



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

EFFECTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTATICAS Y ANTIMICROBIANOS PROCEDENTES DE SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA SOBRE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM



MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Patricia Elena Moreno Zivanovich

Director: Antonio Martínez López

Codirectora: M^a Dolores Rodrigo Aliaga

Directora Experimental: María Sanz Puig

Centro: IATA-CSIC

Valencia, Septiembre, 2015

EFFECTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTATICAS Y ANTIMICROBIANOS PROCEDENTES DE RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA SOBRE SALMONELLA TYPHIMURIUM

Patricia Elena Moreno Zivanovich, Antonio Martínez López¹ (Director), María Dolores Rodrigo Aliaga¹ (Codirector), María Sanz Puig¹ (Director experimental)

RESUMEN

La generación de grandes cantidades de subproductos provenientes de la industria alimentaria y los problemas ambientales y económicos que generan, impulsan a evaluar estrategias para la revalorización de los mismos, aprovechando sus capacidades antioxidantes y antimicrobianas. Además, la industria agroalimentaria está desarrollando nuevas tecnologías de conservación de alimentos que mantengan la calidad y seguridad de los mismos sin aplicar un tratamiento térmico, un buen ejemplo son las Altas Presiones Hidrostáticas (APH). Por tanto, el propósito de este estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana de infusiones obtenidas a partir de subproductos de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*), en combinación con las APH, sobre *S. Typhimurium*. La capacidad antimicrobiana de los subproductos se evaluó en términos de crecimiento/inactivación ($\log(N_t/N_0)$) de la población inicial del microorganismo con el tiempo de incubación, bajo las condiciones en estudio: 10 y 37°C, a partir de muestras tratadas y no tratadas previamente por APH (200 MPa – 2 min). Además, se evaluó el daño subletal generado por el tratamiento de APH y por las infusiones de subproductos de mandarina y coliflor sobre *S. Typhimurium* durante su posterior incubación y se determinó el contenido total de polifenoles de las infusiones obtenidas. Todas las curvas de inactivación de *S. Typhimurium* se ajustaron al modelo de Weibull. Los resultados obtenidos permitieron determinar que las infusiones de subproductos de mandarina y coliflor tienen una alta capacidad antimicrobiana frente a *S. Typhimurium*, que el tratamiento por APH utilizado (200MPa – 2min) ocasiona un daño subletal de 1 ciclo logarítmico sobre *S. Typhimurium*, y que la combinación del poder antimicrobiano de las infusiones de subproductos de mandarina y coliflor con el tratamiento de APH, genera un efecto sinérgico en la inactivación microbiana. Los valores de los parámetros cinéticos del modelo de Weibull demuestran un aumento de la velocidad de inactivación del microorganismo debido a la exposición a las infusiones de subproductos, al tratamiento de APH y a la combinación de ambos. Los resultados del presente trabajo abren una vía de reutilización de los subproductos de mandarina y coliflor como antimicrobianos para el control del crecimiento de *S. Typhimurium*.

ABSTRACT

The generation of large amounts of by-products from the food industry and the environmental and economic problems that it generates, drives to evaluate strategies for the revaluation of them, taking advantage of their antioxidant and antimicrobial capabilities. In addition, the food industry is developing new food preservation technologies that maintain quality and safety of food products without applying a heat treatment. A good example is the high hydrostatic pressure (HHP) processing technology. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the antimicrobial capacity of infusions that were

obtained from by-products of mandarin (*Citrus reticulata* and cauliflower (*Brasica oleracea L. var botrytis*), in combination with HHP, against *S. Typhimurium*. The antimicrobial activity of the by-products was evaluated in terms of growth/inactivation ($\log(N_t/N_0)$) of the initial population of the microorganism with the incubation time, under the conditions studied: 10 and 37°C, from treated samples and not previously treated by HHP (200 MPa - 2 min). Furthermore, it was evaluated the sublethal damage generated by HHP treatment and mandarin and cauliflower by-product infusions against *S. Typhimurium* during subsequent incubation and the total polyphenol content of the infusions was evaluated. All inactivation curves of *S. Typhimurium* were adjusted to Weibull model. The results indicated that infusions of mandarin and cauliflower by-products have high antimicrobial activity against *S. Typhimurium*, the HHP treatment applied (200MPa - 2min) causes a sublethal damage of 1 log cycle on *S. Typhimurium*, and the combination of the antimicrobial capacity of by-product infusions of mandarin and cauliflower and HHP treatment generates a synergistic effect on microbial inactivation. The Weibull kinetic parameters values show an increased inactivation rate of the microorganism due to exposure to infusions, the processing of HHP and the combination of both. The results of the present research open a route of revalorization of the by-products from tangerine and cauliflower like antimicrobials for the control of the growth of *S. Typhimurium*.

RESUM

La generació de grans quantitats de subproductes provinents de la indústria alimentària i els problemes ambientals i econòmics que generen, impulsen a avaluar estratègies per a la seua revalorització, aprofitant les seues capacitats antioxidants i antimicrobianes. A més, la indústria agroalimentària està desenvolupant noves tecnologies de conservació d'aliments que mantinguen la seua qualitat i seguretat sense aplicar un tractament tèrmic, un bon exemple són les Altes Pressions Hidrostàtiques (APH). Per tant, el propòsit d'aquest estudi fou avaluar la capacitat antimicrobiana d'infusions obtingudes a partir de subproductes de mandarina (*Citrus reticulata*) i coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*), en combinació amb les APH, sobre *S. Typhimurium*. La capacitat antimicrobiana dels subproductes es va avaluar en valors de creixement/inactivació ($\log(N_t/N_0)$) de la població inicial del microorganisme amb el temps d'incubació, sota les condicions en estudi: 10 i 37°C, a partir de mostres tractades i no tractades prèviament per APH (200 MPa–2 min). A més, es va avaluar el dany subletal generat per el tractament d'APH i per les infusions de subproductes de mandarina i coliflor sobre *S. Typhimurium* al llarg de la seua posterior incubació i es va determinar el contingut total de polifenols de les infusions obtingudes. Totes les corbes d'inactivació de *S. Typhimurium* es van ajustar al model de Weibull. Els resultats obtinguts van permetre determinar que les infusions de subproductes de mandarina i coliflor tenen una alta capacitat antimicrobiana front a *S. Typhimurium*, que el tractament per APH utilitzat (200MPa–2min) ocasiona un dany subletal d'un cicle logarítmic sobre *S. Typhimurium*, i que la combinació del poder antimicrobià de les infusions de subproductes de mandarina i coliflor amb el tractament d'APH, genera un efecte sinèrgic en la inactivació microbiana. Els valors cinètics de Weibull demostren un augment de la velocitat d'inactivació del microorganisme degut a la exposició a les infusions de subproductes, al tractament d'APH i a la combinació de ambdós. Els resultats d'aquest treball obrin una via de reutilització dels subproductes de mandarina i coliflor com a antimicrobians per al control del creixement de *S. Typhimurium*.

Palabras claves: Altas presiones hidrostáticas, antimicrobianos naturales, subproductos agroindustria, *Citrus reticulata*, *Brasica oleracea L. var botrytis*, *S. Typhimurium*.

1.-INTRODUCCIÓN

La industria agroalimentaria genera, como resultado de la recolección de materias primas y la elaboración de productos alimenticios, miles de toneladas de subproductos, constituidos por pieles, cáscaras, semillas, hojas y otras fracciones no comestibles (Marín *et al*, 2007; Pérez-Jiménez *et al* 2015). Así, recientes estudios indican que más de 1 millón de toneladas de residuos vegetales, provenientes de la industria agroalimentaria se producen en la Unión Europea por año (Stojceska *et al*, 2008).

En la actualidad, estos subproductos generan problemas ambientales debido a que se suelen destinar al vertido o la incineración y, además, la manipulación y descarte de los mismos representa un coste importante para los fabricantes. Es por ello, que se está trabajando en estrategias para el aprovechamiento de los mismos, centradas en proporcionarles un valor añadido, para su utilización en alimentación animal, desarrollo de alimentos funcionales, fertilizantes o antimicrobianos naturales, entre otros (Llorach *et al*, 2003; Marín *et al*, 2007). De esta manera, la reutilización de estos subproductos puede ser de gran beneficio económico para los procesadores de alimentos (Wijngaard *et al* 2009).

Numerosos estudios demuestran que los subproductos de frutas y vegetales pueden ser una fuente abundante de compuestos bioactivos con beneficios para la salud como los polifenoles, los cuales poseen propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antimicrobianas (Balasundram *et al.*, 2006 y Peschel *et al.*, 2006).

Concretamente, los subproductos de muchas especies del genero *Citrus* (naranjas y mandarinas) han demostrado que poseen un fuerte potencial antioxidante y son una fuente importante de compuestos bioactivos como los aceites esenciales o los compuestos fenólicos (flavanonas principalmente) (Khan *et al.*, 2010; Ramful *et al.*, 2010; He *et al.*, 2011). Además, diversos estudios atribuyen propiedades antimicrobianas, bacteriostáticas y/o bactericidas a los aceites esenciales presentes en los cítricos (Dembitsky *et al*, 2012).

De la misma manera, existen estudios que demuestran que los extractos de muchas especies de la familia *Brassicaceae* ejercen efecto como antimicrobianos naturales, especialmente sobre patógenos bacterianos (Ahmet *et al.*, 2008), debido a que poseen sustancias como glucosinolatos, flavonoides y compuestos fenólicos (Stojceska *et al.*, 2008; Volden *et al.*, 2009; Köksal *et al.*, 2007; Brandi *et al.*, 2006).

La presencia de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas en ambas familias y en sus subproductos, abre la posibilidad a su posible revalorización y utilización como antimicrobianos naturales frente a patógenos alimentarios.

La *Salmonella* es una de las principales causas de las enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo. En 2010 se reportaron un total de 99,020 casos de salmonelosis en humanos en la UE, y *Salmonella* se detectó con mayor frecuencia en pollos de engorde fresco y carne de pavo (EFSA, 2011). En los EEUU se detectan cada año más de 40.000 casos de salmonelosis y los alimentos de origen animal se consideran como la fuente más probable de *Salmonella* (Finstad *et al.*, 2012).

Aunque se han identificado más de 2.500 serotipos de *Salmonella enterica*, la mayoría de las infecciones humanas por *Salmonella* son causadas por un número limitado de serotipos. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y Enteritidis son las causas más comunes de la salmonelosis humana en todo el mundo (Kramarenko *et al.*, 2014).

Actualmente las industrias alimentarias están enfocadas en el desarrollo de nuevas tecnologías para garantizar la calidad y seguridad de sus productos alimenticios. Estas nuevas tecnologías son tecnologías de conservación no térmicas, entendiéndose como tal a aquellas que no utilizan la temperatura como principal forma de inactivación de

microorganismos y enzimas (Pina-Perez et al, 2012). Entre estas nuevas tecnologías se encuentran los campos magnéticos oscilatorios, pulsos eléctricos de alta intensidad, ultrasonidos de alta intensidad, la irradiación y las altas presiones hidrostáticas (APH). En respuesta a esa continua necesidad de mejora en la calidad y la seguridad de alimentos, por parte de investigadores y productores, la tecnología de APH ha demostrado, en el procesamiento de alimentos sólidos y líquidos, que es capaz de preservar en gran medida las propiedades sensoriales y nutritivas del alimento a temperatura ambiente, presentando niveles adecuados de inactivación de microorganismos y enzimas (Polydera et al, 2003).

Por lo anterior descrito, radica la importancia del efecto combinado entre los antimicrobianos naturales obtenidos de subproductos y el uso de las altas presiones hidrostáticas (APH) sobre *Salmonella*, ya que, diversos estudios publicados hacen referencia a la aparición de un efecto sinérgico entre ambos sobre la inactivación microbiana, reduciendo la necesidad de tratamientos más severos (Ogihara et al., 2008 y Burt, 2004).

Por tanto, el propósito de este estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana de infusiones obtenidas a partir de subproductos de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*), en combinación con las Altas Presiones Hidrostáticas (APH), sobre *S. Typhimurium*.

2.-MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Microorganismo

Cultivos puros liofilizados de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (CECT 443) se proporcionaron por la Colección Española de Cultivos Tipo. La cepa en estudio fue rehidratada con 10 mL de medio de cultivo TSB (Scharlab Chemie, Barcelona, España). Después de 20 minutos, la cepa rehidratada se transfirió a 500 mL de medio cultivo TSB y se incubó a 37 °C, con agitación continua a 200 rpm durante 14 horas para obtener células en una fase de crecimiento estacionario. Posteriormente las células se centrifugaron dos veces a 4.000 rpm y 4 °C durante 15 minutos y luego se resuspendieron en caldo TSB. Después de la segunda centrifugación, las células se resuspendieron en 20 mL de caldo TSB con 20 % de glicerol, y luego se distribuyeron en crioviales de 2 mL con una concentración final de 10⁸ unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL). Las muestras de 2 mL se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización para los estudios de cinéticas de inactivación.

2.2.-Infusiones de subproductos de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*)

Los subproductos de mandarina y coliflor fueron proporcionados deshidratados y en forma de escamas por empresas externas pertenecientes al sector de la alimentación (INDULLEIDA S.A. y TRASA S.L.). A partir de los mismos, se prepararon infusiones al 10 % (p/v) de cada uno de los subproductos. Para ello se llevaron a ebullición 500 mL de agua de peptona tamponada (Buffered peptone water, BPW) (Scharlab, S.A., Barcelona, ESPAÑA) 0.1 % (p/v) sobre la que se añadieron 50 g de subproducto en escamas. La infusión se cubrió con papel de aluminio, dejándola reposar durante 30 minutos. Finalmente, se centrifugaron, a 4000 rpm, durante 15 min a 4°C y 3000 rpm, 5 min a 4°C las infusiones de coliflor y mandarina, respectivamente. Finalmente, se filtraron las infusiones obtenidas para eliminar las partículas en suspensión. Para la filtración se utilizó una bomba de vacío, un matraz kitasato, un embudo Büchner y papel de filtro Whatman de 11 y 2,5 µm. El filtrado obtenido se almaceno en tubos de 50 mL a -40°C.

2.3.-Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las infusiones de los subproductos de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*) frente a *S. Typhimurium*

Las infusiones fueron esterilizadas por filtración con el uso de filtros de jeringa de PVDF de 0,45 µm de diámetro de poro e inoculadas con el patógeno en estudio, con una concentración inicial de 10⁸ ufc/mL. Cada curva de crecimiento/inactivación del microorganismo se obtuvo por dilución y siembra de alícuotas tomadas a intervalos de tiempo regulares durante su incubación a 10 y 37°C. Las diluciones se efectuaron en agua de peptona estéril al 0.1%, las siembras por inmersión y los recuentos en placas de TSA transcurridas 24 horas a 37°C.

La capacidad antimicrobiana de los subproductos en estudio se evaluó en términos de crecimiento/inactivación ($\log(N_t/N_0)$) de la población inicial con el tiempo de incubación, siendo N_0 (ufc/mL) el número inicial de microorganismos a tiempo cero, y N_t (ufc/mL) el número final de microorganismos a cada tiempo t (h); y bajo las condiciones en estudio: 10 y 37°C.

2.4.-Tratamiento de altas presiones hidrostáticas (APH) sobre *S. Typhimurium*

El tratamiento por APH se llevó a cabo utilizando el equipo EPSI NV (Temse, Bélgica), disponible en la planta piloto del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. El equipo consta de una vasija, la cual puede trabajar entre -5 y 60°C y con una presión máxima de 600 MPa. El efecto del procesado por APH sobre *S. Typhimurium* se evaluó inicialmente a diferentes niveles de presión y tiempo, tal como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1.-Tratamientos de APH evaluados durante la parte experimental frente a *S. Typhimurium*.

Presión (MPa)	Tiempo (min)	Presión (MPa)	Tiempo (min)
500	5	350	5
450	5	200	2 y 5
400	5	100	2 y 5

Las muestras a tratar se prepararon inoculando 10⁸ ufc/ml de *S. Typhimurium* en agua de peptona tamponada (Buffered peptone water, BPW) (Scharlab, S.A., Barcelona, ESPAÑA) 0.1 % (p/v) y luego colocadas en bolsas de polietileno metalizadas y termo-selladas (MULTIVAC, Thermosealer). Posteriormente fueron introducidas en el interior de la vasija.

Se seleccionó para el ensayo el nivel de presión de 200 MPa, y tiempo de tratamiento de 2 min por producir únicamente un ciclo logarítmico de daño celular y poder contar con 5 ciclos logarítmicos de *S. Typhimurium* para realizar el estudio de crecimiento/inactivación del microorganismo en presencia de las infusiones.

2.5.-Efecto combinado de las altas presiones hidrostáticas (APH) y los antimicrobianos naturales presentes en las infusiones de subproductos de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*) sobre *S. Typhimurium*

Para estudiar de forma conjunta el efecto antimicrobiano de las infusiones de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*) y las APH, se compararon muestras de agua de peptona 0.1% y de infusión de subproducto de mandarina y coliflor inoculadas con *S. Typhimurium*, tratadas y no tratadas por APH (200 MPa – 2 min) e incubadas a 10 y 37°C, obteniéndose, en cada caso, curvas de crecimiento/inactivación

post-tratamiento que nos permiten evaluar si la aplicación de APH potencia los efectos que las infusiones tienen sobre *S. Typhimurium* a esas temperaturas.

La aplicación del tratamiento de 200 MPa - 2 minutos y la obtención de curvas de crecimiento/inactivación se llevaron a cabo siguiendo los protocolos anteriormente descritos, siendo aproximadamente 10^8 ufc/mL la concentración celular inicial.

2.6.-Evaluación del daño celular

El daño subletal generado por APH y por la actividad antimicrobiana de las infusiones de subproductos de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*) sobre *S. Typhimurium* se evaluó comparando el recuento en placa obtenido en TSA y en un medio estresante (TSA con 3% (p/v) de cloruro de sodio (NaCl) (Wuytack E *et al*, 2003)) antes y después de la aplicación de los tratamientos de APH y durante su posterior incubación. Esto fue posible porque en medios generales como el TSA crecen todo tipo de células de viables, estén dañadas o no, mientras que en medios con presencia de sal, como el TSA más 3% de NaCl (NaCl; Scharlab S.L., España) sólo crecen las células intactas o no dañadas (Arroyo *et al.*, 2010).

Para cada tratamiento, el número de células inactivadas se estableció en base a la diferencia existente entre los recuentos de viables obtenidos pre y post-tratamiento. Por otro lado, el número de células dañadas se determinó en base a la diferencia existente entre el recuento de viables y el de intactas, es decir, entre el recuento post-tratamiento obtenido en placas de TSA sin sal y con sal.

De esta manera, a partir de los recuentos pre y post-tratamiento mediante APH, se calculó el número de células muertas, dañadas e intactas generado con cada uno de ellos y durante su posterior incubación a diferentes temperaturas. Con ellos, se construyeron histogramas de barras empleando el software Microsoft Office Excel® 2007 (Microsoft® Corporation, USA).

2.7.-Ajuste a modelos matemáticos

Todas las curvas de inactivación de *S. Typhimurium*, obtenidas tras la exposición a las infusiones de subproductos de mandarina y coliflor, combinadas o no con tratamientos de altas presiones hidrostáticas se ajustaron al modelo de Weibull, empleando el programa Statgraphics® Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., USA), cuya expresión matemática es la siguiente (Peleg y Cole, 1998):

$$\log_{10}(S(t)) = -b \times t^n$$

donde: S = fracción de supervivientes, es decir, el cociente entre N y N_0 , siendo N = concentración celular a tiempo t (ufc/mL) y N_0 = concentración inicial de las células (ufc/mL); b = factor de escala; t = tiempo (horas); y n = factor de forma (Rodrigo *et al.*, 2003).

La bondad de los ajustes se evaluó en base al coeficiente de correlación corregido (R^2 *corregido*) y al error cuadrático medio (MSE), teniendo en cuenta que la elección del modelo es adecuada si el valor del primero se aproxima a 1 y el del segundo a 0.

2.8.-Medida del contenido total de polifenoles en las infusiones de subproductos de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*)

El contenido total de polifenoles de los subproductos vegetales se determinó espectrofotométricamente de acuerdo con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se prepararon patrones de calibración de ácido gálico con

concentraciones de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 1000 ppm. A continuación, 3 mL de solución de carbonato de sodio (2% (w/v)) (Sigma-Aldrich Co. LLC, EE.UU.) y 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 (v/v)) (Sigma-Aldrich Co. LLC, EE.UU.) se añadieron a una alícuota de 100 μ L de cada patrón de ácido gálico (Sigma-Aldrich Co. LLC, EE.UU.) o tubo de muestra. La mezcla se agitó en vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora. Se midió la absorbancia a 750 nm usando un espectrofotómetro Lan Óptica Modelo PG1800 (LABOLAN, España), y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) / L.

3.-RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.-Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las infusiones de los subproductos de mandarina y coliflor, de las APH y de la combinación de ambos frente a *S. Typhimurium*

3.1.1.- *Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la infusión de subproducto de mandarina (Citrus reticulata), de las APH y de la combinación de ambos frente a S. Typhimurium.*

Las figuras 1 y 2 muestran el efecto antimicrobiano de la infusión de mandarina al 10% respecto a la muestra control (0%) a través de la inhibición del crecimiento de *S. Typhimurium* sometida o no previamente a un tratamiento de APH (200 MPa - 2 min), a las temperaturas de incubación de 10 y 37°C. Así, se puede comparar el efecto antimicrobiano de la infusión de subproducto de mandarina y de la aplicación del tratamiento de APH, por separado y de forma combinada sobre *S. Typhimurium*.

La curva de crecimiento/inactivación para la concentración del 0% no tratada por APH (0% M NO APH) a la temperatura de incubación de 37°C (Figura 1), muestra que el microorganismo crece rápidamente sin que haya apenas fase de latencia o adaptación al medio. Esto suele ser normal cuando las células no han sufrido ningún tipo de estrés. En la hora 4 de incubación se observa un crecimiento hasta 10^8 ufc/ml, estabilizando su evolución en la hora 29 con 10^9 ufc/ml. Cuando las células se tratan con APH en ausencia de antimicrobiano (0% M APH) se observa un crecimiento celular más lento, motivado probablemente porque las células tras el tratamiento de APH tardan en recuperarse.

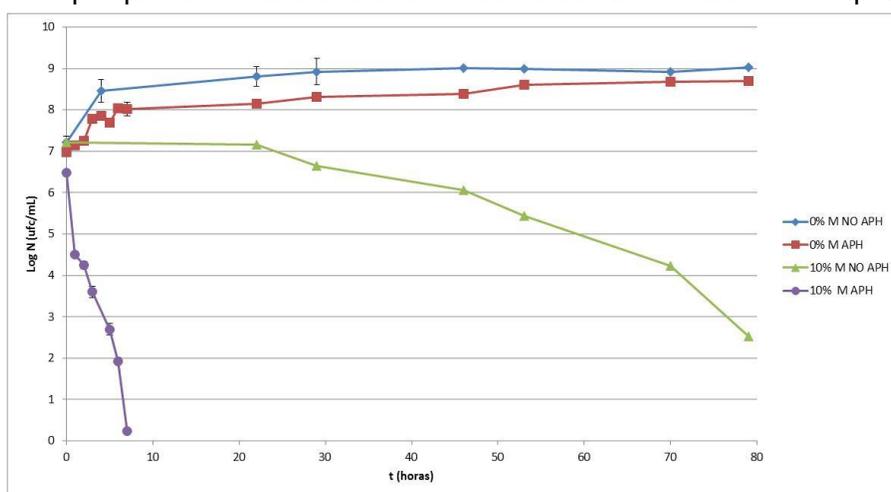


Figura 1.- Curva de crecimiento/inactivación de *S. Typhimurium* en presencia de infusión de subproducto de mandarina y APH a temperatura de incubación de 37°C.

La curva de crecimiento/inactivación del microorganismo en presencia de infusión de subproducto de mandarina al 10% no tratada por APH (10% M NO APH), muestra una inactivación celular bastante alta alcanzándose reducciones de alrededor de los 5 ciclos logarítmicos en *S. Typhimurium*. Diversos estudios científicos han demostrado también que los cítricos poseen capacidad antimicrobiana frente a bacterias gram negativas, debido a su alto contenido de flavonoides (Mandalari et al, 2007).

Al comparar las curvas de inactivación de la infusión de mandarina 10% tratada y no tratada por APH, se observa que en la muestra tratada por APH y posteriormente incubada en presencia de infusión (10% APH), la inactivación celular se inicia a partir la hora 0. La disminución de 5 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en 80 horas ocasionada por el poder antimicrobiano de la infusión de subproducto de mandarina (10% M NO APH) pasa a una disminución 6 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en 5 horas (10% M APH) por el efecto combinado del poder antimicrobiano de la infusión de subproducto de mandarina y las APH.

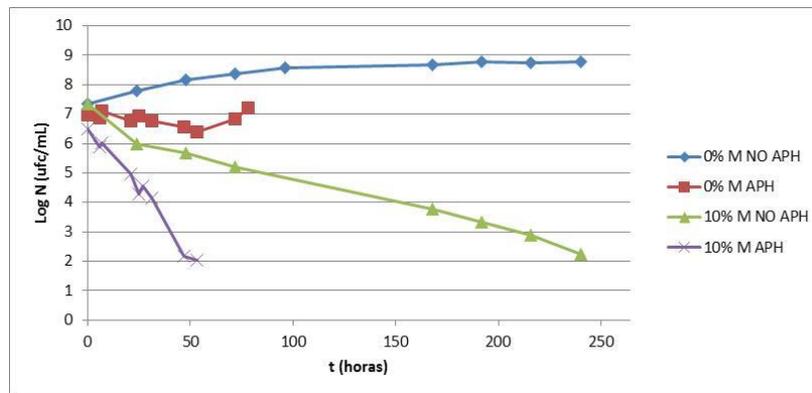


Figura 2.- Curva de crecimiento/inactivación de *S. Typhimurium* en presencia de infusión de subproducto de mandarina y APH a temperatura de incubación de 10°C.

A 10°C, se observan curvas de crecimiento del microorganismo más lentas (Figura 2), debido a la influencia de la temperatura sobre el crecimiento microbiano. Lo anterior se debe a que un microorganismo expuesto a temperaturas reducidas tiene un metabolismo más lento, por lo que necesita un mayor tiempo de recuperación (Swinnen *et al.*, 2004).

La curva de crecimiento con una concentración de 0% de infusión de subproducto de mandarina y no tratada por APH (0% M NO APH), presenta crecimiento celular más lento que en el caso de incubación a 37 °C, llegando a estabilizarse pasadas 170 horas de incubación. Por otra parte, en la curva de inactivación a concentración 0% de antimicrobiano tratada por APH (0% M APH), se observa una recuperación celular, donde a partir de la hora 54 el microorganismo comienza a crecer.

En la curva de inactivación con concentración de 10% de infusión de subproducto de mandarina y no tratada por APH, se observa el poder antimicrobiano de la misma, al producirse una reducción en el número de células viables, desde la hora 0, de 5 ciclos logarítmicos pasadas 248 horas de incubación. Adicionalmente, se observa claramente el efecto sinérgico de la infusión 10% y el tratamiento de APH sobre *S. Typhimurium*, disminuyendo 4,4 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en 53 horas. Algunos estudios han mostrado la ocurrencia de lesiones subletales después del tratamiento por APH, debido al daño de la membrana causado por la presurización, lo cual podría aumentar la sensibilidad a los agentes antimicrobianos (Somolinos *et al*, 2008).

3.1.2.- Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la infusión de subproducto de coliflor (*Brassica oleracea L. var botrytis*), de las APH y de la combinación de ambos frente a *S. Typhimurium*.

Las figuras 3 y 4 muestran el efecto antimicrobiano de la infusión de coliflor al 10% respecto a la muestra control (0%) a través de la inhibición del crecimiento de *S. Typhimurium* sometida o no previamente a un tratamiento de APH (200 MPa - 2 min), durante su incubación a 10 y 37°C. Así, se puede comparar el efecto antimicrobiano de la infusión de subproducto de coliflor y de la aplicación del tratamiento de APH, por separado y de forma combinada sobre *S. Typhimurium*.

A 37°C, (Figura 3) la curva de crecimiento/inactivación a 0% de infusión de subproducto de coliflor no tratada por APH (0% C NO APH), muestra crecimiento celular y una estabilización en la hora 7 de incubación. En la misma figura se puede observar como a 0% de infusión de subproducto de coliflor tratada por APH (0% C APH) el microorganismo en estudio tarda en recuperarse por el tratamiento por APH y comienza a crecer a partir de la hora 3 de incubación.

En la curva de crecimiento/inactivación que se obtiene cuando el microorganismo es expuesto a la infusión de subproducto de coliflor al 10% sin tratamiento previo por Altas Presiones (10% C NO APH) se observa una fase de latencia larga que termina a partir de la hora 5 con la fase de muerte del microorganismo, observándose en 8 horas una reducción de 2,5 ciclos logarítmicos en el número de células viables (ufc/mL). El resultado está en consonancia con los resultados obtenidos por Hu et al, (2004) confirmando la capacidad antimicrobiana de la familia *Brassicaceae* frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.

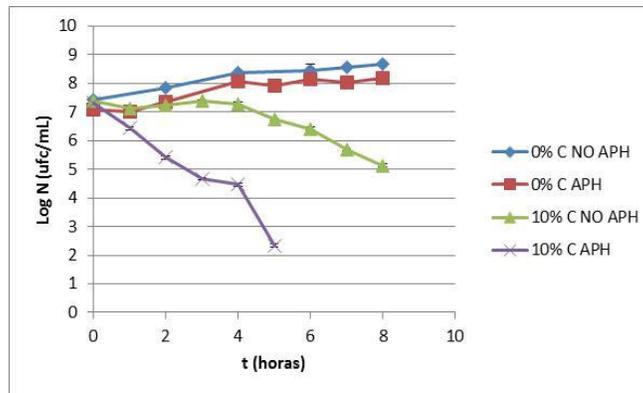


Figura 3.- Curva de crecimiento/inactivación de *S. Typhimurium* en presencia de infusión de subproducto de coliflor y APH a temperatura de incubación de 37°C.

A 37°C, al comparar las curvas de inactivación de la infusión de coliflor al 10% tratada y no tratada por APH, se observa la sinergia que existe entre ambas medidas de control (antimicrobiano y APH) donde la disminución del crecimiento celular se observa desde la hora 0 de incubación, pasando de 2,1 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en 8 horas (10% C NO APH) a una reducción 4,9 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en 5 horas (10% C APH). Otros estudios han demostrado efectos sinérgicos de inactivación con los tratamientos APH combinados con diferentes sustancias antimicrobianas (Somolinos et al, 2008).

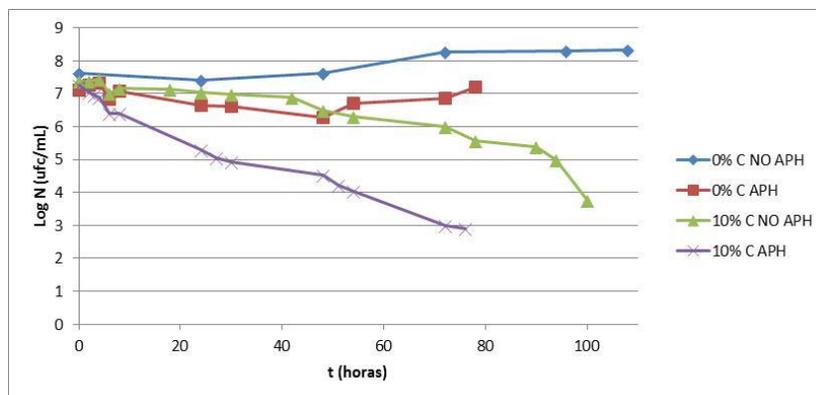


Figura 4.- Curva de crecimiento/inactivación de *S. Typhimurium* en presencia de infusión de subproducto de coliflor y APH a temperatura de incubación de 10°C.

La figura 4 muestra los resultados de los tratamientos pero incubando las muestras a 10 °C. La curva de crecimiento/inactivación con una concentración de 0% infusión de subproducto de coliflor y no tratada por APH (0% C NO APH), presenta una fase de latencia de 50 horas, tras la cual se inicia lentamente el crecimiento celular, llegando a estabilizarse pasadas 100 horas de incubación. Por otra parte, en la curva para la concentración 0% tratada por APH (0% C APH), se observa una recuperación celular a partir de la hora 54 de incubación, que es cuando el microorganismo comienza a crecer.

En la curva de crecimiento/inactivación para 10% infusión de subproducto de coliflor sin tratamiento de APH (10% C NO APH) se observa el inicio de la muerte celular a partir de la hora 4, alcanzando la inactivación de 3,6 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en 100 horas. Hay otros estudios que confirman la capacidad antimicrobiana de la familia *Brassicaceae* frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras como Hu et al, (2004).

En la curva de inactivación de la infusión de subproducto de coliflor al 10% tratada por APH, se observa el efecto sinérgico de la infusión 10% y el tratamiento de APH sobre *S. Typhimurium* a partir de la hora 0 de incubación, alcanzando una reducción de 4.36 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en 76 horas. Otros estudios han demostrado efectos sinérgicos de inactivación con tratamientos APH combinados con diferentes sustancias antimicrobianas (Somolinos *et al*, 2008). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo y los estudios publicados se podría decir que la tecnología no térmica de Altas Presiones Hidrostática sensibiliza a las células que sobreviven al tratamiento frente a los antimicrobianos naturales. Una consecuencia importante de estos resultados es la posible presencia de daño celular como primera diana para los antimicrobianos.

3.3.-Evaluación del daño celular en la población de *S. Typhimurium* expuesta a las infusiones de subproductos de mandarina y coliflor combinadas o no con un tratamiento de APH

*3.3.1.-Evaluación del daño celular en *S. Typhimurium* expuesta a la Infusión de subproducto de mandarina combinada o no con tratamiento de APH (200 MPa – 2 min)*

En las figuras 5, 6, 7 y 8, se pueden observar los resultados de daño de los microorganismos resultante de su exposición a la infusión de subproducto de mandarina, combinada o no con un tratamiento de APH.

En la figura 5, se detalla el número de células intactas, dañadas y muertas de la población de *S. Typhimurium* en la muestra control durante su incubación a 37°C, es decir, que no

había sido sometida a la infusión, ni al tratamiento por APH. En ella se observa que el daño es prácticamente nulo.

En la figura 6, se muestran los resultados obtenidos para la muestra tratada por APH sin ser expuesta a la infusión. Se observa un ligero daño inicial producido por el tratamiento de APH, que se incrementa a partir de la hora 2 y se mantienen durante las 8 horas de incubación. Las células intactas siguen multiplicándose.

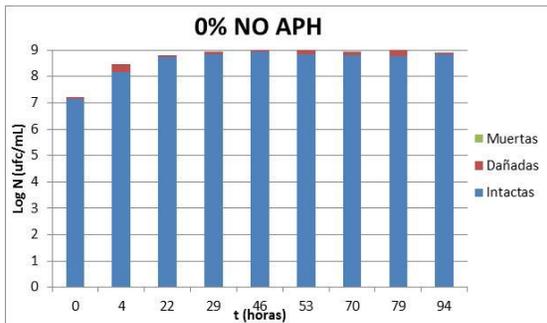


Figura 5.-Daño celular de *S. Typhimurium* sin tratamiento de APH (37°C)

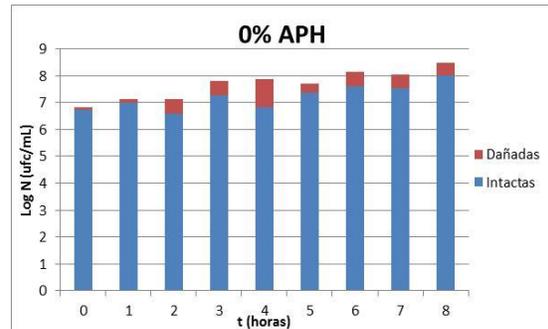


Figura 6.-Daño celular de *S. Typhimurium* por tratamiento de APH (37°C)

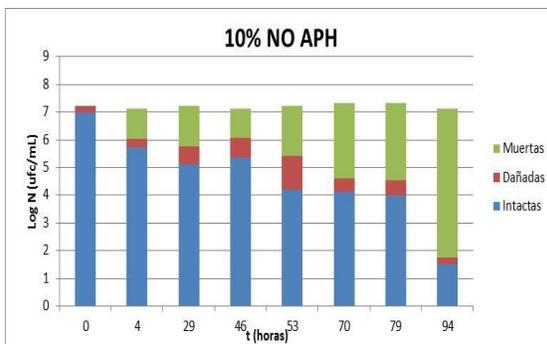


Figura 7.-Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la infusión de subproducto de mandarina (37°C)

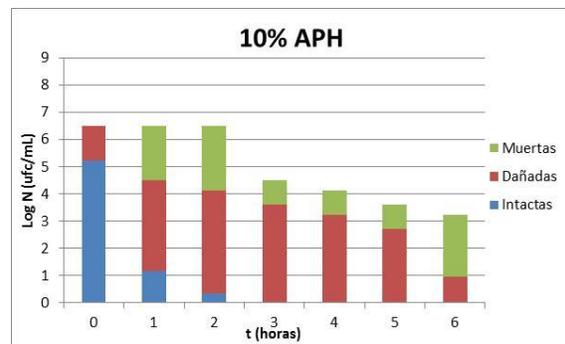


Figura 8.-Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la infusión de subproducto de mandarina y APH (37°C)

En la figura 7, se puede observar el daño celular ocasionado por la infusión de mandarina al 10% sobre *S. Typhimurium*. A lo largo del tiempo de incubación las células intactas disminuyen.

En la figura 8, se destaca el efecto sinérgico de la capacidad antimicrobiana de la infusión de subproducto de mandarina y del tratamiento de APH, donde transcurridas 3 horas desaparecen las células intactas, las células dañadas no logran recuperarse y finalmente mueren. Al cabo de 5 horas, quedan solamente 2,5 ciclos logarítmicos (ufc/mL) de células dañadas y en la hora 6 se alcanza la inactivación total del microorganismo. Otros estudios publicados, demuestran la ocurrencia de daños subletales después de una exposición a APH, resaltando su importancia en la mejora de la conservación de alimentos (Polydera et al, 2003).

En las figuras 9, 10, 11 y 12, se representan los resultados obtenidos de células intactas, dañadas y muertas de *S. Typhimurium* durante su incubación a temperatura de refrigeración (10°C) en presencia de la infusión de subproducto de mandarina, combinado o no con un tratamiento de APH.

Como en el caso de la incubación a 37°C, en la figura 9, se observa un crecimiento y estabilización de la población de *S. Typhimurium*, en ausencia de daño. El crecimiento es más lento que a 37°C, por tratarse de una temperatura de refrigeración.

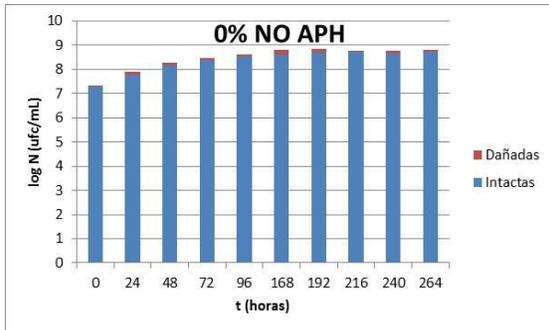


Figura 9.-Daño celular de *S. Typhimurium* sin tratamiento de APH (10°C)

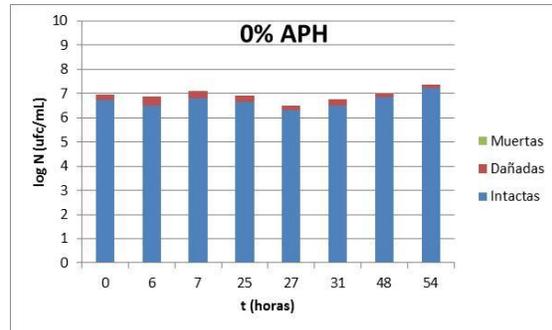


Figura 10.-Daño celular de *S. Typhimurium* por tratamiento de APH (10°C)

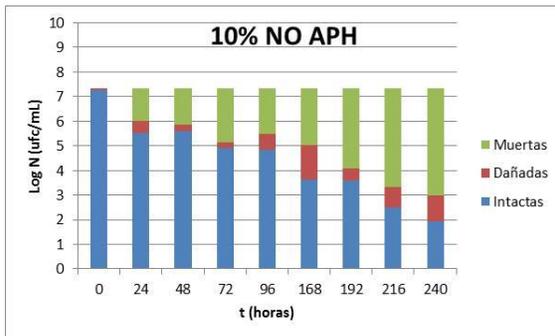


Figura 11.-Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la infusión de subproducto de mandarina (10°C)

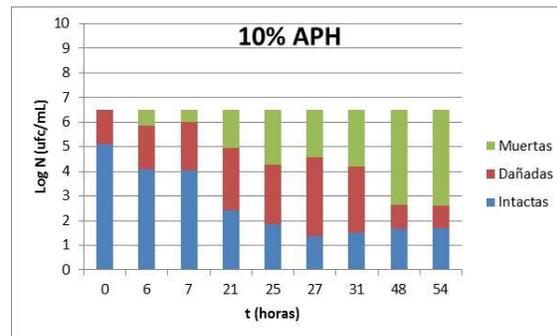


Figura 12.-Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la infusión de subproducto de mandarina y APH (10°C)

En la figura 10, se observa el efecto del tratamiento por APH. Las células de *S. Typhimurium* experimentan un ligero daño inicial, que se mantiene a lo largo de la incubación.

En la figura 11, se observa el daño ocasionado por la infusión de mandarina al 10% sobre las células de *S. Typhimurium* a temperatura de incubación de 10°C. Se observa un número variable de células dañadas a lo largo de la incubación, que no pueden recuperarse y acaban convirtiéndose en células muertas.

La figura 12 destaca el efecto sinérgico de la capacidad antimicrobiana de la infusión de subproducto de mandarina y del tratamiento de APH a una temperatura de incubación de 10°C, donde se presenta una disminución de las células intactas de 3,1 ciclos logarítmicos (ufc/mL) pasadas 54 horas, las células dañadas se incrementan y las células muertas aumentan progresivamente hasta los 3,5 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en 54 horas. Existen estudios que demuestran la ocurrencia de lesiones subletales después del tratamiento por APH, debido al daño de la membrana causado por la presurización, lo cual aumenta la sensibilidad ante otros agentes antimicrobianos (Somolinos *et al*, 2008).

3.3.2.- Evaluación del daño celular en *S. Typhimurium* expuesta a la Infusión de subproducto de coliflor combinada o no con tratamiento de APH

En las figuras 13, 14, 15 y 16, se pueden observar los resultados de células intactas, dañadas y muertas de *S. Typhimurium* durante su incubación a 37°C en presencia de la infusión de subproducto de coliflor, combinada o no con un tratamiento de APH.

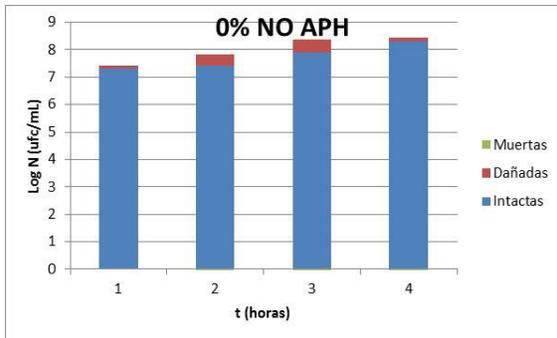


Figura 13.-Daño celular de *S. Typhimurium* sin tratamiento de APH (37°C)

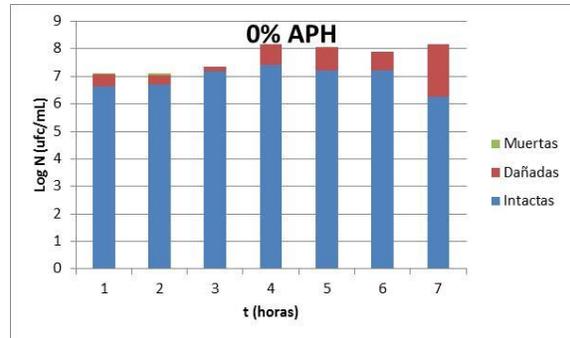


Figura 14.-Daño celular de *S. Typhimurium* por tratamiento de APH (37°C)

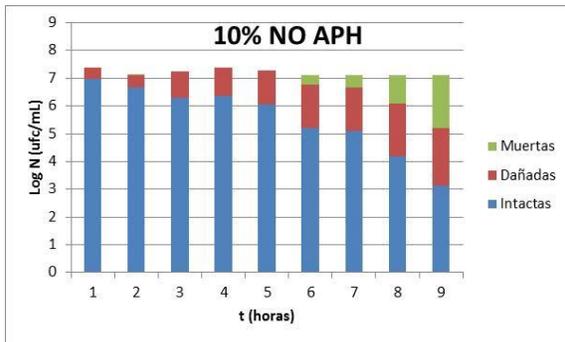


Figura 15.-Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la infusión de subproducto de coliflor (37°C)

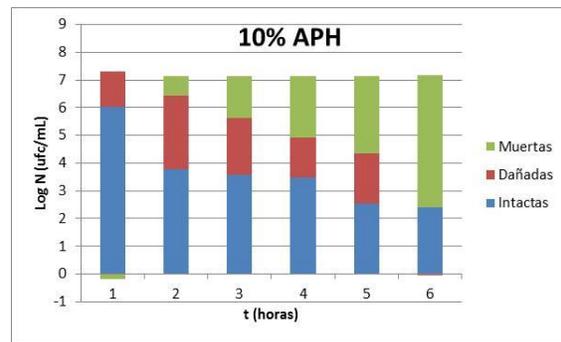


Figura 16.-Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la infusión de subproducto de coliflor y APH (37°C)

En la figura 14 se observa el daño celular causado por el efecto del tratamiento por APH, al compararlo con la figura 13, ya que se aprecia un incremento de las células dañadas en la población inicial de *S. Typhimurium*. Este daño inicial se mantiene a lo largo de la incubación y ralentiza la recuperación y crecimiento de la población de *S. Typhimurium*.

En la figura 15, se observa el daño celular provocado por el efecto de la infusión de subproducto de coliflor, donde a partir de la hora 3 de incubación se incrementan el número de células dañadas, las cuales siguen aumentando hasta llegar a la hora 9. En la medida que las células dañadas van creciendo, las células intactas van disminuyendo y es a partir de la hora 6 de incubación cuando las células empiezan a morir.

En la figura 16 se muestra la sinergia del efecto combinado entre la infusión del subproducto de coliflor y el tratamiento por APH. Se visualiza una rápida disminución de las células intactas y un incremento de las células dañadas y muertas a lo largo de la incubación. En un periodo de 6 horas, las células intactas pasan de 6 a 2,2 ciclos logarítmicos (ufc/mL), aumentando las células dañadas y alcanzando 5 ciclos logarítmicos (ufc/mL) de células muertas. Todo esto demuestra la efectividad de los tratamientos y ratifica su uso combinado en la conservación de los alimentos. Aymerich *et al*, 2005,

señala también que la asociación de las APH con antimicrobianos representa un eficiente tratamiento no térmico para la conservación de los alimentos.

En las figuras 17, 18, 19 y 20, se representan los resultados del daño celular ocasionado en la población de *S. Typhimurium* a temperatura de incubación de 10°C en presencia de la infusión de subproducto de coliflor, combinada o no con el tratamiento de APH

Al comparar las figuras 17 y 18, se visualiza el incremento del daño celular producido por el tratamiento de APH, que se mantiene a lo largo de la incubación y ralentiza la recuperación y crecimiento de las células de *S. Typhimurium*.

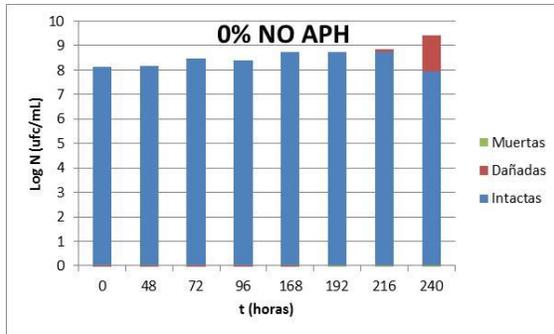


Figura 17.-Daño celular de *S. Typhimurium* sin tratamiento de APH (10°C)

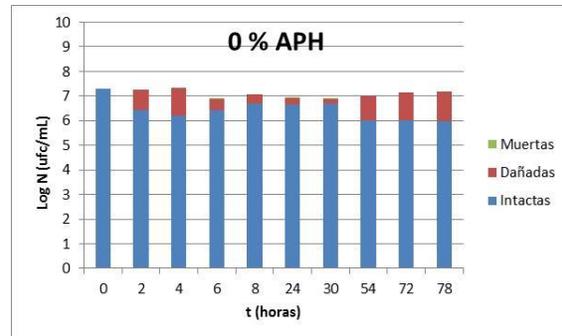


Figura 18.-Daño celular de *S. Typhimurium* por tratamiento de APH (10°C)

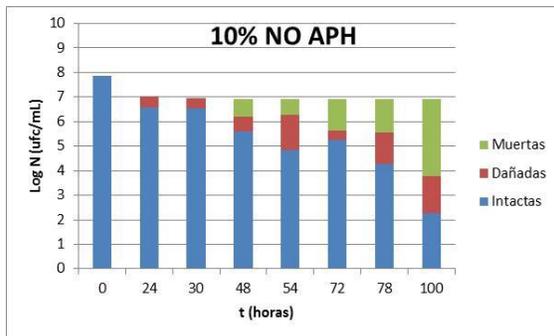


Figura 19.-Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la infusión de subproducto de coliflor (10°C)

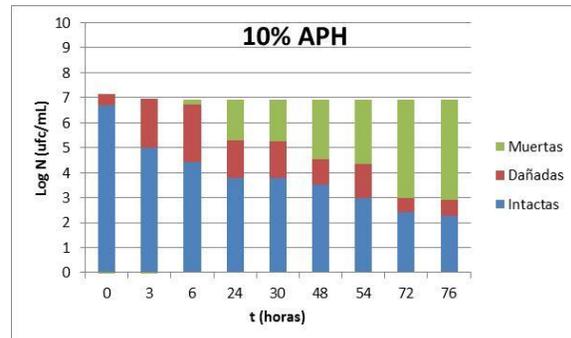


Figura 20.-Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la infusión de subproducto de coliflor y APH (10°C).

La figura 19, muestra el efecto de la infusión de coliflor sobre la población de *S. Typhimurium*, donde disminuyen progresivamente las células intactas, se incrementan las dañadas y muertas. Al cabo de 100 horas de incubación a 10°C, la reducción de las células intactas fue de 5,7 ciclos logarítmicos (ufc/mL).

En la figura 20, se aprecia el efecto combinado de la infusión de subproducto de coliflor y el tratamiento de APH sobre *S. Typhimurium*. Las células intactas se reducen 1,8 ciclos logarítmicos (ufc/mL) en las primeras 3 horas de incubación. En la medida que disminuyen las células intactas, incrementan las dañadas y las muertas. Al cabo de 76 horas, las células intactas disminuyeron en 4,6 ciclos logarítmicos (ufc/mL). Otros autores indican que la aparición de lesiones subletales después del tratamiento APH aumenta la sensibilidad ante los agentes antimicrobianos (Somolinos *et al*, 2008).

3.4.-Ajuste a modelos matemáticos

Todas las curvas de crecimiento/inactivación obtenidas se ajustaron al modelo matemático de Weibull, dada su simplicidad y robustez para describir cinéticas de inactivación lineales ($n = 1$), cóncavas ($n < 1$) y convexas ($n > 1$) (Mafart et al., 2002).

En las tablas que se muestran a continuación, se detallan los valores de b y n obtenidos en cada caso, así como el R^2 corregido y el MSE asociado a cada ajuste.

Tabla 2.-Estimación de los parámetros cinéticos (media \pm desviación estándar) de la distribución de Weibull, en función de la temperatura y concentración de infusión de subproducto de mandarina tratada o no por APH.

Temperatura	APH	[Mandarina]%	b	n	R^2 ajustado	MSE
37°C	0	0	-1,10 \pm 0,15	0,10 \pm 0,04	0,977	0,013
		10	0,77 \pm 0,39	0,36 \pm 0,20	0,998	7,661
	200MPa, 2min	0	-1,01 \pm 0,13	0,15 \pm 0,07	0,986	0,170
		10	1,38 \pm 0,08	0,65 \pm 0,18	0,965	0,340
10°C	0	0	-0,08 \pm 0,01	0,52 \pm 0,03	0,959	0,062
		10	0,18 \pm 0,09	0,56 \pm 0,13	0,986	0,099
	200MPa, 2min	0	0,01 \pm 0,01	0,72 \pm 0,35	0,969	0,013
		10	0,02 \pm 0,01	1,37 \pm 0,18	0,966	0,198

Tabla 3.-Estimación de los parámetros cinéticos (media \pm desviación estándar) de la distribución de Weibull, en función de la temperatura y concentración de infusión de subproducto de coliflor tratada o no por APH.

Temperatura	APH	[Coliflor]%	b	n	R^2 ajustado	MSE
37°C	0	0	-0,41 \pm 0,09	0,34 \pm 0,002	0,958	0,058
		10	0,38 \pm 0,03	0,96 \pm 0,15	0,991	0,429
	200MPa, 2min	0	-0,10 \pm 0,03	1,27 \pm 0,16	0,971	0,209
		10	0,55 \pm 0,04	1,49 \pm 0,04	0,980	0,728
10°C	0	0	-0,08 \pm 0,05	0,51 \pm 0,15	0,977	0,361
		10	0,09 \pm 0,01	0,81 \pm 0,02	0,981	0,084
	200MPa, 2min	0	0,05 \pm 0,003	0,65 \pm 0,05	0,972	0,014
		10	0,26 \pm 0,01	0,64 \pm 0,006	0,965	0,069

En el caso de las curvas de crecimiento, el parámetro cinético b da un valor negativo muy cercano a 0. Eso indica que no hay muerte. En el caso de las curvas de inactivación, en general, se observa que a mayor temperatura de incubación (37°C), los valores de b son más elevados lo cual indica, que a mayor temperatura, mayor es la velocidad de la muerte del microorganismo. Otros estudios publicados demuestran el incremento de la velocidad de la muerte celular, en presencia de antimicrobianos y temperaturas de 37°C (Espinosa *et al.*, 2009).

En la mayoría de los casos, se observa que los valores de b obtenidos en las curvas sin tratamiento son menores a los obtenidos en las curvas con tratamiento de APH, por tanto, la velocidad de la muerte celular es mayor en las curvas tratadas por APH. Esto se debe a que el tratamiento por APH produce una disminución de la carga microbiana inicial y que parte de ella está dañada, siendo más susceptible a la muerte celular (Moody *et al.*, 2014).

Además, cuando se combina el tratamiento de APH con la exposición a las infusiones de subproducto, se observa un aumento en los valores de b y, por lo tanto, de la velocidad de inactivación del microorganismo, respecto a los valores que se obtenían por el efecto de cada uno de ellos por separado.

3.5.-Medida del contenido total de polifenoles en las infusiones de subproductos de mandarina (*Citrus reticulata*) y coliflor (*Brasica oleracea L. var botrytis*).

Utilizando el método de Folin-Ciocalcetau, fue calculada la curva de calibración para la detección de los polifenoles totales presentes en las infusiones de mandarina y coliflor.

Tabla 4.- Contenido de polifenoles totales (mg ácido gálico/L) de las infusiones de subproductos de mandarina y coliflor a una concentración del 10%.

Infusión	Contenido de Polifenoles (mg ácido gálico/L)
Mandarina (10%)	3958,75 ± 185,62
Coliflor (10%)	4560,00 ± 433,90

Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 4. No se aprecian diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las infusiones de subproductos de mandarina y coliflor, sin embargo, el contenido de polifenoles totales en la infusión de subproducto de coliflor es ligeramente mayor. Este resultado se podría relacionar con la capacidad antimicrobiana obtenidas para cada una de las infusiones, donde la infusión del subproducto de coliflor presenta un mayor poder de inactivación frente a *S. Typhimurium*.

4.-CONCLUSIONES

- Las infusiones de subproductos de mandarina y en mayor medida de coliflor tienen una alta capacidad antimicrobiana frente a *S. Typhimurium*.
- El tratamiento por APH utilizado (200MPa – 2min) ocasiona un daño subletal de 1 ciclo logarítmico sobre *S. Typhimurium*.
- La combinación de la capacidad antimicrobiana de las infusiones de subproductos de mandarina y coliflor con el tratamiento de APH, genera un efecto sinérgico en la inactivación microbiana.
- El cálculo de las velocidades de inactivación del microorganismo confirma la capacidad antimicrobiana de las infusiones de coliflor y mandarina y el efecto sinérgico de la combinación de éstas con el tratamiento de APH.
- Los resultados del presente trabajo abren una vía de reutilización de los subproductos de mandarina y coliflor como antimicrobianos para el control del crecimiento de *S. Typhimurium*.

5.-AGRADECIMIENTOS

- ✓ A Dios todopoderoso, por haberme dado la vida y la fortaleza necesaria para alcanzar todas las metas propuestas.
- ✓ A la Universitat Politècnica de Valencia, gran casa de estudio, forjadora de profesionales.

- ✓ Al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), a mis directores Antonio Martínez López y María Dolores Rodrigo Aliaga, por permitirme trabajar con ustedes y brindarme todo su apoyo, confianza y conocimiento.
- ✓ A mi tutora experimental María Sanz Puig, por orientarme, apoyarme y aguantarme, gracias por tu paciencia y confianza.
- ✓ A Raquel y Patricia, por su gran apoyo.
- ✓ A Cathy, por tu continua sonrisa y conversaciones amenas.
- ✓ Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, amor, paciencia y los ánimos recibidos de mi madre, hermana, mi cuñi y Oreste, así como mis sobrinos Andrés y Rafael que llenan mi vida de felicidad.
- ✓ A mi padre y hermano, porque desde donde estén, me acompañan, cuidan y protegen.
- ✓ A Yusmely, por tu amistad, preocupación y gran apoyo, eres única.
- ✓ A mis amigos y compañeros de estudios por todos los momentos compartidos.
- ✓ A todos, una vez más, GRACIAS

6.-REFERENCIAS

- Ahmet, F., Hayirlioglu-Ayaz, S., Alpay-Karaoglu, S., Grúz, J., Valentova, K., Ulrichova, J., & Strnad, M. 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica Oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Science Direct*, 107:19-25.
- Arroyo, C., Somolinos, M., Cebrian, G., Confon, S., & Pagan, R. 2010. Pulsed electric fields causes sublethal injuries in the outer membrane of enterobacter sakazakii facilitating the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*. 51:525-531.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99:191-203.
- Brandi, G., Amagliani, G., Schiavano, F., De Santi, M., & Sisti, M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*, 69:2274-2279.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:223-253.
- Dembitsky V.M., Poovarodom S., Leontowicz H., Leontowicz M., Vearasilp S., Trakhtengerb, S., & Gorinstein S. 2012. The multiple nutrition properties of some exotics fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*, 44:1671-1701.
- Espinosa, J. 2009. Actividad antimicrobiana de la Stevia rebaudiana Bertoni. Tesis Final de Máster. Universitat Politècnica de Valencia.
- European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. 2011. The European Union summary report on trends and sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 9(3):2090.
- Finstad, S., O'Bryan, C., Marcy, J., Crandall, P., & Ricke, S. 2012. Salmonella and broiler processing in the United States: relationship to foodborne salmonellosis. *Food Research International*, 45:789-794.

- Hu, S., Wang, J., Kung, H., Lee, W., & Yang, Y. 2004. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 20:591-599.
- Koksal, E., & Gulcin, I. 2007. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32:65-78.
- Kramarenko, T., Nurmoja, I., Karssin, A., & Meremae, K. 2014. The prevalence and serovar diversity of *Salmonella* in various food products in Estonia. *Food Control*. 42:43-47.
- Llorach, R., Espín, J., Tomás-Barberán, F., & Ferreres, F. 2003. Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) by-products as a source of antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21:2181-2187.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., & Leguerinel, I. 2002 On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72:107-113.
- Mandalari, G., Bennett, R., Bisignano, G., Trombella, D., Saija, A., Faulds, C., Gasson, M., & Narbad, A. 2007. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*. 103:2056-2064.
- Marín, F., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., & Pérez-Alvarez, J. 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry* 100:736-741.
- Moody, A., Marx, G., Swanson, B., & Bermúdez-Aguirre, D. 2014. A comprehensive study on the inactivation of *Escherichia coli* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound. *Food Control* 37: 305-314.
- Ogihara H., Yatuzuka M., Horie N., Furukawa S., and Yamasaki M. 2008. Synergistic effect of high hydrostatic pressure treatment and food additives on the inactivation of *Salmonella enteritidis*. *Food Control*. 20:963–966.
- Pérez-Jiménez, J., & Viuda-Martos, M. 2015. Byproducts from agri-food industry: new strategies for their revalorization. *Food Research International* 73:1-2.
- Peschel, W., Sanchez, R., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., & Jimenez, D. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* 97:137-150.
- Pina Pérez M.C.; Martínez López A.; Rodrigo, D. 2012. Cinnamon antimicrobial effect against *Salmonella Typhimurium* cells treated by pulsed electric fields in pasteurized skim milk beverage. IATA-CSIC Departamento de Conservación y Calidad. Laboratorio de procesos de conservación. Spain 778-779.
- Polydera, A.C.; Stoforos N.G.; & Taoukis, P.S. 2003. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60:21–29.
- Rodrigo, D., Ruiz, P., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., Rodrigo, M. 2003. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 81:223-229.
- Singleton, V., & Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- Stojceska, V., Ainsworth, P., Plunkett, A., Ibanoglu, E., & Ibanoglu, S. 2008. Cauliflower by-products as a new source of dietary fibre, antioxidants and proteins in cereal based ready-to-eat expanded snacks. *Science Direct* 87:554-563.
- Swinnen, I., Bernaerts, K., Dens, E., Geeraerd, A., & Van Impe, J. 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:137-159.
- Volden, J., Bengtsson, G., & Wicklund, T. 2009. Glucosinolates, L-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica oleracea L. ssp. Botrytis*); effects of long-term freezer storage. *Food Chemistry*, 112:967-976.
- Wijngaard, H., Roble, C., & Brunton, N. 2009. A survey of irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 116:202-207.
- Wuytack, E., Phuong, L., Aertsen, A., Reyns, K., Marquenia, D., Ketelaere, B., Masschalkck, B., Van, L., Diels, A., & Nichiels, C. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*. 66:31-70.