



Gıdalardaki Biyokoruyucu: Nisin (E234)

Başar Uymaz¹, Pınar Şanlıbaba^{2*}

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bayramiç Meslek Yüksekokulu Gıda Teknolojisi Programı, 17700, Bayramiç/Çanakkale, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 06110, Dışkapı/Ankara, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Geliş 04 Haziran 2015
Kabul 09 Kasım 2015
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

Anahtar Kelimeler:
Laktik Asit Bakterileri
Bakteriyosin
Nisin
Gıda Biyokoruyucusu
Gıda Muhafazası

* Sorumlu Yazar:

E-mail: pinarsanlibaba@hotmail.com

ÖZET

Fermentasyon gıdaları bozulma etmeni ve hastalık yapıcı mikroorganizmalara karşı korumak için kullanılan en eski geleneksel yöntemdir. Termal uygulamalar, pH ve su aktivitesinin düşürülmesi ve koruyucu katkı maddelerinin ilavesi yaygın kullanılan diğer gıda muhafaza teknikleridir. Koruyucu katkı maddesi olarak çok sayıda antibiyotik ve kimyasal ajan geliştirilmiş olmasına rağmen, bakterilerin kullanılan antibiyotiklere karşı hızla direnç kazanmaları, kimyasal koruyucuların insan sağlığını tehdit edici boyutlarının bulunması ile çeşitli alerjik reaksiyonlara neden olmaları kullanımlarını sınırlayan faktörlerdir. Son yıllarda tüketicilerde gelişen mikrobiyolojik açıdan güvenli ve minimum işlem görmüş gıdalara karşı oluşan talep doğrultusunda toksik veya herhangi bir olumsuz etkisi bulunmayan, Laktik Asit Bakterileri gibi insan tüketimi için güvenli bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler üzerine yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Yeni nesil antimikrobiyel ajan olarak kabul edilen bakteriyosinlerin koruyucu olarak kullanılmasının gıdaların raf ömrünün uzatılması, kimyasal koruyucuların kullanımının ve bozulma etmeni mikroorganizmaların neden olduğu ekonomik kayıpların azaltılması gibi önemli etkileri bulunmaktadır. FDA tarafından GRAS (Genel Olarak Güvenli) olarak tanımlanan ve E234 koduyla 'Nisin-koruyucu' veya 'doğal koruyucu' olarak gıda katkı maddeleri listesinde yer alan Nisin, ilk olarak 1988 yılında ABD'de antibiyotiklerin gıdalarda kullanımının yasaklanmasıyla doğal koruyucu olarak kullanılmıştır. Nisinin günümüzde 50'den fazla ülkede süt ve ürünlerinden konserve gıdalara kadar pek çok gıdanın korunmasında başarılı uygulamaları bulunmaktadır.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 3(12): 908-915, 2015

Biopreservative in Foods: Nisin (E234)

ARTICLE INFO

Article history:
Received 04 June 2015
Accepted 09 November 2015
Available online, ISSN: 2148-127X

Keywords:
Lactic Acid Bacteria
Bacteriocin
Nisin
Food Biopreservatives
Food Protection

* Corresponding Author:

E-mail: pinarsanlibaba@hotmail.com

ABSTRACT

Fermentation is the oldest traditional method in order to protect against spoilage and pathogenic microorganisms. Thermal treatment, pH and water activity lowering and preservative addition other food preservation techniques that are commonly used. Although, as preservatives, many improved antibiotic and chemical agents have been gained, there are some other factors such as rapid resistance to antibiotics used in bacteria, in order to limit their use in food, to be found dimensions of threatening human health of the chemical protection and to cause allergic reactions. Recently, studies on bacteriocins that are produced by the safe bacteria, such as lactic acid bacteria, contain no toxic and adverse effects for human consumption have gained sudden intensity in accordance with the request against consumers in developing microbiologically safe and minimal processed food. There are some important effects using of bacteriocins accepted the new generation of antimicrobial agents as food preservatives such as extension of shelf life, reducing of the use of chemical preservatives and the economic loss caused degradation by microorganisms. Nisin, defined as GRAS (Generally Recognized as Safe) by FDA and named the E234 code 'Nisin-protective' or 'natural protective' located in the food additives list, first used in 1988 as a natural preservative by prohibiting of antibiotics using in food in the US. Nowadays in more than 50 countries, there have been more successful implementation of the nisin protected up the food from milk and dairy products to canned foods many food products

Giriş

Fermente gıdaların tarihçesi antik çağlarda, sütün saklanması sırasında ekşimeye bağlı lezzet değişimlerinin keşfiyle başlamıştır. Çiğ materyallerin Laktik Asit Bakterileri (LAB) ile fermente edilerek yeni gıdaların üretilmesi ve çeşitli gıdaların bu yöntemle korunması, kurutmadan sonra bilinen en eski gıda muhafaza yöntemi olarak kabul edilmektedir. Gıdaların bozulmadan uzun süre muhafazası yanında, gıdaya yeni duyuşal özellikler de kazandıran bu sanatın ilk Hindistan kıtasında ortaya çıktığına dair bulgular bulunmaktadır. 8000 yıl önce bitki ve hayvanların ıslah edilmesine paralel olarak Irak'ta bereketli Tigris ve Euphrates nehirleri arasındaki bölgede peynir yapma prosesinin geliştirilmesi, M.Ö 2000–4000 yıllarında Mısırlıların şarap ve ekme yapımında mayalar kullanmaları, M.Ö. 1750 yılında Sümerlerin arpayı fermente ederek bira yapması ve M.S. 1500'lü yıllarda sauerkraut ve yoğurt yapımının keşfi fermantasyon sürecinin gelişimindeki önemli mihenk taşlarıdır. Antik çağlardan itibaren gıdaların ve içeceklerin korunmasında bir metot olarak kullanılan fermantasyonun koruyucu etkisinin belirli mikroorganizmalar tarafından ileri geldiği görüşü ise, 19. yüzyıl sonlarında kabul görmüştür (Ross ve ark., 2002). Bir proses olarak fermantasyonda farklı mikroorganizmaların (bira ve şarap üretiminde mayaların; fermente süt, sebze ve et üretiminde ise LAB'ın) faaliyeti ile çiğ materyalde bulunan karbonhidratların önemli bir bölümü organik asitlere dönüştürülmektedir. Sonuçta gıdada hem ekşitici etki oluşmakta hem de ortam pH'sının düşürülmesiyle koruyucu etkinin ortaya çıkması söz konusu olmaktadır. Süt bu bakteriler ile yoğurt, peynir, tereyağı ve kefir gibi ürünlere işlenmekte, yaygın olarak tüketilen fermente et ürünleri ve farklı sebzelerden üretilen turşular ise yine laktik asit fermantasyonuyla hazırlanmakta ve muhafaza edilmektedir. Gıdaları bozulma etmeni ve hastalık yapıcı etki gösteren mikroorganizmalara karşı korumak için, geleneksel yöntemlerin yanında çeşitli muhafaza metotları da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknikler; termal uygulamalar (pastörizasyon, sterilizasyon), pH ve su aktivitesinin düşürülmesi (asitlendirme ve dehidrasyon) ile koruyucu katkı maddelerinin ilavesidir. Katkı maddesi olarak kullanılan antimikrobiyel koruyucular antibiyotikler, sorbik asit ve sorbatlar, benzoik asit ve benzoatlar, kısa zincirli organik asitler (asetik asit, laktik asit, propiyonik asit), parabenler, sülfid ve nitrit olarak sıralanabilir. Gıdaların mikrobiyolojik stabilitesinin sağlanması amacıyla çok sayıda antibiyotik ve kimyasal ajan geliştirilmiş olmasına rağmen, bakterilerin kullanılan antibiyotiklere karşı hızla direnç kazanmaları, kimyasal koruyucuların insan sağlığını tehdit edici boyutlarının bulunması ve çeşitli alerjik reaksiyonlara neden olmaları gibi faktörler bunların gıdalarda kullanımını sınırlamaktadır. Yukarıda söz edilen bu metotlar gıda muhafazasında başarı sağlasa da, tüketicilerde kimyasal koruyucuların kullanılmadığı, doğal veya minimal işlem görmüş gıdalara karşı olan eğilim günümüzde giderek artmaktadır. Son yıllarda gıda fermantasyonlarında yararlanılan bakteri kültürleri ile bunların ürettikleri antimikrobiyel metabolitlerin gıda muhafazasında patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı doğal bir bariyer olarak kullanılması yoğun talep gören bir uygulamadır (Zacharof ve Lavitt, 2012).

LAB'ın Antimikrobiyel Etki Mekanizmaları

LAB Gram pozitif, katalaz negatif, sporsuz, hareketsiz, çubuk veya kok morfolojisine sahip patojen olmayan bakteriler olup; *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinsleri gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan türleri içermektedir. LAB'ın sahip olduğu proteolitik ve lipolitik enzimler aracılığıyla ortamda bulunan laktöz gibi karbonhidratların, proteinlerin ve lipitlerin parçalanması sonucu oluşan laktik asit gibi organik asitler ile aroma maddeleri; ürünün yapı, tekstür ve aromasına katkıda bulunurken, ortamın pH'sını da düşürmektedir. Bununla beraber LAB hidrojen peroksit (H_2O_2) ve bakteriyosin gibi antimikrobiyel aktivite gösteren metabolitleri de üretmektedirler. Çeşitli fermente gıdalarda doğal olarak bulunan veya başlangıç kültür olarak kullanılan birçok LAB'ın, bozulma etmeni mikroorganizmalar ile gıda kaynaklı patojenlere karşı gösterdikleri antimikrobiyel etki farklı mekanizmalarla açıklanabilmektedir (Çon ve Gökalp, 2000; Perin ve ark., 2015):

- LAB'ın karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu oluşan laktik ve asetik asit gibi organik asitlere karşı, gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma duyarlıdır ve düşen pH'yı tolere edememektedirler. Düşük pH değerlerinde bakteri hücrelerine girişi artan disosiyasyon olamamış laktik asit molekülü, hücre içinde disosiyasyon olarak zarlardaki proton motive gücü bozar. Böylece bakterinin membrana bağlı transport işlemine müdahale edilmiş olur. Laktik asit, pH 5'de endospor oluşturan bakterilere karşı mükemmel bir inhibitör olmakla birlikte, aynı pH'da maya ve küflere karşı etkisiz kalmaktadır. Laktik asit doğada çok yaygın olarak bulunan bir organik asit olup, asetik asit ile birlikte gıda koruyucusu olarak da kullanılmaktadır.
- Katalaz negatif özellik gösteren LAB, aerobik gelişim sırasında H_2O_2 ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi sitotoksik oksijen türevleri meydana getirmek suretiyle, mikrobiyel enzimlerin sülfidril gruplarını etkilemektedirler. Oluşan disülfid köprüleri veya sitotoksik oksijen türevlerinin mikrobiyel DNA üzerindeki olası mutajenik etkisi, bozulma etmeni olan gıda kaynaklı patojenler üzerinde etkili olmaktadır.
- Bazı LAB'lar tarafından üretilen diasetil, alkol ve CO_2 gibi metabolitler de bazı mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki göstermektedir.
- Bazı Gram negatif ve Gram pozitif LAB'lar gelişimleri sırasında antimikrobiyel aktiviteye sahip protein yapısında 'Bakteriyosin' veya 'Bakteriyosin Benzeri Metabolit' olarak adlandırılan ve özellikle de yakın akraba bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip bileşikler üretmektedir. LAB bakteriyosinlerinin etki mekanizmaları, bakteriyosinin hedef mikroorganizmanın hücre duvarındaki özel reseptörler aracılığıyla absorblanması ve hücre duvarında hasarlar meydana getirmesiyle açıklanmaktadır.

Tüm bu mekanizmalar ayrı ayrı inhibitör etkide bulunabilmesine rağmen, LAB'ın diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etkisi bunların yalnızca birine bağlı olmayıp, çoğunlukla bunların kombinasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Bakteriyosinler

Gıda güvenliği uluslararası öneme sahip bir sorundur. Örneğin; *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ssp., *Staphylococcus aureus* ve *Toxoplasma gondii* gibi mikroorganizmalar yaygın olarak gıda kaynaklı enfeksiyonlara veya zehirlenmelere neden olmaktadır (Zacharof ve Lavitt, 2012). Gıdalarda bulunan patojen mikroorganizmalar ile bozulma etmeni olanların gelişimini önlemek amacıyla, kimyasal koruyucuların kullanılmadığı, doğal ve minimum işlem görmüş gıdalara giderek artan talep doğrultusunda, gıda muhafazasında bakterilerden elde edilen antimikrobiyel bileşiklerin kullanılması üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaştırılmıştır (A.A. de Oliveira Junior ve ark., 2015).

Pek çok mikroorganizma türü mikrobiyel florada ekolojik nişlerini korumak veya varoluşlarını devam ettirebilmek için yarışmacı mikroorganizmaya karşı savunma sistemleri geliştirirler. Antimikrobiyel peptitlerin sentezi ise bu savunma sisteminin ilk ve en önemli aşamasını oluşturur. Ökaryotik ve prokaryotik pek çok tür, doğal bağışıklık sisteminin üyesi olan bu antimikrobiyel peptitleri sentezleme yeteneğindedir. Ancak ökaryotik antimikrobiyel peptitlerin çeşitli düzeylerde sitotoksik olmalarından dolayı gıda uygulamalarında kullanımları söz konusu değildir. Bakteriyosinler ise, Gram pozitif bakterilerden Gram negatif bakterilere kadar pek çok tür tarafından bakteriyel gelişimin ilk fazında ribozomal olarak sentezlenmekte ve yakın akraba türler üzerinde etki göstermektedir. Yüzyıllardır tüketilen süt, fermente süt ürünleri, fermente et ve sebzelerin doğal mikrobiyel florasını oluşturan pek çok LAB türü, aynı zamanda bakteriyosin üreticisidir. İlk tanımlanan bakteriyosin *E. coli*'de karakterize edilen kolisin'dir. Nisin ise 1928'de starter kültürlerin inhibisyonuyla peynir üretiminde karşılaşılan sorunların araştırılması sırasında keşfedilmiştir (Rogers, 1928; Rogers ve Whittier, 1928; Zhang ve Zhong, 2015). Mattick ve Hirsch (1944) tarafından karakterize edilen ve N grubu *Streptococcus* serotipleri tarafından üretilen bu antimikrobiyel bileşik, NİSİN (Group N Inhibitory Substance) olarak adlandırılmıştır. Günümüzde nisin 40 farklı *Lactococcus lactis* suşu tarafından üretilen 35 varyantı belirlenmiştir. Nisin üzerinde yapılan ilk çalışmalar daha çok teröpatik özellikleri nedeniyle klinik ve veterinerlikte kullanım potansiyelleri üzerinde başlamış, ancak vücut sıvılarında düşük çözünürlüğü, fizyolojik pH'lardaki kararsızlığı ve dar bir antimikrobiyel spektruma sahip olmaları nedeniyle son dönemde daha çok gıdalardaki kullanımları üzerine yoğunlaşmıştır (Meira ve ark., 2015).

Nisinin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Bugüne kadar farklı nisin varyantları (nisin A, nisin Z,

nisin Q, nisin U ve nisin F) tanımlanmış olup aralarındaki temel fark, primer yapıdaki bazı pozisyonlarda görülen aminoasit değişimleridir (Gharsallaoui ve ark. 2015). Nisin Z, nisin A'dan farklı olarak 27. pozisyonda histidin yerine asparajin aminoasitini içermektedir. Nisin A ve Z varyantının antimikrobiyel spektrumu benzerdir ve ticari preparatlarda kullanılmaktadır (de Vuyst ve Vandamme, 1994; Meira ve ark., 2015; Zhang ve Zhong, 2015). Gross ve Morell (1971) tarafından kimyasal yapısı açıklanan nisin A polipeptidinin moleküler ağırlığı 3510 Dalton olup, yapısında lantiyonin, metillantiyonin (Met-Lan), 2-3-dehidroksialanin (Dha) ve 2-3-dehidroksibutirin (Dhb) gibi doğada ender rastlanan aminoasitleri bulundurmaktadır. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen geniş bir grup bakteriyosinin gösterdiği ortak özellik olan lantiyonin köprülerini içermesinden dolayı, nisin lantibiyotikler sınıfına dâhil edilmiştir.

Sulu ortamda amfipatik yapıda iki farklı bölge içeren Nisin molekülünün stabilitesi, çözünürlüğü ve biyolojik aktivitesi, pH değerinin artışıyla birlikte azalmaktadır. Özellikle alkali ortamlarda çözünürlüğü tamamen düşmektedir. Örneğin ticari kullanımı bulunan saf nisin A'nın çözünürlüğü pH 2,2'de 56 mg/mL, pH 5,0'de 3 mg/mL ve pH 11,0'de ise 1 mg/mL'dir. Bununla beraber nisin gıda ürünlerinde 0,25 mg/mL'den az kullanıldığı için çözünürlüğü sorun oluşturmamaktadır. Alkali ortamlarda, molekül içi veya moleküller arası oluşan kimyasal modifikasyonlar nedeniyle nisin molekülünde geri dönüşümsüz inaktivasyon meydana gelmektedir. pH 2'de nisin aktivitesinde herhangi bir kayıp olmadan sterilizasyon işlemi uygulanabilir, ancak nötral ve üzerindeki pH'larda önemli kayıplar gözlemlenmektedir. Bununla beraber pastörizasyon normlarında kayıplar daha azdır ve gıda içindeki çoğu komponent nisin molekülünü korur. Ayrıca nisin molekülü α -kimotripsin ve proteinaz K uygulamasına karşı da duyarlılık gösterir (de Vuyst ve Vandamme, 1994; Zhang ve Zhong, 2015).

Nisinin Antimikrobiyel Spektrumu ve Etki Mekanizması

Nisin, Gram pozitif bakteriler ile gıda bozulma etmeni birçok türe karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir (Tablo 1). Bununla beraber bozulma etmeni bakterilerin nisin duyarlılığı cins, tür hatta aynı türün suşları arasında da çeşitlilik göstermektedir (Delves-Broughton and Weber, 2011). Nisine duyarlı Gram pozitif bakteriler arasında, mezofilik ve endospor oluşturan *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Clostridium*, *Desulfomaculum* ve termofilik endospor oluşturan *Geobacillus* ve *Thermoanaerobacterium* cinsleri yer almaktadır. Vejetatif formlar ve sporlar nisine duyarlı olup, spor gelişimini inhibe etmek için gerekli nisin miktarı genellikle vejetatif hücreleri inhibe etmek için gereken miktardan daha azdır. Nisin ayrıca pek çok LAB üzerinde de antimikrobiyel aktiviteye sahiptir (Meira ve ark., 2015).

Antimikrobiyel peptitler hedef hücreyi farklı mekanizmalarla inhibe eder. En yaygın olanı ise; hücre zarı geçirgenliğinin bozulması ve bu nedenle hücre içi bileşiminin (stoplazma) geri dönüşümsüz olarak hücre dışına sızması, sonuçta ise hedef hücrenin ölümüne neden olmasıdır (Cleveland ve ark., 2001; A.A. de Oliveira Junior ve ark., 2015). Gram pozitif bakteri hücre

duvarlarının oldukça büyük moleküllerin geçişine izin vermesi ve hücre duvarı yüzeyinde bulunan anyonik hücre yüzey polimerlerinin katyonik bakteriyosinler için başlangıç temas noktası olması önemlidir. İlk tanımlanan bakteriyosin olan kolisin, yakın akraba türler üzerinde hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, hedef hücre zarı geçirgenliğinin bozulması ve RNaz veya DNaz aktivitesinin inhibisyonu gibi mekanizmalarla etkilemektedir. Başka bir bakteriyosin olan Lactosin 27'nin protein sentezini sınırlandırarak bakteriyostatik etki gösterdiği, diplokoksın'ın ise hassas hücrelerde DNA ve RNA sentezini durdurarak hücre lizisi olmadan bakteriyolitik etki gösterdiği belirlenmiştir (Cleveland ve ark., 2001; Galvez ve ark., 2007). Nisinin antimikrobiyel aktivitesi ise, vejetatif hücre stoplazmik membranında por oluşumunu teşvik etmek ve murein sentezini engellemek suretiyle ortaya çıkmaktadır (Ruhr ve Sahl, 1985). Ortama nisin ilavesi durumunda hassas hücrelerde membran potansiyeli düşmekte ve bu durum proton motivasyon gücünün kaybı ile sonuçlanmaktadır (Garcia ve ark., 1993). Nisin varlığında porların oluşumu hücreler için gerekli olan aminoasitlerin, ATP ve monovalent katyonların kaybına ve hücredeki tüm biyokimyasal

reaksiyonların durmasına neden olmaktadır (Ruhr ve Sahl, 1985). Bununla beraber nisin, diğer koruyucular gibi uygulama konsantrasyonuna ve/veya hedef hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak bakteriyosidal (logaritmik üreme evresinde) veya bakteriyostatik (durma evresinde) etki gösterir. Nisin'in maya, küf, virüs ve Gram negatif bakteriler üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olmadıkları bildirilmektedir. Gram negatif bakterilerdeki dış membran 600 Da'dan daha büyük moleküllerin geçişine izin vermediği için, genellikle bakteriyosinlere karşı dirençlidir. Ancak Nisin'in disodyum etilen-diamin tetra asetik asit (EDTA) gibi bir şelat ajanı ile birlikte kullanılması halinde, şelat ajanı Gram negatif bakterilerde divalent iyonları uzaklaştırır, fosfolipit ve lipoproteinleri serbest bırakarak dış membran geçirgenliğini artırır (Gharsallaoui ve ark. 2015). Nisin'in endosporlar üzerindeki sporasidal veya sporastatik etkisinin kesin mekanizması hala anlaşılammış olmakla birlikte, nisinin *Bacillus anthracis* sporlarına karşı uygulanması sonucunda yüzeydeki proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak endosporların ısı direncini düşürdüğü ve su almaya başladığı saptanmıştır (Delves-Broughton ve Weber, 2011; Gharsallaoui ve ark. 2015).

Tablo 1 Gıdalarda bulunan nisin duyarlı türler (Delves-Broughton and Weber, 2011)

Cins	Tür	Gıdalardaki Etkisi
<i>Alicyclobacillus</i>	<i>acidoterrestis</i>	Isı dirençli; endospor oluşturur; pH 2,5-6,0; 25-60C°'de gelişir. Oda sıcaklığında depolanan taze/pastörize meyve sularında bozulma etmeni.
<i>Bacillus</i>	<i>brevis, subtilis, cereus, coagulans, pumilis, megaterium, licheniformis</i>	Isı dirençli; aerobik veya fakültatif anaerobik; endospor oluşturur. Asit dirençli bozulma etmeni organizmaları ve gıda zehirlenmesine neden olan patojenleri içerir.
<i>Brochothrix</i>	<i>thermosphacto</i>	Ette ısı duyarlı bozulma etmeni. 0-30C°'de gelişir. Çoğunlukla modifiye atmosferde depolanan gıdalarda gelişir.
<i>Clostridium</i>	<i>bifermentas, botulinum, butyricum, perfringens, putificum, sordelli, tertium, sporogenes, pasteurianum, histolyticum</i>	Isı dirençli; endospor oluşturur; obligat anaerob. Bozulmaya ve gıda zehirlenmesine neden olurlar.
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>nigrificans</i>	Isı dirençli; endospor oluşturur; obligat anaerob. Tekelenmiş gıdalarda kararmaya neden olur.
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis, faecium</i>	Aerob/anaerob. Bozulma etmeni. Nisin duyarlılığı çeşitlidir.
<i>Geobacillus</i>	<i>stearothermophilus</i>	Termofilik; endospor oluşturur; sebze konservelerinde bozulma etmeni. Endosporların ısı direnci yüksetir.
<i>Lactobacillus</i>	<i>bulgaricus, brevis, casei, curvatus, helveticus, fermentum, lactis, plantarum, buchneri</i>	Asitli gıdalarda, salata soslarında, kürlenmiş et ürünlerinde, şarap, bira, elma suyunda bozulmaya neden olur. Düşük pH'da gelişir.
<i>Leuconostoc</i>	<i>oenos, mesenteroides</i>	Aerob/anaerob. Bira ve şarapta bozulmaya neden olur.
<i>Listeria</i>	<i>innocua, monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> gıda zehirlenmesi.
<i>Sporolactobacillus</i>	<i>inulinus</i>	Aerob/anaerob. Endospor oluşturur. Düşük pH'da gelişir.
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	Aerob/anaerob. Gıda zehirlenmesine neden olur.
<i>Thermoanaerobacterium</i>	<i>thermosaccharolyticum</i>	Termofilik; Endospor oluşturur. Konserve gıdalarda şişme/sünmeye neden olur. Endosporlarının ısı direnci yüksektir.

Nisinin Gıdalarda Kullanımı

Bakteriyosinlerin çoğu pH değişimlerine ve yüksek sıcaklığa toleranslı olup, gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni bakterilere karşı oldukça geniş bir antimikrobiyel spektruma sahiptirler. Genellikle antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalar, bakteriyosinlere karşı çapraz direnç geliştiremezler ve plazmid kodlu olduklarından genetik manipulasyonlara da olanak sunarlar (Cleveland ve ark., 2001; Delves-Broughton ve Weber, 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde bakteriyosinlerin koruyucu olarak kullanılması gıda endüstrisinde çeşitli faydalar sağlamaktadır (Delves-Broughton ve Weber, 2011):

- Gıdanın raf ömrünün uzamak,
- Uygun olmayan sıcaklık koşullarında ekstra koruma sağlamak,
- Gıda zincirinde gıda kaynaklı patojenler arasındaki aktarım riskini azaltmak,
- Bozulma etmeni mikroorganizmaların neden olduğu ekonomik kayıpları azaltmak,
- Kimyasal koruyucuların kullanımını sınırlandırmak,
- Gıda güvenliğini riske atmadan, gıda bileşenlerin ve gıdanın organoleptik özelliklerinin daha iyi korunmasını sağlayan düşük sıcaklık uygulamalarına olanak sağlamak,
- Daha az asidik, daha düşük tuz konsantrasyonuna veya daha fazla nem içeriğine sahip gıdaların üretimine izin vermek

Bakteriyosinlerin çoğunlukla antibiyotiklerle karıştırılıyor olması, bazı ülkelerde nisinin yasal kullanımını sınırlayan bir durumdur. Bakteriyosinlerle antibiyotikler arasındaki farkın belirlenmesi, gıdalarda antibiyotik kullanımını yasaklayan bazı ülkelerde kritik öneme sahiptir (Cleveland ve ark., 2001). Bakteriyosinler ve antibiyotikler arasındaki temel farklar; bakteriyosinlerin etkilerini yakın akraba türler üzerinde göstermesi, bakteriyel gelişimin logaritmik fazında ribozomal olarak sentezlenmesi, düşük molekül ağırlığına (nadiren 10 kDa üzerinde) sahip antimikrobiyel peptitler olmasıdır. Antibiyotikler ise daha geniş antimikrobiyel spektruma sahip sekonder metabolitlerdir. Bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere özellikle memeli gastrointestinal sisteminde yer alan proteazlara karşı duyarlı olmaları, bakteriyosinleri insan tüketimi için güvenilir kılmaktadır (Ramu ve ark. 2015). Antibiyotik direncinden farklı olarak, bakteriyosin direncinde mikroorganizmalar arasında konjugal aktarım bulunmamaktadır. Sentezleri, antimikrobiyel spektrumları, etki mekanizmaları, toksisite ve direnç mekanizmaları bakımından antibiyotiklerden oldukça farklı olan bakteriyosinler için, medikal amaçlı kullanılmayan 'Biyolojik Gıda Koruyucusu' terimi kullanılabilir (Hurst, 1981; Ramu ve ark. 2015). Nisin, 1950'lerde gıda koruyucusu olarak kullanılmaya başlanmıştır. Nisin ilk olarak İsviçre ve graveyard peynirinde endosporların gelişimini engellemek ve *Clostridial* bulaşmaya karşı kullanılmıştır. Aplin ve Barrett Ltd. (UK) şirketi 1953'de toz nisin preparatını

geliştirerek, 'Nispalin' ismiyle ilk ticari nisin üretimine başlamıştır. ABD'de 1988 yılında antibiyotiklerin gıdalarda kullanımının yasaklanmasıyla birlikte, GRAS (Generally Recognized as Safe-İnsan ve Hayvan Tüketiminde Güvenilir) kabul edilen nisine 'E' kodu verilmiştir. Nisin E234 koduyla, 'Nisin-Koruyucu' veya 'Doğal Koruyucu' olarak gıda katkı maddeleri listesinde yer almaktadır. Nispalin dışındaki diğer nisin preparatlarına 'Chisin' (Chr-Hansens, Denmark), 'Delvoplus' (DSM, Holland) ve 'Silver Elephant Nisin' (Zhejiang Silver Elephant Bio. Engineering, China) ticari isimleriyle ulaşılmaktadır (Galvez ve ark., 2007; Meira ve ark., 2015).

Bakteriyosinlerin gıdalardaki kullanım şekli ile ilgili üç farklı yaklaşım bulunmaktadır (Galvez ve ark., 2007; Gharsallaoui ve ark. 2015):

- Bakteriyosin üreticisi süşun endüstriyel ölçekli bir fermentörde ex-situ üretilmesi, saflaştırılmış (veya kısmi saflaştırılmış) konsantre formlarının veya bir taşıyıcıya (silika veya mısır nişastası, soy protein, kalsiyum aljinat, jelatin, selüloz veya silikon kaplamalar gibi) immobilize edilmiş preparatlarının fermente olmayan gıdaya eklenmesi.
- Bakteriyosin üreticisi süşların gıdaya starter kültür, co-kültür (bir starter kültür ile kombine) veya koruyucu kültür (özellikle fermente olmayan gıdalarda) olarak gıdaya eklenmesi suretiyle in-situ üretim (Maliyetleri açısından avantajlara sahip bu yöntemde üretici kültürlerin seçim kriterleri arasında; gıda ortamına adapte olabilmesi, üretim ve/veya depo koşullarında gelişebilmesi, potansiyel patojen/bozulma etkeninin inhibisyonu için yeterli konsantrasyonlarda üretim kapasitesine sahip olabilmesi sayılabilir.)
- Bakteriyosin üreticisi LAB kültürü ile fermente edilmiş bir ürünün ingrediye olarak gıda formülasyonuna ilave edilmesi.

Bakteriyosinlerin antimikrobiyel aktivitesi üzerinde, gıdaların biyokimyasal ve mikrobiyolojik kompozisyonu ile depolama ortamının fiziksel koşulları önemli etkiye sahiptir (Cleveland ve ark., 2001; Galvez ve ark., 2007; Delves-Broughton ve Weber, 2011). Nisin aktivitesi düşük sıcaklıklarda oldukça stabildir. Ancak bu aktivite uzun süre ısıtıldığında bozulur. Bununla beraber, genel olarak, pH'ın düşmesiyle Nisin'in sıcaklık direncinin artması sahip olduğu beş thioether köprüleriyle açıklanmaktadır. Peptit zinciri kıran proteolitik enzim (pankreatin, α -kemotripsin gibi) varlığında inaktive olan nisin; tripsin, pepsin gibi diğer enzimlerin varlığında etkilenmemektedir. Nisin aktivitesi ile ilişkilendirilen bu faktörler farklı pH, iyonik yük, viskozite ve kimyasal kompozisyona sahip gıda sistemlerinde mikroorganizmaların Nisin'e direncini belirlemektedir (Gharsallaoui ve ark. 2015). Örneğin gıda uygulamalarında, nisin'in fosfolipit emülgatörlerle ve/veya diğer gıda bileşenleriyle etkileşiminden kaynaklanan çeşitli sınırlamalarla karşılaşmaktadır. Bakteriyosinlerin etkinliklerini sınırlayan faktörler aşağıda yer almaktadır:

- Gıdaya bağlı faktörler (Gıdanın işlenme koşulları, depolama sıcaklığı, pH değeri ile bakteriyosinin pH değişimindeki stabilitesi, gıda içinde bakterileri inaktive edici enzimlerin varlığı, bakteriyosinlerin gıda bileşenleri veya gıda katkı maddeleri ile etkileşimleri ve adsorpsiyonu, düşük çözünürlük, bakteriyosinin gıda matrisine yetersiz dağılımı ve gıdanın raf ömrü süresince bakteriyosinlerin sınırlı stabilitesi)
- Mikrobiyataya bağlı faktörler (Mikrobiyel yük, çeşitlilik ve flora içindeki mikroorganizmaların bakteriyosine duyarlılığı, fizyolojik durumu (gelişme, durma fazı ve/veya endospor oluşumu), fiziko-kimyasal bariyer oluşturma eğilimi (mikrokoloni, biyofilm) ve direnç veya adaptasyonun gelişimi)

Nisinin gıdalardaki kullanım amaçları arasında ticari steril gıdalarda proses sonrası bulaşan mikroorganizmaların çoğalmasını engellemek, tamamen sterilize edilemeyen pastörize gıdalarda pastörizasyon sonrası canlı kalabilen endosporları yok etmek ve bira ile şarap üretim proseslerinde bozulma etmeni LAB'ın gelişimini engellemek sayılabilir (Tablo 2) (Knoll ve ark., 2008; Delves-Broughton ve Weber, 2011; Bali ve ark.

2014; Gharsallaoui ve ark. 2015). Örneğin peynir gibi fermente gıdalarda *Clostridium* ve *Listeria* gelişimine karşı gıda koruyucusu olarak nisin kullanımı söz konusudur. Bu amaçla nisin ABD'de pastörize peynirlerde 10.000 IU/ml, Belçika'da 100 IU/ml ve Fransa'da ise limitsiz kullanımına izin verilmektedir (Gharsallaoui ve ark. 2015). Bakteriyosin üreticisi LAB'ın süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmasıyla, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* gelişimi kontrol altına alınmıştır (Rodriguez ve ark., 2005). Maisnier-Potin ve ark., (1992) tarafından yapılan çalışmada, çiğ süttten üretilen geleneksel peynirden antimikrobiyel özellikleri göz önünde bulundurularak izole ettikleri *L. lactis* ESI153 ve *L. lactis* ESI155 (Nis⁺) izolatları peynir üretiminde starter kültür olarak kullanmışlardır. Aynı çalışmada izolatlar pediosin üreticisi olarak transforme edilmiştir. *L. lactis* CL1 (Ped⁺) ve *L. lactis* CL2 (Nis⁺, Ped⁺) transformatlarının starter kültür olarak kullanılmasıyla üretilen peynirde *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus*'a karşı yüksek antimikrobiyel etkinlik saptanmıştır. Camembert peynirinde *L. monocytogenes* ve yarı sert peynirde ise *L. innocua* gelişimi nisin üreticisi starter kültür kullanımıyla engellenmiştir (Maisnier-Potin ve ark., 1992; A.A. de Oliveira Junior ve ark., 2015).

Tablo 2 Farklı gıdalarda nisin uygulamaları (Delves-Broughton ve Weber, 2011)

Gıda	Nisin (µg/g)	Hedef Mikroorganizma
Peynir	2,5-15	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
Süt ve süt ürünleri	0,25-1,25	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
Pastörize ve dondurulmuş sütlü tatlılar	1,88-5	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
Sıvı yumurta	1,25-5	<i>Bacillus</i>
Pastörize çorbalar	2,5-6,25	<i>Bacillus</i>
Meyve suları	0,75-1,5	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>
Konserve gıdalar	2,5-5	Laktik asit bakterileri, <i>Bacillus</i>
Salata sosları	1,25-5	Laktik asit bakterileri, <i>Brochothrix thermosphacto</i>
Sosis gibi et ürünleri	5-10	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus</i>
Rikotta peyniri	2,5-5	
Bira		
Fermentasyon sırasında	0,63-2,5	Laktik asit bakterileri
Fermentasyondan sonra	0,25-1,25	

Nisin bir diğer gıda sisteminde kullanılmasındaki örnek ise et ve et ürünleridir (Bali ve ark. 2014). Birçok ülkede etlerde kimyasal koruyucu olarak nitrit kullanılmaktadır. Fermente sosis, jambon, konserve et, balık ve kanatlı etlerinde karakteristik renk, lezzet ve tekstürün gelişimine katkıda bulunan nitrit, *Clostridium* sporlarının gelişimi engellemesinden dolayı, antimikrobiyel ajan olarak da kullanılmaktadır. Ancak nitrit ile sekonder aminlerin reaksiyonu sonucu karsinojen olarak bilinen nitrozaminlerin oluşumu söz konusu olup, mide asitliği de nitrozamin oluşumu için ideal bir ortam yaratır. Bununla birlikte uzun süre sodyum nitrit tüketimi özellikle bebeklerde 'Methemoglobinemia Hastalığına' neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı et ve et ürünlerinde alternatif koruyucu arayışına yönelinmiştir. Bazı araştırmacılar tarafından et ve et ürünlerindeki yüksek pH içeriği, nisin bu gıdalarda tek düze dağılımının

sağlanamaması ve fosfolipitler gibi et komponentleriyle olan ilişkilerini sınırlayıcı faktörler olarak ileri sürmüşler ve nisin biyokoruyucu olarak et ve et ürünlerinde kullanılmasında başarılı olamayacağı görüşünü savunmuşlardır. Ancak çalışmalar nisin tek başına ya da düşük miktarlarda nitrit ile birlikte kombinasyonlarının uygulanmasının, bu ürünlerde *Clostridium* gelişimi önemli ölçüde engellediğine işaret etmektedir (Cleveland ve ark., 2001; Gharsallaoui ve ark. 2015).

Bakteriyosinler ve Engeller Teknolojisi

Bakteriyosinlerin doğal fenolik bileşikler, diğer antimikrobiyel proteinler ve kimyasal koruyucular gibi diğer antimikrobiyel bileşiklerle birlikte kullanılmaları halinde sinerjistik etki gözlemlenmektedir. Elde olunan bu bulgular, gıda sistemlerinde bakteriyosinlerin tek başına

kullanılmaları yerine çoklu engeller sistemiyle birlikte kullanımı yaklaşım güncel kılınmıştır (Leistner, 2000; Gharsallaoui ve ark. 2015). Engeller teknolojisinde güvenli, stabil, besleyici değeri yüksek, lezzetli ve ekonomik gıdaların üretilmesi amaçlanmış olup, bu yöntemde birden fazla gıda muhafaza yönteminin kombine olarak kullanılması da söz konusudur. Her bir yöntemin tek başına yüksek seviyede uygulanması yerine, yöntemlerin daha düşük seviyede kombinasyonlar şeklinde uygulandığı engeller teknolojisinde, mikrobiyel gelişimi sınırlayan her faktör mikroorganizmaların aşmasını gerektiren bir engeli oluşturmaktadır. Böylece meydana gelen çoklu hasarın tamiri için, daha fazla enerji gereksiniminin olduğu bakteri hücresinde enerji boşalması sonucu ölüm gerçekleşir. Bu bağlamda yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, su aktivitesi (aw), pH, Eh, rekabetçi flora (örneğin LAB) ve katkı maddelerinin kullanımı (nitrat, sorbat, sülfat, nisin) gibi faktörler; gıdanın başlangıç mikrobiyel yükü, ortam koşulları ve hedeflenen raf ömrü gibi parametrelere bağlı olarak kombine edilmektedir (Leistner, 1999). Turşu, tarhana, pastırma, sucuk gibi gıdalarda sıklıkla uygulanan bu gıda muhafaza yönteminde 60'ın üzerinde engel tanımlanmış olup (Leistner, 1999), gıda güvenliğini sağlama konusunda ilave bir engel olarak bakteriyosinlerin kullanımı da son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Deegan ve ark., 2006; Gharsallaoui ve ark. 2015).

Nisin ve Diğer Antimikrobiyel Bileşikler

Ananou (2004) tarafından, NaCl'nin nisinde konformasyonel değişimleri başlattığı ve hedef hücreye bağlanmasını sağlayarak antimikrobiyel aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir. Nisin-nitrit kombinasyonlarının denendiği çalışmalardan elde olunan bulgular ise, botulinum toksinlerinin oluşumunu yok ettiğine ve endospor gelişimini engellediğine işaret etmektedir (Taylor ve ark., 1985). Bakteriyosinlerin düşük pH'da çözünürlüğünün artmasına bağlı olarak organik asitler ve bunların tuzlarıyla birlikte kullanımları halinde, antimikrobiyel etkinliklerinin arttığı saptanmıştır. Ukuku ve Fett'in (2004) tarafından yapılan çalışmada, farklı gıda sistemlerinde nisin sodyum laktat ile birlikte uygulanması halinde antimikrobiyel etkinliğin arttığı belirtilmiştir. Nisin A ile birlikte N₂, CO₂ ve düşük sıcaklık uygulamalarının denendiği başka bir çalışmada; 400 IU/ml düzeyinde Nisin A kullanımının *L. monocytogenes* gelişimini azalttığı, 1250 IU/ml düzeyinde kullanımı halinde ise patojen gelişimini tamamen durdurduğu belirlenmiştir (Szabo ve Cahill, 1998). Nisinin etanol, bakteriyosin veya bakteriyosin olmayan diğer antimikrobiyel bileşiklerle (lizozim gibi) kombine halde kullanılması halinde ise, Gram pozitif bakterilere karşı sinerjistik etki sağladığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Gill ve Holey, 2003; Gharsallaoui ve ark. 2015).

Nisin ve Modifiye Atmosferde Paketleme (MAP)

Gıda endüstrisinde sıklıkla uygulanan MAP, gıdadaki değişimlerin geciktirilmesi ve bozulma etmeni mikroorganizmaların inhibisyonu yoluyla genellikle kolay bozulabilir gıdaların raf ömrünü uzatır. Bununla beraber

nisine dirençli, CO₂'e karşı duyarlı Gram negatif bakterilere karşı, bakteriyosinlerin MAP ile birlikte uygulanması etkili bir muhafaza yöntemidir (Galvez ve ark., 2007; Gharsallaoui ve ark. 2015). Yenilebilir ve yenilemeyen filmlerde nisin ile birlikte EDTA, lizozim, organik asit, üzüm çekirdeği ve yeşil çay ekstratı gibi diğer antimikrobiyellerin uygulandığı çalışmada, *L. monocytogenes*'in gelişiminde 2 log'luk azalma saptanmıştır (Joerges, 2007).

Nisin ve Darbeli Elektrik Alanı (DEA)

Yüksek voltajın uygulandığı, bakteri hücresindeki permeabilityyi artırarak stoplazmik zar üzerinde etkili olan DEA yöntemi, non-termal bir uygulamadır. Hedefi bakteriyel zar olan bakteriyosinlerin zardan geçişini kolaylaştırması nedeniyle, kombine uygulamalarında bakterisidal etki artmakta, bakteriyosinlerin antimikrobiyel spektrumları genişlemektedir (Galvez ve ark., 2007; Delves-Broughton ve Weber, 2011; Ramu ve ark. 2014). Bakteriyosinler DEA uygulamasından kurtulan endosporlara veya sub-letal olarak hasarlanmış hücrelere karşı engel oluşturmaktadır. DEA uygulamasını takip eden nisin uygulamasının Gram negatif bakterilerden *E.coli* ile Gram pozitiflerden *Micrococcus lutes*'a (Dutreux ve ark., 2000), *S. aureus*'a (Sobrinolopez ve Martin Belloso, 2006), *B. cereus*'un vejetatif hücrelerine (Pol ve ark., 2000) karşı lethal etkiyi arttırdığı gösterilmiştir.

Nisin ve Yüksek Hidrostatik Basıncı (YHB)

Tüketime hazır tavuk eti, meyve suyu, taze ıstiridyel gibi gıdalarda; 0-100 °C'de, 100-1000 MPa aralığındaki basınçlarla uygulanan YHB uygulamasında bakteriyel ölüm, hücre zarında ve proteinlerde bulunan hidrojen ve iyonik bağların bozulması ile birlikte hidrofobik etkileşimlerin zarar görmesi sonucu meydana gelir (Hoover, 1993). 690 MPa veya daha altında basınç uygulandığında ise bakterilerin vejetatif formlarının, küf ve mayalar ile küf sporlarının gelişimleri engellenirken; bakteriyel endosporlar direnç göstermektedir. YHB nisin ile birlikte uygulandığı zaman, yüksek basınç gereksinimi azalmakta ve sub-letal olarak hasarlanmış vejetatif hücreler ile endosporlar üzerindeki antimikrobiyel etkinlikleri artmaktadır. YHB uygulamasının, dış membrana zarar vererek Gram negatif bakterilerin nisin duyarlılığını artırdığı belirlenmiş; nisin ile birlikte kullanımları halinde ise bakteriyosin dirençli Gram negatiflerin de gıdalarda gelişimi başarılı bir şekilde kontrol altına alınmıştır (Liang ve ark., 2002).

Kaynaklar

- Ananou S, Valdivia E, Bueno MM, Galvez A, Maqueda M. 2004. Effect of combined physico-chemical preservatives on enterococcal AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. J Appl Microbiol, 99: 48-56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02276.x
- de Oliveira Junior AA, de Araújo Couto HGS, Barbosa AAT, Carnelossi MAG, de Moura TR. 2015. Stability, antimicrobial activity, and effect of nisin on the physico-chemical properties of fruit juices. Int J Food Microbiol. 211: 38-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.029>.

- Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF. 2014. Bacteriocins: Recent trends and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI:10.1080/10408398.2012.729231.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*. 71: 1-20. . PII: S0168-16050100560-8.
- Çon AH, Gökalp HY. 2000. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 30: 180-190.
- de Vuyst L, Vandamme EJ. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: de Vuyst L, Vandamme EJ. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. London. Chapman and Hall. 540 pages. ISBN: 978-1-4613-6146-6 (Print) 978-1-4615-2668-1 (Online).
- Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy Journal* 55: 1058-1071. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.10.026.
- Delves-Broughton J, Weber G. 2011. Nisin, natamycin and other commercial fermentates used in food biopreservation. In: Lacroix C. In *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Preservation*. Philadelphia, USA. Woodhead Publishing. 491 pages. ISBN: 978-1-84569-669-6.
- Dutreux N, Notermans S, Gongora-Nieto MM, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. 2000. Effects of combined exposure of *Micrococcus lutes* to nisin and pulsed electric fields. *Int J Food Microbiol*. 60: 147-152. PII: S0168-1605(00)00306-8.
- Galvez A, Abriouel H, Lopez RL, Ben Omar N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*. 120: 51-70. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001
- Garcia MJ, Elferink MGL, Driessen AJM, Konings WN. 1993. In vitro pore forming activity of the lantibiotic nisin. *Eur J Biochem*. 212: 417-422. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17677.x
- Gharsallaoui A, Oulhal N, Joly C, Degraeve P. 2015. Nisin as a food preservative: Part I Physicochemical properties, antimicrobial activity and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2013.763765.
- Gill AO, Holley RA. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int J Food Microbiol*. 80: 251-259. PII: S0168-1605(02)00171-X.
- Gross E, Morell JL. 1971. The structure of nisin. *Journal of the American Chemical Society*. 93: 4634-4635. DOI: 10.1021/ja00747a073.
- Gupta RK, Prasad DN. 1989. Antibiotic activity of nisin in food preservation: a review. *Microbiologie Aliments Nutrition*. 7: 199-208. ISSN 0759-0644.
- Hoover DG. 1993. Pressure effects on biological systems. *Food Technology*. 47: 150-155.
- Hurst A. 1981. Nisin. *Adv Appl Microbiol*. 27: 85-123.
- Joerger RD. 2007. Antimicrobial films for food applications: a quantitative analysis of their effectiveness. *Packag Technol Sci*. 20: 231-273. DOI: 10.1002/pts.774.
- Knoll C, Dibol B, Du Toit M. 2008. Influence of phenolic compounds on activity of nisin and pediocin PA-1. *Am J Enol Vitic*. 59: 418-421. ISSN: 0002-9254.
- Leistner L. 1999. Combines methods for food preservation. In: Rahman MS, Dekker M. In *Handbook of Food Preservation*. New York, CRC Press. 1088 pages. ISBN 9781574446067.
- Leistner L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol*. 55: 181-186. PII: S0168-1605(00)00161-6.
- Liang Z, Mittal GS, Griffiths MW. 2002. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *J Food Prot*. 65:1081-1087.
- Maisnier-Potin S, Deschamps N, Tatini SR, Richard J. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Comembert cheese made with a nisin producing starter. *Food Technology*. 42: 165-168. DOI: 10.1051/lait:1992318.
- Mattick ATR, Hirsch A. 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature* (154): 551-552. DOI:10.1038/154551a0.
- Meira SMM, Jardim AI, Brandelli A. 2015. Adsorption of nisin and pediocin on nanoclays. *Food Chemistry*, 188; 161–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.136>.
- Perin LM, Bello BD, Belviso GZ, de Carvalho AF, Cocolin L, Nero LA. 2015. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. *Int J Food Microbiol*. 214: 159–167. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.006.
- Pol IE, Mastwijk HC, Bartels PV, Smid EJ. 2000. Pulsed electric field treatment enhances the bacterial action of nisin against *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 66: 428-430. DOI: 10.1128/AEM.66.1.428-430.2000.
- Ramu R, Shirahatti PS, Devi AT, Prasad A, Kumuda J, Lochana MS, Zameer F, Dhananjaya BL, Nagendra PMN. 2015. Bacteriocins and their applications in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2015.1020918.
- Rodriguez E, Calzada J, Arques JL, Rodriguez JM, Nuriez M, Medina M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7 in cheese. *Int Dairy J*. 15: 51-57. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.05.004.
- Rogers LA, Whittier EO. 1928. Limiting factors in the lactic fermentation. *J Bacteriol*. 16: 211-229. Print ISSN: 0021-9193. Online ISSN: 1098-5530.
- Rogers LA. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on lactic fermentation. *J Bacteriol*. 16: 321-325. Print ISSN: 0021-9193. Online ISSN: 1098-5530.
- Ross RP, Morgan S, Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol*. 79: 3-16. PII: S0168-1605(02)00174-5.
- Ruhr E, Sahl HG. 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother*. 16: 841-845. DOI: 0066-4804/85/050841.
- Sobrinho-Lopez A, Martin Belloso O. 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *J Food Prot*. 69: 345-353.
- Szabo EA, Cahill ME. 1998. The combined affects of modified atmosphere temperature, nisin ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 43: 21-31. PII: S0168-1605(98)00091-9.
- Taylor JI, Somer EB, Kruger LA. 1985. Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *J Food Prot*. 63: 741-746.
- Ukuku DO, Fett WF. 2004. Effect of nisin in combination with EDTA, sodium lactate and potassium sorbate for reducing *Salmonella* on whole and fresh-cut cantaloupe. *J Food Prot*. 67: 2143-2150.
- Zacharof MP, Lavitt RW. 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*. 2: 50-56. DOI: 10.1016/j.apcbee.2012.06.010
- Zhang Z, Zhong Z. 2015. The journey of nisin development in China. *Protein Cell*. 6(10): 709–711. DOI 10.1007/s13238-015-0214-9.