

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 56, No 2 (2005)



### Nisin and its food application

N. SOLOMAKOS (N. ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ), A. GOVARIS (A. ΓΚΟΒΑΡΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15076](https://doi.org/10.12681/jhvms.15076)

### To cite this article:

SOLOMAKOS (N. ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ) N., & GOVARIS (A. ΓΚΟΒΑΡΗΣ) A. (2017). Nisin and its food application. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 56(2), 122–129. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15076>

## Η Νισίνη και η χρήση της στα τρόφιμα

N. Σολωμάκος, Α. Γκόβαρης

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Οι βακτηριοσίνες είναι πολυπεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση, που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η πιο διαδεδομένη βακτηριοσίνη στα τρόφιμα είναι η νισίνη, που παράγεται από το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactococcus lactis subsp lactis*. Ανήκει στην κατηγορία των λαντιβιοτικών. Η πεπτιδική αλυσίδα της ομάδας αυτής περιέχει τα αμινοξέα *lanthionine* και  $\alpha$ - *methyl-lanthionine*. Η νισίνη είναι δραστική κυρίως κατά των Gram θετικών βακτηρίων. Η νισίνη δρά κατά των βακτηρίων αυτών, κυρίως με την προσβολή της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης και τη δημιουργία πόρων, που οδηγούν στην έξοδο απαραίτητων ουσιών με αποτέλεσμα το θάνατό τους. Τα Gram αρνητικά βακτήρια δεν προσβάλλονται εύκολα από υδρόφοβα μόρια, όπως η νισίνη, επειδή προστατεύονται από την εξωτερική τους μεμβράνη. Η απαίτηση των καταναλωτών για τη χρήση φυσικών προσθέτων στα τρόφιμα έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για τη χρήση της νισίνης στη βιομηχανία των τροφίμων. Η νισίνη είναι η μόνη βακτηριοσίνη της οποίας η χρήση επιτρέπεται στα τρόφιμα σε πάνω από 50 χώρες. Στην ΕΕ επιτρέπεται η χρήση της ως συντηρητικό τροφίμων, όπως ανακατεργασμένο τυρί και κρέμα, με τον κωδικό E 234. Αρκετές ερευνητικές προσπάθειες έχουν γίνει με χρήση της νισίνης σε διάφορα τρόφιμα για την αναστολή παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων, όπως *Listeria spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* κ.α., με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή της νισίνης στα τρόφιμα κατά των παθογόνων βακτηρίων (Gram αρνητικών και Gram θετικών) σε συνεργασία με άλλες αντιμικροβιακές ουσίες, όπως πχ. χηλικούς παράγοντες. Μια από τις σημαντικές εφαρμογές της νισίνης είναι εκείνη στα συσκευασμένα τρόφιμα που γίνεται με την ενσωμάτωση ή την επιφανειακή απορρόφησή της στο υλικό της συσκευασίας.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** Νισίνη, Πρόσθετο τροφίμων, Τροφολογική παθογόνα, Αντιμικροβιακή δράση

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βακτηριοσίνες είναι πολυπεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση, τα οποία συνθέτονται στα ριβοσώματα ορισμένων βακτηρίων. Οι βακτηριοσίνες, οι οποί-

## Nisin and its food application

Solomakos N., Govaris A.

**ABSTRACT.** Bacteriocins are ribosomally synthesized polypeptides which possess antimicrobial activity and are produced by Lactic Acid Bacteria (LAB). Nisin is the most used bacteriocin in food products, is produced by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis subsp lactis* and its amino-acids are classified to the Lantibiotics group. The peptide chain of this group contains the amino acids *lanthionine* and  $\alpha$ - *methyl-lanthionine*. Nisin is typically active against Gram-positive bacteria. The mechanism of action of nisin involves mainly the formation of transient pores in the cytoplasmic membrane of the target organism, with loss of membrane potential and leakage of intracellular metabolites resulting in the cell death. The inability of nisin to attack easily the Gram-negative bacteria is due to their protective outer membrane. The demand of consumers for more "natural" additives to food products has increased the interest for the use of nisin in the food industry. Nisin is the only bacteriocin authorized for use as food preservative in over 50 countries. In the EU nisin is approved as food additive in foods like cream and cheese under the E 234 label. A lot of research work has proved the antibacterial activity of nisin against food born pathogens, like *Listeria spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, with encouraging results. It is important to note the synergistic action of nisin against food born pathogens with other acting compounds, like chelate factors. Nisin is successfully applied to packaged foods by means of its incorporation or surface absorption to packaging material.

**Key words:** Nisin, Food Additive, Foodborn pathogens, Antimicrobial activity

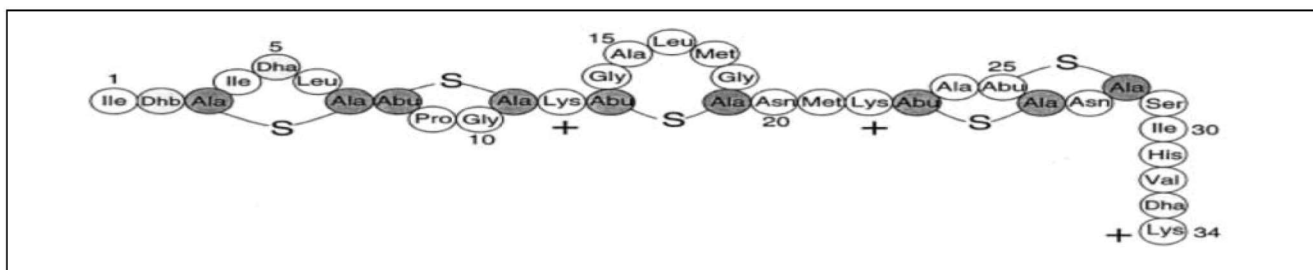
ες βρίσκουν εφαρμογή στα τρόφιμα, είναι κυρίως αυτές που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Klaenhammer 1993, Nes και συν. 1996, Cindas και συν. 2001).

Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης,  
Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,  
Τριγάλων 224, Καρδίτσα ΤΚ 431 00

Ημερομηνία υποβολής: 22.03.2005  
Ημερομηνία εγκρίσεως: 26.05.2005

Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin,  
Veterinary Faculty, University of Thessaly,  
224 Trikalon Street, 431 00 Karditsa, Greece

Submission date: 22.03.2005  
Approval date: 26.05.2005



Εικόνα 1. Η δομή της νισίνης Z. Ala-S-Ala (λανθειονίνη), Abu-S-Abu (μεθυλ-λανθειονίνη)

Η νισίνη ( $C_{134}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ) είναι ένα πολυπεπτιδιο που παράγεται από τον οξυγαλακτικό μικροοργανισμό *Lactococcus lactis* subsp *lactis* και αποτελεί την πιο γνωστή βακτηριοσίνη που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα.

Οι Rogers και Whittier (1928) ήταν οι πρώτοι που υπέθεσαν την ύπαρξη της νισίνης, όταν προσπάθησαν να εξηγήσουν την ανασταλτική δράση που είχαν παρατηρήσει για τον *Lactococcus lactis* κατά του *Lactobacillus bulgaricus*. Το όνομα νισίνη αποδόθηκε από τους Mattick και Hirsch (1947) από τις Αγγλικές λέξεις "N inhibitory substance".

**Ιδιότητες.** Η νισίνη ανήκει σε μια υποκατηγορία των βακτηριοσινών, τα lantibiotics, που χαρακτηριστικό τους γνώρισμα αποτελεί ότι στην πεπτιδική τους αλυσίδα φέρουν τα ασυνήθιστα αμινοξέα lanthionine (Lan) και 3-methylanthionine (MeLan). Πέντε από τα αμινοξέα της νισίνης μαζί με τις κυστεΐνες δημιουργούν τους θειοαιθερικούς δεσμούς, που σχηματίζουν τους χαρακτηριστικούς δακτυλίους lanthionine (εικόνα 1). Οι θειοαιθερικοί δεσμοί δίνουν στη νισίνη δύο συστήματα δακτυλίων τα οποία εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο και αμινοτελικό άκρο του μορίου. Λόγω των δακτυλίων αυτών το μόριο της νισίνης έχει ελικοειδή τρισδιάστατη δομή. Έτσι, η νισίνη εμφανίζει το εξωτερικό της τμήμα να είναι περισσότερο υδρόφοβο από το εσωτερικό της τμήμα (Breukink και de Kruijff 1999). Το γεγονός αυτό έχει επίσης ως αποτέλεσμα η νισίνη να εμφανίζεται θετικά φορτισμένη.

Στη φύση παρατηρούνται δύο μορφές της νισίνης με όμοιες ιδιότητες, η νισίνη A και η νισίνη Z. Η νισίνη A διαφέρει από τη νισίνη Z σε ένα μόνο αμινοξύ στη θέση 27, το οποίο είναι ιστιδίνη στη νισίνη A και ασπαργινίνη στη νισίνη Z (Mulders και συν 1991). Τα δύο πεπτιδία δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά στις ιδιότητές τους και στην παρούσα ανασκόπηση θα χρησιμοποιείται ο όρος νισίνη.

Η νισίνη εξετάστηκε και κρίθηκε ασφαλής σε πειραματόζωα, αφού δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις στον οργανισμό τους (Frazer και συν. 1962,

Shtenberg και Ignatev 1970). Έχει εγκριθεί σε πάνω από πενήντα χώρες σε όλον τον κόσμο για χρήση στα τρόφιμα (Jay 2000). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι εγκεκριμένη ως συντηρητικό κάποιων τροφίμων, π.χ. ανακατεργασμένο τυρί και κρέμα (Οδηγία 95/2/ΕΚ της ΕΕ) με κωδικό E 234. Σύμφωνα με την κοινή επιτροπή ειδικών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ (WHO/FAO), ως μέγιστη ημερήσια δόση για άτομο 70 κιλών, συνίστανται τα 60 mg ή 33000 IU (Hurst και Hoover 1993). Στις ΗΠΑ το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο για χρήση σε επεξεργασμένα τυριά είναι 10000 IU/g, ενώ στη Ρωσία 8000 IU/g. Σε Αργεντινή, Ιταλία και Μεξικό το όριο είναι 500 IU/g στα επεξεργασμένα τυριά και άλλα προϊόντα (Chikindas και Montville 2002). Σε κάποιες χώρες η νισίνη επιτρέπεται να προστεθεί σε διάφορα τρόφιμα, όπως κονσερβοποιημένες σούπες (Αυστραλία), πάγος για συντήρηση φρέσκων ψαριών (Βουλγαρία), παιδικές τροφές – ψημένα τρόφιμα – μαγιονέζα (Τσεχία) και μιλκσεϊκ (Ισπανία) (Hurst και Hoover 1993).

Η νισίνη προστίθεται στα τρόφιμα συχνότερα με τη μορφή εμπορικών σκευασμάτων (Lück και Jager 1997) και λιγότερο με την προσθήκη στα τρόφιμα των οξυγαλακτικών καλλιιεργειών που την παράγουν. Τα βασικότερα εμπόδια για την ευρύτερη εμπορική χρήση της νισίνης στα τρόφιμα είναι το υψηλό κόστος παρασκευής της και η αναποτελεσματικότητα κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων.

### Αντιμικροβιακή δράση

Η νισίνη έχει βακτηριοκτόνο δράση για μεγάλο εύρος Gram θετικών βακτηρίων και αποτρέπει την εκβλάση των σπόρων τους. Αντίθετα, είναι αναποτελεσματική κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων λόγω της φύσης της εξωτερικής τους μεμβράνης, όπως θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω (Hurst and Hoover 1993, De Vuyst and Vandamme 1994).

Ως αντιμικροβιακή ουσία η νισίνη παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων αντιμικροβια-

κών ουσιών: 1) είναι μια ουσία ευρέως αναγνωρισμένη ως ασφαλής «GRAS» (Federal Register, 1988), 2) είναι σταθερή σε συνθήκες κατάψυξης και θερμοκλής επεξεργασίας, 3) είναι ενεργή σε συνθήκες χαμηλού pH και 4) αποδομείται εύκολα από τις πρωτεάσες του ανθρώπινου πεπτικού σωλήνα (Cutter και Siragusa 1998, Joerger και συν. 2000).

### Νισίνη και Gram θετικά βακτήρια

Η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης περιλαμβάνει τόσο παθογόνα όσο και μη παθογόνα Gram θετικά βακτήρια των τροφίμων. Έτσι, η νισίνη είναι δραστητική κατά των οξυγαλακτικών βακτηρίων των τροφίμων, π.χ. *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *Leuconostoc cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, και κατά παθογόνων βακτηρίων των τροφίμων, όπως *Clostridium sporogenes*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Cindas και συν. 1998).

**Μηχανισμός δράσης.** Ο βασικότερος μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης της νισίνης κατά των Gram θετικών βακτηρίων είναι η δημιουργία πόρων στην κυτταρική τους μεμβράνη, που έχει ως συνέπεια τη διαταραχή της λειτουργίας των βακτηριακών κυττάρων (Sahl και Brandis 1983, Montville και συν. 1995, Breukink και de Kruijff 1999, Hoffman και συν. 2001)

Ο σχηματισμός πόρων στη βακτηριακή μεμβράνη γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο η νισίνη δεσμεύεται στη βακτηριακή μεμβράνη. Η δέσμευση αυτή είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ του θετικά φορτισμένου υδρόφοβου τμήματος της νισίνης με την αρνητικώς φορτισμένη βακτηριακή μεμβράνη. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι σε μεμβράνες που περιέχουν ποσοστό μεγαλύτερο του 40 % σε ανιονικά λιπίδια, η ποσότητα της νισίνης που δεσμεύεται σε αυτές αυξάνεται σημαντικά (Breukink και συν. 1997). Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι γενικά τα Gram θετικά βακτήρια περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό ανιονικών λιπιδίων από τα Gram αρνητικά βακτήρια στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη (O'Leary και Wilkinson 1988, Breukink και συν. 1997, Breukink και de Kruijff 1999). Μετά το πρώτο στάδιο της δέσμευσης της νισίνης από το λιπιδικό στρώμα της βακτηριακής μεμβράνης ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, όπου το υδρόφιλο τμήμα της νισίνης εισέρχεται στη μεμβράνη που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του πόρου.

Η προσβολή της βακτηριακής μεμβράνης με το σχηματισμό πόρων έχει ως αποτέλεσμα τη διαρροή διαφόρων ουσιών, όπως ιόντων, αμινοξέων ή ATP (μικρού μεγέθους μεταβολιτών), γεγονός που οδηγεί σε άμεση αναστολή όλων των κυτταρικών βιοσυνθετικών διαδικασιών του βακτηρίου (Sahl και Brandis 1983,

Ruhr και Sahl 1985, Benz και συν. 1991, Jack και συν. 1994). Η είσοδος της νισίνης στο βακτηριακό κύτταρο έχει επίσης ως αποτέλεσμα την αναστολή σύνθεσης διαφόρων μακρομορίων, όπως DNA, RNA, πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών (Sahl και Brandis 1982).

Επιπρόσθετα της δημιουργίας πόρων στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, η νισίνη προκαλεί αναστολή της σύνθεσης του λιπιδίου II, το οποίο συμμετέχει στη σύνθεση των πεπτιδογλυκανών της μεμβράνης. Το γεγονός αυτό προκαλεί αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου (Brotz και συν. 1998). Επίσης, η αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των σταφυλοκοκκικών κυττάρων μπορεί να οφείλεται και σε δύο υδρολυτικά ένζυμα που απελευθερώνονται από τη νισίνη (Bierbaum και Sahl 1987).

Η αποτρεπτική, για την εκβλάστηση των σπόρων, δράση της νισίνης οφείλεται στην παρουσία του αμινοξέος 2,3- διυδροαλανίνη (Dha) στη θέση 5 του πεπτιδίου (Liu και Hansen 1993, Chan και συν. 1996), που αντιδρά με έναν παράγοντα που είναι αναγκαίος για την εκβλάστηση των σπόρων (Chan και συν. 1996).

### Νισίνη και Gram αρνητικά βακτήρια

Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν για την αποτελεσματικότητα της νισίνης κατά της ομάδας των Gram αρνητικών βακτηρίων, στην οποία ανήκουν πολλά παθογόνα των τροφίμων. Η αδυναμία αυτή της νισίνης οφείλεται κυρίως στην προστατευτική εξωτερική μεμβράνη, η οποία καλύπτει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται από δύο στρώματα, ένα εξωτερικό από μόρια λιποπολυσακχαριτών (LPS) και ένα εσωτερικό από γλυκεροφωσfolιπίδια. Τα μόρια των λιποπολυσακχαριτών αποτελούνται από ένα λιπιδικό μέρος και ένα σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με ελάχιστα ανιονικό χαρακτήρα και σχηματίζουν ένα συμπαγές στρώμα με υδρόφιλη επιφάνεια (Nikaido 1996), με αποτέλεσμα η εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων να αποτελεί φραγμό για την είσοδο υδρόφοβων ουσιών και μακρομορίων. Η νισίνη, ως ένα υδρόφοβο μακρομόριο, αδυνατεί να περάσει την εξωτερική μεμβράνη.

Η δράση της νισίνης κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων επιτυγχάνεται ως εξής. Αρχικά γίνεται προσβολή της εξωτερικής μεμβράνης με τη χρήση κυρίως κάποιων αντιμικροβιακών παραγόντων και ακολούθως αυτό το γεγονός επιτρέπει στη νισίνη να διεισδύσει εντός του κυττάρου και να δράσει εναντίον του Gram αρνητικού βακτηρίου. Η άρση του φραγμού της εξωτερικής τους μεμβράνης επιτυγχάνεται με τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως χηλικών ενώσεων π.χ. EDTA (Stevens και συν. 1991, Delves-Broughton 1993, Schved και συν. 1994, Cutter και

Siragusa 1995 a,b), αιθανόλης (Brewer και συν. 2002), αιθέρια έλαια βοτάνων (Singh και συν. 2001, Dykes και συν. 2003, Yamazaki και συν. 2004) ή και με τη χρήση χαμηλής θερμοκρασίας (Boziaris και Adams 2001) Η μέθοδος αυτή, αναφερόμενη και ως Τεχνολογία των Εμποδίων, βρίσκει εφαρμογή τόσο σε Gram αρνητικά όσο και σε Gram θετικά βακτήρια σε διάφορα τρόφιμα και συνοψίζεται στον Πίνακα 1.

### Χρήση της νισίνης σε ορισμένα ζωικά τρόφιμα

Μετά την ανακάλυψη της νισίνης, αρκετές προσπάθειες έγιναν για την πρακτική εφαρμογή της. Οι Taylor και συνεργάτες το 1949 δοκίμασαν τη δράση της νισίνης στη θεραπεία της μαστίτιδας σε γαλακτοπαραγωγά ζώα. Η πρώτη προσπάθεια για χρήση της νισίνης στα τρόφιμα έγινε από τους Hirsch και συν. (1951).

**Νισίνη και κρεατοσκευάσματα.** Η προσθήκη νισίνης (800 IU/g) σε ωμό μπιτωτό κρέατος βούβαλου που ενοφθαλμίστηκε με *Listeria monocytogenes* ( $10^3$  CFU/g) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των πληθυσμών του παθογόνου κατά 2,4 log CFU/g σε σχέση με τους μάρτυρες στη διάρκεια της συντήρησης στους 4°C για 16 ημέρες (Pawar και συν. 2000). Σφάλγια μοσχαριών, που ενοφθαλμίστηκαν με *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens* και *L. innocua* (4 log CFU/cm<sup>2</sup>) και ψεκάστηκαν με νισίνη (5000 IU/ml), παρουσίασαν μείωση των πληθυσμών των μικροβίων κατά 1,8 έως 3,5 log CFU/cm<sup>2</sup> αμέσως μετά τον ψεκάσμο και κατά 2,0 έως 3,6 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> μετά από συντήρηση στους 40°C για μία ημέρα (Cutter και Siragusa 1994).

Στη διάρκεια συντήρησης μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος στους 40°C, η προσθήκη νισίνης (10000 IU/g) ανέστειλε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, όχι όμως και της *Pseudomonas fragi*, ενώ σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (80% CO<sub>2</sub> και 20% αέρα) ανέστειλε την ανάπτυξη και των δύο παραπάνω μικροοργανισμών (Fang και Lin 1994). Ο συνδυασμός 3000 IU/g νισίνης και 40 ppm νιτρωδών αλάτων απέτρεψε σχεδόν ολοκληρωτικά την εκβλάστηση των σπόρων *Clostridium sporogenes* σε ζωμούς κρέατος που διατηρήθηκαν στους 37°C για 56 ημέρες (Rayman και συν. 1981). Επίσης, σε χοίρειο κρέας με τιμή pH 5,8 ο συνδυασμός νισίνης, σε συγκέντρωση 22000 IU/g, με 60 ppm νιτρωδών αλάτων δεν μπόρεσε να αποτρέψει την εκβλάστηση σπόρων *Clostridium botulinum*, ενώ αντίθετα σε pH 5,5 του κρέατος ο συνδυασμός νισίνης 8000 IU/g με 60 ppm νιτρωδών απέτρεψε την εκβλάστηση σπόρων *C. botulinum* (Rayman και συν. 1983).

Σε συντήρηση (4°C) υπό κενό ζωμών κρέατος κοτόπουλου, που επιμολύνθηκαν με *C. botulinum*, η προσθήκη νισίνης (4000 IU/g) και νιτρωδών (120 ppm)

καθυστέρησε το σχηματισμό της τοξίνης της αλλαντίασης για 5 εβδομάδες, σε αντίθεση με τα δείγματα των μαρτύρων που εμφάνισαν την τοξίνη από την 1η εβδομάδα (Taylor και συν. 1985).

**Νισίνη και γαλακτοκομικά.** Οι Ferreira και Lund (1996) παρατήρησαν ότι η προσθήκη νισίνης (2000 IU/g) σε τυρί cottage (pH 4.6 – 4.7) μείωσε τη *Listeria monocytogenes*, που είχαν ενοφθαλμίσει στο τυρί αυτό, κατά 3 log<sub>10</sub> μετά από 3 ημέρες συντήρησης στους 20°C. Ομοίως, οι Davies και συν. (1997) βρήκαν ότι προσθήκη νισίνης (100 IU/g) ανέστειλε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε τυρί ricotta σε συντήρηση σε θερμοκρασία 6 – 8°C για χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων, σε αντίθεση με τα δείγματα μάρτυρες που περιείχαν επικίνδυνες ποσότητες του παθογόνου σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Σε τυρί cold pack cheese spreads η νισίνη (100 και 300 IU/g) μείωσε σημαντικά τους πληθυσμούς *L. monocytogenes*, *S. aureus* και θερμοκλώς τραυματισμένων σπόρων *Cl. sporogenes* (Zottola και συν. 1994).

Η νισίνη, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις 5 ή 10 IU/ml, κατάφερε να αναστείλει πλήρως την ανάπτυξη στελεχών *Bacillus spp.* που είχαν ενοφθαλμισθεί σε κρέμα κατά τη συντήρησή της στους 8 και 10°C (Nissen και συν. 2001). Οι Samelis και συν. (2003) μελέτησαν την ανασταλτική δράση της νισίνης κατά της *L. monocytogenes* ( $10^4$  cfu/g) σε ανθότυρο συσκευασμένο σε κενό. Η νισίνη (500 IU/g), προστιθέμενη τόσο στον ορό πριν την τυροκόμηση όσο και στο τελικό προϊόν, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του παθογόνου (0.7 – 2.2 log CFU/g) μέχρι την 5η ημέρα της συντήρησης στους 4°C, ενώ μετέπειτα παρουσίασε ανάπτυξη μέχρι το τέλος της συντήρησης (45η ημέρα).

**Νισίνη και αλιεύματα.** Η προσθήκη νισίνης (500 και 1000 IU/g) σε δείγματα σολωμού ενοφθαλμισμένα με *L. monocytogenes* ( $10^3$  CFU/g) και συσκευασμένα σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 1 – 2 log<sub>10</sub> στο τέλος της συντήρησης στους 4°C για 27 ημέρες (Nilsson και συν. 1997).

Για την αύξηση της διάρκειας συντήρησης των γαρίδων προστίθενται οργανικά οξέα (κυρίως σορβικό και βενζοϊκό), αλλά τα οξέα αυτά δημιουργούν ανησυχίες για πιθανά προβλήματα υγείας στους καταναλωτές. Η προσθήκη νισίνης (800 IU/g) σε γαρίδες σε άλμη, σαν εναλλακτική μορφή συντηρητικού, είχε ως αποτέλεσμα 31 ημέρες διάρκεια ζωής του προϊόντος (Einarsson και Lauzon 1995).

Σε καπνιστή πέστροφα που ενοφθαλμίστηκε με *L. monocytogenes* (4.9 log<sub>10</sub> CFU/g) και συντηρήθηκε στους 8°C για 17 ημέρες, τόσο η νισίνη (4000 IU/g)

Πίνακας 1. Τεχνολογία των εμποδίων και νισίνη

Συνδυαστικός αντιμικροβιακός παράγοντας	Αντιμικροβιακή δράση νισίνης	Βιβλιογραφία
Θέρμανση	Νισίνη (1000 IU/g) ανέστειλε την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> σε αστακό με ήπια θέρμανση (60 ή 65 °C). Νισίνη (500-2500 IU/ml) με ήπια θέρμανση (550C) ανέστειλε την ανάπτυξη <i>Salmonella enteritidis</i> σε αγνά.	Budu-Amoako και συν. 1999 Bozariar και συν. 1998
Χηλικοί παράγοντες ή τροποποιημένη ατμοσφαιρα (TA)	Σε συνδυασμό με το χηλικό παράγοντα EDTA, κιτρικό ή γαλακτικό οξύ, η νισίνη (2000 IU/ml) ανέστειλε την ανάπτυξη <i>Salmonella typhimurium</i> και <i>Escherichia coli</i> O157:H7 σε μοσχαρίσιο κρέας συσκευασμένο. Σε συνδυασμό με συσκευασία TA (αέρας, 100%N <sub>2</sub> ή 40% N <sub>2</sub> +60%CO <sub>2</sub> ή 100%CO <sub>2</sub> ), χαμηλή θερμοκρασία (4 & 12 °C), η νισίνη (1250 IU/ml) ανέστειλε την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> . Συνδυασμός συσκευασία TA ( 100% CO <sub>2</sub> ή 80% CO <sub>2</sub> + 20% αέρας) και νισίνης (1000 ή 10000 IU/ml) ανέστειλε την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> και <i>Pseudomonas fragi</i> σε μαγειρεμένο χοιρινό κρέας.	Cutter και Siragusa 1995 Szabo και Cahill 1998 Fang και Lin 1994
Διάφοροι παράγοντες	Η συνδυασμένη χρήση σορβικού καλίου και νισίνης (400 IU/ml) ανέστειλε την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> σε υπόστρωμα BHI. Η νισίνη (6 IU/ml) ήταν περισσότερο αποτελεσματική στη μείωση του πληθυσμού <i>Bacillus cereus</i> , όταν συνδυάστηκε in vitro με καρβακρόλη (0.3 mmol/l) Νισίνη (100 IU/ml) και μονολαυρίνη (0.25 mg/l) είχαν συνεργό δράση κατά βλαστικών κυττάρων <i>Bacillus spp.</i> σε γάλα. Νισίνη και εκχύλισμα σκόρδου εμφάνισαν συνεργό δράση στην αναστολή <i>L. monocytogenes</i> in vitro. Εκχύλισμα κούμαρου (5000 μg/ml) αύξησε τη βακτηριοκτόνο δράση της νισίνης in vitro κατά gram θετικών βακτηρίων. Η χρήση λακτοφερρίνης (2000μg/ml) σε συνδυασμό με νισίνη μείωσε στο μισό την απαιτούμενη συγκέντρωση νισίνης για την πλήρη αναστολή <i>L. monocytogenes</i> . Ο συνδυασμός νισίνης και EDTA παρουσίασε ανασταλτική δράση κατά στελεχών <i>Escherichia coli</i> και <i>L. monocytogenes</i> σε UHT γάλα. Συνδυασμός καρβακρόλης (0.5 mmol/l) ή θυμόλης (0.67 mmol/l) με νισίνη (0.625 μg/ml) και DGMC12 (0.0025%) παρουσίασε σημαντική ανασταλτική δράση κατά της <i>L. monocytogenes</i> .	Buncic και συν. 1995 Periago και συν. 2001 Mansour και Millière 2001 Singh και συν. 2001 Dykes και συν. 2003 Branen και Davidson 2004 Yamazaki και συν. 2004
Λακτοπεροξειδάση	Συνδυασμός νισίνης (10 - 200IU/ml) και λακτοπεροξειδάσης εμφάνισε συνεργό βακτηριοκτόνο δράση κατά της <i>L. monocytogenes</i> σε αποβουτυρωμένο γάλα. Συνδυασμός νισίνης (100 IU/ml) και λακτοπεροξειδάσης ήταν πιο αποτελεσματικός, έναντι των ουσιών αυτών όταν προστέθηκαν μόνες τους, κατά gram θετικών βακτηρίων απομονωμένα από σαρδέλλες ( <i>Sardina pilchardus</i> ).	Boussouel και συν. 2000, Zapico και συν. 1998 Elotmani και Assobhei 2003
Υδροστατική πίεση	Χρήση νισίνης (100 IU/ml), σε συνδυασμό με την εφαρμογή πίεσης (155-450 MPa), ανέστειλε την ανάπτυξη των μικροοργανισμών <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . Συνδυασμός νισίνης (100 IU/ml – 200 IU/ml) και πίεσης (200-600 MPa) ανέστειλε κύτταρα <i>Escherichia coli</i> . Νισίνη (1 ή 10 IU/ml) σε συνδυασμό με πίεση (404 MPa), θέρμανση και μειωμένο pH ανέστειλε σπόρους <i>Bacillus subtilis</i> και <i>Clostridium sporogenes</i> . Συνδυασμός νισίνης (4000 IU/ml), πίεσης (350 MPa) και γλυκονο-δελτα – λακτόνης παρέτεινε τη διάρκεια συντήρησης κρέατος κοτόπουλου.	Masschalck και συν. 2001 Masschalck και συν. 2000, Ponce και συν. 1998 Steward και συν. 2000 Yuste και συν. 1998

όσο και το γαλακτικό νάτριο (1%) μείωσαν τον πληθυσμό του παθογόνου σε  $3.3 \log_{10}$  CFU/g. Όμως, ο συνδυασμός των δύο ουσιών ήταν πιο αποτελεσματικός και επέφερε μείωση στον πληθυσμό της *L. monocytogenes* σε  $1.8 \log_{10}$  CFU/g στο τέλος της συντήρησης (Nykänen και συν. 2000).

Οι Zuckerman και Avraham (2002) βρήκαν ότι σε σολωμό η νισίνη μόνη της προκάλεσε μείωση του αρχικού πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά  $2.5 \log$  CFU/g, ενώ ο συνδυασμός νισίνης και Microgard™ (βακτηριοσίνη του *Propionibacterium shermanii*)  $1.5 \log$  CFU/g, μετά από συντήρηση 3 ημερών στους  $6^\circ\text{C}$ . Αντίθετα, ο συνδυασμός ήταν πιο αποτελεσματικός κατά της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (τελικός πληθυσμός  $4.7 \log$  CFU/g έναντι  $8.3 \log$  CFU/g των μαρτύρων) μετά από συντήρηση 8 ημερών σε θερμοκρασία  $6^\circ\text{C}$ .

**Νισίνη και συσκευασία.** Η προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών σε μεμβράνη υλικού συσκευασίας αποτελεί μια μέθοδο για τον έλεγχο των παθογόνων, καθώς και των μικροοργανισμών που αλλοιώνουν τα τρόφιμα. Για να είναι αποτελεσματική η αντιμικροβιακή μεμβράνη υλικού συσκευασίας πρέπει να εφάπτεται στο τρόφιμο, ώστε η αντιμικροβιακή ουσία να διαχέεται στην επιφάνειά του. Η προσθήκη της νισίνης σε μεμβράνη υλικού συσκευασίας για αποτελεσματικότερη και ασφαλέστερη συντήρηση τροφίμων (κρέας, τυριά κλπ) αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας κατά την τελευταία δεκαετία. Δύο είναι οι κύριες μέθοδοι προσθήκης νισίνης στη μεμβράνη υλικού συσκευασίας, είτε με ενσωμάτωση στα υλικά της συσκευασίας είτε με απορρόφηση της νισίνης στην επιφάνεια της μεμβράνης του υλικού της συσκευασίας.

Οι Siragusa και συν. (1999) ενσωμάτωσαν νισίνη σε μεμβράνη από πολυαιθυλένιο που χρησιμοποιήθηκε για συσκευασία σε κενό σφάγιων μόσχου. Τις πρώτες 2 ημέρες συντήρησης στους  $4^\circ\text{C}$  παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του *B. thermosphacta* κατά  $2 \log_{10}$ . Η ενσωμάτωση νισίνης σε βρώσιμη μεμβράνη από κυτταρίνη, που χρησιμοποιήθηκε για τη συσκευασία διαφόρων τροφίμων, είχε ως αποτέλεσμα την ανασταλτική δράση έναντι των *Listeria innocua* και *Staphylococcus aureus* κατά τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη (Coma και συν. 2001).

Οι Bower και συν. (1995) δοκίμασαν μεμβράνη συσκευασίας με νισίνη σε υπόστρωμα που περιείχε *L. monocytogenes*. Το παθογόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις νισίνης (40000 IU/ml) δεν παρουσίασε ανάπτυξη, ενώ αντίθετα, όταν τοποθετήθηκε σε χαμηλότερη συγκέντρωση νισίνης (4000 IU/ml), παρουσίασε μικρότερο βαθμό αναστολής.

Οι Scannell και συνεργάτες (2000) εξέτασαν την αντιμικροβιακή δράση της νισίνης, που είχε απορροφηθεί σε πλαστική μεμβράνη συσκευασίας, κατά των *Listeria innocua* και *Staphylococcus aureus* σε τυρί και χοιρομέρι στη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη ( $4^\circ\text{C}$ ). Οι αρχικοί πληθυσμοί της *Listeria innocua* ( $4 \times 10^5$  CFU/g) παρουσίασαν μείωση  $>3 \log_{10}$  CFU/g στο τυρί μετά από 5 ημέρες και μείωση κατά  $1.5 \log_{10}$  CFU/g στο χοιρομέρι μετά από 12 ημέρες. Οι αρχικοί πληθυσμοί του *Staphylococcus aureus* ( $4 \times 10^5$  CFU/g) μειώθηκαν  $1.5$  και  $2.8 \log_{10}$  CFU/g στο τυρί και το χοιρομέρι, αντίστοιχα, μετά από 12 ημέρες συντήρηση. □

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Benz R, Junk G, Sahl HG (1991) Mechanism of channel formation by lantibiotics in black lipid membranes. In: Nisin and Novel Lantibiotics, Escm, Leiden,;359-372.
- Bierbaum G, Sahl HG (1987) Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22, influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanineamidase, J Bacteriol. 169:5452-5458.
- Boussouel N, Mathieu F, Revol-Junelles AM, Milliere JB (2000) Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk, Int J Food Microbiol, 61:169-175.
- Bower C, McGuire J, Daeschel M (1995) Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following absorption of nisin onto silica surfaces, Appl Environ Microbiol, 61:992-997.
- Boziaris IS, Humpheson L, Adams MR (1998) Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4, Int J Food Microbiol, 43:7-13.
- Boziaris IS, Adams MR (2001) Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives, J Appl Microbiol, 91:715-724.
- Brancan JK, Davidson PM (2004) Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediamine-tetraacetic acid and lactoferrin, Int J Food Microbiol, 90:63-74.
- Breukink E, Von Kraaij C, Demel RA, Siezen RJ, Kuipers OP, de Kruijff B (1997) The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane, Biochem, 36:6968-6976.
- Breukink E, de Kruijff B (1999) The lantibiotic nisin, a special case or not?, Biochem Biophys Acta, 1462:223-234.
- Brewer R, Adams MR, Park SF (2002) Enhancement inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol, Lett Appl Microbiol, 34:18-21.
- Brötz H, Josten M, Wiedemann I, Schneider U, Götz F, Bierbaum G (1998) Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and others lantibiotics, Mol Microbiol, 30:317-327.
- Budu-Amoako E, Ablett RF, Harris J, Delves-Broughton J (1999) Compined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat, J Food Prot, 62:46-50.
- Buncic S, Fitzgerald CM, Bell RG, Hudson JA (1995) Individual and

- combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature, *J Food Safety*, 15:247-264.
- Chan WC, Leyland ML, Clark J, Dodd HM, Lian LY, Gasson MJ (1996) Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: antibacterial activity of fragments of nisin, *FEBS Lett*, 390:129-132.
- Chikindas ML, Montville TJ (2002) Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: *Control of foodborne microorganisms*, Marcel Dekker, New York, :303-321.
- Cindas LM, Casaus MP, Fernandez MF, Hernandez PE (1998) Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and food-borne pathogenic bacteria. *Food Microbiol*, 15:289-298.
- Cindas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernandez PE (2001) Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci Tech Int*, 7:281-305.
- Coma V, Sebti J, Pardon P, Deschamps A, Pichavant FH (2001) Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids and nisin incorporation to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot*, 64:470-475.
- Cutter CN, Siragusa GR (1994) Decontamination of beef carcasses tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. *Food Microbiol*, 11:481-489.
- Cutter CN, Siragusa GR (1995a) Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *J Food Prot*, 58:977-983.
- Cutter CN, Siragusa GR (1995b) Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *J Food Prot*, 58:1028-1030.
- Cutter CN, Siragusa GR (1998) Incorporation of nisin into meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett Appl Microbiol*, 27:19-23.
- Davies EA, Bevis HE, Delves-Broughton J (1997) The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*, 24:343-346.
- Delves-Broughton J (1993) The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards Gram-negative bacteria. *Int Biodeterior Biodegr*, 32:87-97.
- De Vuyst L, Vandamme EJ (1994) Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Blackie, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, pp:151-221.
- Dykes GA, Amarowicz R, Pegg RB (2003) Enhancement of nisin antibacterial activity by a bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaf extract. *Food Microbiol*, 20:211-216.
- Einarsson H, Lauzon HL (1995) Biopreservation of brined shrimp (*pandalus-borealis*) by bacteriocins from lactic-acid bacteria. *Appl Environm Microbiol*, 61:669-676.
- Elotmani F, Assobhei O (2003) *In vitro* inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. *Lett Appl Microbiol*, 38:60-65.
- Fang TJ, Lin LW (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packaging/nisin combination. *J Food Prot*, 57:479-485.
- Ferreira MASS, Lund BM (1996) The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Lett Appl Microbiol*, 22:433-438.
- FDA (US Food & Drug Administration)/Federal Register (1988) Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human ingredient. 21 CFR Part 184, Fed Reg 53:11247-11251.
- Frazer AC, Sharratt M, Hickman JR (1962) The biological effects of food additives. I. Nisin, *J Sci Food Agric*, 13:32-42.
- Helander IM, Von Wright A, Mattila-Sandholm TM (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci Technol*, 8:146-150.
- Hirsch A, Grinstead E, Chapman HR, Mattick ATR (1951) A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing streptococcus. *J Dairy Res*, 18:205-206.
- Hoffmann A, Pag U, Wiedemann I, Sahl HG (2001) Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *II Farmaco*, 57:685-691.
- Hurst A, Hoover DG (1993) Nisin. In: *Antimicrobials in foods*, Marcel Dekker Inc, New York, :369-407.
- Jack RW, Benz R, Tagg JR, Sahl HG (1994) The mode of action of SA-FF22, a lantibiotic isolated from *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *Eur J Biochem*, 219:669-705.
- Joerger RD, Hoover DG, Barefoot SF, Harmon KM, Grinstead DA, Nettles-Cutter CG (2000) Bacteriocins. In: *Encyclopedia of microbiology*, vol 1, 2nd ed, Academic Press, San Diego, pp:389-397.
- Liu W, Hansen JN (1993) The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Appl Environm Microbiol*, 59:648-651.
- Lück E, Jager M (1997) *Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects*. Springer, Berlin, :260.
- Mansour M, Millière JB (2001) An inhibitory synergistic effect of a nisin-monolaurin combination on *Bacillus* spp. vegetative cells in milk. *Food Microbiol*, 18:87-94.
- Masschalck B, Garcia-Graells C, Van Haver E, Michiels CW (2000) Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 1:39-47.
- Masschalck B, Houdt RV, Michiels CW (2001) High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *Int J Food Microbiol*, 64:325-332.
- Mattick ATR, Hirsch A (1947) Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2:5-8.
- Montville TJ, Winkowski K, Ludescher RD (1995) Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *Int Dairy J*, 5:797-814.
- Mulders JWM, Boerrigter IJ, Rollema HS, Siezen RJ, de Vos WM (1991) Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a structural nisin variant. *Eur J Biochem*, 201:581-584.
- Nikaido H (1996) Outer membrane. In: *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, ASM Press, Washington DC, :29-47.
- Nilsson L, Huss HH, Gram L (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int J Food Microbiol*, 38:217-227.
- Nissen H, Holo H, Axelsson L, Blom H (2001) Characterization and growth of *Bacillus* spp. in heat-treated cream with or without nisin. *J Appl Microbiol*, 90:530-534.
- Nykänen A, Weckman K, Lepveteläinen A (2000) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int J Food Microbiol*, 61:63-72.
- Οδηγία 95/2/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 20ης Φεβρουαρίου 1995 για τα πρόσθετα τροφίμων.
- O' Leary WM, Wilkinson SG (1988) In: *Microbial Lipids*, vol 1, Academic press, New York, :117-201.

- Pawar DD, Malik SVS, Bhilegaongar KN, Barbuddle SB (2000) Effect of nisin and its components with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Sci*, 56:215-219.
- Periago PM, Moezelaar R (2001) Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol*, 68:141-148.
- 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.
- Rayman K, Aris B, Hurst A (1981) Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl Environm Microbiol*, 41:375-380.
- Rayman K, Malik N, Hurst A (1983) Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. *Appl Environm Microbiol*, 46:1450-1452.
- Rogers LA, Whittier EO (1928) Limiting factors in lactic fermentation. *J Bacteriol*, 16:211-229.
- 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*, 27:841-845.
- Sahl HG, Brandis H (1982) Mode of action of the staphylococcin-like peptide Pep5 and culture conditions effecting its activity. *Zbl Bact Hyg*, 252:166-175.
- Sahl HG, Brandis H (1983) Efflux of low-Mr substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococcin-like agent Pep5. *FEMS Microbiol Lett*, 16:75-79..
- Samelis J, Kakouri A, Rogga KJ, Savvaidis IN, Kontominas MG (2003) Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. *Food Microbiol*, 20:661-669.
- Scannell AGM, Hill C, Ross RP, Marx S, Hartmeier W, Arendt EK (2000) Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins, Lactacin 3147 and Nisaplin (R). *Int J Food Microbiol*, 60:241-249.
- Sched F, Henis Y, Juven BJ (1994) Responce of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *Int J Food Microbiol*, 21:305-314.
- Shtenberg AJ, Ignatev AD (1970) Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. *Food Cosmet Toxicol*, 8:369-380.
- Singh B, Falahee B, Adams MR (2001) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiol*, 18:133-139.
- Siragusa GR, Cutter CN, Willett JL (1999) Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol*, 16:229-235.
- Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR (1991) Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl Environm Microbiol*, 57:3612-3615.
- Steward CM, Dunne CP, Sikes A, Hoover DG (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.
- Szabo EA, Cahill ME (1998) The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA<sup>TM</sup> 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, 43:21-31.
- Taylor JL, Hirsch A, Mattick ATR (1949) The treatment of bovine Streptococcal and Staphylococcal mastitis with nisin. *Vet Rec*, 61:197-198.
- Taylor SL, Somers EB, Krueger LA (1985) Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *J Food Prot*, 48:234-239.
- Yamazaki K, Yamamoto T, Kawai Y, Inoue N (2004) Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiol*, 21:283-289.
- Yuste J, Mor-Mur M, Capellas M, Guamis B, Pla R (1998) Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. *Food Microbiol*, 15:407-414.
- Zapiko P, Medina M, Gaya P, Nuñez M (1998) Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Int J Food Microbiol*, 40:35-42.
- Zottola EA, Yezzi TL, Ajao DB, Roberts RF (1994) Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *Int J Food Microbiol*, 24:227-238.
- Zuckerman H, Avraham RB (2002) Control of growth of *Listeria monocytogenes* in fresh salmon using Microgard<sup>TM</sup> and nisin. *Lebensm Wiis Technol*, 35:543-548.