

MEJORA DE LA SEGURIDAD Y LA VIDA ÚTIL DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL MEDIANTE MÉTODOS BIOLÓGICOS

MARIA JOSÉ GRANDE BURGOS, ANTONIO COBO MOLINOS, ANTONIO GÁLVEZ Y RUBÉN PÉREZ PULIDO

RESUMEN

Los alimentos de origen vegetal están a menudo implicados en la aparición de brotes de intoxicaciones alimentarias. El control biológico de los microorganismos patógenos o alterantes en alimentos vegetales no deja de ser una herramienta interesante, como lo demuestra la intensidad de los estudios realizados en este campo sobre los agentes antimicrobianos producidos por microorganismos, en especial los conocidos como bacteriocinas, así como los antimicrobianos naturales presentes en las plantas y sus aceites esenciales. Los bacteriófagos son una herramienta muy interesante para la inactivación de patógenos en alimentos, como lo demuestra el reciente desarrollo de preparados comerciales. Los antimicrobianos naturales funcionan mejor cuando se emplean como parte de la tecnología de obstáculos o barreras, pudiendo establecer efectos sinérgicos con otros agentes antimicrobianos o con tratamientos físico químicos.

Palabras clave: alimentos vegetales; bacteriocinas; aceites esenciales; bacteriófagos

ABSTRACT

Vegetable foods are often involved in outbreaks of foodborne illnesses. Biological control of human pathogenic and food spoiling bacteria in vegetable foods still remains a viable approach, as shown by the numerous studies published in recent years on antimicrobial substances from microorganismos, especially the so-called bacteriocins, as well as on plant-derived

* Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. E-mail: agalvez@ujaen.es

natural antimicrobial compounds and essential oils. Bacteriophages are also a relevant tool for inactivation of foodborne pathogens, as shown by recent development of commercial phage preparations. The efficacy of natural antimicrobials can be improved considerably if they are used as part of hurdle technology, since they can act synergistically with other antimicrobials or with physico-chemical treatments.

Keywords: vegetable foods; bacteriocins; essential oils; bacteriophages

1. INTRODUCCIÓN

Las estadísticas sobre incidencia de intoxicaciones y toxiinfecciones asociadas al consumo de alimentos nos indican que debemos mantener una alerta constante para garantizar la seguridad de los alimentos que consumimos (Berger et al., 2013; Braden y Tauxe, 2013; Lynch et al., 2009). El control de los microorganismos es uno de los principales retos de las industrias alimentarias, que deben invertir un esfuerzo importante en el empleo de sistemas de conservación de los alimentos, higiene, procesado y control de puntos críticos. Los consumidores prefieren incluir en su dieta alimentos frescos, crudos o mínimamente procesados. Sin embargo, se trata de alimentos con una vida útil limitada a menos que se mantengan congelados o refrigerados, y que pueden constituir un riesgo para la salud si no se conservan de forma adecuada. La alteración de los alimentos o sus materias primas provoca graves pérdidas económicas en el sector agroalimentario a nivel mundial. Los alimentos de origen vegetal cada vez destacan más por su implicación en la aparición de intoxicaciones o toxiinfecciones alimentarias.

2. MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y ALTERANTES EN ALIMENTOS VEGETALES

2.1. Alimentos vegetales crudos

Los alimentos vegetales crudos, preparados y listos para consumo (tales como brotes de alfalfa o de soja, o bien mezclas de vegetales troceados para ensaladas, col, lechuga u otros vegetales troceados) presentan una gran demanda en el mercado alimentario, ya que son considerados alimentos saludables que requieren poca elaboración. Pueden contener microorganismos patógenos de diverso tipo (p. ej. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* enteropatógena, *Salmonella*....), muchos de los cuales pueden sobrevivir o multiplicarse durante los procesos de distribución tras la recolección (Beuchat, 2002; Burnett y Beuchat, 2000, 2001; Lynch et al., 2009).

Para su preparación y procesado, este tipo de alimentos son sometidos con frecuencia a procesos de lavado con soluciones desinfectantes. Sin embargo, parte de los microorganismos no son eliminados en el lavado, y sobreviven protegidos en estomas, lamelas y otras zonas menos expuestas del vegetal. Durante su procesado, el riesgo microbiológico aumenta considerablemente tanto por contaminación cruzada como por las operaciones de corte y manipulación, alterando las barreras naturales a la penetración de los microorganismos a los tejidos del vegetal y liberando nutrientes que favorecen su proliferación.

Para su venta al consumidor, este tipo de alimentos generalmente son envasados en recipientes con una baja permeabilidad a los gases. Debido a la actividad metabólica de las células del vegetal y de los microorganismos presentes se crea una atmósfera de CO₂ y se reduce la tensión de oxígeno. Este ambiente, junto con el almacenamiento en frío, inhibe el crecimiento de muchos microorganismos. Sin embargo, muchos patógenos crecen o sobreviven en atmósferas modificadas bajo condiciones de refrigeración. Así mismo, el ambiente anaerobio permite el desarrollo de anaerobios estrictos (*Clostridium botulinum*), y el abuso de temperatura (bien en los puntos de venta, durante el transporte a casa, o en los refrigeradores domésticos) favorece el crecimiento microbiano.

2.2. Zumos de frutas

Los principales agentes implicados en brotes infecciosos por consumo de zumos han sido *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp., y *Cryptosporidium parvum* (Burnett y Beuchat, 2000, 2001; Tribst et al., 2009). Entre los principales microorganismos alterantes destacan *Alicyclobacillus acidoterrestris*, bacterias lácticas, levaduras, y en menor medida mohos y bacterias acéticas. Además de los problemas asociados a los zumos tradicionales, se observa un interés creciente por zumos de frutas exóticas debido a los compuestos con propiedades funcionales o bioactivos que contienen (Vieira et al., 2000; Rosso et al., 2008). Las alteraciones de los zumos pueden provocar provocando pérdidas millonarias en el sector (Dijksterhuis 2007). Por otra parte, los zumos y concentrados de frutas se utilizan como ingredientes de una gran variedad de alimentos y bebidas, incluyendo alimentos funcionales y/o probióticos, por lo que deben tener una calidad microbiológica óptima. También es muy importante el mercado mundial de purés de frutas, principalmente como materias primas para la elaboración de zumos, mermeladas, y en pastelería.

El pH ácido de los zumos de fruta es una barrera natural frente a la proliferación y supervivencia de microorganismos patógenos. No obstante, las bacterias adaptadas al estrés por acidez no sólo pueden sobrevivir en los zumos (como es el caso de *E. coli* y *Salmonella*) sino que muestran además una capacidad de supervivencia incrementada a las condiciones ácidas del estómago, aumentando el riesgo de infección. Además, muchos zumos de frutas (como sandía, melón, o muchos zumos de frutas exóticas tienen un pH suficientemente elevado para permitir la supervivencia y el crecimiento de los patógenos (Cobo Molinos et al., 2008; Tribst et al., 2009). Aunque no se ha descrito ningún brote de listeriosis asociado al consumo de zumos, *L. monocytogenes* puede crecer a temperaturas entre 10 y 30°C en una variedad de zumos y jugos de frutas (como melón, sandía, papaya o caqui; Caggia et al., 2009; Penteadó and Leitao 2004b; Uchima et al. 2008; Cobo Molinos et al., 2008). Recientemente, se ha descrito que *Cronobacter sakazakii* (una bacteria que provoca graves infecciones en recién nacidos, pero también en niños y adultos inmunodeprimidos) también puede crecer en diversos tipos de zumos (Beuchat et al., 2009).

Entre los microorganismos alterantes de zumos se reconocen tres grupos: bacterias acidúricas, mohos y levaduras. Las bacterias del ácido láctico (BAL), especialmente especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, son reconocidas como unas de las principales causantes de alteraciones en productos ácidos. Pueden generar metabolitos como el diacetilo o el acetil metilcarbinol que dan sabores similares a mantequilla. También producen láctico, acético, fórmico, etanol, CO₂, acroleína, polisacáridos, y aminas biógenas (Jay y Andersn, 2001). Aunque la presencia de BAL es más frecuente en los zumos no tratados (Oliveira et al., 2006a), la recontaminación de los zumos pasterizados durante las operaciones de llenado es también un problema importante, debido a fallos en la limpieza de los equipos. *Propionibacterium cyclohexanicum* ha sido aislada de zumos alterados, y es capaz de crecer en zumo de naranja, piña y tomate, y de sobrevivir a la pasterización (Kusano et al., 1997; Walker y Philips, 2007).

Las bacterias formadoras de endosporas representan un problema debido a la supervivencia de las endosporas a los procesos de pasterización. *A. acidoterrestris* es la principal bacteria acidófila de interés como alterante de zumos, confiriendo un sabor medicinal o fenólico debido a la producción de guayacol (Yamazaki et al., 1996; Silva and Gibbs, 2001). *Clostridium pasteurianum* es otra bacteria que puede ocasionar problemas en zumos pasterizados, debido a su capacidad para crecer en zumos y purés de tomate, pera, manzana o melocotón, generando gases (H₂ y CO₂) que provocan el hinchamiento de los envases, y alterando severamente el sabor y olor del producto (debido a la producción de butírico). Otras bacterias formadoras de endosporas, como *C. butyricum*, *Thermoanaerobium thermosaccharolyticum* y

Bacillus coagulans pueden provocar alteraciones en zumos de tomate y otros productos ácidos. *Geobacillus stearothermophilus* causa alteraciones en zumos cuando la temperatura ambiente es elevada, como en las regiones tropicales.

Algunos actinomicetos pueden actuar como alterantes de zumos, como en el caso de *Streptomyces griseus* (Siegmund and Pollinger-Zierler 2007), demostrando su capacidad de crecimiento en zumos de manzana y la producción de olores anómalos debido a los metabolitos que liberan (como geosmina y otros). Las esporas de *Streptomyces*, aunque mucho menos resistentes que las endosporas bacterianas, pueden sobrevivir a los tratamientos de pasteurización.

Entre las levaduras alterantes, destacan las especies de *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Kloekera*, *Torulaspota*, *Rhodothorula*, *Candida* y *Zygosaccharomyces*. *Z. bailii* es una de las principales causas de alteración de los zumos de frutas ((Tribst et al., 2009; Pitt and Hocking, 1999; de Souza Sant´Ana et al., 2010). Algunas especies de *Candida* recontaminan con frecuencia los zumos pasteurizados. Algunas cepas son extremadamente resistentes a los conservantes como el sórbico o el benzoico. Las levaduras son capaces de crecer a pH ácido y baja temperatura, y pueden provocar diversas alteraciones tales como producción de gas, turbidez, sedimentos, floculación o separación de fases debido a los efectos de las enzimas que liberan sobre las pectinas (Pitt and Hocking, 1999; Jay and Anderson, 2001). Algunas especies de hongos (*Byssoschlamys*, *Neosartorya*, *Eupenicillium* y *Talaromyces*) también pueden provocar alteraciones si existen pequeñas cantidades de oxígeno en el medio que permitan su crecimiento. Las ascosporas de estos hongos son termorresistentes, lo que facilita su persistencia tras la pasteurización.

2.3. Alimentos vegetales precocinados

El consumo de alimentos precocinados mínimamente procesados ha incrementado notablemente en una sociedad donde cada vez se dedica menos tiempo a la preparación de la propia comida. Muchos alimentos precocinados listos para consumo se preparan mediante cocción suave (65-95°C), siendo con posterioridad almacenados bajo refrigeración para prolongar su vida útil. Las células vegetativas son eliminadas durante el tratamiento térmico, pero las endosporas que sobreviven pueden germinar bajo condiciones adecuadas. La abundancia de nutrientes, la ausencia de microbiota competitiva, y el bajo contenido en conservantes de estos alimentos permite el crecimiento de microorganismos psicrotrofos durante su almacenamiento en condiciones de refrigeración. La interrupción en la cadena del frío, o el abuso de temperatura son también causa común de alteración por este tipo de microorganismos. Entre los mi-

croorganismos formadores de endosporas predominantes en alimentos precocinados refrigerados como los purés de verduras destacan las especies *Bacillus macroides*, *B. maroccanus*, *B. cereus*, *Paenibacillus amylolyticus*, y *P. polymyxa* (Guinebretiere et al., 2001). Se considera que *B. cereus* y *C. botulinum* son las principales bacterias de riesgo en alimentos precocinados (Carlin, 2000).

2.4. Alimentos fermentados

Los alimentos fermentados rara vez constituyen un riesgo para la salud desde el punto de vista microbiológico ya que los microorganismos patógenos son desplazados del ambiente durante la fermentación. No obstante, existen riesgos considerables de alteración, siendo las refermentaciones las más frecuentes, por lo que la mayoría de estos productos son sometidos a tratamiento térmico antes de su puesta en venta (Abriouel et al., 2011).

3. LOS BIOCONSERVANTES NATURALES COMO BARRERAS PARA MEJORAR LA CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Los bioconservantes se definen como agentes de origen natural que, gracias a su actividad antimicrobiana, permiten inactivar a los microorganismos en los alimentos, mejorando su seguridad e incrementando su vida útil a la vez que permiten reducir la adición de conservantes químicos. Los bioconservantes se aplican a menudo como parte de la tecnología de barreras, en la que la eficacia de los tratamientos combinados se ve claramente incrementada. Muchos bioconservantes han sido ensayados en combinación con conservantes químicos y también en combinación con métodos térmicos o con métodos no térmicos como las altas presiones, la luz ultravioleta, o los pulsos eléctricos. La combinación de bioconservantes con tratamientos por alta presión hidrostática ofrece una serie de ventajas en el caso de los alimentos de origen vegetal, ya que las altas presiones apenas tienen efecto sobre las propiedades organolépticas y el valor nutricional de los alimentos. Además, al aplicarse sobre el producto envasado, se evita el riesgo de posterior contaminación cruzada.

3.1. Bacteriocinas y bioconservación de alimentos

Las bacteriocinas son compuestos bacterianos de naturaleza proteica y síntesis ribosómica, primarios o modificados, que tienen un espectro de acción bactericida

relativamente estrecho sobre razas de la misma especie o de especies relacionada (Jack et al., 1995). La producción de bacteriocinas por bacterias del ácido láctico (BAL) y su utilización como bioconservantes ha despertado un enorme interés en las dos últimas décadas, siendo numerosas las bacteriocinas estudiadas (como la nisina, pediocina PA-1/AcH, lacticina 3147 y otras). En la actualidad existe una amplia experiencia sobre las posibilidades y limitaciones que ofrecen las bacteriocinas para su aplicación como bioconservantes en alimentos (revisado por Cleveland et al., 2001; Deegan et al., 2006; Gálvez et al., 2007, 2008, 2010, 2011a, 2011b; Abriouel et al., 2010).

Entre las múltiples bacteriocinas descritas destaca la nisina, que está autorizada como bioconservante (E234) en más de 50 países (Delves-Broughton et al., 1996; Thomas et al., 2000). La enterocina AS-48 también es una bacteriocina interesante. Se trata de un péptido cíclico con potente actividad antimicrobiana cuya estructura, determinantes genéticos y modo de acción son bien conocidos (Maqueda et al., 2004). La actividad de esta bacteriocina frente a bacterias patógenas o alterantes en alimentos de origen vegetal (vegetales crudos, zumos de frutas, alimentos preparados, productos enlatados...) sola o en combinación con otros antimicrobianos (incluidos aceites esenciales y sus componentes bioactivos) y tratamientos físico-químicos (calor, pulsos eléctricos) ha sido ampliamente estudiada por nuestro grupo de investigación (revisado por Abriouel et al., 2010; Grande et al., 2014).

Las plantaricinas son un conjunto de péptidos antimicrobianos producidos por *Lactobacillus plantarum*. La mayoría de los estudios realizados se han centrado en la aplicación de cepas productoras de plantaricinas como cultivos protectores en alimentos fermentados. La cepa *L. plantarum* 2.9 (aislada por nuestro grupo a partir de cereales fermentados) produce una fuerte actividad inhibidora frente a *B. cereus*, *E. coli* y *Salmonella* (Sánchez Valenzuela et al., 2008).

Las bacteriocinas producidas por especies del género *Bacillus*, aunque mucho menos conocidas, muestran un alto potencial para su aplicación en alimentos, hasta ahora inexplorado (Abriouel et al., 2011). La mersacidina es el lantibiótico de menor tamaño conocido, siendo activa frente a diversas bacterias Gram-positivas de interés en alimentos como *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *S. aureus* (incluyendo cepas resistentes a metilicina) (Barrett et al., 1992). Aunque este péptido antimicrobiano se produce a escala comercial, no se ha estudiado aún su posible aplicación en alimentos.

La adición de bacteriocinas potencia los efectos de las altas presiones (Hugas et al., 2002; Gálvez et al., 2007, 2011; Black et al., 2007). Nisina y lacticina 3147 incre-

mentan la inactivación de *L. monocytogenes* y *S. aureus* por alta presión hidrostática (APH) en lácteos (Morgan et al., 2000; Arqués et al., 2005). El tratamiento por APH sensibiliza a bacterias Gram-negativas a la nisina (Kalchayanand et al., 1994; Ponce et al., 1998; García-Graels et al., 1999; Masschalck et al., 2001; Garriga et al., 2002; Black et al., 2005). La enterocina AS-48 incrementa el efecto de APH frente a *Salmonella* en fuet (Ananou et al., 2010). La combinación de bacteriocinas como nisina o pediocina y APH incrementa la inactivación de las endosporas bacterianas (Capellas et al., 2000; Stewart et al., 2000; Kalchayanand et al., 2003; López Pedemonte et al., 2003; Black et al., 2005) o inhiben su posterior crecimiento en productos cárnicos o lácteos. A pesar de las investigaciones realizadas en productos lácteos y cárnicos, el efecto de los tratamientos combinados bacteriocinas/ APH en alimentos vegetales apenas ha sido estudiado.

3.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (como el de orégano, tomillo y otros) y sus compuestos bioactivos (como carvacrol, timol, eugenol, etc) son ampliamente reconocidos por su actividad antibacteriana y antifúngica además de antioxidante, y se adicionan en determinados alimentos para conferir sabor (Burt, 2004; Tiwari et al., 2009). Su actividad frente a las endosporas bacterianas en proceso de germinación es reconocida (Chaibi et al., 1997; Burt, 2004; Juneja y Friedman, 2007; Hernández-Herrero et al., 2008). También pueden potenciar la actividad antimicrobiana de bacteriocinas como la enterocina AS-48 y otras (Gálvez et al., 2007; Cobo Molinos et al., 2008, 2009), y de los tratamientos no térmicos como pulsos eléctricos y altas presiones (Pol et al., 2001; Karatzas et al., 2001; Vurma et al., 2006; Somolinos et al., 2008). A modo de ejemplo, la adición de citral o *tert*-butil-hidroquinona incrementó la eficacia de APH frente a *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. cerevisiae*. El potencial uso que ofrece esta gama de productos naturales no ha sido suficientemente explotado, debido al impacto que tienen sobre las propiedades organolépticas de los alimentos cuando se emplean solo. Sin embargo, en tratamientos combinados pueden incrementar la inactivación de los microorganismos a concentraciones mucho más bajas.

3.3. Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que atacan a las bacterias (Abedon, 2011). Están ampliamente distribuidos por la naturaleza, en la que juegan un papel importante

en el control de las poblaciones bacterianas de forma natural. Los bacteriófagos son altamente específicos, tanto a nivel de especie como de cepa, lo que hace que tengan poco impacto sobre el resto de las poblaciones microbianas de los alimentos. Además, son considerados como seguros ya que no atacan a células eucariotas. La EFSA ha dictaminado que determinados preparados a base de bacteriófagos carecen de efectos tóxicos para la salud humana. El interés por los bacteriófagos ha llevado al desarrollo comercial de preparados seleccionados por su especificidad frente a las especies de bacterias patógenas más relevantes transmitidas por alimentos vegetales (Abedon, 2011; Pérez Pulido et al., 2016). Muchos preparados han dado buenos resultados en alimentos vegetales para la inactivación de *E. coli* (Abuladze et al., 2008; Boyacioglu et al., 2013; Ferguson et al., 2013; Viazis et al., 2011), *S. enterica* (Kocharunchitt et al., 2009; Pao et al., 2004) y *L. monocytogenes* (Leverentz et al., 2004; Oliveira et al., 2014). Los preparados desarrollados son activos frente a un número elevado de cepas de la especie correspondiente, lo que dificulta la aparición de cepas resistentes. No obstante, es necesario mantener una búsqueda activa de bacteriófagos para rotar las preparaciones que se usan de forma masiva y de ese modo evitar una posible adaptación de la población bacteriana. Los preparados comerciales existentes en el mercado se recomiendan para la desinfección de materias primas, productos listos para consumo, así como de industrias de procesado de alimentos.

4. CONCLUSIONES

El riesgo de transmisión de microorganismos patógenos a través de los alimentos de origen vegetal ha renovado el interés de la comunidad científica por los métodos de bioconservación. Los estudios sobre aplicación de bacteriocinas en alimentos vegetales son bastante extensos, aunque de momento solo la nisina está autorizada como bioconservante alimentario. Los aceites esenciales y sus compuestos fenólicos activos pueden encontrar aplicaciones interesantes en aquellas condiciones en las que no comprometan las características organolépticas de los alimentos. Los bacteriófagos se presentan como una herramienta prometedora alternativa y segura para la eliminación de patógenos, y su aplicación despierta menos inconvenientes desde el punto de vista normativo en comparación con otros métodos de conservación. Los efectos sinérgicos de los bacteriófagos con otros antimicrobianos son un campo en el que todavía se han realizado escasos estudios.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon, S.T., 2011. Lysis from without. *Bacteriophage*, 1, 46-49.
- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Ben Omar, N., Gálvez, A., 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 201-232.
- Abriouel, H., Lucas, R., Omar, N.B., Valdivia, E., Gálvez, A., 2010. Potential Applications of the Cyclic Peptide Enterocin AS-48 in the Preservation of Vegetable Foods and Beverages. *Probiot. Antimicrob. Prot.* 2, 77-89.
- Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T., Senecal, A., Sulakvelidze, A., 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6230-6238.
- Ananou, S., Garriga, M., Jofré, A., Aymerich, T., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., 2010. Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Sci.* 84, 594-600.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M., 2005. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int. Dairy J.* 15, 893-900.
- Barrett, M.S., Wenzel, R.P., Jones, R.N., 1992. In vitro activity of mersacidin (M87-1551), an investigational peptide antibiotic tested against gram-positive bloodstream isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 641-644.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G., 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* 12, 2385-2397.
- Beuchat, L.R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 4, 413-423.
- Beuchat, L.R., Kim, H., Gurtler, J.B., Lin, L.C., Ryu, J.H., Richards, G.M., 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 204-213.
- Black, E.P., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., 2005. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6, 286-292.
- Black, E.P., Setlow, P., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Kelly, A.L., Hoover, D.G., 2007. Response of Spores to High-Pressure Processing. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 6, 103-119.
- Boyacioglu, O., Goktepe, I., Sharma, M., Sulakvelidze, A., 2013. Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh cut leafy greens: Using a bacteriophage cocktail in combination with modified atmosphere packaging. *Bacteriophage*, 3, e24620.
- Braden, C.R., Tauxe, R.V., 2013. Emerging trends in foodborne diseases. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 27, 517-533.
- Burnett, S.L., Beuchat, L.R., 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25, 281-287.
- Burnett, S.L., Beuchat, L.R., 2001. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 104-110.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- Caggia, C., Scifo, G.O., Restuccia, C., Randazzo, C.L., 2009. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. *Food Cont.* 20, 59-66.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Gervilla, R., Yuste, J., Guamis, B., 2000. Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiol.* 17, 633-641.

- Carlin, F., Girardin, H., Peck, M.W., Stringer, S.C., Barrer, G.C., Martínez, A., Fernández, A., Fernández, P.S., Waites, W.M., Movahedi, S., van Leusden, F., Nauta, M., Moezelaar, R., Del Torre, M., Litman, S., 2000. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: A FAIR collaborative project. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 117–135.
- Chaibi, A., Ababouch, L.H., Belasri, K., Boucetta, S., Busta, F.F., 1997. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiol.* 14, 161–174.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1–20.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16, 1058–1071.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., Gálvez, A., Gálvez, 2008. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *J. Food Prot.* 71, 2460–2467.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., Gálvez, A., 2009. Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds, and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salads. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2216–2223.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Anton. Van Leeuwen.* 69, 193–202.
- Dijksterhuis, J., 2007. Heat resistant ascospores In J Dijksterhuis J, RA Samson, eds. *Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food.* Chapter 7. Boca Raton: CRC Press.
- Ferguson, S., Roberts, C., Handy, E., Sharma, M., 2013. Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut lettuce introduced through cross-contamination. *Bacteriophage*, 3, e24323.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51–70.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., 2010. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 142–148.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N., 2011a. Biological control of pathogens and post-processing spoilage microorganisms in fresh and processed fruit and vegetables A2 - Lacroix, Christophe, in: *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 403–432.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas, R., Grande Burgos, M.J., 2011b. Bacteriocins for bioprotection of foods., in: Rai, M., Chikindas, M. (Eds.), *Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality*. CABI, Wallingford, pp. 39–61.
- Galvez, A., Lopez, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N.B., 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 125–152.
- García-Graells, C., Masschalck, B., Michiels, C.W., 1999. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *J. Food Prot.* 62, 1248–1254.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M., Hugas, M., 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19, 509–518.
- Grande Burgos, M.J., Pérez Pulido, R., López Aguayo, M.C., Gálvez, A., Lucas, R., 2014. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food application. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22706–22727.

- Guinebretiere, M. H., Berge, O., Normand, P., Morris, C., Carlin, F., Nguyen-The, C., 2001. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4520–4530.
- Hernández-Herrero, L.A., Giner, M.J., Valero, M., 2008. Effective chemical control of psychrotrophic *Bacillus cereus* EPSO-35AS and INRA TZ415 spore outgrowth in carrot broth. *Food Microbiol.* 25, 714–721.
- Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J.M., 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Sci.* 62, 359–371.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171–200.
- Jay, S., Anderson, J., 2001. Fruit juice and related products, in: Moir, C.J., Andrew-Kabifkas, C., Arnold, G., Cox, B.M., Hocking, A.D., Jenson, I. (Eds.), *Spoilage of Processed Foods: Causes and Diagnosis*. Australian Institute of Food Science and Technology, Waterloo, NSW Australia, pp. 187–197.
- Juneja, V.K., Friedman, M., 2007. Carvacrol, cinnamaldehyde, oregano oil, and thymol inhibit *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth in ground turkey during chilling. *J. Food Prot.* 70, 218–222.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P., Ray, B., 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4174–4177.
- Karatzas, A.K., Kets, E.P., Smid, E.J., Bennik, M.H., 2001. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.* 90, 463–469.
- Kocharunchitt, C., Ross, T., McNeil, D.L. 2009. Use of bacteriophages as biocontrol agents to control *Salmonella* associated with seed sprouts. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 453–59.
- Kusano, K., Yamada, H., Niwa, M., Yamasato, K., 1997. *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant omega-cyclohexyl fatty acid-containing propionibacterium isolated from spoiled orange juice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 825–831.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W., Camp, M.J., 2004. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J. Food Prot.* 67(8), 1682–1686.
- López-Pedemonte, T.J., Roig-Sagués, A.X., Trujillo, A.J., Capellas, M., Guamis, B., 2003. Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *J. Dairy Sci.* 86, 3075–3081.
- Lynch MF, Tauxe RV, Hedberg CW. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol. Infect.* 137, 307–315.
- Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Sánchez-Barrena, J., González, C., Albert, A., Rico, M., Valdivia, E., 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 5, 399–416.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 325–332.
- Morgan, S.M., Ross, R.P., Beresford, T., Hill, C., 2000. Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 414–420.
- Oliveira, J.C., Setti-Perdigão, P., Siqueira, K.A.G., Santos, A.C., Miguel, M.A.L., 2006. Microbiological characteristics of in natura Orange juice. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 26, 241–245.
- Oliveira, M., Vinas, I., Colas, P., Anguera, M., Usall, J., Abadias, M., 2014. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiol.* 38, 137–142.

- Pao, S., Randolph, S.P., Westbrook, E.W., Shen, H., 2004. Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds. *J. Food Sci.* 69, M127-129.
- Penteado, A.L., Leitao, M.F.F., 2004. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon watermelon and papaya pulps. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 89-94.
- Pérez Pulido, R., Grande Burgos, M.J., Gálvez, A., Lucas López, R., 2016. Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 851 - 861.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. Aspen, Gaithersburg.
- Pol, I.E., Mastwujk, H.C., Slump, R.A., Popa, M.E., Smid, E.J., 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *J. Food Prot.* 64, 1012-1018.
- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., Mor-Mur, M., 1998. Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 15-19.
- Rosso, V.V., Hillebrand, S., Montilla, E.C., Bobbio, F.O., Winterhalter, P., Mercadante, A.Z., 2008. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC) and acai (*Euterpe oleacea* Mart) by HPLC-PDA-MS,MS. *J. Food Compos. Anal.* 21, 291-299.
- Sánchez Valenzuela, A., Díaz Ruiz, G., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas López, R., Martínez Cañamero, M., Ortega, E., Gálvez, A., 2008. Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. *Food Cont.* 19, 842-848.
- Sant'Ana, A. de S., Dantigny, P., Tahara, A.C., Rosenthal, A., de Massaguer, P.R., 2010. Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssoschlamys fulva* in clarified apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 299-302.
- Sharma, M., 2013. Lytic bacteriophages. Potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce. *Bacteriophage*, 3(2), e25518.
- Siegmund, B., Pollinger-Zierler, B., 2007. Growth behavior of off-flavor forming microorganisms in apple juice. *J. Agr. Food Chem.* 55, 6692-6699.
- Silva, F.V.M., Gibbs, P., 2001. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 68-74.
- Somolinos, M., García, D., Pagán, R., Mackey, B., 2008. Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7570-7577.
- Stewart, C.M., Dunne, C.P., Sikes, A., Hoover, D.G., 2000. Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA 3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 49-56.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R., Delves-Broughton, J., 2000. Nisin. In: Naidu, A.S. (Ed.), *Natural food antimicrobial systems*. CRC Press, Boca-Raton, FL, pp. 463-524.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P.J., 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5987-6000.
- Tribst, A.A.L., Sant'Ana, A. de S., de Massaguer, P.R., 2009. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices--past, present and future perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 310-339.
- Uchima, C.A., Castro, M.F.P.M., Gallo, C.R., Rezende, A.C.B., Benato, E.R., Penteado, A.L., 2008. Incidence and growth of *Listeria monocytogenes* in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 235-239.

- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F., 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiol.* 28, 149-157.
- Vieira, M.C., Teixeira, A.A., Silva, C.L.M., 2000. Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuacu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. *J. Food Eng.* 43, 1-7.
- Vurma, M., Chung, Y.K., Shellhammer, T.H., Turek, E.J., Yousef, A.E., 2006. Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high-pressure processing. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 263-269.
- Walker, M., Phillips, C.A., 2007. The growth of *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juices and its survival following elevated temperature treatments. *Food Microbiol.* 24, 313-318.
- Yamazaki, K., Teduka, H., Shinano, H., 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 543- 545.