial mejora en el resultado (organolépticamente); dichas cocciones suelen incluirse entre las de modalidad indirecta, acortando su vida útil a sólo unos días (Roca & Brugués, 2003).

En cocciones inmediatas, como antes ocurría con las indirectas, se pueden incorporar distintos líquidos de gobierno y otros complementos sólidos. De igual forma, también en este caso resulta aplicable la doble cocción (rustido de la superficie del alimento), antes o después del cocinado al vacío.

Como método de pasteurización, las temperaturas relativamente bajas que esta técnica emplea (en buen número de elaboraciones apenas se rebasa el umbral térmico de seguridad: $65\text{ }^{\circ}\text{C}$) deben conjugarse con tiempos de aplicación bastante prolongados (varias horas, o incluso días). Esta combinación baja temperatura y largo tiempo ofrece una serie de ventajas sobre el cocinado tradicional a alta temperatura: la capacidad de alcanzar un equilibrio térmico con el medio confiere al alimento una calidad uniforme y reduce el riesgo de sobrecocción, permitiendo además un mayor control sobre su punto de cocción (Domínguez-Hernández, Salaseviciene, & Ertbjerg, 2018). Lo cual facilita la reproducibilidad de las elaboraciones: una vez que se ha establecido una determinada fórmula (establecido sus ingredientes y cantidades, temperaturas y tiempos de cocción) y se han alcanzado unos niveles microbiológicos satisfactorios, puede estandarizarse la producción del alimento sin una variación apreciable de sus cualidades sensoriales (Schafheitle, 1990).

Sus ventajas, sin embargo, no se reducen a un mayor control sobre el proceso de cocción. Dado que existe una correlación entre el aumento de la temperatura de cocción

del producto y el incremento de su merma, la técnica *sous vide* supone una evidente mejora de la rentabilidad debido a su apreciable reducción de mermas por evaporación (Roldán, Antequera, Martín, Mayoral, & Ruiz, 2013). Esta relación temperatura-merma se halla, a su vez, vinculada con el grado de desnaturalización que sufren la proteínas; transformación que hace que éstas pierdan su capacidad para retener el agua constitutiva del alimento (Ayub & Ahmad, 2019). Esta retención del agua en el alimento durante la cocción también conlleva la retención de sus compuestos hidrosolubles y, en particular, sus componentes biológicamente activos o de algún valor nutricional (Llave, y otros, 2017). Asimismo, la ausencia de oxígeno y la baja intensidad térmica de este tipo de cocciones minimizan las modificaciones en ácidos grasos (Falowo, Muchenje, & Hugo, 2017). Constatándose que, en general, esta técnica comporta una mayor preservación de nutrientes termolábiles y compuestos aromáticos, con respecto a otras cocciones tradicionales (Díaz, Nieto, Garrido, & Bañón, 2008).

En consecuencia, los atributos sensoriales de los alimentos tratados con este tipo de cocción se ven menos afectados: éstos presentan mayor jugosidad e intensidad de sabor, mejor textura, mayor terniza y una menor alteración en su color (Rinaldi, y otros, 2014). Sucede, asimismo, que la atenuación de sabores y aromas durante la cocción *sous vide* resulta mucho menor que mediante técnicas convencionales; requiriéndose, por tanto, una adecuada moderación en el uso de ingredientes saborizantes y aromatizantes (sal, hierbas y especias) (Schafheitle, 1990).

En resumen, se podría decir que la cocción *sous vide* es una poderosa herramienta de la cocina actual. El control preciso de la temperatura permite un ajuste del punto de cocción, así como una reproducibilidad, mucho mayores; asegura mediante temperaturas más bajas una reducción de patógenos a niveles aceptables, y proporciona más opciones

de textura que los métodos de cocinado tradicionales. Por otra parte, el envasado al vacío mejora el flujo de calor, reduce el deterioro oxidativo y la transferencia de nutrientes al medio de cocción, elimina el riesgo de recontaminación, y prolonga la vida útil de los alimentos (Baldwin, 2012).

1.2.8.3. COCCIÓN *SOUS VIDE* BAJO EL UMBRAL TÉRMICO DE SEGURIDAD

Según las directrices europeas, la intensidad mínima del tratamiento térmico para la pasteurización de un alimento *sous vide* debe ser equivalente a alcanzar una temperatura de 70 °C durante 2 minutos en corazón de producto; esto es, en su punto de calentamiento más lento ($T_{cp} \geq 70 \text{ °C}$ durante $t \geq 2'$) (Stringer & Metris, 2017). En este sentido, las recomendaciones de las distintas agencias gubernamentales suelen utilizar el concepto de *procesamiento equivalente*: aquellas combinaciones de tiempo y temperatura que dan lugar a una reducción microbiana del mismo orden que un tratamiento dado. Así, en un rango de temperaturas bien definido (concretamente, entre 63 °C y 71 °C), se aceptan distintas relaciones tiempo-temperatura que provocan grados de inactivación bacteriana semejantes (Domínguez-Hernández, Salaseviciene, & Ertbjerg, 2018). Una combinación de tiempo y temperatura que sirve como referencia usualmente ($T_{cp} \geq 65 \text{ °C}$ durante $t \geq 20'$), se propuso en el epígrafe anterior.

Únicamente dentro de los parámetros indicados la técnica *sous vide* ofrece garantía de inocuidad. Conviene resaltar que determinadas cepas del bacilo anaerobio *Clostridium botulinum* son capaces de crecer y producir toxinas a temperaturas del orden de 3 °C (Graham, Mason, Maxwell, & Peck, 1997); representando, por tanto, el principal peligro microbiológico para este tipo de productos (envasados en condiciones de anaerobiosis y en almacenamiento refrigerado). Pero no es la única amenaza, existen otros peligros

potenciales: productores de toxinas termoestables como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, o psicotolerantes como *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* o *Yersinia enterocolitica*, también pueden encontrar un medio adecuado para su crecimiento en estos productos envasados (Vaudagna, y otros, 2002). Y, aunque la cocción *sous vide* se puede combinar, según se dijo, con tratamientos térmicos adicionales como salteado, plancha o fritura (doble cocción), para mejorar el color y la textura del alimento, por lo general, estas técnicas sólo producen una higienización superficial, ya que no poseen la suficiente magnitud para destruir los microorganismos ubicados internamente (Stringer & Metris, 2017).

Sin embargo, incluso los tratamientos con temperaturas de subpasteurización (por debajo del rango que recomienda la autoridad alimentaria: 63-71 °C) pueden producir una drástica reducción de la población microbiana (combinaciones temperatura-tiempo como: $T_{cp} = 60\text{ °C}$; $t = 6$ horas) (Roldán, Antequera, Martín, Mayoral, & Ruiz, 2013). Especialmente, las bacterias mesófilas pueden ser inactivadas mediante temperaturas bastante suaves, siempre que su aplicación se prolongue en el tiempo lo suficiente (Domínguez-Hernández, Salaseviciene, & Ertbjerg, 2018). Es decir, hay posibilidad de alcanzar una higienización aceptable del alimento incluso por debajo del umbral térmico de seguridad (dependiendo en gran medida de la cuantía del decremento en la temperatura, del tiempo de aplicación y de la carga microbiana inicial del alimento).

Sin embargo, la seguridad de un alimento no se puede apoyar en la suficiencia de una probable higiene (mayor o menor), debe estar basada en la total garantía de su inocuidad; de ahí que ningún tratamiento a temperaturas de subpasteurización ($T_{cp} < 63\text{ °C}$) permita, en rigor, la posterior conservación del producto.

La modalidad *sous vide* en cocción directa aplica mayoritariamente temperaturas que se hallan por debajo del umbral térmico de seguridad (muy por debajo, en determinados tipos de elaboraciones). Según se ha referido, la utilización de materia prima muy fresca y una correcta manipulación, junto a temperaturas próximas a ese umbral ($T_{cp} \approx 55-63\text{ }^{\circ}\text{C}$), proporcionan productos *bastante seguros* para su consumo inmediato, que mantienen una gran calidad organoléptica.

No obstante, las tendencias gastronómicas van más allá; se orientan decididamente hacia una maximización de la calidad sensorial del alimento, hacia una concepción en que se prodiga un ferviente respeto a las cualidades genuinas del producto, donde la más ligera sobrecocción representa un injustificable menoscabo de su palatabilidad. Una atenuación térmica que, particularmente en géneros con textura delicada (como pescados y mariscos), implica cocciones de intensidad calórica apenas superior a la de un proceso de atemperado, o incluso de entibiado ($T_{cp} \approx 40-55\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Véanse los tiempos y temperaturas que proponen prestigiosos chefs para este tipo de elaboraciones (Roca & Brugués, 2003):

	BACALAO	MERLUZA	SALMÓN	RAPE	RAYA	LUBINA	CABALLA
TEMPERATURA (CORAZÓN DE PRODUCTO)	38-40 °C	50 °C	38 °C	48 °C	50 °C	45 °C	43 °C
TIEMPO DE TRATAMIENTO	12'	15'	13'	12'	10'	15'	8'

TABLA 2. Relación tiempo-temperatura en cocción directa SV de pescados

Producción propia en base a contenidos de: (Roca y Brugués, 2003)

En este rango térmico, el grado de higienización del alimento sale del dominio de la garantía o la certidumbre para adentrarse en un escenario de múltiples probabilidades con difícil pronóstico. Dado que la capacidad germicida del tratamiento térmico es bastante limitada (y decrece según se atenúa la temperatura), toda posibilidad de mejora de la calidad microbiológica queda limitada a emplear materias primas de la máxima frescura y

extremar las medidas de higiene en su manipulación. Sin embargo, el carácter altamente perecedero de pescados y mariscos complica aún más esta situación, ya que la cualidad *máxima frescura* resulta un atributo muy efímero. Y, en cuanto al pescado se refiere, por muy fresco que éste sea, siempre poseerá una alta carga microbiana en agallas, escamas y vísceras, lo que exigirá que su preelaboración (eviscerado, desescamado, despiece...) deba realizarse de forma temprana y muy cuidadosa, si se quiere minimizar la transferencia de microorganismos a la musculatura del animal. Por tanto, la calidad microbiológica de este tipo de elaboraciones, en conjunto, ha de presentar inevitablemente una gran disparidad, ya que su higienización se apoya fuertemente en numerosos factores preventivos, sujetos a una importante variabilidad. La evaluación de su nivel de seguridad, en consecuencia, debe efectuarse sobre una determinada práctica, específicamente, nunca sobre la vasta heterogeneidad de su casuística.

En conclusión, la cocción *sous vide* que se realiza bajo el umbral térmico de seguridad puede ofrecer una gama de elaboraciones de la máxima calidad nutricional y organoléptica; sin embargo, algunas de estas elaboraciones, por aspectos de su propia definición técnica (reducción extrema del procesamiento térmico), por características de su materia prima (necesidad de una preelaboración pronta y cabal), por condicionantes de índole mercantil (carácter altamente perecedero, o coste económico elevado), o como efecto resultante de todas las causas anteriores, ciertas elaboraciones, se decía, podrían mostrar algún tipo de deficiencia en su calidad microbiológica.

Un escenario donde, presumiblemente, la inocuidad de los alimentos no resulta una completa garantía; que alberga, por tanto, una incertidumbre intrínseca que conduce a la formulación de interrogantes:

¿Hasta qué punto resultan inseguras estas elaboraciones?



¿Podría garantizarse su inocuidad sin alterar su calidad sensorial?

¿Sería factible conjugar su calidad gastronómica y su conservación refrigerada?

Una serie de cuestiones a las que se buscará respuesta; y que van a representar uno de los ejes principales del presente trabajo.

1.3. TRATAMIENTOS VACUOMÉTRICOS E HIPERBÁRICOS

La presión que ejerce la atmósfera terrestre a nivel del mar es ligeramente superior a 0,1 MPa (con exactitud, 101325 Pa). Dicha presión supone el punto de referencia para la clasificación de los tratamientos presurizados (negativos o positivos).

Los tratamientos presurizados que se exponen en esta sección se llevan a cabo a una presión distinta a la atmosférica. En base a ello se distinguirán entre:

- Tratamientos vacuométricos ($P < 0,1$ MPa). Aquellos que se realizan a una presión inferior a la atmosférica. También se conocen como tratamientos *a presión subatmosférica*, *de presión negativa* o *a presión de vacío*.

- Tratamientos hiperbáricos ($P > 0,1$ MPa). Aquellos que aplican presiones superiores a la atmosférica. En esta categoría, el rango de sobrepresiones que se pueden emplear en los tratamientos resulta extraordinariamente amplio.

Se presentan en primer término dos técnicas a presión de vacío que combinan otros procedimientos, como temperatura (positiva y negativa) o deshidratación. Antes de pasar a metodologías que emplean distintos grados de sobrepresión, entre las que se encuentran los tratamientos con altas presiones hidrostáticas, o HHP (de su acrónimo anglosajón *High Hydrostatic Pressure*), las cuales constituyen un capítulo fundamental en este trabajo.

1.3.1. TÉCNICA *COOK VIDE*

Este método supone una adaptación de las cocciones tradicionales; realizándose el procesamiento térmico en condiciones de presión subatmosférica. En esencia, la cocción se produce en un recipiente donde se ha practicado un alto grado de vacío (del orden de

un 80%, como máximo); por lo que la presión residual estaría en torno a 20 kPa (Mans & Castells, 2011) (sería, por así decirlo, como cocinar en una cordillera imaginaria, a casi 11800 metros de altitud).

Según se explicó en la presentación de la técnica *sous vide*, un líquido acuoso entra en estado de ebullición cuando su presión de vapor se iguala con la presión del medio. En consecuencia, cuanto menor sea la presión del medio, antes se alcanzará la temperatura de ebullición (a una presión de unos 20 kPa, el agua hierve alrededor de los 60 °C) (García-Segovia, Andrés-Bello, & Martínez-Monzó, 2008).

Esta variación de las condiciones de presión durante el procesado de los alimentos ofrece, en términos generales, resultados de una gran calidad gastronómica, a la vez que posibilita la diversificación de texturas y sabores y la intensificación de aromas (Gómez, y otros, 2019). Las bajas temperaturas de la cocción (asociadas a la presión negativa), y una atmósfera residual con niveles de oxígeno muy bajos, hacen que la técnica *cook vide* (CV) ofrezca una preservación nutricional de los alimentos de orden comparable al de la cocción *sous vide*. Asimismo, en derivación de su laxidad térmica, el método CV ocasiona un menor deterioro de las características sensoriales del producto que las técnicas tradicionales de cocinado, así como una producción mucho menor de acrilamida (Iborra-Bernad, Tárrega, García-Segovia, & Martínez-Monzó, 2014).

El dispositivo donde se realiza la cocción CV se denomina *gastrovac*. Esencialmente, está compuesto por una marmita (con tapa hermética de metacrilato), y por un cuerpo principal (de alimentación eléctrica) que dispone de una bomba de vacío y de una placa calefactora (fuente de calor con control digital) (García-Segovia, Andrés-Bello, & Martínez-Monzó, 2008). La marmita se halla conectada a la bomba de vacío; y mediante una sonda situada en su interior se regula la temperatura; dispone también de un cestillo elevable

para gobernar la inmersión del alimento en el líquido (sin discontinuidad en la presión de vacío) (Gómez, y otros, 2019).

El gastrovac no sólo permite cocciones en líquidos acuosos o mixtos; también admite técnicas en medios grasos, como la fritura; en este caso, la temperatura del aceite se sitúa en torno a los 90 °C (mientras que una fritura tradicional que se realice a fuego moderado puede alcanzar unos 160-170 °C) (Mans & Castells, 2011). A diferencia de la cocción *sous vide*, la técnica *cook vide* posibilita un contacto físico entre el alimento y el líquido en ebullición, lo que incrementa el coeficiente de transmisión calórica sobre su superficie (Iborra-Bernad, Tárrega, García-Segovia, & Martínez-Monzó, 2014).

Un interesante recurso que ofrece esta técnica es la denominada *impregnación*. Un fenómeno que se evidencia con mayor intensidad en productos con textura porosa; y que, en esencia, supone una succión que el alimento ejerce sobre el medio circundante; un efecto de absorción que se materializa en el instante en que cesa la presión de vacío, y se restaura la presión atmosférica; momento en que el alimento absorbe la fase líquido-vapor que lo circunda, impregnándose de sabores, colores y aromas. Fenómeno que también se conoce con el nombre de *efecto esponja* (Gómez, y otros, 2019).

1.3.2. LIOFILIZACIÓN

Si en condiciones de alto vacío (de un grado superior al 99,99%; es decir, a presiones inferiores a 10^{-4} atmósferas) se combinan adecuadamente métodos de conservación tan comunes como la congelación y la desecación, se pueden obtener resultados asombrosos: productos secos que se mantienen estructural y composicionalmente intactos (salvo en su grado de humedad, claro está), y que permiten su reconstitución mediante remojo sin una considerable alteración de su textura original (Ramírez Navas, 2006).

La liofilización, también denominada *criodeshidratación*, supone la sublimación del agua del alimento (es decir, su vaporización desde fase sólida). Para que el hielo sublime a gas sin fundir antes, se precisan unas determinadas condiciones de presión y temperatura.

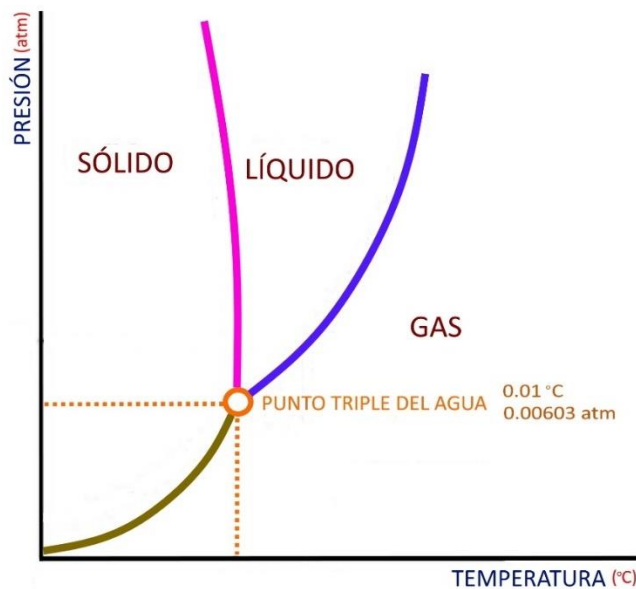


ILUSTRACIÓN 8. Diagrama P-T del agua

Adaptación de: (Nireesha, y otros, 2013)

Concretamente, tanto la presión como la temperatura habrán de ser inferiores a las del punto triple del agua ($P_{\text{sublimación}} < 611 \text{ Pa}$; $T_{\text{sublimación}} < 0,01 \text{ °C}$).

El proceso de liofilización abarca tres etapas bien diferenciadas; a saber: congelación, sublimación y desorción (éstas dos últimas, también denominadas *desección primaria* y *desección secundaria*) (Siccha Macassi & Lock de Ugaz, 1995).

Como aproximación, un alimento se podría considerar una disolución acuosa; en la que se involucran sustancias muy diversas: proteínas, alcoholes, carbohidratos, ácidos... Provocando las interacciones soluto-disolvente un descenso del punto de solidificación de la mezcla (con respecto al agua pura). Por tanto, en el proceso de congelación, en primer lugar, cristalizará la fracción de agua libre del alimento, y según descienda la temperatura solidificarán las mezclas eutécticas de los diferentes solutos (Orrego Alzate, 2008). Por

tanto, la congelación debe resultar suficientemente enérgica para minimizar los posibles efectos que la heterogeneidad de las velocidades de solidificación pueda provocar sobre la estructura del alimento (intersticios y discontinuidades) (Ramírez Navas, 2006).

Esencialmente, el liofilizador es una cabina hermética donde el producto congelado (a una temperatura entre -20 y -45 °C) se somete a una presión de vacío que, normalmente, alcanza entre 10^{-4} y 10^{-5} atmósferas (esto es, presiones entre 2 y 3 órdenes de magnitud por debajo de las que practica el vacío de la cocción SV). Para que el hielo del alimento sublime (desección primaria), se eleva su temperatura en lo posible dentro de los límites que aseguran la integridad de su estado sólido. La cámara de liofilización está dotada de un colector o condensador (también llamado *trampa fría*) que se mantiene a una temperatura muy baja (entre -50 y -80 °C); dispositivo que, en consecuencia, genera en su inmediación un significativo descenso de la presión de vapor, originando un gradiente de presiones que induce a las moléculas de agua a escapar del alimento y dirigirse hacia el colector, donde son atrapadas por condensación (Nireesha, y otros, 2013). En esta fase de secado primario, se extrae del alimento su agua no ligada (que exige menor energía). Dependiendo del tipo de alimento de que se trate, ésta puede suponer de un 75 a un 90 % de su agua constitutiva (Orrego Alzate, 2008).

El objetivo de la desecación secundaria (fase de desorción) es extraer el agua ligada; reduciendo así la humedad del alimento hasta niveles que posibiliten su almacenamiento no refrigerado (por debajo del 5%), y le proporcionen una alta estabilidad microbiológica (Ramírez Navas, 2006). Para ello, se maximiza el vacío de la cámara (típicamente, hasta presiones del orden de 10^{-5} atmósferas), y se eleva la temperatura del alimento (hasta los 20-30 °C). Esta etapa, si bien requiere mayor energía, precisa un menor cuidado, ya que el riesgo de la fusión del hielo ha desaparecido (Nireesha, y otros, 2013).

La liofilización es una técnica costosa por el tiempo y tecnología que requiere. Sin embargo, proporciona alimentos deshidratados de la más alta calidad: sin menoscabo de sabores y aromas (los cuales se concentran e intensifican), de estructura reconstituible, y con una preservación nutricional irreproachable (Ramírez Navas, 2006).

1.3.3. ULTRASONIDOS Y MANOSONICACIÓN

En el espectro sonoro, las frecuencias de los ultrasonidos de alta potencia, también conocidos como HPU (acrónimo anglosajón de *High Power Ultrasound*), comenzarían con los primeros agudos no audibles por el oído humano. En concreto, su rango de frecuencias se extiende de 20 a 100 kHz. En la industria alimentaria este tipo de ultrasonidos recibe numerosas aplicaciones; su capacidad para la inactivación microbiana acaso sea una de las más destacables (Piyasena, Mohareb, & McKellar, 2003).

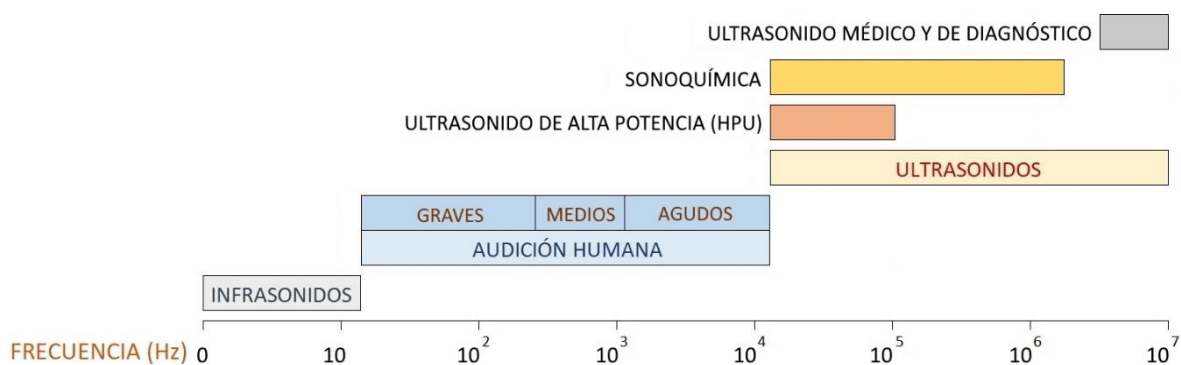


ILUSTRACIÓN 9. Espectro sonoro

Adaptación de: (Jambrak & Herceg, 2014)

El sonido es una perturbación que se transmite en un medio elástico mediante fluctuaciones locales de presión. Se trata, por tanto, de una onda mecánica que somete a los puntos del fluido en que se propaga a un efecto sucesivo de compresión y rarefacción (O'Brien, 2007). Es decir, si el fluido soporta una presión hidrostática P_h , y el valor absoluto de la perturbación se traduce en un incremento de presión Δp , la presión total aplicada

sobre cada uno de sus puntos oscilará en el tiempo entre un valor de máxima compresión ($P_h + \Delta p$) y un valor de máxima presión subhidrostática o de mayor rarefacción ($P_h - \Delta p$). Si Δp posee suficiente magnitud (esto es, por encima de una determinada amplitud de onda), durante la fase de rarefacción se formarán microburbujas de gas en el seno del fluido debido al significativo descenso de presión; en sucesivos ciclos compresión/rarefacción, tales burbujas (o cavidades) incrementarán su tamaño. Dicho fenómeno recibe el nombre de *cavitación* (James & James, 2014). Estas microburbujas (con radio de orden del μm) pueden aumentar su radio hasta 30 veces entre los extremos de la varianza de presión; sin embargo, por encima de un volumen crítico (que dependerá de Δp) pierden su estabilidad e implosionan violentamente en la fase compresiva del ciclo. Como consecuencia de cada uno de estos micro-colapsos se generan ondas de choque a pequeña escala, de una presión extraordinariamente alta (70-100 MPa). Y, si bien la energía de una sola implosión resulta insignificante a nivel macroscópico, el efecto sumativo de millones de burbujas colapsando cada segundo sí supone un fenómeno de consideración (Kentish & Ashokkumar, 2011).

Especialmente turbulento resulta el efecto de la cavitación en las discontinuidades del fluido (esto es, en la proximidad de interfases y superficies), donde el colapso de las burbujas se produce asimétricamente, apareciendo cizalladuras y microeyecciones de alta presión que ocasionan perforaciones, erosión y ruptura de cadenas poliméricas en la pared celular de los microorganismos. Efectos mecánicos que se acentúan con la intensidad del ultrasonido, llegando a producir graves daños estructurales y lisis celular (Dolas, Saravanan, & Pal Kaur, 2019). Asimismo, las ondas de choque también originan fuertes incrementos térmicos muy localizados, y dan lugar a la formación de sustancias altamente reactivas (radicales hidroxilo e hidroperoxilo, peróxido de hidrógeno...), que potencian la actividad bactericida del tratamiento con HPU (Inguglia, Tiwari, Kerry, & Burgess, 2018).

Son numerosos los factores que influyen en la capacidad de inactivación microbiana de los ultrasonidos; según su naturaleza, se podrían clasificar en tres grupos (Gao, Lewis, & Hemar, 2016):

- Parámetros que afectan al umbral de cavitación.

Una mayor amplitud de onda (magnitud proporcional a la intensidad) reporta, como se ha indicado, un incremento en la efectividad del tratamiento. En cambio, un aumento de la frecuencia lo hace menos eficaz, ya que un acortamiento del ciclo de rarefacción y compresión limita la formación de burbujas. Sin embargo, un aumento de la temperatura o de la presión hidrostática resulta perjudicial para los microorganismos.

- Propiedades del medio de propagación.

Se observa que una mayor volumetría del medio, un incremento de su viscosidad o en su pH, conllevan una atenuación de la actividad bactericida de los ultrasonidos.

- Características microbiológicas.

Diversas particularidades de los microorganismos afectan desigualmente a la eficacia de los tratamientos HPU. Se constata que las altas densidades de población (es decir, cargas microbianas elevadas) reportan menores tasas de inactivación; como también que dicha tasa se incrementa en la fase estacionaria del crecimiento microbiano. En lo referente a su morfología, las células más grandes (con mayor superficie) resultan más vulnerables a este tipo de tratamientos; así, en general, las formas cocoides muestran mayor resistencia que las bacilares. Por su parte, las paredes celulares más delgadas (bacterias gramnegativas) se ven afectadas por efectos cavitacionales menos intensos.

Principalmente, el tratamiento con HPU se aplica, bien mediante baño, lo que supone que el alimento se sumerge en un fluido que propaga los ultrasonidos, o bien por sonda, la cual se sumerge en el alimento, produciendo una vibración de frecuencia ultrasónica. El

equipo, esencialmente, consta de un generador que produce una señal de corriente alterna con la frecuencia adecuada, que es convertida en vibración mecánica por un transductor (ya sea piezoeléctrico, magnetoestrictivo, o de flujo), y entregada finalmente al reactor de ultrasonido (Dolas, Saravanan, & Pal Kaur, 2019).

Cuando el tratamiento HPU posee suficiente intensidad, y su aplicación se realiza bajo unas condiciones de moderado incremento en la presión hidrostática del fluido, los efectos cavitacionales se potencian considerablemente, produciéndose un drástico aumento de la capacidad antimicrobiana del tratamiento. Técnica que se denomina *manosonicación* (MS) (Martínez, Delso, Aguilar, Álvarez, & Raso, 2020). Si bien el aumento de presión hidrostática en el fluido supone, en principio, una mayor viscosidad y cohesión intramolecular, así como una disminución de su presión de vapor, circunstancias que dificultan la cavitación, ésta se garantiza con un adecuado incremento en la amplitud del ultrasonido; constatándose en tales condiciones que la cantidad de energía que genera la cavitación aumenta de forma exponencial con la presión hidrostática (hasta cierto valor umbral). Lo que se traduce en una multiplicación de sus efectos mecánicos y bioquímicos; esto es, de su letabilidad. Este umbral de presión se sitúa, aproximadamente, en torno a los 300-400 kPa; por encima de los cuales, deja de crecer la energía asociada a los efectos cavitacionales (Condón, Mañas, & Cebrián, 2011).

No obstante, debido a la producción de diferentes compuestos altamente reactivos (OH, OOH, O₃, O, O₂⁻, H₂O₂...), tanto en los tratamientos con ultrasonidos de alta intensidad (HPU) como en los de manosonicación (MS), se ha de buscar cierto equilibrio entre el grado de higienización del producto y la preservación de su calidad organoléptica y nutricional; algo que hace imprescindible una óptima parametrización del proceso (James & James, 2014).

1.3.4. ALTAS PRESIONES DINÁMICAS

Los tratamientos con altas presiones dinámicas (en inglés *High Dynamic Pressure* o HDP), si bien producen distintos efectos en los alimentos, tienen como principal finalidad la homogeneización. De ahí que, en función del rango de presiones aplicadas, también se denominen *altas presiones de homogeneización* (*High Pressure Homogenization* o HPH) si el incremento de presión supone entre 50 y 200 MPa, y *presiones de homogeneización ultra-altas* (*Ultra High Pressure Homogenization* o UHPH) cuando intervienen presiones de 200 a 400 MPa (Guamis López & López Pedemonte, 2010).

No obstante, entre los resultados que producen este tipo de tratamientos también se halla un robusto efecto higienizante. Las bacterias grampositivas, debido a la morfología de su pared celular, muestran mayor resistencia que las gramnegativas (Wuytack, Diels, & Michiels, 2002). Mientras que hongos y levaduras, con una pared más gruesa y a la vez de mayor complejidad, presentan una resistencia intermedia entre ambas clases de bacterias. La inactivación de esporas requiere, sin embargo, la aplicación de presiones ultra-altas en combinación con otras barreras adicionales (Patrignani, Rossi, Vannini, & Lanciotti, 2021).

Esencialmente, el procesado mediante altas presiones dinámicas supone el bombeo de un alimento fluido a través de orificios de sección muy reducida (una amplitud típica de la válvula del homogeneizador es del orden de una décima de milímetro); lo que ocasiona la dispersión de sus componentes estructurales (presiones del orden de 400 MPa dan lugar a partículas de calibre nanométrico) y, por tanto, un alto grado de homogenización del producto (Mayta-Hancco, Trujillo, & Juan, 2020). Proceso que, consecuentemente, genera un régimen turbulento: el fluido se ve forzado a salvar súbitamente reducciones de sección muy abruptas (de entre 2 y 3 órdenes de magnitud); alcanzando a su paso por la válvula

velocidades que oscilan entre los 200 y 300 ms⁻¹ (Osorio-Arias, Vega-Castro, & Martínez-Monteagudo, 2021). Un flujo vortiginoso que origina descensos de presión localizados; los cuales inducirán un efecto de cavitación (presentado en el epígrafe 1.3.3. *Ultrasonidos y manosonicación*).

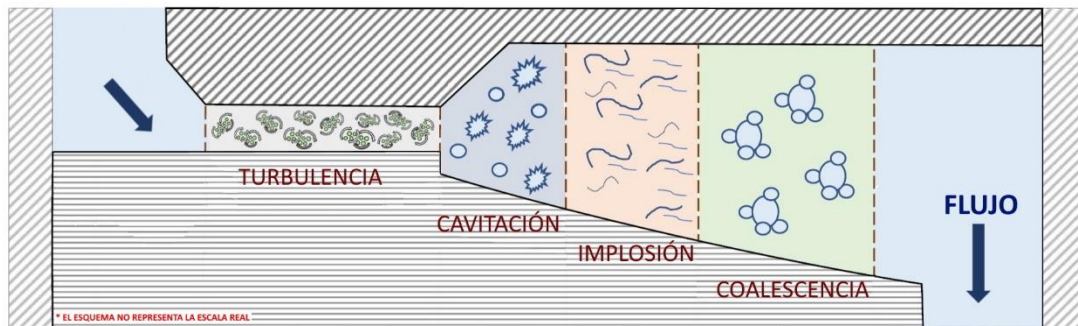


ILUSTRACIÓN 10. Fenomenología turbulenta en flujos HDP

Adaptación de: (Osorio-Arias, Vega-Castro, & Martínez-Monteagudo, 2021)

En rigor, se distinguen dos tipos de cavitación: la acústica y la hidrodinámica; según el tipo de fenómeno que las ocasione. Ambas están relacionadas con una variación local de presión, que produce la rarefacción y compresión de microburbujas en el seno del fluido. En la cavitación acústica (caso de los ultrasonidos) debido a la propagación ondulatoria de una perturbación; mientras que en el caso de la cavitación hidrodinámica tiene lugar por el flujo turbulento de un líquido (Ferrari, 2017). Si bien en los tratamientos de altas presiones dinámicas se producen contribuciones de ambos tipos de cavitación, mayoritariamente es de naturaleza hidrodinámica.

Al igual que ocurría en los tratamientos ultrasónicos, el mecanismo de inactivación microbiana deriva de la implosión de estas microburbujas; evento que lleva aparejado la formación de ondas de choque e intensos gradientes locales de presión y temperatura, que ocasionan la disrupción de la membrana celular (Sharma, y otros, 2008). Según se indicó en el epígrafe precedente, el violento colapso de estas burbujas también genera una serie

de sustancias de alta reactividad (OH, OOH, O₃, O, O₂⁻, H₂O₂...), que podrían contribuir tanto al deterioro de la estructura celular como a la alteración de los componentes nutricionales del alimento (Osorio-Arias, Vega-Castro, & Martínez-Monteagudo, 2021).

La eficacia germicida del tratamiento HDP, en general, se verá afectada por diversos factores; como pueden ser: morfología microbiana (estructura de la pared celular, tamaño y forma...), presión aplicada, temperatura, número de circulaciones, densidad microbiana inicial, viscosidad del fluido o composición del sustrato (Guamis López & López Pedemonte, 2010).

Uno de los principales inconvenientes de la técnica HDP es su limitada aplicabilidad: únicamente se pueden tratar líquidos de una viscosidad reducida (leche, licuados de frutas, ovoproductos...). Tipo de tratamiento que, sin embargo, posibilita un procesado continuo y posterior envasado aséptico (Morales-Ramírez, 2010).

1.3.5. ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Tras más de una veintena de técnicas expuestas, es probable que se haya incurrido en cierta sobreabundancia de acrónimos y siglas; algo inevitable, por otra parte. Algo que, sin embargo, podría confundir más que aclarar.

Precisamente, el propósito de esta digresión no es otro que aseverar la sinonimia de las dos abreviaciones que se pueden encontrar en la literatura en referencia a este tipo de tecnología. Ya que, si bien, actualmente se ha hecho extensivo el uso del acrónimo HPP (*High Pressure Processing*, o procesado con altas presiones), también se encuentra muy a menudo la abreviatura HHP (*High Hydrostatic Pressure*, o altas presiones hidrostáticas): ambos términos implican tratamientos de idéntica naturaleza. En este trabajo se utilizará tanto HHP como HPP, indistintamente.

Sin mayor dilación, se procede a describir esta técnica hiperbárica, cuya aplicación sinérgica con la cocción *sous vide* será objeto de estudio experimental.

1.3.5.1. DESCRIPCIÓN Y FUNDAMENTOS DEL TRATAMIENTO HHP

El procesado de alimentos mediante HHP, generalmente, aplica presiones en el rango 100-800 MPa, a distintas temperaturas, con el propósito de inactivar formas vegetativas de bacterias patógenas y alterantes, mohos, levaduras y virus, de modo que el producto resultante sea microbiológicamente seguro (Balasubramaniam, Martínez-Monteagudo, & Gupta, 2015). No obstante, la parametrización más habitual en este tipo de tratamientos emplea presiones entre 400 y 600 MPa, temperaturas de procesado por debajo de 40 °C, y tiempos de retención de unos pocos minutos (Valdez-Fragoso, Mújica-Paz, Welte-Chanes, & Torres, 2011). Aunque se emplean presiones de 1 GPa (e incluso más elevadas), su límite superior en aplicaciones comerciales es de 600 MPa (Heinz & Buckow, 2009).

Un equipo de HPP es un sistema de energía hidráulica. Básicamente, dicho procesado supone la compresión hidrostática de un alimento (envasado previamente al vacío) que se halla sumergido en un fluido, a través del cual se transfieren a la matriz alimentaria los efectos de la presión. Para alcanzar el rango de presiones necesario se requiere la acción combinada de una bomba y un intensificador de presión: la bomba transforma energía mecánica en energía hidráulica, mientras que el intensificador, mediante un sistema de pistones de sección decreciente, multiplica la presión de entrada. Un fluido de reducida compresibilidad se encarga de transmitir la potencia a lo largo del circuito: generalmente, agua (15% de compresión a 600 MPa); si bien, también se utilizan ésteres sintéticos, aceites vegetales o poliglicoles. Un conjunto de válvulas separa las líneas de baja presión de la cámara de tratamiento, donde el fluido transmite uniformemente al alimento el efecto

constrictor de la presión. Cámara ésta que habrá de reunir unas características específicas (forma de la cavidad y grosor de la pared), que le permitan soportar enormes presiones operativas (Martínez-Monteagudo & Rathnakumar, 2021).

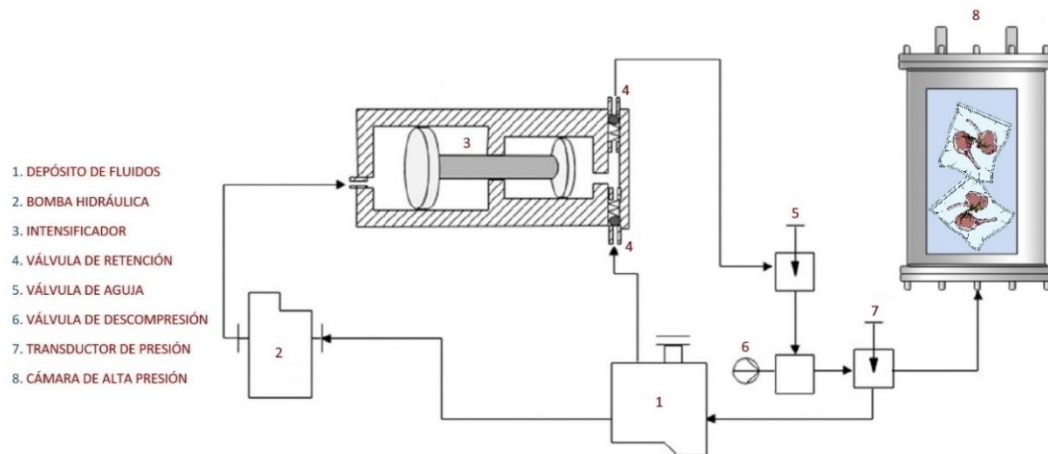


ILUSTRACIÓN 11. Diagrama de componentes de un equipo HPP

Adaptación de: (Martínez-Monteagudo & Rathnakumar, 2021)

Un proceso cuya fisicoquímica esencial se sustenta en dos principios de gobierno:

- Principio de Pascal o condición hidrostática.

La presión ejercida sobre un fluido de escasa compresibilidad se transmite de forma instantánea, homogénea e isotrópica, a todos los puntos de éste. Lo que implica que la presión afecta de forma simultánea y uniforme a todo el alimento, independientemente de cuál sea su volumen o su geometría (Martínez-Monteagudo & Balasubramaniam, 2016). En esta situación de equilibrio isostático, desde cualquier dirección del espacio se ejerce una fuerza de igual intensidad sobre cada punto del alimento, de modo que no se generan estrés tangencial y, por lo tanto, la estructura macroscópica del alimento no sufre ningún tipo de deformación lateral.

- Principio de Le Châtelier.

Ante cualquier perturbación externa, todo sistema en estado de equilibrio evoluciona hacia un nuevo estado que contrarresta parcialmente la perturbación original. En este caso

la presión representaría la perturbación; y este principio determina que el incremento de la presión facilitará cualquier tipo de fenómeno (ya sea reconfiguración molecular, reacción química, o cambio de fase) que lleve asociado una disminución de su variable intensiva conjugada, el volumen; mientras que serán inhibidos aquellos que requieran un aumento de volumen (Téllez-Luis, Ramírez, Pérez-Lamela, Vázquez, & Simal-Gándara, 2001). Por tanto, la presión coadyuvará fenómenos como la solidificación de lípidos, la fusión del hielo o la formación de enlaces químicos (esto es, las reacciones que los originan). En rigor, la presión inducirá cierto grado de reestructuración molecular, debido a la contracción del espacio interatómico y la redistribución de interacciones entre partículas: no afectará a los enlaces covalentes (ya que entrañan una enorme compactación), por lo que la mayor parte de los componentes del alimento no se verán alterados (Sanz Martínez, 2019); sin embargo, desestabilizará otros enlaces más débiles (de tipo iónico e hidrofóbico), y favorecerá la formación de enlaces de hidrógeno (Bajovic, Bolumar, & Heinz, 2012).

Por otra parte, dado que en todo sistema termodinámico las variables temperatura, presión y volumen se hallan inseparablemente relacionadas, el aumento de la presión durante el tratamiento HHP lleva asociado un calor de compresión (o calor adiabático), que se traduce en un incremento de temperatura. En alimentos con un alto contenido en agua, dicho incremento térmico es del orden de unos 3 °C cada 100 MPa de sobrepresión; en el caso de matrices ricas en grasa se eleva a 8-9 °C cada 100 MPa (Karwe, Maldonado, & Mahadevan, 2014).

1.3.5.2. HIGIENIZACIÓN MEDIANTE PROCESADO HHP

La sensibilidad que muestran los microorganismos a la presión resulta muy variable: puede variar según tipo de organismo, morfología, fase de crecimiento o género (incluso

entre cepas de la misma especie se llegan a producir diferencias significativas); asimismo, las características de la matriz alimentaria (composición, pH o a_w) pueden modificar de una manera sustancial la respuesta del microorganismo a las altas presiones (Daryaei, Yousef, & Balasubramaniam, 2016).



ILUSTRACIÓN 12. Pared celular: diferencias estructurales

Adaptación de: (Gao, Lewis, & Hemar, 2016)

Se constata que las formas vegetativas bacterianas presentes en alimentos sufren drásticas reducciones de viabilidad tras los tratamientos HPP con presiones entre los 200 y 600 MPa. En general, dado el mayor grosor y rigidez de su pared celular, las bacterias grampositivas muestran más resistencia a la presurización que las gramnegativas (Rendueles, y otros, 2011); mientras que las formas bacilares resultan más sensibles a la presión que las de morfología cocoide. Por otra parte, comparativamente, los microorganismos procariotas son más resistentes que los eucariotas (levaduras y mohos); los cuales sólo precisan tratamientos de moderada intensidad (300-400 MPa) para su inactivación (Sehrawat, Kaur, Nema, Tewari, & Kumar, 2020).

Sin embargo, la inactivación de esporas bacterianas no se llega a alcanzar mediante presurización únicamente; sino que exige la conjunción sinérgica de temperatura y presión (Patterson & Linton, 2010). Los denominados *tratamientos térmicos asistidos por presión*

o PATP (del inglés *Pressure-Assisted Thermal Processing*), combinan las altas presiones con temperaturas que van de la pasteurización a la esterilización (70-120 °C) (Valdez-Fragoso, Mújica-Paz, Welte-Chanes, & Torres, 2011). Según su intensidad, este tratamiento puede suponer la esterilización comercial del producto y, por tanto, permitir su conservación no refrigerada; un proceso que también se denomina *esterilización térmica de alta presión* o HPTS (del inglés *High Pressure Thermal Sterilization*) (Sevenich, Rauh, & Knorr, 2016).

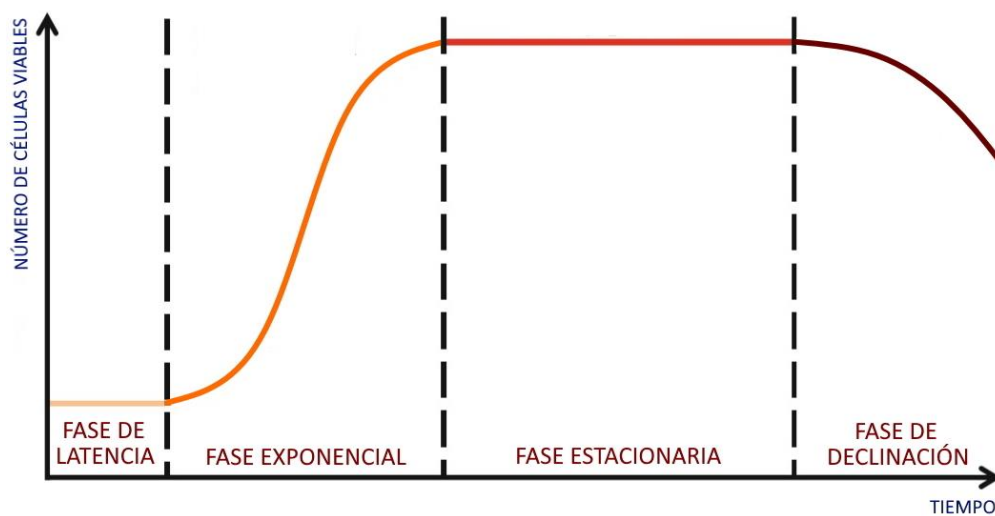


ILUSTRACIÓN 13. Fases de crecimiento microbiano en un sistema cerrado

Adaptación de: (Gao, Lewis, & Hemar, 2016)

Se evidencia, por otra parte, que la presión afecta más severamente a las bacterias que se hallan en su fase exponencial de crecimiento; mientras que cuando éstas alcanzan la fase estacionaria, la mayor robustez de su membrana citoplasmática aumenta su grado de barotolerancia (Patterson & Linton, 2010).

La matriz alimentaria, en general, supone para los microorganismos una protección frente a las altas presiones; en distinta medida, lípidos, proteínas e hidratos de carbono apantallan los efectos de la presurización. Asimismo, cuanto menor es la actividad de agua del alimento más se potencia este blindaje; por tanto, la adición de solutos, como azúcar o sal, puede disminuir significativamente la tasa de inactivación de microorganismos. Ello se

debe a la contracción celular de carácter osmótico que originan los solutos, lo que conlleva un engrosamiento de la membrana y una reducción de su permeabilidad; mecanismos que, conjuntamente, logran atenuar la letalidad de la presión (Sehrawat, Kaur, Nema, Tewari, & Kumar, 2020). Sin embargo, la acidez del sustrato alimentario incrementa sensiblemente la eficacia del tratamiento hiperbárico: un pH bajo no sólo mejora la tasa de inactivación, sino que también disminuye la capacidad de recuperación de las células con lesiones subletales durante un posterior almacenamiento refrigerado (Patterson & Linton, 2010).

En cuanto a la influencia de los distintos parámetros del tratamiento (temperatura, presión y tiempo de tratamiento), se comprueba que tanto temperaturas muy bajas como muy altas comportan una mejora en la tasa de inactivación microbiana de la presurización (Yordanov & Angelova, 2010); no obstante, como es lógico, el factor fundamental no es otro que el nivel de presión, cuya magnitud resulta directamente proporcional al poder higienizante del tratamiento. El tiempo de tratamiento, por su parte, más allá de un umbral (relativamente corto) no implica una mejora apreciable (Hnosko, San Martín-González, & Clark, 2012).

Durante el tratamiento hiperbárico se identifican diversos mecanismos que entrañan algún tipo de perjuicio o menoscabo para la viabilidad celular, cuya acción conjunta tiene a menudo consecuencias letales. Por efecto de la presión se reduce la fluidez de las capas de lípidos de la membrana plasmática, alterando su permeabilidad y perturbando procesos esenciales de su metabolismo (como el transporte de nutrientes, la síntesis de proteínas o la respiración). Asimismo, la presión desnaturaliza o desvincula de la membrana diversas enzimas; produce el desdoblamiento y la agregación intracelular de proteínas, y origina un descenso del pH citoplasmático. A su vez, esta desactivación enzimática compromete la funcionalidad del material genético, viéndose afectada la síntesis de ribosomas y, por lo

tanto, la normal transcripción y replicación genética. Incluso, por encima de un umbral de presión determinado, las endonucleasas provocan rupturas en el ADN. Morfológicamente, la presurización ocasiona tanto la elongación de la célula, como la constricción de su pared (Sehrawat, Kaur, Nema, Tewari, & Kumar, 2020).

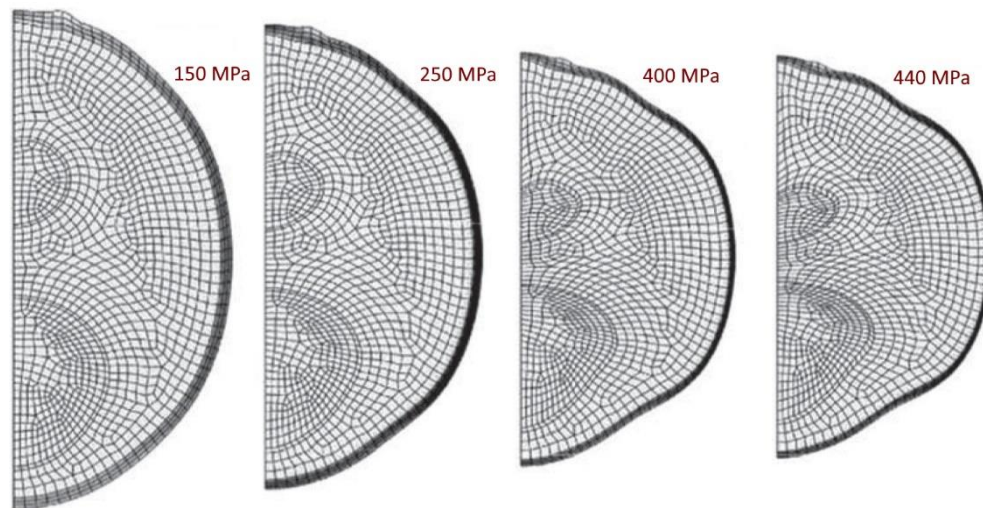


ILUSTRACIÓN 14. Efecto de la presión sobre la pared celular

Adaptado de: (Karwe, Maldonado, & Mahadevan, 2014)

La suma de los diferentes daños que las altas presiones inducen en la célula puede resultar, en ciertas ocasiones, reversible o potencialmente recuperable durante el período de almacenamiento del alimento; sin embargo, habitualmente la severidad de las lesiones ocasiona la muerte celular (Daryaei, Yousef, & Balasubramaniam, 2016). Esta naturaleza multiobjetivo de la higienización mediante HPP evidencia una gran efectividad (Sehrawat, Kaur, Nema, Tewari, & Kumar, 2020).

1.3.5.3. TRANSFORMACIONES NUTRICIONALES Y ORGANOLÉPTICAS POR HPP

En alguna medida, todos los componentes de los alimentos se ven afectados por las altas presiones; la modificación que sufra cada tipo de nutriente va a depender de su propia estructura molecular y del nivel de presión aplicado, principalmente; si bien, factores como

el pH y el contenido en agua del alimento (entre otras características de la matriz), el tiempo de retención o la temperatura del tratamiento HHP, también van a influir. Cambios estructurales que se inducirán siguiendo una variación negativa del volumen (principio de Le Châtelier); que, en algunos casos podrán tener un carácter reversible, mientras que en otros originarán nuevas estructuras estables (Sanz Martínez, 2019).

La compleja configuración macromolecular de las proteínas no se ve afectada en su estructura primaria (unión peptídica de su secuencia de aminoácidos) por las presiones del rango HPP; ya que la compresibilidad de los enlaces covalentes no resulta significativa a presiones inferiores a 2 GPa (Winter, Lopes, Grudzielanek, & Vogtt, 2007). Sin embargo, las estructuras secundaria, ternaria y cuaternaria de su estado nativo (distintos niveles de orientación espacial resultantes de la interacción global de sus átomos) sí son susceptibles de alteración mediante tratamiento HHP; pues tales órdenes estructurales se sustentan en enlaces mucho más débiles que las uniones peptídicas (enlaces de hidrógeno, disulfuro y de Van der Waals, e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas) (Yang & Powers, 2016).

La estructura secundaria de las proteínas se ve afectada con presiones superiores a 700 MPa; sin embargo, por encima de 200 MPa empiezan a desestabilizarse los enlaces que sustentan la estructura ternaria (Bolumar, Middendorf, Toepfl, & Heinz, 2016). Sostenida principalmente por interacciones hidrofóbicas, la estructura cuaternaria se muestra aún más sensible a la presión (100-200 MPa) (Queirós, Saraiva, & Da Silva, 2018).

La presión rompe el equilibrio de fuerzas solvente-proteína, y ocasiona el colapso de las cavidades intramoleculares (generalmente hidrofóbicas); forzando una redistribución de sus regiones anfífilas, e induciendo cambios conformacionales que pueden ocasionar el desdoblamiento de la proteína. Dado que la funcionalidad biológica de las proteínas está vinculada a su estructura ternaria, cuando ésta se altera hasta el punto de afectar a su

funcionalidad, se dice que la proteína se ha desnaturalizado. No obstante, esta capacidad del procesado HHP para alterar de forma sustancial las propiedades funcionales de los biopolímeros puede representar una excelente herramienta para obtener alimentos con características mejoradas (en sus propiedades gelificantes, humectantes, emulsionantes o estabilizantes) (Orlien, 2021).

Las enzimas sólo son proteínas con capacidad para catalizar reacciones bioquímicas muy específicas. Cada enzima muestra afinidad por un determinado tipo de moléculas, que se denominan *sustratos*; sobre los cuales actúa acelerando reacciones en que se generan unos *productos* bien definidos. Esta actividad catalítica está localizada en ciertas cavidades tridimensionales de su estructura llamadas *sitios activos*; donde aminoácidos específicos interaccionan con los sustratos induciendo la ruptura y formación de enlaces que conducen hasta los productos finales. Una vez completada la transformación del sustrato, y liberados los productos del sitio activo, como cualquier otro catalizador, la enzima recupera su estado inicial, hallándose en disposición de comenzar un nuevo proceso catalítico (Ramírez & Ayala Aceves, 2014). Por tanto, como le sucede al resto de las proteínas, la modificación de la estructura ternaria de las enzimas afectará a su funcionalidad, dada la gran especificidad conformacional de su sitio activo; el cual define y posibilita su actividad reactiva. De modo que, químicamente, la inactivación enzimática sólo es una variedad de desnaturalización proteica (Chakraborty, Kaushik, Rao, & Mishra, 2014).

Esta actividad enzimática, si bien puede promover reacciones deseables que suponen una mejora cualitativa del alimento, a menudo conllevan una degradación de la calidad y la reducción de la vida útil del producto. Bajo una parametrización adecuada (100-300 MPa) el procesado HHP puede potenciar la actividad de determinadas enzimas con diversos fines (ablandamiento de carnes, eliminación de alérgenos u obtención de péptidos bioactivos,

entre otros). Mientras que mayores niveles de presión pueden inactivar enzimas oxidativas responsables de pardeamientos y decoloraciones, enranciamiento de grasas o desarrollo de sabores enrarecidos (Gómez, y otros, 2021). La barorresistencia enzimática resulta muy variable: su estabilidad en un rango de presión y temperatura variará en gran medida de los tipos y fuentes de enzimas. Su inactivación no sólo va a depender de la intensidad del tratamiento (nivel de presión, temperatura y tiempo de retención), sino también de otros factores como pueden ser la concentración enzimática, pH y salinidad del medio, y otras características de la matriz alimentaria (Oey, 2016). Sin embargo, se constata que una total inactivación de las enzimas oxidativas no se consigue con niveles de presión inferiores a 900 MPa (Ghafoor, y otros, 2020).

	PRESIÓN (MPa)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (')	INACTIVACIÓN (%)	TIPO DE MATRIZ
PECTINMETILESTERASA	200	25	10	27.8	ZUMO DE TOMATE
TRIMETILAMINA-N-ÓXIDO DEMETILASA	300	20	20	75	CALAMAR
POLIGALACTURONASA	400	25	17	70	ZUMO DE TOMATE
POLIGALACTURONASA	500	20	13	89	TOMATE
PECTINMETILESTERASA	500	60	15	40	PIMIENTO VERDE
LIPOXIGENASA	550	25	15	100	ZUMO DE TOMATE
PEROXIDASA	600	40	15	91	ZANAHORIA
PEROXIDASA	600	50	30	70	KIWI
POLIFENOLOXIDASA	600	60	20	90	LICHI
HIDROPERÓXIDO LIASA	650	25	15	80	ZUMO DE TOMATE
PROTEASA	650	55	10	60	LECHE DE OVEJA

TABLA 3. Barorresistencia orientativa de algunas enzimas

Adaptado de: (Oey, 2016)

Las altas presiones no afectan a los azúcares simples (monosacáridos y disacáridos). Sin embargo, glúcidos de mayor complejidad como pectinas o almidones, por encima de ciertos niveles de presión, pueden reducir su peso molecular y modificar sus propiedades mecánicas y reológicas (aumentando sus capacidades viscoelásticas y estabilizantes) (Xie, y otros, 2018). Los almidones, concretamente, están compuestos por dos polímeros de glucosa de elevado peso molecular: amilopectina, polisacárido mayoritario (AP $\geq$ 72%), de

moléculas muy ramificadas y regulares, que presentan estructura cristalina (doble hélice) en sus regiones lineales, y amorfa en sus ramificaciones; y amilosa en menor proporción ($0\% \leq AM \leq 28\%$), formada por cadenas lineales, esencialmente (Guignon, 2011). Ambos polisacáridos se disponen en capas alternas de anidación concéntrica para formar gránulos. A presión atmosférica y temperatura ambiente ambas sustancias resultan insolubles en agua (la amilopectina en menor medida). El proceso de gelificación del almidón (ya sea hiperbárico o térmico) supone la solubilización en agua de sus componentes mediante un incremento de presión y/o temperatura. Mientras que, a temperatura ambiente, presiones del orden de 400 MPa pueden inducir la gelificación del almidón, el aumento de la presión ocasionará su gelificado a temperaturas decrecientes (Balakrishna, Wazed, & Farid, 2020). Se constata que la estructura cristalina de la amilopectina se desestabiliza y gelifica a menor presión que las cadenas de amilosa; por tanto, los gránulos de almidón con una mayor riqueza en amilosa resultarán más resistentes a las altas presiones (Pei-Ling, Xiao-Song, & Qun, 2010). Comparativamente, mientras que los geles de almidón obtenidos por calor implican la completa destrucción del gránulo, la gelificación mediante presión sólo provoca su destrucción parcial, proporcionando geles de menor viscosidad, y que absorben menos cantidad de agua (Salazar, y otros, 2021).

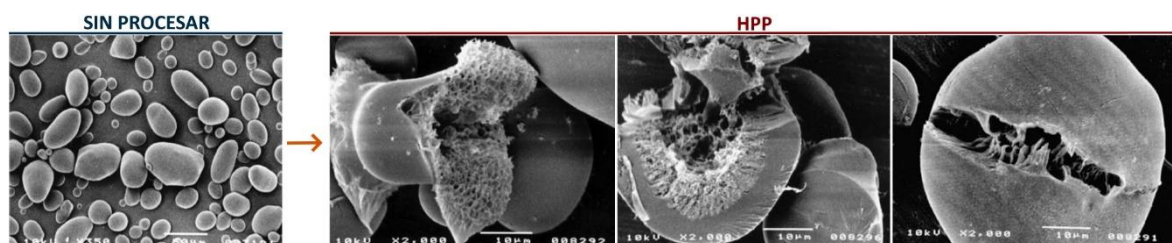


ILUSTRACIÓN 15. Efectos HPP (600 MPa, 3') sobre los gránulos de almidón de patata

Adaptado de: (Pei-Ling, Xiao-Song, & Qun, 2010)

Los lípidos son las biomoléculas que muestran mayor sensibilidad estructural a los tratamientos hiperbáricos, dado que en su conformación las interacciones hidrofóbicas

desempeñan un papel relevante; las cuales, según se indicó anteriormente, resultan poco estables frente a la compresión HHP. Ésta promueve distribuciones atómicas de una mayor compactación (siguiendo el principio de Le Châtelier), lo que se traduce en un mayor grado de solidificación de las grasas, es decir, en un aumento de su temperatura de fusión (dicho incremento, en el caso de los triglicéridos, es del orden de unos 10 °C por cada 100 MPa) (Guignon, 2011).

Sin embargo, el efecto de mayor trascendencia que provocan las altas presiones es, sin duda alguna, la oxidación lipídica. Proceso éste en que se involucran radicales y especies reactivas del oxígeno, provocando la degradación de la calidad nutricional y organoléptica del alimento (Shahidi & Zhong, 2010). En general, una energía de suficiente intensidad (en el caso HHP, esencialmente mecánica) puede inducir en los lípidos biológicos la formación de diversos radicales alquilo, originando una cadena de reacciones oxidativas. Fenómeno éste, denominado *peroxidación lipídica*, que tiene como principales productos peróxidos e hidroperóxidos; los cuales a menudo resultan inestables y se transforman en compuestos de menor peso molecular como aldehídos, cetonas o epóxidos (Porter, 2013). En el caso particular del colesterol, se generan asimismo una serie de productos oxidativos llamados *oxisteroles*. Todos ellos subproductos que implican un deterioro organoléptico y estructural del alimento. Tales procesos de oxidación se ven acelerados tanto por catalizadores de tipo biológico (enzimas lipasas y lipoxigenasas) como inorgánico (iones metálicos liberados por altas presiones: trazas de Fe, Ni y Cu, especialmente) (Medina-Meza, Barnaba, & Barbosa-Cánovas, 2014). Se constata que estos procesos oxidativos afectan en mayor medida a los alimentos con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados; también se comprueba que por debajo de los 300 MPa el impacto de la oxidación resulta poco significativo (Gómez, y otros, 2021).

Por otra parte, el procesado HHP permite, en diferentes matrices alimentarias, una aceptable preservación de su contenido vitamínico (tanto de carácter hidrosoluble como liposoluble). Evidenciándose que este tipo de tratamientos representan un método eficaz para la extracción de distintos componentes bioactivos, como carotenoides y compuestos fenólicos (Salazar, y otros, 2021).

Generalmente, el sabor del alimento se ve poco afectado por las altas presiones. Si bien, se puede reducir la concentración de algunos de sus compuestos volátiles, así como incrementarse el nivel de ciertos volátiles asociados a la oxidación lipídica (hexanal y otros aldehídos característicos de olores enranciados) (Gómez, y otros, 2021). Por otra parte, el color se modifica en distinta medida dependiendo del tipo de alimento: mientras que en los productos musculares la desnaturalización proteica da lugar a coloraciones similares a las de productos cocinados, la alteración de los pigmentos vegetales resulta mucho menos significativa (debiéndose ésta, principalmente, a fuga de enzimas por daños en las paredes celulares) (Salazar, y otros, 2021). Asimismo, se evidencia que la textura de los tejidos musculares puede transformarse por efecto de la presurización; tales cambios dependerán del nivel de presión, de la temperatura, y de si el procesado HHP se lleva a cabo antes o después del *rigor mortis* (Bajovic, Bolumar, & Heinz, 2012). Obteniéndose, en general, una mejora en la jugosidad y la masticabilidad del alimento, así como una disminución de su dureza en los tratamientos *pre-rigor* (a temperatura ambiente); un ablandamiento que, en el caso *post-rigor*, puede requerir un procesado a mayor temperatura ($T_{HPP} > 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Sun & Holley, 2010). Estos cambios de textura se relacionan con la alteración estructural de las proteínas (desnaturalización, agregación o gelificación), la cual afecta a su capacidad de retención de agua, parámetro éste vinculado a la dureza, cohesividad y masticabilidad del alimento; asimismo, en tales efectos se puede hallar involucrada la acción proteolítica de

determinadas enzimas (como catepsinas lisosomales y calpaínas) (Sikes & Warner, 2016).

Los cambios de textura en vegetales, sin embargo, tienen que ver con transformaciones en los polímeros de sus paredes celulares, debido a la perturbación de la permeabilidad celular y la liberación e interacción de enzimas, iones y metabolitos. Dado que los parámetros del tratamiento HHP condicionan la activación o desactivación de las enzimas, la alteración de la textura dependerá del tipo de tratamiento y del vegetal al que se aplique; produciendo, por lo general, texturas de considerable firmeza y con aspecto humedecido (Oey, Lille, Van Loey, & Hendrickx, 2008).

En definitiva, comparativamente, cualquier clase de deterioro o alteración que pueda inducir el tratamiento HHP sobre las propiedades sensoriales y la calidad nutricional del alimento, siempre será de menor consideración que los ocasionados mediante los procesos térmicos convencionales (Salazar, y otros, 2021).

1.4. MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

Se exponen en esta sección una serie de generalidades referentes a distintos tipos de microorganismos indeseables vinculados a los procesos alimentarios, tanto de carácter alterante como patogénico. Se incluye, asimismo, un breve glosario caracterizador de las bacterias patógenas más habituales en el procesado alimentario.

Previamente se presenta el recopilatorio legislativo que reglamenta el proceso de transformación de las elaboraciones pertenecientes a la V gama de alimentos; donde se establecen los criterios microbiológicos exigibles a este tipo de productos. Realizando, finalmente, una revisión de la normativa más reciente acerca de *nuevos alimentos*, con el fin de dilucidar si la aplicación de tratamientos hiperbáricos (altas presiones hidrostáticas, concretamente) a los productos pasteurizados *sous vide* requeriría la consideración de una legislación específica.

1.4.1. NORMATIVA VIGENTE

Las elaboraciones *sous vide* que se realizan en este trabajo, se englobarían dentro del grupo B de comidas preparadas (Real Decreto 3484/2000), bajo la denominación: *comidas preparadas con tratamiento térmico*.

Su proceso de producción está sujeto a diversa normativa, tanto de ámbito estatal como comunitario. Su reglamentación queda establecida en las siguientes disposiciones:

1. Disposiciones nacionales:

- Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre de 2000, *por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas*.

- Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre de 2006, *sobre prevención de la parasitosis por anisakis en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades.*

2. Disposiciones comunitarias:

- Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, *por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.*

- Reglamento (CE) nº 852/2004, de 29 de abril de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, *relativo a la higiene de los productos alimenticios.*

- Reglamento (CE) nº 853/2004, de 29 de abril de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, *por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.*

- Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, *sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.*

- Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005, *relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.*

- Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2005, *por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 853/2004 y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) nº 854/2004 y (CE) nº 882/2004, se*

introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 852/2004 y se modifican los Reglamentos (CE) nº 853/2004 y (CE) nº 854/2004.

▪ Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, *relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*.

▪ Reglamento (CE) nº 1935/2004, de 27 de octubre de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, *sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE, de manera que se garantiza que todos los materiales que se ponen en el territorio comunitario cumplen los mismos requisitos de calidad*.

▪ Reglamento (CE) nº 2023/2006, de 22 de diciembre de 2006, de la Comisión, *sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos*.

▪ Reglamento (UE) nº 10/2011, de la Comisión, de 14 de enero de 2011, *sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos*.

Legislación que, entre una gran diversidad de consideraciones, determina los criterios microbiológicos aplicables a este tipo de elaboraciones alimentarias. Principalmente, es el Real Decreto 3484/2000 donde se recogen los siguientes límites:

LÍMITES MICROBIOLÓGICOS (UFC/g)							
COMIDAS PREPARADAS GRUPO B: COMIDAS PREPARADAS CON TRATAMIENTO TÉRMICO							
NORMATIVA		AEROBIOS MESÓFILOS	ENTEROBACTERIAS COLIFORMES (lactosa positiva)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>Listeria monocytogenes</i>
Real Decreto 3484/2000	SATISFACTORIO	$< 10^4$	< 10	AUSENCIA	< 10	AUSENCIA	
	ACEPTABLE	$[10^4, 10^5]$	$[10, 10^2]$		$[10, 10^2]$		
	INACEPTABLE	$> 10^5$	$> 10^2$		$\neq 0$		
Reglamento CE 2073/2005 modificado por Reglamento CE 1441/2007	SATISFACTORIO						$< 10^2$
	INSATISFACTORIO						$\geq 10^2$

TABLA 4. Criterios microbiológicos comidas preparadas grupo B

Adaptación de: (Real Decreto 3484/2000) y (Reglamento CE nº 1441/2007)

Si bien, normativa posterior introduce alguna ligera modificación en los recuentos de *Listeria monocytogenes* (Reglamento CE nº 1441/2007).

No obstante, toda la reglamentación precedente está dirigida al tratamiento térmico del producto, exclusivamente: un eventual tratamiento hiperbárico posterior estaría fuera de su marco legislativo. A este respecto, en 2015 se aprobó el Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de noviembre de 2015, *relativo a los nuevos alimentos*, el cual modificaba el Reglamento (CE) nº 258/1997 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997, *sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios*. Normativa que, en principio, se debía aplicar a los alimentos sometidos a tratamientos HPP (del inglés *High Pressure Processing*). Sin embargo, la Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria de la Comisión Europea publicó en 2018 una serie de orientaciones (Documento de orientación del Reglamento CE nº 852/2004, 2018), donde se estipulaba que los tratamientos alimentarios con altas presiones estaban autorizados en la Unión Europea, y su aplicación no se hallaba sujeta a autorización previa; ya que, en base al Reglamento (UE) 2015/2283, un tratamiento novedoso tan sólo genera nuevos alimentos cuando éste afecta a su composición o estructura, si produce una alteración de su valor nutricional o su metabolización, o incrementa su contenido en sustancias no deseables. Efectos que, en ningún caso, se asocian a los tratamientos con altas presiones (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021).

Por tanto, la tecnología HPP no se halla sujeta a ningún tipo de autorización específica que se pueda derivar de la aplicación del Reglamento (UE) 2015/2283, *relativo a los nuevos alimentos*; ya que se considera un procedimiento mecánico de inactivación microbiológica. Si algún Estado de la Unión Europea decidiera regular su uso, deberá mediar notificación previa a la Comisión y al resto de Estados. En caso contrario, se asumirá la autorización del

procesado alimentario HPP (Documento de orientación del Reglamento CE nº 852/2004, 2018).

1.4.2. MICROORGANISMOS ALTERANTES Y PATÓGENOS

Entre los microorganismos indeseables que pueden colonizar un sustrato alimentario se distinguen dos grupos: los denominados *alterantes* o *deteriorantes*, que desvirtúan las características sensoriales del producto, sin suponer riesgo para la salud; y los *patógenos* que, según especies, pueden ocasionar dolencias de distinta gravedad (incluida la muerte).

1.4.2.1. AGENTES ALTERANTES

El deterioro de los alimentos es resultado de un proceso metabólico que transforma sus atributos sensoriales (olor, sabor, textura o color) de modo que resultan inaceptables, desagradables o indeseables al ser humano. Una alteración que, en el mejor de los casos, implica un considerable coste económico. Tras estos cambios se hallan una gran variedad de microorganismos, tanto eucariotas (levaduras y mohos) como procariotas (bacterias) (Rawat, 2015).

Algunas levaduras pueden crecer en condiciones de bajo pH, altas concentraciones de sal o azúcar, presencia de conservantes y baja temperatura (Loureiro, 2000). Ciertas especies, en géneros como *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* o *Dekkera*, resultan muy fermentativas, generan biopelículas, gases y malos olores, lo que se traduce en una alta capacidad de deterioro de los alimentos; sin embargo, aunque menos dañosas que las anteriores, la relación de levaduras alterantes resulta mucho más extensa (*Wickerhamomyces*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Kloeckera*, *Candida*, *Torulaspora*, *Rhodotorula*...) (Maráz & Kovács, 2014). Las levaduras no producen

metabolitos tóxicos; pudiendo crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Rawat, 2015). Normalmente, muchas de ellas se encuentran en el aire o el agua; las frutas y hortalizas suponen asimismo un importante reservorio, o incluso pueden ser transmitidas por insectos; otras, sin embargo, entran en la cadena de procesamiento alimentario debido a una manipulación inadecuada o a falta de higiene en equipos e instalaciones (Stratford, 2006).

Por su parte, los mohos pueden crecer en una amplia variedad de sustratos de muy diversa naturaleza (grasos, proteicos o glucídicos), generando en el alimento una gran actividad enzimática que le ocasiona decoloración, cambios estructurales, malos olores y podredumbre. Las especies responsables de dichas alteraciones pertenecen a diferentes géneros: *Alternaria*, *Penicillium*, *Petromyces*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Eurotium* o *Aspergillus* (Filtenborg, Frisvad, & Thrane, 1996). Sin embargo, ciertas especies de mohos, a diferencia de las levaduras, sí pueden generar sustancias tóxicas: las micotoxinas. Bajo este nombre se engloban más de 300 sustancias con distinta estructura química; las más relevantes en el ámbito de la seguridad alimentaria son los grupos compuestos por aflatoxinas, fumonisinas, tricotecenos y ocratoxinas; generadas por especies de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, y *Aspergillus* (Arroyo-Manzanares, Huertas-Pérez, Gámiz-Gracia, & García-Campaña, 2014).

Entre las bacterias, exceptuadas las patógenas que se presentarán separadamente, existen diversos grupos con capacidad deteriorante.

Por el tipo de alimentos objeto de este trabajo (envasados al vacío), acaso el tipo de bacterias deteriorantes de mayor importancia sea el grupo de las acidolácticas. Se trata de organismos con morfología cocoide o bacilar, grampositivos, no esporulados, anaerobios o aerotolerantes, con gran capacidad de crecimiento en matrices proteicas (carne y pescado)

en un amplio rango de pH (Parra Huertas, 2010). Los géneros vinculados habitualmente con el deterioro de los alimentos son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* y *Oenococcus*. Existiendo en los cuatro primeros géneros diversas especies con capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración (especies psicrótrofas) (Björkroth, 2010).

Otro grupo de bacterias con numerosas especies alterantes lo forma el orden de las Enterobacterales: un heterogéneo conjunto de bacilos gramnegativos con respiración anaeróbica facultativa, que entre sus distintas familias incluye patógenos tan conspicuos como *Salmonella*, *Shigella* o *Yersinia* (Pérez Guerrero, Galán Sánchez, Gutiérrez Saborido, & Guerrero Lozano, 2014). Entre los géneros que conforman el subgrupo de las bacterias coliformes (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*) (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009), se hallan numerosas especies deteriorantes (también alguna patógena), que pueden generar aminos biógenos (histamina, principalmente), viscosidad superficial, gases y olores fétidos, sabores enrarecidos y putrescencia. Diferentes alteraciones que otros géneros de este grupo también pueden ocasionar (*Raoultella*, *Hafnia*, *Proteus*, *Serratia* o *Erwinia*, entre otros). En general, este tipo de bacterias se hallan ampliamente distribuidas en una gran diversidad de hábitats: superficies, agua, vegetales, heces, tractos respiratorio e intestinal de mamíferos... Ubicuidad ésta que, junto a su respiración anaerobia y al hecho de que ciertos géneros (en particular los coliformes) sean capaces de crecer a temperaturas de refrigeración (Baylis, 2006), convierte a los productos *sous vide* en un sustrato muy adecuado para su crecimiento.

Otros géneros bacterianos relacionados habitualmente con el deterioro alimentario son *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Xanthomonas*. Se trata de tres géneros taxonómicamente relacionados. Todos son bacilos gramnegativos con respiración aeróbica (facultativa en el

caso de *Shewanella* y alguna especie de *Pseudomonas*). Se encuentran presentes en gran diversidad de entornos. A menudo, estos géneros actúan asociativamente en procesos de biodegradación aeróbica: putrescencia de vegetales, procesos de proteólisis y lipólisis en carnes, pescados y productos lácteos (que se traducen en degradación de tejidos, malos olores y limos superficiales). (Liao, 2006).

1.4.2.2. PRINCIPALES PATÓGENOS ALIMENTARIOS

A continuación, a modo de glosario, se compendian las 15 bacterias patógenas o productoras de toxinas más habituales susceptibles de causar enfermedades asociadas al consumo de alimentos¹:

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella* spp.
3. *Campylobacter* spp.
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium* spp.
11. *Salmonella* spp.
12. *Shigella* spp.
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio* spp.
15. *Yersinia enterocolitica*

■ 1. *Bacillus cereus*.

Se trata de un bacilo grampositivo esporulado, anaerobio facultativo muy extendido en una gran variedad de medios: agua, polvo, superficies, materias primas de origen vegetal y animal... (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). A pesar de ser un microorganismo mesófilo (entre 28 y 35 °C es su rango térmico de mayor crecimiento), existen cepas capaces de crecer a temperaturas de refrigeración ($T \approx 4$ °C), y en un amplio rango de pH (4.5-9.3) (Bouëtard & Santos Hernández, 2009). Asimismo, sus esporas se muestran muy resistentes, no sólo a tratamientos térmicos, sino también a irradiaciones y otras técnicas de higienización (Martino Zagovalov, Leyva Castillo, & Puig Peña, 2008). Este bacilo produce dos tipos de enterotoxinas termorresistentes: la toxina emética y la toxina

¹ En dicho glosario no se incluye *Coxiella burnetii*, coccobacilo aerobio altamente infeccioso causante de una patología conocida con el nombre de *fiebre Q* (Françoise, 2010); cuya transmisión, en diversa literatura, se asocia con productos lácteos no pasteurizados (si bien, como transmisión de baja probabilidad). A este respecto, la EFSA se pronunció en 2010 declarando que no se disponía de evidencias científicas que constatarán esta posibilidad (EFSA, 2010); señalando como vías de transmisión: contacto con animales infectados, inhalación de bioaerosoles o picaduras de artrópodo. Por otra parte, los protocolos del Centro Nacional de Epidemiología vigentes actualmente tampoco consideran la transmisión alimentaria (CNE: Instituto de salud Carlos III, 2013). Por tanto, en base a lo anterior, en el presente trabajo se considerará que la fiebre Q es causa de una infección de transmisión no alimentaria.

diarreica. La primera se produce durante la fase de crecimiento bacteriano en el propio alimento, ocasionando un cuadro de náuseas y vómitos; mientras que la variante diarreica es generada en el intestino del huésped, tras la ingestión y desarrollo de formas vegetativas o de resistencia, originando dolores abdominales y diarreas (Cortés-Sánchez, Díaz-Ramírez, & Salgado-Cruz, 2017).

Los alimentos potencialmente colonizables por este patógeno resultan muy variados: todo tipo de elaboraciones a base de carnes, pescados, vegetales, cereales y derivados lácteos; con una especial incidencia en elaborados de arroz, pastas y otros carbohidratos (EFSA, 2016). En general, la toxiinfección de *Bacillus cereus* se asocia a productos que han recibido tratamiento térmico tras el cual aún persisten esporas residuales; esporas que no tardan en germinar si el enfriamiento del producto se realiza a temperatura ambiente. Condiciones en las que este patógeno prolifera con gran facilidad, dada la total ausencia de competidores (Martino Zagovalov, Leyva Castillo, & Puig Peña, 2008).

1. *Bacillus cereus*
2. ***Brucella* spp.**
3. *Campylobacter* spp.
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium* spp.
11. *Salmonella* spp.
12. *Shigella* spp.
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio* spp.
15. *Yersinia enterocolitica*

■ 2. *Brucella* spp.

Se trata de un cocobacilo gramnegativo, mesófilo (su crecimiento óptimo se produce en un rango de temperaturas entre 20 y 40 °C, y a un pH entre 6.6 y 7.4); es no esporulado y posee respiración estrictamente aerobia (Freer & Castro-Arce, 2001).

Este género posee 10 especies; cuatro de las cuales resultan patógenas para el ser humano: *B. melitensis*, cuyo principal reservorio es el ganado ovino y caprino; *B. abortus* y *B. suis* huéspedes del ganado vacuno y porcino, respectivamente; y, por último, *B. canis*, cuyo hospedador es el perro (Álvarez-Hernández, Díaz-Flores, & Ortiz-Reynoso, 2015).

La especie *B. melitensis* es la más virulenta en humanos. La dosis infectiva necesaria es realmente baja: entre 10-100 células del microorganismo. La brucelosis, también

conocida como *fiebres de Malta*, presenta un período de incubación muy variable (entre 5 y 60 días), y una sintomatología inespecífica en la que pueden darse astenia, fiebre, escalofríos, artralgia, sudoración, cefaleas... (CNE: Instituto de salud Carlos III, 2013).

La infección puede transmitirse mediante la ingestión de alimentos contaminados: principalmente, leche y derivados lácteos que no han recibido pasteurización o tratamiento higienizante equivalente, así como productos cárnicos (ovino, caprino, vacuno y porcino) poco cocinados. Infección ésta que también puede propagarse por aerosoles, a través de las mucosas, e incluso de abrasiones cutáneas (Álvarez-Hernández, Díaz-Flores, & Ortiz-Reynoso, 2015).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella* spp.
3. ***Campylobacter* spp.**
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium* spp.
11. *Salmonella* spp.
12. *Shigella* spp.
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio* spp.
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 3. *Campylobacter* spp.

Género que engloba 17 especies de bacilos gramnegativos no esporulados, entre las cuales las especies *C. jejuni* y *C. coli* son las que más frecuentemente guardan relación con enfermedades humanas (OMS, 2013).

Se trata de microorganismos mesófilos, con una temperatura óptima de crecimiento entre 37 y 42 °C (no crecen por debajo de 30 °C), y un rango de pH entre 6.5 y 7.5; la mayor parte de sus especies son microaerófilas, si bien se adaptan a condiciones aerobias mediante la formación de películas o biofilms (Di Pillo & Sotomayor, 2017).

Se muestra especialmente sensible a condiciones de baja actividad de agua y a radiación UV. No crece en alimentos, pero puede persistir en ellos durante largos períodos. Aunque se puede hallar en diferentes entornos, se encuentra principalmente en el tracto digestivo de mamíferos y aves. Habitualmente, llega hasta los alimentos a través de una evisceración poco cuidadosa de los animales portadores (Martín de Santos, Cepeda Sáez, Herrera Marteache, & Martínez López, 2012).

Según muestra el gráfico 1, la campilobacteriosis representa, con diferencia, la toxiinfección más frecuente en la Unión Europea (seguida de la salmonelosis). Tras un período de incubación habitual de entre 1 y 3 días, la infección por *Campylobacter* cursa con gastroenteritis aguda, que se manifiesta con dolor abdominal severo y diarreas, entre otros síntomas (Martín de Santos, Cepeda Sáez, Herrera Marteache, & Martínez López, 2012).

Entre los alimentos con un mayor potencial de transmisión se hallan las carnes (aves, especialmente; también porcino y vacuno) a las que no se aplica un tratamiento térmico de suficiente intensidad (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). En menor medida, lácteos sin pasteurizar, comidas preparadas y otros alimentos con deficiente higienización, también pueden ser el origen de esta infección (Martín de Santos, Cepeda Sáez, Herrera Marteache, & Martínez López, 2012).

CASOS DE ZONOSIS UE 2019

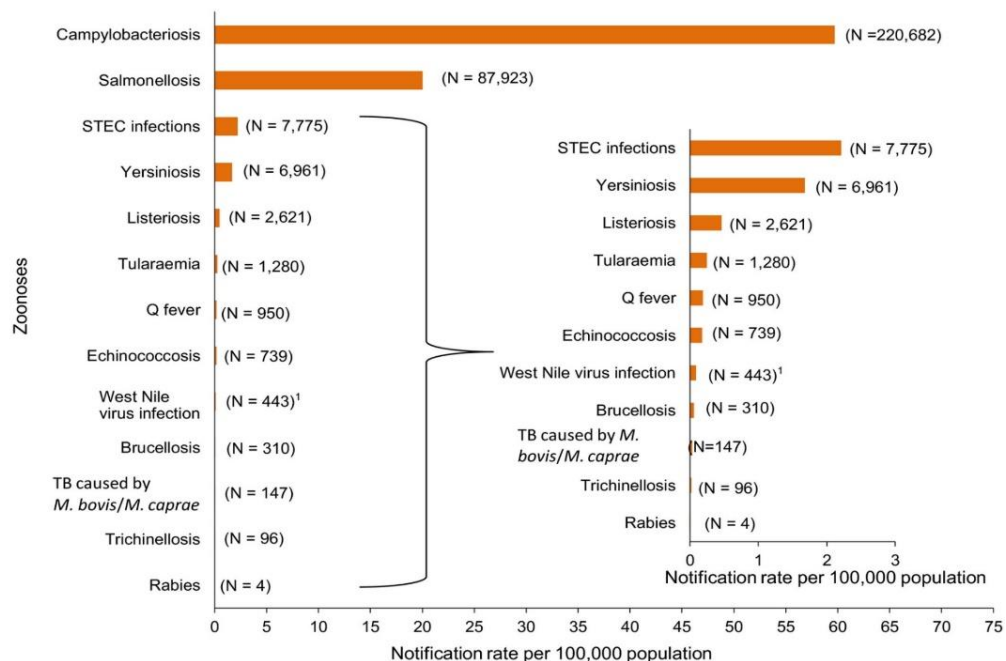


GRÁFICO 1. Principales zoonosis en EU 2019

Obtenido de: (EFSA & ECDC, 2021)

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella spp.*
3. *Campylobacter spp.*
4. ***Clostridium botulinum***
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium spp.*
11. *Salmonella spp.*
12. *Shigella spp.*
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio spp.*
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 4. *Clostridium botulinum*.

Esta especie posee morfología bacilar y es anaerobia estricta. Se trata de microorganismos grampositivos, esporulados y generadores de toxinas (Bouëtard & Santos Hernández, 2009); de crecimiento mesófilo (rango óptimo de temperaturas entre 25 y 35 °C), en unos márgenes de pH que van de moderadamente ácido a ligeramente alcalino (entre 4.5 y 8.0). Si bien, algunas cepas de la especie pueden presentar crecimiento psicrótrofo.

Existen siete tipos de toxina botulínica, cuatro de ellos (tipos A, B y E; más raramente el F) son responsables del botulismo en humanos. Estas toxinas son termolábiles ($T \geq 85$ °C, durante 5'). El botulismo de transmisión alimentaria supone la ingestión de un alimento donde alguna de estas toxinas se halle presente. Las neurotoxinas botulínicas cursan con síntomas de letargia y parálisis muscular descendente (desde el cráneo hacia abajo), hasta imposibilitar la respiración, pudiendo llegar a provocar la muerte por asfixia. Síntomas que se manifiestan entre 12 y 36 horas después de ingerir la toxina. También es posible contraer la enfermedad por ingestión de esporas (botulismo intestinal, generalmente infantil), o bien por el desarrollo de esporas en heridas. Esporas, por otra parte, muy resistentes ($T_{\text{inactivación}} \geq 121$ °C, durante 10') (CNE: Instituto de salud Carlos III, 2013).

El reservorio de *C. botulinum* es muy amplio, sus esporas se pueden encontrar tanto en suelos y aguas como en el tracto intestinal de diversos animales. Dada la ubicuidad de sus esporas y el metabolismo anaerobio de sus formas vegetativas, los alimentos asociados a este tipo de intoxicaciones son, principalmente, conservas y productos envasados al vacío (Velusamy, Arshak, Korostynska, Oliwa, & Adley, 2009), cuyo procesado térmico permite esporas residuales (de germinación postratamiento).

1. *Bacillus cereus*
 2. *Brucella* spp.
 3. *Campylobacter* spp.
 4. *Clostridium botulinum*
 5. ***Clostridium perfringens***
 6. *Cronobacter sakazakii*
 7. *Escherichia coli*
 8. *Francisella tularensis*
 9. *Listeria monocytogenes*
 10. *Mycobacterium* spp.
 11. *Salmonella* spp.
 12. *Shigella* spp.
 13. *Staphylococcus aureus*
 14. *Vibrio* spp.
 15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 5. *Clostridium perfringens*.

Al igual que *C. botulinum*, esta especie la forman bacilos grampositivos y esporulados.

Sin embargo, a diferencia del primero, *C. perfringens* tolera una reducida presencia de oxígeno (microaerófilo). Genera numerosas toxinas; tipificándose la especie (tabla 4) en base a la producción, o no, de sus cuatro principales toxinas (alfa, beta, épsilon e iota) (Morris & Fernández-Miyakawa, 2009). Su crecimiento óptimo se produce en un rango de temperaturas entre 32 y 40 °C (Bouëtard & Santos Hernández, 2009), y con un pH próximo a neutro (6-7).

	TOXINAS			
	Alfa	Beta	Epsilon	Iota
<i>C. perfringens</i> tipo A	+	-	-	-
<i>C. perfringens</i> tipo B	+	+	+	-
<i>C. perfringens</i> tipo C	+	+	-	-
<i>C. perfringens</i> tipo D	+	-	+	-
<i>C. perfringens</i> tipo E	+	-	-	+

TABLA 5. Clasificación de *C. perfringens* por producción de toxinas

Obtenido de: (Morris & Fernández-Miyakawa, 2009)

Esta especie se halla enormemente extendida: suelos, materia en descomposición, aguas residuales o el tracto intestinal de distintos animales, tanto terrestres como marinos, son algunos de sus reservorios (Morales-Ramírez, 2010). La intoxicación con este patógeno, en general produce una gastroenteritis (dolor abdominal, diarreas y náuseas); si bien, en determinados casos puede revestir mayor gravedad, ocasionando enteritis necrosante y septicemia. Se precisa una ingestión muy elevada de células vegetativas (del orden de 10^8) para que se produzca la intoxicación. Bajo las condiciones de bajo pH del aparato digestivo, las formas vegetativas se ven forzadas a esporular, proceso al que se asocia la segregación de toxinas (EFSA, 2005).

Al tratarse de una especie tan ubicua, puede encontrarse en una gran diversidad de alimentos. Su presencia suele ser indicador de falta de higiene o manipulación defectuosa. Generalmente, se asocia con alimentos que no han recibido tratamiento térmico (lácteos sin pasteurizar o vegetales frescos), o de insuficiente intensidad (carnes pocos cocinadas; especialmente, carnes rojas y aves). Sin embargo, dada la gran resistencia de sus esporas, puede proliferar en todo tipo de elaboraciones que tras su terminación se dejan enfriar a temperatura ambiente (Martino Zagovalov, Leyva Castillo, & Puig Peña, 2008).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella spp.*
3. *Campylobacter spp.*
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium spp.*
11. *Salmonella spp.*
12. *Shigella spp.*
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Yersinia spp.*
15. *Yersinia enterocolitica*

■ 6. *Cronobacter sakazakii*.

En diversa literatura se denomina a esta especie *Enterobacter sakazakii* (renombrada en 2007). Se trata de un bacilo gramnegativo, facultativamente anaerobio, no esporulado y que no genera toxinas (Gurtler, Kornacki, & Beuchat, 2005). Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 37-43 °C; sin embargo, puede crecer desde los 6 °C hasta 45 °C (Luján Medina, Loredó Treviño, & Noe Aguilar, 2014).

Esta especie muestra una gran resistencia a condiciones de muy baja humedad. De hecho, este microorganismo ha adquirido una gran relevancia como responsable de numerosas infecciones transmitidas mediante preparados en polvo para lactantes (OMS-FAO, 2004). Tales infecciones pueden llegar a provocar en hospedadores con un sistema inmunitario poco robusto, como neonatos y lactantes, enfermedades tan graves como meningitis, abscesos cerebrales, enterocolitis necrosante y septicemia; que alcanzan tasas de mortalidad que van del 40 al 80% (Petrola, Martínez, Tomé, Luigi, & Rojas, 2013). Si bien su presencia en la leche deshidratada ha originado los casos más graves, este patógeno ha sido aislado en alimentos muy diversos: cereales, especias, vegetales frescos, huevos, quesos o carnes (Cetinkaya, Joseph, Ayhan, & Forsythe, 2013).

1. *Bacillus cereus*
2. *Bacillus* spp.
3. *Campylobacter* spp.
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. ***Escherichia coli***
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium* spp.
11. *Salmonella* spp.
12. *Shigella* spp.
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio* spp.
15. *Yersinia enterocolitica*

7. *Escherichia coli*.

La precisión de las técnicas que emplea la taxonomía actual provoca una permanente reclasificación de especies y grupos taxonómicos. Buena prueba de la profundidad de esta de esta revisión es el orden de las Enterobacterales: en Brock (12ª ed., 2009) (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009) lo componen 44 géneros pertenecientes a una sola familia (Enterobacteriaceae). No obstante, otras fuentes más actualizadas (base de datos del NCBI) muestran que el referido orden está compuesto por 77 géneros distribuidos en 9 familias (sin considerar *incertae sedis* ni *candidatus*) (NCBI, 2021).

ORDEN ENTEROBACTERALES

Enterobacteriaceae			
1 <i>Alterococcus</i>	12 <i>Erwinia</i>	23 <i>Pantoea</i>	34 <i>Salmonella</i>
2 <i>Arsenophonus</i>	13 <i>Escherichia</i>	24 <i>Pectobacterium</i>	35 <i>Samsonia</i>
3 <i>Brenneria</i>	14 <i>Ewingella</i>	25 <i>Phlomobacter</i>	36 <i>Serratia</i>
4 <i>Buchnera</i>	15 <i>Hafnia</i>	26 <i>Photobacterium</i>	37 <i>Shigella</i>
5 <i>Budvicia</i>	16 <i>Klebsiella</i>	27 <i>Plesiomonas</i>	38 <i>Sodalis</i>
6 <i>Buttiauxella</i>	17 <i>Kluyvera</i>	28 <i>Pragia</i>	39 <i>Tatumella</i>
7 <i>Calymmatobacterium</i>	18 <i>Leclercia</i>	29 <i>Proteus</i>	40 <i>Trabulsiella</i>
8 <i>Cedecea</i>	19 <i>Leminorella</i>	30 <i>Providencia</i>	41 <i>Wigglesworthia</i>
9 <i>Citrobacter</i>	20 <i>Moellerella</i>	31 <i>Rahnella</i>	42 <i>Xenorhabdus</i>
10 <i>Edwardsiella</i>	21 <i>Morganella</i>	32 <i>Raoultella</i>	43 <i>Yersinia</i>
11 <i>Enterobacter</i>	22 <i>Obesumbacterium</i>	33 <i>Saccharobacter</i>	44 <i>Yokenella</i>

Adaptado de:
(Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009)

ORDEN ENTEROBACTERALES

Bruguierivoraceae	Budviciaceae	Erwiniaceae	Hafniaceae
1 <i>Biostraticola</i>	1 <i>Budvicia</i>	1 <i>Buchnera</i>	1 <i>Edwardsiella</i>
2 <i>Bruguierivorax</i>	2 <i>Jinshanibacter</i>	2 <i>Erwinia</i>	2 <i>Enterobacillus</i>
3 <i>Sodalis</i>	3 <i>Leminorella</i>	3 <i>Izhakiella</i>	3 <i>Hafnia</i>
	4 <i>Limnobaculum</i>	4 <i>Kalamiella</i>	4 <i>Obesumbacterium</i>
	5 <i>Pragia</i>	5 <i>Mixta</i>	
		6 <i>Pantoea</i>	
		7 <i>Phaseolibacter</i>	
		8 <i>Rosenbergiella</i>	
		9 <i>Tatumella</i>	
		10 <i>Wigglesworthia</i>	
Morganellaceae	Pectobacteriaceae	Thorselliaceae	Yersiniaceae
1 <i>Arsenophonus</i>	1 <i>Acerihabitus</i>	1 <i>Coetzee</i>	1 <i>Chania</i>
2 <i>Cosenzaea</i>	2 <i>Brenneria</i>	2 <i>Thorsellia</i>	2 <i>Chimaeribacter</i>
3 <i>Moellerella</i>	3 <i>Dickeya</i>		3 <i>Ewingella</i>
4 <i>Morganella</i>	4 <i>Lonsdalea</i>		4 <i>Gibbsiella</i>
5 <i>Photobacterium</i>	5 <i>Pectobacterium</i>		5 <i>Nissabacter</i>
6 <i>Proteus</i>	6 <i>Samsonia</i>		6 <i>Rahnella</i>
7 <i>Providencia</i>			7 <i>Rouxella</i>
8 <i>Xenorhabdus</i>			8 <i>Serratia</i>
			9 <i>Yersinia</i>
Enterobacteriaceae			
1 <i>Atlantibacter</i>	11 <i>Klebsiella</i>	21 <i>Pseudocitrobacter</i>	
2 <i>Buttiauxella</i>	12 <i>Kluyvera</i>	22 <i>Raoultella</i>	
3 <i>Cedecea</i>	13 <i>Kosakonia</i>	23 <i>Salmonella</i>	
4 <i>Citrobacter</i>	14 <i>Leclercia</i>	24 <i>Scandinavium</i>	
5 <i>Cronobacter</i>	15 <i>Lelliottia</i>	25 <i>Shigella</i>	
6 <i>Edaphovirga</i>	16 <i>Mangrovibacter</i>	26 <i>Shimwellia</i>	
7 <i>Enterobacter</i>	17 <i>Metakosakonia</i>	27 <i>Siccibacter</i>	
8 <i>Escherichia</i>	18 <i>Phytobacter</i>	28 <i>Superficieibacter</i>	
9 <i>Franconibacter</i>	19 <i>Pluralibacter</i>	29 <i>Trabulsiella</i>	
10 <i>Jejubacter</i>	20 <i>Pseudoescherichia</i>	30 <i>Yokenella</i>	

Adaptado de: (NCBI, 2021)
TABLA 6. Evolución taxonómica
del orden Enterobacterales



Perspectiva taxonómica que permite constatar que la especie *Cronobacter sakazakii* (patógeno anterior en este listado) se ha escindido ciertamente del género *Enterobacter*, permaneciendo, no obstante, en la familia Enterobacteriaceae; y, por el contrario, géneros como *Hafnia*, *Proteus*, *Pectobacterium*, *Yersinia* o *Serratia*, se han diferenciado en distintas familias. Por otra parte, dado que los criterios microbiológicos de la normativa aplicable a comidas preparadas de tipo B (entre las que se incluyen las elaboraciones *sous vide*) limita explícitamente la concentración de bacterias coliformes permitida en el alimento (inferior a 100 ufc/g), convendría siquiera una reseña² aclaratoria acerca de este grupo, ya que no existe un consenso claro sobre qué géneros lo integran. De modo que la categorización por familias de la tabla 5 puede ayudar a una mejor caracterización de los géneros susceptibles de formar parte de dicho grupo (los cuatro géneros más habituales se muestran en rojo).

Entre las coliformes, sin duda, *Escherichia coli* es la especie más representativa (da nombre al grupo) y también la más peligrosa.

Se trata de un bacilo gramnegativo mesófilo (su rango óptimo de crecimiento se halla entre 35 y 40 °C, aunque puede crecer hasta 7 °C en un amplio intervalo de pH, desde 4.4 hasta 10). Como el resto de bacterias del grupo, posee respiración anaerobia facultativa y no genera esporas. La mayoría de las cepas resultan inofensivas; de hecho, esta especie es huésped habitual del tracto intestinal del ser humano, por lo que representa un indicador genuinamente fecal asociado a deficiencias higiénicas en la manipulación alimentaria. Sin embargo, determinadas cepas de *E. coli* resultan patógenas; algunas de las cuales producen potentes enterotoxinas (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). Según el mecanismo

² Las bacterias coliformes son bacilos gramnegativos, no esporulados, con respiración anaerobia facultativa y capacidad para fermentar la lactosa a una temperatura entre 35 y 37 °C en 24 horas con acidificación del medio y producción de CO₂; resultando, asimismo, oxidasas negativas (Larrea-Murrell, Rojas-Badía, Romeu-Álvarez, Rojas-Hernández, & Heydrich-Pérez, 2013). Habitualmente, en el grupo de las coliformes se incluyen los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Citrobacter* pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Si bien, hay autores que excluyen a *Citrobacter*, debido a la lentitud de su proceso fermentativo; otros autores, por el contrario, incorporan al grupo géneros como *Serratia* o *Pectobacterium*.

de su patogenicidad se distinguen seis patotipos (Rípodas Navarro, Fernández Moreira, & Macho Martínez, 2017):

1. *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (EHEC o VTEC)
2. *E. coli* con adherencia difusa (DAEC)
3. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)
4. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
5. *E. coli* enteropatogénica (EPEC)
6. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

El primero se conoce también como *E. coli* productora de toxina Shiga, o *E. coli* STEC (de su acrónimo inglés *Shiga-toxin producing Escherichia coli*). Toxina que puede producir desde una leve diarrea hasta un cuadro de colitis hemorrágica, caracterizado por dolores abdominales y diarreas sanguinolentas, que puede ocasionar distintas afecciones, entre ellas un fallo renal agudo (síndrome urémico hemolítico).

El principal reservorio de esta especie es el tracto intestinal de mamíferos (rumiantes, especialmente) y aves; sin embargo, pueden persistir en el medio ambiente durante largo tiempo y bajo condiciones desfavorables, lo que posibilita su proliferación en diversos tipos de alimentos (frutas, hortalizas y productos lácteos). El ser humano, como se ha indicado, puede representar un importante vector de transmisión (CNE: Instituto de salud Carlos III, 2013).

Por tanto, esta intoxicación resulta potencialmente transmisible a través de cualquier alimento manipulado sin observar unas adecuadas medidas de higiene; especialmente, productos elaborados con carne picada, cuyo tratamiento térmico no alcanza intensidad suficiente, leche y derivados lácteos sin pasteurizar o vegetales crudos (en particular, brotes de semillas germinadas).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella* spp.
3. *Campylobacter* spp.
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. ***Francisella tularensis***
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium* spp.
11. *Salmonella* spp.
12. *Shigella* spp.
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio* spp.
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 8. *Francisella tularensis*.

Este patógeno es uno de los agentes más infecciosos que se conocen: la dosis que se requiere para la infección humana es enormemente baja (25 bacterias por inhalación de bioaerosoles; sólo 10 mediante inyección subcutánea) (CNE: Instituto de salud Carlos III, 2013). Por tanto, este patógeno se considera un agente susceptible de ser empleado en bioterrorismo (categoría A: agentes de alta prioridad) (INSST, 2015).

Se trata de un coccobacilo gramnegativo mesófilo (su crecimiento óptimo se produce a temperaturas en torno a 37 °C, y en un rango de pH entre 6.8 y 7.3), no esporulado y con respiración estrictamente aerobia (Rodríguez Ferri, 2, 2000). Origina una patología llamada *tularemia*, también conocida como *enfermedad de Ohara* o *fiebre de los conejos*. Especie de la cual se conocen dos subespecies patógenas: *F. tularensis* y *F. tularensis holartica*; resultando mucho más virulenta la primera. Hasta el momento, en España sólo se ha detectado la variedad *holartica* (CCAES, 2013). Dicha enfermedad presenta diversa sintomatología: fiebre elevada, escalofríos, malestar general, dolor articular y muscular, cefaleas, rinitis y dolor de garganta; que pueden ir acompañados de trastornos intestinales, como vómitos y diarreas (INSST, 2015).

Esta bacteria se ha aislado en un gran número de mamíferos salvajes, principalmente lagomorfos (conejos y liebres) y roedores; en ganado ovino y porcino, así como en animales domésticos. También puede infectar aves, anfibios y peces; siendo vectores de transmisión distintos artrópodos (garrapatas, pulgas, tábanos, mosquitos...) (Rodríguez Ferri, 2, 2000).

La principal vía de transmisión es el contacto con animales infectados (con sus heces o cadáveres). Sin embargo, es posible el contagio por ingestión de carne con tratamiento térmico insuficiente, o incluso de agua contaminada. Asimismo, se han producido casos de

infección por manipulación de carne de caza (desollado y descuartizado de los animales). Representando un importante factor de riesgo la presencia de heces de roedores en las zonas de elaboración o almacenamiento de alimentos (CCAES, 2013). Aunque esta bacteria se muestra resistente a la congelación, mediante un tratamiento térmico relativamente suave (56 °C, durante 30') se consigue su inactivación (Rodríguez Ferri, 2, 2000).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella* spp.
3. *Campylobacter* spp.
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium* spp.
11. *Salmonella* spp.
12. *Shigella* spp.
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio* spp.
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 9. *Listeria monocytogenes*.

Se trata de un bacilo grampositivo, mesófilo (crecimiento óptimo en un rango térmico de 30-37 °C), de respiración aerobia facultativa y que no genera esporas. Muestra una gran resistencia en condiciones muy variadas: tolera altas concentraciones salinas, pudiendo incluso crecer (halotolerancia); soporta la deshidratación y la congelación, manteniendo su crecimiento a temperaturas de refrigeración (psicrotolerancia) (Martino Zagovalov, Leyva Castillo, & Puig Peña, 2008); adaptándose también a un amplio intervalo de pH (desde 4.3 hasta 9.6) (CNE: Instituto de salud Carlos III, 2013).

Precisamente, la versatilidad este patógeno le confiere una enorme ubicuidad. En general, se puede hallar en cualquier medio (tierra, suelos, vegetación, agua, materia fecal, superficies, paredes...); asimismo, representan un reservorio aves y mamíferos infectados (tanto salvajes como de abasto). Por otra parte, su capacidad para crear biofilms le permite sobrevivir prolongadamente sobre superficies pulidas, como acero, poliéster, cerámica o vidrio (habituales en las instalaciones de producción alimentaria) (CNE: Instituto de salud Carlos III, 2013).

Igualmente amplio resulta el conjunto de alimentos susceptibles de transmitir este patógeno. No obstante, la mayor parte de los brotes de listeriosis apunta a manipulaciones alimentarias de higiene inadecuada (contaminación cruzada o procesado defectuoso). De

modo que, si bien cualquier alimento crudo o con escaso tratamiento térmico (vegetales, lácteos sin pasteurizar, carnes y pescados poco cocinados...) entraña riesgo de infección, la mayor parte los casos tienen su origen en productos que sufren algún tipo de manipulación posterior a su tratamiento térmico: fiambres loncheados, vegetales procesados en frío, comidas preparadas sin pasteurizar, quesos frescos no higienizados... (Bouëtard & Santos Hernández, 2009).

Generalmente, esta enfermedad reviste escasa gravedad en adultos sanos (posibles vómitos y malestar abdominal, dolor de cabeza o fiebre). Sin embargo, en el caso de adultos inmunocomprometidos o con avanzada edad, embarazos y neonatos, la infección puede cursar con fiebres elevadas, cefaleas, vómitos y diarreas, lesiones cutáneas, e incluso con septicemia o graves afecciones del sistema nervioso central (como meningoencefalitis o meningitis). Durante el caso de las embarazadas, la infección puede transmitirse al feto por vía transplacentaria (Churchill, Lee, & Hall, 2006).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella spp.*
3. *Campylobacter spp.*
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. ***Mycobacterium spp.***
11. *Salmonella spp.*
12. *Shigella spp.*
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio spp.*
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 10. *Mycobacterium* spp.

Hubo un tiempo taxonómico en que el género *Mycobacterium* se hallaba compuesto únicamente por dos espantosas especies: *Mycobacterium leprae* (o bacilo de la lepra) y *Mycobacterium tuberculosis* (o bacilo tuberculoso) (Dorransoro & Torroba, 2007). Debido a la expansión del conocimiento, actualmente tales especies resultan menos temibles, y en dicho género se catalogan 97 especies; entre las que se encuentra un taxón que bajo el nombre *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) agrupa las 2822 variantes conocidas de esta especie, causante de la enfermedad de la tuberculosis (NCBI, 2021).

El taxón MTC o complejo *M. tuberculosis* lo integran organismos que presentan una homología en su ADN superior al 95% (Dorransoro & Torroba, 2007); entre el gran número

de variantes de este grupo se podrían destacar *M. tuberculosis africanum*, *M. tuberculosis bovis*, *M. tuberculosis caprae*, *M. tuberculosis microti* y *M. tuberculosis pinnipedii* (NCBI, 2021).

Se trata de bacilos grampositivos, no esporulados y estrictamente aerobios. Su rango de crecimiento comprende temperaturas que van desde 25 a 45 °C, y valores de pH entre 4 y 8. Se muestran resistentes a la desecación y la congelación, pudiendo sobrevivir durante meses en condiciones ambientales sin radiación solar (INSST, 2012). Son reservorios de este patógeno diversos tipos de mamíferos, tanto salvajes como de abasto (especialmente, ganado vacuno, ovino y caprino), e incluso los animales domésticos (CNE: Instituto de salud Carlos III, 2013).

La transmisión alimentaria de esta infección se suele producir, principalmente, por la ingestión de leche sin tratamiento térmico o derivados lácteos no pasteurizados; en menor medida, a causa de la ingestión de alimentos contaminados por manipuladores portadores de este patógeno o por contaminaciones cruzadas. La infección con *M. tuberculosis* por vía alimentaria presenta localización extrapulmonar, pudiendo cursar inicialmente con fatiga, pérdida de peso, dolores articulares y musculares, y derivar en diversos tipos de afecciones (cutáneas, pulmonares, óseas, linfáticas o meníngeas) (INSST, 2012).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella spp.*
3. *Campylobacter spp.*
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium spp.*
11. *Salmonella spp.*
12. *Shigella spp.*
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio spp.*
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 11. *Salmonella spp.*

Este género, como se ha visto, pertenece a la extensa familia Enterobacteriaceae; con la que comparte sus características generales: morfología bacilar, tinción de Gram negativa, no esporulado y respiración aerobia facultativa (Bouëtard & Santos Hernández, 2009). Su crecimiento requiere temperaturas comprendidas entre 5 y 47 °C (con un valor óptimo en torno a 37 °C), y condiciones de pH muy variables (intervalo 3.8-9.5, con valor óptimo 7.7)

(Hernández-Domínguez, Hernández-Anguiano, Cháidez-Quiroz, Rendón-Sánchez & Suslow, 2008).

La actual clasificación de este género diferencia 2 especies: *S. bongori* y *S. enterica*. Ésta última agrupa 7 subespecies; una de las cuales, *S. enterica enterica* (de la que se han descrito casi un millar de serotipos), es causante de la práctica totalidad de las infecciones alimentarias producidas por este género (especialmente, las serovariedades Enteritidis y Typhimurium) (ACSA & UAB, 2021).

Salmonella spp es huésped habitual del tracto intestinal de diversos animales: aves, ganado vacuno y porcino, y animales domésticos. Por tanto, sus heces, las contaminaciones cruzadas derivadas del eviscerado de animales de abasto, y la contaminación endógena de los huevos representan las principales vías de infección. En consecuencia, son alimentos susceptibles de provocar salmonelosis todo tipo de elaboraciones a base de carne, leche o huevo que no reciban un tratamiento término de suficiente intensidad (65-70°C) (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009); o productos vegetales regados con aguas contaminadas, si se consumen crudos y no se realiza una adecuada desinfección (ACSA & UAB, 2021).

La salmonelosis puede presentar distintas formas clínicas: desde una gastroenteritis (causada, principalmente, por los serotipos Typhimurium y Enteritidis); una fiebre entérica, bien sea tifoidea o paratifoidea (debido a las variedades Typhi y Paratyphi); o incluso una infección sistémica invasiva (producida por el tipo Choleraesuis) (Martino Zagovalov, Leyva Castillo, & Puig Peña, 2008).

- 1. *Bacillus cereus*
- 2. *Brucella spp*
- 3. *Campylobacter spp*
- 4. *Clostridium botulinum*
- 5. *Clostridium perfringens*
- 6. *Cronobacter sakazakii*
- 7. *Escherichia coli*
- 8. *Francisella tularensis*
- 9. *Listeria monocytogenes*
- 10. *Mycobacterium spp*
- 11. *Salmonella spp*
- 12. *Shigella spp*
- 13. *Staphylococcus aureus*
- 14. *Vibrio spp*
- 15. *Yersinia enterocolitica*

■ 12. *Shigella spp*.

Como el anterior, este patógeno también pertenece a la familia Enterobacteriaceae; se trata, por tanto de un bacilo gramnegativo con respiración anaerobia facultativa y no

esporulado. Puede crecer en un rango térmico que va de 6 a 47 °C (con una temperatura óptima de 37 °C), y en un amplio intervalo de pH (entre 4.8 y 9.3) (ACHIPIA, 2018).

En este género se distinguen 4 especies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*; todas ellas patogénicas para el ser humano. El principal reservorio es el tracto intestinal del ser humano; por tanto, su transmisión alimentaria está asociada con manipulaciones de higiene precaria y contaminaciones cruzadas (Martino Zagovalov, Leyva Castillo, & Puig Peña, 2008).

Generalmente la shigelosis cursa con fiebre, fatiga, dolor abdominal y diarreas; sin embargo, este cuadro se agrava considerablemente cuando es la especie *S. dysenteriae* la que ocasiona la infección, ya que ésta es capaz de generar la enterotoxina Shiga (similar a la que producen los serotipos *E. coli* STEC), que puede originar un síndrome hemolítico-urémico (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella* spp.
3. *Campylobacter* spp.
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium* spp.
11. *Salmonella* spp.
12. *Shigella* spp.
13. ***Staphylococcus aureus***
14. *Vibrio* spp.
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 13. *Staphylococcus aureus*.

Se trata de un organismo grampositivo, de morfología cocoide, facultativamente anaerobio, mesófilo y no esporulado. Puede crecer entre 7 y 48 °C (con temperatura óptima en torno a los 37 °C), y en un amplio intervalo de pH (desde 4 a 10, con valores óptimos entre 6 y 7). Asimismo, esta especie tiene la capacidad de producir varios tipos de toxinas termoestables en el alimento contaminado (Rey Rodríguez, y otros, 2011).

S. aureus puede sobrevivir en condiciones muy diversas, por lo que puede hallarse en numerosos sustratos: aire, agua, suelo, residuos, superficies...; no obstante, su principal reservorio son los animales, incluido seres humanos. Este patógeno puede colonizar con relativa facilidad mucosas, piel o cabello (entendiendo por colonización el desarrollo de un microorganismo en un hospedador sin provocar infección o reacción inmune) (Rodríguez

Tamayo & Jiménez Quiceno, 2015). Por tanto, cualquier tipo de alimento es susceptible de resultar contaminado con este patógeno a través de una manipulación poco cuidadosa. Especialmente peligrosos son aquellos productos que se manipulan tras su procesamiento térmico o, tras éste, sufren un enfriamiento lento (a temperatura ambiente); ya que si el microorganismo encuentra las condiciones para producir toxinas en el alimento, éstas no se podrán eliminar mediante ningún tipo de tratamiento (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

Entre los distintos tipos de toxinas que puede generar *S. aureus*, comúnmente, las que se asocian a toxiinfecciones alimentarias son las enterotoxinas estafilocócicas. Tras la ingestión del alimento intoxicado, con un margen de pocas horas, se produce un cuadro de gastroenteritis, cuyos síntomas más habituales son hipotensión arterial, náuseas, vómitos y diarreas (Martino Zagovalov, Leyva Castillo, & Puig Peña, 2008).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella spp.*
3. *Campylobacter spp.*
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium spp.*
11. *Salmonella spp.*
12. *Shigella spp.*
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio spp.*
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 14. *Vibrio spp.*

Existen varias especies de este género que pueden resultar patógenas para el ser humano. Entre las más perniciosas se podrían destacar *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Todos ellos son bacilos gramnegativos, halófilos, facultativamente anaerobios y no esporulados (Martino Zagovalov, Leyva Castillo, & Puig Peña, 2008). Asimismo, son organismos mesófilos, cuyo crecimiento se produce a temperaturas entre 10 y 43 °C (con valores óptimos en torno a 37 °C), y un rango de pH que va de 5 a 9.6 (con un valor óptimo de 7.6) (Rodríguez Ferri, y otros, 2012).

Este género se halla muy extendido en ecosistemas acuáticos, tanto de agua dulce como salada. A menudo, ejerce comensalismo sobre distintos tipos de animales marinos, moluscos y crustáceos especialmente. Asimismo, puede sobrevivir de forma prolongada en

aguas con contaminación fecal (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). Por tanto, las toxiinfecciones que ocasiona este patógeno estarán asociadas principalmente a productos del mar (pescado, moluscos y crustáceos) que no han recibido un tratamiento térmico de suficiente intensidad antes de su consumo. También es posible la infección por ingestión de agua contaminada con el patógeno (Rodríguez Ferri, y otros, 2012).

La infección con *V. cholerae* produce la enfermedad del cólera. Una vez ha llegado la bacteria al intestino segrega la toxina colérica, que ocasiona un cuadro caracterizado por náuseas y vómitos, seguidos de diarreas masivas (acuosas y blanquecinas), que dan lugar a una rápida deshidratación. Análogamente, en la infección con *V. parahaemolyticus*, la gastroenteritis es producida por la toxicidad de las hemolisinas que segrega esta especie; patología que cursa con dolores abdominales, vómitos, fiebre y diarrea acuosa (Rojas Ruiz, Muñoz Zurita, Gárate Vélez, González Montesinos, & Del Pozo González, 2013).

1. *Bacillus cereus*
2. *Brucella* spp.
3. *Campylobacter* spp.
4. *Clostridium botulinum*
5. *Clostridium perfringens*
6. *Cronobacter sakazakii*
7. *Escherichia coli*
8. *Francisella tularensis*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Mycobacterium* spp.
11. *Salmonella* spp.
12. *Shigella* spp.
13. *Staphylococcus aureus*
14. *Vibrio* spp.
15. *Yersinia enterocolitica*

▪ 15. *Yersinia enterocolitica*.

El género *Yersinia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Posee varias especies que resultan patógenas para el ser humano; sin embargo, sólo dos de ellas llegan a producir enfermedades de transmisión alimentaria: *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*. Se trata de bacilos gramnegativos, con respiración anaerobia facultativa, psicrótrofos y no esporulados. Pueden crecer en un intervalo térmico que va de -1 a 42 °C (con temperaturas óptimas entre 25 y 32 °C), y en un extenso rango de pH (entre 4.2 y 10, con valores óptimos en torno a 7.6) (ELIKA, 2013).

El cerdo representa el principal reservorio de este patógeno; no obstante, también se puede hallar en otros animales de abasto (vacuno, ovino, caprino, e incluso aves); muy a menudo se encuentra en el tracto intestinal de animales domésticos (Madigan, Martinko,

Dunlap, & Clark, 2009). Por tanto, los alimentos comúnmente asociados a infecciones con *Yersinia* son elaboraciones cárnicas (de cerdo, especialmente) cuyo tratamiento térmico no alcanza temperatura de seguridad; asimismo, podría vincularse a leche y derivados lácteos no pasteurizados, y agua no tratada (Santos Buelga, y otros, 2018). Las elaboraciones a base de huevo crudo o con un tratamiento térmico reducido (mahonesas, cremas, helados...), comidas preparadas envasadas al vacío o en MAP, u otras elaboraciones susceptibles de sufrir contaminación posterior a su cocción, poseen un riesgo implícito siempre que subsiga su almacenamiento refrigerado, dado el carácter psicrófilo de este patógeno (ELIKA, 2013).

La yersiniosis se muestra más agresiva en niños y personas de avanzada edad; puede presentar diversos cuadros clínicos, sin embargo, la gastroenteritis resulta el más habitual. Patología de diversa intensidad que cursa con fiebre, dolores abdominales y diarreas, con frecuencia hemorrágicas (Santos Buelga, y otros, 2018).

1.5. CALIDAD MICROBIOLÓGICA vs CALIDAD GASTRONÓMICA

Para concluir la introducción, esta última sección agrupa una serie de epígrafes de diversa índole temática. Dicha miscelánea pretende aportar cierta completitud a este capítulo introductorio.

Conforme a los antecedentes expuestos a lo largo de la introducción, esta sección se inicia con la concreción de una hipótesis de trabajo; a la que sigue una breve argumentación justificativa de la combinación de técnicas de barrera que se aplica en este estudio. Lo que enlaza con un informe de la situación que atraviesa la tecnología de procesado con altas presiones hidrostáticas en el sector alimentario.

El último epígrafe presenta resumidamente unos apuntes sobre metodologías de evaluación sensorial.

1.5.1. UNA HIPÓTESIS DE TRABAJO

En todo esfuerzo investigador, ya esté impulsado por una acuciante necesidad o por pura satisfacción del conocimiento, siempre subyace el afán de mejorar.

Tanto los trabajos cuyas conclusiones llegan a cambiar el mundo, como aquellos que no conducen hasta ningún resultado positivo, todos comparten un origen en cierto modo semejante: una apreciación, una conjetura, a veces, sólo una sospecha poco coherente, surgida de un contexto inexplicable, problemático o, simplemente, perfectible.

Desde esa percepción germinal, se produce la ideación de una serie de suposiciones que, presumiblemente, debieran conducir hacia el objetivo que se perseguía (explicación, solución o adelanto); cuya veracidad o validez habría que constatar, en cualquier caso. Tal

es, en síntesis, la diacronía de un proceso de investigación; la serie de suposiciones que lo vertebran se conocen como *hipótesis de trabajo*.

Es momento de suponer.

Actualmente, según se ha indicado, la cocción *sous vide* es una técnica muy extendida en el ámbito de la restauración comercial. Dicha técnica persigue, primordialmente, una significativa mejora de la calidad gastronómica de las elaboraciones; algo que se obtiene a expensas de una reducción de intensidad en el tratamiento térmico que se aplica al alimento.

Reducción térmica que lleva aparejada, inevitablemente, un detrimento a ponderar en la tasa de higienización del producto. Realizar esta ponderación, sin embargo, a menudo no resultará ni fácil ni fiable.

Habría que definir, en primer lugar, las condiciones más probables en que se realizan este tipo de elaboraciones: un régimen productivo con grado de estandarización limitado o poco relevante, con un sistema de aprovisionamiento de materias primas orientado a la estacionalidad o la oferta de mercado, y donde el factor humano juega un papel primordial en la manipulación y preelaboración de géneros en crudo, a menudo, en unas instalaciones infradimensionadas. Generalización ésta que podría englobar a buena parte de las cocinas de restauración directa.

En tales condiciones, se podría presumir que los límites entre la minimización térmica de la cocción *sous vide* y una defectuosa calidad microbiológica, no siempre van a resultar suficientemente claros.

Situación que aún puede generar mayor incertidumbre en ciertas formulaciones: tal es el caso de aquellas modalidades de cocción *sous vide* que se realizan muy por debajo del umbral térmico de seguridad ($T_{sv} \ll 65\text{ °C}$); donde toda la fiabilidad microbiológica queda

depositada en una deseable irrelevancia de la carga microbiana inicial de la materia prima, y en la esperanza de su modélica manipulación en frío. Eventualidades de cuestionable solidez, que dejan margen a la desconfianza; que en ningún caso ofrecen absoluta garantía de inocuidad.

Este horizonte de riesgo induce a una averiguación diversa:

Genera una duda razonable acerca de la seguridad de alguna de las modalidades de esta técnica de cocinado; e insta, por tanto, a una evaluación de su peligrosidad potencial en condiciones promedio. En la presentación de la metodología *sous vide* (epígrafe 1.2.8) esta incertidumbre de carácter genérico ya se planteaba mediante diferentes interrogantes específicos.

Por otra parte, cuando la minoración del tratamiento térmico afecte sensiblemente al equilibrio entre una máxima preservación de las cualidades organolépticas del producto y su adecuada calidad microbiológica, habría que valorar otras opciones de higienización. La combinación sinérgica de distintos tratamientos puede resultar una alternativa eficaz, siempre que se elija convenientemente qué tipo de procesos se asocian.

Existe, como se verá seguidamente, una gran diversidad de técnicas que se emplean en la conservación alimentaria. Sería deseable, en este caso, que la cocción *sous vide* se complementara con algún tratamiento que presente una importante capacidad germicida y, a la par, no implique un menoscabo significativo de las características sensoriales de la elaboración culinaria.

Acaso, una de las opciones que pueda ofrecer mejores resultados sea el tratamiento con altas presiones hidrostáticas. Su elección, entre muchas posibles, se argumentará al menos brevemente en el epígrafe siguiente (1.5.2).

Finalmente, habrá que constatar la validez de la solución propuesta, mediante una estimación de la medida en que se ve influenciada la calidad microbiológica y sensorial del producto bajo distintas parametrizaciones del tratamiento hiperbárico.

1.5.2. UNA COMBINACIÓN ENTRE MUCHAS POSIBLES

Según se ha visto, las opciones que permite actualmente la tecnología en el ámbito de la conservación alimentaria son bastante numerosas. Si se considera, además, que la metodología de combinación de barreras se fundamenta, precisamente, en la asociación sinérgica de dos o más técnicas, el número de posibilidades que arroja tal combinatoria es elevadísimo.

No obstante, una combinación apropiada exige cierto grado de complementariedad entre las técnicas empleadas y el tipo de producto a que se apliquen. En el caso concreto de las elaboraciones *sous vide*, que buscan por definición un mínimo deterioro de la calidad gastronómica, resultaría contraproducente su asociación con cualquier técnica que reduzca dicha calidad. Asimismo, cualquier técnica que se conjugue con la cocción *sous vide* deberá compensar la presumible debilidad de ésta: su calidad microbiológica.

Un tratamiento adicional con altas presiones hidrostáticas acaso represente una de las soluciones más simples, limpias y efectivas, de cuantas permita concebir la abundante combinatoria de la tecnología de barreras.

Distintas particularidades sugieren la idoneidad de esta opción:

Se trata de una alternativa simple; en cuanto a que requiere un único tratamiento adicional (en contraposición a posibles combinaciones que involucran barreras múltiples). Un hecho que, junto a su reducido tiempo de aplicación (pocos minutos), se traduce en mayor operatividad.

Simplicidad ésta que, por otra parte, aporta mayor contraste y nitidez a las relaciones causa-efecto; esto es, permitirá determinar cómo influye la variación de los parámetros del procesamiento hiperbárico en la calidad final del producto (sin interferencia o afectación de variables de otros tratamientos).

Es una técnica estrictamente mecánica; por tanto, no incorpora al alimento ningún tipo de aditivo o residuo indeseable. Tampoco ocasiona modificaciones estructurales de consideración, por lo que su impacto global sobre la calidad sensorial del producto debe resultar poco significativo.

Y, por supuesto, esta técnica posee una contrastada capacidad de inactivación de formas vegetativas de todo tipo de microorganismos.

Por otra parte, la considerable expansión que ha experimentado esta tecnología en los últimos años evidencia una creciente accesibilidad; lo que permite presumir que pronto pueda convertirse (si no lo es ya) en una opción factible para la restauración comercial (por costes y volumen).

La situación actual del procesado HHP (en España, especialmente) se revisará en el siguiente epígrafe.

1.5.3. TECNOLOGÍA HPP: ACTUALIDAD Y TENDENCIAS

Hace sólo una década el procesado con altas presiones se consideraba una *tecnología emergente*; en la actualidad, las cifras de producción evidencian que este tipo de procesos ha alcanzado una fuerte implantación en la industria alimentaria.

A finales de 2019 se hallaban operativos en todo el mundo 550 equipos industriales de alta presión destinados al procesado alimentario (con capacidades entre 35 y 525 dm³; sin contabilizar equipos I+D), con un volumen total de presurización de unos 130000 litros.

Cuya producción en 2018 ascendió a un valor de casi 12 mil millones de euros; estimándose que en 2023 dicha cifra puede incrementarse hasta alcanzar los 23 mil millones de euros (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021).



GRÁFICO 2. Expansión del procesado industrial HHP : número de líneas productivas (escala mundial)

Adaptado de: (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021)



GRÁFICO 3. Tecnologías no térmicas más empleadas en 2020

Adaptado de: (Khouryieh, 2021)

En última instancia, la expansión que ha experimentado la tecnología HPP se sustenta en la percepción general que tiene el consumidor sobre este tipo de productos; los cuales

se suelen asociar con un menor grado de procesamiento y ausencia (o contenido inferior) de aditivos y conservantes; identificándose, en definitiva, con alimentos más saludables, frescos y naturales. Una favorable percepción que situó al procesado HHP a la cabeza de las tecnologías no térmicas empleadas por la industria alimentaria en 2020 en los Estados Unidos de América (Khouryieh, 2021).

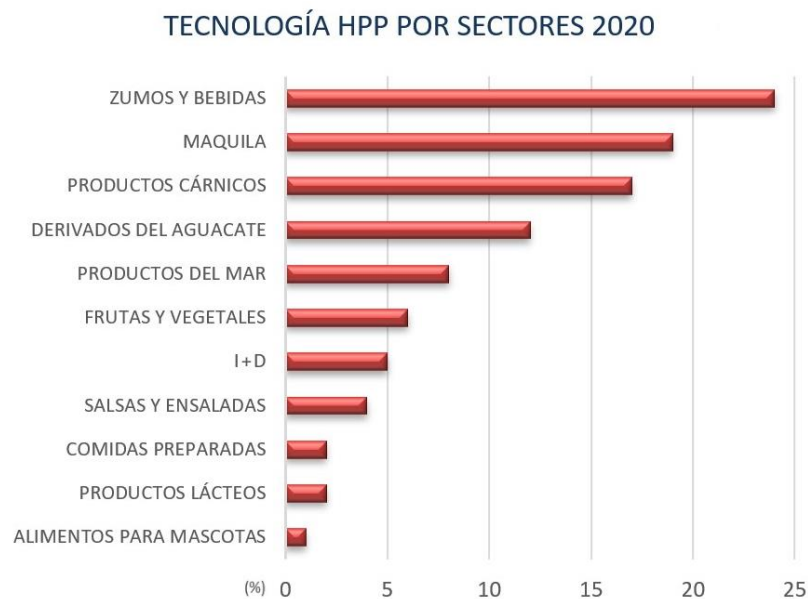


GRÁFICO 4. Tecnología HPP por sectores (distribución mundial 2020)

Adaptado de: (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021)

Expansión que simultáneamente ha supuesto una diversificación de las aplicaciones de esta tecnología. Hace unos años los alimentos tratados eran mayoritariamente líquidos y la finalidad del tratamiento esencialmente higienizante, en la actualidad se procesan todo tipo de alimentos: carnes, pescados y mariscos, frutas y hortalizas, comidas preparadas... (Gráfico 4), con propósitos muy distintos (incremento de la vida útil, efectos texturizantes, activación de enzimas o promover procesos fermentativos). Entre la creciente diversidad de aplicaciones del procesado HHP se encuentran: la extracción de carne de crustáceos y apertura de moluscos bivalvos, o *shucking* (Martínez, y otros, 2017), (Ye, y otros, 2021)

(véase *Ilustración 16*); estabilización microbiológica de cervezas (Santos, Oliveira, Ferreira, & Rosenthal, 2017); reducción de sulfitos y estabilización de vinos (Van Wyk, Farid, & Silva, 2018); alimentos infantiles y para neonatos (Kultur, y otros, 2018); comida para mascotas (Neshovska, Shindarska, & Kirov, 2020); fermentación de alimentos mediante bacterias probióticas (Mota, y otros, 2018); o la higienización de algas sin reducción de a_w (Del Olmo, Picón, & Núñez, 2020).



ILUSTRACIÓN 16. Extracción de carne de marisco mediante HPP
Obtenido de: www.shediacobster.ca

Según el *Gráfico 4*, en 2020 un 19 % del volumen productivo total HPP correspondió al sector *maquila* (o *tolling*). Nombre con que se conoce la subcontrata o arrendamiento de servicios de procesado HPP a pequeños productores por parte de la empresa propietaria del equipo; un modelo de explotación que posibilita el acceso a esta tecnología a empresas incipientes o cuyo volumen de negocio no permite grandes inversiones.

A finales de 2019, unas 50 empresas en todo el mundo ofrecían servicio maquila HPP; de las cuales, 6 de ellas lo hacían en España (véase *Tabla 7*) (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021). Número éste que se había incrementado a 10 en abril de 2021 (véase *Tabla 8*). Una rapidez en la evolución de las cifras que da cuenta del gran auge que experimenta esta tecnología.

	COMPañÍA	WEBSITE	PAÍS
1	Longfresh	http://www.longfresh.com.au/	Australia
2	HiFood Tec	https://hifoodtec.be/	Belgium
3	HPP services	https://hppservices.be/	Belgium
4	Aquabar	https://www.aquabar.bg/	Bulgary
5	HPP services Canada	https://www.hppservicescanada.com/	Canada
6	HPP West Coast	http://www.hppwestcoast.com/	Canada
7	Natural HPP	https://naturalhpp.com/	Canada
8	Alta HPP services	http://www.altahpp.com/	Chile
9	Natural safe	http://www.naturalsafe.cl	Chile
10	Campo	http://carpofoods.com.co/	Colombia
11	HPP center	https://www.hppcentre.fr/	France
12	HPP Atlantique	https://hppatlantique.fr/	France
13	HPP Deutschland	https://hpp-deutschland.de/	Germany
14	High pressure process Tolling	https://www.hpptolling.com/	Ireland
15	HPP Italia	https://www.hppitalia.com/	Italy
16	SterilParma	http://www.sterilparma.com/	Italy
17	HPP food Mexico	https://www.hppfoods.mx/	Mexico
18	Fruity line	https://fruity-line.nl/	The Netherlands
19	Pascal processing	https://www.pascalprocessing.com/	The Netherlands
20	WLNA	http://www.wlna.com.sg/	Singapore
21	HPP South Africa	http://sahpp.co.za/	South Africa
22	Accua HPP solutions	https://www.accuahpp.com/	Spain
23	APA processing	http://apaprocessing.com/	Spain
24	Fruselva	http://www.fruselva.com/	Spain
25	Idro	http://idro.es/	Spain
26	Itacyl	http://www.itacyl.es/	Spain
27	MRM	http://www.mrm.es/	Spain
28	Woo Yang	http://www.foodkorea.com/	South Korea
29	HPP Nordic	http://hppnordic.se/	Sweden
30	HPP competence	https://hppcompetence.ch/	Switzerland
31	KFS	http://www.kfs-foodtech.com/	Taiwan
32	Smart foods solutions	https://www.sfoods.ae/	UAE
33	Deli 24	http://deli24.co.uk/	United Kingdom
34	Sunmagic	https://sunmagic.co.uk/	United Kingdom
35	American pasteurization company	https://www.americanpasteurizationcompany.com/	USA
36	Dora's natural	http://www.dorasnaturals.com/	USA
37	Fresh advantage	http://www.fresherpressure.com/	USA
38	Green plant	http://www.greenplant.com/	USA
39	HPPLA	https://hpplosangeles.com/	USA
40	HPP food services	https://www.hppfs.com/	USA
41	HPP fresh Florida	https://www.hppfreshflorida.com/	USA
42	Hydrofresh HPP	https://hydrofreshhpp.com/	USA
43	Great Lakes HPP	http://greatlakeshpp.com/	USA
44	Intermountain HPP	https://intermountainhpp.com/	USA
45	Lineage	https://www.lineagelogistics.com/	USA
46	Maryland packaging	https://marylandpackaging.com/	USA
47	Nutrifresh	https://www.nutrifreshservices.com/	USA
48	Texas food solutions	http://texasfoodsolutions.com/	USA
49	True fresh	https://truefreshhpp.com/	USA
50	Universal pure	https://universalpure.com/	USA
51	Vincent Giordano	http://www.vgiordano.com/	USA

TABLA 7. Empresas con servicio tolling en 2019 (por países)

Adaptado de: (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021)



	COMPAÑÍA	WEBSITE	PROVINCIA
1	Accua HPP solutions	https://www.accuahpp.com/	Elgóibar (Guipúzcoa)
2	Anfaco-Cecopesca	http://www.anfaco.es/	Vigo (Pontevedra)
3	APA processing	http://apaprocessing.com/	Barcelona
4	Citytex	http://cicytex.juntaex.es/	Guadajira (Badajoz)
5	Comercial Logística Calamocha	https://www.comerciallogistica.com	Teruel
6	Frumaco	http://www.frumaco.com/	Vélez-Málaga (Málaga)
7	Fruselva	http://www.fruselva.com/	La Selva del Camp (Tarragona)
8	Idro	http://idro.es/	Getafe (Madrid)
9	Itacyl	http://www.itacyl.es/	Valladolid
10	MRM	http://www.mrm.es/	Móstoles (Madrid)

TABLA 8. Empresas con servicio tolling en España 2021

Elaboración propia a partir de: (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021 y www.hiperbaric.com)



ILUSTRACIÓN 17. Equipos HPP fabricados por Hiperbaric

Obtenido de: (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021)

Entre los principales fabricantes de equipos de altas presiones a escala industrial se hallan *Hiperbaric* (Burgos, España), *UHDE High-Pressure Technologies* (Hagen, Alemania) y *Avure Technologies* (Västerås, Suecia) (Ghafoor, y otros, 2020). La empresa española, en concreto, ha experimentado un fuerte crecimiento en los últimos años: a finales de 2014 había instalado 140 equipos, mientras que actualmente supera los 300 (lo que supone en torno a un 50 % de cuota de mercado). Su maquinaria opera en los cinco continentes,

siendo una de las pocas empresas del sector que cuenta con las certificaciones necesarias para la instalación de máquinas en cualquier país del mundo (Balasubramaniam, Barbosa-Cánovas, & Lelieveld, 2016). *Hiperbaric* fabrica equipos de distinta volumetría (con cámaras de presurización desde 55 a 525 dm³) de producción envasada (*in pack*); cuenta también con equipos de procesamiento de líquidos granel (*in bulk*), cuyo modelo con mayor capacidad (1050 dm³) alcanza una producción de 8000 litros/hora (véase *Ilustración 17*).

La creciente implantación de esta tecnología no sólo supone una mayor accesibilidad, sino también un abaratamiento. Una estimación de costes de procesamiento HPP publicada en 2016 (Balasubramaniam, Barbosa-Cánovas, & Lelieveld, 2016), donde se incluyen gastos de amortización de equipo, costes energéticos y de mantenimiento, bajo una parametrización de procesamiento de 600 MPa y 3 minutos de retención, con un aprovechamiento del volumen de cámara de un 60 %, usando el equipo de mayor productividad (cámara de presurización de 525 dm³), ofrece como resultado unos 7 céntimos de euro por kilogramo de alimento; coste que se duplica en caso de emplear el equipo de menor capacidad (cámara de 55 dm³). Los diferentes costes según la capacidad del equipo utilizado se detallan en la siguiente tabla:

	VOLUMEN CÁMARA DE PRESURIZACIÓN (dm ³)					
	55	120	135	300	420	525
COSTE PROCESADO HPP (€/kg)	0,140	0,102	0,117	0,079	0,074	0,071

TABLA 9. Estimación de costes de procesamiento HPP según capacidad del equipo

Obtenido de: (Balasubramaniam, Barbosa-Cánovas, & Lelieveld, 2016)

En una estimación de costes de procesamiento publicada más recientemente (González-Angulo, Serment-Moreno, Queirós, & Tonello-Samson, 2021), con igual parametrización que el caso anterior (600 MPa, con 3' de tiempo de retención), considerando consumo de

energía, desgaste de maquinaria y amortización en 10 años, con sólo un aprovechamiento del volumen de cámara del 50 %, en un equipo que opera 16 horas al día durante 300 días al año, el gasto por kilogramo de alimento supone 0,05 € en el equipo de mayor capacidad (cámara de 525 dm³) y 0,11 € en el equipo más pequeño (cámara de 55 dm³); estimación que, como en el caso anterior, no incluye mano de obra. Unos costes de procesado que, en general, resultan inferiores a los costes de envasado.

Dado que los costes de procesado resultan asequibles, y que el precio de un equipo HPP oscila entre 500000 € y 2500000 € (según la capacidad de su cámara de presurización) (Balasubramaniam, Barbosa-Cánovas, & Lelieveld, 2016), inversión considerable, aunque asumible por ciertas empresas de restauración colectiva (medianos y grandes cáterings), especialmente si parte de esa inversión se rentabiliza mediante *tolling*, podría ocurrir que el número de empresas maquiladoras continúe en aumento y, al igual que ya sucedió con otras tecnologías, el procesado HPP rebase el estricto ámbito de la industria alimentaria para volverse accesible a volúmenes de producción mucho más modestos.

Un escenario factible, acaso bastante cercano.

1.5.4. INICIACIÓN AL ANÁLISIS SENSORIAL DE ALIMENTOS

El análisis sensorial es una disciplina que, mediante metodología científica, persigue una evaluación, interpretación o medida de los estímulos que provocan en el consumidor las propiedades de los alimentos; considerada esta percepción globalmente, a través de todos sus sentidos (Stone & Sidel, 2004).

Esta ciencia trata de establecer una vinculación cuantitativa y específica entre los atributos de los alimentos y la percepción que el individuo tiene de ellos. Para ello, combina métodos de evaluación conductual con la observación y la cuantificación de las respuestas

humanas (Lawless & Heymann, 2010). Como disciplina, el análisis sensorial surge de la necesidad de conocer el grado de aceptación que tienen los productos, o cuál es la calidad de éstos en opinión del consumidor (Hernández Alarcón, 2005).

En este proceso de cuantificación se emplean un conjunto de técnicas que intentan minimizar, si no eliminar, cualquier posible efecto de sesgo o condicionamiento en la percepción y respuesta del consumidor. Procurando, asimismo, una evaluación separada de los distintos atributos de los alimentos, de modo que la información obtenida posea un mayor nivel de concreción y, por tanto, mayor utilidad en la investigación alimentaria y el desarrollo de productos (Lawless & Heymann, 2010). Una información de gran importancia que la industria alimentaria utiliza desde las primeras etapas de diseño de sus productos; y que no sólo se aplica a la innovación de su oferta, sino también en otros ámbitos del proceso productivo: ya sea la optimización de alimentos existentes en el mercado (de modo que su calidad no deje de satisfacer las expectativas del consumidor) (Hernández Alarcón, 2005), la evaluación de posibles mejoras en su sistema de producción (con el fin de reducir costes), o una estimación cualitativa de vida útil (para valorar el deterioro que sufren sus propiedades organolépticas con el tiempo) (Stone & Sidel, 2004).

La percepción no es un fenómeno idéntico y universal; antes bien, cada individuo posee una forma peculiar de percibir. Esta singularidad en la manera de sentir atributos y sucesos, sumativamente, hace que no haya dos sujetos con la misma representación del mundo. Diferenciación que se acentúa con las especificidades circunstanciales de cada individuo (educación, entorno social y cultural, estilo de vida, etc). Fisiológicamente, la percepción consiste en la transmisión nerviosa de informaciones que captan los receptores sensoriales; una vez en el cerebro, los estímulos son decodificados e interpretados. Es en este proceso de interpretación donde el sujeto añade a la información recibida sus propias

asociaciones psicológicas; incorporando una carga de subjetividad a la información. En este hecho reside la importancia del entrenamiento de los miembros de un panel de cata: cada uno de sus juicios serán inevitablemente interpretaciones personales, de las que habrán aprendido a separar la mayor parte de su aportación individual y subjetiva (Wittig de Penna, 2001).

Precisamente, una de las metas más ambiciosas de esta disciplina es el desarrollo de un método absolutamente objetivo para la valoración de las características organolépticas de los alimentos. En el análisis sensorial, el factor humano aún no ha podido ser sustituido por técnicas instrumentales: no existe ninguna tecnología capaz de reproducir la amplitud y sensibilidad de la percepción (aspecto, textura, aroma, sabor...) de un panelista bien entrenado (Mondino & Ferratto, 2006). El análisis sensorial de alimentos requiere que los juicios de los paneles de cata resulten veraces, sensibles y reproducibles (Wittig de Penna, 2001), sólo así se dispondrá de una información fiable sobre la calidad del producto (o qué grado de aceptación puede recibir por parte del consumidor), y cuáles son sus atributos sensoriales mejor valorados (Osorio-Oviedo, 2019).

Según los objetivos de la prueba, en la evaluación sensorial se distinguen dos tipos de técnicas: analíticas y hedónicas (también denominadas *afectivas*). Entre las analíticas, a su vez, se hallan las pruebas descriptivas y discriminativas. En cada uno de estos tipos, la selección de los evaluadores se lleva a cabo atendiendo a criterios diferentes (Lawless & Heymann, 2010). Estas metodologías de análisis sensorial, compendiosamente, presentan las siguientes características:

- Técnicas descriptivas. Esta modalidad de análisis es la que presenta un mayor grado de sofisticación y, por tanto, la que requiere jueces con una mejor preparación: mientras que en otros tipos de pruebas se debe emitir un único juicio como resultado global de la

percepción, en las pruebas descriptivas se deben emitir numerosos juicios por producto en una escala compleja. Con este tipo de técnicas se pretende cuantificar con qué intensidad se perciben cada una de las propiedades organolépticas de un producto; obteniendo así su completa y precisa descripción sensorial. La información que suministran permite mapear diferencias y semejanzas entre productos, establecer relaciones causales y dilucidar qué atributos contribuyen en mayor medida a la aceptación del producto (Stone & Sidel, 2004).

- Técnicas de discriminación. Esencialmente, el propósito de estas pruebas es tratar de determinar la existencia de diferencias perceptibles entre dos muestras de alimentos. En ciertos casos, se tratará de una valoración estrictamente cualitativa (existe o no existe diferencia), y en otros cuantitativa (estimación de su importancia o magnitud). Los subtipos más habituales son las comparativas (ya sean simples o múltiples) y las de ordenamiento (Cárdenas-Mazón, y otros, 2018). Una vez se ha determinado la diferencia entre productos, se podrían realizar otras pruebas de naturaleza descriptiva para identificar dónde radica la diferencia de los productos; pero en ningún caso los test discriminatorios debieran incluir preguntas sobre preferencias (Stone & Sidel, 2004).

- Técnicas hedónicas o afectivas. Este tipo de pruebas suponen la formulación de juicios simples, que emiten evaluadores no entrenados. Son pruebas que albergan bastante subjetividad, y que reportan una información muy limitada; por lo que precisan, en general, una adecuada interpretación. Pueden plantear una mera disyunción (agrado o rechazo de un producto), una preferencia comparativa (cuál de los productos comparados se prefiere), o incluso un test de escalado (valoración numérica de distintos productos comparados) (Stone & Sidel, 2004). La evaluación de carácter hedónico, habitualmente, se orienta hacia una estimación estadística del grado de aceptación que podría generar un determinado alimento en un consumidor promedio (Lawless & Heymann, 2010).



2. OBJETIVOS

Considero un triste reflejo de nuestra civilización el hecho de que podamos medir la temperatura de la atmósfera de Venus y, sin embargo, no sepamos qué ocurre en el interior de un soufflé.

Nicholas Kurti (1969)

Si bien en distintos epígrafes de la introducción precedente ya se apuntan buena parte de los propósitos capitales de este trabajo, seguidamente se procede a explicitar con mayor orden y detalle los objetivos que lo fundamentan.

Esencialmente, el objetivo general del presente trabajo estriba en un análisis de la correlación existente entre la calidad gastronómica y la calidad microbiológica de distintos alimentos elaborados mediante cocción *sous vide* (en diversas modalidades), así como en una evaluación de la medida en que estas calidades se ven afectadas cuando dichos tratamientos térmicos se combinan con algún tipo de procesamiento hiperbárico.

Concretamente, este amplio propósito alberga diversos objetivos específicos, que a continuación se enumeran:

1. Ya que en este género de cocciones la preservación de la calidad organoléptica del alimento se consigue mediante una significativa disminución de la intensidad térmica del procesado (muy considerable según qué modalidades SV), se plantea una estimación de la tasa de higienización que se alcanza en productos SV de

variada naturaleza (vegetal, carne y pescado); realizando dichas elaboraciones a partir de materias primas de I gama en unas *condiciones iniciales promedio*³.

La eficacia higienizante del procesamiento térmico se dilucida, en cada caso, mediante la cuantificación de la vida útil del producto (la cual se realiza conforme a la normativa vigente aplicable a este tipo de alimentos preparados).

2. Se propone, asimismo, un estudio comparativo de cómo se ve afectada su vida útil cuando se aplica un tratamiento hiperbárico adicional a cada una de estas elaboraciones SV.

Estudio que trasciende el ámbito estrictamente cuantitativo, y pretende tanto la identificación de las especies bacterianas presentes en el sustrato alimentario, como la evolución de sus poblaciones durante el periodo de vida útil.

3. En el caso de aquellas cocciones SV que se realizan por debajo del umbral térmico de seguridad (temperaturas de subpasteurización: $T_{cp} < 63\text{ }^{\circ}\text{C}$; habitualmente, de modalidad directa), se persigue una constatación (ya sea positiva o negativa) de la viabilidad de su almacenamiento refrigerado cuando reciben un tratamiento hiperbárico adicional; esto es, la posibilidad de su comercialización en modalidad indirecta.
4. Por otra parte, se pretende realizar una evaluación de la influencia que ejercen los distintos parámetros del tratamiento hiperbárico sobre la calidad del alimento (principalmente, sobre su calidad microbiológica).
5. Dado que un minucioso análisis organoléptico de los productos procesados bajo diferentes combinaciones de tratamientos excedería ampliamente los propósitos

³ Entiéndase por *condiciones iniciales promedio*: materias primas con un grado de frescura bastante aceptable, sometidas antes de su envasado a una cuidadosa manipulación alimentaria (tal que minimice el incremento de la carga microbiana inicial del alimento).

de este trabajo, se proyecta siquiera una comparativa elemental, una valoración de carácter hedónico que al menos permita identificar las modificaciones más apreciables que pudieran experimentar los principales atributos sensoriales de los distintos productos SV tras recibir tratamiento con altas presiones.

Dicha valoración la lleva a cabo un público que carece de entrenamiento en cata, y que se selecciona de forma aleatoria.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Comprender lo que se hace es el procedimiento más simple para cocinar con éxito.

Harold McGee (2010)

Se eligieron tres elaboraciones de naturaleza muy distinta (vegetal, carne y pescado), precisamente, por la importante diferencia de los tratamientos térmicos que requieren cada una de ellas (téngase en cuenta la importancia que se concede en la cocción SV a la minimización de la intensidad del tratamiento térmico, con el objeto de preservar la calidad sensorial del producto). Circunstancia que supuso la aplicación de temperaturas y tiempos de cocción muy dispares (desde una alta pasteurización hasta un procesado muy por debajo del umbral térmico de seguridad, o tiempos de cocción desde un día a sólo unos minutos).

En concreto, tales elaboraciones fueron:

- Elaboración_A: Judías verdes con jamón y cebolla.
- Elaboración_B: Pierna de cordero en su jugo.
- Elaboración_C: Lomo de bacalao con pilpil emulsionado.

3.1. PROCESADO PREVIO DE LAS MATERIAS PRIMAS

Como ya se ha indicado, en la cocción SV la carga microbiológica inicial del género resulta un factor relevante (mucho más a medida que decrece la intensidad del tratamiento aplicado). Por tanto, no sólo se emplearon géneros de una aceptable frescura, sino que éstos se sometieron a una cuidadosa manipulación. En todos los casos, concluida la fase de preelaboración, los géneros se refrigeraron hasta temperatura de envasado ($T \leq 3\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Se detallan a continuación los procesos que recibieron las materias primas de las distintas elaboraciones.

3.1.1. ELABORACIÓN_A: JUDÍAS VERDES

Este vegetal, a diferencia de carne o pescado, permitió una higienización previa por inmersión en agua ligeramente clorada. En concreto, el procedimiento que se aplicó fue el siguiente:

- Lavado somero de las vainas en agua corriente.
- Inmersión durante 3 minutos en una dilución acuosa con lejía apta para desinfección de agua de bebida (1,5 ml de lejía por litro de agua).
- Aclarado con abundante agua fría, y posterior escurrido.
- Troceado de las vainas: porciones de alrededor de 2 gramos.

Por otro lado, como base o complemento de cocción (a modo de líquido de gobierno), se sofrío cebolla blanca en aceite de oliva virgen extra (fuego moderado; alrededor de 15 minutos). Al retirarse del fuego, se incorporó seguidamente un picadillo de jamón serrano;

el cual se integró con la cebolla, antes de tapar el recipiente y dejar reposar el conjunto, recibiendo así una suave cocción por el calor residual.

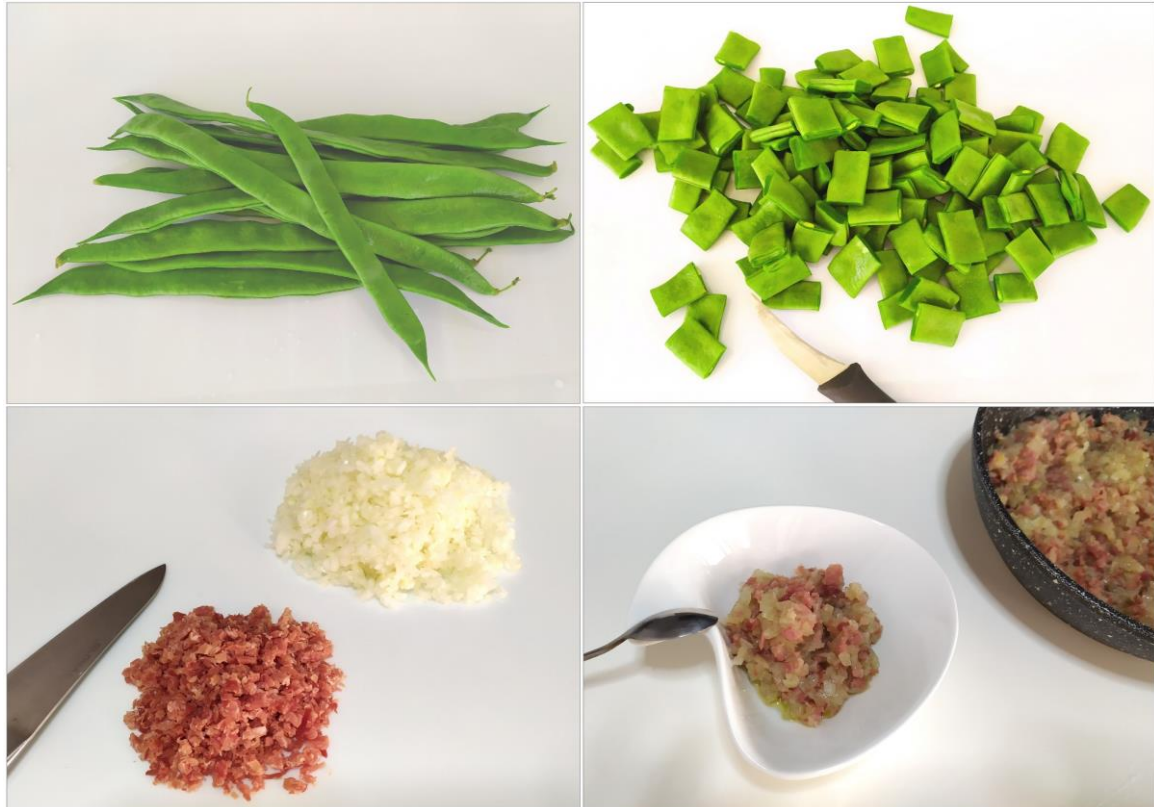


ILUSTRACIÓN 18. *Procesado previo de las judías verdes*

(Elaboración propia)

3.1.2. ELABORACIÓN_B: PIERNA DE CORDERO

Análogamente, en la manipulación del cordero se extremó la higiene de superficies, útiles y procesos. Éstos consistieron en:

- Retirada parcial del sebo subcutáneo.
- Deshuesado.
- Porcionado: a razón de 8-10 gramos.

Como líquido de gobierno, se elaboró un jugo de cordero tradicional. Para ello se aprovecharon huesos, tejido conectivo y porciones de carne de menor calibre que, junto a

un conjunto de hortalizas (cebolla, zanahoria, puerro, apio, ajo...) y elementos aromáticos (perejil, laurel, pimienta...), se hornearon hasta alcanzar un dorado de cierta intensidad. Conseguida la coloración adecuada y tras su inmersión en agua fría, la mixtura se sometió a suave y prolongada ebullición hasta obtener una decocción sustanciosa; la cual, una vez filtrada, se trabó ligeramente con almidón, y se puso a punto de sazón.



ILUSTRACIÓN 19. *Procesado previo del cordero*
(Elaboración propia)

3.1.3. ELABORACIÓN_C: LOMO DE BACALAO

Se adquirió bacalao entero (eviscerado), tan fresco como permitió el mercado. Dado que el tratamiento térmico a aplicar sería de baja intensidad, durante las diferentes fases de la preelaboración se aplicó una continua y sistemática limpieza de superficies y útiles de

trabajo, con objeto de minimizar la carga microbiana aportada al pescado durante su manipulación. Las preelaboraciones realizadas fueron las siguientes:

- Desescamado: considerando diversos factores (piel, aletas y cabeza se emplearon para preparar la salsa de acompañamiento; ésta no superó los 70-75 °C de temperatura durante su elaboración; las escamas albergan una alta concentración de microorganismos), este proceso se realizó exhaustivamente, aplicando en su transcurso sucesivos enjuagues con agua corriente.

- Extracción de lomos, desespinado y desollado: operaciones que, al ir aumentando la superficie de exposición de la musculatura, incrementan a la par la probabilidad de su contaminación; por tanto, se realizaron entre la reiterada limpieza de superficies y útiles de corte.

- Seccionado, limpieza y desangrado de la cabeza: una vez cortada en dos y saneada, se mantuvo inmersa en agua fría alrededor de 30 minutos.

- Porcionado de los lomos: 8-12 gramos/porción.

La base de cocción (líquido de gobierno), en este caso, fue una emulsión estable de aceite de oliva virgen extra variedad picual. Estabilidad que le proporcionó la gelatina del bacalao. Para ello, se doraron en aceite unos ajos laminados y unas guindillas; ambos, sólidos y líquido se reservaron por separado. Por otra parte, pieles, aletas y cabeza se cubrieron con aceite de oliva y se confitaron entre 70 y 75 °C durante 25-30 minutos (hasta que los restos de pescado hubieron exudado suficiente gelatina); filtrándose seguidamente el conjunto (despreciando sólido y reservando líquido). Una vez éste se hubo entibiado, se separó toscamente su fase acuosa (gelatina) del aceite de confitado. Para incorporar a continuación sobre la gelatina, poco a poco y emulsionando la mezcla con colador de malla, tanto el aceite aromatizado con ajo como el del confitado.



ILUSTRACIÓN 20. *Procesado previo del bacalao*
(Elaboración propia)

3.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para el envasado de las diferentes muestras se emplearon bolsas de polipropileno y poliamida biorientada para uso alimentario; de un grosor de 90 micras.

En el envasado todas las elaboraciones, tanto el elemento principal (crudo) como el complemento de cocción (o líquido de gobierno), se hallaban a una temperatura adecuada ($T \leq 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) para alcanzar un correcto porcentaje de vacío. Una vez ensamblados en las bolsas los componentes de las distintas elaboraciones, se aplicó a éstas una presión de vacío de 95 KPa, termosellándose a continuación. Para ello se empleó una envasadora de vacío marca Sammic modelo SE-204.



ILUSTRACIÓN 21. Envasadora Sammic SE-204

Obtenido de: www.sammic.es

Cada una de las muestras contenía alrededor de 25 g de elemento principal, y entre 8 y 12 gramos de su correspondiente base de cocción (o líquido de gobierno).



ILUSTRACIÓN 22. Envasado de muestras
(Elaboración propia)

3.3. TRATAMIENTO TÉRMICO DE LAS MUESTRAS

El tratamiento térmico se realizó en un róner (baño maría con circulación de agua y termostato de precisión) marca Garhe modelo SV-Pro; con operatividad del termostato hasta los 100 °C, y margen de error de ± 0.1 °C.

Para la pasteurización de las muestras, dicho equipo se ajustó a una cubeta de acero inoxidable GN 1/1 de 200 mm de fondo, con 26 litros de agua.



ILUSTRACIÓN 23. Róner Garhe SV-pro
(Elaboración propia)

3.3.1. PASTEURIZACIÓN SV DE LAS JUDÍAS

Si bien, como ya se ha referido en numerosas ocasiones, uno de los fundamentos de la cocción SV es la preservación de la calidad organoléptica del producto mediante una minimización de la intensidad del tratamiento térmico, la propia naturaleza de los géneros determina cuáles deben ser los márgenes de tales mínimos.

Así, en el caso de las judías, su considerable contenido en fibras vegetales (celulosas y hemicelulosas, principalmente) (Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006), exige altas temperaturas de cocción (no inferiores a 90 °C).

Se les aplicó, por tanto, un tratamiento térmico de notable intensidad (pasteurización alta); exactamente, consistió en:

► JUD_1: $T_{\text{róner}} = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$; $t = 1\text{ h } 45'$

Seguidamente, tras la aplicación del tratamiento térmico, parte de las muestras se procesaron con altas presiones hidrostáticas. Las muestras restantes (que no recibirían ningún tipo de tratamiento adicional⁴) se sometieron a enfriamiento rápido hasta alcanzar los 3°C (en corazón de producto); pasando a conservación refrigerada (entre 3 y 5°C), donde se mantendrían hasta el momento de su correspondiente análisis.

3.3.2. PASTEURIZACIÓN SV DEL CORDERO

El principal responsable de la dureza de las carnes es el tejido conectivo (esto es, el colágeno intramuscular que forma las membranas endomisiales y perimisiales) (Bianchi, y otros, 2008). El colágeno (la proteína más abundante del reino animal) inicia un proceso de desnaturalización térmica en torno a los $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en vertebrados terrestres); proceso que, de producirse en medio acuoso, da lugar a su gelificación: originándose una red proteica, cuya capacidad de absorción de agua dependerá de la temperatura y el tiempo en que se efectúe la referida desnaturalización proteica (Barbut, 2016).

En el caso del cordero, se planteó un doble procedimiento experimental:

→ Un ensayo preliminar (COR_1): en el cual se combinó un tiempo relativamente corto y una temperatura ligeramente por encima del umbral de seguridad (pasteurización moderada). Concretamente, la intensidad del tratamiento fue:

► COR_1: $T_{\text{róner}} = 67.5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $t = 8\text{ h}$

⁴ Tales muestras, en cada uno de los experimentos realizados, representan el control o referente.

→ Un segundo ensayo (**COR_2**): en el que se rebajó la temperatura hasta el umbral de seguridad, mientras que el tiempo de aplicación del tratamiento se prolongó de forma bastante considerable. Su intensidad fue:

► **COR_2**: $T_{\text{róner}} = 65\text{ °C}$; $t = 24\text{ h}$

Al igual que se hiciera con las judías, tras la aplicación del tratamiento térmico, parte de las muestras de cordero (en ambos experimentos) se procesaron acto seguido con altas presiones hidrostáticas. Asimismo aquellas que no se habrían de presurizar (las muestras control) se abatieron térmicamente (3 °C en corazón de producto); permaneciendo en almacenamiento refrigerado (entre 3 y 5 °C) hasta su análisis.

3.3.3. COCCIÓN SV DEL BACALAO

El colágeno de los animales marinos, a diferencia del de los terrestres, presenta una composición muy variable (especialmente, en aminoácidos como prolina e hidroxiprolina); un hecho que va a determinar sus propiedades fisicoquímicas. Y una de las consecuencias de mayor relevancia es que los procesos de su desnaturalización térmica y gelificación se inician a temperaturas significativamente más bajas: en torno a 45 °C (Guerrero Legarreta, Rosmini Garma, & Armenta López, 2018).

Como en el caso anterior, con el bacalao también se realizó un doble procedimiento experimental:

→ Un experimento preliminar (**BAC_1**): en el que se aplicó un tratamiento térmico con unos parámetros de cocción relativamente conservadores (tratándose de pescado); tales fueron:

► **BAC_1**: $T_{\text{róner}} = 57.1\text{ °C}$; $t = 30'$

→ Y un segundo ensayo (BAC_2): en el cual disminuyeron tanto la temperatura como el tiempo de aplicación del tratamiento. La intensidad de éste fue:

► BAC_2: $T_{\text{róner}} = 52\text{ }^{\circ}\text{C}$; $t = 20'$

Análogamente, como en los casos precedentes, los procesados térmico e hiperbárico de las muestras se concatenaron en el tiempo. Mientras que con las muestras control (que sólo recibirían tratamiento térmico), se procedió sin dilación a su abatimiento y ulterior refrigeración.

3.4. PROCESAMIENTO HIPERBÁRICO DE LAS MUESTRAS

Todos los tratamientos con altas presiones hidrostáticas aplicados sobre las distintas muestras se realizaron con un equipo Stansted Fluid Power LTD HHP (SFP, Essex, UK); con un máximo de presión operativa de 700 MPa. Dicho equipo está provisto de una cámara de presurización de 2.5 litros de capacidad; empleando agua con un 5% de propilenglicol como líquido transmisor de presión.

El ascenso de la presión se configuró a razón de 75 MPa/min; la descompresión se produjo de manera casi instantánea.



ILUSTRACIÓN 24. Equipo HHP Stansted Fluid Power LTD
(Elaboración propia)

3.4.1. TRATAMIENTO HHP DE LAS JUDÍAS

Con los parámetros SV de JUD_1 se realizaron dos lotes con distintos tratamientos HHP. Se pretendió que la intensidad de éstos fuese muy dispar:

► JUD_1.A: $P_{\text{hidrostática}} = 300 \text{ MPa}$; $T_{\text{cámara}} = 55 \text{ °C}$; $t_{\text{retención}} = 8'$

► JUD_1.B: $P_{\text{hidrostática}} = 600 \text{ MPa}$; $T_{\text{cámara}} = 55 \text{ °C}$; $t_{\text{retención}} = 8'$

Donde:

- $P_{hidrostática}$ es la presión hidrostática efectiva aplicada al alimento.
- $T_{cámara}$ es la temperatura de la cámara de presurización durante el tratamiento.
- $t_{retención}$ es el tiempo durante el que se mantuvo el máximo de presión efectiva.

La disparidad relativa de uno de los parámetros HHP (en este caso la presión: 300 vs 600 MPa) manteniendo iguales el resto ($T_{cám}$ y t_{ret}) en ambos tratamientos, tiene por objeto la detección o, al menos, la inferencia de posibles efectos observables que se pudieran atribuir a la variación de un parámetro concreto. Estrategia ésta que se hará extensiva a otros experimentos.

3.4.2. TRATAMIENTO HHP DEL CORDERO

En el experimento preliminar del cordero (**COR_1**) no se diversificaron los parámetros del tratamiento HHP. La intensidad de su única parametrización fue:

► **COR_1**: $P_{hidrostática} = 500 \text{ MPa}$; $T_{cámara} = 24 \text{ °C}$; $t_{retención} = 8'$

Por el contrario, en el segundo ensayo (**COR_2**), al igual que se procediera con las judías, se realizaron dos lotes a los que se aplicó tratamientos HHP en los que difería sólo uno de sus parámetros (en este caso, la temperatura de la cámara de presurización). En concreto, las intensidades de éstos fueron las siguientes:

► **COR_2.A**: $P_{hidrostática} = 500 \text{ MPa}$; $T_{cámara} = 29 \text{ °C}$; $t_{retención} = 8'$

► **COR_2.B**: $P_{hidrostática} = 500 \text{ MPa}$; $T_{cámara} = 50 \text{ °C}$; $t_{retención} = 8'$

3.4.3. TRATAMIENTO HHP DEL BACALAO

Análogamente, en el primer ensayo del bacalao (**BAC_1**) únicamente se aplicó un tipo de tratamiento HHP, con la intensidad que se indica:

► **BAC_1**: $P_{\text{hidrostática}} = 500 \text{ MPa}$; $T_{\text{cámara}} = 24 \text{ °C}$; $t_{\text{retención}} = 8'$

Mientras que en el segundo experimento (**BAC_2**) la diversidad de la parametrización del tratamiento HHP fue más amplia que en casos precedentes. En concreto, se variaron uno a uno los tres parámetros del tratamiento HHP de mayor intensidad (**BAC_2.D**); dando lugar, por tanto, a cuatro tipos de tratamientos diferenciados. A saber:

► **BAC_2.D**: $P_{\text{hidrostática}} = 600 \text{ MPa}$; $T_{\text{cámara}} = 50 \text{ °C}$; $t_{\text{retención}} = 8'$

► **BAC_2.C**: $P_{\text{hidrostática}} = 600 \text{ MPa}$; $T_{\text{cámara}} = 22 \text{ °C}$; $t_{\text{retención}} = 8'$

► **BAC_2.B**: $P_{\text{hidrostática}} = 600 \text{ MPa}$; $T_{\text{cámara}} = 50 \text{ °C}$; $t_{\text{retención}} = 4'$

► **BAC_2.A**: $P_{\text{hidrostática}} = 300 \text{ MPa}$; $T_{\text{cámara}} = 50 \text{ °C}$; $t_{\text{retención}} = 8'$

En este punto, convendría realizar una síntesis aclaratoria de los epígrafes 3.3 y 3.4:

CONTOLES	TRATAMIENTO SV		TRATAMIENTO HHP		
	$T_{\text{róner}} (\text{°C})$	$t_{\text{cocción}} (\text{h}')$	$P_{\text{hidrostática}} (\text{MPa})$	$T_{\text{cámara}} (\text{°C})$	$t_{\text{retención}} (')$
► JUD_1.A	90	1h 45'	300	55	8
► JUD_1.B			600	55	8
► COR_1	67.5	8h	500	24	8
► COR_2.A	65	24h	500	29	8
► COR_2.B			500	50	8
► BAC_1	57.1	30'	500	24	8
► BAC_2.A	52	20'	300	50	8
► BAC_2.B			600	50	4
► BAC_2.C			600	22	8
► BAC_2.D			600	50	8

TABLA 10. Parametrización de los tratamientos aplicados en los distintos ensayos
(Elaboración propia)

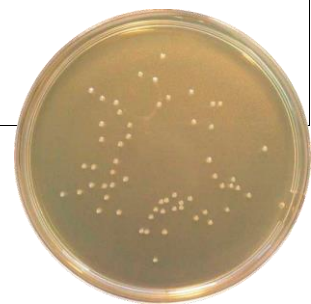
3.5. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

El análisis microbiológico preliminar de las muestras de alimentos se realizó sobre diferentes medios sólidos (según el tipo de microorganismos cuyo crecimiento convenía favorecer). Tanto la formulación y procedimiento que se siguió para preparar cada uno de ellos, como una breve descripción de éstos, se exponen seguidamente:

- Agar triptona y soja (TSA): Su elevado valor nutritivo permite el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos aerobios mesófilos. Asimismo, al carecer de azúcares fermentables, resulta un medio indicado para mantenimiento de cepas (Scharlau, 2021a).

FÓRMULA Y PREPARACIÓN: TSA (<i>Tryptone Soy Agar</i>)		
COMPOSICIÓN MEDIO DESHIDRATADO (g/l)	Peptona de caseína	15,0
	Agar	15,0
	Peptona de soja ⁵	5,0
	Sodio cloruro	5,0
pH (a 25 °C)	7,3 ± 0,2	
PROCEDIMIENTO	→ Reconstituir 40 gramos de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. → Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. → Atemperar a 50 °C. → Extender en placa de Petri.	

TABLA 11. Formulación y procedimiento medio TSA (Agar soja y triptona)
Elaboración propia a partir de la ficha técnica del fabricante: (Scharlau, 2021a)



- Agar *MacConkey* (MC): Se trata de un medio selectivo para la detección de bacterias coliformes (véase una descripción de este grupo en epígrafe 1.4.2.2. *Principales patógenos alimentarios: 7. Escherichia coli*). Un medio que en su composición incorpora inhibidores

⁵ 105 g/l de peptona de soja en el caso de la preparación de TSA salino.

del crecimiento de bacterias grampositivas (como son las sales biliares o el cristal violeta), y un azúcar fermentable (lactosa monohidrato) que permite diferenciar entre las bacterias con capacidad para degradar este azúcar y aquellas que no pueden hacerlo. Fermentación ésta que produce un descenso de pH en el medio; a tal efecto, como indicador de dicha acidificación, incluye rojo neutro en su composición. El crecimiento de *Escherichia coli* es distinguible por la formación de halos púrpuras de precipitado biliar en torno a sus colonias (Scharlau, 2021b).

Eventualmente, además de los bacilos indicados (coliformes), en este medio también podrían crecer enterococos, identificables por el reducido tamaño de sus colonias.

FÓRMULA Y PREPARACIÓN: MC (<i>MacConkey</i>)		
COMPOSICIÓN MEDIO DESHIDRATADO (g/l)	Digerido pancreático de gelatina	17,0
	Agar	15,0
	Lactosa monohidrato	10,0
	Cloruro sódico	5,0
	Peptona de carne	1,5
	Peptona de caseína	1,5
	Sales biliares	1,5
	Rojo neutro	0,03
	Cristal violeta	0,001
pH (a 25 °C)	7,1 ± 0,2	
PROCEDIMIENTO	→ Reconstituir 51,5 gramos de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. → Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. → Atemperar a 50 °C. → Extender en placa de Petri.	

TABLA 12. Formulación y procedimiento medio MC (Agar MacConkey)

Elaboración propia a partir de la ficha técnica del fabricante: (Scharlau, 2021b)



- Agar PALCAM: Medio altamente selectivo empleado para la detección de *Listeria* spp. Esta selectividad se la proporcionan, por un lado el cloruro de litio de su fórmula base, y en mayor medida los componentes que integran el suplemento (cefotaxima, polimixina

B y acriflavina), inhibidores de una gran diversidad de bacterias, tanto gramnegativas como grampositivas. Como diferenciador este medio incorpora esculina, un compuesto que la *Listeria* transforma en esculetina, la cual reacciona con el citrato de amonio férrico dando lugar a un precipitado de color oscuro (distintivo de las colonias de *Listeria*) (Scharlau, 2021c), (Scharlau, 2022).

FÓRMULA Y PREPARACIÓN: PALCAM		
COMPOSICIÓN MEDIO BASE DESHIDRATADO (g/l)	Triptona	23,0
	Cloruro de litio	15,0
	Agar	13,0
	Manitol	10,0
	Cloruro de sodio	5,0
	Extracto de levadura	3,0
	Almidón de maíz	1,0
	Esculina	0,8
	Citrato de amonio férrico	0,5
	Glucosa	0,5
	Rojo fenol	0,08
COMPOSICIÓN SUPLEMENTO (g/vial)	Ceftazidima	0,01
	Polimixina B	0,005
	Acriflavina	0,0025
pH (a 25 °C)	7,2 ± 0,2	
PROCEDIMIENTO	→ Reconstituir 36 gramos de medio deshidratado en 500 ml de agua destilada. → Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. → Atemperar el medio base a 50 °C. → Diluir el contenido de un vial de suplemento con 6 ml de agua destilada. → Incorporar la dilución anterior al medio atemperado. → Extender en placa de Petri.	

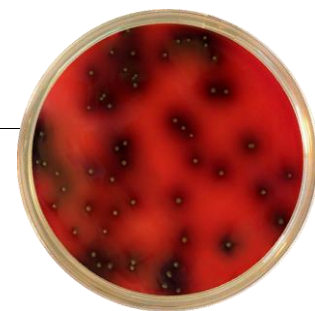


TABLA 13. Formulación y procedimiento medio PALCAM

Elaboración propia a partir de la ficha técnica del fabricante: (Scharlau, 2021c) & (Scharlau, 2022)

Mientras que otras bacterias que pudieran rebasar la selectividad de este medio (por lo general, enterococos y estafilococos), a diferencia de la *Listeria*, sí fermentan el manitol,

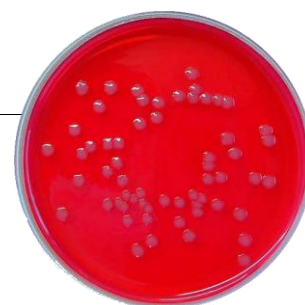
produciendo una acidificación del medio; como indicador este descenso de pH el rojo fenol torna su coloración a amarillo.

- **Agar BGA (*Brilliant Green Agar*)**: Se trata también de un medio muy selectivo, en este caso, para la detección de *Salmonella* spp (a excepción de *S. typhi* y *S. paratyphi*). El verde brillante actúa como inhibidor de todas las bacterias grampositivas, así como de la mayor parte de bacilos gramnegativos. Como diferenciador de otras bacterias que pudieran crecer en este medio, incorpora en su composición dos azúcares fermentables (lactosa y sacarosa), los cuales *Salmonella* no puede degradar. Al igual que PALCAM, el rojo fenol es el indicador de la acidificación del medio por fermentación de lactosa/sacarosa: de modo que las colonias de *Salmonella* estarán rodeadas por halo rojo, mientras que otras bacterias fermentadoras presentarán halo amarillo (Scharlau, 2021d).

FÓRMULA Y PREPARACIÓN: BGA (<i>Brilliant Green Agar</i>)		
COMPOSICIÓN MEDIO DESHIDRATADO (g/l)	Agar	15,0
	Lactosa	10,0
	Sacarosa	10,0
	Peptona de carne	5,0
	Peptona de caseína	5,0
	Cloruro sódico	5,0
	Extracto de levadura	3,0
	Rojo fenol	0,08
	Verde brillante	0,0125
pH (a 25 °C)	6,9 ± 0,2	
PROCEDIMIENTO	→ Reconstituir 53 gramos de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. → Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. → Atemperar a 50 °C. → Extender en placa de Petri.	

TABLA 14. Formulación y procedimiento medio BGA (Agar verde brillante)

Elaboración propia a partir de la ficha técnica del fabricante: (Scharlau, 2021d)



• **Agar Baird Parker (BP):** Es éste un medio selectivo empleado para la identificación de estafilococos coagulasa positivos. La caseína y los extractos de carne y levadura aportan los nutrientes que requieren para su crecimiento. El cloruro de litio, el telurito potásico y la glicina son agentes selectivos, que inhiben el desarrollo de otros microorganismos (Condalab, 2021a).

El *Staphylococcus aureus* puede reducir el telurito en telurio, generando colonias de color negro o gris oscuro (Condalab, 2021b).

FÓRMULA Y PREPARACIÓN: BP (<i>Baird Parker</i>)		
COMPOSICIÓN MEDIO DESHIDRATADO (g/l)	Agar	20,0
	Glicina	12,0
	Piruvato sódico	10,0
	Digerido pancreático de caseína	10,0
	Extracto de carne	5,0
	Cloruro de litio	5,0
	Extracto de levadura	1,0
COMPOSICIÓN SUPLEMENTO (g~ml/l)	Agua destilada	800 ml
	Emulsión de yema de huevo	200 ml
	Cloruro potásico	4,25 g
	Telurito potásico	2,1 g
pH (a 25 °C)	7,2 ± 0,2	
PROCEDIMIENTO	→ Reconstituir 63 gramos de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. → Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. → Atemperar el medio base a 45-50 °C. → Agregar asépticamente 50 ml de suplemento a la dilución anterior. → Homogeneizar suavemente. → Extender en placa de Petri.	

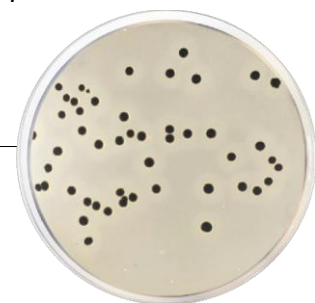


TABLA 15. Formulación y procedimiento medio BP (Agar Baird Parker)

Elaboración propia a partir de la ficha técnica del fabricante: (Condalab, 2021a) & (Condalab, 2021b)

3.6. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Las muestras se sometieron, por un lado, a un análisis cuantitativo mediante siembra en placa por superficie y posterior recuento de colonias. Análisis que proporcionaría una referencia de la calidad microbiológica de las elaboraciones en el marco de la normativa higiénico-sanitaria aplicable; la cual, según tipo de alimento y conforme a las abundancias en las poblaciones de determinados microorganismos, dilucida la peligrosidad o inocuidad del alimento (véase *Tabla 4*). Un referente que, en el presente trabajo, permitirá asimismo formular una estimación de vida útil de los productos (basada estrictamente en los criterios microbiológicos exigidos por la legislación; sin considerar su calidad sensorial).

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio cualitativo de las poblaciones microbianas presentes en los alimentos; tanto de su identificación y abundancia relativa, como de la evolución de tales poblaciones a lo largo del tiempo de almacenamiento del producto. Este estudio de biodiversidad requirió el aislamiento del ADN bacteriano, su secuenciación y análisis.

3.6.1. SIEMBRA EN PLACA Y RECuento DE COLONIAS

Conforme a los criterios microbiológicos aplicables al tipo de elaboraciones objeto de este trabajo (*Tabla 4*), y a fin de detectar la presencia de los géneros bacterianos que en éstos se especifican, se procedió a la siembra en superficie (sobre los medios de cultivo más adecuados según tipo de microorganismo) de las pertinentes diluciones de las muestras.

En los diferentes ensayos, las muestras se analizaron con idéntica frecuencia hasta transcurridos 30 días desde su tratamiento. A partir del primer mes, tanto la frecuencia de

análisis como la prolongación de las pruebas varió de unos experimentos a otros. El tiempo de muestreo que se siguió se sintetiza en la siguiente tabla:

TIEMPO DE MUESTREO POR ENSAYO															
ENSAYO	▶ JUD_1	0	3	7	14	30	60	90	120	150	180	210	240	270	
	▶ COR_1	0	3	7	14	30	45	60							
	▶ COR_2	0	3	7	14	30	60	90	120	150	180	210	240	270	
	▶ BAC_1	0	3	7	14	30	45	60							
	▶ BAC_2	0	3	7	14	30	45	60	75	90	105				
TIEMPO (días)															

TABLA 16. *Tiempo de muestreo en los distintos ensayos*

(Elaboración propia)

A lo largo de esta distribución temporal, se sometieron a análisis 2 muestras de cada tipo, sembrándose éstas por duplicado. Procedimiento que se hizo extensivo a todas las elaboraciones en cada una de sus variantes de parametrización de los tratamientos.

Los medios de cultivo empleados fueron los que se describen en el epígrafe 3.5:

- TSA⁶ (genérico aerobios mesófilos).
- MC (enterobacterias y coliformes; con especial atención al crecimiento de colonias con halo púrpura o cualquier presunción de *E. coli*).
- BGA (selectivo *Salmonella spp*).
- PALCAM (selectivo *Listeria spp*).
- BP (identificación de estafilococos; en especial, *S. aureus*).

Para cada muestra el procedimiento analítico fue el siguiente:

- a. Homogeneizar en *Stomacher* (30'' a velocidad media) 10 g de muestra junto con 10 g de agua de peptona.
- b. Extraer 1 ml de este homogeneizado y reservar en tubo *Eppendorf* (dilución_0), para realizar las sucesivas diluciones.

⁶ En el ensayo BAC_1 se empleó también TSA salino.

- c. Extraer 1 ml más del homogeneizado inicial para hacer la medición de pH.
- d. Incorporar 100 µl de dilución_0 a un tubo con 900 µl de solución salina estéril (SS) (dilución_-1). Diluir ésta tantas veces como requiera el proceso de siembra, siempre en proporción 1 → 9 (dilución_previa → SS); obteniendo así sucesivas diluciones de factor 10.
- e. Pipetear asépticamente 100 µl de la dilución pertinente⁷ en cada medio. Extender el inóculo. Identificar la placa mediante rotulado.
- f. Estufar las placas a 37 °C, entre 24 y 48 horas.
- g. Proceder al recuento de colonias.

3.6.2. ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD⁸

Inicialmente, se aisló el ADN de la microbiota presente en las muestras alimentarias; el cual fue analizado mediante secuenciación masiva. Para ello se empleó el sistema de pirosecuenciación (Roche 454), amplificando las regiones V3 y V4 del ADN ribosomal del gen 16S.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron asignadas a unidades taxonómicas operativas (OTUs) por comparación con las registradas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Finalmente, se procedió a realizar un tratamiento informático de los resultados, con el fin de efectuar la agrupación taxonómica de las OTUs obtenidas.

⁷ Debe realizarse a priori una estimación de crecimiento y efectuar la siembra a distintas diluciones. En caso de crecimiento a distintas diluciones, el recuento se llevará a cabo en la placa que contenga entre 30 y 300 colonias.

⁸ Dicho estudio sólo se realizó sobre las muestras del ensayo BAC_2.

3.6.2.1. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN de las muestras se aplicó el siguiente protocolo previo:

- a. Homogeneizar en *Stomacher* (30'' a velocidad media) 20 g de muestra junto con 10 g de agua de peptona. Disponer en tubo *Falcon* 50 ml.
- b. Centrifugar a 1200 rpm durante 5'.
- c. Pipetear fase líquida (despreciar sedimento). Disponer en nuevo tubo *Falcon*.
- d. Centrifugar a 4000 rpm durante 30'.
- e. Despreciar sobrenadante. Resuspender sedimento con 1 ml de SS. Disponer en tubo *Eppendorf*.
- f. Centrifugar a 500 rpm durante 1'.
- g. Recuperar sobrenadante (despreciar sedimento).
- h. Centrifugar a 13400 rpm durante 5'.
- i. Despreciar sobrenadante. Resuspender sedimento con 0.5 ml de SS.
- j. Incorporar 2.5 µl de PMA (monoázida de propidio). Enfriar a -20 °C durante 5' (Elizaquível, Sánchez, & Aznar, 2012) (Nocker, Sossa-Fernández, Burr, & Camper, 2007).
- k. Someter los tubos a fuente luminosa ($\lambda = 465-475$ nm) durante 15'. (Ilustración 25).

MODIFICACIÓN DEL ADN DE CÉLULAS NO VIABLES MEDIANTE PMA

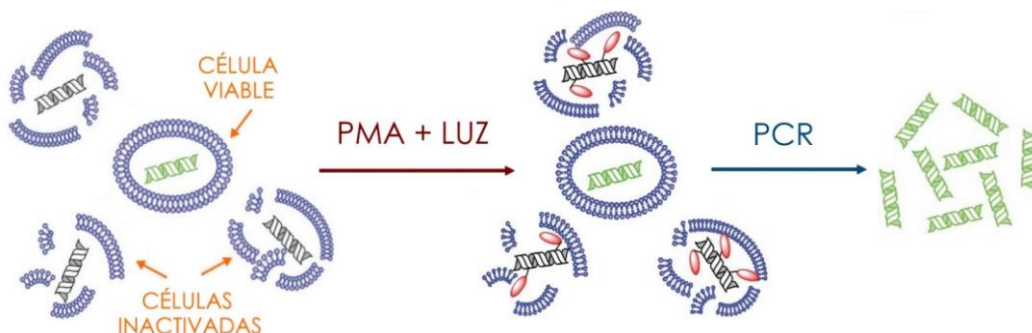


ILUSTRACIÓN 25. Fotorreactividad del PMA
(Adaptación de www.biotium.com)

- l. Incorporar 1 ml de SS. Centrifugar a 1300 rpm durante 5'.
- m. Despreciar sobrenadante. Resuspender sedimento con 1.5 ml de SS.
- n. Centrifugar a 13000 rpm durante 5'.
- ñ. Despreciar sobrenadante. Resuspender sedimento con 1.5 ml de agua miliQ.
- o. Centrifugar a 13000 rpm durante 5'.
- p. Despreciar sobrenadante. Congelar sedimento ($T < -20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Obtenidos los *pellets*, se empleó el kit *GenElute* de *Sigma-Aldrich* de extracción de ADN. Sintéticamente, el protocolo de este fabricante supone:

- q. Resuspender los 2 *pellets* de la misma muestra en 200 μl de lisozima (sin espumar ésta).
- r. Incubar los tubos 30' (girando 180° cada 5' para evitar su precipitado).
- s. Añadir 20 μl de *RNasa*. Incubar 2' (temperatura ambiente).
- t. Incorporar 20 μl de *Proteinasa K* e integrar ligeramente.
- u. Añadir 200 μl de *Lysis solution C*. Homogeneizar a vórtex durante 15''. Incubar en baño a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10'.
- v. Incubar en baño a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10'.
- w. Preparar tubos con columnas, e incorporar 500 μl de *Column preparation solution* a cada uno. Centrifugar a 13400 rpm durante 75''. Desechar el filtrado. Recolocar las columnas.
- x. Sacar del baño, e incorporar al lisado 200 μl de Etanol puro (EtOH). Integrar a vórtex 10''.
- y. Pasar el lisado a los nuevos *Eppendorf* (con la columna ya preparada). Centrifugar a 13400 rpm, 75''. Desechar filtrado y recolocar la columna.
- z. Añadir a cada columna 500 μl de *Wash solution 1*.

- aa. Centrifugar a 13400 rpm durante 75". Desechar el filtrado y recolocar la columna.
- ab. Añadir a cada columna 500 µl de *Wash solution EtOH*.
- ac. Centrifugar a 13400 rpm durante 3'. Desechar filtrado.
- ad. Rotular nuevos *Eppendorf*, y pasar la columna a estos tubos.
- ae. Añadir 100 µl de *Elute* a cada columna. Incubar durante 5' (temperatura ambiente).
- af. Centrifugar a 13400 rpm durante 75".
- ag. Desechar columna. Guardar el eluido por debajo de -20 °C.

Para la determinación de la concentración y la calidad del ADN extraído se empleó el sistema *QuantiFluor ONE dsDNA* de *Promega*.

3.6.2.2. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN

Para determinar la diversidad bacteriana presente en el ADN extraído de las muestras se amplificaron las regiones hipervariables V3 y V4 del gen 16S-rRNA empleando cebadores modificados 341F y 805R (Klindworth, y otros, 2013).

Las bibliotecas se prepararon conforme al Protocolo de Preparación de Bibliotecas de Secuenciación Metagenómica de *Illumina Inc*. Añadiéndose a las secuencias específicas del gen 16S las secuencias de nucleótidos adicionales (*overhangs*) del adaptador de *Illumina*.

Se emplearon las siguientes secuencias de cebadores de PCR para el citado gen:

→ 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG, como cebador hacia delante (*forward primer*).

→ 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC, como cebador hacia atrás (*backward primer*).

Para iniciar dicho protocolo se utilizó ADN genómico microbiano (5 ng/ μ l en 10 mM Tris a pH 8.5). Tras la amplificación del ADN del gen 16S, se realizó un procedimiento de multiplexación de las distintas muestras empleando el kit de índices *Nextera XT* (Illumina).

Se procesó un total de 1 μ l del producto de la PCR en un chip de ADN 1000 del bioanalizador para verificar si el tamaño del ADN replicado se correspondía con el esperado (aproximadamente 550 pares de bases). Tras dicha comprobación, los fragmentos de ADN obtenidos (bibliotecas) se secuenciaron empleando una serie de extremos emparejados de 2 x 300 bp del kit de reactivos *MiSeq v3* (MS-102-3001), en un secuenciador *MiSeq* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina) (Rodríguez López, Grande, Pérez-Pulido, Gálvez, & Lucas, 2020).

La evaluación de la calidad se realizó mediante el uso del programa *prinseq-lite* (Schmieder & Edwards, 2011). Los datos de secuencia se analizaron mediante el flujo de trabajo automatizado de *qiime2* (Caporaso, y otros, 2011). La limpieza de ruido en los datos, el emparejamiento de extremos y la depleción de quimeras se realizaron a partir de datos de extremos emparejados, llevando a cabo un procesado en cascada mediante *DADA2* (Callahan, y otros, 2016). Las asignaciones taxonómicas se realizaron haciendo uso del clasificador de *Naive Bayes* integrado en los *plugins* de *qiime2* y la base de datos *SILVA_release_132* (Quast, y otros, 2013). El análisis estadístico se llevó a cabo con el software *SPSS v. 24* (IBM Corporation).

3.7. VALORACIÓN SENSORIAL DE LAS ELABORACIONES

La evaluación sensorial a la que se sometieron las elaboraciones careció, ciertamente, del rigor o la objetividad que pueden aportar la medición analítica o un grupo de panelistas con adecuado entrenamiento. Sin embargo, como ya se indicó en el epígrafe 2. *Objetivos*, una diferenciación minuciosa de sus atributos sensoriales según tipología del tratamiento aplicado, no se halla entre los propósitos substantivos de este trabajo. Antes bien, con la valoración organoléptica llevada a cabo, sólo se pretendía disponer de una referencia de carácter hedónico, meramente orientativa (en consecuencia, de considerable subjetividad y con resultados de una validez bastante limitada).

Todas las pruebas sensoriales de las diferentes elaboraciones se realizaron en la primera quincena tras el tratamiento de muestras (siempre en las 24 horas subsiguientes al último recuento en placa). Mayoritariamente, dichas pruebas se desarrollaron en una de las salas-comedor del campus (de habilitación tipo *bring your own food*). Un hecho éste que segmentó el perfil del público encuestado: jóvenes universitarios (aproximadamente, con igualdad porcentual de ambos sexos); todos ellos sin ningún tipo de adiestramiento en cata. Su elección fue aleatoria; sin otro filtro selectivo que una cuestión indagatoria previa: con la cual se sondeaba si el tipo de plato a valorar formaba parte de las preferencias alimentarias del posible evaluador/a o, al menos, si solía incluirse en su dieta con cierta regularidad. La finalidad de tal cuestión no era otra que descartar en alguna medida una predisposición negativa en la evaluación.

Todas las elaboraciones se sometieron a regeneración térmica (a baño maría) en la propia bolsa de envasado, conforme a los siguientes tiempos y temperaturas:

- Judías verdes: $T_{\text{regeneración}} = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{regeneración}} = 35'$.
- Cordero: $T_{\text{regeneración}} = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{regeneración}} = 35'$.
- Bacalao: $T_{\text{regeneración}} = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ([BAC_1](#)) y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ([BAC_2](#)); $t_{\text{regeneración}} = 35'$.

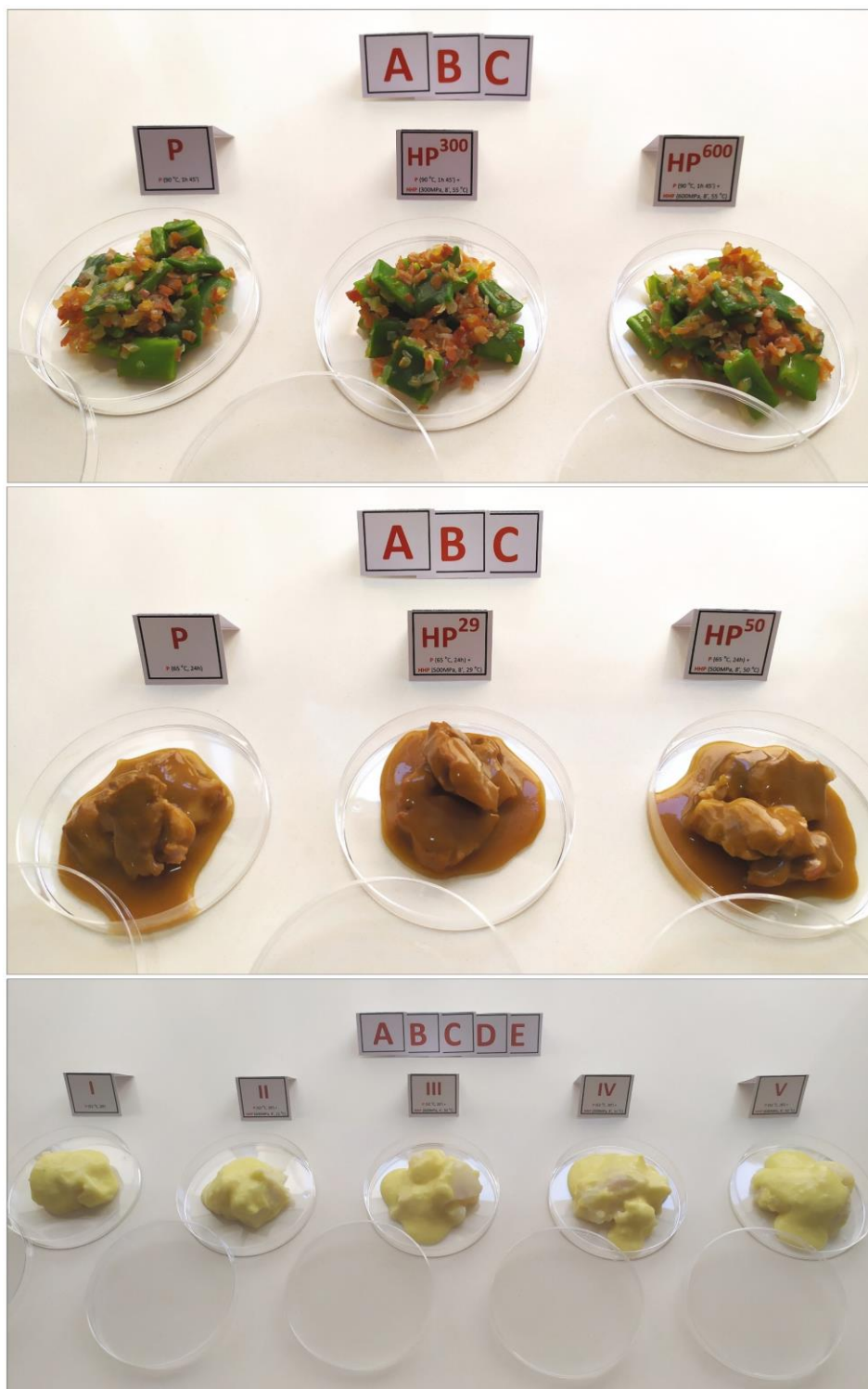


ILUSTRACIÓN 26. Análisis sensorial de muestras

(Elaboración propia)

Previamente, en baño maría a temperatura de regeneración se introdujeron unas placas eutécticas de gel calórico, que se depositarían junto con las muestras regeneradas en un recipiente isoterma, de modo que las elaboraciones mantuviesen una temperatura adecuada durante su transporte, hasta el momento de su valoración.

En el caso de las muestras salseadas (pescado y carne), concluida su regeneración térmica, se procedió a separar⁹ el elemento principal de su salsa, aplicando a ésta 30'' de homogeneización en *Stomacher* (a máxima velocidad de palas).

Se llevaron a cabo dos tipos de pruebas:

- 1. Test triangular: Diferenciación holística entre muestras.

Prueba en la que se presentaban tres muestras: una de ellas que sólo había recibido tratamiento térmico (muestra pasteurizada) y otras dos a las que, adicionalmente, se había aplicado algún tipo de procesamiento hiperbárico (siendo idéntica la parametrización del procesado HHP en las dos muestras presurizadas).

ANÁLISIS SENSORIAL TEST TRIANGULAR

NOMBRE DEL PRODUCTO: JUDÍAS VERDES CON CEBOLLA Y JAMÓN

► Tiene frente a usted 3 muestras de judías verdes con cebolla y jamón, con los mismos ingredientes e idénticas proporciones.

► Sin embargo, alguno/s de los parámetros de procesamiento (presión y/o tiempo) aplicado a 1 de ellas difiere de los otros 2.

♦ ¿Sabría identificar las 2 muestras absolutas?

☐ Muestra A
☐ Muestra B
☐ Muestra C

Marque con una X si las 3 muestras le resultan indistinguibles.

ANÁLISIS SENSORIAL TEST TRIANGULAR

NOMBRE DEL PRODUCTO: PIERNA DE CORDERO EN SU JUGO

► Tiene frente a usted 3 muestras de pierna de cordero en su jugo, con los mismos ingredientes e idénticas proporciones.

► Sin embargo, alguno/s de los parámetros de procesamiento (presión y/o temperatura) aplicado a 1 de ellas difiere de los otros 2.

♦ ¿Sabría identificar las 2 muestras absolutas?

☐ Muestra A
☐ Muestra B
☐ Muestra C

Marque con una X si las 3 muestras le resultan indistinguibles.

ANÁLISIS SENSORIAL TEST TRIANGULAR

NOMBRE DEL PRODUCTO: BACALAO CON PIL PIL EMULSIONADO

► Tiene frente a usted 3 muestras de bacalao con pil pil emulsionado, con los mismos ingredientes e idénticas proporciones.

► Sin embargo, alguno/s de los parámetros de procesamiento (presión y/o temperatura) aplicado a 1 de ellas difiere de los otros 2.

♦ ¿Sabría identificar las 2 muestras absolutas?

☐ Muestra A
☐ Muestra B
☐ Muestra C

Marque con una X si las 3 muestras le resultan indistinguibles.

ILUSTRACIÓN 27. Análisis sensorial: Formulario test triangular

(Elaboración propia)

⁹ Separación mucho más cuidadosa en el caso del bacalao, con el fin de minimizar su exfoliación.

Según la ilustración de la página precedente, los evaluadores debían señalar en el formulario las dos muestras que a su parecer eran idénticas (casillas color rojo), o bien marcar la casilla verde, en caso de no apreciar distinción alguna entre las tres muestras.

- 2. Comparación entre pares.

En esta otra prueba los evaluadores debían valorar cuantitativamente el grado de disimilitud o semejanza existente entre determinadas características organolépticas de dos muestras. En este caso, mayoritariamente, la comparativa se realizó entre una muestra que sólo había recibido tratamiento térmico y otra con algún tipo de procesado hiperbárico adicional. No obstante, bajo este mismo formato de prueba, también se compararon pares de muestras presurizadas (con diferentes parametrizaciones HPP); si bien, dicha variante únicamente se llevó a cabo con el pescado.

Los atributos sensoriales que se compararon fueron:

- Color
- Sabor
- Olor
- Textura

A esta relación, en el caso del pescado, se añadió la consistencia de la emulsión.

La referida valoración cuantitativa del grado de semejanza o diferencia entre tales atributos se debía realizar conforme a una escala numérica (de 0 a 4), con la equivalencia que figura en la siguiente tabla:

0 :	SON COMPLETAMENTE DIFERENTES
1 :	SE APRECIA UNA TRANSFORMACIÓN MUY CONSIDERABLE
2 :	SE DISTINGUEN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS
3 :	SE PERCIBE UNA LIGERA VARIACIÓN
4 :	RESULTAN INDISTINGUIBLES

TABLA 17. Análisis sensorial: Escala numérica de comparación (Elaboración propia)

Las valoraciones sobre cada una de las características sensoriales debían registrarse en la correspondiente casilla del formulario adjunto:

ANÁLISIS SENSORIAL
COMPARACIÓN ENTRE PARES

NOMBRE DEL PRODUCTO: JUDÍAS VERDES CON CEBOLLA Y JAMÓN

► Tiene frente a usted **2 muestras de judías verdes con cebolla y jamón** con los mismos ingredientes e idénticas proporciones.

► Sin embargo, los tratamientos aplicados a ambas muestras difieren en alguno/s de sus parámetros de procesamiento (temperatura, presión y/o tiempo).

♦ ¿Podría cuantificar las diferencias que observa entre ciertas características organolépticas de ambas muestras?

Marque con una X la casilla que mejor describe la **variación observable**:

	0	1	2	3	4
• COLOR	☐	☐	☐	☐	☐
• SABOR	☐	☐	☐	☐	☐
• OLORES	☐	☐	☐	☐	☐
• TEXTURA	☐	☐	☐	☐	☐

Donde la escala numérica (0-4) equivale a:

0 : SON COMPLETAMENTE DIFERENTES
1 : SE APRECIA UNA TRANSFORMACIÓN MUY CONSIDERABLE
2 : SE DISTINGUEN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS
3 : SE PERCIBE UNA LIGERA VARIACIÓN
4 : RESULTAN INDISTINGUIBLES

ANÁLISIS SENSORIAL
COMPARACIÓN ENTRE PARES

NOMBRE DEL PRODUCTO: PIERNA DE CORDERO EN SU JUGO

► Tiene frente a usted **2 muestras de pierna de cordero en su jugo** con los mismos ingredientes e idénticas proporciones.

► Sin embargo, los tratamientos aplicados a ambas muestras difieren en alguno/s de sus parámetros de procesamiento (temperatura, presión y/o tiempo).

♦ ¿Podría cuantificar las diferencias que observa entre ciertas características organolépticas de ambas muestras?

Marque con una X la casilla que mejor describe la **variación observable**:

	0	1	2	3	4
• COLOR	☐	☐	☐	☐	☐
• SABOR	☐	☐	☐	☐	☐
• OLORES	☐	☐	☐	☐	☐
• TEXTURA	☐	☐	☐	☐	☐

Donde la escala numérica (0-4) equivale a:

0 : SON COMPLETAMENTE DIFERENTES
1 : SE APRECIA UNA TRANSFORMACIÓN MUY CONSIDERABLE
2 : SE DISTINGUEN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS
3 : SE PERCIBE UNA LIGERA VARIACIÓN
4 : RESULTAN INDISTINGUIBLES

ANÁLISIS SENSORIAL
COMPARACIÓN ENTRE PARES

NOMBRE DEL PRODUCTO: BACALAO CON PIL PIL EMULSIONADO

► Tiene frente a usted **2 muestras de bacalao con pil pil emulsionado** con los mismos ingredientes e idénticas proporciones.

► Sin embargo, los tratamientos aplicados a ambas muestras difieren en alguno/s de sus parámetros de procesamiento (temperatura, presión y/o tiempo).

♦ ¿Podría cuantificar las diferencias que observa entre ciertas características organolépticas de ambas muestras?

Marque con una X la casilla que mejor describe la **variación observable**:

	0	1	2	3	4
• COLOR	☐	☐	☐	☐	☐
• SABOR	☐	☐	☐	☐	☐
• OLORES	☐	☐	☐	☐	☐
• TEXTURA	☐	☐	☐	☐	☐
• CONSISTENCIA EMULSIÓN	☐	☐	☐	☐	☐

Donde la escala numérica (0-4) equivale a:

0 : SON COMPLETAMENTE DIFERENTES
1 : SE APRECIA UNA TRANSFORMACIÓN MUY CONSIDERABLE
2 : SE DISTINGUEN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS
3 : SE PERCIBE UNA LIGERA VARIACIÓN
4 : RESULTAN INDISTINGUIBLES

ILUSTRACIÓN 28. Análisis sensorial: Formulario comparación entre pares

(Elaboración propia)



4. RESULTADOS

*Hemos creado algo único en el mundo: el primer libro de cocina
que contiene ecuaciones diferenciales en derivadas parciales.*

Nathan Myhrvold (2011)

Se exponen seguidamente los resultados derivados de los diferentes procedimientos experimentales objeto de este trabajo.

En primer lugar se presentará el resultado que proporcionó la siembra y recuento de colonias en los medios de cultivo, en cada uno de los ensayos realizados.

Se ofrecerán a continuación los datos que resultaron del estudio de biodiversidad bacteriana realizado en el ensayo [BAC_2](#).

En un tercer apartado se incluirá la tendencia que experimentó el pH de las distintas muestras a lo largo de su almacenamiento refrigerado. Donde asimismo se mostrarán otros resultados adicionales obtenidos mediante tinción en los ensayos preliminares de cordero y bacalao ([COR_1](#) y [BAC_1](#)).

Para concluir este capítulo, se mostrará el resumen de las apreciaciones sensoriales que se recogieron en los diferentes test organolépticos.

4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Procedimiento que se llevó a cabo conforme a los criterios microbiológicos que la normativa establece para este tipo de alimentos (epígrafe 1.4.1. *Normativa vigente*). Tanto los rangos de permisividad de tales criterios, como los grupos microbianos a estudiar, se recogen en Tabla 4.

La magnitud de las poblaciones microbianas se expresa en unidades logarítmicas de UFC/g; calculándose esta concentración, así como la incertidumbre en el logaritmo de su medida (σ), según las siguientes expresiones:

- UFC/g: *Unidades formadoras de colonias por gramo.*

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ colonias} \cdot \text{factor dilución}}{\text{volumen (ml)}}$$

- σ : *Desviación estándar o DS* (parámetro que da cuenta del grado de dispersión de las medidas respecto a su valor promedio).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Siendo, en este caso, $n=4$ (siembra duplicada de dos muestras por cada uno de los tipos de tratamiento).

Los resultados obtenidos se ordenan por ensayo y tratamiento aplicado. Asimismo, en las representaciones gráficas se emplea el siguiente código de colores:



ILUSTRACIÓN 29. Código de colores según calidad microbiológica
(Elaboración propia)

Coloraciones que delimitan los distintos rangos según los valores y la categorización microbiológica que determina la normativa vigente.

4.1.1. JUDÍAS VERDES: ENSAYO JUD_1

Resumen de los tratamientos aplicados, así como de la periodicidad y prolongación del análisis (extractos Tabla 10 y Tabla 16):

CONTROLES	TRATAMIENTO SV					TRATAMIENTO HHP							
	T _{róner} (°C)		t _{cocción} (h')			P _{hidrostática} (MPa)		T _{cámara} (°C)		t _{retención} (')			
	90		1h 45'			300		55		8			
► JUD_1.A	90		1h 45'			600		55		8			
► JUD_1.B													
► JUD_1	0	3	7	14	30	60	90	120	150	180	210	240	270
TIEMPO (días)													

RECuento de CÉLULAS VIABLES									
ensayo JUD_1 SV _{90-1h 45'} CONTROL									
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios				
	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
3	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
60	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
90	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
120	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
150	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
180	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
210	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
240	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
270	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		

TABLA 18. Recuentos de células viables en muestras control JUD_1
(Ensayo judías): SV 90 °C, 1h 45'. Medios: TSA, MC, BGA, PALCAM y BP
(Elaboración propia)

La intensidad del tratamiento SV (alta pasteurización) fue suficiente para que los recuentos de células viables se mantuvieran por debajo del umbral de detección durante todo el tiempo de análisis (9 meses), en la totalidad de los medios (Tabla 18).

La higienización proporcionada por los tratamientos de presurización A y B (de 300 y 600 MPa, con una temperatura de 55 °C durante el procesado hiperbárico), sólo vino a reforzar una tendencia que ya estaba bien afianzada (Tabla 19).

Por tanto, ambos tratamientos HHP ofrecieron recuentos semejantes (Gráfico 5).

RECuento de CÉLULAS VIABLES							RECuento de CÉLULAS VIABLES						
ensayo JUD_1 SV+HHP _{300·55·8} (tp_A)							ensayo JUD_1 SV+HHP _{600·55·8} (tp_B)						
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios		tiempo (días)	TSA		MC		resto medios	
	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ		log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30		0	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
3	< 1,30		< 1,30		< 1,30		3	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30		7	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30		14	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30		30	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
60	< 1,30		< 1,30		< 1,30		60	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
90	< 1,30		< 1,30		< 1,30		90	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
120	< 1,30		< 1,30		< 1,30		120	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
150	< 1,30		< 1,30		< 1,30		150	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
180	< 1,30		< 1,30		< 1,30		180	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
210	< 1,30		< 1,30		< 1,30		210	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
240	< 1,30		< 1,30		< 1,30		240	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
270	< 1,30		< 1,30		< 1,30		270	< 1,30		< 1,30		< 1,30	

TABLA 19. Recuentos de células viables en muestras presurizadas JUD_1.A y JUD_1.B (ensayo judías)
HPP: tp_A (300 MPa, 55 °C, 8’); tp_B (600 MPa, 55 °C, 8’). Medios: TSA, MC, BGA, PALCAM y BP
(Elaboración propia)

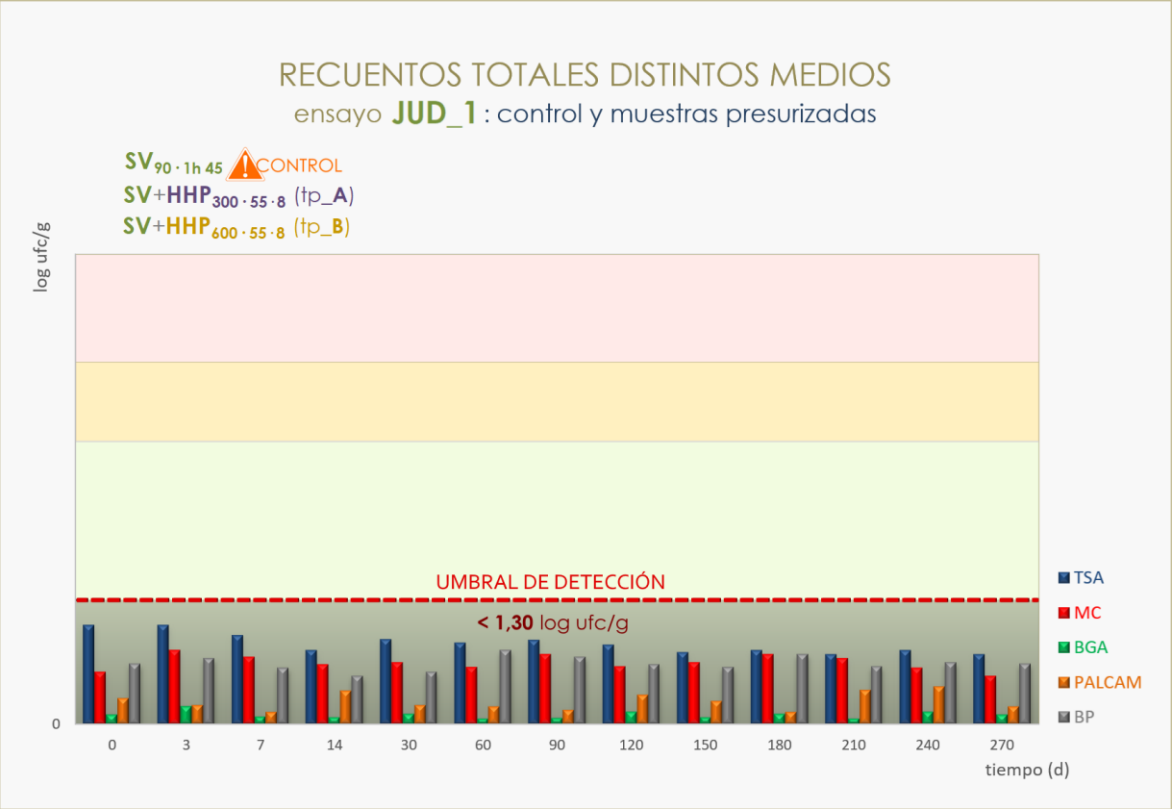


GRÁFICO 5. Evolución microbiológica de las muestras en JUD_1 (ensayo judías)
Control: SV (90 °C, 1h 45’); Presurizadas: SV + HPP (tp_A: 300 MPa, 55 °C, 8’; tp_B: 600 MPa, 55 °C, 8’). Medios: TSA, MC, BGA, PALCAM y BP
(Elaboración propia)

4.1.2. CORDERO: ENSAYOS COR_1 Y COR_2

Resumen de las parametrizaciones de los tratamientos de ambos ensayos, así como de la frecuencia y prolongación del muestreo (extractos Tabla 10 y Tabla 16):



CONTROLES

TRATAMIENTO SV

	T _{róner} (°C)	t _{cocción} (h ')
▶ COR_1	67.5	8h
▶ COR_2.A	65	24h
▶ COR_2.B		

▶ COR_1	0	3	7	14	30	45	60						
▶ COR_2	0	3	7	14	30	60	90	120	150	180	210	240	270

TRATAMIENTO HHP

P _{hidrostática} (MPa)	T _{cámara} (°C)	t _{retención} (')
500	24	8
500	29	8
500	50	8

TIEMPO (días)

Los recuentos viables de mesófilos aerobios de las muestras control se mantuvieron por debajo del umbral de detección durante los 30 primeros días. El día 45 dicho recuento se hallaba próximo a 4 unidades logarítmicas, mientras que a los 60 días sobrepasaba las 4,5 unidades. En el resto de medios, las muestras control presentaron recuentos viables por debajo del umbral de detección a lo largo de todo el tiempo de muestreo. Sin embargo, las muestras HPP de este ensayo mantuvieron recuentos bajo el límite de detección en todos los medios, hasta la conclusión del proceso analítico (Tabla 20 y Gráficos 6 y 7).

RECuento de CÉLULAS VIABLES									
ensayo COR_1 SV _{67,5 · 8h}  CONTROL									
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios				
	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ			
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
3	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
45	3,87	± 0,12	< 1,30		< 1,30				
60	4,54	± 0,04	< 1,30		< 1,30				

RECuento de CÉLULAS VIABLES									
ensayo COR_1 SV+HHP _{500 · 24 · 8}									
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios				
	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ			
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
3	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
45	< 1,30		< 1,30		< 1,30				
60	< 1,30		< 1,30		< 1,30				

TABLA 20. Recuentos de células viables en COR_1: muestras control vs HPP (Ensayo preliminar cordero)

Control: SV (67.5 °C, 8h); Presurizadas: SV + HPP (500 MPa, 24 °C, 8'). Medios: TSA, MC, BGA, PALCAM y BP

(Elaboración propia)

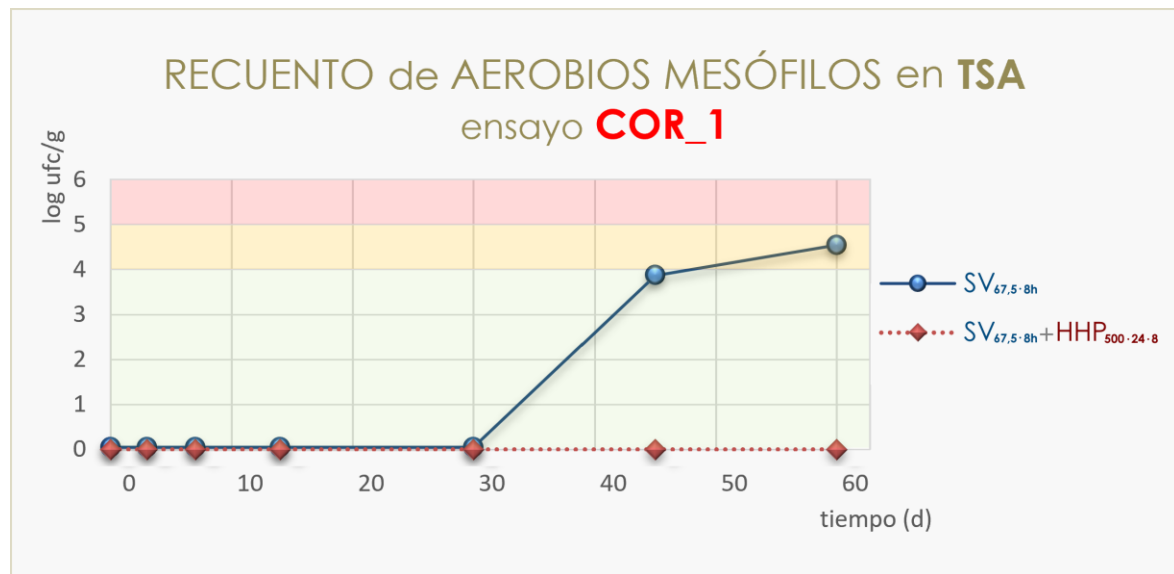


GRÁFICO 6. Evolución de mesófilos aerobios en COR_1: muestras control vs HPP (Ensayo preliminar cordero)

Control: SV (67.5 °C, 8h); Presurizadas: SV + HPP (500 MPa, 24 °C, 8'). Medio: TSA

(Elaboración propia)

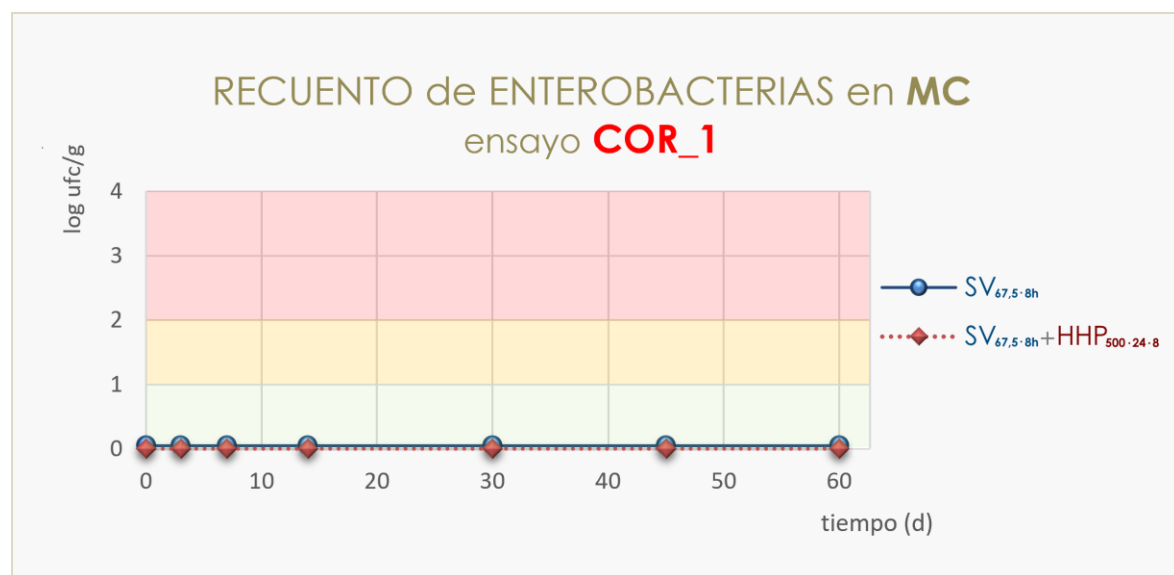


GRÁFICO 7. Recuentos de enterobacterias en COR_1: muestras control vs HPP (Ensayo preliminar cordero)

Control: SV (67.5 °C, 8h); Presurizadas: SV + HPP (500 MPa, 24 °C, 8'). Medio: MacConkey

(Elaboración propia)

La vida útil de las muestras SV (control) se sitúa en torno a los 60 días; mientras que las muestras HPP mantienen recuentos bajo el límite de detección a t_{60} (Gráficos 6 y 7).

En el segundo ensayo (**COR_2**), aunque se disminuyó la temperatura del tratamiento térmico SV con respecto a **COR_1** (de 67.5 a 65 °C), el considerable aumento del tiempo de pasteurización (de 8 a 24 horas), dio lugar a un escenario muy similar al que se produjo

en el ensayo de las judías: recuentos de células viables por debajo del umbral de detección en las muestras SV (control), en la totalidad de los medios de cultivo y durante todo el proceso analítico (Tabla 21). Situación que se intensificó, si cabe, con la aplicación de los tratamientos hiperbáricos (2.A y 2.B); manteniendo las muestras presurizadas, por tanto, recuentos semejantes a los de las muestras control (Gráfico 8).

RECuento de CÉLULAS VIABLES						
ensayo COR_2 SV₆₅·24h CONTROL						
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios	
	log	DS σ	log	DS σ	log	DS σ
	ufc/g		ufc/g		ufc/g	
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
3	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
60	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
90	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
120	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
150	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
180	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
210	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
240	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
270	< 1,30		< 1,30		< 1,30	

RECuento de CÉLULAS VIABLES						
ensayo COR_2 SV+HHP₅₀₀·29·8 (tp_A)						
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios	
	log	DS σ	log	DS σ	log	DS σ
	ufc/g		ufc/g		ufc/g	
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
3	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
60	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
90	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
120	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
150	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
180	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
210	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
240	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
270	< 1,30		< 1,30		< 1,30	

RECuento de CÉLULAS VIABLES						
ensayo COR_2 SV+HHP₅₀₀·50·8 (tp_B)						
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios	
	log	DS σ	log	DS σ	log	DS σ
	ufc/g		ufc/g		ufc/g	
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
3	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
60	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
90	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
120	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
150	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
180	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
210	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
240	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
270	< 1,30		< 1,30		< 1,30	

TABLA 21. Recuentos de células viables en COR_2: muestras control vs HPP (Ensayo cordero 2)

(Elaboración propia)

Control: SV (65 °C, 24h); Presurizadas: SV + HPP (tp_A: 500 MPa, 29 °C, 8'; tp_B: 500 MPa, 50 °C, 8'). Medios: TSA, MC, BGA, PALCAM y BP

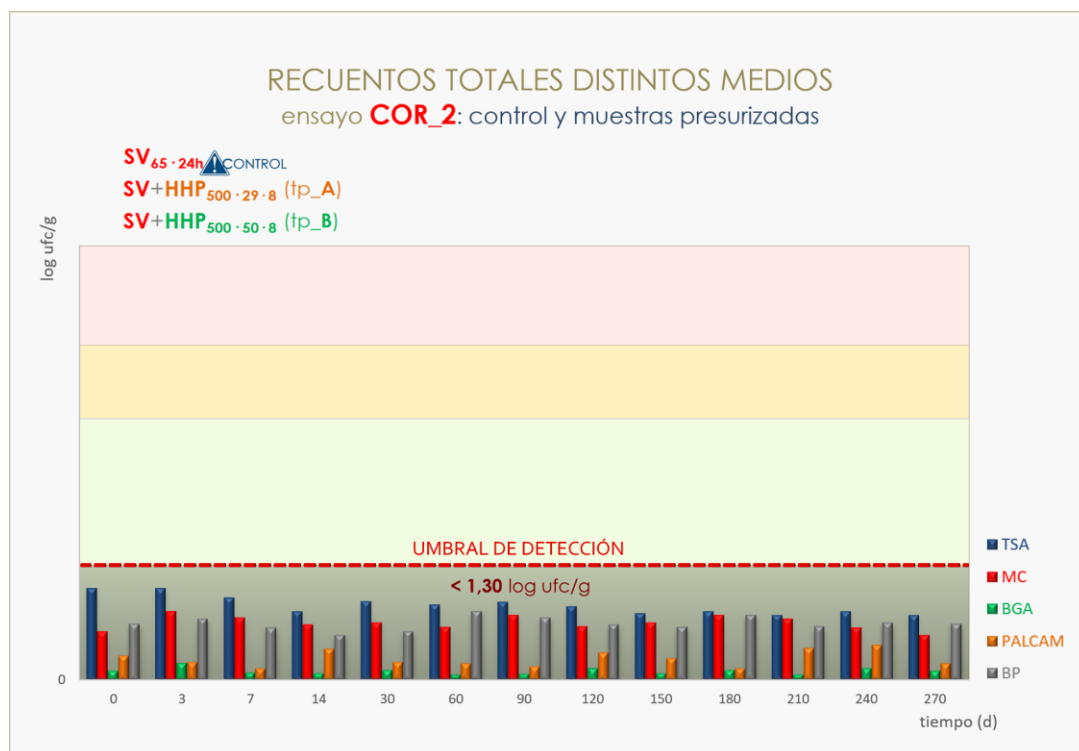


GRÁFICO 8. Evolución microbiológica de las muestras en CORD_2 (ensayo cordero 2)

(Elaboración propia)

Control: SV (65 °C, 24h); Presurizadas: SV + HPP (tp_A: 500 MPa, 29 °C, 8'; tp_B: 500 MPa, 50 °C, 8'). Medios: TSA, MC, BGA, PALCAM y BP

La representación gráfica de recuentos viables de mesófilos aerobios de los distintos tratamientos (controles y presurizados) en ambos ensayos evidencia que, a excepción del control **COR_1**, todas las parametrizaciones restantes garantizan un grado de higienización semejante en un período de 60 días (Gráfico 9).

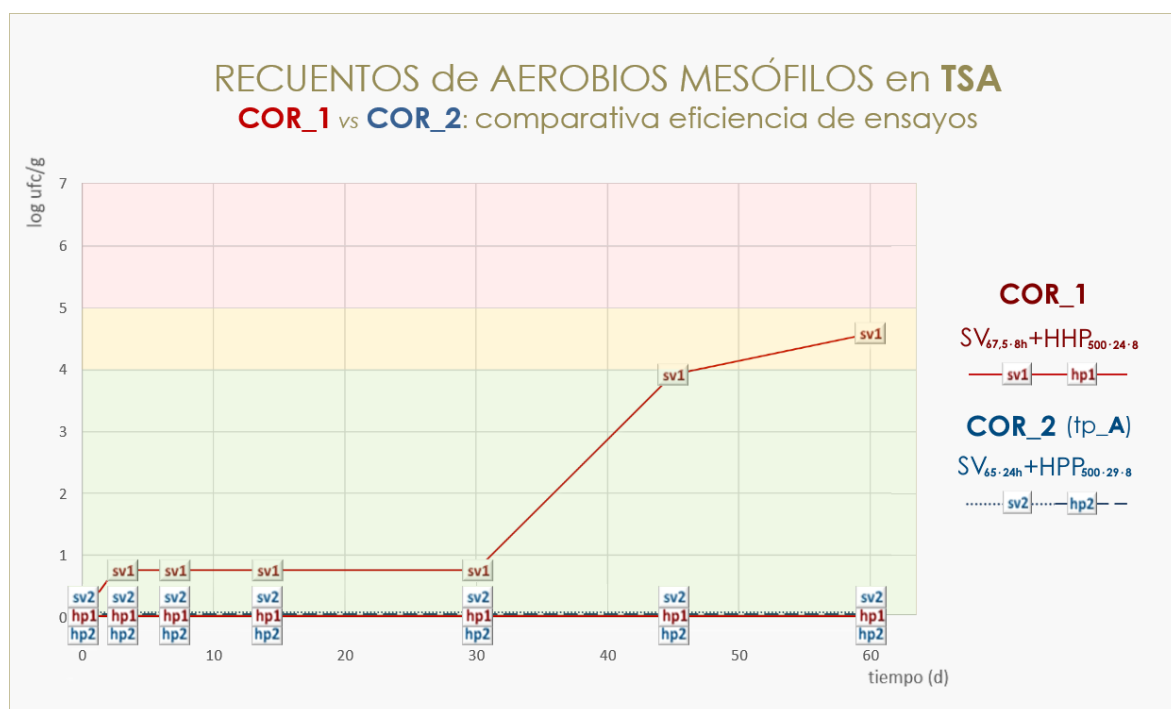


GRÁFICO 9. Comparativa de recuentos de aerobios mesófilos en COR_1 y COR_2 (cordero ambos ensayos). Medio: TSA

Muestras control: sv1 (67.5 °C, 8h) y sv2 (65 °C, 24h). Presurizadas: hp1 (500 MPa, 24 °C, 8') y hp2 (500 MPa, 24 °C, 8')

(Elaboración propia)

4.1.3. BACALAO: ENSAYOS BAC_1 Y BAC_2

Resumen de la periodicidad y prolongación del análisis de muestras, así como de las parametrizaciones de los diferentes tratamientos que integran dichos ensayos (extractos

Tabla 16 y Tabla 10):

► BAC_1	0	3	7	14	30	45	60			
► BAC_2	0	3	7	14	30	45	60	75	90	105
TIEMPO (días)										

CONTROLES	TRATAMIENTO SV		TRATAMIENTO HHP		
	T _{róner} (°C)	t _{cocción} (h')	P _{hidrostática} (MPa)	T _{cámara} (°C)	t _{retención} (')
► BAC_1	57.1	30'	500	24	8
► BAC_2.A	52	20'	300	50	8
► BAC_2.B			600	50	4
► BAC_2.C			600	22	8
► BAC_2.D			600	50	8

En el primer ensayo¹⁰, las muestras control presentaron recuentos viables de aerobios mesófilos totales que no alcanzaban el límite de detección en t₀. Recuentos que entre t₃ y t₁₄ se estabilizaron en torno a 2 unidades logarítmicas (1.70 en TSA y 2.18 en TSA salino a los 14 días de su tratamiento). A los 30 días de almacenamiento dichos recuentos se hallaban próximos a 4 unidades logarítmicas; continuando su crecimiento hasta rebasar las 7 unidades a los 60 días (Tabla 22).

RECuento de CÉLULAS VIABLES									
ensayo BAC_1					SV _{57,1 · 30}  CONTROL				
		TSA		TSA salino		MC		resto medios	
		log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ
tiempo (días)	0	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	3	1,70	± 1,41	1,70	± 1,41	< 1,30		< 1,30	
	7	1,70	± 1,41	1,70	± 1,41	< 1,30		< 1,30	
	14	1,70	± 1,41	2,18	± 0,21	< 1,30		< 1,30	
	30	3,70	± 0,03	3,78	± 0,15	< 1,30		< 1,30	
	45	5,63	± 0,06	5,69	± 0,02	< 1,30		< 1,30	
	60	7,33	± 0,03	7,40	± 0,01	< 1,30		< 1,30	

TABLA 22. Recuentos de células viables en muestras control BAC_1 (ensayo preliminar bacalao)

Control: SV (57.1 °C, 30'). Medios: TSA, TSAsalino, MC, BGA, PALCAM y BP

(Elaboración propia)

¹⁰ En BAC_2 se prescindió de la siembra TSA salino al no existir diferencias significativas en los recuentos viables con respecto a TSA.

Los recuentos viables de enterobacterias en las muestras SV (control) no superaron el umbral de detección en ningún momento del tiempo de muestreo. Un comportamiento similar mostraron los recuentos en el resto de medios de cultivo (Tabla 22).

En el caso de las muestras presurizadas, los recuentos viables de aerobios mesófilos sobrepasaron el límite de detección más tardíamente: a los 60 días de almacenamiento; con un brusco incremento, muy próximo a 5 unidades logarítmicas (Tabla 23).

Las muestras tratadas con HHP, como ocurriera antes con las muestras control, no mostraron recuentos viables por encima del límite de detección en ninguno de los medios restantes a lo largo de todo el procedimiento analítico (Tabla 23).

RECuento de CÉLULAS VIABLES									
ensayo BAC_1					SV+HHP _{500 · 24 · 8}				
tiempo (días)	TSA		TSA salino		MC		resto medios		
	log	DS σ	log	DS σ	log	DS σ	log	DS σ	
	ufc/g		ufc/g		ufc/g		ufc/g		
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
3	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
45	< 1,30		< 1,30		< 1,30		< 1,30		
60	4,92 ± 0,03		4,98 ± 0,01		< 1,30		< 1,30		

TABLA 23. Recuentos de células viables en muestras presurizadas BAC_1 (ensayo preliminar bacalao)
Parámetros HPP: 500 MPa, 24 °C, 8'. Medios: TSA, TSAsalino, MC, BGA, PALCAM y BP
(Elaboración propia)

Según se ha reseñado, no se apreció una diferencia significativa en el crecimiento de mesófilos aerobios al incrementar la salinidad del agar TSA (Gráficos 10 y 11).

Estos resultados permiten visualizar que la vida útil de las muestras SV no supera los 40 días; mientras que las tratadas con HHP se extiende hasta los 60 días (Gráficos 10 y 12).

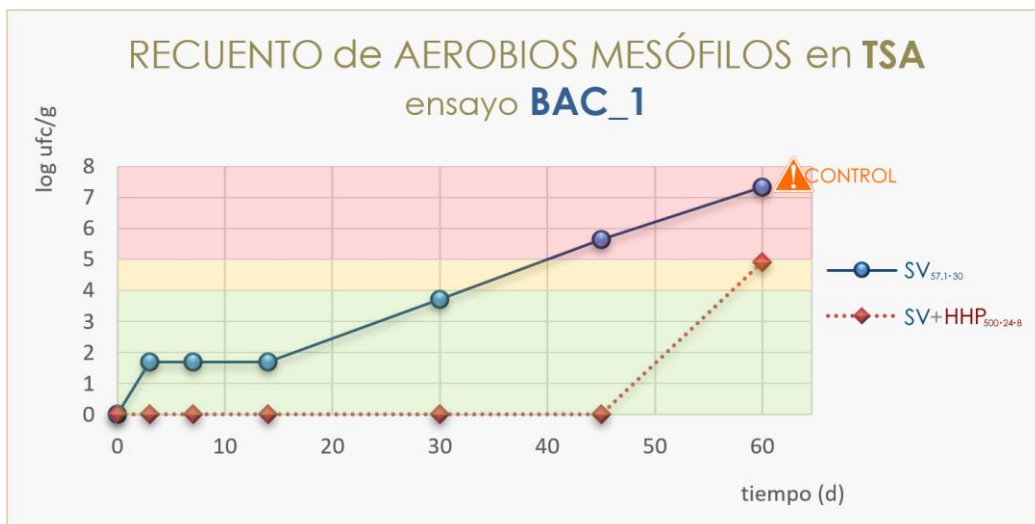


GRÁFICO 10. Evolución de mesófilos aerobios en BAC_1: muestras control vs presurizadas (Ensayo preliminar bacalao)
Control: SV (57.1 °C, 30'); Presurizadas: SV + HHP (500 MPa, 24 °C, 8'). Medio: TSA (Elaboración propia)

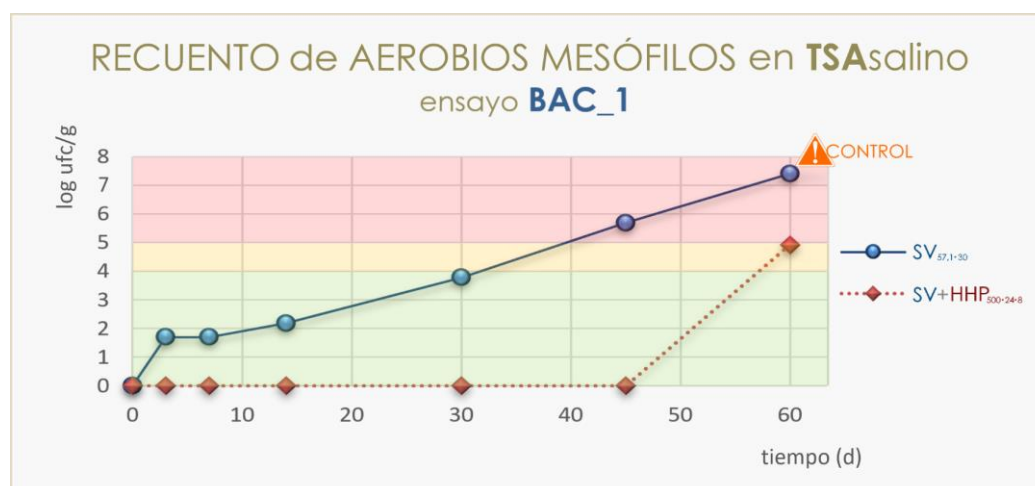


GRÁFICO 11. Evolución de mesófilos aerobios en BAC_1: muestras control vs presurizadas (Ensayo preliminar bacalao)
Control: SV (57.1 °C, 30'); Presurizadas: SV + HHP (500 MPa, 24 °C, 8'). Medio: TSA salino (Elaboración propia)

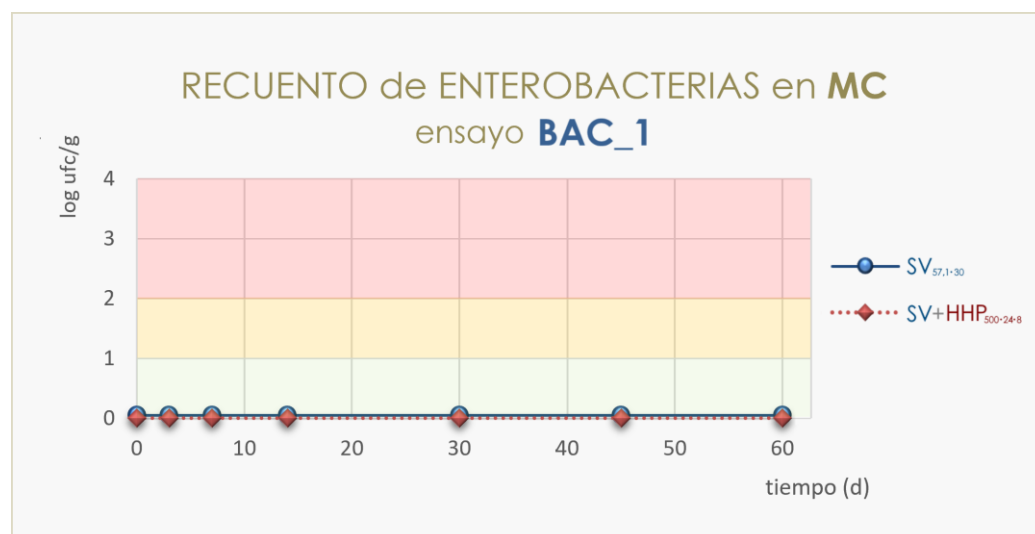


GRÁFICO 12. Recuentos de enterobacterias en BAC_1: muestras control vs presurizadas (Ensayo preliminar bacalao)
Control: SV (57.1 °C, 30'); Presurizadas: SV + HHP (500 MPa, 24 °C, 8'). Medio: MacConkey (Elaboración propia)

En el segundo ensayo del bacalao se disminuyó la intensidad del tratamiento térmico, y se diversificaron las parametrizaciones del procesado HHP (con propósito de vislumbrar alguna inferencia sobre el efecto que ejercen las distintas variables de la parametrización hiperbárica sobre la higienización final del alimento).

RECuento de CÉLULAS VIABLES							
		ensayo BAC_2		SV _{52 · 20}		 CONTROL	
		TSA		MC		resto medios	
tiempo (días)		log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ
	0	2,30	± 0,29	1,90	± 0,30	< 1,30	
	3	3,13	± 0,22	2,86	± 0,24	< 1,30	
	7	5,45	± 0,06	3,70	± 0,13	< 1,30	
	14	6,45	± 0,06	4,70	± 0,14	< 1,30	
	30	8,73	± 0,03	7,71	± 0,05	< 1,30	
	45	9,59	± 0,15	9,21	± 0,43	< 1,30	
	60	10,51	± 0,44	9,68	± 0,15	< 1,30	
	75	11,03	± 0,38	9,56	± 0,07	< 1,30	
	90	11,64	± 0,09	10,45	± 0,39	< 1,30	
	105	9,79	± 0,48	8,84	± 0,10	< 1,30	

TABLA 24. Recuentos de células viables en muestras control BAC_2
(Ensayo bacalao 2): SV (52 °C, 20'). Medios: TSA, MC, BGA, PALCAM y BP

La baja intensidad del tratamiento térmico dio lugar a recuentos viables por encima del umbral de detección en las muestras control desde t_0 ; tanto en TSA como en MC. Los recuentos de aerobios mesófilos totales se situaron en la primera semana en casi 5.5 log UFC/g; a los 30 días se hallaban cerca de 9 log UFC/g (Tabla 24).

Análogamente, los recuentos viables de enterobacterias experimentaron un crecimiento de similar magnitud; equiparándose las poblaciones de ambos grupos, por encima de las 9 unidades logarítmicas, a t_{45} . En el resto de medios, los recuentos viables se mantuvieron bajo el límite de detección durante todo el tiempo de muestreo (Tabla 24).

RECuento de CÉLULAS VIABLES							
		ensayo BAC_2		SV+HHP₆₀₀ · 50 · 8 (tp_D)			
		TSA		MC		resto medios	
		log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ
tiempo (días)	0	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	3	1,59	± 0,35	< 1,30		< 1,30	
	7	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	14	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	30	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	45	1,85	± 0,39	< 1,30		< 1,30	
	60	4,26	± 0,10	< 1,30		< 1,30	
	75	5,37	± 0,07	< 1,30		< 1,30	
	90	5,10	± 0,17	< 1,30		< 1,30	
	105	4,58	± 0,20	< 1,30		< 1,30	

TABLA 25. Recuentos células viables en muestras presurizadas BAC_2.D

RECuento de CÉLULAS VIABLES							
		ensayo BAC_2		SV+HHP₆₀₀ · 22 · 8 (tp_C)			
		TSA		MC		resto medios	
		log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ
tiempo (días)	0	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	3	2,02	± 0,41	< 1,30		< 1,30	
	7	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	14	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	30	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
	45	3,04	± 0,09	< 1,30		< 1,30	
	60	5,17	± 0,05	< 1,30		< 1,30	
	75	6,54	± 0,05	< 1,30		< 1,30	
	90	7,07	± 0,14	< 1,30		< 1,30	
	105	5,64	± 0,23	< 1,30		< 1,30	

TABLA 26. Recuentos células viables en muestras presurizadas BAC_2.C

RECuento de CÉLULAS VIABLES						
ensayo BAC_2 SV+HHP₆₀₀₋₅₀₋₄ (tp_B)						
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios	
	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
3	1,86 ± 0,45		< 1,30		< 1,30	
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
45	2,38 ± 0,14		< 1,30		< 1,30	
60	4,79 ± 0,06		< 1,30		< 1,30	
75	5,67 ± 0,06		< 1,30		< 1,30	
90	5,67 ± 0,07		< 1,30		< 1,30	
105	5,27 ± 0,15		< 1,30		< 1,30	

TABLA 27. Recuentos células viables en muestras presurizadas BAC_2.B

(Ensayo bacalao 2): Distintos tratamientos HHP (tp_D: 600 MPa, 50 °C, 8'; tp_C: 600 MPa, 22 °C, 8'; tp_B: 600 MPa, 50 °C, 4'; tp_A: 300 MPa, 50 °C, 8')

Medios: TSA, MC, BGA, PALCAM y BP

RECuento de CÉLULAS VIABLES						
ensayo BAC_2 SV+HHP₃₀₀₋₅₀₋₈ (tp_A)						
tiempo (días)	TSA		MC		resto medios	
	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ	log ufc/g	DS σ
0	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
3	2,13 ± 0,30		< 1,30		< 1,30	
7	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
14	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
30	< 1,30		< 1,30		< 1,30	
45	4,99 ± 0,13		< 1,30		< 1,30	
60	6,70 ± 0,04		< 1,30		< 1,30	
75	8,47 ± 0,10		< 1,30		< 1,30	
90	8,77 ± 0,11		< 1,30		< 1,30	
105	6,55 ± 0,05		< 1,30		< 1,30	

TABLA 28. Recuentos células viables en muestras presurizadas BAC_2.A

(Elaboración propia)

En todas las muestras sometidas a procesamiento hiperbárico (en cualquiera de sus 4 parametrizaciones: tp_A, tp_B, tp_C o tp_D) se redujeron de forma considerable los recuentos viables de aerobios mesófilos totales; permaneciendo todos ellos bajo el umbral de detección hasta t₄₅ (salvo un pequeño repunte en t₃, que se osciló entre 1.5 y 2 log UFC/g según tratamiento). Los recuentos máximos se situaron entre 5 y 6 log UFC/g a t₇₅, caso de tp_D y tp_B, por encima de 7 log UFC/g en tp_C, y cerca de 9 log UFC/g en tp_A; a t₉₀ en el caso de estos dos últimos tratamientos presurizados (Tablas 25, 26, 27 y 28; Gráfico 13).

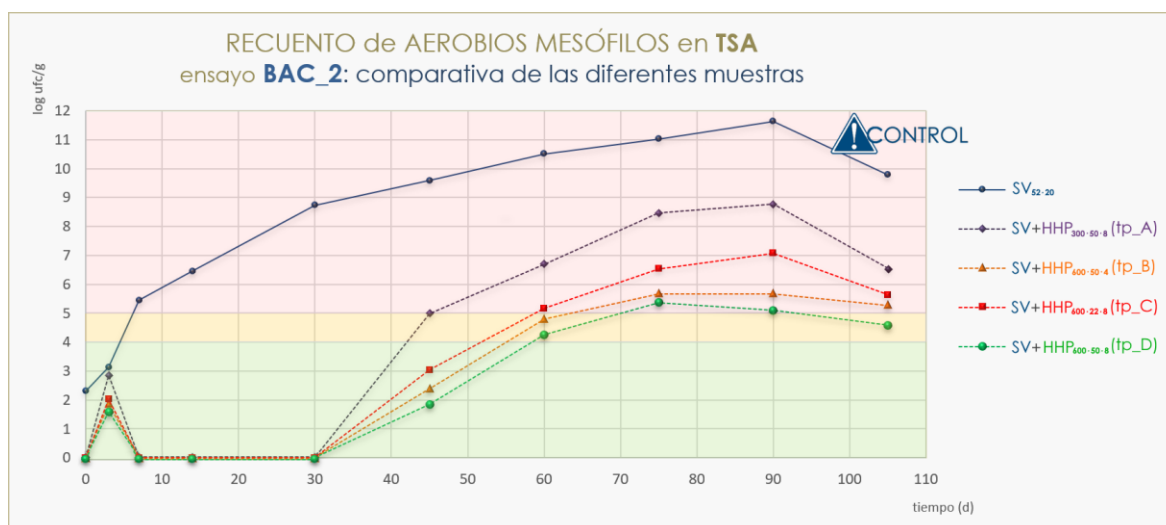


GRÁFICO 13. Evolución de aerobios mesófilos en BAC_2 (ensayo bacalao 2). Comparativa distintas muestras: SV vs HPP. Medio: TSA

Control: SV (52 °C, 20'); Presurizadas: SV + HPP (tp_D: 600 MPa, 50 °C, 8'; tp_C: 600 MPa, 22 °C, 8'; tp_B: 600 MPa, 50 °C, 4'; tp_A: 300 MPa, 50 °C, 8')

Los recuentos viables de enterobacterias (Gráfico 14) se mantuvieron bajo el límite de detección a lo largo de todo el procedimiento analítico en las cuatro variantes presurizadas. Hecho éste que se hizo extensivo al resto de medios de cultivo.

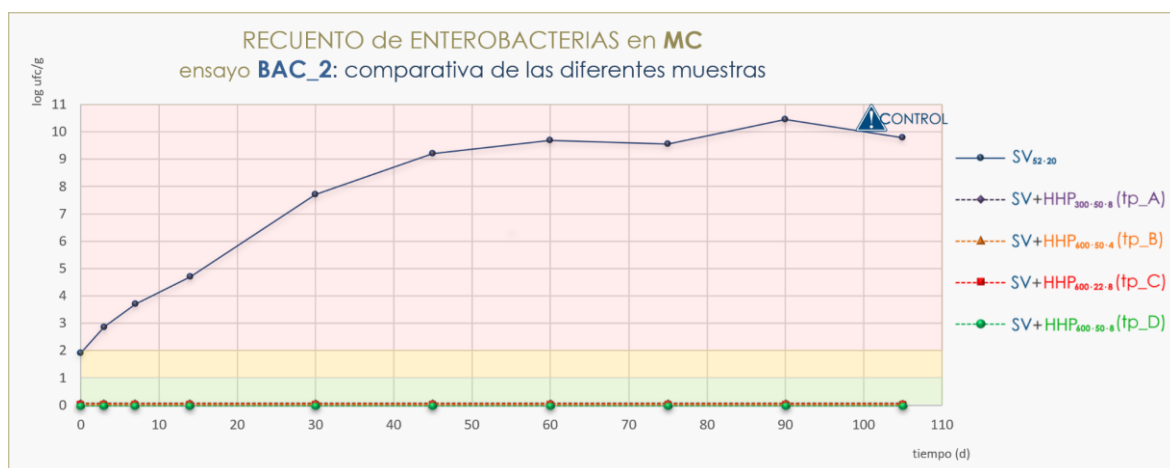


GRÁFICO 14. Evolución de enterobacterias en BAC_2 (ensayo bacalao 2). Comparativa distintas muestras: SV vs HPP. Medio: MacConkey
Control: SV (52 °C, 20'); Presurizadas: SV + HPP (tp_D: 600 MPa, 50 °C, 8'; tp_C: 600 MPa, 22 °C, 8'; tp_B: 600 MPa, 50 °C, 4'; tp_A: 300 MPa, 50 °C, 8')
(Elaboración propia)

En términos de vida útil, la representación precedente (Gráfico 14) indica que las muestras control (SV) en t_0 , conforme a los rangos que define la normativa, ya se hallaban a punto de sobrepasar los límites de aceptabilidad microbiológica.

En el caso de las muestras que recibieron algún tipo de tratamiento presurizado, su vida útil vino determinada por sus poblaciones de aerobios mesófilos totales; estimándose, a la vista de los resultados (Gráfico 13), máximos de hasta 70 días para las muestras que recibieron el tratamiento presurizado de mayor intensidad (tp_D), alrededor de 60 días para aquellas en que se redujo el tiempo de retención o la temperatura de la cámara de presurización (tp_B y tp_C, respectivamente); y en torno a 45 días para las muestras sometidas a una presión de sólo 300 MPa (tp_A).

Si se compara la eficiencia de los distintos tratamientos presurizados al disminuir a la mitad una de sus variables (presión hidrostática, temperatura de cámara de presurización y tiempo de retención), se puede observar que una reducción de la presión (de 600 MPa a

300 MPa: tp_D vs tp_A) ocasionó un incremento de alrededor de 3 unidades logarítmicas (Gráfico 15) en los recuentos de células viables (entre t_{45} y t_{60}).

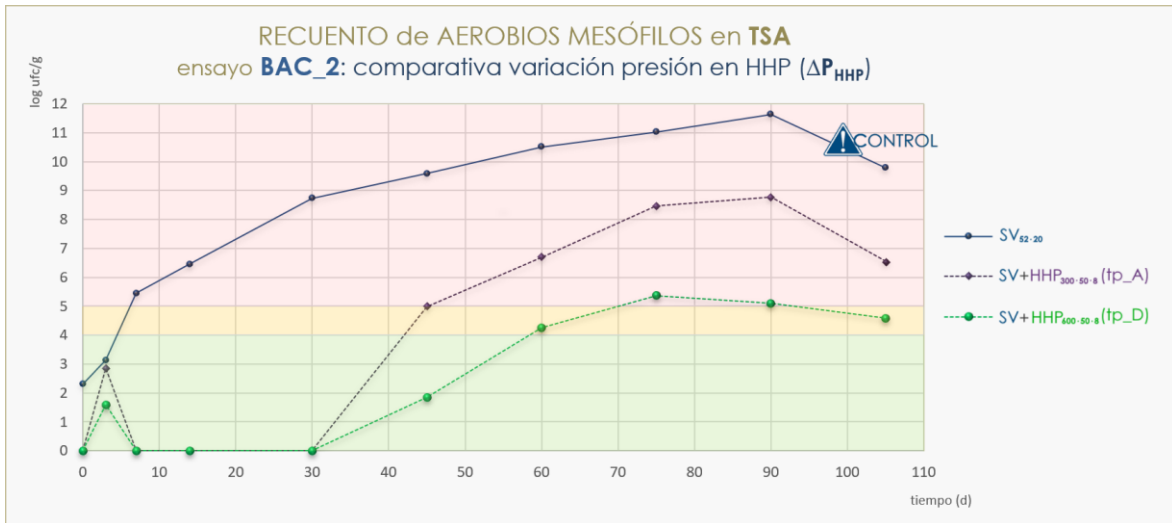


GRÁFICO 15. Comparativa de la variación paramétrica HPP (Δ Presión) en BAC_2 (ensayo bacalao 2). Medio: TSA
Control: SV (52 °C, 20'); Presurizadas: SV + HPP (tp_D : 600 MPa, 50 °C, 8'; tp_A : 300 MPa, 50 °C, 8').
(Elaboración propia)

Sin embargo, una disminución en la temperatura de la cámara de presurización (de 50 °C a 22 °C: tp_D vs tp_C) supuso un incremento de en torno a 1 unidad logarítmica en los recuentos de células viables (entre t_{45} y t_{60}) (Gráfico 16).

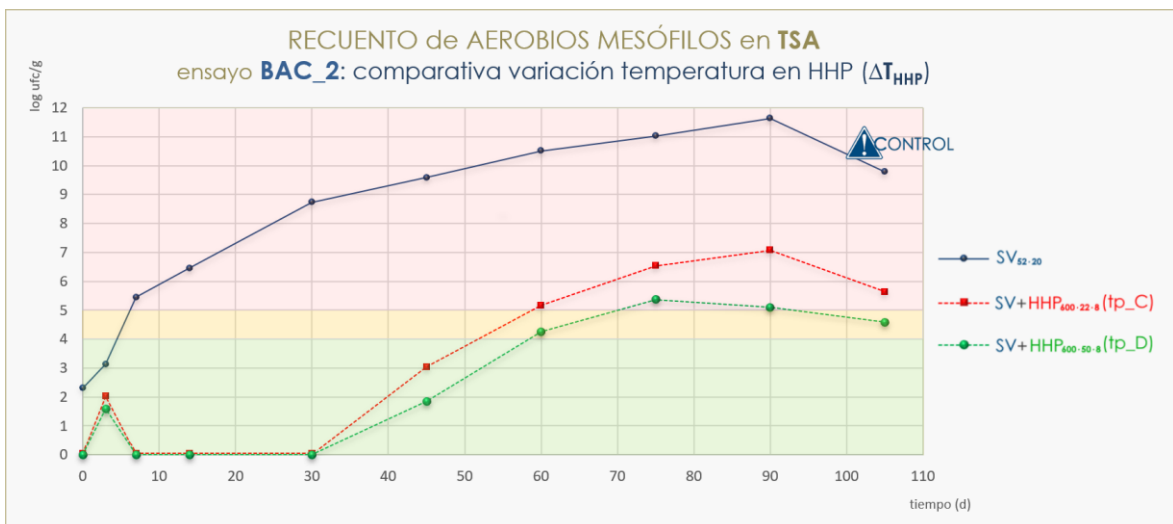


GRÁFICO 16. Comparativa de la variación paramétrica HHP (Δ Temperatura) en BAC_2 (ensayo bacalao 2). Medio: TSA
Control: SV (52 °C, 20'); Presurizadas: SV + HPP (tp_D : 600 MPa, 50 °C, 8'; tp_C : 600 MPa, 22 °C, 8').
(Elaboración propia)

Mientras que un decremento en un factor 2 del tiempo de aplicación del máximo de la presión hidrostática (de 8 a 4 minutos: tp_D vs tp_B) significó un aumento aproximado

de 0.5 unidades logarítmicas (Gráfico 17) en los recuentos de células viables de mesófilos aerobios totales (entre t_{45} y t_{60}).

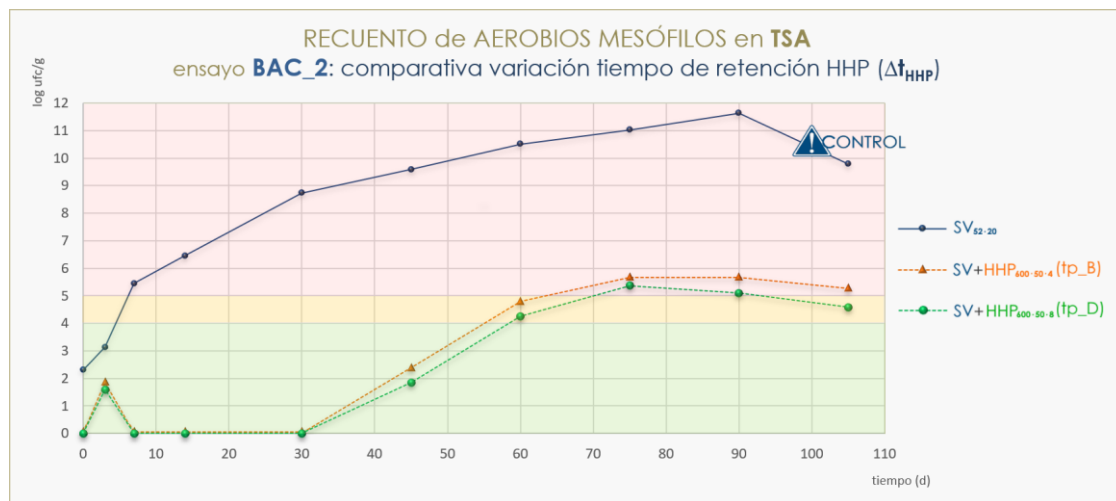


GRÁFICO 17. Comparativa de la variación paramétrica HHP (Δ tiempo) en BAC_2 (ensayo bacalao 2). Medio: TSA (Control: SV (52 °C, 20'); Presurizadas: SV + HHP (tp_D: 600 MPa, 50 °C, 8'; tp_B: 600 MPa, 50 °C, 4'). (Elaboración propia)

Las siguientes representaciones muestran la higienización comparada que se alcanza en ambos ensayos de bacalao; en recuentos viables de mesófilos aerobios la primera de ellas (Gráfico 18), y en enterobacterias la segunda (Gráfico 19):

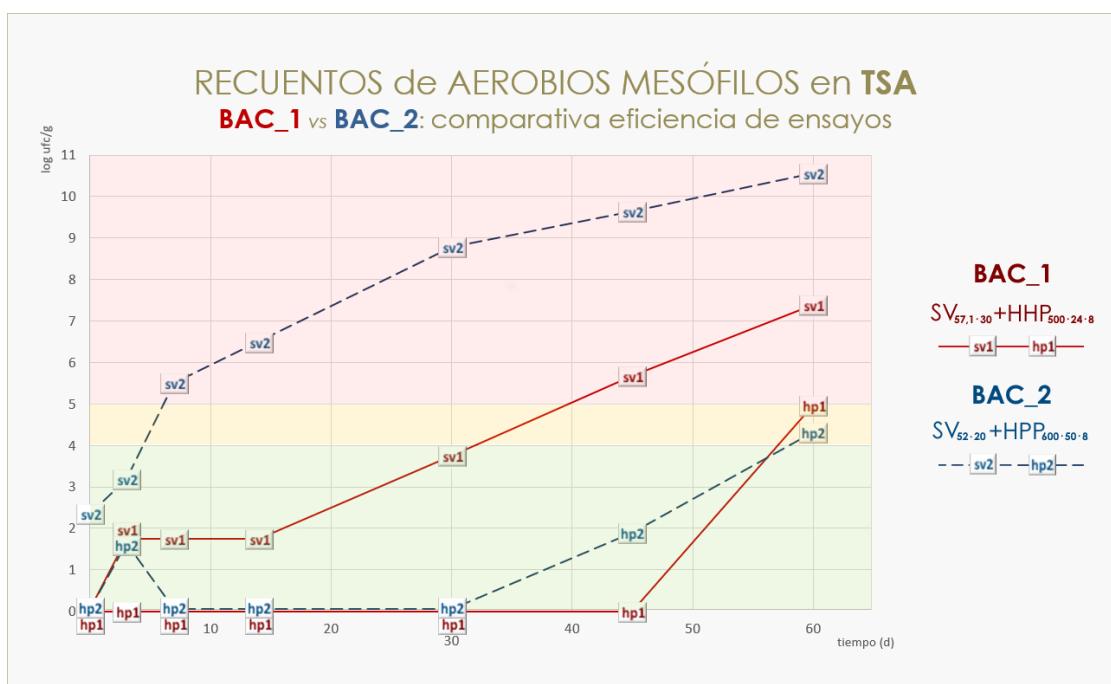


GRÁFICO 18. Comparativa de recuentos de aerobios mesófilos en BAC_1 y BAC_2 (bacalao ambos ensayos). Medio: TSA Muestras control: sv1 (57.1 °C, 30') y sv2 (52 °C, 20'). Presurizadas: hp1 (500 MPa, 24 °C, 8') y hp2 (tp_D: 600 MPa, 50 °C, 8') (Elaboración propia)

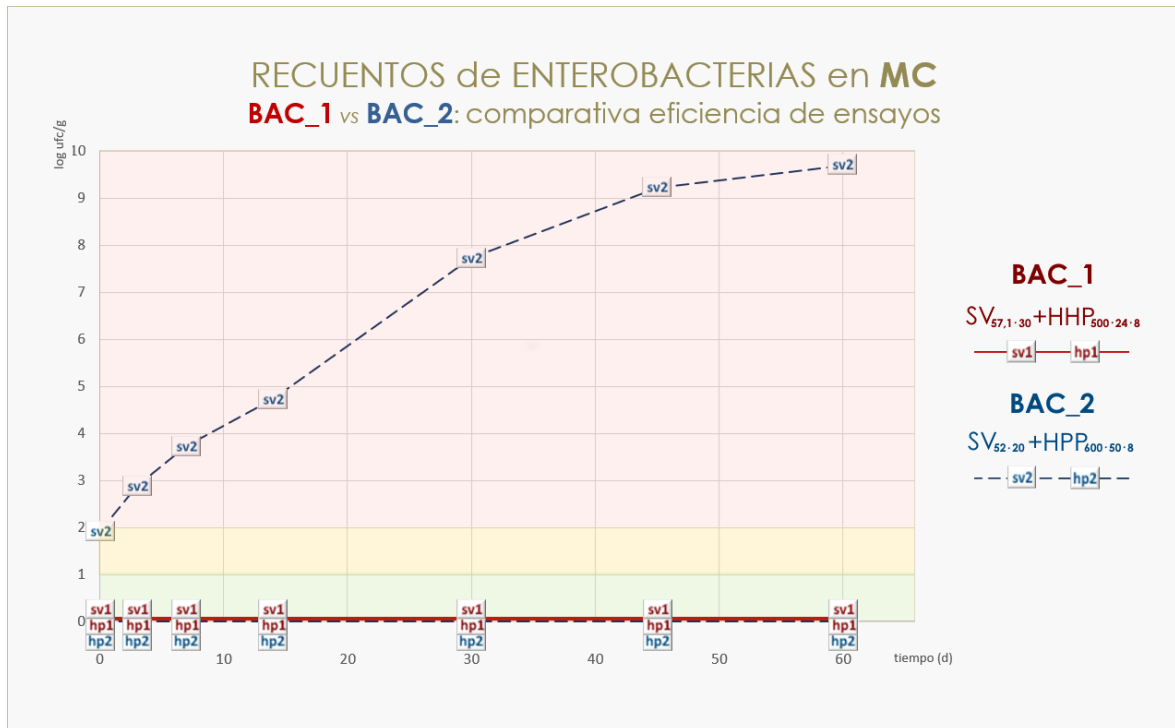


GRÁFICO 19. Comparativa de recuentos de enterobacterias en BAC_1 y BAC_2 (bacalao ambos ensayos). Medio: MacConkey
Muestras control: sv1 (57.1 °C, 30') y sv2 (52 °C, 20'). Presurizadas: hp1 (500 MPa, 24 °C, 8') y hp2 (tp_D: 600 MPa, 50 °C, 8')
(Elaboración propia)

Constatándose, debido a la baja intensidad de su tratamiento térmico, un sustancial decremento de la calidad microbiológica de las muestras SV en BAC_2. Calidad que se restituye (incluso se mejora ligeramente) con la aplicación del tratamiento hiperbárico (Gráfico 18).

4.2. ESTUDIO DE DIVERSIDAD BACTERIANA

Este estudio de diversidad α se efectuó sobre las muestras del ensayo [BAC_2](#). El número de lecturas asignadas a unidades taxonómicas operativas (OTU) a nivel de género osciló entre 37162 y 129557, resultando su promedio de 76881 (Tabla 29).

En las muestras control se observó una disminución del índice *Chao1* a partir del séptimo día de incubación. En las muestras presurizadas la minoración de este índice requirió tiempos de incubación más prolongados (a partir de t_{30} , generalmente; pudiendo demorarse hasta t_{45} o t_{60} , según tipo de tratamiento). Se observó, asimismo, similar comportamiento en los índices *Shannon* y *Simpson* durante la incubación tardía (Tabla 29).

NÚMERO DE LECTURAS ASIGNADAS A UNIDADES TAXONÓMICAS OPERATIVAS

E ÍNDICES DE DIVERSIDAD α A NIVEL GÉNERO

ensayo [BAC_2](#)

MUESTRAS DE CONTROL

MUESTRAS PRESURIZADAS

SV ₅₂₋₂₀					SV+HHP ₃₀₀₋₅₀₋₈				SV+HHP ₆₀₀₋₅₀₋₄				SV+HHP ₆₀₀₋₂₂₋₈				SV+HHP ₆₀₀₋₅₀₋₈					
	NÚMERO LECTURAS	CHAO1	SHANNON	SIMPSON		NÚMERO LECTURAS	CHAO1	SHANNON	SIMPSON	NÚMERO LECTURAS	CHAO1	SHANNON	SIMPSON	NÚMERO LECTURAS	CHAO1	SHANNON	SIMPSON	NÚMERO LECTURAS	CHAO1	SHANNON	SIMPSON	
tiempo alm. (días)	0	57650	69	2.67	0.89	3	80123	80	2.76	0.91	37162	82	2.67	0.88	76095	83	2.53	0.87	49311	66	2.56	0.87
	3	83152	67	2.32	0.83	7	64749	68	2.10	0.77	84481	92	2.44	0.84	72866	68	2.38	0.86	73380	85	2.54	0.88
	7	105751	33	0.36	0.12	14	48361	70	2.53	0.87	60180	85	2.31	0.8	51027	88	2.51	0.85	57243	78	2.10	0.76
	14	91869	14	0.82	0.45	30	77803	63	2.57	0.89	68849	97	2.75	0.9	78121	59	2.08	0.82	69923	62	2.54	0.88
	30	102818	21	1.59	0.73	45	98955	31	0.73	0.43	107646	45	1.30	0.52	43784	60	2.50	0.88	74970	76	2.27	0.83
tiempo de almacenamiento (días)	60	85408	14	1.47	0.72	60	89039	17	1.11	0.62	95428	20	0.97	0.54	90508	36	0.65	0.23	129557	14	0.25	0.09
						75	90091	21	0.73	0.42	105106	33	1.24	0.53	64176	55	2.39	0.87	87593	15	0.05	0.01
						90	80582	16	0.74	0.47	65624	17	0.48	0.27	64318	44	2.26	0.85	49819	32	1.24	0.48
						105	83397	11	0.13	0.04	86020	14	0.42	0.2	69903	25	0.85	0.47	76186	17	0.19	0.06

TABLA 29. Índices de diversidad α y número de OTUs (nivel género) en BAC_2 (ensayo bacalao 2)

Adaptado de: (Pérez Alcalá, Grande Burgos, Rodríguez López, Lucas, Gálvez, & Pérez Pulido, 2023)

En las muestras control la microbiota estaba compuesta, principalmente, por los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes*; mientras que *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* presentaban bajas abundancias. Sus abundancias relativas (tanto de filos como de los taxones inferiores) variaron significativamente durante el período de almacenamiento refrigerado (Gráfico 20).

DIVERSIDAD BACTERIANA (POR FILOS)

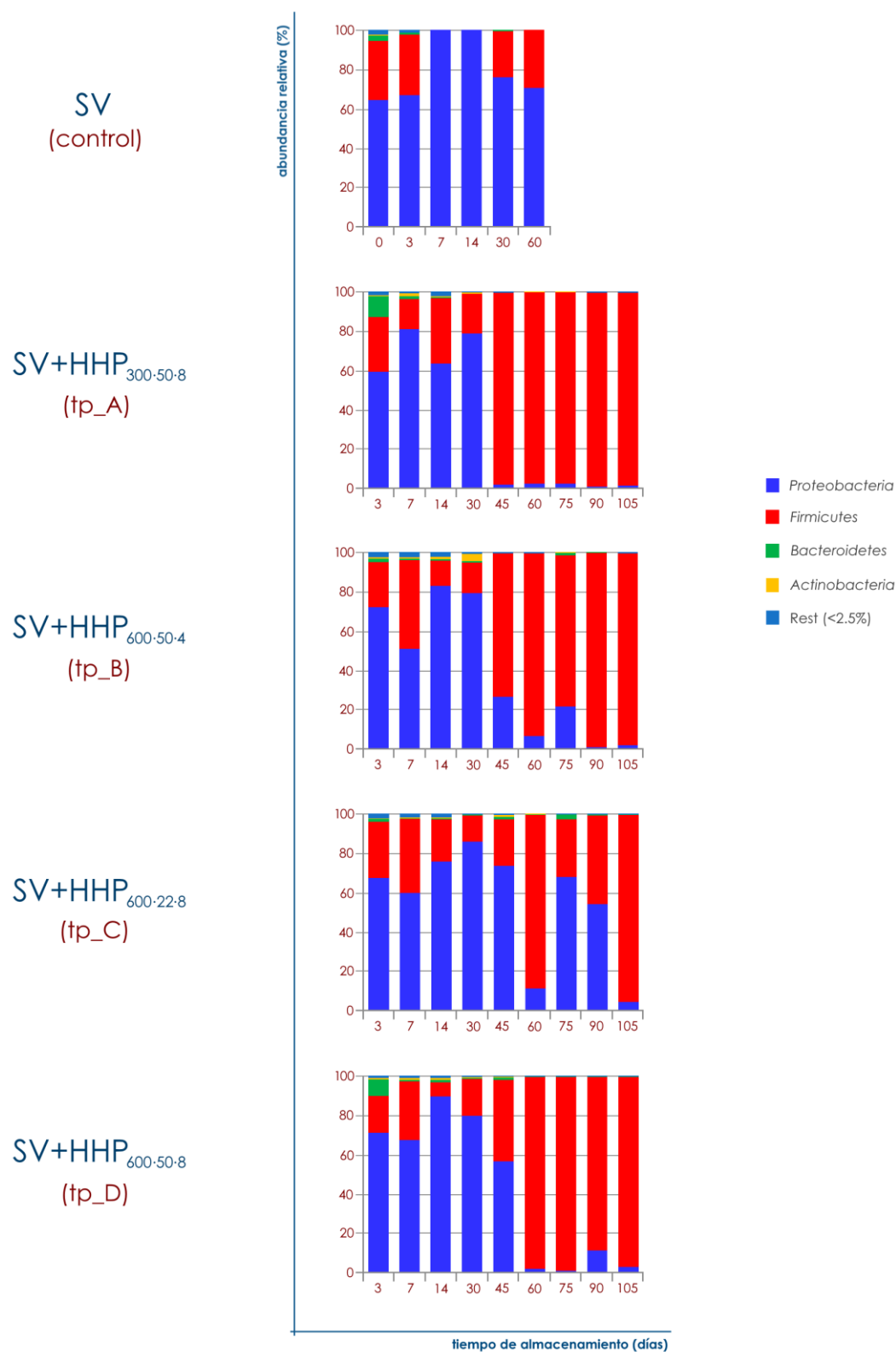


GRÁFICO 20. Abundancias microbianas relativas (por filos) en muestras BAC_2 (ensayo bacalao 2)

Adaptado de: (Pérez Alcalá, Grande Burgos, Rodríguez López, Lucas, Gálvez, & Pérez Pulido, 2023)

Por orden de abundancia relativa, a t_0 en *Proteobacteria* se incluían las siguientes familias: *Burkholderiaceae* (representada por los géneros como *Cupriavidus* y *Ralstonia*), *Enterobacteriaceae* (géneros *Escherichia-Shigella*, y otras asignadas sólo a nivel familia), *Xanthomonadaceae* (género *Vulcaniibacterium*), y *Moraxellaceae* (género *Acinetobacter*). Entre las familias de *Firmicutes* se hallaban *Bacillaceae* (representada ésta por el género *Anoxybacillus*) y *Paenibacillaceae* (género *Paenibacillus*) (Gráfico 21).

En las muestras control, *Proteobacteria* presentó la mayores abundancias relativas durante el primer período de almacenamiento refrigerado (a t_7 y t_{14}); siendo la familia *Pseudomonadaceae* (género *Pseudomonas*) la que experimentó a partir de t_3 un mayor incremento de abundancia, hasta convertirse en el grupo predominante en el citado período. Los miembros de *Burkholderiaceae* mantuvieron una elevada abundancia relativa a t_3 , disminuyendo drásticamente a partir de ese momento (muestras de t_7 a t_{60}). Una evolución similar se observó en la familia *Xanthomonadaceae*. Los representantes de *Enterobacteriaceae*, por su parte, disminuyeron notablemente su presencia entre t_7 y t_{14} ; convirtiéndose en el grupo predominante durante el resto del periodo de almacenamiento muestreado (con abundancias relativas que superaron el 50%). Durante este período de incubación tardío, los principales miembros fueron *Enterobacteriaceae* (otros), seguidos de *Enterobacter* y *Serratia* (Gráfico 21).

En cuanto a *Firmicutes*, los endosporíferos presentaron una elevada abundancia relativa a t_3 ; disminuyendo considerablemente sus poblaciones durante el resto del tiempo de almacenamiento. Sorprendentemente, los miembros de la familia *Carnobacteriaceae* (género *Carnobacterium*) incrementaron su abundancia relativa a partir de t_{14} , alcanzando el 27,5% en t_{60} (Pérez Alcalá, Grande Burgos, Rodríguez López, Lucas, Gálvez, & Pérez Pulido, 2023).

DIVERSIDAD BACTERIANA (POR FAMILIAS)

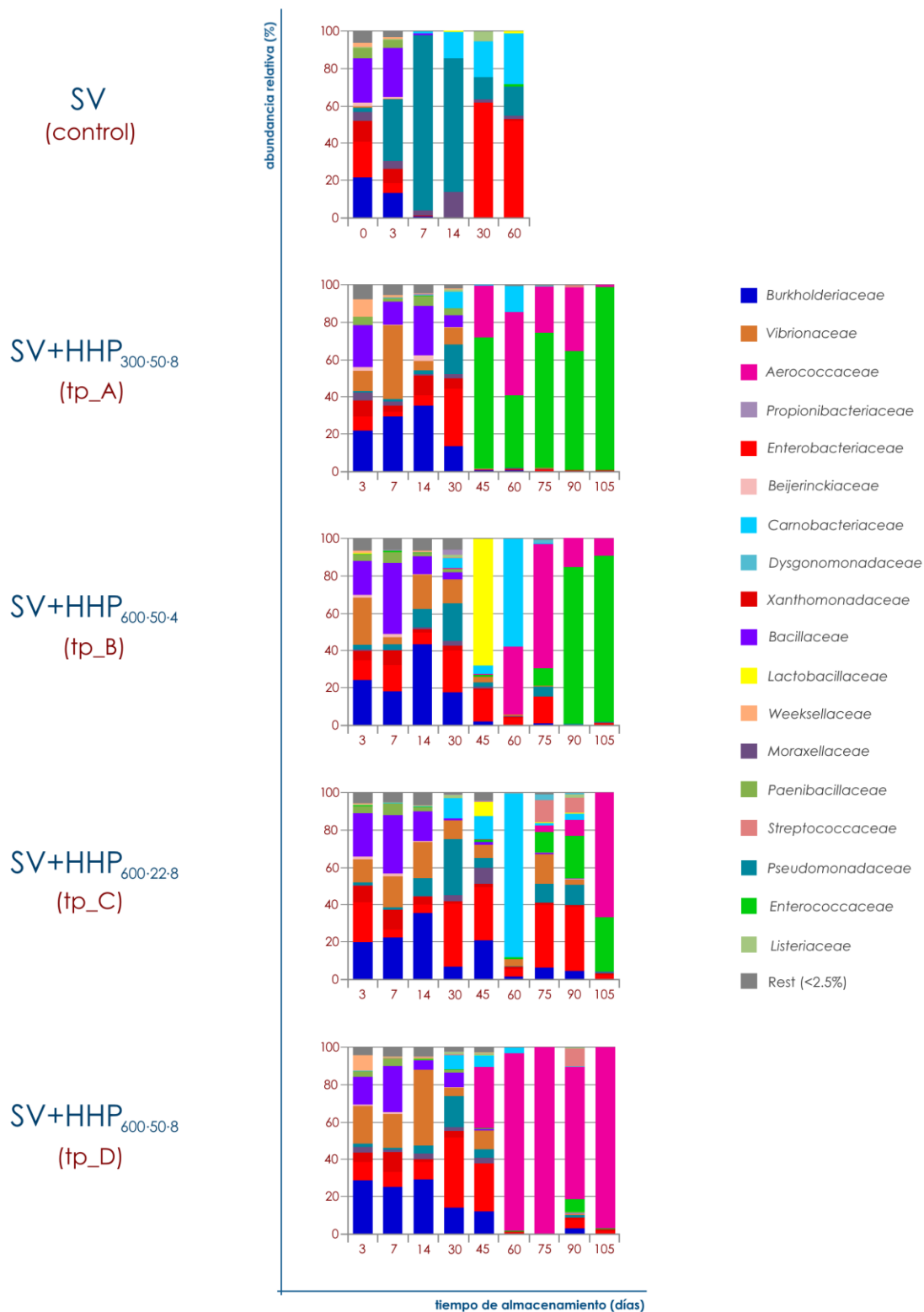


GRÁFICO 21. Abundancias microbianas relativas (por familias) en muestras BAC_2 (ensayo bacalao 2)

Adaptado de: (Pérez Alcalá, Grande Burgos, Rodríguez López, Lucas, Gálvez, & Pérez Pulido, 2023)



En las muestras presurizadas la microbiota estuvo compuesta principalmente por miembros de *Proteobacteria* durante los primeros 30 días de almacenamiento. Momento en que *Firmicutes* se convirtió en el grupo predominante (con ciertas excepciones: en *tp_C* a *t*₄₅, *t*₇₅ y *t*₉₀, y en *tp_D* a *t*₄₅).

En el primer filo, la familia *Burkholderiaceae* (géneros *Cupriavidus* y *Ralstonia*) mostró las mayores abundancias relativas durante los primeros 14 días de almacenamiento. La familia *Vibrionaceae* (género *Photobacterium*) presentó, asimismo, elevada abundancia relativa durante el citado período. Mientras que, *Enterobacteriaceae* fue la familia que alcanzó mayores abundancias a *t*₃₀ (según tratamiento, también a *t*₄₅). *Pseudomonadaceae* (género *Pseudomonas*), por su parte, registró en general bajas abundancias relativas a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento (a excepción de *t*₃₀).

En tales muestras, *Firmicutes* estuvo representado principalmente por miembros de la familia *Bacillaceae* (género *Anoxybacillus*) durante el almacenamiento temprano (hasta *t*₁₄). Durante el almacenamiento medio y tardío, sus principales miembros pertenecieron a las familias *Aerococcaceae* (género *Aerococcus*), *Enterococcaceae* (género *Enterococcus*) y *Carnobacteriaceae* (género *Carnobacterium*). Si bien, las abundancias relativas de estos tres grupos bacterianos varió considerablemente según la parametrización del tratamiento hiperbárico: *Enterococcus* presentó mayores abundancias en las muestras sometidas a una menor presión (*tp_A*: 300 MPa, 50 °C, 8'), así como durante el almacenamiento tardío de las muestras tratadas con menor tiempo de retención (*tp_B*: 600 MPa, 50 °C, 4'; a *t*₉₀ y *t*₁₀₅). En las muestras que recibieron tratamientos de mayor intensidad (*tp_D*: 600 MPa, 50 °C, 8') *Aerococcus* fue el género predominante (entre *t*₆₀ y *t*₁₀₅); escenario que también se produjo en *tp_B* a *t*₇₅ y en *tp_C* a *t*₁₀₅. *Carnobacterium* presentó la mayor abundancia relativa a *t*₆₀ en *tp_B* y en *tp_C* (Gráfico 22).

DIVERSIDAD BACTERIANA (POR GÉNEROS)

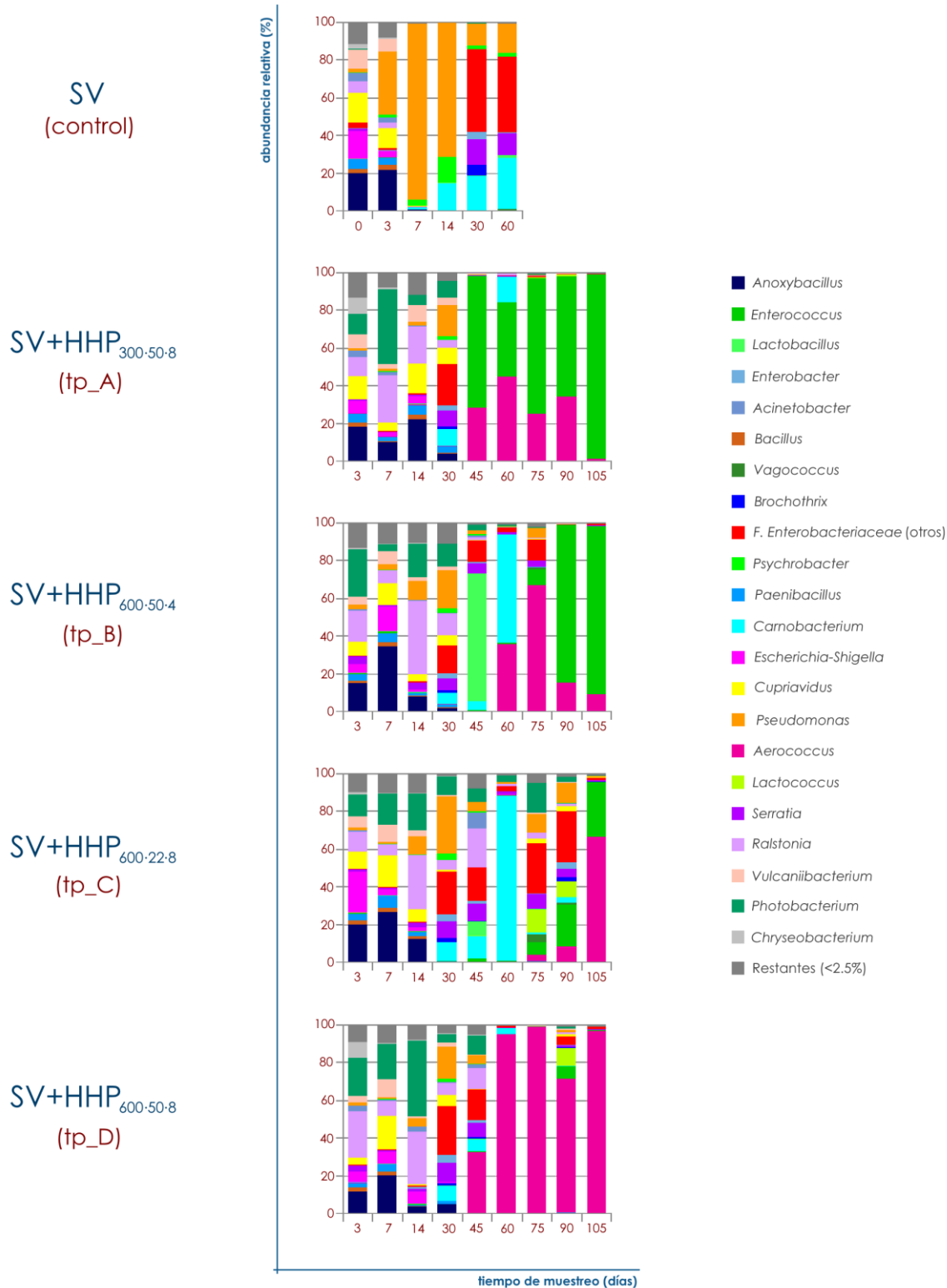


GRÁFICO 22. Abundancias microbianas relativas (por géneros) en muestras BAC_2 (ensayo bacalao 2)

Adaptado de: (Pérez Alcalá, Grande Burgos, Rodríguez López, Lucas, Gálvez, & Pérez Pulido, 2023)

El análisis de coordenadas principales (Gráfico 23) mostró una progresiva separación de las muestras control conforme al transcurso del tiempo de incubación. Las muestras a t_{30} y t_{60} se situaron muy próximas (en concordancia con la similitud de su composición microbiana).

Por su parte, las muestras presurizadas mapearon estrechamente durante el período de almacenamiento temprano (de t_3 a t_{14}); próximas a las muestras control a t_0 . A t_{30} las muestras presurizadas mostraron cierto agrupamiento. Durante el almacenamiento tardío se observaron asimismo mapeos próximos (especialmente, en las muestras tp_A y tp_D) (Pérez Alcalá, Grande Burgos, Rodríguez López, Lucas, Gálvez, & Pérez Pulido, 2023).

ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES

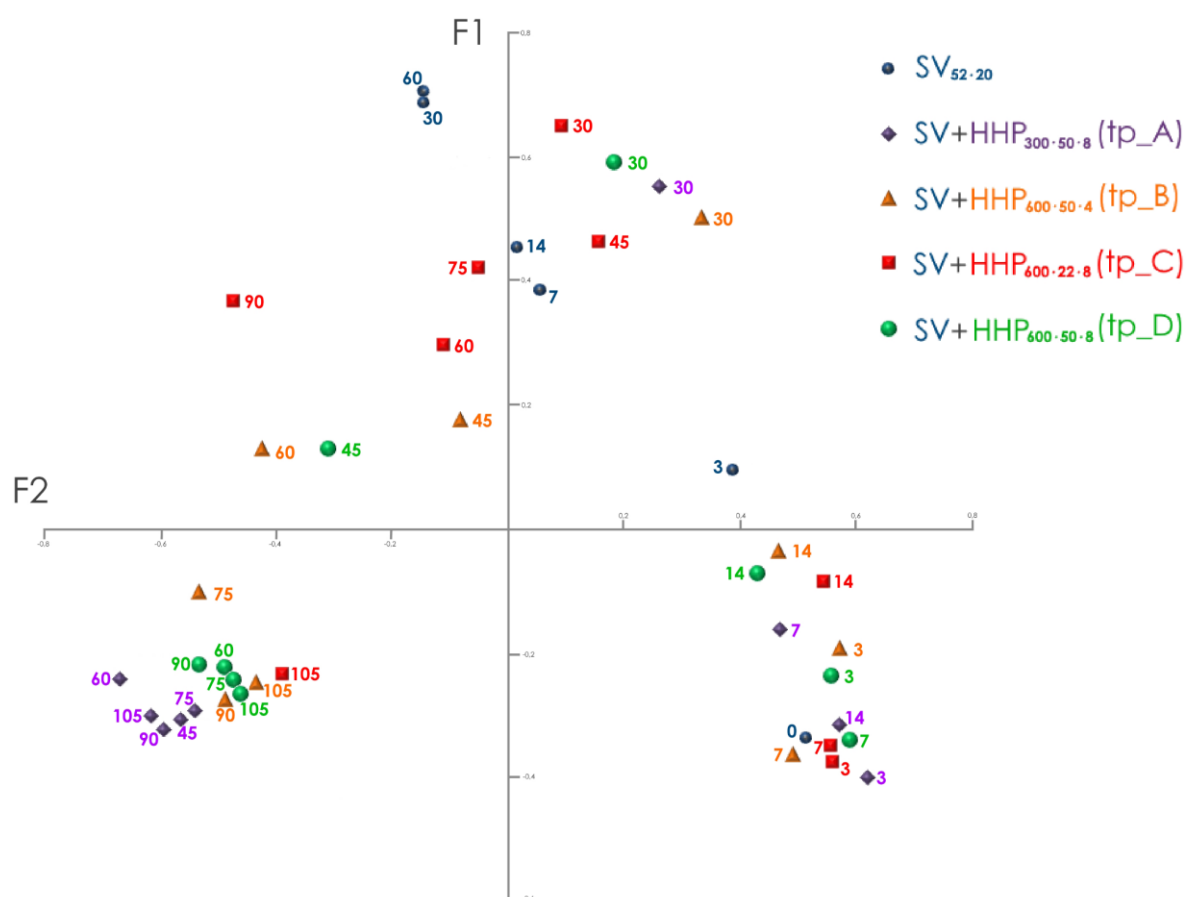


GRÁFICO 23. Análisis de coordenadas principales BAC_2 (ensayo bacalao 2)

Adaptado de: (Pérez Alcalá, Grande Burgos, Rodríguez López, Lucas, Gálvez, & Pérez Pulido, 2023)

4.3. RESULTADOS ADICIONALES

4.3.1. VARIACIÓN DEL pH DE LAS MUESTRAS

Durante su prolongado almacenamiento (270 días) no se registró una significativa variación de pH (Tabla 31) en las muestras de judías (ensayo JUD_1). Sus líneas de tendencia (aproximación lineal) presentaron una suave pendiente negativa (Gráfico 24); esto es, se produjo una acidificación muy ligera de las muestras en dicho período.

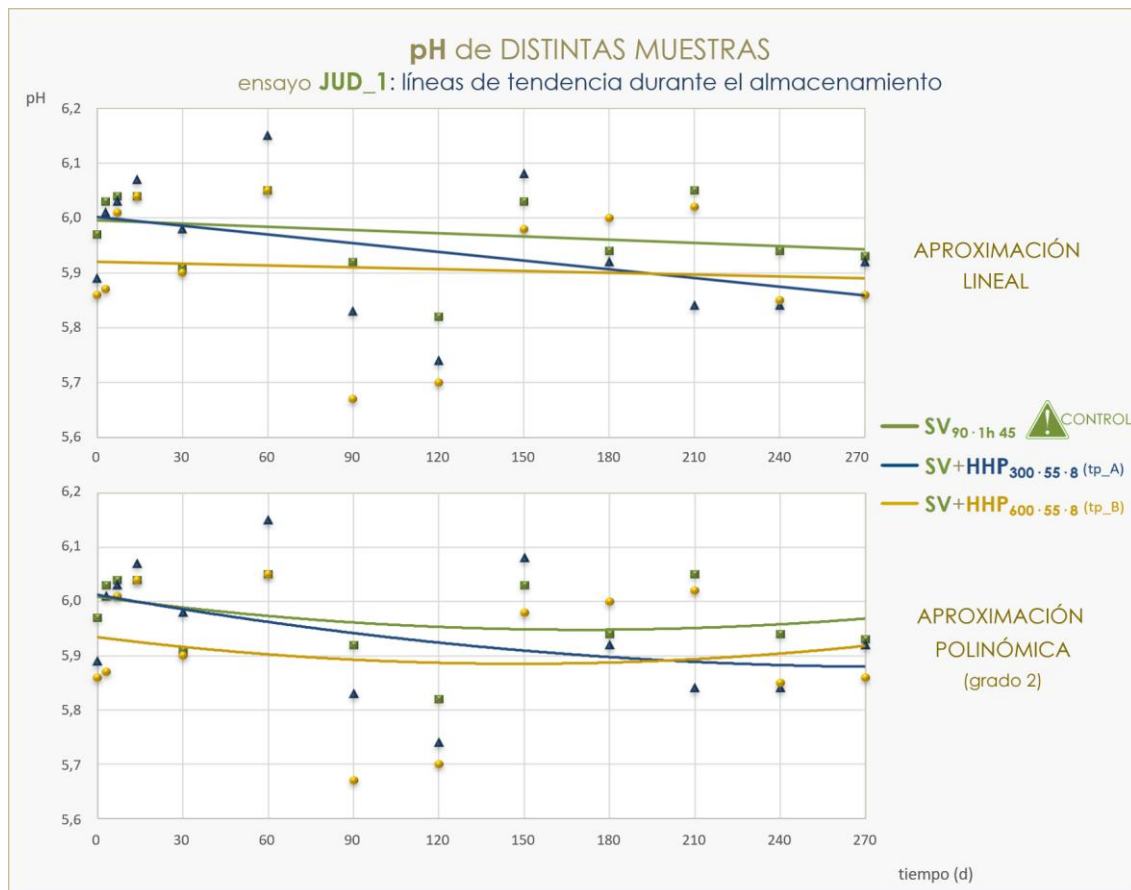


GRÁFICO 24. Tendencia pH en muestras JUD_1 (ensayo judías)
(Elaboración propia)

La pendiente de las rectas de regresión de mínimos cuadrados que reportan las lecturas de pH a lo largo del tiempo de muestreo (Tablas 31, 32 y 33) en cada uno de los ensayos (normalizada dicha pendiente respecto a los valores máximos de ordenadas y de

abscisas en el correspondiente ensayo), puede proporcionar un referente comparativo de la magnitud de la variación de pH habida en cada tipo de muestra (Tabla 30).

VARIACIÓN pH MUESTRAS distintos ENSAYOS					
PENDIENTES PORCENTUALES RECTAS DE REGRESIÓN NORMALIZADAS					
ensayo JUD_1	m (%)	ensayo COR_2	m (%)	ensayo BAC_2	m (%)
control: SV ₉₀ ·1h45'	-0,88%	control: SV ₆₅ ·24h	-2,56%	control: SV ₅₂ ·20'	1,95%
tp_A: SV+HHP ₃₀₀ ·55·8	-2,38%	tp_A: SV+HHP ₅₀₀ ·29·8	-4,17%	tp_A: SV+HHP ₃₀₀ ·50·8	1,05%
tp_B: SV+HHP ₆₀₀ ·55·8	-0,50%	tp_B: SV+HHP ₅₀₀ ·50·8	-2,89%	tp_B: SV+HHP ₆₀₀ ·50·4	0,11%
				tp_C: SV+HHP ₆₀₀ ·22·8	1,32%
				tp_D: SV+HHP ₆₀₀ ·50·8	2,24%

TABLA 30. Pendientes rectas de regresión pH distintos ensayos
(Elaboración propia)

Conforme a los valores de dicha pendiente (Tabla 30), en este ensayo (JUD_1) las muestras presurizadas tp_A (300 MPa, 55 °C, 8') habrían experimentado una acidificación algo más intensa (2.38%; frente a <1% resto de muestras). Asimismo, según el ajuste de las líneas de tendencia (Gráfico 24), las muestras control mantendrían valores de pH superiores a los de las muestras presurizadas durante su almacenamiento refrigerado.

En el ensayo COR_2 (cordero), con un tiempo de muestreo idéntico al caso anterior (270 días), también se advirtió una ligera tendencia decreciente en el pH de las muestras (Gráfico 25); si bien, algo más acentuada que en las judías. En concreto, las muestras del tratamiento presurizado tp_A (500 MPa, 29 °C, 8') experimentaron el mayor decremento de pH (4.17%); tanto las muestras control, como las muestras presurizadas tp_B (500 MPa, 50 °C, 8'), mostraron una acidificación similar (por debajo del 3%) (Tabla 30). Apreciándose mayor tasa de decrecimiento (línea de tendencia de aproximación polinómica: Gráfico 25) en la primera mitad del período de almacenamiento. También en este ensayo, las líneas de tendencia con los valores de pH más elevados corresponderían a las muestras control.

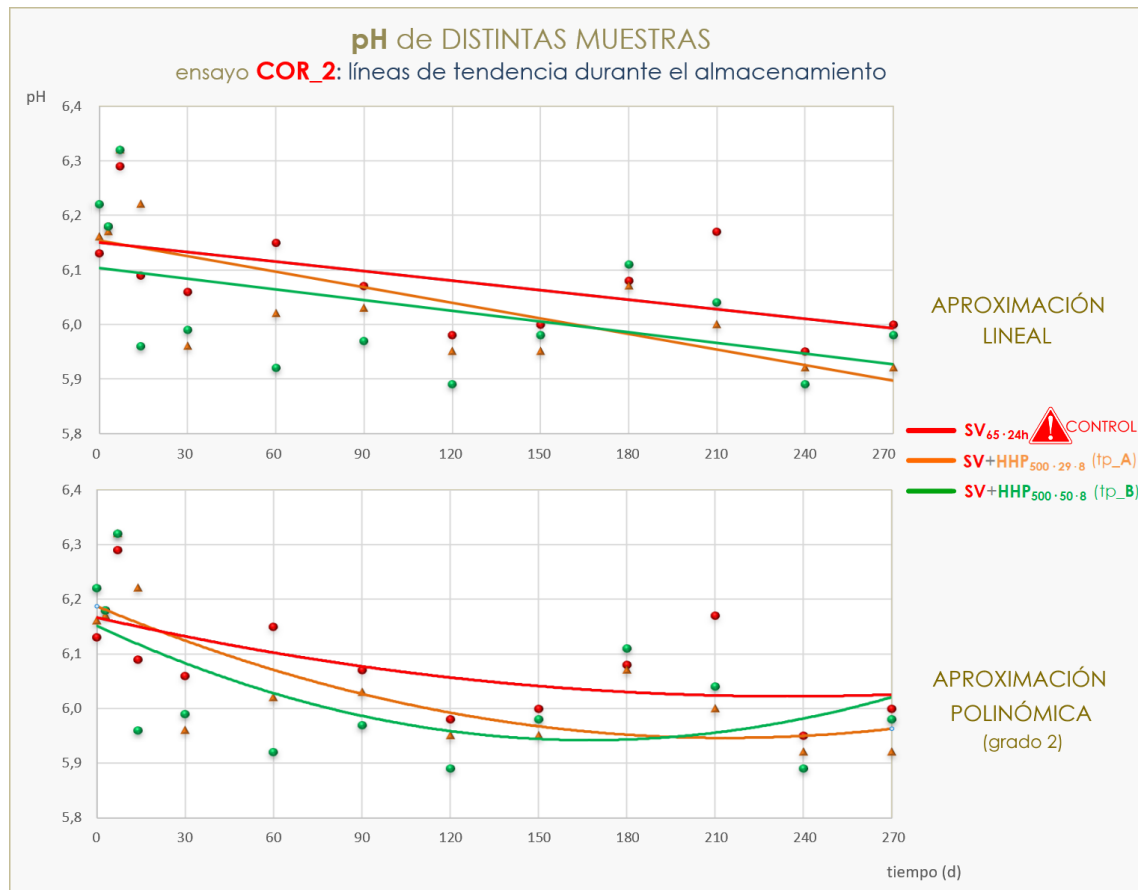


GRÁFICO 25. Tendencia pH en muestras COR_2 (ensayo cordero 2)
(Elaboración propia)

Con una mayor diversificación de muestras presurizadas (cuatro), e inferior tiempo de almacenamiento que los ensayos precedentes (105 días), en el ensayo BAC_2 (bacalao) se invirtió el signo de las pendientes de las líneas de tendencia: en general, las distintas muestras experimentaron una ligera alcalinización (Gráfico 26). Según la pendiente de las rectas de regresión (Tabla 30), este incremento de pH habría resultado algo mayor (2.24%) en las muestras que recibieron el tratamiento HHP más intenso: tp_D (600 MPa, 50 °C, 8'); mientras que la pendiente de las muestras control se aproximó al 2%. Las muestras tp_B (600 MPa, 50 °C, 4'), con tiempo de retención HPP inferior, presentaron la aproximación lineal con menor pendiente (0.11%). Según se infiere de las líneas de tendencia de 2º grado, tanto en las muestras control como en las presurizadas tp_D, la mayor tasa de variación en el pH se habría producido durante la primera mitad del período de almacenamiento. Como

en los casos que anteceden, las líneas de tendencia que presentan los valores de pH más elevados corresponden a las muestras control (Gráfico 26).

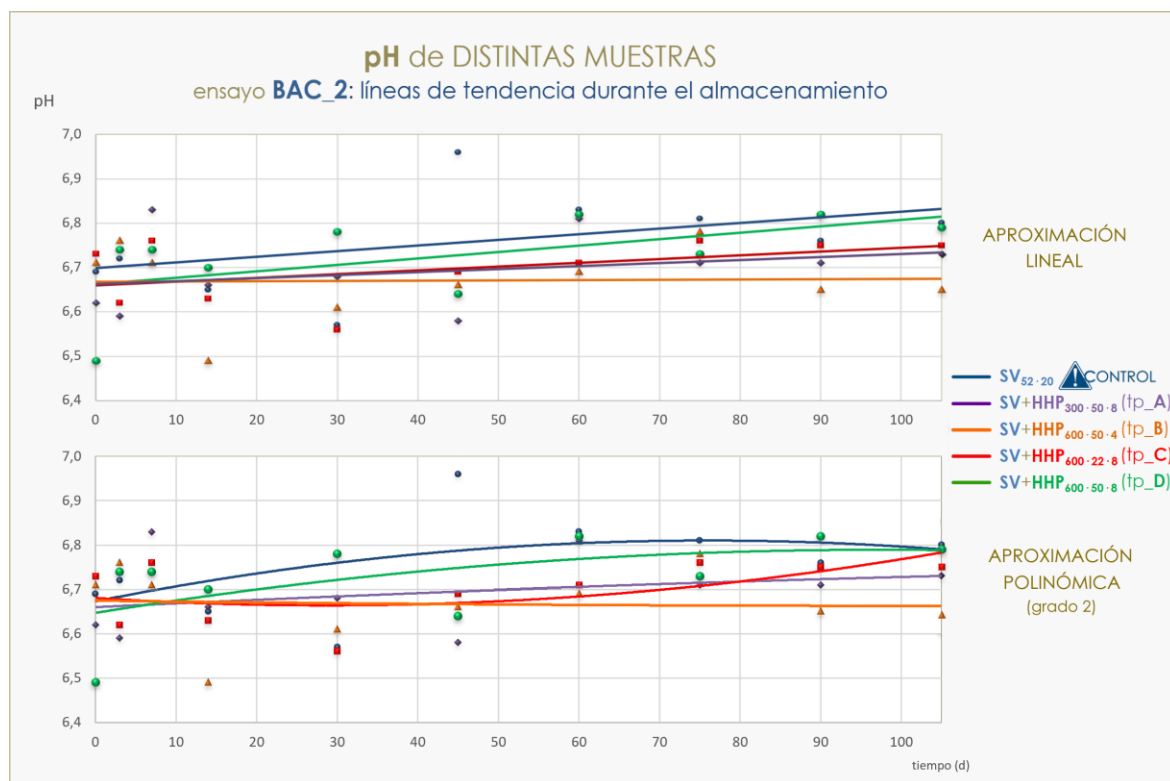


GRÁFICO 26. Tendencia pH en muestras BAC_2 (ensayo bacalao 2)
(Elaboración propia)

pH MUESTRAS		ensayo JUD_1					
tiempo (días)	SV _{90:1h 45}		SV+HHP _{300:55:8}		SV+HHP _{600:55:8}		
	pH	DS σ	pH	DS σ	pH	DS σ	
0	5,97	± 0,01	5,89	± 0,02	5,86	± 0,04	
3	6,03	± 0,04	6,01	± 0,06	5,87	± 0,06	
7	6,04	± 0,01	6,03	± 0,02	6,01	± 0,02	
14	6,04	± 0,04	6,07	± 0,07	6,04	± 0,04	
30	5,91	± 0,06	5,98	± 0,06	5,90	± 0,00	
60	6,05	± 0,04	6,15	± 0,01	6,05	± 0,13	
90	5,92	± 0,13	5,83	± 0,01	5,67	± 0,03	
120	5,82	± 0,04	5,74	± 0,01	5,70	± 0,05	
150	6,03	± 0,08	6,08	± 0,11	5,98	± 0,06	
180	5,94	± 0,15	5,92	± 0,13	6,00	± 0,01	
210	6,05	± 0,07	5,84	± 0,03	6,02	± 0,04	
240	5,94	± 0,05	5,84	± 0,07	5,85	± 0,01	
270	5,93	± 0,05	5,92	± 0,02	5,86	± 0,01	

La medición de pH en los diferentes ensayos a lo largo de su correspondiente período de almacenamiento refrigerado proporcionó las lecturas subsiguientes.

TABLA 31. Lecturas de pH en muestras JUD_1 (ensayo judías)
(Elaboración propia)

pH MUESTRAS		ensayo COR_2					
tiempo (días)		SV _{65·24h}		SV+HHP _{500·29·8}		SV+HHP _{500·50·8}	
		pH	DS σ	pH	DS σ	pH	DS σ
0		6,13	± 0,03	6,16	± 0,13	6,22	± 0,12
3		6,18	± 0,00	6,17	± 0,00	6,18	± 0,09
7		6,29	± 0,13	6,32	± 0,13	6,32	± 0,11
14		6,09	± 0,01	6,22	± 0,06	5,96	± 0,11
30		6,06	± 0,02	5,96	± 0,01	5,99	± 0,05
60		6,15	± 0,13	6,02	± 0,07	5,92	± 0,03
90		6,07	± 0,03	6,03	± 0,04	5,97	± 0,01
120		5,98	± 0,11	5,95	± 0,06	5,89	± 0,01
150		6,00	± 0,06	5,95	± 0,02	5,98	± 0,01
180		6,08	± 0,05	6,07	± 0,04	6,11	± 0,04
210		6,17	± 0,19	6,00	± 0,09	6,04	± 0,07
240		5,95	± 0,02	5,92	± 0,02	5,89	± 0,02
270		6,00	± 0,01	5,92	± 0,11	5,98	± 0,06

TABLA 32. Lecturas de pH en muestras COR_2 (ensayo cordero 2)
(Elaboración propia)

pH MUESTRAS		ensayo BAC_2									
tiempo (días)		SV _{52·20}		SV+HHP _{300·50·8}		SV+HHP _{600·50·4}		SV+HHP _{600·22·8}		SV+HHP _{600·50·8}	
		pH	DS σ	pH	DS σ	pH	DS σ	pH	DS σ	pH	DS σ
0		6,69	± 0,02	6,62	± 0,07	6,71	± 0,16	6,73	± 0,01	6,49	± 0,07
3		6,72	± 0,04	6,59	± 0,01	6,76	± 0,06	6,62	± 0,16	6,74	± 0,02
7		6,74	± 0,07	6,83	± 0,09	6,71	± 0,08	6,76	± 0,03	6,74	± 0,01
14		6,65	± 0,04	6,66	± 0,18	6,49	± 0,08	6,63	± 0,06	6,70	± 0,02
30		6,57	± 0,03	6,68	± 0,01	6,61	± 0,15	6,56	± 0,08	6,78	± 0,03
45		6,96	± 0,05	6,58	± 0,05	6,66	± 0,08	6,69	± 0,06	6,64	± 0,06
60		6,83	± 0,07	6,81	± 0,06	6,69	± 0,11	6,71	± 0,09	6,82	± 0,02
75		6,81	± 0,10	6,71	± 0,00	6,78	± 0,01	6,76	± 0,02	6,73	± 0,05
90		6,76	± 0,01	6,71	± 0,01	6,65	± 0,01	6,75	± 0,06	6,82	± 0,02
105		6,80	± 0,01	6,73	± 0,02	6,61	± 0,01	6,75	± 0,10	6,79	± 0,08

TABLA 33. Lecturas de pH en muestras BAC_2 (ensayo bacalao 2)
(Elaboración propia)

4.3.2. OTROS RESULTADOS

Como se vio anteriormente, en la representación correspondiente a la evolución de aerobios mesófilos totales de las muestras control en el ensayo preliminar de cordero (COR_1) (Gráfico 6), a t₄₅ se produjo un brusco incremento del recuento de células viables

(pasando a casi 4 unidades logarítmicas, tras una serie invariable de recuentos por debajo del límite de detección).

Mediante tinción de Gram se obtuvo una primera aproximación a la caracterización de tales microorganismos. Procedimiento que reveló su morfología bacilar y su carácter grampositivo (Ilustración 30).

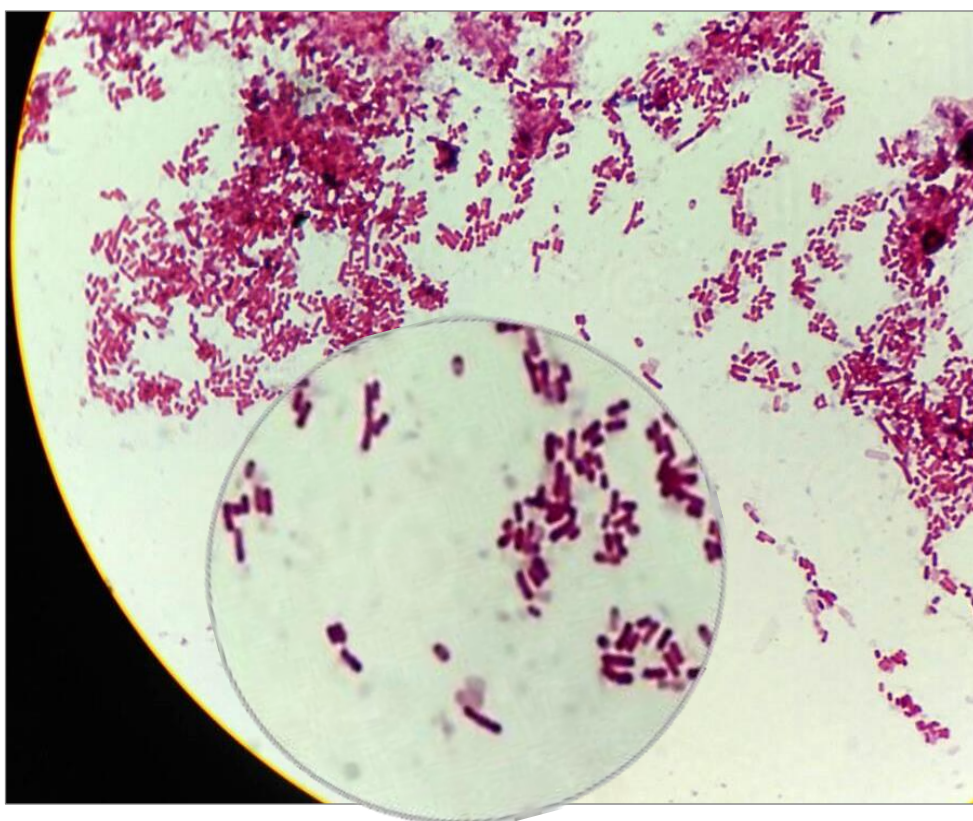


ILUSTRACIÓN 30. Bacilos Gram+ en TSA a t_{45} COR_1 (ensayo preliminar cordero)
(Elaboración propia)

Análogamente, en la representación de los recuentos de mesófilos aerobios totales del ensayo preliminar de bacalao (BAC_1), tanto en TSA como en TSA salino, se produjeron sendos repuntes de cierta similitud (Gráficos 10 y 11): tras una serie de recuentos previos por debajo de 2 log UFC/g en ambos medios; si bien, más tempranamente que en el caso del cordero (en t_{30}). En esta ocasión la tinción permitió determinar que los responsables del sustancial incremento en los recuentos de células viables (tanto en un medio como en

otro) era atribuible a cierto género indeterminado de microorganismos grampositivos con morfología cocoidea (Ilustración 31).

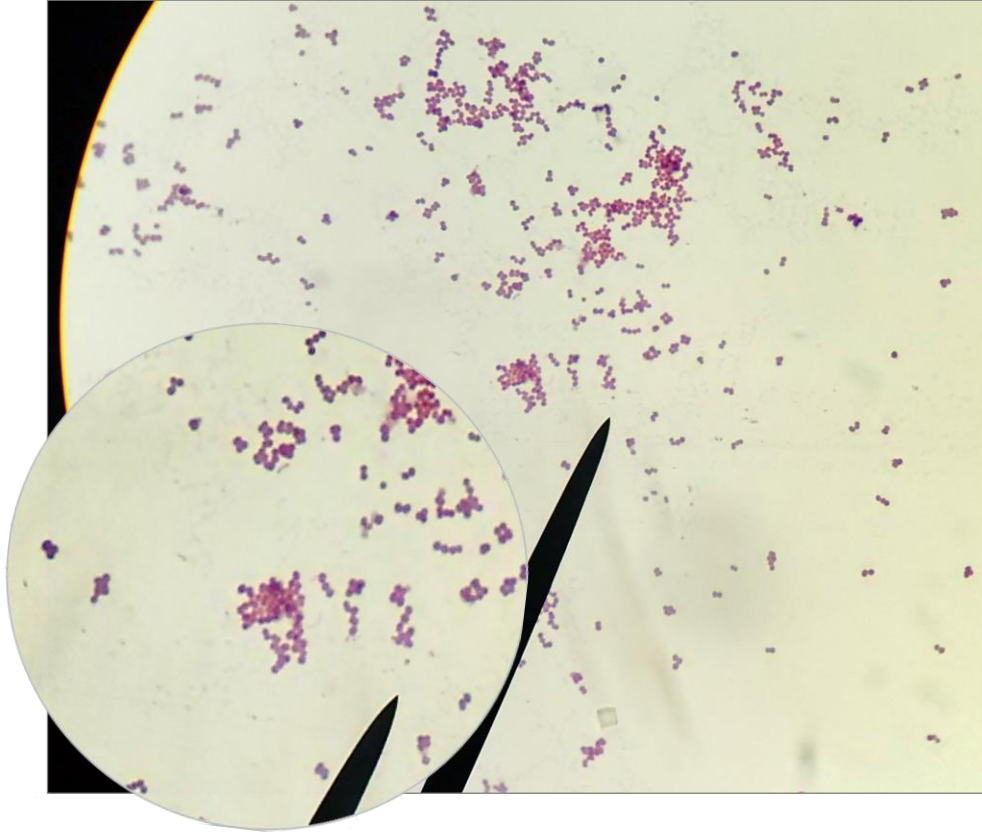


ILUSTRACIÓN 31. Cocos Gram+ en TSA a t_{30} BAC_1 (ensayo preliminar bacalao)
(Elaboración propia)

4.4. APRECIACIONES ORGANOLÉPTICAS

Si bien ya se ha mencionado la subjetividad intrínseca de este tipo de pruebas y, por tanto, la limitada validez de cualquier resultado o deducción extraíble de ellas, como una consecuencia implícita en la profanía o el desentrenamiento de quienes debían emitir las valoraciones (los *encuestados*); acaso también convendría resaltar alguna percepción de quienes se encargaron de realizar las pruebas (los *encuestadores*): impresiones que podrían de algún modo contribuir a aquilatar la certidumbre efectiva de este procedimiento (o, tal vez, a todo lo contrario). De cualquier forma, se incluyen un par de percepciones de los encuestadores (también muy subjetivas):

1. En la primera de las pruebas (test triangular) de identificación de muestras iguales (*Ilustración 27*), el encuestado/a debía optar entre:

- Una selección simple: marcar la casilla *no diferenciables*.
- Una selección doble: marcar las 2 casillas de las muestras, a su parecer, idénticas.

→ Entre los encuestados que creyeron diferenciar las muestras y, por tanto, debieron señalar dos iguales entre tres posibles, en ocasiones se pudo vislumbrar cierto grado de resolución quinielística en la selección de las opciones.

2. En el segundo formulario (comparación entre pares), se pedía al encuestado/a cuantificar la diferencia entre determinados atributos sensoriales de dos muestras conforme a una escala numérica (*Ilustración 28*). La mayor parte de estas pruebas se realizaron concatenadamente; esto es: un mismo encuestado cumplimentó ambos formularios sobre la misma terna inicial de muestras (desechando una de ellas en el

test de pares). Constatándose que el 100% de las divergencias señaladas en alguno de los atributos a comparar en la segunda prueba (es decir, cualquier valoración numérica distinta de 4) procedieron de encuestados que en el test triangular creyeron percibir diferencias entre las muestras.

→ Un hecho que, a la vista del porcentaje de aciertos alcanzado por este segmento de encuestados en la primera prueba, induce a sospechar que pudiera tratarse de un sesgo añadido en la certidumbre de la valoración.

4.4.1. TEST TRIANGULAR

En el ensayo **JUD_1** (judías) se realizaron a distintos tiempos catorce pruebas que combinaban muestras control y presurizadas, y siete en donde las tres muestras eran presurizadas (Tabla 34).

TEST TRIANGULAR de diferenciación de muestras							
ensayo JUD_1		NO SE APRECIA DISTINCIÓN ENTRE LAS MUESTRAS		SE IDENTIFICAN ERRÓNEAMENTE LAS MUESTRAS		SE RECONOCEN LAS MUESTRAS IDÉNTICAS	
CONTROL vs PRESURIZADOS (SV vs HHP)		9	64,29%	5	35,71%	0	0,00%
ENTRE TIPOS DE PRESURIZADOS (≠ HHP)		5	71,43%	2	28,57%	0	0,00%

TABLA 34. Resumen formularios test triangular en JUD_1 (ensayo judías)
(Elaboración propia)

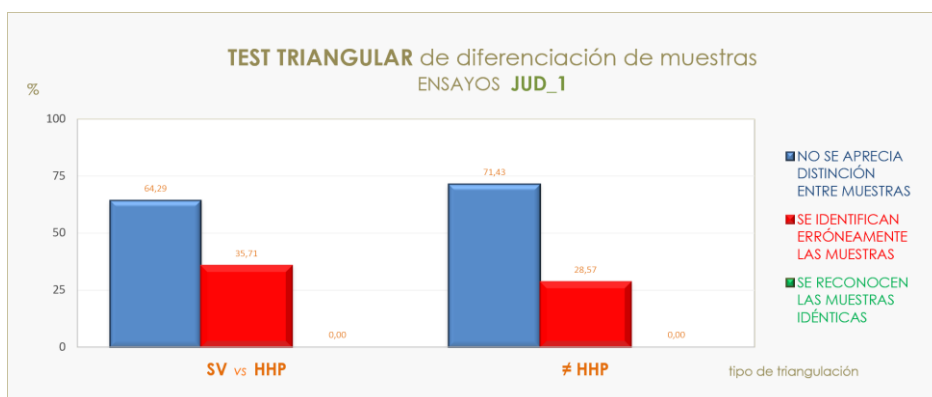


GRÁFICO 27. Comparativa test triangular (SV vs HHP y ≠HHP) en JUD_1 (ensayo judías)
(Elaboración propia)

En la primera combinación (SV vs HHP) casi $\frac{2}{3}$ partes de los encuestados reconocieron *no apreciar diferencia entre muestras*, el tercio restante las identificó erróneamente. En el caso con tres muestras presurizadas el resultado fue bastante similar (Gráfico 27). Ninguno de los encuestados supo indicar qué muestras que habían recibido un tratamiento idéntico (ni en SV vs HHP, ni en $\neq$ HHP).

Entre los ensayos **COR_1** y **COR_2** se llevaron a cabo un total de doce test donde se combinaban muestras control y presurizadas, y otros ocho en donde la totalidad de las muestras eran presurizadas (Tabla 35).

TEST TRIANGULAR de diferenciación de muestras							
ensayos COR_1&COR_2		NO SE APRECIA DISTINCIÓN ENTRE LAS MUESTRAS		SE IDENTIFICAN ERRÓNEAMENTE LAS MUESTRAS		SE RECONOCEN LAS MUESTRAS IDÉNTICAS	
CONTROL vs PRESURIZADOS (SV vs HHP)		7	54,55%	5	45,45%	0	0,00%
ENTRE TIPOS DE PRESURIZADOS (≠ HHP)		4	50,00%	3	37,50%	1	12,50%

TABLA 35. Resumen formularios test triangular en **COR_1&COR_2** (cordero ambos ensayos)
(Elaboración propia)

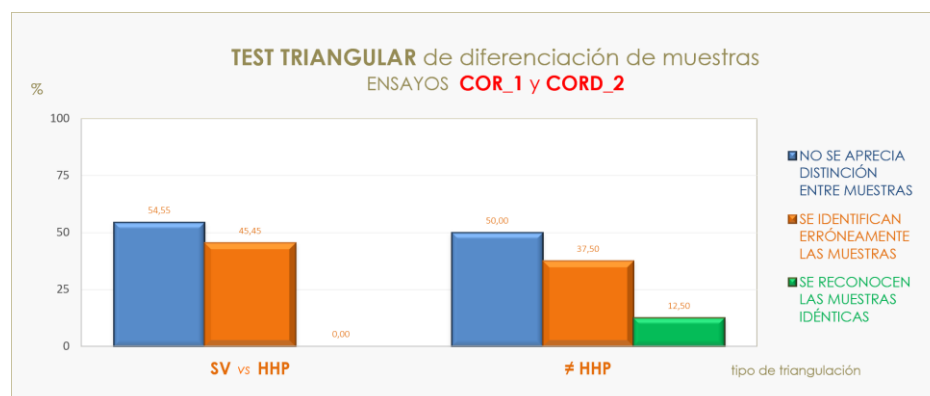


GRÁFICO 28. Comparativa test triangular (SV vs HHP y $\neq$ HHP) en **COR_1&COR_2** (cordero ambos ensayos)
(Elaboración propia)

En los test que combinaban muestras control y presurizadas, algo más de la mitad de los participantes no apreció diferencia entre las muestras; el resto de encuestados las identificó erróneamente. En los test de muestras HHP, el 50% no percibió diferencias, $\frac{3}{8}$ partes erró en la identificación, y sólo $\frac{1}{8}$ parte supo diferenciar las muestras (Gráfico 28).

En el conjunto de los ensayos **BAC_1** y **BAC_2**¹¹ se realizaron un total de trece test que combinaban muestras control y presurizadas, y quince pruebas integradas únicamente por muestras presurizadas con distintas parametrizaciones (Tabla 36).

TEST TRIANGULAR de diferenciación de muestras							
ensayos BAC_1&BAC_2		NO SE APRECIA DISTINCIÓN ENTRE LAS MUESTRAS		SE IDENTIFICAN ERRÓNEAMENTE LAS MUESTRAS		SE RECONOCEN LAS MUESTRAS IDÉNTICAS	
CONTROL vs PRESURIZADOS (SV vs HHP)		5	38,46%	7	53,85%	1	7,69%
ENTRE TIPOS DE PRESURIZADOS (≠ HHP)		7	46,67%	8	53,33%	0	0,00%

TABLA 36. Resumen formularios test triangular en BAC_1&BAC_2 (bacalao ambos ensayos)
(Elaboración propia)

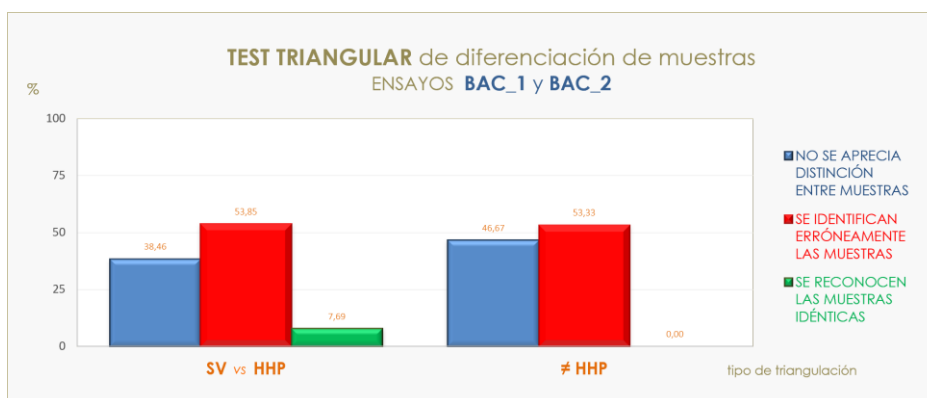


GRÁFICO 29. Comparativa test triangular (SV vs HHP y ≠ HHP) en BAC_1&BAC_2 (bacalao ambos ensayos)
(Elaboración propia)

En ambas modalidades (SV vs HHP y ≠ HHP) más de la mitad de los participantes no identificaron las muestras correctamente. En el primer formato (SV vs HHP), casi un 40% reconocieron *no apreciar distinción entre muestras*; la fracción restante (en torno a un 8%) supo diferenciar las muestras. En el segundo caso (≠ HHP) ningún encuestado consiguió indicar qué muestras eran idénticas (Gráfico 29).

¹¹ Desafortunadamente, en el ensayo **BAC_2** los recuentos viables de enterobacterias en las muestras control a t_0 impidieron su inclusión en las pruebas de valoración sensorial. Todos los test CONTROL vs PRESURIZADOS (tanto triangulares, como de comparación entre pares) realizados con bacalao corresponden al ensayo **BAC_1**; todos, salvo un caso:

En dicha excepción, realizada en t_1 , se completaron ambos test. Se llevó a cabo por petición expresa del encuestado, siendo éste plenamente conocedor de las circunstancias excepcionales que concurrían en la prueba, y consciente de que alguna de las muestras que se iban a valorar podía no reunir completas garantías de inocuidad microbiológica.

Los resultados de tales pruebas fueron:

- Test 1: Identificó erróneamente las muestras.
- Test 2 : Valoración 4 en todos los atributos sensoriales.

4.4.2. TEST DE COMPARACIÓN ENTRE PARES

En esta prueba el encuestado debía comparar el grado de similitud de determinados atributos de las muestras, conforme a una escala numérica de 0 a 4 (Tabla 17).

En el ensayo JUD_1 se realizaron trece test que enfrentaban muestras control con muestras presurizadas (SV vs HHP), y nueve que comparaban la divergencia (o semejanza) de los atributos de muestras con distintos tratamientos hiperbáricos ($\neq$ HHP) (Tabla 37).

TEST de COMPARACIÓN ENTRE PARES de muestras ensayo JUD_1		SON COMPLETAMENTE DIFERENTES	SE APRECIA UNA TRANSFORMACIÓN MUY CONSIDERABLE	SE DISTINGUEN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS	SE PERCIBE UNA LIGERA VARIACIÓN	RESULTAN INDISTINGUIBLES	PROMEDIOS
		0	1	2	3	4	$\leftrightarrow$
CONTROL vs PRESURIZADOS (SV vs HHP)	COLOR				1	12	3,92
	SABOR					13	4,00
	OLOR				1	12	3,92
	TEXTURA			1	1	11	3,77
ENTRE TIPOS DE PRESURIZADOS ($\neq$ HHP)	COLOR				1	8	3,89
	SABOR				1	8	3,89
	OLOR					9	4,00
	TEXTURA					9	4,00

TABLA 37. Resumen formularios test comparación entre pares en JUD_1 (ensayo judías)
(Elaboración propia)

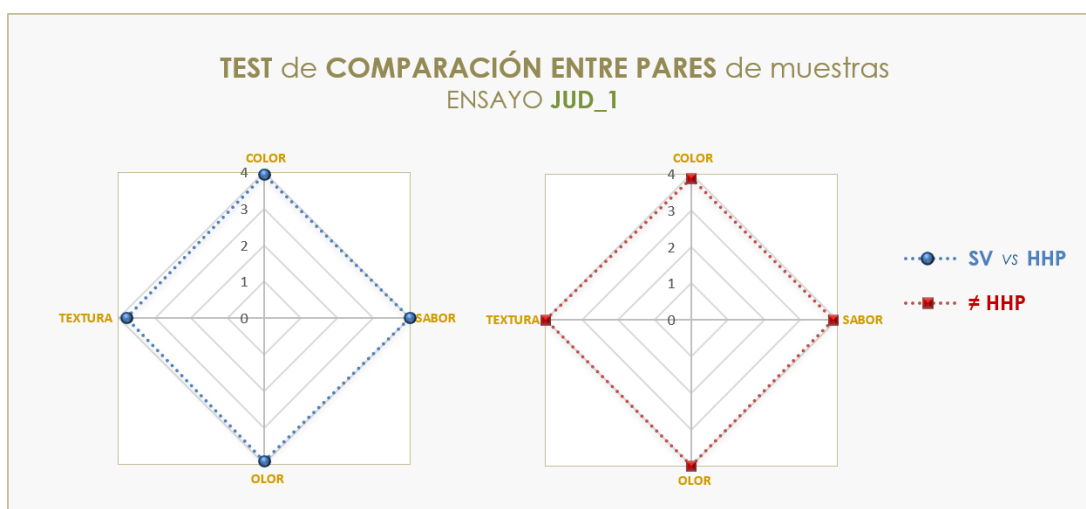


GRÁFICO 30. Comparativa test entre pares (SV vs HHP y $\neq$ HHP) en JUD_1 (ensayo judías)
(Elaboración propia)

En las pruebas SV vs HHP realizadas el promedio total de similitud entre muestras se cifró en 3.90 (tabla y gráfico de la página precedente); siendo la textura el atributo más afectado (3.77), y el sabor el atributo de mayor grado de coincidencia (4.00). En las pruebas comparativas $\neq$ HHP, el promedio total resultó muy semejante (3.94); percibiéndose en este caso el olor y la textura como los atributos de máxima similitud (4.00), y el resto levemente afectados (3.89) (Gráfico 30).

En los ensayos **COR_1&COR_2** se cumplieron un total de trece pruebas en donde se combinaban ambos tipos de muestras (SV vs HHP), y ocho en que se empleaban únicamente muestras presurizadas ($\neq$ HHP) (Tabla 38).

TEST de COMPARACIÓN ENTRE PARES de muestras		ensayos					
		COR_1&COR_2					
		$\langle \text{TOTAL} \rangle_{SV \text{ vs HHP}} = 3,94$ $\langle \text{TOTAL} \rangle_{\neq \text{ HHP}} = 3,91$					
		SON COMPLETAMENTE DIFERENTES	SE APRECIA UNA TRANSFORMACIÓN MUY CONSIDERABLE	SE DISTINGUEN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS	SE PERCIBE UNA LIGERA VARIACIÓN	RESULTAN INDISTINGUIBLES	PROMEDIOS
		0	1	2	3	4	Δ
CONTROL vs PRESURIZADOS (SV vs HHP)	COLOR					13	4,00
	SABOR				1	12	3,92
	OLOR					13	4,00
	TEXTURA			1		12	3,85
ENTRE TIPOS DE PRESURIZADOS ($\neq$ HHP)	COLOR					8	4,00
	SABOR				1	7	3,88
	OLOR					8	4,00
	TEXTURA				2	6	3,75

TABLA 38. Resumen formularios test comparación entre pares en COR_1&COR_2 (cordero ambos ensayos)
(Elaboración propia)

En este caso los promedios totales resultaron muy próximos a los del ensayo anterior: En la comparativa SV vs HHP fue 3.94; siendo color y olor los atributos de mayor semejanza (4.00), mientras que la textura se percibió como el más divergente (3.85). En los test de presurizados ($\neq$ HHP) el grado de similitud promedió en 3.91; repitiendo color y olor como atributos menos alterados (4.00), y textura como el más transformado (3.75) (Gráfico 31).

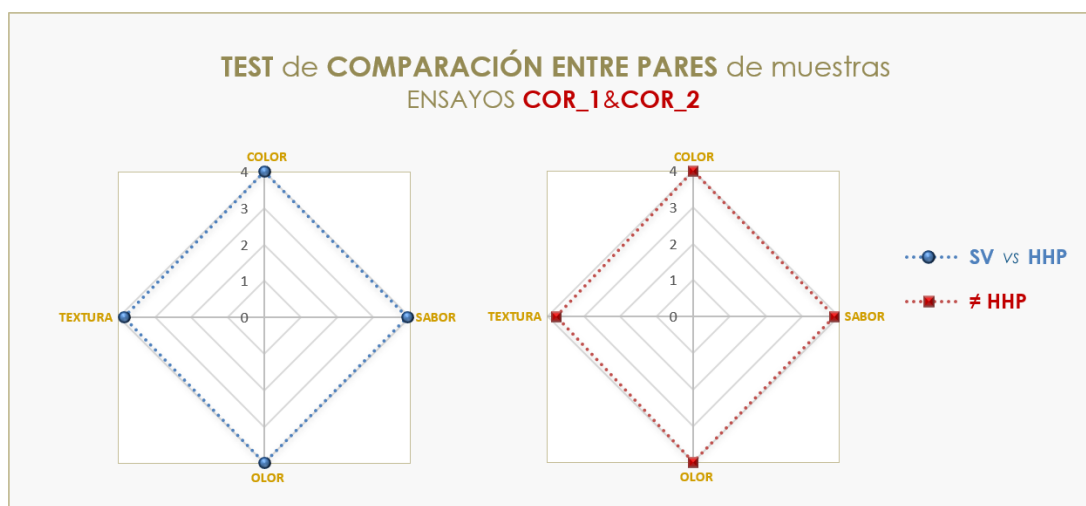


GRÁFICO 31. Comparativa test entre pares (SV vs HHP y ≠HHP) en COR_1&COR_2 (cordero ambos ensayos)
(Elaboración propia)

En los ensayos **BAC_1&BAC_2** se efectuaron diez pruebas que incluían ambos tipos de muestras (SV vs HHP), y quince pruebas que únicamente comparaban muestras con distintos tipos de presurizaciones (≠ HHP) (Tabla 39).

TEST de COMPARACIÓN ENTRE PARES de muestras
ensayos
BAC_1&BAC_2

<TOTAL> SV vs HHP = **3,88**

<TOTAL> ≠ HHP = **3,89**

		SON COMPLETAMENTE DIFERENTES	SE APRECIA UNA TRANSFORMACIÓN MUY CONSIDERABLE	SE DISTINGUEN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS	SE PERCIBE UNA LIGERA VARIACIÓN	RESULTAN INDISTINGUIBLES	PROMEDIOS
		0	1	2	3	4	◇
CONTROL vs PRESURIZADOS (SV vs HHP)	COLOR				1	9	3,90
	SABOR			1	1	8	3,70
	OLOR					10	4,00
	TEXTURA				2	8	3,80
	EMULSIÓN					10	4,00
ENTRE TIPOS DE PRESURIZADOS (≠ HHP)	COLOR				2	13	3,87
	SABOR				1	14	3,93
	OLOR					15	4,00
	TEXTURA			1	1	13	3,80
	EMULSIÓN				2	13	3,87

TABLA 39. Resumen formularios test comparación entre pares en BAC_1&BAC_2 (bacalao ambos ensayos)
(Elaboración propia)

Estos test incorporaban un quinto atributo a valorar: la consistencia de la emulsión.

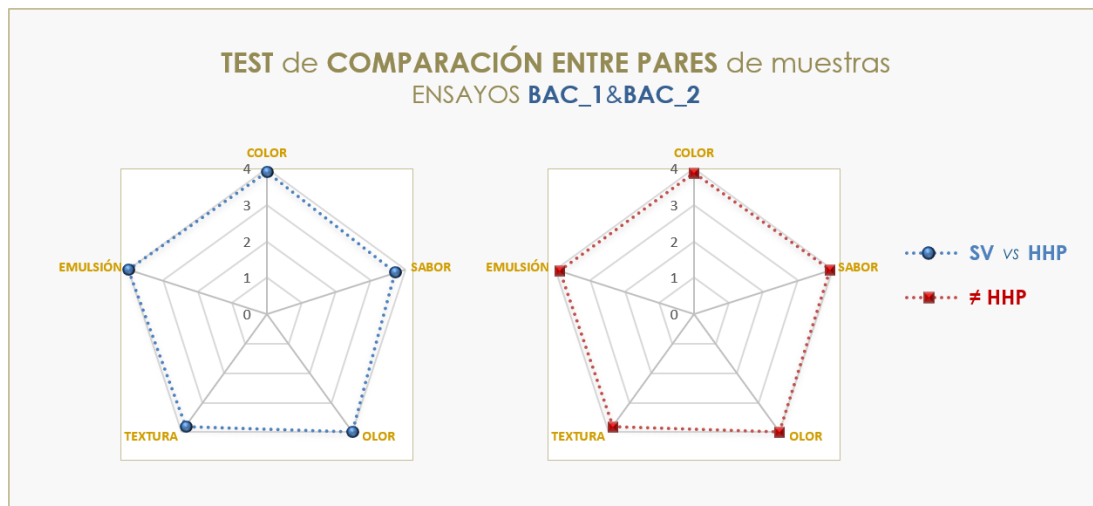


GRÁFICO 32. Comparativa test entre pares (SV vs HHP y $\neq$ HHP) en BAC_1&BAC_2 (bacalao ambos ensayos)
(Elaboración propia)

Los promedios totales de comparación obtenidos fueron muy parecidos a los de las elaboraciones anteriores. En las pruebas SV vs HHP el grado de similitud percibido fue de 3.88; resultando olor y consistencia de la emulsión los atributos de menor varianza (4.00), y el sabor la característica que se vio más afectada (3.70). En las comparativas entre muestras presurizadas ($\neq$ HHP) el promedio total fue casi idéntico (3.89) al caso anterior; siendo la textura el atributo en el cual se apreció una diferencia más significativa (3.80), y el olor el que mantuvo mayor semejanza (4.00) (Gráfico 32).



5. DISCUSIÓN

El tomate... ¿es un producto natural o una realidad imaginaria?

Ferrán Adriá (2015)

Conforme a los resultados de este trabajo y considerando sus objetivos promotores, acaso convenga efectuar primeramente una breve recapitulación que permita situarlos en el extenso preámbulo introductorio y sirva, a la misma vez, para contextualizar la discusión que aquí se aborda.

En la caracterización que se realizó inicialmente de la técnica SV (tanto, a modo de exordio, en el epígrafe 1.1. *Tecnología de barreras o de métodos combinados*, como en el epígrafe 1.2.8. *Pasteurización por cocción sous vide*, con un carácter mucho más específico), ésta fue presentada como una de las mejores alternativas para la obtención de alimentos que conjugaran gran calidad y durabilidad, con cierta simplicidad metodológica y un coste reducido (Kato, y otros, 2016). Albergando este cúmulo de virtudes genéricas una amplia serie de ventajosas particularidades: como un considerable grado de reproducibilidad y, por tanto, de estandarización (Schafheitle, 1990) (si bien, tanto en éste como en el siguiente punto, habría que exceptuar las cocciones inmediatas, las cuales requieren consideración independiente); una notable reducción del riesgo de sobrecocción del alimento, al existir

equilibrio térmico entre su punto geométrico de calentamiento más tardío (corazón de producto) y el medio exterior (agua o vapor) durante buena parte del tiempo de cocción ($T_{cp}=T_{me}$) (Domínguez-Hernández, Salaseviciene, & Ertbjerg, 2018); minoración de mermas, tanto por evaporación, como por mejora de la retentiva tisular de su agua constitutiva (al producirse una menor desnaturalización proteica) (Ayub & Ahmad, 2019); en consecuencia, preservación de sus componentes hidrosolubles y, en particular, aquellos biológicamente activos y con valor nutricional (Llave, y otros, 2017); asimismo, la baja intensidad térmica del proceso y su ausencia de oxígeno van a minimizar la modificación estructural de ácidos grasos; que, junto a la menor desnaturalización proteica referida anteriormente, posibilita que las propiedades organolépticas del alimento se vean transformadas en menor medida (Falowo, Muchenje, & Hugo, 2017).

No obstante, entre las muchas cualidades que distinguen y acreditan a esta técnica, habría que destacar la que probablemente resulte su peculiaridad más aventurada: ésta no es otra que la propia significación gastronómica de la metodología SV, cómo se conceptúa su práctica en el seno de la restauración comercial de vanguardia. En tales ámbitos SV es, ante todo, sinónimo de calidad sensorial, de un afán por preservar la genuina identidad del producto, por minimizar la degradación organoléptica inherente al cocinado, en un ajuste llevado hasta el límite... Un límite que no resulta fácil de precisar (Stringer & Metris, 2018); que en el caso del ensayo BAC_2, según se ha visto (Gráfico 14), vino determinado *in extremis* por los recuentos viables de enterobacterias en t_0 .

Ahora bien, salvo en aquellos tratamientos SV que se realizan por debajo del umbral térmico de seguridad (modalidad de cocción SV directa o inmediata), que representarán la base de disertación de este capítulo, por encima de determinada intensidad (temperatura-tiempo) esta técnica garantiza un grado de pasteurización del alimento que permite su

conservación refrigerada. Incuestionable evidencia de ello son los resultados obtenidos en los ensayos realizados en este trabajo con judías verdes ([JUD_1](#): SV_{90°C-105'}) o con cordero ([COR_2](#): SV_{65°C-24h}); en los cuales, los recuentos de células viables permanecieron bajo el umbral de detección durante la totalidad del período de muestreo (9 meses) en todos los medios de cultivo (TSA, MC, BGA, BP y PALCAM).

Como se ha referido anteriormente, la temperatura aplicada en el procesado SV, si bien persigue una minimización, ha de ser compatible con la naturaleza tisular de la matriz alimentaria: la intensidad térmica aplicada a los vegetales (generalmente, $T_{sv} > 85\text{ °C}$) es muy superior a la que suelen recibir las carnes ($58\text{ °C} < T_{sv} < 75\text{ °C}$), o los pescados y mariscos (en ocasiones $T_{sv} < 50\text{ °C}$); todas ellas por debajo de las temperaturas que han de aplicarse a las legumbres ($T_{sv} \geq 100\text{ °C}$: del orden las empleadas en cocción tradicional) ([Myhrvold, Young, & Bilet, 2015](#)); ([Tansey & Gormley, 2004](#)).

En el caso de la cocción SV de los vegetales, no se aplican temperaturas inferiores a 80 °C ; las cuales garantizan la completa gelificación de los almidones, así como de pectinas y otras fibras solubles ([Iborra-Bernad, García-Segovia, & Martínez-Monzó, 2015](#)). Distintos trabajos han estudiado la cocción de vegetales mediante esta técnica, en el citado rango de temperaturas: calabaza a 90 °C durante 30 minutos ([Gomes da Silva, Machado Sousa, Figueiredo, Gouveia, & Severino Lima, 2019](#)); patata con aceite de romero a 105 °C durante 30 minutos ([Amoroso, Rizzo, & Muratore, 2019](#)); col de Bruselas a 90 °C durante 45 minutos, coliflor y romanesco a 90 °C durante 45 minutos ([Florkiewicz, Socha, Filipiak-Florkiewicz, & Topolska, 2018](#)); diversas hortalizas (zanahoria, apio, puerro, chalota, pimiento, apionabo, raíz de perejil...) a 84 °C durante 30-60 minutos ([Kosewski, y otros, 2018](#)); espárrago a 80 °C durante 15 minutos ([Gonnella, Durante, Caretto, D'Imperio, & Renna, 2018](#)); remolacha a 85 °C durante 3 horas, judías verdes a 85 °C durante 90 minutos, o brécol a 85 °C durante

45 minutos (Czarnowska-Kujawska, Draszanowska, Chróst, & Starowicz, 2023). Estudios en los que se evalúa, principalmente, la calidad sensorial y nutricional de vegetales de V Gama SV; y, en particular, aspectos como la preservación de sus compuestos bioactivos de índole termolábil (vitaminas, betacarotenos, licopenos, antocianinas, glucosinolatos y algunas otras sustancias antioxidantes), o la retención de minerales (Kilibarda, y otros, 2018). En concreto, el estudio de cocciones SV a una misma temperatura y diferentes intervalos de tiempo evidenció que la retención de minerales no decrecía al aumentar el tiempo de cocción; idéntico comportamiento mostraron los compuestos volátiles. En cuanto a la valoración sensorial de las muestras, las que recibieron tratamientos de mayor intensidad se percibieron con sabor y aromas más concentrados; siendo las mejor valoradas en calidad general (Gráfico 33) (Czarnowska-Kujawska, Draszanowska, Chróst, & Starowicz, 2023).

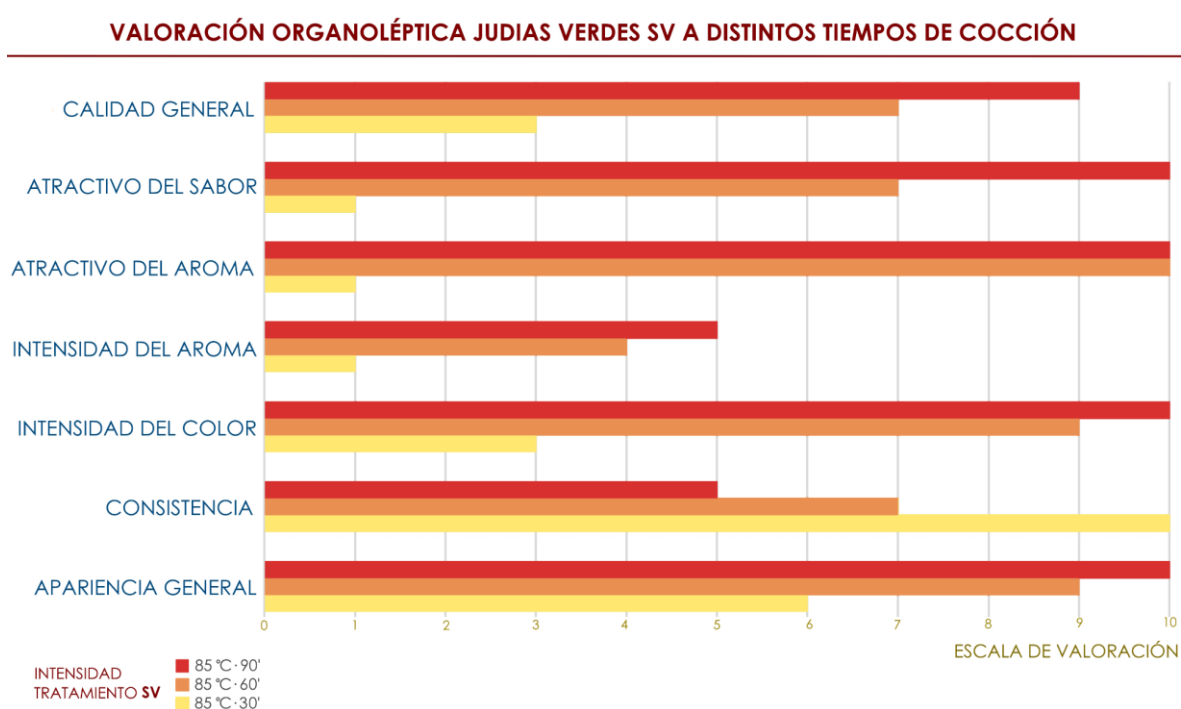


GRÁFICO 33. Valoración sensorial judías verdes con tratamiento SV a distintas intensidades

Adaptado de: (Czarnowska-Kujawska, Draszanowska, Chróst, & Starowicz, 2023)

Ensayos similares se llevaron a cabo con brécol y remolacha, obteniéndose resultados análogos en todos los parámetros evaluados, excepto en uno: la intensidad del color. Un

hecho que podría justificarse por un incremento de la concentración de pigmentos como la feofitina en los tratamientos térmicos de una mayor duración (Czarnowska-Kujawska, Draszanowska, Chróst, & Starowicz, 2023).

En lo que respecta a la calidad microbiológica de este grupo de elaboraciones, dado que la mayor parte de los vegetales permiten una prehigienización mediante inmersión en dilución clorada, junto a la considerable intensidad de los tratamientos térmicos que se aplican, y considerando que la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos de mayor patogenicidad (Gráfico 34) se sitúa entre 30 y 50 °C (Zavadlav, y otros, 2020), se podría convenir que tales elaboraciones presentan, en general, un considerable grado de seguridad.

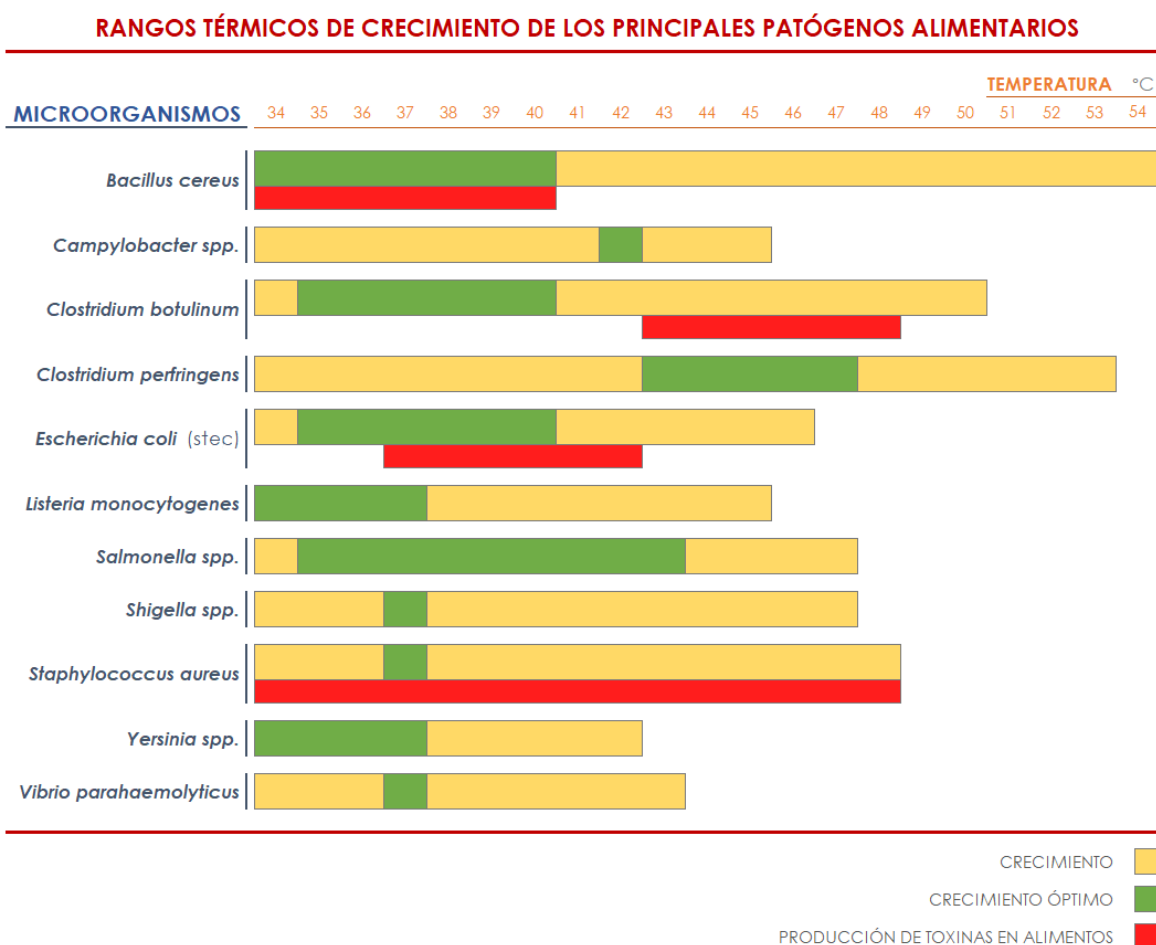


GRÁFICO 34. Rangos térmicos de crecimiento de patógenos alimentarios
Adaptado de: (Zavadlav, y otros, 2020)

La reducción de compuestos volátiles y humedad durante la cocción, la inhibición de reacciones oxidativas, la imposibilidad de contaminación cruzada durante el almacenaje, la reducción del crecimiento bacteriano aeróbico y otra serie de ventajas que, en su conjunto, se traducen en una mejora sensorial y nutricional del producto (Onyeaka, y otros, 2022) resultan, sin embargo, insuficientes en la medida que el decremento térmico de la cocción SV no ofrece unas garantías microbiológicas certeras. Entre los factores que inciden sobre la calidad microbiológica de las elaboraciones SV se hallan, principalmente, la intensidad del tratamiento térmico aplicado y la carga microbiana inicial de las materias primas, así como la temperatura y la velocidad del enfriamiento tras la cocción, y el control térmico de su almacenamiento refrigerado (Armstrong, 2000). Si los primeros determinarán el poder higienizante del tratamiento, estos últimos evitarán el crecimiento de células bacterianas supervivientes (o en estado subletal), y una posible germinación de esporas durante el transcurso del almacenamiento.

La trascendencia de la intensidad del tratamiento SV sobre la calidad microbiológica de la elaboración queda patente en los resultados obtenidos en los ensayos de cordero: COR_1 y COR_2 (Tabla 40).

ENSAYOS CORDERO CALIDAD MICROBIOLÓGICA t_{60} (MESÓFILOS AEROBIOS)

ENSAYO	TRATAMIENTOS APLICADOS	log UFC	MÁXIMO ACEPTABLE	
ensayo COR_1 :	SV _{67.5 °C, 8h}	4,54	5,00	log UFC
	SV _{67.5 °C, 8h} + HHP _{500 MPa, 24 °C, 8'}	< 1,30		
ensayo COR_2 :	SV _{65 °C, 24h}	< 1,30	5,00	log UFC
	SV _{65 °C, 24h} + HHP _{500 MPa, 29 °C, 8'}	< 1,30		

TABLA 40. Calidad microbiológica (log UFC) a t_{60} ensayos cordero
(Elaboración propia)

Como se ha indicado, en el caso de la cocción SV de las carnes el rango térmico que se suele emplear se halla netamente por debajo del aplicado a los vegetales. En particular, las carnes rojas (vacuno, ovino, caza mayor o equino), con una distribución de nutrientes en torno a 5% grasa y 20% proteína (variable en un estrecho intervalo, en función de edad, sexo, alimentación o raza del animal), se caracterizan por presentar los valores más altos en proteínas del estroma (tejido conectivo: colágeno y elastina). La calidad gastronómica de las elaboraciones cárnicas se encuentra estrechamente relacionada con los procesos de desnaturalización proteica, y con los cambios que ésta induce en la estructura fibrilar de la musculatura (Stankov, Fidan, Rusev, & Baeva, 2020). Durante el tratamiento térmico se suceden diferentes procesos: por una parte, se produce la agregación y gelificación de las proteínas sarcoplasmáticas (desde los 40 °C, hasta completarse su transformación en torno a 60 °C); a dicha temperatura se inicia, en primera instancia, una contracción del tejido conectivo (proceso que se intensifica al superar los 65 °C) (Baldwin, 2012) y, una vez que la estructura del colágeno se halla su totalmente desnaturalizada, éste se vuelve hidrosoluble, dando comienzo su gelificación (Christensen, y otros, 2013); por otra parte, entre 40 °C y 60 °C los filamentos musculares (compuestos, hasta en un 70%, por actina y miosina, que pueden retener hasta el 75% del agua de la musculatura) experimentan una contracción transversal, incrementando el espacio intermiofibrilar; por encima de los 65 °C se produce la contracción longitudinal de las miofibrillas, lo que reduce sustancialmente la capacidad de retención de agua del músculo (Karki, Bremer, Silcock, & Oey, 2022). Procesos éstos que van a determinar tanto la calidad sensorial como nutricional de la elaboración resultante; y que dependerán, principalmente, de la intensidad del tratamiento SV (temperatura-tiempo) y de la velocidad de transferencia del calor (Domínguez-Hernández, Salaseviciene, & Ertbjerg, 2018).



En cortes de vacuno con alto contenido en tejido conectivo, como el costillar, se ha constatado que la intensidad de la cocción SV (c_1 : 80 °C, 45'; c_2 : 60 °C, 4h 30'; c_3 : 60 °C, 10h) determina el grado de las transformaciones fisicoquímicas que experimenta la carne; en concreto: su dureza decreció con el tiempo de cocción ($c_1 > c_2 > c_3$); la merma por cocinado fue mayor para la temperatura más elevada ($c_1 > c_3 > c_2$); las tonalidades rojo-rosáceas predominaron en los tratamientos de menor intensidad, pardeándose a medida que se incrementaba la temperatura y el tiempo (principalmente, por la desnaturalización de la oximioglobina a metamioglobina); por su parte, la degradación lipídica (según presencia de TBARS: acrónimo anglosajón de *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) aumentó en la medida en que se intensificó el tratamiento ($c_3 > c_1 > c_2$) (Bhat, Morton, Mason, & Bekhit, 2020).

Otros ensayos que han aplicado diferentes combinaciones de intensidad en cocción SV (53 °C y 58 °C, entre 6 y 30 horas) a diversos tipos de carne (ternera, cerdo y pollo) evidencian que, en general, la carne resulta más tierna, y menos jugosa, según se intensifica el tratamiento SV. Si bien, en carnes blandas como el pollo (con escaso tejido conectivo), una cocción prolongada no supone mejora cualitativa (Christensen, y otros, 2012).

Los resultados de un estudio realizado con lomo de cordero sometido a tratamientos SV con numerosas combinaciones de temperatura y tiempo (60 °C, 70 °C y 80 °C, durante 6, 12 y 24 horas) se hallan en concordancia con las transformaciones (dureza, jugosidad, merma, color...) observadas, como se ha indicado, en otras carnes rojas. Constatándose que cualquier de estos tratamientos proporciona una importante reducción de la carga bacteriana, incluso el de menor intensidad (60 °C, 6h) (Roldán, Antequera, Martín, Mayoral, & Ruiz, 2013). Asimismo, se pudo comprobar que tanto la oxidación de lípidos (empleando como marcador la presencia de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico), como la

oxidación proteica (en este caso, con la abundancia de grupos carbonilo como indicador) se vieron incrementadas en los tratamientos de mayor intensidad; debiendo, por tanto, escoger una combinación adecuada de temperatura y tiempo, según las características concretas del tipo de carne, que optimice la relación entre su calidad sensorial y la citada degradación lípido-proteica (Roldán, Antequera, Armenteros, & Ruiz, 2014).

En los ensayos de cordero realizados en este trabajo, COR_1 (SV_{67.5°C-8h}) y COR_2 (SV_{65°C-24h}), el corte de cordero empleado, pierna trasera, posee un contenido en proteínas del estroma bastante más elevado que el lomo (caso de los estudios precedentes); por tanto, temperaturas inferiores a las empleadas dificultarían (o diferirían en exceso) la gelificación del colágeno. Aceptando que entre las combinaciones empleadas (SV_{67.5°C-8h} y SV_{65°C-24h}) se hallara la intensidad más idónea para la cocción de la pierna de cordero, y en vista de los resultados de vida útil que se han obtenido (Tabla 40), cabría plantearse si una higienización adicional mediante HPP podría suponer algún valor añadido para el producto. Si bien, como ya se indicó, este tipo de tratamientos no alteran de forma significativa las cualidades sensoriales del alimento (mucho menos si, previamente, sus nutrientes han sufrido una desnaturalización térmica); en caso de requerirse una eventual extensión de su vida útil, ésta podría alcanzarse fácilmente con una ligerísima variación en la intensidad de la cocción SV.

Una situación muy distinta se planteó en los ensayos realizados con pescado.

Si se establece una comparativa¹² entre los ensayos de bacalao, BAC_1 (SV_{57.1°C-30'}) y BAC_2 (SV_{52°C-20'}), considerando los tratamientos aplicados y los resultados obtenidos (en términos de vida útil) se observa (Tabla 41) la trascendencia higienizante que posee la

¹² Si bien, las diversas muestras de bacalao no procedieron de un único lote, se parte del siguiente supuesto: los animales poseían similar grado de frescura, y los procedimientos de limpieza, despiece y porcionado se realizaron con una rigurosidad en la higiene muy semejante; por tanto, se asume una carga microbiana inicial equiparable en los diferentes lotes de muestras.



intensidad del procesado SV por debajo del umbral térmico de seguridad: un decremento en la temperatura del 9% ($\Delta T = -5.1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y de $\frac{1}{3}$ en el tiempo de aplicación del tratamiento ($\Delta t = -10'$), marcan la diferencia entre la posibilidad de 45 días de conservación refrigerada y un consumo forzosamente inmediato (con una calidad microbiológica casi inaceptable).

ENSAYOS BACALAO EXTENSIÓN DE VIDA ÚTIL SEGÚN TRATAMIENTO

ENSAYO	TRATAMIENTOS APLICADOS	VIDA ÚTIL (días)	GRUPO BACTERIANO LIMITANTE
ensayo BAC_1 :	SV $57.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30'	45	AEROBIOS MESÓFILOS
	SV $57.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30' + HHP 500 MPa , $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8'	60	AEROBIOS MESÓFILOS
ensayo BAC_2 :	SV $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20'	0	ENTEROBACTERIAS
	SV $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20' + HHP 600 MPa , $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8'	70	AEROBIOS MESÓFILOS

TABLA 41. Resumen vida útil ensayos bacalao

(Elaboración propia)

Cierto es que esta minoración en la intensidad de los tratamientos, también marca la diferencia entre la flexible jugosidad de un alimento *poco hecho* y la colapsada firmeza de un producto muy próximo a su completa desnaturalización proteica.

Precisamente, este previsible aumento en la proliferación bacteriana (por descenso de la intensidad en la cocción SV, de **BAC_1** a **BAC_2**) motivó la inclusión de un estudio de biodiversidad mediante secuenciación en el segundo ensayo, que permitiría identificar la composición dinámica de las poblaciones microbianas; a la vez que se optaba por aplicar una combinatoria múltiple en los parámetros del tratamiento hiperbárico, con el fin de evaluar la medida en que cada uno de éstos contribuye a la inhibición microbiana.

El estudio de diversidad de dicho ensayo (**BAC_2**) reveló que en las muestras control (SV: $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20'), a t_0 , las principales poblaciones bacterianas correspondían a las familias *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Burkholderiaceae*.

Anoxybacillus fue el principal representante de la familia *Bacillaceae*. Género que, no sólo se detectó en las muestras control durante el almacenamiento temprano (en t_0 , y t_3), sino también en todas las muestras presurizadas (hasta t_{30}). Si bien, *Anoxybacillus* fue descrito inicialmente como un microorganismo anaerobio estricto (de ahí su nombre), revisiones posteriores lo catalogaron como anaerobio facultativo (Pikuta, y otros, 2000); se trata un bacilo grampositivo, termófilo (puede crecer en un amplio rango térmico: entre 30 y 70 °C), ligeramente alcalófilo (pH óptimo entre 6 y 9), y formador de esporas (Bremer, Seale, Flint, & Palmer, 2009). Se ha llegado a aislar en aguas termales, donde puede ser un género dominante (Narayan, Hatha, Morgan, & Rao, 2008); como también en la industria láctea, donde su carácter termófilo y esporulante lo convierten en un huésped frecuente e indeseable (Palmer, Flint, Schmid, & Brooks, 2010). La mayoría de las secuencias de lectura obtenidas para este género en el ensayo BAC_2 se asignaron a la especie *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *flavithermus*. Como en el caso de la industria láctea, la capacidad de este género para desarrollar distintas estrategias adaptativas (producción de endosporas, formación de biopelículas o crecimiento termófilo), podrían explicar su presencia en las muestras; probablemente a través del complemento de cocción (pilpil), elaborado según se indicó (epígrafe 3.1.3. *Elaboración_C: Lomo de bacalao*) mediante confitado de pieles, aletas y cabeza del pescado a temperatura moderada (70-75 °C) en aceite de oliva. Por otra parte, es conocido que la matriz alimentaria, según sea su naturaleza, ejerce cierto efecto blindaje frente a la acción inhibitoria de los tratamientos hiperbáricos; potenciándose este apantallamiento en los sustratos lipídicos (Sehrawat, Kaur, Nema, Tewari, & Kumar, 2020). Circunstancia que contribuiría a explicar su reiterada detección en muestras presurizadas. Hipótesis éstas que, no obstante, habría que investigar.

En las muestras control a t_0 y t_3 , la mayor parte de las OTU pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* se asignaron a los géneros *Escherichia-Shigella*. Se trata, ciertamente, de géneros taxonómicamente distintos: *Shigella* es un microorganismo muy especializado, resultando patógenas para el ser humano todas sus especies (Wei, y otros, 2003); mientras que el género *Escherichia* es bastante más diverso, muchas de sus especies forman parte de la microbiota humana habitual en individuos sanos (como bacteria comensal del tracto intestinal), mostrando patogenicidad únicamente algunas cepas de la especie *Escherichia coli* (Qin, y otros, 2010). Sin embargo, ambos géneros son filogenéticamente muy cercanos; esto es, la mayor parte de su material genético es común (Pupo, Lan, & Reeves, 2000). Esta gran similitud genética hace que diversos análisis de identificación bacteriana muestren las abundancias de los géneros *Shigella* y *Escherichia* conjuntamente (tal es el caso del estudio de diversidad de este trabajo).

Las abundancias relativas de *Escherichia-Shigella* también fueron las más destacables de la familia *Enterobacteriaceae* en las muestras presurizadas durante los primeros días de almacenamiento (hasta t_7). Un escenario que obliga siquiera a una sucinta reflexión...: la presencia de poblaciones de este grupo microbiano (aun tratándose de especies o cepas no patógenas; caso estadísticamente más probable) se asocia normalmente a una higiene defectuosa en la fase de preelaboración (explicación que debe descartarse, ya que dicho proceso se cuidó especialmente). Esta inquietante presencia podría tener su origen en la propia microbiota intestinal del pescado (el cual, según se dijo, se adquirió eviscerado); una hipótesis consistente con investigaciones que estudiaron la composición de la microbiota de diferentes peces marinos, informando que, entre su considerable variabilidad, resultaba muy frecuente la presencia de la familia *Enterobacteriaceae* (Egerton, Culloty, Whooley, Stanton, & Ross, 2018). En cuanto a la capacidad de estos microorganismos para sobrevivir

a ambos tratamientos (térmico SV e hiperbárico HPP), se ha estudiado la resistencia al calor y a la presión de *Escherichia coli*, identificándose el locus donde se ubica el módulo de homeostasis proteica que previene, mediante diferentes mecanismos, la agregación o el plegamiento defectuoso de proteínas con el fin de mantener su funcionalidad biológica en condiciones de estrés (Li, y otros, 2020). Comprobándose que tales respuestas adaptativas pueden permitir a ciertas cepas tolerar temperaturas de hasta 60 °C durante 30 minutos (Li & Gänzle, 2016); pudiendo, asimismo, aumentar su barotolerancia hasta 2 GPa con gran rapidez (sometiendo a los microorganismos supervivientes a sucesivos ciclos de presión creciente) (Vanlint, y otros, 2011).

La familia *Burkholderiaceae* estuvo representada por los géneros *Cupriavidus* y *Ralstonia*. Ambos géneros son bastante cercanos filogenéticamente, por tanto, comparten muchas de sus características, tanto morfológicas como fisiológicas: se trata de bacilos gramnegativos con motilidad flagelar y metabolismo quimioheterótrofo (oxidasa, catalasa, citrato y ureasa positivos) (García-Masedo Fernández, García, Sáez-Nieto, & Orden, 2019); obteniendo tanto la energía, como las fuentes de carbono y nitrógeno, que posibilitan su viabilidad celular de la degradación de diferentes compuestos orgánicos (ácidos grasos, azúcares o aminoácidos). Pueden desarrollar biopelículas de exopolisacáridos (Vandamme & Coenye, 2004) y, pese a no generar esporas, logran adaptarse a condiciones ambientales extremas: algunas especies de *Cupriavidus* (*C. metallidurans*) toleran altas concentraciones de metales pesados; se ha constatado que *Ralstonia pickettii* consigue degradar sustancias de cierta toxicidad (como la tioacetamida o la tiobenzamida) (Dodge, Richman, Johnson, & Wackett, 2006); *Cupriavidus* y *Ralstonia* se han podido detectar en la atmósfera y en los sistemas de agua potable de la estación espacial, incluso se han hallado cepas de *Ralstonia pickettii* en la superficie de robots espaciales (Mergeay, Monchy, Janssen, Houdt, & Leys,

2009). Si bien, son microorganismos aerobios, se ha comprobado que *Cupriavidus* puede mantener su metabolismo respiratorio en condiciones de anoxia mediante desnitrificación; proceso por el cual enzimas reductasas catalizan a través de cuatro etapas consecutivas la transformación de los óxidos de nitrógeno (NO_x) en nitrógeno molecular (N_2): reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), reducción de nitrito a óxido nítrico (NO), reducción de óxido nítrico a óxido nitroso (N_2O) y, finalmente, reducción de éste a nitrógeno molecular (N_2) (Liu, Zhang, Bakken, Snipen, & Frostegård, 2019). Ciertamente, no son géneros a los que se atribuya patogenicidad alimentaria; no obstante, pueden resultar patógenos oportunistas, normalmente, por infecciones nosocomiales; evidenciándose que determinadas especies de *Ralstonia* muestran una especial resistencia a antibióticos (*R. mannitolilytica*, *R. pickettii* y *R. insidiosa*) (Ryan & Adley, 2014).

En el ensayo BAC_2, durante el almacenamiento temprano los géneros de la familia *Burkholderiaceae* presentaron abundancias relativas modestas, por lo general, con picos de cierta consideración. *Cupriavidus* alcanzó entre un 10% y un 15% hasta t_3 en las muestras control; mientras que mantuvo su presencia hasta t_{30} en las muestras HPP (excepto en el tratamiento tp_C, donde se prolongó hasta t_{90}), con picos del 16% (a t_{14}) en tp_A: (300 MPa, 50 °C, 8'), del 11% (a t_7) en tp_B: (600 MPa, 50 °C, 4'), y tanto en tp_C: (600 MPa, 22 °C, 8') como en tp_D: (600 MPa, 50 °C, 8') de poco más de un 17% (a t_7). Por su parte, *Ralstonia* mostró, en cuanto a distribución de poblaciones se refiere, un comportamiento muy similar al de *Cupriavidus*; no obstante, su cuantía fue comparativamente inferior en las muestras control (abundancia máxima del 6% en t_0), y significativamente superior en las muestras presurizadas; alcanzando picos de abundancia relativa de un 25% (a t_7) en tp_A: (300 MPa, 50 °C, 8'), del 40% (a t_{14}) en tp_B: (600 MPa, 50 °C, 4'), y tanto en tp_C: (600 MPa, 22 °C, 8') como en tp_D: (600 MPa, 50 °C, 8') de poco más de un 28% (a t_{14}).

Entre los géneros que mantuvieron poblaciones de orden minoritario se encontraban *Vulcaniibacterium* (familia *Xanthomonadaceae*) y *Acinetobacter* (familia *Moraxellaceae*). Microorganismos que convendría describir, siquiera someramente, no por la cuantía de sus abundancias, como se ha indicado, ni tampoco por la peligrosidad de su presencia en las muestras, sino más bien por tratarse de aerobios estrictos según gran parte de la literatura científica disponible.

Vulcaniibacterium, es un género de reciente indexación taxonómica. En 2012 se aisló la primera de las tres especies que hasta este momento se han identificado (NCBI, 2023a), *V. thermophilum*; la cual, inicialmente, se clasificó dentro del género *Lysobacter* (Wei, y otros, 2012). En 2013, la identificación de una segunda especie, *V. tengchongense*, supuso su reclasificación como género (Yu, y otros, 2013).

Taxonomy Browser NCBI

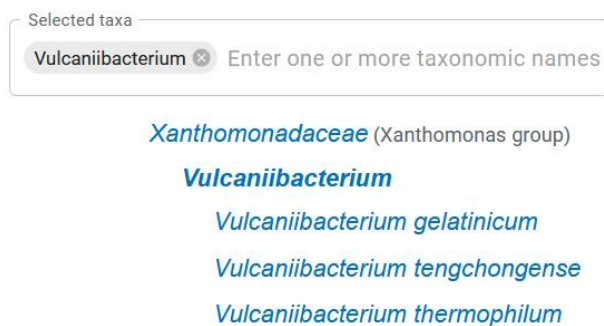


ILUSTRACIÓN 32. Género *Vulcaniibacterium* NCBI
Obtenido de: (NCBI, 2023)

Todas las especies de este género se aislaron en entornos geotermales. Se trata de microorganismos gramnegativos, termófilos (con crecimiento entre 22 °C y 55 °C, y en un rango de pH entre 6 y 8), con morfología bacilar, sin motilidad, catalasa positivo, oxidasa positivo o negativo (según especies y cepas). En su metabolismo aerobio, la coenzima Q8 es la principal quinona respiratoria (Niu, y otros, 2020). Si bien, no se ha hallado ningún estudio que aborde cómo pueda afectar este grupo bacteriano a la calidad de los alimentos, tampoco se ha vinculado a ningún tipo de patogenicidad, ni en humanos ni en animales. En

este sentido, se ha informado que *Vulcaniibacterium* forma parte del microbioma habitual de las ostras del Pacífico; habiéndose identificado dicho género en distintos órganos de estos moluscos, con abundancias relativas superiores al 7% en las branquias y al 12% en el hepatopáncreas (glándula digestiva) (King, y otros, 2020). En el estudio de diversidad del ensayo BAC_2, el género *Vulcaniibacterium* se identificó en ambos tipos de muestras (SV y HHP). En las muestras control mantuvo poblaciones hasta t_3 , con abundancias relativas de cierta significación (de un 10% en t_0 y superior al 6% en t_3). Sin embargo, en las muestras presurizadas este género se pudo detectar hasta t_{30} (si bien, minoritariamente); con picos de abundancia relativa de un 6% (a t_{14}) en las muestras tp_A (300 MPa, 50 °C, 8'), de casi un 7% (a t_7) en las muestras tp_B (600 MPa, 50 °C, 4'), y por encima del 9% (a t_7) en las muestras tp_C (600 MPa, 22 °C, 8') y tp_D (600 MPa, 50 °C, 8'). Habría que abordar, por tanto, un estudio que esclareciese si ciertas cepas del género *Vulcaniibacterium* disponen de vías metabólicas alternativas que posibiliten su respiración en condiciones de anoxia, cuáles son sus niveles de barotolerancia, o qué mecanismos permitieron su crecimiento a temperaturas de refrigeración durante la primera semana de almacenamiento (muestras presurizadas).

Porcentualmente, las abundancias del género *Acinetobacter* fueron inferiores a las de *Vulcaniibacterium*. En el caso de las muestras control, la distribución de las poblaciones resultó similar en ambos géneros (en torno al 4% en t_0 y al 2% en t_3 , para *Acinetobacter*); sin embargo, las abundancias de este género en las muestras presurizadas siguieron una distribución completamente distinta: en las muestras tratadas con menor presión, tp_A (300 MPa, 50 °C, 8'), *Acinetobacter* se detectó en t_0 (3%) y t_3 (1.5%); en las muestras tp_C (600 MPa, 22 °C, 8'), únicamente en t_{45} mostró una abundancia relativa del 8%; mientras que en las muestras con tratamiento hiperbárico más intenso, tp_D (600 MPa, 50 °C, 8'),

presentó abundancias inferiores al 3% en t_3 , t_{14} , y t_{45} ; no detectándose en ningún momento durante el período de análisis en las muestras tp_C (600 MPa, 22 °C, 8'). La identificación fenotípica de *Acinetobacter* resulta compleja: la variabilidad de su morfología (bacilar en fase de crecimiento; derivando a cocobacilo durante su fase estacionaria), una absorción diferencial de la tinción de Gram (por segregación de exopolisacáridos o por agrupación de células), así como su reducida reactividad en los ensayos bioquímicos; hacen que a veces se identifiquen erróneamente como cocos grampositivos (Alsan & Klompas, 2010). Este género lo conforman actualmente unas 115 especies (NCBI, 2023b): microorganismos gramnegativos, sin motilidad, catalasa positivos y oxidasa negativos, no fermentadores; y, estrictamente aerobios (según se afirma en gran parte de la literatura científica disponible). Se trata, sin embargo, de un género que emplea una amplia gama de adaptaciones para sobrevivir en entornos hostiles: acaso su especie más funesta, *Acinetobacter baumannii*, soporta condiciones tan diversas como valores de pH entre 5 y 10, o temperaturas entre 44 °C y -22 °C; pudiendo sobrevivir hasta 50 días en condiciones rigurosamente anaerobias, o 20 días en estado de deshidratación. Diversas especies de *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. haemolyticus*, *A. pittii* y, especialmente, el mencionado *A. baumannii*) son patógenos oportunistas: este último es la principal causa de infecciones nosocomiales en todo el mundo; habiendo desarrollado en sólo unas décadas resistencia frente a todos los agentes antibióticos de uso hospitalario (Dekic, Jasna, Van Wilpe, Venter, & Goic-Barisic, 2019). Los mecanismos que desarrollados por dichas especies para adquirir este grado de multirresistencia son muy variados: mutaciones en las proteínas diana de los antibióticos, disminución de la permeabilidad de la membrana externa, adquisición de plásmidos que codifican proteínas resistentes o enzimas que inhiben la acción del agente antimicrobiano... (Van Looveren & Goossens, 2004). Otra estrategia de resistencia que *Acinetobacter* emplea



como recurso extremo es el estado de latencia (también *dormancia* o *quiescencia*): en dicho estado se suspende la bipartición y el metabolismo celular se ralentiza; pudiendo aumentar el grosor de su membrana externa hasta 3,3 veces (por incremento de la capa de peptidoglicano), como respuesta defensiva ante una situación de anaerobiosis prolongada (Ilustración 33) (Dekic, Jasna, Van Wilpe, Venter, & Goic-Barisic, 2019).

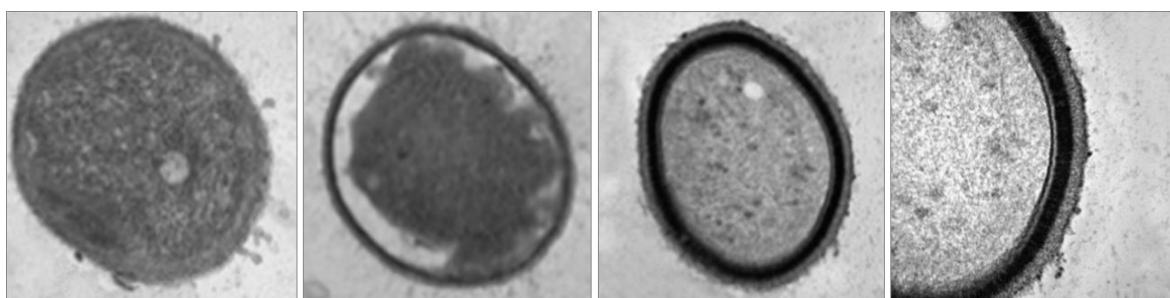


ILUSTRACIÓN 33. Estado de latencia celular en *Acinetobacter* spp.

Obtenido de: (Dekic, Jasna, Van Wilpe, Venter, & Goic-Barisic, 2019)

Otros estudios refrendan la gran capacidad de este grupo bacteriano para adaptarse a regímenes de anoxia: se informó que *Acinetobacter* fue el género predominante en el microbioma de un reactor de tratamiento de aguas residuales (reactor anaerobio de flujo ascendente de lodos: UASB, comúnmente; de su acrónimo anglosajón *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*). Dominancia que se interpreta como una ventaja competitiva sobre otros géneros, al disponer de un metabolismo adaptativo capaz de valerse de sustratos orgánicos muy variados (Vieira, Bergamasco, Gimenes, Nakamura, & Diasfilho, 2003). Sin embargo, en determinados estudios que tratan sobre la biodegradación de sustancias contaminantes (tensioactivos, petróleo, bifenilos, acetonitrilo...) por la acción enzimática de *Acinetobacter*, se afirma que ciertas especies de este género son anaerobias facultativas; tal es el caso de *Acinetobacter calcoaceticus* (Muayad, y otros, 2007). Consideraciones de índole diversa que, junto con el carácter ubicuo de este género (Van Looveren & Goossens, 2004), podrían

contribuir a explicar su presencia en todas las muestras del ensayo principal realizado con bacalao (BAC_2); en algunos casos, hasta t_{45} .

A partir de t_3 la microbiota inicial de las muestras control cambió la predominancia de sus poblaciones. El género que presentó mayor abundancia relativa desde t_3 hasta t_{14} fue *Pseudomonas*, mostrando en t_7 una abundancia superior al 90%. Por distintos estudios se conoce que este género es colonizador predominante y habitual del pescado marino durante su almacenamiento refrigerado en condiciones aeróbicas (Kuuliala, y otros, 2018); (Gram & Dalgaard, 2002). *Pseudomonas* es el principal género de deterioro en este tipo de alimentos, pudiendo experimentar un rápido crecimiento a temperaturas de refrigeración (Parlapani & Boziaris, 2016); (Pang, y otros, 2015). Se ha podido aislar tanto en pescados frescos con distinto grado de preelaboración (Parlapani, Haroutounian, Nychas, & Boziaris, 2015), como en moluscos, o en salmón ahumado. Se trata de un género microbiano de persistente ubicuidad; habiéndose detectado que, incluso tras la limpieza y desinfección de las plantas de procesado de productos derivados de la pesca, *Pseudomonas* continúa siendo una bacteria predominante (Bagge-Ravn, y otros, 2003). Entre las especies que se vinculan más frecuentemente al deterioro de productos marinos se hallan *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas putida* (Macé, y otros, 2012); también especies como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas vranovensis* (Odeyemi, Burke, Bolch, & Stanley, 2018). En el estudio de diversidad realizado en el ensayo BAC_2, las OTU de este género se asignaron mayoritariamente a *Pseudomonas fragi*.

Los miembros del género *Pseudomonas* son bacterias gramnegativas, estrictamente aeróbicas, psicrótrofas, no fermentativas, oxidasas-positivas y móviles (Heller, Tortora, & Burger, 1990). La competencia entre distintas especies en la misma matriz alimentaria puede llevar a su inhibición mutua (Parlapani & Boziaris, 2016). Emplean diversas enzimas

(proteasas y lipasas) en los procesos de deterioro de productos pesqueros, generándose como resultado de tal degradación diferentes metabolitos: aldehídos, alcoholes y ésteres (3-metil-1-butanol, 2-etil-1-hexanol, 3-metilbutanal, isoamil butirato) (Mikš-Krajnik, Yoon, Ukuku, & Yuk, 2016).

Es factible que, en el ensayo BAC_2, *Pseudomonas* se hallara en el propio pescado antes de su preelaboración: una de las investigaciones referida con anterioridad, informa que entre la microbiota habitual del bacalao del Atlántico (*Gadus Morhua*) se halla dicho género bacteriano (Egerton, Culloty, Whooley, Stanton, & Ross, 2018). Por otra parte, en cuanto al paradójico crecimiento de este microorganismo estrictamente aerobio en un envase al vacío, dicho resultado es consistente con los obtenidos por distintos autores: un estudio reciente informó sobre la capacidad de *Pseudomonas* para crecer en condiciones de vacío durante el almacenamiento refrigerado de productos cárnicos (inoculados con dicha bacteria), tras un tratamiento térmico superior a 70 °C; si bien, los recuentos viables de *Pseudomonas* estuvieron bajo el umbral de detección inicialmente, su proliferación se hizo patente tras 14 días de almacenamiento refrigerado. En dicho estudio se sugiere que diversos metabolitos obtenidos por degradación de la arginina posibilitarían su crecimiento en régimen de anaerobiosis (Watson, Furbeck, Fernando, Chaves, & Sullivan, 2023). Otros autores, justifican el crecimiento de *Pseudomonas* durante el almacenamiento de lomo de cerdo (pasteurizado mediante SV) por la existencia de oxígeno residual en los intersticios cárnicos (Nyati, 2000). En un estudio realizado con pescado (carpa plateada) sometido a cocción SV (a 75 °C y 80 °C), se dio una situación similar: en las muestras con tratamiento SV_{75°C} el crecimiento de *Pseudomonas* pudo observarse tras 7 días de almacenamiento refrigerado, mientras que en las muestras SV_{80°C} su crecimiento se produjo a partir de los 14 días; evidenciándose la capacidad que posee este género para adaptarse a condiciones

desfavorables (Hosseini, y otros, 2023). En el caso concreto del ensayo BAC_2, acaso el esfuerzo adaptativo que debió realizar *Pseudomonas* no fuese tan intenso; ya que es muy posible que el complemento o base de cocción (emulsión de pilpil) retuviera una cantidad significativa de aire residual.

La composición de las poblaciones que se desarrollan durante el almacenamiento del pescado es muy variable; dependiendo en gran medida de las condiciones y la prolongación del almacenamiento. Determinados estudios han descrito que la microbiota de deterioro del bacalao fresco refrigerado se hallaba dominaba por géneros como *Pseudomonas* y *Psychrobacter*; mientras que en el almacenamiento refrigerado del bacalao envasado en atmósfera modificada las especies más relevantes fueron *Carnobacterium maltaromaticum* y *Rahnella aquatilis* (Sørensen, y otros, 2020). En el estudio de biodiversidad de BAC_2, en las muestras control, las OTU asignadas al género *Psychrobacter* sólo presentaron una abundancia relativa de cierta relevancia (inferior al 15%) en t₁₄; *Carnobacterium* mostró una abundancia similar, resultando todavía mayoritaria *Pseudomonas*. Género que sería desplazado en t₃₀ y t₆₀ por *Enterobacteriaceae* y *Carnobacterium*.

El género *Psychrobacter* está compuesto por cocobacilos aerobios pertenecientes a la familia *Moraxellaceae*; se trata de microorganismos gramnegativos, psicrótrofos, oxidasa positivos, sin motilidad, no esporulados, osmotolerantes y con capacidad para la formación de biopelículas (Bowman, 2006). Entre las especies del género *Psychrobacter* se encuentran *Psb. immobilis*, *Psb. cibarius*, *Psb. maritimus*, *Psb. proteolyticus* y *Psb. fozii* (Broekaert, Heyndrickx, Herman, Devlieghere, & Vlaemynck, 2011). Su crecimiento a temperaturas de refrigeración, junto a la capacidad que poseen algunas de sus especies (*Psychrobacter immobilis*, especialmente) para la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, generando olores desagradables (a moho, pescado viejo o enranciamiento), cambios de textura y



sabor, hacen que *Psychrobacter* se vincule al deterioro de alimentos de diversa naturaleza (Broekaert, Heyndrickx, Herman, Devlieghere, & Vlaemynck, 2013). Se ha podido aislar en productos lácteos, cárnicos y derivados de la pesca; desde moluscos (Prapaiwong, Wallace, & Arias, 2009), o crustáceos (Meziti, Ramette, Mente, & Kormas, 2010), a pescados grasos y magros; y, entre estos últimos, también en el bacalao del Atlántico (protagonista de los ensayos BAC_1 y BAC_2) (Wilson, Danilowicz, & Meijer, 2008). Algunos de los compuestos orgánicos volátiles más comunes producidos por *Psychrobacter* en los alimentos de origen marino son éteres, histaminas, cetonas, alcoholes y aldehídos (como 2,3-dimetil-oxirano, 2-formilhistamina, 2-butanona, 2-metil-2-propanol, o acetaldehído) (Broekaert, Nosedá, Heyndrickx, Vlaemynck, & Devlieghere, 2013). Se ha comprobado que la competencia con otros géneros bacterianos deteriorantes puede ocasionar la inhibición de *Psychrobacter* (Rodríguez-Calleja, y otros, 2005); si bien, se constató el caso contrario: las poblaciones que aúnan los géneros *Psychrobacter* y *Pseudoalteromonas*, por algún tipo de conjunción simbiótica, incrementa la proliferación de ambos grupos y, por tanto, aumenta el deterioro de la matriz alimentaria (Joffraud, Leroi, Roy, & Berdagué, 2001).

En las muestras control en t_{30} , *Brochothrix* presentó una abundancia relativa algo superior al 5%. Dicho género actualmente perteneciente a la familia *Brochothrichaceae*, estuvo incluida hasta 2012 en la familia *Listeriaceae*. Se trata de bacilos grampositivos, no esporulantes, sin motilidad, psicotróficos y aerobios facultativos (Casaburi, Di Martino, Ercolini, & Villani, 2015). Una de sus especies, *Brochothrix thermosphacta*, es halófila y puede crecer en un amplio rango de térmico; se ha podido aislar en diferentes tipos de matrices alimentarias y bajo distintas condiciones de almacenamiento (Nowak, Rygala, Oltuszk-Walczak, & Walczak, 2012); realizando siempre una considerable actividad de deterioro de la calidad del alimento, con modificaciones indeseables de textura, sabor y

olor (Laursen, Leisner, & Dalgaard, 2006); (Drosinos & Nychas, 1996). Se comprobó que el metabolismo de *Brochothrix thermosphacta* generó subproductos de degradación como cetonas y alcoholes (2-pentanona, 3-hidroxi-2-butanona, 2,3-butanediona, 2-pentanol, diacetilo, 3-metil-1-butanol, 4-metil-3-cloro-2-pentanol) durante el almacenamiento de crustáceos tratados térmicamente (Fall, y otros, 2012). *Brochothrix thermosphacta* es resistente a antibióticos como la estreptomicina (capaz de inhibir el crecimiento de un gran número de microorganismos, tanto grampositivos como gramnegativos); sin embargo, la competencia con otros géneros (como los acidolácticos) pueden provocar el retroceso e inhibición de las poblaciones de *Brochothrix* durante el almacenamiento refrigerado (Fall, Leroi, Cardinal, Chevalier, & Pilet, 2010).

En las muestras control, el género *Serratia* (familia *Enterobacteriaceae*) alcanzó entre t_{30} y t_{60} abundancias relativas de cierta significación (alrededor de un 14% y un 12%). Este género está compuesto por bacilos gramnegativos, aerobios facultativos, con motilidad flagelar, no esporulados, con capacidad de crecimiento en un amplio rango térmico y en gran diversidad de sustratos. Ninguna de las especies de este género se incluye entre los patógenos alimentarios; si bien, alguna de ellas (*S. marcescens*, especialmente; en menor medida *S. liquefaciens*) pueden resultar patógenas para el ser humano (normalmente por infección nosocomial) (Khanna, Khanna, & Aggarwal, 2013). Sin embargo, distintas especies de *Serratia* se han vinculado al deterioro de productos pesqueros: *S. proteamaculans* y *S. fonticola* fueron especies dominantes en el deterioro del filete de jurel de IV gama (Alfaro & Hernández, 2013). Estas bacterias generan enzimas descarboxilasas que transforman aminoácidos como la lisina y la ornitina en poliaminas como la cadaverina y la putrescina, con liberación de CO₂ (De Filippis, y otros, 2013). Una especie frecuentemente asociada al deterioro de productos pesqueros ligeramente conservados es *Serratia liquefaciens*; la cual



produce olores ácidos y amoniacales, a queso y caucho, debido a metabolitos como aminas, tioéteres y alcoholes (trimetilamina, dimetildisulfuro, 2,3-butanodiol o 2-pentanol) (Joffraud, Leroi, Roy, & Berdagué, 2001).

Un género de deterioro que mantuvo abundancias de cierta consideración en todas las muestras presurizadas fue *Photobacterium*. Se trata de bacilos marinos pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*; son microorganismos gramnegativos, con respiración anaerobia facultativa y motilidad mediante flagelos. Entre las diversas especies que componen este género se hallan entre otros *Photobacterium phosphoreum*, *P. iliopiscarium*, *P. aquimaris*, *P. kishitanii* o *P. piscicola* (Figge, y otros, 2014). En las muestras presurizadas de menor intensidad, tp_A (300 MPa, 50 °C, 8'), mostró en t₇ una abundancia relativa próxima al 40%, manteniendo abundancias inferiores (en torno al 9%) hasta t₃₀. En las muestras sometidas a un menor tiempo de retención, tp_B (600 MPa, 50 °C, 4'), su mayor abundancia relativa la presentó en t₃ (sobre un 25%); con abundancias de menor consideración hasta t₄₅. En las muestras cuya presurización se efectuó a temperatura ambiente, tp_C (600 MPa, 22 °C, 8'), *Photobacterium* no fue desplazado por las bacterias acidolácticas hasta t₁₀₅; presentando abundancias del 19% en t₁₄, o superiores al 15% en t₇₅. En el tratamiento presurizado de mayor intensidad, tp_D (600 MPa, 50 °C, 8'), dicho género alcanzó su máxima abundancia relativa en t₁₄, con casi un 40%; y tan sólo fue completamente desplazado por *Aerococcus* en t₆₀. Se ha comprobado que, entre las distintas especies de este género, *Photobacterium phosphoreum* es la que más frecuentemente se asocia al deterioro de productos derivados de la pesca, tanto mariscos (Gornik, Albalat, Macpherson, Birkbeck, & Neil, 2011), (Hansen, y otros, 2009), como en pescados (Macé, y otros, 2012), produciendo olores indeseables y otras alteraciones organolépticas, por la degradación enzimática de aminoácidos (Macé, y otros, 2013). La naturaleza bioluminiscente de *Photobacterium phosphoreum* hace que se

pueda identificar en agar LH (*Long&Hammer*) si se observa en la oscuridad; si bien, esta bioluminiscencia se atenúa o se pierde tras unos días de incubación, hecho que dificulta la identificación de las células aisladas (Flodgaard, y otros, 2005); (Urbanczyk, Furukawa, Yamamoto, & Dunlap, 2012). Pese a la alta solubilidad del CO₂, tanto en lípidos como en agua, provocando una disminución de pH (lo que confiere a este gas una notable capacidad bacteriostática), *Photobacterium* se muestra resistente a niveles elevados de CO₂ (Gornik, Albalat, Theethakaew, & Douglas, 2013). Se ha comprobado que *Photobacterium* produce una serie de compuestos orgánicos durante la degradación de los productos pesqueros, como pueden ser: diacetilo, ácido acético, acetato de etilo, alcohol isoamílico, benceno acetaldehído, benzaldehído, isobutiraldehído, isovaleraldehído, isopentanal e isobutanol (Nieminen, Dalgaard, & Björkroth, 2016). Asimismo, se pudo comprobar que este género logró inhibir el crecimiento de otras bacterias de deterioro, como *Shewanella putrefaciens* y *Brochothrix thermosphacta*, en una matriz de salmón crudo (Mikš-Krajnik, Yoon, Ukuku, & Yuk, 2016).

Comparativamente, la diferencia más sustancial entre las dinámicas microbianas que siguieron las muestras presurizadas frente a las muestras control (estudio de biodiversidad de BAC_2), residió en las abundancias relativas de sus principales grupos de deterioro: mientras que en las muestras control las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae* se mostraron predominantes, en las muestras presurizadas dichas familias presentaron abundancias relativas muy bajas. Ciertamente es que, según se ha indicado, en la microbiota de las muestras presurizadas se detectaron durante el almacenamiento temprano diversos grupos bacterianos que también formaban parte de las muestras control (tal es el caso de géneros como *Anoxybacillus* o *Escherichia-Shigella*). Sin embargo, la microbiota de las muestras presurizadas durante el almacenamiento tardío estuvo dominada por distintas

familias acidolácticas (*Aerococcaceae* y *Enterococcaceae*, principalmente; *Lactobacillaceae*, *Carnobacteriaceae* y *Streptococcaceae*, en menor medida). En las muestras presurizadas tp_A (300 MPa, 50 °C, 8'), la suma de lecturas asignadas al orden *Lactobacillales* durante el período comprendido entre t_{45} y t_{105} , representaron abundancias relativas entre un 97,7% y un 99,3% para dicho grupo bacteriano; durante ese mismo período, para las muestras tp_B (600 MPa, 50 °C, 4'), *Lactobacillales* mostró abundancias relativas entre el 76,8% y el 99,3% (cifras que restringidas al período de t_{60} a t_{105} se sitúan en el rango de 87,4% a 99,5%). En las muestras presurizadas tp_C (600 MPa, 22 °C, 8'), la abundancia relativa del orden *Lactobacillales* presentó dos picos a t_{60} (88,5%) y a t_{105} (95,8%). Comprobándose que en esta fase tardía del almacenamiento, la abundancia relativa de las principales bacterias acidolácticas variaba en gran medida con el tipo de tratamiento hiperbárico que se aplicó a la muestra. Así, en el tratamiento HPP de menor intensidad (tp_A: 300 MPa, 50 °C, 8'), el género predominante fue *Enterococcus*, seguido de *Aerococcus* (excepto en t_{60}); mientras que en el caso del tratamiento con menor tiempo de retención (tp_B: 600 MPa, 50 °C, 4'), predominancias semejantes sólo se produjeron en t_{90} y t_{105} , alternando mayor abundancia relativa diversos géneros de *Lactobacillales*: *Lactobacillus* en t_{45} , *Carnobacterium* en t_{60} o *Aerococcus* en t_{75} . Más heterogéneas resultaron las poblaciones de las muestras sometidas al tratamiento en que la cámara de presurización se mantuvo a temperatura ambiente (tp_C: 600 MPa, 22 °C, 8'), en las cuales *Carnobacterium* fue el género predominante en t_{60} , y *Aerococcus* en t_{105} (seguido de *Enterococcus*); en el resto de tiempos de muestreo ningún género mostró una abundancia relativa mayoritaria. Por su parte, en el tratamiento de mayor intensidad (tp_D: 600 MPa, 50 °C, 8'), *Aerococcus* fue el género que evidenció un claro predominio durante la fase de almacenamiento prolongado, relegando al resto de las especies acidolácticas a unas abundancias relativas muy reducidas. Tales resultados se

deben interpretar considerando una conjunción de factores: distinta sensibilidad de los microorganismos a determinadas barreras impuestas por el tratamiento HHP (intensidad de la presión hidrostática, tiempo de retención de ésta o incremento térmico de la cámara de presurización), su capacidad específica de proliferación a temperatura de conservación en frío positivo ($T_{stock} \approx 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), así como su grado de competitividad con otros supervivientes presentes en el sustrato alimentario.

A la vista de tales resultados, el papel que desempeñaron las bacterias acidolácticas en la segunda mitad del almacenamiento de las muestras presurizadas del ensayo [BAC_2](#), sin duda, fue de una gran relevancia. Este grupo de microorganismos está compuesto por cocos y bacilos grampositivos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, catalasa-negativos, tolerantes a los ácidos y estrictamente fermentativos (con un único metabolito resultante, o con varios) ([Fidan, y otros, 2022](#)). Lo integran alrededor de veinte géneros pertenecientes al filo *Firmicutes* (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus* y *Oenococcus*, entre otros; siendo *Lactobacillus* el más extenso de estos géneros). Su contribución secular en la transformación y conservación de alimentos (los cuales, tradicionalmente, se han considerado seguros, saludables y/o apetitosos) ha hecho que en ocasiones se tenga una percepción uniforme y simplista de los efectos metabólicos de un grupo bacteriano tan vasto y variado como éste. De cierto, su actividad metabólica suele mejorar la digestibilidad del alimento (por modificación de macronutrientes), dando lugar a nuevas texturas, así como a sabores y aromas de una mayor complejidad y sutileza; asimismo, es conocida la función que desempeñan muchas de ellas como bioconservantes, mediante diversos mecanismos de desplazamiento de los patógenos (como competencia por los nutrientes, acidificación del medio o producción de sustancias antimicrobianas)

(Parra Huertas, 2010). Sin embargo, también es cierto que el metabolismo de determinadas especies de este grupo de bacterias, lejos de mejorar las propiedades del alimento, sólo se traduce en un progresivo deterioro de su calidad organoléptica. Distintas especies de este grupo bacteriano se han aislado en productos de la pesca en almacenamiento refrigerado, crudos, ligeramente conservados, o incluso envasados en atmósfera modificada (Franzetti, Scarpellini, Mora, & Galli, 2003); habiéndose comprobado que, dado su carácter anaerobio, el envasado al vacío favorece su crecimiento, tras cierto período en el que otras especies competidoras acaban siendo desplazadas (Silbande, y otros, 2016).

En general, las bacterias acidolácticas pueden adaptarse bien a las condiciones de almacenamiento de los productos pesqueros con reducido procesamiento térmico: la mayor parte de las cepas que se aislaron en tales productos eran son psicrotrofas; capaces de catabolizar la arginina, de crecer con baja concentración de glucosa o hasta con un 10% de sal (Dellaglio, De Roissart, Torriani, Curk, & Janssens, 1994); (Mauguin & Novel, 1994). Condiciones vetadas para muchos microorganismos gramnegativos que podrían rivalizar por los nutrientes de este tipo de sustratos alimentarios: concentraciones de ClNa entre un 5% y un 6% inhiben, o atenúan considerablemente, el crecimiento de *Photobacterium phosphoreum* (Morii & Kasama, 2004); observándose resultados muy similares para otros posibles competidores, como *Shewanella putrefaciens* (Le Den, 1995), o *Aeromonas spp.* (Gram, 1991). Factores como el envasado al vacío o en atmósfera modificada, tan sólo refuerzan su prevalencia frente a otros grupo bacterianos, dado su metabolismo anaerobio aerotolerante. Determinados géneros acidolácticos, como *Carnobacterium*, son resistentes a la congelación, muestran buena tasa de crecimiento a temperaturas de refrigeración, en cualesquiera condiciones de envasado y en presencia de diferentes tipos de conservantes (Laursen, y otros, 2005); su gran versatilidad le permite prosperar en sustratos tan diversos

como quesos elaborados con leche cruda (Millière & Lefebvre, 1994) y diversos productos lácteos (Afzal, y otros, 2010), carnes crudas y derivados cárnicos (Montel, Talon, Fournaud, & Champomier, 1991), carnes pasteurizadas SV (Didimo Imazaki, y otros, 2012), elaborados avícolas de V gama envasados en atmósfera modificada (Barakat, Griffiths, & Harris, 2000), o productos derivados de la pesca sometidos a ligeros procesos de conservación (Leroi, Joffraud, & Chevalier, 2000), (Leroi, Joffraud, Chevalier, & Cardinal, 1998). Habiéndose comprobado que las abundancias relativas de los géneros acidolácticos varía según los parámetros del proceso de conservación: en el ahumado del salmón, con salmuera al 5%, un 97% de agua libre ($a_w=0.97$) y una densidad de humo de 10 ppm, las abundancias de *Carnobacterium* y *Lactobacillus* guardaron una relación de 30 vs 70; mientras que al disminuir a 3 ppm el nivel de humo (manteniendo el resto de parámetros), las poblaciones de *Carnobacterium* se incrementaban considerablemente (hasta 60 vs 40) (Tomé, Gibbs, & Teixeira, 2007).

Décadas atrás, se consideraba que el género *Carnobacterium* ejercía una actividad bioprotectora sobre los alimentos de origen marino; una atribución ésta que, si bien se podría justificar por la capacidad de algunas especies de dicho género (*C. maltaromaticum* o *C. divergens*) de inhibir el crecimiento de psicrófilos como *Listeria*, mediante síntesis de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) (Nilsson, Gram, & Huss, 1999), (Duffes, Corre, Leroi, Dousset, & Boyaval, 1999), no habría que olvidar que estas especies metabolizan también sustancias poco deseables, como la tiramina (Leisner, Laursen, Prévost, Drider, & Dalgaard, 2007), (Laursen, y otros, 2005); y, a medida que se sucedieron los estudios que informaban sobre una presencia predominante de *Carnobacterium* en las poblaciones microbianas asociadas al deterioro de todo tipo de productos marinos: en salmón ahumado envasado al vacío (Leroi, Arbey, Joffraud, & Chevalier, 1996), o en atmósfera modificada

(Paludan-Müller, Dalgaard, Huss, & Gram, 1998), en distintos productos de IV Gama como atún, pez espada, salmón y sepia (Franzetti, Scarpellini, Mora, & Galli, 2003), o en crustáceos cocidos en salmuera y envasados en atmósfera modificada (Dalgaard, y otros, 2003), (Laursen, Leisner, & Dalgaard, 2006), incluso en peces de agua dulce (González, Encinas, García-López, & Otero, 2000), comenzó a evidenciarse cierto carácter pírrico en la bioprotección proporcionada por *Carnobacterium*. Entre las especies de este género que se han aislado en productos pesqueros (en diferentes condiciones de almacenamiento refrigerado) se encuentran *C. mobile*, *C. divergens*, *C. alterfunditum*, *C. funditum* (Franzetti, Scarpellini, Mora, & Galli, 2003), *C. maltaromaticum*, *C. jeotgali*, o *C. iners* (Calliauw, y otros, 2016). Se ha constatado que tales especies producen metabolitos como acetil propionilo (2,3-pentanodiona) y diacetilo (2,3-butanodiona) (Joffraud, Leroi, Roy, & Berdagué, 2001), (Stohr, Joffraud, Cardinal, & Leroi, 2001), precursores de olores a mantequilla azucarada, queso, toffee, con matices de pimienta, chile o jengibre. Compuestos volátiles que, sin embargo, en determinados estudios no produjeron el rechazo de un panel entrenado de cata (Brillet, Pilet, Prevost, Cardinal, & Leroi, 2005). En otras investigaciones se informó, por el contrario, que poblaciones predominantes de *Carnobacterium* (especies *C. divergens* y *C. maltaromaticum*) generaban en la matriz alimentaria diversos aldehídos, alcoholes y cetonas, que ocasionaban sabores amoniacales y agrídulces, con fuertes olores a cloro, malta y frutos secos; muestras que los panelistas consideraron no aptas para el consumo (Dalgaard, y otros, 2003), (Laursen, Leisner, & Dalgaard, 2006).

Por su parte, el deterioro alimentario causado por el género *Lactobacillus* resulta muy variable según especies (e incluso cepas): la inoculación bacteriana en salmón esterilizado por ionización, y su evaluación sensorial tras un período de almacenamiento por un panel de cata entrenado determinaron que *Lactobacillus sakei* causaba un considerable deterioro

sensorial del producto; mientras que *Lactobacillus alimentarius* no introducía alteraciones organolépticas significativas (Stohr, Joffraud, Cardinal, & Leroi, 2001). Se pudo constatar que *Lactobacillus sakei* genera metabolitos como sulfuro de hidrógeno, acetato de etilo y etanoato de propilo (Joffraud, Leroi, Roy, & Berdagué, 2001), sustancias responsables de olores ácidos y sulfurosos (Nilsson, Gram, & Huss, 1999); (Stohr, Joffraud, Cardinal, & Leroi, 2001), causantes de rechazo sensorial. Si bien, como se ha indicado, se pudo comprobar que determinadas cepas de esta misma especie no ocasionaban menoscabo de la calidad organoléptica (Weiss & Hammes, 2006). Asimismo, otros estudios informaron sobre una posible variabilidad del efecto deteriorante de un determinado género en función del tipo de sustrato alimentario en donde se halle: así, *Lactobacillus alimentarius* que, según se ha referido, no produjo un deterioro apreciable en el salmón fresco, pudo identificarse como responsable del deterioro sensorial del arenque marinado (Lyhs, Korkeala, Vandamme, & Björkroth, 2001). Por otra parte, se ha observado que el grado de deterioro también guarda relación con la asociación de determinados géneros, especies o cepas: la conjunción de *Carnobacterium spp.* con *Vibrio spp.*, o con *Brochothrix thermosphacta* se mostró más deteriorante que los cultivos puros de tales microorganismos, según los niveles de TVB-N del alimento (acrónimo anglosajón de *Total Volatile Basic Nitrogen*: total de sustancias volátiles nitrogenadas básicas, índice empleado frecuentemente para medir la calidad de los productos pesqueros, ya que tales compuestos se generan por degradación proteica) (Brillet, Pilet, Prevost, Cardinal, & Leroi, 2005); comprobándose que los compuestos volátiles generados por estas asociaciones bacterianas diferían de los producidos en cultivo puro (Laursen, Leisner, & Dalgaard, 2006). Asimismo, se pudo observar que el deterioro inducido por *Lactobacillus sakei* en salmón estéril se atenuaba en presencia de *Serratia*



liquefaciens; especie ésta cuyo efecto deteriorante (en monocultivo) se percibía más tardíamente y en menor medida (Joffraud, y otros, 2006).

Aunque, en general, las bacterias responsables del deterioro sensorial se hallan bien identificadas, se trata de un fenómeno de gran complejidad, ya las interacciones entre los distintos grupos bacterianos condicionan los productos metabólicos resultantes. A menudo se ha considerado que, en sustratos como el pescado, los géneros acidolácticos eran menos competitivos (y, por tanto, menos deteriorantes) que microorganismos gramnegativos como *Pseudomonas spp.*, *Photobacterium phosphoreum* o *Shewanella putrefaciens* (Jørgensen, Huss, & Dalgaard, 2000); sin embargo, se ha podido comprobar que en pruebas de crecimiento realizadas con pescado ligeramente conservado (salmón ahumado en frío) distintas especies de *Lactobacillus* (*L. sakei*, *L. alimentarius* y *L. farciminis*) experimentaron un mayor desarrollo que *Serratia liquefaciens*, *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* o *Brochothrix thermosphacta* (Joffraud, y otros, 2006). Estudios sobre las características del deterioro relacionado con la actividad de las bacterias acidolácticas, sus compuestos responsables y precursores asociados, informaron que la fermentación de los carbohidratos origina ácidos orgánicos, responsables de sabores y olores agrios, ácidos y especiados. Géneros como *Carnobacterium* catabolizan los aminoácidos dando lugar a aldehídos y alcoholes; degradación proteica que origina sabores amargos. La cisteína y la arginina pueden metabolizarse en H_2S y NH_3 respectivamente, ocasionando olores sulfurosos y amoniacales. Géneros como *Leuconostoc* y *Lactococcus* producen aromas a mantequilla y otros olores lácteos, transformando el citrato en diacetilo. Otros productos del metabolismo de los géneros acidolácticos heterofermentativos es el CO_2 , resultado de la degradación de aminoácidos, hidratos de carbono y ácidos orgánicos (Huss, Jeppesen, Johansen, & Gram, 1995).

Entre las bacterias acidolácticas asociadas a productos derivados de la pesca se hallan habitualmente especies como *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* o *Carnobacterium maltaromaticum*; asimismo, diversas especies de *Leuconostoc* y *Lactococcus* se vinculan con frecuencia a tales productos (Françoise, 2010). Estas bacterias llegan a ocasionar un considerable deterioro del pescado (Zhuang, y otros, 2021) como consecuencia de los metabolitos generados a partir de la degradación de hidratos de carbono, ácidos orgánicos y aminoácidos (Huss, Jeppesen, Johansen, & Gram, 1995); (Stohr, Joffraud, Cardinal, & Leroi, 2001). En estos procesos metabólicos, ciertos géneros acidolácticos (especialmente *Enterococcus*) pueden llegar a producir aminas biógenas mediante la descarboxilación de aminoácidos; hecho que cobra especial relevancia en productos ricos en proteínas, como es el caso del pescado (Ghanbari & Jami, 2013). A este respecto habría que señalar que, según los resultados que proporcionó el estudio de diversidad bacteriana realizado en el ensayo BAC_2, en las muestras sometidas a tratamiento hiperbárico, la mayoría de las OTU asignadas al género *Lactobacillus* pertenecían a la especie *L. sakei*; y, por otra parte, según refleja el reporte gráfico de tal estudio, las abundancias relativas del género *Enterococcus* fueron muy considerables (Gráfico 22) en las muestras sometidas a tratamientos de menor presión (tp_A: 300 MPa, 50 °C, 8') desde t₄₅; mientras que aquellas muestras a las que se aplicó tratamiento presurizado con menor tiempo de retención (tp_B: 600 MPa, 50 °C, 4'), *Enterococcus* resultó el género predominante a partir de t₉₀.

También conforme al referido estudio (biodiversidad en el ensayo BAC_2) se observa que *Aerococcus* fue uno de los géneros acidolácticos presentes durante el almacenamiento tardío de las muestras presurizadas (Gráfico 22). En concreto, su abundancia relativa resultó altamente mayoritaria desde t₆₀ en las muestras sometidas al tratamiento HHP de mayor intensidad: tp_D (600 MPa, 50 °C, 8'); hallándose presente en menor medida en el resto de



muestras presurizadas. Si bien, no se trata de un género de una asidua vinculación a las poblaciones microbianas detectadas en los productos pesqueros, *Aerococcus* forma parte de la microbiota habitual de los peces de agua dulce sanos (Ringø, 2004); y se ha podido aislar en pescados con distintos tipos de procesamiento, como salmón ahumado o bacalao salado (Rodrigues, Ho, López-Caballero, Vaz-Pires, & Nunes, 2003), o pastas fermentadas compuestas por pescado y crustáceos (Lv, y otros, 2020). Se conoce, asimismo, que ciertas especies de *Aerococcus* resultan patógenas para los crustáceos: *Aerococcus viridans* subsp. *homari* es responsable de la enfermedad denominada *gaffkemia* (o *enfermedad de la cola roja*), afección muy agresiva que afecta principalmente a langostas; si bien, puede infectar a otros crustáceos (como cangrejos y camarones) que, sin embargo, no desarrollan una enfermedad grave; pudiendo permanecer viable esta bacteria durante largos períodos en animales enfermos, los cuales actúan como reservorio de la infección (Shields, 2011). También se han documentado casos en que esta especie se encuentra relacionada con la patogénesis de pescados de acuicultura como la tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Ke, y otros, 2012).

A pesar de estas referencias poco amables, el estudio de las especies de *Aerococcus* puede albergar un gran interés debido a su potencial en la bioconservación de productos derivados de la pesca. Se conoce que la cepa SF1044 de *Aerococcus viridans* aislada de salmón fresco mostró una excelente capacidad para inhibir el crecimiento de seis especies de una contrastada actividad deteriorante en pescados (*Photobacterium phosphoreum*, *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella baltica*, *Serratia proteamaculans*, *Hafnia alvei*, *Lactobacillus sakei*) y de un conocido patógeno psicrófilo (*Listeria monocytogenes*); dicho estudio no detectó producción de aminas biógenas, ni de olores extraños, asociados a la referida acción antimicrobiana de *Aerococcus viridans* (Wiernasz, y otros, 2017).

En virtud de lo cual, y a la vista de las abundancias relativas que se observan en las muestras tp_D (próximas al 100% en t_{75} y t_{105}) en el ensayo BAC_2 (Gráfico 22), acaso resultara fructífero profundizar en esta línea de investigación; a saber: aislar e identificar las especies de *Aerococcus* que componían las poblaciones de tales muestras presurizadas, determinar su tolerancia a tratamientos hiperbáricos, y analizar su posible virulencia, así como su capacidad de producir sustancias antimicrobianas con una potencial aplicación en la conservación alimentaria.

En cuanto a la escasa variación del pH de las muestras durante su almacenamiento refrigerado, dicho comportamiento es consistente con los resultados de otros estudios que, por el tipo de tratamientos aplicados, guardan cierta analogía con los ensayos que se han realizado en este trabajo. En el almacenamiento refrigerado durante 10 semanas de lomo de salmón SV se observó que su pH permanecía estable en torno a un valor de 6.3 (Díaz, Garrido, & Bañón, 2011). Un comportamiento similar presentó el pH de colas de langosta con tratamientos SV y HHP, manteniéndose relativamente constante alrededor de 6.5 durante 28 días de almacenamiento (Humaid, Nayyar, Bolton, Perkins, & Skonberg, 2020). Tras 12 semanas de estocaje refrigerado, el pH del curry de pescado en elaboración SV no experimentó variación significativa; permaneciendo siempre en valores próximos a 5.5 (Shakila, Raj, & Felix, 2012). Variación más considerable, sin embargo, experimentó el lomo de bonito SV, cuyo pH aumentó de 6 a 6.7 a lo largo de 6 semanas de almacenamiento (Mol, Özturan, & Cosansu, 2012).



6. CONCLUSIONES

Así como el sabio no ambicionará la vida más prolongada, sino la más intensa, tampoco escogerá el alimento más copioso, sino aquel que proporcione mayor deleite.

Epicuro de Samos (260 AC)

Se finaliza con una sucinta enumeración asertiva que pretende compendiar este trabajo:

- En el ensayo con judías verdes (JUD_1), la intensidad del tratamiento SV (90 °C, 1 h 45') permitió mantener las concentraciones de aerobios mesófilos totales por debajo del límite de detección durante 270 días de almacenamiento refrigerado. Una higienización adicional con HPP resulta superflua.

- En el ensayo preliminar de cordero (COR_1), la intensidad del tratamiento SV (67.5 °C, 8h) mantuvo las concentraciones de aerobios mesófilos totales por debajo del límite de detección durante 30 días de almacenamiento refrigerado; alcanzando 4.54 log UFC a fin de tiempo de muestreo (60 días). La aplicación de un tratamiento HPP (500 MPa, 24 °C, 8') adicional permitió que tales concentraciones continuaran bajo el umbral de detección hasta fin de ensayo (60 días).

- El segundo ensayo de cordero (**COR_2**), con mayor intensidad del tratamiento SV (65 °C, 24h) fue suficiente para que las concentraciones de aerobios mesófilos totales no rebasaran el límite de detección durante 270 días de almacenamiento refrigerado. También en este caso, la aplicación adicional de tratamientos HHP se evidenciaron innecesarios.

- En el ensayo preliminar con bacalao (**BAC_1**), con una temperatura de tratamiento SV (57.1 °C, 30') por debajo del umbral térmico de seguridad, se detectó proliferación microbiana (aerobios mesófilos) entre los 14 y 30 días de almacenamiento refrigerado; con una concentración superior a 5 log UFC en t_{45} . La aplicación adicional de un tratamiento HHP (500 MPa, 24 °C, 8') permitió que la concentración de aerobios mesófilos totales permaneciera bajo los límites de detección durante 45 días de almacenamiento en refrigeración.

- El segundo ensayo con bacalao (**BAC_2**), de menor intensidad SV (52 °C, 20') que el caso precedente, evidenció una importante reducción de su capacidad higienizante; detectándose crecimiento microbiano desde los primeros días de almacenamiento refrigerado. La aplicación adicional de tratamientos hiperbáricos con parametrizaciones diferentes: presión efectiva (300 o 600 MPa), temperatura de la cámara de presurización (22 o 50 °C) y tiempo de retención (4 u 8'), mostró una eficacia variable según intensidad del tratamiento. Sólo los tratamientos HHP a 600 MPa permitieron un almacenamiento refrigerado superior a 30 días (en términos de vida útil).

La combinación que ofreció mejores resultados microbiológicos fue, como era presumible, aquella que maximizaba cada uno de los parámetros de tratamiento de presurización: 600 MPa, 50 °C, 8'.

- En cuanto a la influencia relativa de estos parámetros (P, T, t) sobre la eficacia higienizante del tratamiento, se constató que la reducción del tiempo de retención (t) tuvo

menor trascendencia en la inhibición microbiana que disminución de la temperatura de la cámara (T).

- En el estudio de diversidad bacteriana realizado en el ensayo [BAC_2](#) se comprobó que *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*) fue el grupo predominante en las muestras SV (control). Produciéndose durante el almacenamiento una sucesión microbiana de las familias *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*) y *Enterobacteriaceae*.

Firmicutes (*Bacillota*) estuvo representado, principalmente, por *Anoxybacillus* en las etapas iniciales, y por *Carnobacterium* en las etapas finales.

En las muestras con presurización adicional se observan diferencias considerables respecto al control no presurizado. Tales diferencias resultan más acusadas a partir del día 30 de almacenamiento; siendo *Firmicutes* (*Bacillota*) el grupo predominante en la mayoría de los casos, con *Aerococcus* y *Enterococcus* como géneros principales (según tratamiento HPP aplicado).

Resultados que contribuyen a una mejor comprensión de la influencia de los distintos tratamientos sobre la microbiota alterante que se desarrolla durante la etapa de almacenamiento; microbiota que, en definitiva, condiciona la vida útil del producto final.

- En cuanto a la seguridad de la cocción SV, se podría afirmar que se trata de una técnica bastante segura siempre que la intensidad del tratamiento entrañe cierto grado de pasteurización del producto (cocciones indirectas). Así se ha evidenciado en los ensayos realizados con judías y cordero.

Sin embargo, a medida que decrece la intensidad del tratamiento SV la seguridad del alimento se precariza hasta convertirse en un azar de peligrosidad creciente. Prueba de ello se tiene en el control del ensayo [BAC_2](#) (52 °C, 20'): una materia prima de aceptable frescura, una cuidadosa preelaboración, y una cocción SV bastante por debajo del umbral

térmico de seguridad, dieron como resultado un producto con una concentración de enterobacterias en t_0 muy próxima a la inaceptabilidad microbiológica.

- Dado que las materias primas empleadas habitualmente en cocción directa SV (pescados y mariscos frescos) son muy perecederas y poseen un coste elevado, a la vista de los resultados, se considera una opción factible el almacenamiento refrigerado de este tipo de elaboraciones cuando se conjugan con un tratamiento HHP.

En tal caso, la regeneración térmica del producto tendría que llevarse a cabo a una temperatura igual, o ligeramente inferior, a la del tratamiento SV inicial.



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Con la despensa llena... presto se guisa la cena.

Sancho Panza (1605)

- Abriouel, H., Franz, C. M., Ben Omar, N., & Gálvez del Postigo Ruiz, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201-232. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
- ACHIPIA. (2018). *Shigella* spp. Ficha de peligros nº 9. Soporte al análisis de riesgo, Agencia chilena para la inocuidad y calidad alimentaria (ACHIPIA). Obtenido de <https://www.achipia.gob.cl/inicio/prensa-y-publicaciones/evaluaciones-de-riesgo/>
- ACSA & UAB. (2021). Peligro biológico: *Salmonella* spp. Mapa de peligros alimentarios. Agència catalana de seguretat alimentària (ACSA) & Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Obtenido de <https://mapaperills.uab.cat/cat/index.php#>
- Afzal, M. I., Jacquet, T., Delaunay, S., Frédéric, B., Millière, J.-B., Revol-Junelles, A. M., & Cailliez-Grimal, C. (2010). *Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiology*, 27(5), 573-579. doi:10.1016/j.fm.2010.03.019
- Ahmed, J., & Ramaswamy, H. S. (2007). Microwave pasteurization and sterilization of foods. En S. M. Rahman (Ed.), *Handbook of Food Preservation* (págs. 691–712). Boca Ratón: CRC Press. ISBN: 9781574446067.
- Alfaro, B., & Hernández, Í. (2013). Evolution of the indigenous microbiota in modified atmosphere packaged atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) identified by conventional and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 117–123. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.017
- Alsan, M., & Klompas, M. (2010). *Acinetobacter baumannii*: an emerging and important pathogen. *Journal of Clinical Outcomes Management*, 17(8), 363-369. PMID: 26966345
- Altuntas, J., Evrendilek, G. A., Sangun, M. K., & Zhang, H. Q. (2010). Effects of pulsed electric field processing on the quality and microbial inactivation of sour cherry juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 899-905. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02213.x
- Alvarado, J., Martínez, G., Navarrete, J., Botello, E., Calderón, M., & Jiménez, H. (2009). Fenomenología de la esterilización de alimentos líquidos enlatados. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 50, 87-98. ISSN: 2422-2844.

- Álvarez-Hernández, N. E., Díaz-Flores, M., & Ortiz-Reynoso, M. (2015). Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Revista de Medicina e Investigación*, 3(2), 129-133. doi:10.1016/j.mei.2015.07.002
- Alvis, A., Cortés, L. E., & Páez, M. (2009). Transferencia de calor y materia durante la fritura de trozos de ñame (*Dioscúrea alata*). *Información Tecnológica*, 20(1), 99-109. doi:10.4067/S0718-07642009000100012
- Amoroso, L., Rizzo, V., & Muratore, G. (2019). Nutritional values of potato slices added with rosemary essential oil cooked in sous vide bags. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 15, 1–5. doi:10.1016/j.ijgfs.2018.11.007
- Ares-Pernas, A. (2006). *Estudio de las propiedades barrera de filmes basados en polipropileno y copolímero de etileno y alcohol vinílico*. (Tesis doctoral). Universidade da Coruña, España. ISBN: 978-84-692-8230-4. Obtenido de <http://hdl.handle.net/2183/848>
- Armstrong, G. A. (2000). Sous-vide products. En D. Kilcast, & P. Subramaniam (Edits.), *The stability and shelf life of food* (págs. 171–196). Cambridge, England: Woodhead Publishing. ISBN: 978-0081004357
- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. (J. F. García Reyes, Universidad de Jaén, Ed.) *Boletín GRASEQA (Grupo Regional Andaluz Sociedad Española de Química Analítica). Seguridad Alimentaria*, 7, 16-31. ISSN: 2254-1241.
- Ascorbe Landa, C. (2018). Alimentos y gastronomía de cercanía: ¿un valor en alza? *Nutrición Hospitalaria (versión online)*, 35(esp. 4), 44-48. ISSN: 1699-5198. doi:10.20960/nh.2124
- Augusto, P. E., Pinheiro, T. F., Tribst, A. A., & Cristianini, M. (2009). Evaluation of methodologies for mathematical modeling of packaged conductive foods heat process. *International Journal of Food Engineering*, 5(4), 1-15. doi:10.2202/1556-3758.1458
- Ayub, H., & Ahmad, A. (2019). Physiochemical changes in sous-vide and conventionally cooked meat. *International Journal of Gastronomy and Food Science. Advance online publication*. doi:10.1016/j.ijgfs.2019.100145
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C., & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 239-250. doi:10.1016/S0168-1605(03)00067-9
- Bajovic, B., Bolumar, T., & Heinz, V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Science*, 92, 280-290. doi:10.1016/j.meatsci.2012.04.024
- Balakrishna, A. K., Wazed, M. A., & Farid, M. (2020). A review on the effect of high pressure processing (HPP) on gelatinization and infusion of nutrients. *Molecules*, 25(10), 1-19. doi:10.3390/molecules25102369
- Balasubramaniam, V. M., Barbosa-Cánovas, G. V., & Lelieveld, H. L. (2016). High-pressure processing equipment for the food industry. En V. Balasubramaniam, G. Barbosa-Cánovas, & H. Lelieveld (Edits.), *High pressure processing of food. Food Engineering Series* (págs. 39-65). New York: Springer science. ISBN: 978-1-4939-3233-7.
- Balasubramaniam, V. M., Martínez-Monteagudo, S. I., & Gupta, R. (2015). Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 435-462. doi:10.1146/annurev-food-022814-015539
- Baldwin, D. (2012). Sous vide cooking: a review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1, 15-30. doi:10.1016/j.ijgfs.2011.11.002

- Barakat, R. K., Griffiths, M. W., & Harris, L. J. (2000). Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 83-94. doi:10.1016/S0168-1605(00)00381-0
- Barbut, S. (2016). *Poultry products processing: an industry guide*. Chapter 9, pp. 249-288. Boca Ratón: CRC Press. ISBN: 9781420031744.
- Bárdos, L., & Baránková, H. (2010). Cold atmospheric plasma: sources, processes, and applications. *Thin Solid Films*, 518(23), 6705-6713. doi:10.1016/j.tsf.2010.07.044
- Barham, P., Skibsted, L. H., Bredie, W. L., Frøst, M. B., Møller, P., Risbo, J., & Mortensen, L. M. (2010). Molecular gastronomy: a new emerging scientific discipline. *Chemical Reviews*, 110(4), 2313-2365. doi:10.1021/cr900105w
- Baylis, C. L. (2006). *Enterobacteriaceae*. En C. W. Blackburn (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (págs. 624-667). Woodhead Publishing. ISBN: 9781855739666.
- Berbel-Pineda, J. M., Palacios-Florencio, B., Ramírez-Hurtado, J. M., & Santos-Roldán, L. (2019). Gastronomic experience as a factor of motivation in the tourist movements. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 18. doi:10.1016/j.ijgfs.2019.100171
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Mason, S. L., & Bekhit, A. A. (2020). Sous-vide cooking improves the quality and invitro digestibility of semitendinosus from culled dairy cows. *Food Research International*, 127, 108708. doi:10.1016/j.foodres.2019.108708
- Bianchi, G., Garibotto, G., Franco, J., Ballesteros, F., Feed, O. D., & Betancur, O. (2008). Calidad de canal y carne de cordero: su medición y factores involucrados. *XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 136-149. Biblioteca digital veterinaria. Obtenido de <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/handle/123456789/98>
- Björkroth, J. (2010). *Leuconostoc gasicomitatum*, un organismo deteriorante específico. En Universidad de Burgos, & Instituto Tomás Pascual Sanz (Edits.), *Nuevas Tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos* (págs. 27-33). Madrid: IMC. ISBN: 978-84-92681-14-3.
- Bolumar, T., Middendorf, D., Toepfl, S., & Heinz, V. (2016). Estructural changes in foods caused by high-pressure processing. En V. Balasubramaniam, G. Barbosa-Cánovas, & H. Lelieveld (Edits.), *High pressure processing of food. Food engineering series* (págs. 509-537). New York: Springer science. ISBN: 978-1-4939-3233-7.
- Bouëtard, J., & Santos Hernández, J. J. (2009). *La línea fría completa. Organización de cocinas centrales*. Salamanca: Innova Concept Ingeniería. ISBN: 987-84-613-4707-0.
- Bowman, J. P. (2006). The genus psychrobacter. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Edits.), *The prokaryotes* (Vol. 6. Proteobacteria: Gamma subclass, págs. 920–930). New York: Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_35
- Bremer, P., Seale, B., Flint, S., & Palmer, J. (2009). Biofilms in dairy processing. En *Biofilms in the food and beverage industries* (págs. 396-431). Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition: Woodhead Publishing. doi:10.1533/9781845697167.4.396
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M., & Leroi, F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), 309-324. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.012
- Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F., & Vlaemynck, G. (2011). Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiology*, 28(6), 1162-1169. doi:10.1016/j.fm.2011.03.009



- Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F., & Vlaemynck, G. (2013). Molecular identification of the microbiota of peeled and unpeeled brown shrimp (*Crangon crangon*) during storage on ice and at 7.5 °C. *Food Microbiology*, 36(2), 123-134. doi:10.1016/j.fm.2013.04.009
- Broekaert, K., Nosedá, B., Heyndrickx, M., Vlaemynck, G., & Devlieghere, F. (2013). Volatile compounds associated with *Psychrobacter* spp. and *Pseudoalteromonas* spp., the dominant microbiota of brown shrimp (*Crangon crangon*) during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 487-493. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.013
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869
- Calliauw, F., De Mulder, T., Broekaert, K., Vlaemynck, G., Michiels, C., & Heyndrick, M. (2016). Assessment throughout a whole fishing year of the dominant microbiota of peeled brown shrimp (*Crangon crangon*) stored for 7 days under modified atmosphere packaging at 4 °C without preservatives. *Food Microbiology*, 54, 60-71. doi:10.1016/j.fm.2015.10.016
- Camargo Knirsch, M., Alves dos Santos, C., Martins de Oliveira, A. A., & Vessoni Penna, T. C. (2010). Ohmic heating: a review. *Food Science & Technology*, 21, 436-441. doi:10.1016/j.tifs.2010.06.003
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_1), 4516–4522. doi:10.1073/pnas.1000080107
- Caracuel García, Á. M. (2008). Técnicas de cocción saludables aplicables a la alimentación mediterránea. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 21, 171-180. ISSN: 1130-2534. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3327141>
- Cárdenas-Mazón, N., Cevallos-Hermida, C., Salazar-Yacelga, J., Romero-Machado, E., Gallegos-Murillo, P., & Cáceres-Mena, M. (2018). Uso de pruebas afectivas, discriminatorias y descriptivas de evaluación sensorial en el campo gastronómico. *Dominio de las Ciencias*, 4(3), 253-263. doi:10.23857/dc.v4i3.807
- Casaburi, A., Di Martino, V., Ercolini, D., & Villani, F. (2015). Antimicrobial activity of *Myrtus communis* L. water-ethanol extract against meat spoilage strains of *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fragi* in vitro and in meat. *Annals of Microbiology*, 65(2), 841-850. doi:10.1007/s13213-014-0925-9
- CCAES. (2013). Informe de situación y evaluación del riesgo de la turaemia en España. Centro de coordinación de alertas y emergencias sanitarias. Madrid: Dirección general de salud pública y sanidad exterior. Ministerio de sanidad. Obtenido de <https://www.msbs.gob.es/ca/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/infoSitua.htm>
- Cetinkaya, E., Joseph, S., Ayhan, K., & Forsythe, S. J. (2013). Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. *Molecular and Cellular Probes*, 27(1), 60–64. doi:10.1016/j.mcp.2012.10.003
- Chakraborty, S., Kaushik, N., Rao, P. S., & Mishra, H. N. (2014). High-pressure inactivation of enzymes: a review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 578-596. doi:10.1111/1541-4337.12071
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., & Basak, T. (2013). Microwave food processing—A review. *Food Research International*, 52, 243–261. doi:10.1016/j.foodres.2013.02.033

- Christensen, I., Gunvig, A., Tørrngren, M. A., Aaslyng, M. D., Knøchel, S., & Christensen, M. (2012). Sensory characteristics of meat cooked for prolonged times at low temperature. *Meat Science*, 90(2), 485-489. doi:10.1016/j.meatsci.2011.09.012
- Christensen, L., Ertbjerg, P., Løje, H., Risbo, J., van den Berg, F. W., & Christensen, M. (2013). Relationship between meat toughness and properties of connective tissue from cows and young bulls heat treated at low temperatures for prolonged times. *Meat Science*, 93(4), 787-795. doi:10.1016/j.meatsci.2012.12.001
- Churchill, R., Lee, H., & Hall, J. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods*, 64(2), 141-170. doi:10.1016/j.mimet.2005.10.007
- CNE: Instituto de salud Carlos III. (2013). Protocolos de la red nacional de vigilancia epidemiológica. En Centro nacional de epidemiología (CNE) (Ed.). Madrid: Red nacional de vigilancia epidemiológica. NIPO: 725-14-01-05.
- Condalab. (2021a). Agar Baird Parker. Catálogo Condalab: Ficha Técnica. Obtenido de <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1793-14890-base-de-agar-baird-parker-iso.html>
- Condalab. (2021b). Suplemento emulsión de yema de huevo y telurito. Catálogo Condalab: Ficha Técnica. Obtenido de <https://www.condalab.com/int/es/suplementos/1772-14891-emulsion-yema-de-huevo-telurito.html>
- Condón, S., Mañas, P., & Cebrián, G. (2011). Manothermosonication for microbial inactivation. En H. Feng, G. Barbosa-Canovas, & J. Weiss (Edits.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing. Food Engineering Series* (págs. 287-319). New York: Springer Science. ISBN: 978-1-4419-7471-6.
- Coronel, P., Simunovic, J., Sandeep, K. P., & Kumar, P. (2008). Dielectric properties of pumpable food materials at 915 MHz. *International Journal of Food Properties*, 11(3), 508-518. doi:10.1080/10942910701472755
- Cortés-Sánchez, A., Díaz-Ramírez, M., & Salgado-Cruz, M. (2017). *Bacillus cereus*: Alimentos, salud y biotecnología. *Agroproductividad*, 10(10), 3-9. ISSN: 2448-7546.
- Czarnowska-Kujawska, M., Draszanowska, A., Chróst, M., & Starowicz, M. (2023). The effect of sous-vide processing time on chemical and sensory properties of broccoli, green beans and beetroots. *Applied Sciences*, 13, 4086. doi:10.3390/app13074086
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., & Leisner, J. J. (2003). Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), 80-89. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01806.x
- Daryaei, H., Yousef, A. E., & Balasubramaniam, V. M. (2016). Microbiological aspects of high-pressure processing of food: inactivation of microbial vegetative cells and spores. En V. Balasubramaniam, G. Barbosa-Cánovas, & H. Lelieveld (Edits.), *High pressure processing of food. Food Engineering Series* (págs. 271-294). New York: Springer science. ISBN: 978-1-4939-3233-7.
- Das, I., & Das, S. K. (2014). Infrared in food preservation and processing. En S. Bhattacharya (Ed.), *Conventional and advanced food processing technologies* (págs. 471-500). Hoboken: John Wiley & sons. ISBN: 9781118406328.
- De Filippis, F., Pennacchia, C., Di Pasqua, R., Fiore, A., Fogliano, V., Villani, F., & Ercolini, D. (2013). Decarboxylase gene expression and cadaverine and putrescine production by *Serratia proteamaculans* in vitro and in beef. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 332-338. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.021

- Dekic, S., Jasna, H., Van Wilpe, E., Venter, C., & Goic-Barisic, I. (2019). Survival of emerging pathogen *Acinetobacter baumannii* in water environment exposed to different oxygen conditions. *Water Science and Technology*, 80(8), 1581–1590. doi:10.2166/wst.2019.408
- Del Olmo, A., Picón, A., & Núñez, M. (2020). Preservation of five edible seaweeds by high pressure processing: effect on microbiota, shelf life, colour, texture and antioxidant capacity. *Algal Research*, 49(1), 1-8. doi:10.1016/j.algal.2020.101938
- Del Valle, A. (2016). Südpack. Materiales poliméricos flexibles y rígidos empleados en el envasado de alimentos. *Guía envase*. (Centro tecnológico Ainia, Ed.) Obtenido de <http://envases-barrera.guiaenvase.com/articulos-packaging-innovacion/>
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., & Janssens, D. (1994). Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques. En H. Roissart, & F. M. Luquet (Edits.), *Bacteries Lactiques* (pág. 25e116). Loriga, Uriage, France. ISBN: 978-2-294-02131-2
- Di Clemente, E., Hernández Mogollón, J. M., & López-Guzmán, T. (2014). La gastronomía como patrimonio cultural y motor del desarrollo turístico: Un análisis DAFO para Extremadura. *Tejuelo: Didáctica de la Lengua y la Literatura. Educación*, 9(Extra: I Congreso internacional sobre educación y socialización del patrimonio en el medio rural), 817-833. ISSN-e: 1988-8430. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5385975>
- Di Pillo, F., & Sotomayor, G. (2017). *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en carne de aves de corral. *Perfil de riesgo. Agencia chilena para la inocuidad y calidad alimentaria (ACHIPIA)*, 1(1), 1-88. Obtenido de <https://www.achipia.gob.cl/inicio/prensa-y-publicaciones/evaluaciones-de-riesgo/>
- Díaz, P., Garrido, M. D., & Bañón, S. (2011). Spoilage of sous vide cooked salmon (*Salmo salar*) stored under refrigeration. *Food Science and Technology International*, 17(1), 31-37. doi:10.1177/1082013210368744
- Didimo Imazaki, P. H., Tahiri, A., Baptista Rodrigues, A. L., Taminiau, B., Nezer, C., Daube, G., & Clinquart, A. (2012). Viandes bovines à longue durée de conservation conditionnées sous vide: isolement et caractérisation de souches de *Carnobacterium*. *14èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes*. Caen, France. <https://hdl.handle.net/2268/136766>
- Dielh, J. F. (2002). Food irradiation: past, present and future. *Radiation Physics and Chemistry*, 63(3-6), 211-215. doi:10.1016/S0969-806X(01)00622-3
- Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria (Comisión Europea). (2018). *Documento de orientación sobre la aplicación de determinadas disposiciones del Reglamento (CE) nº 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios*. Obtenido de https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_legis_guidance_reg-2004-852_es.pdf
- Dodge, A. G., Richman, J. E., Johnson, G., & Wackett, L. P. (2006). Metabolism of thioamides by *Ralstonia pickettii* TA. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7468–7476. doi:10.1128/AEM.01421-06
- Dolas, R., Saravanan, C., & Pal Kaur, B. (2019). Emergence and era of ultrasonic's in fruit juice preservation: a review. *Ultrasonics Sonochemistry. Advance online publication*, 58. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.05.026
- Domínguez-Hernández, E., Salaseviciene, A., & Erthbjerg, P. (2018). Low-temperature long-time cooking of meat: Eating quality and underlying mechanisms. *Meat Science*, 143, 104-113. doi:10.1016/j.meatsci.2018.04.032
- Dorronsoro, I., & Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(supl.2), 67-85. ISSN: 1137-6627.

- Drosinos, E. H., & Nychas, G. E. (1996). *Brochothrix thermosphacta*, a dominant microorganism in Mediterranean fresh fish (*Sparus aurata*) stored under modified atmosphere. *Italian Journal of Food Science*, 8, 323-329. ISSN: 1120-1770 .
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., & Boyaval, P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection*, 62, 1394 e1403.
- EFSA & ECDC. (2021). The European Union one health 2019 zoonoses report. *EFSA Journal. European food safety authority and european centre for disease prevention and control*, 19(2), 1-286. doi:10.2903/j.efsa.2021.6406
- EFSA. (2005). *Clostridium* spp in foodstuffs. *EFSA journal. Scientific opinion. Panel on biological hazards (BIOHAZ)*, 199(1), 1-65. doi:10.2903/j.efsa.2005.199
- EFSA. (2010). Scientific opinion on Q fever. *EFSA journal. Scientific opinion. Panel on biological hazards (BIOHAZ)*, 8(5), 1-114. doi:10.2903/j.efsa.2010.1595
- EFSA. (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA journal. Scientific opinion. Panel on biological hazards (BIOHAZ)*, 14(7), 1-93. doi:10.2903/j.efsa.2016.4524
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9(873). doi:10.3389/fmicb.2018.00873
- Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., von Woedtke, T., Brandenburg, R., & Weltmann, K. (2011). Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(1), 1-18. doi:10.1088/0022-3727/44/1/013002
- ELIKA. (2013). *Yersinia enterocolitica*. Fichas de peligros biológicos. Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria (ELIKA). Obtenido de http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento97/9.Yersinia.pdf
- Elizaquível, P., Sánchez, G., & Aznar, R. (2012). Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25, Issue 2, 704-708. doi:10.1016/j.foodcont.2011.12.003
- Erdoğan, F., Uyar, R., & Palazoğlu, T. K. (2010). Experimental comparison of natural convection and conduction heat transfer. *Journal of Food Process Engineering*, 33(s1), 85-100. doi:10.1111/j.1745-4530.2008.00309.x
- Escobar Hernández, A., Márquez Cardozo, C. J., Restrepo Flores, C. E., Cano Salazar, J. A., & Patiño Gómez, J. H. (2014). Aplicación de tratamiento térmico, recubrimiento comestible y baño químico como tratamientos poscosecha para la conservación de hortalizas mínimamente procesadas. *Agroindustria*, 63(1), págs. 1-12. doi:10.15446/acag.v63n1.40149
- Escoffier, G. A. (1989). *Mi cocina*. Barcelona: Garriga. ISBN: 84-7079-101-X.
- Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición hospitalaria*, 21(2), 61-72. ISSN: 1699-5198.
- Fall, P. A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., & Pilet, M. (2010). Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 357-361. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02801.x
- Fall, P. A., Pilet, M. F., Leduc, F., Cardinal, M., Duflos, G., Guérin, C., & Leroi, F. (2012). Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 82-90. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.015



- Falowo, A. B., Muchenje, V., & Hugo, A. (2017). Effect of sous-vide technique on fatty acid and mineral compositions of beef and liver from Bonsmara and non-descript cattle. *Annals of Animal Science*, 17(2), 565-580. doi:10.1515/aoas-2016-0078
- Farkas, J. (2007). Physical methods of food preservation. En L. R. Beuchat, & M. P. Doyle (Edits.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (3ª ed., págs. 685–712.). Washington DC: ASM Press. ISBN: 9781555814076.
- Fernández-Molina, J. J., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (2001). Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor. *Arbor*, 168(661), 155-170. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. doi:10.3989/arbor.2001.i661
- Ferrari, A. (2017). Fluid dynamics of acoustic and hydrodynamic cavitation in hydraulic power systems. *Proceedings of the Royal Society. Mathematical, Physical and Engineering Science*, 473(2199), 1-32. doi:10.1098/rspa.2016.0345
- Fidan, H., Esatbeyoglu, T., Simat, V., Trif, M., Tabanelli, G., Kostka, T., & Özogul, F. (2022). Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps. *Food Bioscience*. 47,101741. doi:10.1016/j.fbio.2022.101741
- Figge, M. J., Cleenwerck, I., van Uijen, A., De Vos, P., Huys, G., & Robertson, L. (2014). *Photobacterium piscicola* sp. nov., isolated from marine fish and spoiled packed cod. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(5), 329-335. doi:10.1016/j.syapm.2014.05.003
- Filténborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 85-102. doi:10.1016/0168-1605(96)01153-1
- Flodgaard, L. R., Dalgaard, P., Andersen, J. B., Nielsen, K. F., Givskov, M., & Gram, L. (2005). Nonbioluminescent strains of *Photobacterium phosphoreum* produce the cell-to-cell communication signal N-(3-Hydroxyoctanoyl)homoserine lactone. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2113-2120. doi:10.1128/AEM.71.4.2113-2120.2005
- Florkiewicz, A., Socha, R., Filipiak-Florkiewicz, A., & Topolska, K. (2018). Sous-vide technique as an alternative to traditional cooking methods in the context of antioxidant properties of Brassica vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 173–182. doi:10.1002/jsfa.9158
- Françoise, L. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27(6), 698-709. doi:10.1016/j.fm.2010.05.016
- Franzetti, L., Scarpellini, M., Mora, M., & Galli, A. (2003). *Carnobacterium* spp. in seafood packaged in modified atmosphere. *Annals of Microbiology*, 53(2), 189-198. ISSN: 1590-4261.
- Freer, E., & Castro-Arce, R. (2001). *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 22(1-2), 73-82. ISSN: 0253-2948.
- Fusté-Forné, F. (2016). Los paisajes de la cultura: la gastronomía y el patrimonio culinario. *Dixit*, 1(24), 4-16. ISSN: 0797-3691. Obtenido de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0797-36912016000100001&lng=es&tlng=es
- Gálvez del Postigo Ruiz, A., Abriouel, H., Lucas López, R., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001
- Gao, S., Lewis, G., & Hemar, Y. (2016). Ultrasonic inactivation of microorganisms. En M. Ronnier Luo (Ed.), *Encyclopedia of color science and technology. Handbook of ultrasonics and sonochemistry*. Singapore: Springer Reference. ISBN: 978-981-287-277-7.

- Garcés-Rimón, M., Sandoval, M., Molina, E., López-Fandiño, R., & Miguel, M. (2016). Egg protein hydrolysates: New culinary textures. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 3, 17–22. doi:10.1016/j.ijgfs.2015.04.001
- García Iglesias, E., Gago Cabezas, L., & Fernández Nuevo, J. L. (2006). Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. *Informe de vigilancia tecnológica*, 3. Fundación para el conocimiento madri+d, Consejería de ciencia, universidades e investigación de la comunidad de Madrid. Obtenido de <https://www.madrimasd.org/fundacion/publicaciones-madrid/informes-vigilancia-tecnologica>
- García-Masedo Fernández, S., García, J., Sáez-Nieto, J. A., & Orden, B. (2019). Bacteriemia nosocomial por *Cupriavidus pauculus* en paciente con colitis ulcerosa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(10), 677-678. doi:10.1016/j.eimc.2018.09.011
- García-Mosqueda, C. B., Cerón-García, A., Salas Araiza, M. D., & Sosa-Morales, M. E. (2016). Uso de radiofrecuencia como alternativa eficaz para la desinfestación postcosecha: una revisión para alimentos secos. *Vitae*, 23(1), 46-50. Universidad de Antioquia. e-ISSN: 21452660.
- García-Segovia, P., Andrés-Bello, A., & Martínez-Monzó, J. (2008). Textural properties of potatoes (*Solanum tuberosum* L., cv. Monalisa) as affected by different cooking processes. *Journal of Food Engineering*, 88(1), 28–35. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.12.001
- Gayán, E., Torres, J., & Paredes-Sabya, D. (2012). Hurdle approach to increase the microbial inactivation by high pressure processing: effect of essential oils. *Food Engineering Reviews*, 4(3), 141–148. doi:10.1007/s12393-012-9055-y
- Gennadios, A., Hanna, M. A., & Kurth, L. B. (1997). Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 30(4), 337-350. doi:10.1006/fstl.1996.0202
- Gerlach, D., Alleborn, N., Baars, A., Delgado, a., Delgado, A., Moritz, J., & Knorr, D. (2008). Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 408-417. doi:10.1016/j.ifset.2008.02.001
- Ghafoor, K., Gavahian, M., Marszałek, K., Barba, F. J., Xia, Q., & Denoya, G. I. (2020). An overview of the potential applications based on HPP mechanism. En F. J. Barba, C. Tonello-Samson, E. Puértolas, & M. Lavilla (Edits.), *Present and future of high pressure processing* (págs. 3-11). Elsevier. ISBN: 9780128164051
- Ghanbari, M., & Jami, M. (2013). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: a promising approach to seafood biopreservation. En M. Kongo (Ed.), *Lactic acid bacteria. R & D for food, health and livestock purposes. Selection of Lactobacillus species from intestinal microbiota of fish for their potential use as biopreservatives* (págs. 381-404). InTech Publication. doi:10.5772/50705
- Gomes da Silva, M. F., Machado Sousa, P. H., Figueiredo, R. W., Gouveia, S. T., & Severino Lima, J. S. (2019). Cooking effects on bioactive compounds and sensory acceptability in pumpkin (*Cucurbita moschata* cv. Leite). *Revista Ciencia Agronomica*, 50, 394–401. doi:10.5935/1806-6690.20190047
- Gómez, B., Munekata, P. E., Barba, F. J., Pinto, C. A., Saraiva, J. A., & Lorenzo, J. M. (2021). Influence of high-pressure processing on the nutritional changes of treated foods. En K. Knoerzer, & K. Muthukumarappan (Edits.), *Innovative food processing technologies: a comprehensive review* (Vol. 1, págs. 74-86). Elsevier. ISBN: 9780128157824.
- Gómez, M., Ábalos, R., Lencina, M., Brossard, M., Aizaga, M., Correa, S., & Bello, F. (2019). Diseño de platos regionales listos para consumir optimizados en su perfil nutricional. *Ciencia, docencia y tecnología. Suplemento*, 9(9), 192-225. ISSN: 2250-4559.

- Gómez, P., Welti-Chanes, J. S., & Alzamora, S. M. (2011). Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 447-465. doi:10.1146/annurev-food-022510-133619
- Gonnella, M., Durante, M., Caretto, S., D'Imperio, M., & Renna, M. (2018). Quality assessment of ready-to-eat asparagus spears as affected by conventional and sous-vide cooking methods. *LWT-Food Science and Technology*, 92, 161-168. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.017
- González, C. J., Encinas, J. P., García-López, M. L., & Otero, A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17(4), 383-391. doi:10.1006/fmic.1999.0330
- González-Angulo, M., Serment-Moreno, V., Queirós, R. P., & Tonello-Samson, C. (2021). Food and beverage commercial applications of high pressure processing. En K. Knoerzer, & K. Muthukumarappan (Edits.), *Innovative food processing technologies: a comprehensive review* (Vol. 1, págs. 39-73). Elsevier. ISBN: 9780128157824.
- Gornik, S. G., Albalat, A., Macpherson, H., Birkbeck, H., & Neil, D. M. (2011). The effect of temperature on the bacterial load and microbial composition in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) tail meat during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 582-592. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05081.x
- Gornik, S. G., Albalat, A., Theethakaew, C., & Douglas, M. N. (2013). Shelf life extension of whole Norway lobster *Nephrops norvegicus* using modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 369-377. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.002
- Graham, A. F., Mason, D. R., Maxwell, F. J., & Peck, M. W. (1997). Effect of pH and NaCl on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* temperature. *Letters in Applied Microbiology*, 24(2), 95-100. doi:10.1046/j.1472-765x.1997.00348.x
- Gram, L. (1991). Inhibition of mesophilic spoilage *Aeromonas* spp. on fish by salt, potassium sorbate, liquid smoke, and chilling. *Journal of Food Protection*, 54(6), 436-442. doi:10.4315/0362-028X-54.6.436
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria: problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262-266. doi:10.1016/s0958-1669(02)00309-9
- Grande Burgos, M. J., Cobo Molinos, A., Gálvez del Postigo Ruiz, A., & Pérez Pulido, R. (2015). Mejora de la seguridad y la vida útil de alimentos de origen vegetal mediante métodos biológicos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 28, 179-192. ISSN: 1130-2534. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6282933>
- Grigelmo-Miguel, N., Soliva-Fortuny, R., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín-Belloso, O. (2011). Use of oscillating magnetic fields in food preservation. En H. Q. Zhang, G. V. Barbosa-Cánovas, V. M. Balasubramaniam, C. Patrick Dunne, D. F. Farkas, & J. T. Yuan (Edits.), *Nonthermal processing technologies for food* (págs. 222-235). Hoboken: Blackwell Publishing. ISBN: 9780813816685.
- Guamis López, B., & López Pedemonte, T. (2010). Homogenización a altas presiones: tecnología y aplicaciones. En Universidad de Burgos, & Instituto Tomás Pascual Sanz (Edits.), *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos* (págs. 81-91). Madrid: IMC. ISBN: 978-84-92681-14-3.
- Guerrero Legarreta, I., Rosmini Garma, M. R., & Armenta López, R. E. (2018). *Utilización de pescados y mariscos: Tecnologías e innovación*. Capítulo 1: Los componentes químicos de los productos pesqueros, pp. 11-12. Beau Bassin: Editorial Académica Española. ISBN: 9786202139588.
- Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International*, 10(3), 137-147. doi:10.1177/1082013204044359

- Guignon, B. (2011). Altas presiones en tecnología de alimentos. En *Materia a alta presión: fundamentos y aplicaciones* (págs. 441-457). Oviedo: Ediciones de la universidad de Oviedo. ISBN: 978-84-8317-877-5.
- Gurtler, J. B., Kornacki, J. D., & Beuchat, L. R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104(1), 1-34. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.013
- Hall, C. M., & Sharples, L. (2003). The consumption of experiences or the experience of consumption? An introduction to the tourism of taste. *Food tourism around the world: development, management and markets*, 1-24. doi:10.1016/B978-0-7506-5503-3.50004-X
- Hansen, A. A., Mørkøre, T., Rudi, K., Rødbotten, M., Bjerke, F., & Eie, T. (2009). Quality changes of prerigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) packaged in modified atmosphere using CO2 emitter, traditional MAP, and vacuum. *Journal of Food Science*, 74(6), 242-249. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01233.x
- Heinz, V., & Buckow, R. (2009). Food preservation by high pressure. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), 73–81. doi:10.1007/s00003-009-0311-x
- Heller, H. M., Tortora, G., & Burger, H. (1990). *Pseudomonas putrefaciens* bacteremia associated with shellfish contact. *American Journal of Medicine*, 88(1), 85-86. doi:10.1016/0002-9343(90)90139-5
- Hernández Alarcón, E. (2005). Evaluación sensorial. Bogotá: Centro nacional de medios para el aprendizaje. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Obtenido de <https://fliphtml5.com/wcjo/fziz/basic>
- Hernández-Domínguez, C., Hernández-Anguiano, A. M., Cháidez-Quiroz, C., Rendón-Sánchez, G., & Suslow, T. (2008). Detección de *Salmonella* y coliformes fecales en agua de uso agrícola para la producción de melón cantaloupe. *Agricultura Técnica en México*, 34(1), 75-84. ISSN: 0568-2517.
- Hijnen, W. A., Beerendonk, E. F., & Medema, G. J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research*, 40(1), 3-22. doi:10.1016/j.watres.2005.10.030.
- Hnosko, J., San Martín-González, M. F., & Clark, S. (2012). High-pressure processing inactivates *Listeria innocua* yet compromises queso fresco crumbling properties. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4851-4862. doi:10.3168/jds.2011-5028
- Hossan, M. r., Byun, D., & Dutta, P. (2010). Analysis of microwave heating for cylindrical shaped objects. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 53, 5129-5138. doi:10.1016/J.IJHEATMASS TRANSFER.2010.07.051
- Hosseini, S. V., Pero, M., Hoseinabadi, Z., Tahergorabi, R., Kazemzadeh, S., Santos Alemán, R., & Feas Sanchez, X. (2023). Sous-vide processing of silver carp: Effect of processing temperature and cold storage duration on the microbial quality of the product as well as modeling by artificial neural networks. *PLoS ONE*, 18(3). doi:10.1371/journal.pone.02467
- Humaid, S., Nayyar, D., Bolton, J., Perkins, B., & Skonberg, D. I. (2020). Refrigerated shelf-life evaluation of high pressure processed, raw and sous vide cooked lobster. *High Pressure Research*, 40:3, 444-463. doi:10.1080/08957959.2020.1774753
- Huss, H. H., Jeppesen, V. F., Johansen, C., & Gram, L. (1995). Biopreservation of fish products e a review of recent approaches and results. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4, 5-26. doi:10.1300/J030v04n02_02
- Ibarra, J. P., Teixeira, A., Simpson, R., Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2013). Addition of fish protein hydrolysate for enhanced water retention in sous vide processing of salmon. *Journal of Food Processing and Technology*, 4(7), 1-7. doi:10.4172/2157-7110.1000241

- Iborra-Bernad, C., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2015). Physico-chemical and structural characteristics of vegetables cooked under sous-vide, cook-vide, and conventional boiling. *Journal of Food Science*, 80(8), e1725–e1734. doi:10.1111/1750-3841.12950
- Iborra-Bernad, C., Tárrega, A., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2014). Comparison of vacuum treatments and traditional cooking using instrumental and sensory analysis. *Food Analytical Methods*, 7(2), 400-408. doi:10.1007/s12161-013-9638-0
- Içier, F., & Baysal, T. (2004). Dielectrical properties of food materials: factors affecting and industrial uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 465-471. doi:10.1080/10408690490886692
- Imai, T., Uemura, K., Ishida, N., Yoshizaki, S., & Noguchi, A. (1995). Ohmic heating of Japanese white radish *Rhaphanus sativus*. *International Journal of Food Science and Technology*, 30(4), 461–472. doi:10.1111/j.1365-2621.1995.tb01393.x
- Inguglia, E. S., Tiwari, B. K., Kerry, J. P., & Burgess, C. M. (2018). Effects of high intensity ultrasound on the inactivation profiles of *Escherichia coli* K12 and *Listeria innocua* with salt and salt replacers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48(1), 492-498. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.05.007
- INSST. (2012). *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*. *Databio: fichas de agentes biológicos*. Instituto nacional de seguridad y salud en el trabajo, Ministerio de trabajo y economía social. NIPO: 118-20-006-7.
- INSST. (2015). *Francisella tularensis*. *Databio: fichas de agentes biológicos*. Instituto nacional de seguridad y salud en el trabajo, 1-5. Ministerio de trabajo y economía social. NIPO: 118-20-006-7.
- Institut Paul Bocuse. (2015). *La escuela de la excelencia culinaria*. Barcelona: Larousse. ISBN: 978-84-16984-22-0.
- Instituto Nacional de Estadística. (2019). *España en cifras 2019*. INE. ISSN: 2255-0410. Obtenido de http://www.ine.es/prodyser/espa_cifras
- James, S., & James, C. (2014). Chapter 32 - Minimal Processing of Ready Meals. En D.-W. Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing* (second ed., págs. 599-612). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-411479-1.00032-2
- Jegadeeshwar, H., Vijay Shankar, S., Premkumar, J., & Ranganathan, T. V. (2017). A review on utilization of ozone in food preservation. En M. Shakila Banu, A. Reni, P. Suganya, & R. Sinthiya (Eds.), *Proceedings (chapter I)*. Department of food processing and engineering, Karunya University. Coimbatore, India: Garuda Graphics. ISBN: 9789380769875.
- Joffraud, J. J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J. S., Léon, S., Gigout, F., & Leroi, F. (2006). Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 51-61. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.014
- Joffraud, J. J., Leroi, F., Roy, C., & Berdagué, J. L. (2001). Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 66(3), 175-184. doi:10.1016/s0168-1605(00)00532-8
- Jørgensen, L. V., Huss, H. H., & Dalgaard, P. (2000). The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 920-934. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01196
- Karki, R., Bremer, P., Silcock, P., & Oey, I. (2022). Effect of sous vide processing on quality parameters of beef short ribs and optimisation of sous vide time and temperature using third-order multiple regression. *Food and Bioprocess Technology*, 15, 1629–1646. doi:10.1007/s11947-022-02849-6

- Karwe, M. V., Maldonado, J., & Mahadevan, S. (2014). High pressure processing: current status. En S. Bhattacharya (Ed.), *Conventional and advanced food processing technologies* (págs. 595–616). Hoboken: John Wiley & Sons. ISBN: 9781118406328.
- Kato, H. C., Lourenço, L. F., Araújo, E. A., Sousa, C. L., Peixoto Joele, M. R., & Ribeiro, S. C. (2016). Change in physical and chemical characteristics related to the binomial time-temperature used in sous pasteurization see Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(1), 224-232. doi:10.1590/1678-4162-8096
- Ke, X., Lu, M., Ye, X., Gao, F., Zhu, H., & Huang, Z. (2012). Recovery and pathogenicity analysis of *Aerococcus viridans* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in southwest of China. *Aquaculture*, 342–343, 18-23. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.02.012
- Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). The physical and chemical effects of ultrasound. En H. Feng, G. Barbosa-Canovas, & J. Weiss (Edits.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing. Food engineering series* (págs. 1–12). New York: Springer Science. ISBN: 978-1-4419-7471-6.
- Khanna, A., Khanna, M., & Aggarwal, A. (2013). *Serratia marcescens*- a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(2), 243-246. doi:10.7860/JCDR/2013/5010.2737
- Khouryieh, H. A. (2021). Novel and emerging technologies used by the US food processing industry. *Innovative Food Science & Emerging Technologies. Advance online publication*, 67. doi:10.1016/j.ifset.2020.102559
- Kilibarda, N., Brdar, I., Baltic, B., Markovic, V., Mahmutovic, H., Karabasil, N., & Stanisic, S. (2018). The safety and quality of sous vide food. *Meat Technology*, 59(1), 38-45. doi:10.18485/meattech.2018.59.1.5
- Kim, J.-G., Yousef, A. E., & Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62, 1071–1087. doi:10.4315/0362-028x-62.9.1071
- King, W., Siboni, N., Kahlke, T., Dove, M., O'Connor, W., Mahbub, K. R., & Labbate, M. (2020). Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the pacific oyster bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), 1-12. doi:10.1093/femsec/fiaa054
- Kivela, J., & Crotts, J. C. (2006). Tourism and gastronomy: gastronomy's influence on how tourists experience a destination. *Journal of Hospitality & Tourism Research*, 30(3), 345-377. doi:10.1177/1096348006286797
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1):e1. doi:10.1093/nar/gks808
- Kosewski, G., Górna, I., Boleśawska, I., Kowalówka, M., Więckowska, B., Główna, A. K., & Przysławski, J. (2018). Comparison of antioxidative properties of raw vegetables and thermally processed ones using the conventional and sous-vide methods. *Food Chemistry*, 240, 1092–1096. doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.048
- Kozempel, M., Cook, R. D., Scullen, O. J., & Annous, B. A. (2000). Development of a process for detecting nonthermal effects of microwave energy on microorganisms at low temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*, 24(4), 287-301. doi:10.1111/j.1745-4549.2000.tb00420.x
- Krishnamurthy, K., Khurana, H. K., Soojin, J., Irudayaraj, J., & Demirci, A. (2008). Infrared heating in food processing: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 2–13. doi:10.1111/j.1541-4337.2007.00024.x



- Kultur, G., Misra, N. N., Barba, F. J., Koubaa, M., Gökmen, V., & Alpas, H. (2018). Effect of high hydrostatic pressure on background microflora and furan formation in fruit purée based baby foods. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 985–991. doi:10.1007/s13197-017-3011-z
- Kuuliala, L., Al Hage, Y., Ioannidis, A., Sader, M., Kerckhof, F., Vanderroost, M., & Devlieghere, F. (2018). Microbiological, chemical and sensory spoilage analysis of raw Atlantic cod (*Gadus morhua*) stored under modified atmospheres. *Food Microbiology*, 70, 232-244. doi:10.1016/j.fm.2017.10.011
- Lagerstedt, Å., Lundström, K., & Lindahl, G. (2011). Influence of vacuum or high-oxygen modified atmosphere packaging on quality of beef *M. longissimus dorsi* steaks after different ageing times. *Meat Science*, 87, 101-106. doi:10.1016/j.meatsci.2010.08.010
- Lan, X., Wang, J., Bu, D., Shen, J., Zheng, N., & Sun, P. (2010). Effects of heating temperatures and addition of reconstituted milk on the heat indicators in milk. *Journal of Food Science*, 75(8), 653-658. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01802.x
- Larousse Gastronomique. (2015). *Larousse gastronomique en español*. Barcelona: Larousse. ISBN: 978-84-16368-43-3.
- Larrea-Murrell, J. A., Rojas-Badía, M. M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández, N. M., & Heydrich-Pérez, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(3), 24-34. ISSN: 0253-5688.
- Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., & Leisner, J. J. (2005). *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(2), 151-164. doi:10.1016/j.syapm.2004.12.001
- Laursen, B. G., Leisner, J. J., & Dalgaard, P. (2006). *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3604-3611. doi:10.1021/jf053017f
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: principles and practices* (2^a ed.). New York: Springer (Food science text series). e-ISBN: 978-1-4419-6488-5.
- Le Den, N. (1995). Conductance métrie indirect. Détection de gaz bactériens. Application au suivi de paramètres de croissance de *Schewwanella putrefaciens*. Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, France, Ph.D.
- Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D., & Dalgaard, P. (2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiol Reviews*, 31(5), 592-613. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x
- Leistner, L. (1994). Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation. *Journal of Food Engineering*, 22(1-4), 421-432. doi:10.1016/0260-8774(94)90044-2
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 181-186. doi:10.1016/s0168-1605(00)00161-6
- Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J. J., & Chevalier, F. (1996). Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold-smoked salmon. *International Journal of Food Science & Technology*, 31(6), 497-504. doi:10.1046/j.1365-2621.1996.00366.x
- Leroi, F., Joffraud, J. J., & Chevalier, F. (2000). Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5 degrees C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*, 63(4), 502-508. doi:10.4315/0362-028x-63.4.502

- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., & Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*, 39(1-2), 111-121. doi:10.1016/s0168-1605(97)00126-8
- Li, H., & Gänzle, M. (2016). Some like it hot: Heat resistance of *Escherichia coli* in food. *Frontiers in Microbiology*, 7(1763). doi:10.3389/fmicb.2016.01763
- Li, H., Mercer, R., Behr, J., Heinzlmeir, S., McMullen, L. M., Vogel, R. F., & Gänzle, M. G. (2020). Heat and pressure resistance in *Escherichia coli* relates to protein folding and aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 11(111). doi:10.3389/fmicb.2020.00111
- Liao, C. H. (2006). *Pseudomonas* and related genera. En C. W. Blackburn (Ed.), *Food spoilage microorganisms. Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition* (págs. 507-540). Woodhead Publishing. ISBN: 9781855739666.
- Lipiec, J., Janas, P., Barabasz, W., Pysz, M., & Pisulewski, P. (2005). Effects of oscillating magnetic field pulses on selected oat sprouts used for food purposes. *Acta Agrophysica*, 5(2), 357–365. Corpus ID: 73560190.
- Liu, B., Zhang, X., Bakken, L. R., Snipen, L., & Frostegård, Å. (2019). Rapid succession of actively transcribing denitrifier populations in agricultural soil during an anoxic spell. *Frontiers in Microbiology*, 9(3208). doi:10.3389/fmicb.2018.03208
- Llave, Y., Shibata-Ishiwatari, N., Watanabe, M., Fukuoka, M., Hamada-Sato, N., & Sakai, N. (2017). Analysis of the effects of thermal protein denaturation on the quality attributes of sous-vide cooked tuna. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13347. doi:10.1111/jfpp.13347
- López, M., Calvo, T., Prieto, M., Múgica-Vidal, R., Muro-Fraguas, I., Alba-Elías, F., & Alvarez-Ordóñez, A. (2019). A review on non-thermal atmospheric plasma for food preservation: mode of action, determinants of effectiveness, and applications. *Frontiers in Microbiology*, 2(10), 622 (1-21). doi:10.3389/fmicb.2019.00622
- Loureiro, V. (2000). Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*, 33(3), 247-256. doi:10.1016/s0963-9969(00)00044-2
- Luján Medina, G. A., Loredó Treviño, A., & Noe Aguilar, C. (2014). *Cronobacter sakazakii*: un patógeno emergente transmitido por alimentos. *Acta química mexicana. Revista científica de la universidad autónoma de Coahuila*, 6(12), 24-29. Obtenido de <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/?cat=9>
- Lv, X., Li, Y., Cui, T., Sun, M., Bai, F., Li, X., Li, J., & Yi, S. (2020). Bacterial community succession and volatile compound changes during fermentation of shrimp paste from chinese Jinzhou region. *LWT - Food Science and Technology*, 122, 108998. doi:10.1016/j.lwt.2019.108998
- Lyhs, U., Korkeala, H., Vandamme, P., & Björkroth, J. (2001). *Lactobacillus alimentarius*: a specific spoilage organism in marinated herring. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 355-360. doi:10.1016/s0168-1605(00)00486-4
- Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M. F., Dousset, X., & Joffraud, J.-J. (2012). Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. *Food Microbiology*, 30(1), 164-172. doi:10.1016/j.fm.2011.10.013
- Macé, S., Mamlouk, K., Chipchakova, S., Prévost, H., Joffraud, J. J., Dalgaard, P., & Dousset, X. (2013). Development of a rapid real-time PCR method as a tool to quantify viable *Photobacterium phosphoreum* bacteria in salmon (*Salmo salar*) steaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2612-2619. doi:10.1128/AEM.03677-12

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Educación. ISBN: 978-84-7929-136-6.
- Maherani, B., Hossain, F., Criado, P., Ben-Fadhel, Y., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). World market development and consumer acceptance of irradiation technology. *Foods*, 5(4), 79. doi:10.3390/foods5040079
- Mak, A. H., Lumbers, M., & Eves, A. (2012). Globalisation and food consumption in tourism. *Annals of Tourism Research*, 39(1), 171-196. doi:10.1016/j.annals.2011.05.010
- Mans, C., & Castells, P. (2011). La nueva cocina científica. *Investigación y Ciencia*, 421(1), 56-63. ISBN: 9770210136004.
- Mañas, P., & Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1387-1399. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02561.x
- Maráz, A., & Kovács, M. (2014). Food spoilage by cold-adapted yeasts. En P. Buzzini, & R. Margesin (Edits.), *Cold-adapted yeasts* (págs. 497-532). Berlín: Springer. ISBN: 978-3-642-39680-9.
- Marra, F., Zhang, L., & Lyng, J. G. (2009). Radio frequency treatment of foods: Review of recent advances. *Journal of Food Engineering*, 91, 497-508. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.10.015
- Martín de Santos, M. R., Cepeda Sáez, A., Herrera Marteache, A., & Martínez López, A. (2012). Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición con relación a las medidas de control para reducir la presencia de *Campylobacter* spp. en carne fresca de aves (pollo). *Revista del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)*, 16, 21-55. ISSN: 1885-6586.
- Martínez de Albéniz, I. (2018). Foundations for an analysis of the gastronomic experience: from product to process. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 13, 108-116. doi:10.1016/j.ijgfs.2018.01.001
- Martínez, J. M., Delso, C., Aguilar, D. E., Álvarez, I., & Raso, J. (2020). Organic-solvent-free extraction of carotenoids from yeast *Rhodotorula glutinis* by application of ultrasound under pressure. *Ultrasonics Sonochemistry*, 61(1), 1-9. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104833
- Martínez, M. A., Velázquez, G., Cando, D., Núñez-Flores, R., Borderías, A. J., & Moreno, H. M. (2017). Effects of high pressure processing on protein fractions of blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 323-329. doi:10.1016/j.ifset.2017.04.010
- Martínez-Monteaudo, S. I., & Balasubramaniam, V. M. (2016). Fundamentals and applications of high-pressure processing technology. En V. Balasubramaniam, G. Barbosa-Cánovas, & H. Lelieveld (Edits.), *High pressure processing of food. Food engineering series* (págs. 3-17). New York: Springer science. ISBN: 978-1-4939-3233-7.
- Martínez-Monteaudo, S. I., & Rathnakumar, K. (2021). High-Pressure Processing: Fundamentals, Misconceptions, and Advances. En K. Knoerzer, & K. Muthukumarappan (Edits.), *Innovative Food Processing Technologies: a comprehensive review* (Vol. 1, págs. 19-38). Elsevier. ISBN 9780128157824.
- Martino Zagovalov, T. K., Leyva Castillo, V., & Puig Peña, Y. (2008). Principales bacterias patógenas en alimentos. En Á. E. Caballero Torres, *Temas de higiene de los alimentos* (págs. 29-42). La Habana: Ciencias Médicas. ISBN: 978-959-212-363-2.
- Mauguin, S., & Novel, G. (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(6), 616-625. doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb01660.x
- Mayta-Hanco, J., Trujillo, A. J., & Juan, B. (2020). La homogeneización a ultra-alta presión (UHPH): efectos en la leche y aplicaciones en la fabricación de quesos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2), 1-14. doi:10.15381/rivep.v31i2.17934

- McGee, H. (2017). *La cocina y los alimentos*. Madrid: Debate. ISBN: 9788483067444.
- McMillin, K. W. (2008). Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, 80(1), 43–65. doi:10.1016/j.meatsci.2008.05.028
- Medina-Meza, I. G., Barnaba, C., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2014). Effects of high pressure processing on lipid oxidation: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22(1), 1-10. doi:10.1016/j.ifset.2013.10.012
- Mergeay, M., Monchy, S., Janssen, P., Houdt, R. V., & Leys, N. (2009). Megaplasms in *Cupriavidus* genus and metal resistance. En E. Schwartz (Ed.), *Microbial megaplasms. Microbiology monographs* (Vol. 11, págs. 209–238). Berlin, Heidelberg: Springer. doi:10.1007/978-3-540-85467-8_10
- Meziti, A., Ramette, A., Mente, E., & Kormas, K. A. (2010). Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(2), 472-484. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00964.x
- Mikš-Krajnik, M., Yoon, Y. J., Ukuku, D. O., & Yuk, H. G. (2016). Volatile chemical spoilage indexes of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored under aerobic condition in relation to microbiological and sensory shelf lives. *Food Microbiology*, 53(Pt B), 182-191. doi:10.1016/j.fm.2015.10.001
- Millière, J. B., & Lefebvre, G. (1994). *Carnobacterium piscicola*, a common species of french soft cheeses from cow's raw milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48, 19-30.
- Mol, S., Özturan, S., & Cosansu, S. (2012). Determination of the quality and shelf life of sous-vide packaged bonito (*Sarda sarda*, Bloch, 1793) stored at 4 and 12°C. *Journal of food quality*, 35(1), 137-143. doi:10.1111/j.1745-4557.2011.00430.x
- Mondino, M., & Ferratto, J. (2006). El análisis sensorial: una herramienta para la evaluación de la calidad desde el consumidor. *Agromensajes*, 18, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Obtenido de <http://hdl.handle.net/2133/554>
- Montel, M. C., Talon, R., Fournaud, J., & Champomier, M. C. (1991). A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 469-472. doi:10.1111/j.1365-2672.1991.tb02742.x
- Moraga, N., Torres, A., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2013). Non-newtonian canned liquid foof, unsteady fluid mechanics and heat transfer prediction for pasteurization and sterilization. *Journal of Food Process Engineering*, 34(6), 2000-2025. doi:10.1111/j.1745-4530.2009.00542.x
- Morales-Ramírez, F. (2010). *Clostridium perfringens*. *Revista Médica MD*, 2(2), 107-110. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2010/md102l.pdf>
- Moreno, J., Simpson, R., Pizarro, N., Parada, K., Pinilla, N., Reyes, J. E., & Almonacid, S. (2014). Effect of ohmic heating and vacuum impregnation on the quality and microbial stability of osmotically dehydrated strawberries (cv. *Camarosa*). *Journal of Food Engineering*, 110(2), 310–316. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.03.005
- Morii, H., & Kasama, K. (2004). Activity of two histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum* at different temperatures, pHs, and NaCl concentrations. *Journal of Food Protection*, 67(8), 1736-1742. doi:10.4315/0362-028x-67.8.1736
- Morris, W. E., & Fernández-Miyakawa, M. E. (2009). Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(1), 251-260. ISSN: 0325-7541.
- Mota, M. J., Lopes, R. P., Koubaa, M., Roohinejad, S., Barba, F. J., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2018). Fermentation at non-conventional conditions in food- and bio-sciences by the application of advanced processing technologies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), 122-140. doi:10.1080/07388551.2017.1312272



- Muayad, M. A., Khaled, M. K., Mufeed, B., Khaled, A. T., Ahmed, A.-M., & Maali, A.-M. (2007). Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzosulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pantoea agglomerans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(4), 432–439. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.03.011
- Muredzi, P. (2014). Food Irradiation as a model preservation technique for the food industry: the pros. School of Industrial Sciences and Technology. Harare Institute of Technology. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/244994988_Food_Irradiation_as_a_model_preservation_technique_for_the_food_industry_the_pros
- Murmu, S. B., & Mishra, H. N. (2017). The effect of edible coating based on arabic gum, sodium caseinate and essential oil of cinnamon and lemon grass on guava. *Food Chemistry*, 245(1), 820-828. doi:doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.104
- Myhrvold, N., Young, C., & Bilet, M. (2015). *Modernist cuisine: el arte y la ciencia de la cocina* (Vol. 2). Köln: Taschen. ISBN: 978-3-8365-3258-7.
- Narayan, V. V., Hatha, M. A., Morgan, H. W., & Rao, D. (2008). Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the savusavu hot springs in Fiji. *Microbes and Environments*, 23, 350-352. doi:10.1264jsme2.me08105
- Navarro, V., Serrano, G., Lasa, D., Aduriz, A. L., & Ayo, J. (2012). Cooking and nutritional science: Gastronomy goes further. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1(1), 37-45. doi:doi.org/10.1016/j.ijgfs.2011.11.004
- NCBI. (2021). *Enterobacterales*. National center for biotechnology information: National library of medicine (NLM). Bethesda, Maryland. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=2&lvl=3&srchmode=1&keep=1&unlock>
- NCBI. (2021). *Mycobacterium genus*. National center for biotechnology information: National library of medicine (NLM). Bethesda, Maryland. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=1763&lvl=1&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- NCBI. (2023a). *Vulcaniibacterium genus*. National center for biotechnology information: National library of medicine (NLM). Bethesda, Maryland. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=1649512>
- NCBI. (2023b). *Acinetobacter genus*. National center for biotechnology information: National library of medicine (NLM). Bethesda, Maryland. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=469>
- Neshovska, H., Shindarska, Z., & Kirov, V. (2020). Evaluation of the impact of HPP treatment on the chemical composition and organoleptic indicators of raw dog food. *Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, 75(5), 46-51. ISSN : 0514-7441.
- Nieminen, T. T., Dalgaard, P., & Björkroth, J. (2016). Volatile organic compounds and *Photobacterium phosphoreum* associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged raw pork. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 86-95. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.003
- Nilsson, L., Gram, L., & Huss, H. H. (1999). Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection*, 62(4), 336-342. doi:10.4315/0362-028X-62.4.336
- Nireesha, G. R., Sowmya, C., Niranjan Babu, M., Divya, L., Venkateshan, N., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/freezing drying: an review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 87-98. ISSN: 2277 – 2782.

- Niu, X. K., Rao, M. P., Dong, Z. Y., Kan, Y., Li, Q. R., Huang, J., & Li, W. J. (2020). *Vulcaniibacterium gelatinicum* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 1571–1577. doi:10.1099/ijsem.0.003934
- Nocker, A., Sossa-Fernández, P., Burr, M. D., & Camper, A. K. (2007). Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5111–51117. doi:10.1128/AEM.02987-06
- Nowak, A., Rygala, A., Oltuszek-Walczak, E., & Walczak, P. (2012). The prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1304–1310. doi:10.1002/jsfa.4701
- Nunes dos Santos, C. (2007). Somos lo que comemos: Identidad cultural, hábitos alimenticios y turismo. *Estudios y perspectivas en turismo*, 16(2), 234–242. ISSN: 0327-5841. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180713889006>
- Nyati, H. (2000). An evaluation of the effect of storage and processing temperatures on the microbiological status of sous vide extended shelf-life products. *Food Control*, 11(6), 471–476. doi:10.1016/S0956-7
- O'Brien, W. D. (2007). Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 212–255. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010
- Odeyemi, O. A., Burke, C. M., Bolch, C. C., & Stanley, R. (2018). Seafood spoilage microbiota and associated volatile organic compounds at different storage temperatures and packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 280, 87–99. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.029
- Oey, I. (2016). Effects of high pressure on enzymes. En V. Balasubramaniam, G. Barbosa-Cánovas, & H. Lelieveld (Edits.), *High pressure processing of food. Food engineering series* (págs. 391–431). New York: Springer science. ISBN: 978-1-4939-3233-7.
- 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 & Technology*, 19(6), 320–328. doi:10.1016/j.tifs.2008.04.001
- Ojha, S., Fröhling, A., Durek, J., Ehlbeck, J., Tiwari, B. K., Schlüter, O. K., & Bußler, S. (2021). Principles and application of cold plasma in food processing. En K. Knoerzer, & K. Muthukumarappan (Edits.), *Innovative food processing technologies: a comprehensive review* (Vol. 1, págs. 519–540). Elsevier. ISBN: 9780128157824.
- OMS. (2013). *The global view of campylobacteriosis. Report of expert consultation: Utrecht, Netherlands (9-11 July 2012)*. Geneve: WHO Document production services. ISBN: 9789241564601.
- OMS-FAO. (2004). *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes: informe de la reunión Ginebra, Suiza (2-5 febrero 2004). *Microbiological risk assessment series FAO-OMS*, 6, 1–86. ISBN: 92-5-105164-X.
- Onyeaka, H., Nwabor, O., Jang, S., Obileke, K., Hart, A., Anumudu, C., & Miri, T. (2022). Sous vide processing: a viable approach for the assurance of microbial food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(9), 3503–3512. doi:10.1002/jsfa.11836
- Orlien, V. (2021). Structural changes induced in foods by HPP. En K. Knoerzer, & K. Muthukumarappan (Edits.), *Innovative Food Processing Technologies: a Comprehensive Review* (Vol. 1, págs. 112–129). Elsevier. ISBN: 9780128157824.
- Orrego Alzate, C. E. (2008). *Congelación y liofilización de alimentos*. (Secretaría de Educación Gobernación de Caldas y Universidad Nacional de Colombia, Ed). Manizales: AG Tizan. ISBN: 978-958-44-4436-3.



- Ortega Rosell, F. J., Sánchez Martín, J. M., & Hernández Mogollón, J. M. (2012). *La gastronomía “de alta gama, de lujo o de calidad” como eje potenciador del turismo cultural y de sensaciones en Extremadura*. Cáceres: Fundación Caja Extremadura. ISBN: 978-84-695-6689-3 .
- Osorio, O., Villareal, Y., Mejía, D. F., & Cerón, A. F. (2013). Efecto de pasteurización sobre características sensoriales y contenido de vitamina C en jugos de frutas. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 11(2), 66-75. ISSN: 1692-3561. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117703>
- Osorio-Arias, J. C., Vega-Castro, Ó., & Martínez-Monteagudo, S. I. (2021). Fundamentals of high-pressure homogenization of foods. En K. Knoerzer, & K. Muthukumarappan (Edits.), *Innovative Food Processing Technologies: a Comprehensive Review* (Vol. 3, págs. 244-273). Elsevier. ISBN: 9780128157824.
- Osorio-Oviedo, Á. A. (2019). Pruebas de análisis sensorial para el desarrollo de productos de cereales infantiles en Venezuela. *Publicaciones en Ciencias y Tecnología*, 13(2), 27-37. doi:10.13140/RG.2.2.21791.51361
- Otero, J. (2017). High-status food is changing: New gastronomic perspectives. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 35-40. doi:10.1016/j.ijgfs.2017.11.003
- Palmer, J. S., Flint, S. H., Schmid, J., & Brooks, J. D. (2010). The role of surface charge and hydrophobicity in the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* isolated from milk powder. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(11), 1111-1119. doi:10.1007/s10295-010-0758-x
- Paludan-Müller, C., Dalgaard, P., Huss, H. H., & Gram, L. (1998). Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 155-166. doi:10.1016/S0168-1605(97)00133-5
- Pang, Y. H., Zhang, L., Zhou, S., Yam, K. L., Liu, L., & Sheen, S. (2015). Growth behavior prediction of fresh catfish fillet with *Pseudomonas aeruginosa* under stresses of allyl isothiocyanate, temperature and modified atmosphere. *Food Control*, 47, 326-333. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.030
- Parlapani, F. F., & Boziaris, I. S. (2016). Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 553-559. doi:10.1016/j.lwt.2015.11.007
- Parlapani, F. F., Haroutounian, S. A., Nychas, G. J., & Boziaris, I. S. (2015). Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C. *Food Microbiology*, 50, 44-53. doi:10.1016/j.fm.2015.03.006
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review lactic acid bacteria: functional role in the foods. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105. eISSN: 1909-9959.
- Patrignani, F., Rossi, S., Vannini, L., & Lanciotti, R. (2021). High-pressure homogenization effects on spoilage and pathogenic microorganisms in foods. En K. Knoerzer, & K. Muthukumarappan (Edits.), *Innovative Food Processing Technologies: a Comprehensive Review* (Vol. 3, págs. 274-292). Elsevier. ISBN: 9780128157824.
- Patterson, M. F., & Linton, M. (2010). “Pasteurización” de alimentos por altas presiones. En Instituto Tomás Pascual Sanz, & Universidad de Burgos (Edits.), *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos* (págs. 59-72). Madrid: IMC. ISBN: 978-84-92681-14-3.
- Pei-Ling, L., Xiao-Song, H., & Qun, S. (2010). Effect of high hydrostatic pressure on starches: a review. *Starch*, 62(12), 615–628. doi:10.1002/star.201000001
- Pérez Alcalá, D., Grande Burgos, M. J., Rodríguez López, J., Lucas, R., Gálvez, A., & Pérez Pulido, R. (2023). Effect of high hydrostatic pressure processing on the microbiological quality and bacterial diversity of sous-vide cooked cod. *Foods*, 12(6), 1206. doi:10.3390/foods12061206

- Pérez Guerrero, P., Galán Sánchez, F., Gutiérrez Saborido, D., & Guerrero Lozano, I. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine - Programa de formación médica continuada acreditado*, 11(55), 3276-3282. doi:10.1016/S0304-5412(14)70768-1
- Pérez-Reyes, M. E., & Sosa-Morales, M. E. (2013). Mecanismos de transferencia de calor que ocurren en tratamientos térmicos de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 37-47. Obtenido de <https://tsia.udlap.mx/mecanismos-de-transferencia-de-calor-que-ocurren-en-tratamientos-termicos-de-alimentos/>
- Petrola, M., Martínez, A., Tomé, E., Luigi, T., & Rojas, T. (2013). Effect of temperature cooling and heating of powered infant formula on the growth of *Cronobacter sakazakii*. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 26(2), 106-111. ISSN: 0798-0752.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., & Laurinavichius, K. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2109–2117. doi:10.1099/00207713-50-6-2109
- Piyasena, P., Dussault, C., Koutchma, T., Ramaswamy, H. S., & Awuah, G. B. (2003). Radio frequency heating of foods: Principles, applications and related properties. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 587-606. doi:10.1080/10408690390251129
- Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 207– 216. doi:10.1016/S0168-1605(03)00075-8
- Porter, N. A. (2013). A perspective on free radical autoxidation: the physical organic chemistry of polyunsaturated fatty acid and sterol peroxidation. *The Journal of Organic Chemistry*, 78(8), 3511-3524. doi:10.1021/jo4001433
- Prapaiwong, N., Wallace, R. K., & Arias, C. R. (2009). Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), 145-150. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.014
- Pundir, A., & Murtaza, N. (2015). Hurdle technology: an approach towards food preservation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(7), 802-809. ISSN: 2319-7706 .
- Pupo, G. M., Lan, R., & Reeves, P. R. (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19), 10567–10572. doi:10.1073/pnas.180094797
- Qian, J., Zhuang, H., Nasiru, M. M., Muhammad, U., Zhang, J., & Yan, W. (2019). Action of plasma-activated lactic acid on the inactivation of inoculated *Salmonella enteritidis* and quality of beef. *Innovative Food Science & Emerging Technologies. Advance online publication*, 57(1). doi:10.1016/j.ifset.2019.102196
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K., Manichanh, C., & Yamada, T. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. doi:10.1038/nature08821
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590-D596. doi:10.1093/nar/gks1219
- Queirós, R. P., Saraiva, J. A., & Da Silva, J. A. (2018). Tailoring structure and technological properties of plant proteins using high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(9), 1538-1556. doi:10.1080/10408398.2016.1271770



- Rabasó, R., & Aneiros, F. (1970). *El práctico: resumen mundial de cocina y pastelería*. Buenos Aires: Santiago Rueda. ISBN: 978-84-920959-2-6.
- Ramírez Navas, J. S. (2006). Liofilización de alimentos. *Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 6(1), 1-36. ISSN: 2027-6850.
- Ramírez, J., & Ayala Aceves, M. (2014). Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria. Universidad Nacional Autónoma de México*, 15(12), 1-13. ISSN: 1607-6079.
- Rawat, S. (2015). Food spoilage: microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47-56. ISSN: 2249-7412.
- Real Academia Española. (2020). *Diccionario de la lengua española*, 23.^a ed., (versión 23.4 en línea). Obtenido de <https://dle.rae.es>
- Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre de 2000, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. (Boletín Oficial del Estado, 12 de enero de 2001, núm. 11).
- Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (Diario Oficial de la Unión Europea, L 322, de 7 de diciembre de 2007, pp. 12-29).
- 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. doi:10.1016/j.lwt.2010.11.001
- Restrepo Flórez, C. E., & Patiño Gómez, J. H. (2008). Efecto del monóxido de carbono (CO) en el envasado bajo atmósferas modificadas de carne roja. *Revista Alimentos Hoy - Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 14(14), 37-47. ISSN: 2027-291X. Obtenido de <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/search/advancedResults>
- Rey Rodríguez, J. F., Alejo Riveros, J. C., Cortés Muñoz, M. S., Correa Lizarazo, D. X., Klotz Ceberio, B., Herrera Arias, F. C., & Vanegas López, M. C. (2011). *Evaluación de riesgos de Staphylococcus aureus enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia*. Unidad de evaluación de riesgos para la inocuidad de los alimentos (UERIA). Bogotá: Instituto nacional de salud. ISBN: 978-958-13-0154-6.
- Reyes Uribe, A. C., Guerra Ávalos, E. A., & Quintero Villa, J. M. (2017). Educación en gastronomía: su vínculo con la identidad cultural y el turismo. *El periplo sustentable*, 32, ISSN-e: 1870-9036. Obtenido de <https://rperiplo.uaemex.mx/article/view/4880>
- Rinaldi, M., Dall'Asta, C., Paciulli, M., Martina, C., Manzi, C., & Chiavaro, E. (2014). A novel time/temperature approach to sous vide cooking of beef muscle. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2969–2977. doi:10.1007/s11947-014-1268-z
- Ringø, E. (2004). Lactic acid bacteria in fish and fish farming. En S. Salminen, A. Wright, & A. Ouwehand (Edits.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (third ed., págs. 581-610). New York: CRC Press. doi:10.1201/9780824752033.ch21
- Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., & Macho Martínez, M. (2017). Investigación de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Militar*, 73(3), 147-152. ISSN: 1887-8571.
- Roca, J., & Brugués, S. (2003). *La cocina al vacío*. Barcelona: Montagud Editores. ISBN: 84-7212-100-3.
- Roca, J., & Brugués, S. (2017). *Cocina con Joan Roca*. Barcelona: Planeta. ISBN: 978-84-0812147-3.
- Rodrigues, M. J., Ho, P., López-Caballero, M. E., Vaz-Pires, P., & Nunes, M. L. (2003). Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials. *Food Microbiology*, 20(4), 471-481. doi:10.1016/S0740-0020(02)00086-2

- Rodríguez Ferri, E. F. (2000). Tularemia en España. *Anales de la Real Academia de Doctores*, (4), 349-372. ISSN: 1138-2414.
- Rodríguez Ferri, E. F., Bosch Navarro, A., Cepeda Sáez, A., Domínguez Rodríguez, L., Otero Carballeira, A., & Zurera Cosano, G. (2012). Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género *Vibrio* aplicables, como medidas adicionales de control en los puntos de inspección. *Revista del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)*, 12, 9-36. ISSN: 1885-6586.
- Rodríguez López, J., Grande, M. J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2020). Impact of High-Hydrostatic Pressure Treatments applied singly or in combination with moderate heat on the microbial load, antimicrobial resistance, and bacterial diversity of guacamole. *Microorganisms*, 8(6), 909. doi:10.3390/microorganisms806090
- Rodríguez Tamayo, E. A., & Jiménez Quiceno, J. N. (2015). Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. 28(1), 66-77. ISSN 0121-0793.
- Rodríguez-Calleja, J. M., Patterson, M. F., García-López, I., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. L. (2005). Incidence, radioresistance, and behavior of *Psychrobacter* spp. in rabbit meat. *Journal of Food Protection*, 68(3), 538-543. doi:10.4315/0362-028x-68.3.538
- Rojas Ruiz, N. E., Muñoz Zurita, G., Gárate Vélez, L., González Montesinos, D. V., & Del Pozo González, M. F. (2013). Aislamiento microbiológico de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de camarón coctelero en la ciudad de Puebla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 33(4), 147-151. ISSN: 1405-0994.
- Roldán, M., Antequera, T., Armenteros, M., & Ruiz, J. (2014). Effect of different temperature–time combinations on lipid and protein oxidation of sous-vide cooked lamb loins. *Food Chemistry*, 149, 129-136. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.079
- Roldán, M., Antequera, T., Martín, A., Mayoral, A. I., & Ruiz, J. (2013). Effect of different temperature–time combinations on physicochemical, microbiological, textural and structural features of sous vide cooked lamb loins. *Meat Science*, 93(3), 572-578. doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.014
- Rostami, Z., Ayaz Ahmad, M., Usman Khan, M., Prakash Mishra, A., Rashidzadeh, S., & Shariati, M. A. (2016). Food preservation by hurdle technology: a review of different hurdle and interaction with focus on foodstuffs. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4), 2633-2639. doi:10.22207/JPAM.10.4.20
- Ruiz-Carrascal, J., Roldán, M., Refolio, F., Pérez-Palacios, T., & Antequera, T. (2018). Sous vide cooking of meat: a Maillardized approach. Advance online publication. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 16, 100138. doi:10.1016/j.ijgfs.2019.100138
- Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2014). *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(3), 291-304. doi:10.1007/s10096-013-1975-9
- Sakr, M., & Liu, S. (2014). A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39(1), 262-269. doi:10.1016/j.rser.2014.07.061
- Salazar, F. A., Yildiz, S., Leyva, D., Soto-Caballero, M., Welti-Chanes, J., Anubhav, P. S., & Escobedo-Avellaneda, Z. (2021). HHP influence on food quality and bioactive compounds: a review of the last decade. En K. Knoerzer, & K. Muthukumarappan (Edits.), *Innovative Food Processing Technologies: a Comprehensive Review* (Vol. 1, págs. 87-111). Elsevier. ISBN: 9780128157824.
- Salazar-González, C., San Martín-González, M. F., López-Malo, A., & Sosa-Morales, M. E. (2012). Recent studies related to microwave processing of fluid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 31–46. doi:10.1007/s11947-011-0639-y



- Sánchez del Pulgar, J., Gázquez, A., & Ruiz-Carrascal, J. (2012). Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature, and cooking time. *Meat Science*, 90(3), 828-835. doi:10.1016/j.meatsci.2011.11.024
- Santos Buelga, J. Á., Giner Pons, R. M., González Fandos, M. E., Guix Arnau, S., Palop Gómez, A., & Rodríguez Lázaro, D. (2018). Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros biológicos de interés en seguridad alimentaria en España. *Revista del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*, 28, 11-67. ISSN: 1885-6586.
- Santos, L. M., Oliveira, F. A., Ferreira, E. H., & Rosenthal, A. (2017). Application and possible benefits of high hydrostatic pressure or high-pressure homogenization on beer processing: a review. *Food Science and Technology International*, 23(7), 561-581. doi:10.1177/1082013217714670
- Sanz Martínez, P. (2019). Procesado de alimentos mediante alta presión hidrostática. (págs. 1-7). Madrid: Real Academia de Ciencias Veterinarias de España (RACVE). Obtenido de <http://www.racve.es/2019/01/31/el-dr-pedro-sanz-martinez-interviene-en-la-real-academia-de-ciencias-veterinarias-de-espana/>
- Sari, E. K., Bambang, S., & Sumarlan, S. H. (2012). Non thermal preservation process of apple cider based on oscillating magnetizing field (OMF) technology. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(2), 78-87. ISSN: 2528-2794.
- Sastry, S. K. (2004). Advances in ohmic heating and moderate electric field (MEF) processing. En G. V. Barbosa-Cánovas, M. P. Cano, & M. Tapia (Edits.), *Novel food processing technologies* (págs. 491-499). Boca Ratón: CRC Press. ISBN: 9780429225055.
- Schafheitle, J. M. (1990). The sous-vide system for preparing chilled meals. *British Food Journal*, 92(5), 23-27. doi:10.1108/00070709010139427
- Scharlau. (2021a). *Agar triptona y soja (TSA)*. Scharlau Microbiology: Fichas de datos técnicos. Obtenido de https://www.scharlab.com/docs/tds/descargarpdf.php?path=01-200_TDS_ES.pdf&idid=ES&ref=01-200-500
- Scharlau. (2021b). *Agar MacConkey*. Scharlau Microbiology: Fichas de datos técnicos. Obtenido de https://www.scharlab.com/docs/tds/descargarpdf.php?path=01-118_TDS_ES.pdf&idid=ES&ref=01-118-500
- Scharlau. (2021c). *PALCAM agar base*. Scharlau Microbiology: Fichas de datos técnicos. Obtenido de https://www.scharlab.com/docs/tds/descargarpdf.php?path=01-470_TDS_ES.pdf&idid=ES&ref=01-470-500
- Scharlau. (2021d). *Agar verde brillante (BGA)*. Scharlau Microbiology: Fichas de datos técnicos. Obtenido de https://www.scharlab.com/docs/tds/descargarpdf.php?path=01-203_TDS_ES.pdf&idid=ES&ref=01-203-500
- Scharlau. (2022). *PALCAM agar selective supplement for Listeria*. Scharlau Microbiology: Fichas de datos técnicos. Obtenido de https://www.scharlab.com/docs/tds/descargarpdf.php?path=06-110LYO1_TDS_ES.pdf&idid=ES&ref=06-110LYO1
- Schellekens, M. (1996). New research issues in sous-vide cooking. *Trends in Food Science and Technology*, 7(8), 256-262. doi:10.1016/0924-2244(96)10027-3
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026
- Sehrawat, R., Kaur, B. P., Nema, P. K., Tewari, S., & Kumar, L. (2020). Microbial inactivation by high pressure processing: principle, mechanism and factors responsible. *Food Science and Biotechnology*, 30(1), 19-35. doi:10.1007/s10068-020-00831-6

- Sevenich, R., Rauh, C., & Knorr, D. (2016). A scientific and interdisciplinary approach for high pressure processing as a future toolbox for safe and high quality products: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38(Part A), 65-75. doi:10.1016/j.ifset.2016.09.013
- Seyitoğlu, F., & Ivanov, S. (2020). A conceptual study of the strategic role of gastronomy in tourism destinations. *International Journal of Gastronomy and Food Science. Advance online publication*. doi:10.1016/j.ijgfs.2020.100230
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4067-4079. doi:10.1039/b922183m
- Shakila, R. J., Raj, B. E., & Felix, N. (2012). Quality and safety of fish curry processed by sous vide cook chilled and hot filled technology process during refrigerated storage. *Food Science and Technology International*, 18(3), 261-269. doi:10.1177/1082013211415177
- Sharma, M., Shearer, A. E., Hoover, D. G., Liu, M. N., Solomon, M. B., & Kniel, K. E. (2008). Comparison of hydrostatic and hydrodynamic pressure to inactivate foodborne viruses. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 418-422. doi:10.1016/j.ifset.2008.05.001
- Shields, J. D. (2011). Diseases of spiny lobsters: a review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(1), 79-91. doi:10.1016/j.jip.2010.09.015
- Siccha Macassi, A., & Lock de Ugaz, O. (1995). Liofilización. *Revista de química. Pontificia Universidad Católica del Perú*, 9(2), 173-183. e-ISSN: 2518-2803.
- Siemer, C., Aganovic, K., Toepfl, S., & Heinz, V. (2014). Application of pulsed electric fields in food. En S. Bhattacharya (Ed.), *Conventional and Advanced Food Processing Technologies* (págs. 645-672). Hoboken: John Wiley & sons. ISBN: 9781118406328.
- Sikes, A., & Warner, R. D. (2016). Application of high hydrostatic pressure for meat tenderization. En K. Knoerzer, P. Juliano, & G. Smithers (Edits.), *Innovative Food Processing Technologies* (1 ed., págs. 259-290). Woodhead publishing. Series in food science, technology and nutrition. ISBN: 978-0-08-100294-0.
- Silbande, A., Adenet, S., Smith-Ravin, J., Joffraud, J. J., Rochefort, K., & Leroi, F. (2016). Quality assessment of ice-stored tropical yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and influence of vacuum and modified atmosphere packaging. *Food Microbiology*, 60, 62-72. doi:10.1016/j.fm.2016.06.016
- Singh, S., & Shalini, R. (2014). Effect of hurdle technology in food preservation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (56), 641-649. doi:10.1080/10408398.2012.761594
- Soleno Wilches, R. (2015). Tecnologías no térmicas en el procesado y conservación de alimentos vegetales: una revisión. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 2(1), 73-83. doi:10.23850/24220582.172
- Sørensen, J. S., Ørnfeld-Jensen, O., Bøknæs, N., Mejlholm, O., Jessen, F., & Dalgaard, P. (2020). Thawed and chilled Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from Greenland - Options for improved distribution. *LWT - Food Science and Technology*, 131. doi:10.1016/j.lwt.2020.109473
- Spence, C., & Youssef, J. (2018). Assessing the long-term impact of the molecular gastronomy movement on haute cuisine. *International Journal of Gastronomy and Food Science. Advance online publication*. doi:10.1016/j.ijgfs.2018.10.001
- Stankov, S., Fidan, H., Rusev, R., & Baeva, M. (2020). Low-temperature cooking method sous vide in the restaurant industry: a review. *Food Science and Applied Biotechnology*, 3(1), 92-102. doi:10.30721/fsab2020.v3.i1.83

- Stohr, V., Joffraud, J. J., Cardinal, M., & Leroi, F. (2001). Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International*, 34(9), 797-806. doi:10.1016/S0963-9969(01)00101-6
- Stone, H., & Sidel, J. L. (2004). *Sensory evaluation practices* (3ª ed.). San Diego: Academic Press (Food Science and Technology). ISBN: 9780126726909.
- Stratford, M. (2006). Food and beverage spoilage yeasts. En A. Querol, & G. Fleet (Edits.), *Yeasts in food and beverages* (págs. 335-379). Berlín: Springer. ISBN 978-3-540-28398-0.
- Stringer, S. C., & Metris, A. (2017). Predicting bacterial behaviour in sous vide food. *International Journal of Gastronomy and Food Science. Advance online publication*. doi:10.1016/j.ijgfs.2017.09.001
- Stringer, S. C., & Metris, A. (2018). Spore forming pathogens and sous vide food safety. En S. Ghazala (Ed.), *Sous vide and cook-chill processing for the food industry* (second ed.). Springer: New York, USA.
- Sun, X. D., & Holley, R. A. (2010). High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products. *Journal of Food Science*, 75(1), R17-R23. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01449.x
- Surowsky, B., Schlüter, O., & Knorr, D. (2015). Interactions of nonthermal atmospheric pressure plasma with solid and liquid food systems: a review. *Food Engineering Reviews*, 7(2), 82–108. doi:10.1007/s12393-014-9088-5
- Tang, J., Chan, T., & Wang, Y. (2004). Radio-frequency heating in food processing. En G. V. Barbosa-Cánovas, M. P. Cano, & M. Tapia (Edits.), *Novel Food Processing Technologies* (págs. 501-524). Boca Ratón: CRC Press. ISBN: 9780429225055.
- Tansey, F. S., & Gormley, T. R. (2004). Sous-vide/Freezing technology for ready meals. En M. P. Cano, M. S. Tapia, & G. S. Barbosa-Canovas (Edits.), *Novel Food Processing Technologies* (págs. 477-490). CRC Press. doi:10.1201/9780203997277.ch22
- Teixeira, A. A. (2014). Thermal food preservation techniques (pasteurization, sterilization, canning and blanching). En S. Bhattacharya (Ed.), *Conventional and Advanced Food Processing Technologies* (págs. 115-128). Hoboken: John Wiley & Sons. ISBN: 9781118406328.
- Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M., & Simal-Gándara, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *CYTA Journal of Food*, 3(2), 66-80. doi:10.1080/11358120109487649
- This, H. (2003). Ciencia y gastronomía: Avances recientes en gastronomía molecular. *Métode. Revista de difusión de la investigación*, 40, Servicio de Publicaciones de la Universitat de València. Obtenido de <https://metode.es/revistas-metode/monograficos/ciencia-y-gastronomia-avances-recientes-en-gastronomia-molecular.html>
- Toepfl, S., Heinz, V., & Knorr, D. (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(6), 537-546. doi:10.1016/j.cep.2006.07.011
- Tomé, E., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. C. (2007). Could modifications of processing parameters enhance the growth and selection of lactic acid bacteria in cold-smoked salmon to improve preservation by natural means? *Journal of Food Protection*, 70(7), 1607-1614. doi:10.4315/0362-028
- Torres, B., Tiwari, B. K., Patras, A., Wijngaard, H. H., Brunton, N., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2011). Effect of ozone processing on the colour, rheological properties and phenolic content of apple juice. *Food Chemistry*, 124(3), 721-726. doi:10.1016/j.foodchem.2010.06.050
- Umair, M., Jabbar, S., Nasiru, M. M., Sultana, T., Senan, A. M., Awad, F. N., & Zhang, J. (2019). Exploring the potential of high-voltage electric field cold plasma (HVCP) using a dielectric barrier discharge

- (DBD) as a plasma source on the quality parameters of carrot juice. *Antibiotics*, 8(4), 1-18. doi:10.3390/antibiotics8040235
- Urbanczyk, H., Furukawa, T., Yamamoto, Y., & Dunlap, P. V. (2012). Natural replacement of vertically inherited lux-rib genes of *Photobacterium aquimaris* by horizontally acquired homologues. *Environmental Microbiology Reports*, 4(4), 412-416. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00355.x
- Valdez-Fragoso, A., Mújica-Paz, H., Welti-Chanes, J., & Torres, J. A. (2011). Reaction kinetics at high pressure and temperature: effects on milk flavor volatiles and on chemical compounds with nutritional and safety importance in several foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 986-995. doi:10.1007/s11947-010-0489-z
- Van Looveren, M., & Goossens, H. (2004). Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(8), 684-704. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00942.x
- Van Wyk, S., Farid, M. M., & Silva, F. V. (2018). SO₂, high pressure processing and pulsed electric field treatments of red wine: effect on sensory, *Brettanomyces* inactivation and other quality parameters during one year storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48(1), 204-211. doi:10.1016/j.ifset.2018.06.016
- Vandamme, P., & Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2285-2289. doi:10.1099/ijs.0.63247-0
- Vanlint, D., Mitchell, R., Bailey, E., Meersman, F., McMillan, P. F., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2011). Rapid acquisition of gigapascal-high-pressure resistance by *Escherichia coli*. *mBio*, 2(1). doi:10.1128/mbio.00130-10
- Vargas-Sánchez, A., & López-Guzmán, T. (2018). Protection of culinary knowledge generation in Michelin-starred restaurants. The spanish case. *International Journal of Gastronomy and Food Science. Advance online publication*. doi:10.1016/j.ijgfs.2018.09.001
- Vaudagna, S. R., Sánchez, G., Neira, M. S., Insani, E. M., Picallo, A. B., Gallinger, M. M., & Lasta, J. A. (2002). Sous vide cooked beef muscles: effects of low temperature-long time (LT-LT) treatments on their quality characteristics and storage stability. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 425-441. doi:10.1046/J.1365-2621.2002.00581.X
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2009). An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28(1), 232-254. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.12.004
- Vieira, A. M., Bergamasco, R., Gimenes, M. L., Nakamura, C. V., & Diasfilho, B. P. (2003). Enumeration and isolation of facultative anaerobic bacteria in an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating wastewater from a gelatine industry. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 25(2), 257-260. Universidade estadual de Maringá. ISSN: 1679-9283.
- Watson, S. C., Furbeck, R. A., Fernando, S. C., Chaves, B. D., & Sullivan, G. A. (2023). Spoilage *Pseudomonas* survive common thermal processing schedules and grow in emulsified meat during extended vacuum storage. *Journal of Food Science*, 88, 2162-2167. doi:10.1111/1750-3841.16557
- Wei, D. Q., Yu, T. T., Yao, J. C., Zhou, E. M., Song, Z. Q., Yin, Y. R., & Li, W. J. (2012). *Lysobacter thermophilus* sp. nov., isolated from a geothermal soil sample in Tengchong, south-west China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(4), 643-651. doi:10.1007/s10482-012-9761-8
- Wei, J., Goldberg, M. B., Burland, V., Venkatesan, M. M., Deng, W., Founier, G., & Blattner, F. R. (2003). Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infection and Immunity*, 71(5), 2775-2786. doi:10.1128/IAI.71.5.2775-2786.2003

- Weiss, A., & Hammes, W. P. (2006). Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold-smoked salmon. *European Food Research and Technology*, 222(1), 343-346. doi:10.1007/s00217-005-0116-9
- Wiernasz, N., Cornet, J., Cardinal, M., Pilet, M. F., Passerini, D., & Leroi, F. (2017). Lactic acid bacteria selection for biopreservation as a part of hurdle technology approach applied on seafood. *Frontiers in Marine Science*, 4, 119. doi:10.3389/fmars.2017.00119
- Wilson, B., Danilowicz, B. S., & Meijer, W. G. (2008). The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua*. *Microbial Ecology*, 55(3), 425-434. doi:10.1007/s00248-007-9288-0
- Winter, R., Lopes, D., Grudzielanek, S., & Vogtt, K. (2007). Towards an understanding of the temperature/pressure configurational and free-energy landscape of biomolecules. *Journal of Non-equilibrium Thermodynamics*, 32(1), 41-97. doi:10.1515/JNETDY.2007.003
- Wittig de Penna, E. (2001). Evaluación sensorial: una metodología actual para tecnología de alimentos. Universidad de Chile. Santiago de Chile. Obtenido de <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/121431>
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M., & Michiels, C. W. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 77(3), 205-212. doi:10.1016/s0168-1605(02)00054-5
- Xie, F., Zhang, W., Lan, X., Gong, S., Wu, J., & Wang, Z. (2018). Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization processing on characteristics of potato peel waste pectin. *Carbohydrate Polymers*, 196(1), 474-482. doi:10.1016/j.carbpol.2018.05.061
- Xu, L., Garner, A. L., Tao, B., & Keener, K. M. (2017). Microbial inactivation and quality changes in orange juice treated by high voltage atmospheric cold plasma. *Food Bioprocess Technology*, 10(1), 1778-1791. doi:10.1007/s11947-017-1947-7
- Yang, J., & Powers, J. R. (2016). Effects of high pressure on food proteins. En V. Balasubramaniam, G. Barbosa-Cánovas, & H. Lelieveld (Edits.), *High Pressure Processing of Food. Food Engineering Series* (págs. 353-389). New York: Springer science. ISBN: 978-1-4939-3233-7.
- Ye, T., Chen, X., Chen, Z., Yao, H., Wang, Y., Lin, L., & Lu, J. (2021). Quality and microbial community of high pressure shucked crab (*Eriocheir sinensis*) meat stored at 4°C. *Journal of Food Processing and Preservation. Advance online publication*, 45(4). doi:10.1111/jfpp.15330
- Yildiz Turp, G., Sengun, I., Kendirci, P., & Icier, F. (2013). Effect of ohmic treatment on quality characteristic of meat: A review. *Meat Science*, 93(3), 441-448. doi:10.1016/j.meatsci.2012.10.013
- Yordanov, D. G., & Angelova, G. V. (2010). High pressure processing for foods preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(3), 1940-1945. doi:10.2478/V10133-010-0057-8
- Yu, T. T., Zhou, E. M., Yin, Y. R., Yao, J. C., Ming, H., Dong, L., & Li, W. J. (2013). *Vulcaniibacterium tengchongense* gen. nov., sp. nov. isolated from a geothermally heated soil sample, and reclassification of *Lysobacter thermophilus* Wei et al. 2012 as *Vulcaniibacterium thermophilum* *Antonie van Leeuwenhoek*, 104, 369-376. doi:10.1007/s10482-013-9959-4
- Yu, T. Y., Morton, J. D., Clerens, S., & Dyer, J. M. (2017). Cooking-induced protein modifications in meat. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 141-159. doi:10.1111/1541-4337.12243
- Zavadlav, S., Blažic, M., Van de Velde, F., Vignatti, C., Fenoglio, C., Piagentini, A. M., & Putnik, P. (2020). Sous-vide as a technique for preparing healthy and high-quality vegetable and seafood products. *Foods*, 9, 1537. doi:10.3390/foods9111537

- Zhong, Y., Cavender, G., & Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on mozzarella cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 1-8. doi:10.1016/j.lwt.2013.11.006
- Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, 86(1), 119–128. doi:10.1016/j.meatsci.2010.04.033
- Zhuang, S., Liu, X., Li, Y., Zhang, L., Hong, H., Liu, J., & Lou, Y. (2021). Biochemical changes and amino acid deamination & decarboxylation activities of spoilage microbiota in chill-stored grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets. *Food Chemistry*, 30(336), 127683. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127683
- Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P. J., Keener, K. M., & Bourke, P. (2014). Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food Microbiology*, 42(1), 109-116. doi:10.1016/j.fm.2014.02.00