

Nisinin Sinerjistik Antimikrobiyel Etkisi

Burcu Özel¹ , Ömer Şimşek² 

¹Pamukkale Üniversitesi, Çal Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Denizli
²Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli

Geliş Tarihi (Received): 20.05.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 19.07.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): omers@pau.edu.tr (Ö.Şimşek)

📞 0 258 216 30 15 📠 0 258 296 32 62

ÖZ

Gıda muhafaza yöntemlerinin birlikte kullanılması, gıda kalitesini ve güvenliğini artırmaktadır. Bu nedenle engeller teknolojisi kapsamında çeşitli doğal koruyucular kullanılarak mikrobiyal risk ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Nisin ise *Lactococcus lactis* suşları tarafından üretilen ve gıda sistemlerinde kullanılmasına izin verilmiş (E234) bir doğal koruyucudur. Bu antimikrobiyel ajanın gıda sistemlerinde etkisinin artırılması için çeşitli kimyasal katkı ve fiziksel işlemlerle birlikte kullanılması denenmiştir. Bu derleme çalışmasında da nisinin sinerjistik antimikrobiyel etkisi üzerinde durularak, hem gıda sistemlerinde çeşitli muhafaza yöntemlerinin olumsuz etkilerinin azaltılabildiği hem de nisinin antimikrobiyel aktivitesinin artırılabilirdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nisin, Sinerjistik etki, Antimikrobiyel, Engeller teknolojisi

Synergistic Antimicrobial Effect of Nisin

ABSTRACT

Application of food preservation treatments in combinations increases food quality and safety. Therefore, microbial risks can be prevented by using natural preservatives within the concept of hurdle technology. Nisin is a natural preservative (E234) permitted in food production and produced by *Lactococcus lactis*. To increase the effect of this antimicrobial agent in foods systems, it has been tested in combinations with different chemical additives and physical treatments. In this review, the synergistic antimicrobial effect of nisin was emphasized and it was shown that the adverse effects of various preservation methods in food systems can be reduced while the antimicrobial activity of nisin can be increased.

Keywords: Nisin, Synergistic activity, Antimicrobial, Hurdle technology

GİRİŞ

Gıdaların, mikrobiyolojik güvenliğinin sağlanmasında antimikrobiyel etkili ajanların veya fiziksel işlemlerin birlikte kullanılması (Sinerjizm) artan önem kazanmış ve son yıllarda bu yönde yapılan uygulamalar engeller teknolojisi kavramı kapsamında değerlendirilmektedir. Bu sayede gıda ortamında gelişimi engellenemeyen çeşitli bozucu ve patojen nitelikli mikroorganizmaların direnci zayıflatılarak öldürülmesi sağlanmaktadır.

Engeller teknolojisinde antimikrobiyel etkiye sahip uygulamalar sırasıyla (sublethal) veyahutta birlikte (sinerjistik) kullanılmaktadır. Sinerjistik uygulamalar açısından gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımı gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. İzin verilmiş tek bakteriyosin olan nisinin kullanımını kısıtlayan en temel unsurlardan bazıları bu bakteriyosinin Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyel etkisinin bulunmaması ve ayrıca hassas olan bakterilerin de nisine karşı direnç göstermeye başlamasıdır [1, 2]. Bu anlamda özellikle

günümüzde ticari potansiyeli bulunan nisin antimikrobiyel etkisinin geliştirilmesi ve nisin kullanım maliyetinin düşürülmesi için nisinin çeşitli antimikrobiyel ajanlarla veyahutta fiziksel işlemlerle birlikte kullanımı yönünde çalışmalara hız verilmiştir [3, 4].

Nisin, tip I lantibiyotik grubuna dahil olan ve laktik asit bakterileri üyesi *Lactococcus lactis* tarafından sentezlendiği tespit edilmiş ilk bakteriyosindir. Bu bakteriyosin oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle gıda endüstrisinde koruyucu, medikal alanda ise terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Nisin FDA tarafından GRAS (insan ve hayvan tüketiminde güvenilir) ajan olarak tanımlanmış ve belgelendirilerek (E234) kullanımına izin verilmiştir. Bu bakteriyosin günümüzde 50'den fazla ülkede süt ve süt ürünleri, konserve ürünler ve hazır çorbalar gibi gıdaların korunmasında kullanılmaktadır. Ayrıca diş macunu ve sargı bezlerini içeren çeşitli sağlık ürünlerinde de kullanımı mevcuttur [5].

Birçok Gram pozitif bakteri nisine karşı duyarlıdır. Nisinin Gram pozitif bakterilerin vejetatif formları yanında, *Clostridium* ve *Bacillus* sporlarına karşı da etkili olduğu saptanmıştır. Bu karakteristikleri nedeniyle nisin yüksek sıcaklıktan etkilenen ya da ısı işlem uygulanmayan asidik gıdalarda patojen ya da gıda bozulması etmeni birçok bakterinin vejetatif (*Listeria* ve laktik asit bakterilerinin kontamine üyeleri gibi) ve spor formlarının (*Clostridium* ve *Bacillus* sporları gibi) inhibisyonu amacı ile kullanılmaktadır [5, 7]. Ancak nisinin Gram negatif bakteriler üzerinde çok düşük antimikrobiyel etkisi bulunmaktadır [8]. Bunun temel nedeni nisinin Gram pozitif hücrelerin duvarında bulunan lipit II fraksiyonlarına tutunarak antimikrobiyel etkisini göstermesidir. Diğer taraftan nisine karşı hassas olan bakteriler zamanla direnç kazanmaktadır.

Son yıllarda çeşitli gıdalarda önem taşıyan patojen veya bozucu nitelikteki bakterilerin inhibisyonu amacıyla, nisinin diğer ajanlarla veya fiziksel işlemlerle birlikte kullanımı yönünde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu araştırmalarda özellikle çeşitli organik asitler (laktik ve asetik asit), bitki ekstraktları (karvakrol, öjenol, timol, sinamik asit), şelatlayıcı bileşikler (EDTA) ve ısı işlemlerin yanında yüksek basınç ve vurgulu elektriksel alan uygulamaları denenmiştir. Bakterilerin engellenmesi yönünde oluşturulan bu antimikrobiyel sistemlerde temel hedef hücrelerin duvar yapısının zayıflatılarak nisinin sitoplazmik membrana ulaşmasının sağlanmasıdır. Böylece nisinin antimikrobiyel etkisi ve spektrumu geliştirilmektedir. Ancak bu noktada dikkati çeken husus nisinin sinerjistik etkisi için birlikte kullanılacak yöntemin gıda ve hedef mikroorganizma türüne göre seçilmesidir. Bu nedenle kullanılan diğer antimikrobiyel engelin nisinin fonksiyonelliğini artırıcı yönde olması gerekmektedir.

Bu derleme çalışmasında bugüne kadar yapılmış, nisinin sinerjistik etkisi kapsamında araştırılan, çalışmaların sonuçları toplanmıştır. Çalışmada nisinin hangi kombinasyonlarda yüksek antimikrobiyel etkinlikte sonuç verebildiği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Derlemede öncelikle nisinin antimikrobiyel etki mekanizması

üzerinde durulmuş, takiben nisinin sinerjistik etkisi ile ilgili uygulamalar tartışılmıştır.

NİSİNİN ANTIMİKROBIYEL ETKİ MEKANİZMASI

Nisinin antimikrobiyel aktivitesi, hedef hücre sitoplazmik membranında por oluşumunu teşvik etmek ve murein sentezini engellemek suretiyle ortaya çıkmaktadır [9, 10]. Ortama nisin ilavesi durumunda hassas hücrelerde membran potansiyeli düşmekte ve bu durum proton motivasyon gücünün kaybı ile sonuçlanmaktadır [11, 12]. Nisin varlığında porların oluşmasıyla hücreler için gerekli olan aminoasitlerin, ATP ve monovalent katyonların kaybı meydana gelmektedir [9]. Sonuç olarak hassas hücredeki tüm biyokimyasal reaksiyonlar durmaktadır.

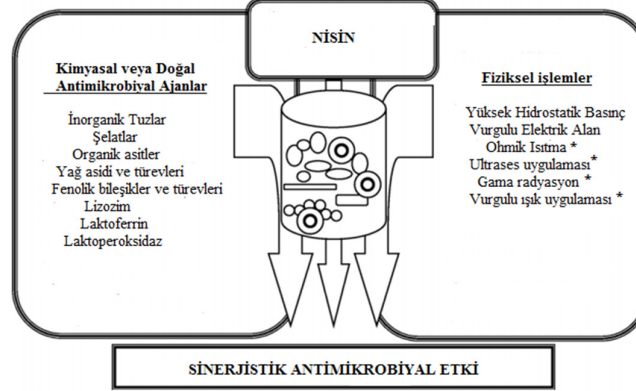
Nisin sitoplazmik membran üzerinde por oluşumunu, hem mikromolar hem de nanomolar konsantrasyonda teşvik edebilmektedir. Nisinin membran üzerinde por oluşturma mekanizmasının açıklanmasını sağlayan ilk veriler, bu bakteriyosinin mikromolar konsantrasyonda kullanılmasıyla elde edilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki nisinin zwitteriyonik fosfatikolin (PC) yapay membranından 6-karboksiflorasan bileşiklerinin difüzyonunu indüklediğini fakat anyonik karakterli fosfatilgliserol (PG) membranından herhangi bir bileşiğin salınımına yol açmadığı belirlenmiştir [13]. Bu durum nisinin zwitteriyonik fosfolipit yapılarla etkileşime girdiği ve por oluşumuna neden olduğu şeklinde açıklanmıştır. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, nisinin yüksek konsantrasyonda bulunması durumunda, sitoplazmik membranda anyonik fosfolipitlerle de etkileşime girerek por oluşturabildiği saptanmıştır [14, 15]. Son olarak nisin molekülünün hücre yüzeylerinde yerleşiminin incelendiği çalışmada; molekülün her iki ucunun da lipit faz içerisine girdiğini ve membran yüzeyine paralel olduğu saptanmıştır [16]. Nisin molekülünün mikromolar konsantrasyondaki por oluşum mekanizması, sıkıştırma (Wedge) modeli olarak adlandırılmıştır (Şekil 1.a). Bu modele göre yüksek konsantrasyondaki nisin, lipit dinamiğini bozmakta ve membrandaki anyonik fosfolipitleri eğerek por oluşumuna yol açmaktadır. Söz konusu porlar, hücrenin membran potansiyelinin ve proton motivasyon gücünün kaybına neden olmaktadır [17].

Nisinin nanomolar konsantrasyondaki antimikrobiyel etki mekanizması, hücre duvarı öncü molekülü lipit II'nin nisinle olan ilişkisinin anlaşılması sonucunda aydınlatılmıştır. Söz konusu ilişki ilk defa lipit II molekülünün birleştirici fonksiyonunun belirlenmesiyle ortaya çıkmıştır [18]. Ancak por oluşumu için gerekli nisin miktarının lipit II tarafından düşürüldüğü ve bunun nisinin etkinliğinde anahtar rol oynadığı deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır [19]. Araştırmacılar, lipozom içerisinde bir molekül lipit II'nin bulunması durumunda bile, nisinin bu moleküle yüksek ilgi gösterdiğini ve model membranlarda por oluşturarak sızıntının meydana gelmesine yol açtığını saptamıştır. İleri çalışmalarda, sitoplazmik membranda por oluşumu için öncelikle nisinin N- ucundaki İle-1 aminoasidinin, lipit II'nin fosfat gruplarına bağlandığı, ardından C- ucunun bu moleküle ilişkilendiği ve son aşamada membrana tutunduğu belirlenmiştir [20, 23]. (Şekil 1 b ve c). Bu bulgulara ilave

NİSİNİN SİNERJİSTİK ANTİMİKROBİYEL ETKİSİ

Nisinin patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etkisinin geliştirilmesi amacıyla bu ajanının farklı antimikrobiyel engeller ile kombine edilerek kullanılması yönündeki yaklaşımlar son yıllarda hızla artmaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalarda denenen başlıca engeller

Şekil 2'de verilmiştir. Söz konusu bu engellerin nisin ile birlikte kullanılmasında gıda çeşidi ve hedef mikrobiyal çeşitliliği büyük önem arz etmektedir. Ayrıca nisinin yapısal ve kimyasal özellikleri de birlikte kullanılacak antimikrobiyel engelin seçiminde dikkate alınması gereken önemli faktörlerden birisidir.



Şekil 2. Nisinin sinerjistik antimikrobiyel etkisini oluşturan engeller [51]

Nisinin Kimyasal ve Doğal Antimikrobiyel Ajanlarla Birlikte Kullanımı

Antimikrobiyel etkinin geliştirilmesi amacıyla, nisinle beraber NaCl kullanımı ilk uygulamalardan birisidir. Bu yönde yapılan öncü çalışmalarda tuzun nisinin antimikrobiyel aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir [28]. Ancak daha sonraki çalışmalarda, tuzun nisinin konformasyonel yapısı üzerinde ve hedef bakterilerdeki hücre duvar yapısında değişikliğe neden olmasından dolayı antimikrobiyel etkide azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir [29].

Nisin kullanımı, gıdalarda nitrit kullanımının azaltılması yönünde önemli katkı sağlamıştır. Özellikle fermente et ürünlerinde nisinin nitritle birlikte kombine edilmesiyle botulinum toksin üreticisi (*Clostridium botulinum*) ve diğer spor oluşturan *Clostridium*' ların yanında *L. monocytogenes*' leri de önemli ölçüde engellenmiştir [30]. Son yapılan bir çalışmada 250 mg/kg nisin (10 000 IU/mL) kullanarak, sucuk örneklerinde nitrit kullanımının %50 azaltılabileceği ve bunun da son üründe hem biyojenik amin oluşumunun düşürülmesinde hem de mikrobiyolojik güvenliğin sağlanmasında katkıda bulunduğu tespit edilmiştir [31]. Ancak özellikle yağ içeriği yüksek olan gıdalarda hedef alınan antimikrobiyel etkinliğe ulaşabilmek için birçok çalışmada olduğu gibi yüksek oranlarda nisin kullanılması gerekmektedir [30, 31]. Söz konusu bu durum nisinin hidrofobik yapısından kaynaklanmakta ve bu uygulamalarda nisinin önemli oranda yağ fazında tutulmasından dolayı antimikrobiyel etkinlik düşmektedir.

Gıda sistemlerinde mikroorganizmaların inhibisyonu amacıyla nisinle beraber kullanılan en verimli koruyuculardan birisi organik asit ve tuzlarıdır [32, 33]. Özellikle nisinin asidik ortamlarda daha yüksek oranlarda çözünebilmesi, bu ajanın bakteri hücre duvarına daha fazla nüfuz etmesini sağlayarak

antimikrobiyel etkinliği artırmaktadır [34, 35]. Örneğin, ticari kullanımı bulunan nisin A'nın çözünürlüğü pH 2'de 57 mg/mL iken, pH 6'da 1.5 mg/mL'ye düşmektedir [5, 34]. Çözelti ortamının alkalilik derecesi arttığında oluşan bu farklılık, molekül içi veya moleküller arası kimyasal modifikasyonlar nedeniyle, nisin molekülünde geri dönüşümsüz inaktivasyonun meydana gelmesinden oluşmaktadır [34].

Nisinin asidik koşullardaki yüksek etkinliği bu ajanın organik asitlerle birlikte kombine edilerek başta nisin dirençli *Listeria monocytogenes* olmak üzere, Gram negatif *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* suşları üzerinde inhibisyon etkinliğini geliştirmek üzere birçok çalışma yapılmıştır. 400 IU/mL nisinin laktik asit ile birlikte kullanılması durumunda *L. monocytogenes* sayısında 6.7 log oranında düşüş tespit edilmiştir [36]. Benzer şekilde farklı gıda sistemlerinde yapılan çalışmalarda nisinin laktik asitin sodyum tuzu ile birlikte kullanılması durumunda *Salmonella* suşları üzerinde antimikrobiyel etkinliğin önemli derecede geliştirilebildiği bildirilmiştir [37, 39]. Nisinle birlikte asetik asitin kullanıldığı Ricotta tipi peynirlerde 70 gün boyunca *Listeria* bulaşmasının engellendiği tespit edilmiştir. Fitik asitin nisinle kombine edildiği bir diğer çalışmada ise lahanaya ve brokoliye aşılanmış *L. monocytogenes* sayısında 2.20 ile 4.35 arasında değişen logaritmik azalma belirlenmiştir [40].

Nisinin Gram negatif bakterilerin inhibisyonu üzerindeki yetersizliği aşılması istenen önemli konulardan birisidir. Bu problemin çözümü yönünde nisinle birlikte kullanılan antimikrobiyel ajanlardan birisi şelatlardır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısındaki lipopolisakarit yapı (LPS) membran proteinlerine lipit A ile ve iki değerlikli katyonların aracılığı ile bağlanmıştır. Bu ajanlar, Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakarit yapının stabilitesini sağlayan Mg²⁺ ve Ca²⁺ katyonlarını tutarak, hücre duvar yapısının zayıflamasına ve geçirgenliğin artışına sebep olarak

nisinin sitoplazmik membrana ulaşmasını kolaylaştırmaktadır [41, 43]. Bu amaç doğrultusunda yaygın kullanımı olan güvenli şelatlar; sitrat, fosfat, heksametafosfat ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'dır. Bu sayılan şelatlar arasında özellikle EDTA hem antimikrobiyel aktiviteye sahip olması, hem de nisinin antimikrobiyel etkinliğini diğer şelatlarla göre daha fazla artırmadan dolayı gıda uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. EDTA kullanılarak yapılan bu çalışmalarda özellikle *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* türlerinin laboratuvar ve gıda ortamında inhibisyonu gösterilmiştir [44, 46]. *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarının *Salmonella*'ya kıyasla nisin ve EDTA varlığında daha hassas olduğu belirtilmiştir. Ayrıca gıda ortamında yapılan çalışmalarda nisin ile birlikte EDTA kullanımının besiyeri ortamına göre daha düşük düzeyde etkili olduğu ifade edilmektedir. Örneğin %2 yağlı UHT sütte tripton soy besiyerine göre, *S. enteridis* ve *P. fluorescens* suşlarının söz konusu antimikrobiyel kombinasyonlara daha fazla dirençli olduğu saptanmıştır [47]. Başka bir çalışmada ise, EDTA'nın nisin uygulamasından sonra gıdaya katılmasının, eşzamanlı kullanıma göre *E. coli* NCTC12900 üzerinde daha fazla inhibisyon sağlanmıştır [43].

Gıda patojenlerinin inhibisyonu amacıyla nisinle birlikte doğal antimikrobiyel ajanların kombine edilerek kullanılması, son yıllarda dikkati çeken önemli yönelimlerden birisidir [48, 57]. Özellikle tüketici tercihlerinin doğal bileşenlerin kullanılmasından yana olması doğal antimikrobiyel ajanların önemini daha fazla artırmaktadır. Diğer taraftan bu ajanların kullanılması ile bakteriler üzerinde letal etkiye ulaşabilmek için yüksek oranda kullanılmasının gerekliliği, yüksek konsantrasyonlarda kullanılması durumunda ise gıda aroma ve lezzetinde değişimlere ve kayıplara neden olması, bu ajanların nisin gibi diğer antimikrobiyel ajanlarla birlikte sinerjistik kullanımı teşvik etmektedir. Ayrıca bitkisel antimikrobiyel ajanlarla nisin dirençli bakterilerin inhibisyonu da sağlanmaktadır. Çünkü söz konusu bu ajanlar bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etkinliğini hücre duvarını bozarak göstermektedir. Nisin de hücre duvarı zarar gören hücrelerin sitoplazmik membranına ulaşarak daha fazla etkili olabilmektedir [50, 51, 54, 55].

Sinerjistik antimikrobiyel etki amacıyla nisinle birlikte kullanılan en önemli doğal antimikrobiyel ajanlar; kekikten ekstrakte edilen karvakrol ve timol, karanfilden ekstrakte edilen öjenol ve tarçından ekstrakte edilen sinamik asittir. Bunların yanında kekik, güveyotu, kimyon, su ladini kozalağı gibi bitkilerin özütü de nisinle birlikte patojen bakterilerin inhibisyonu için denenmiştir [48, 57]. Nisinin karvakrol, timol ve öjenol ile birlikte *B. cereus* ve *L. monocytogenes* suşları üzerinde sinerjistik antimikrobiyel etki gösterdiği tespit edilmiştir [58, 59]. Başka bir çalışmada karvakrol, öjenol ve timolün nisinle birlikte kullanılmasıyla *B. subtilis* ve *L. innocua* suşlarının tamamen inhibe edilebildiği belirlenmiştir [49]. Süt ortamına aşılardan *L. monocytogenes* suşlarında, su ladini kozalağının özütünün nisinle birlikte kullanılması durumunda canlılık tamamen sona erdirilmiştir [54]. Benzer şekilde, doğal antimikrobiyel ajanlar nisinle

birlikte Gram negatif bakterilerin inhibisyonu için de denenmiştir. Sinamik asit ile nisinin kombinasyonu ile yapılan çalışmada elma suyunda *S. typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 suşlarının inhibisyonunu hızlandırmıştır [60]. Ancak Olasupo ve ark. [49] 5 farklı organik bileşiğin (karvakrol, öjenol, timol, diasetil ve sinamik asit) *E. coli* ve *S. typhimurium* suşları üzerinde letal etkiye sahip olduğunu ancak bu organik bileşiklerin nisinle birlikte kullanılması durumunda letal etkinin geliştirilemediğini belirtmiştir. *S. enterica serovar Typhi* suşu kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, kekik yağında bulunan ve monoterpen yapısında olan *p*-cymene ve nisin kombinasyonunun 37°C'de yüksek letal etkili iken aynı organik bileşiklerin ayrı uygulamasında herhangi bir inhibisyon tespit edilememiştir. Bu çalışmada *p*-cymene'nin bakterilerin hücre duvarına nisinin difüze olmasını sağlayarak antimikrobiyel etkinin artırıldığı ifade edilmiştir [55].

Bitki özlerinin ve esansiyel yağlarının bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etki mekanizması nisinin inhibisyon etkisinin geliştirilmesi yönünde önem taşımaktadır. Her ne kadar bitkisel özütlerin ve esansiyel yağlarının antimikrobiyel etkisinin mekanizması üzerinde farklı yaklaşımlar bulunsa da, özellikle bu doğal antimikrobiyel ajanların hidrofobik karakterde olmalarından dolayı bakterilerin hücre duvarında bulunan yağ tabakasının yapısının bozulması ile geçirgenliğinin artırılması ile ilişkili mekanizmalar ağırlık kazanmıştır [50, 61]. Dolayısıyla bu doğal antimikrobiyel ajanların uygulaması ile bakterilerin hücre duvarında meydana gelen yapısal bozulmalar neticesinde nisinin bakteri hücrelerinin sitoplazmik zarına ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Bu yöndeki yaklaşımlarda özellikle karvakrol ve timolün yapısında yer alan fenolik yapının çeşitli yerlerinde bulunan hidroksil gruplarının hücre duvarı üzerinde etkili olmalarından dolayı sinerjistik antimikrobiyel etki için nisinle birlikte kullanılması açısından ön plana çıkmaktadır [62].

Patojen mikroorganizmaların engellenmesi amacıyla nisinle birlikte antimikrobiyel aktiviteye sahip diğer kimyasal bileşenler de kullanılmıştır. Örneğin nisin etil alkolle birlikte kullanıldığında *L. monocytogenes* suşlarının canlılıkları tamamen durdurulmuştur [63]. Diğer taraftan içme sütünde manolaurinin nisinle birlikte kullanılması durumunda *L. monocytogenes* suşlarının gelişimi engellenmiştir [64]. Bunların yanında nisinle birlikte bakteriyofajlardan saflaştırılan endolizin proteini (LysH5) denenmiştir. Bu çalışmada endolizin proteini ile nisin pastörize sütte birlikte kullanıldığında *S. aureus* suşlarında sadece nisinden elde edilen antimikrobiyel etkinlikten daha fazlasına ulaşıldığı rapor edilmiştir [65]. Nisin ve lizozime karşı ayrı ayrı dirençli olduğu bilinen *Clostridium difficile* sporları, söz konusu bu iki antimikrobiyel ajan gelişme ortamında aynı anda beraber bulundurulduğunda oluşan sinerjistik etki ile inhibisyonunda artış sağlanmıştır [66]. *Enterococcus faecalis* suşlarına karşı ϵ -polilisinin ve nisin kombinasyonunun antimikrobiyel sinerjistik etkisi membran geçirgenlik analizlerince doğrulanmış, çalışmada ϵ -polilisinin hücre içinde gösterdiği antimikrobiyel etkinin nisinin hücre zarına verdiği tahribatla kolaylaştırıldığı bildirilmiştir [67].

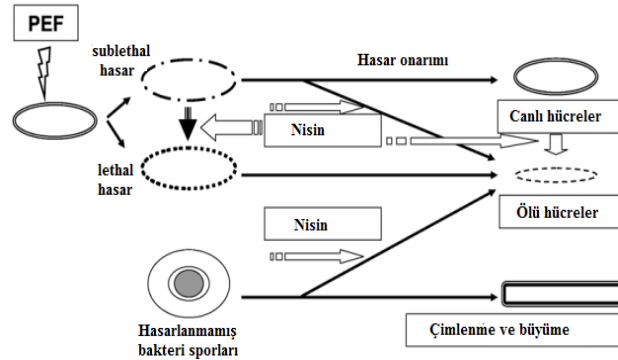
Nisinin Fiziksel İşlemlerle Birlikte Kullanımı

Gıda sistemlerinde mikrobiyal güvenliğin sağlanması amacı ile çoklu antimikrobiyel faktörlerin birlikte kullanımı veya hücre duvarlarını tahrip edici ısı işlem, vurgulu elektrik alan veya yüksek hidrostatik basınç gibi fiziksel uygulamaların antimikrobiyel ajanlarla kombinasyonu sonucu geliştirilen, prensibinde ortak hücre hedefler yer alan engeller teknolojisi hakkında yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır [68, 74]. Sadece bir antimikrobiyel etkiye maruz bırakılmış bakteri popülasyonunda gözlemlenebilecek durumlar sırasıyla şöyle özetlenebilir: i) uygulanan antimikrobiyel etkinin derecesi popülasyonda letal etki yaratabilir, ii) ya da antimikrobiyel ajan yeterli letal doza ulaşmadığından uygulama sonunda subletal etki gözlemlenebilir ki bu durumda hücreler strese karşı geliştirdikleri adaptasyon mekanizmaları sayesinde daha dirençli hale gelebilirler, iii) son olarak bakteri popülasyonu doğal olarak ya da sonradan antimikrobiyel ajana direnç gösterebilir. Engeller teknolojisinde ise kullanılan her stres faktörünün letal etkisinin oluşturduğu sinerjistik artıştan faydalanılır.

Gıdalarda raf ömrünün uzatılması için sıklıkla yapılan ısı işlem uygulaması çoğu gıdada besin kayıpları ve kalite kusurlarına neden olur. Alternatif seçenek olan bakteriyosinlerin kullanımı ise oldukça maliyetlidir. Isıl işlem ve nisin birlikte kullanılması halinde hem hedeflenen letal etki düzeyi yükseltilebilir hem de maliyet, besin ve kalite kayıpları önlenir. İstakozda *L. monocytogenes* inhibisyonunun araştırıldığı bir çalışmada nisin ve ısı işlem uygulamasının birlikte kullanılması halinde popülasyondaki letal etkinin arttığı bildirilmiştir [75]. Nisine dirençli *L. monocytogenes* suşları ile yapılan bir başka çalışmada suşlara 55°C ısı işlem uygulanması halinde nisine karşı duyarlılığın önemli ölçüde arttığı vurgulanmıştır [76] Subletal ısı işlem uygulamaları Gram negatif bakterileri nisinle birlikte enterosin, pediosin gibi birçok farklı bakteriyosine karşı da duyarlı hale getirmektedir [77, 80]. Ayrıca yüksek antimikrobiyel etki, bakteriyosin, ısı işlem ve şelatların kombine uygulamalarından elde edildiği de rapor edilmiştir [79, 80, 51] *Clostridium sporogenes* sporlarında sadece nisin uygulaması ile canlılık oranında herhangi bir azalma elde edilemediği, spor

inhibisyonu için nisin kullanımının ısı işlemle birlikte uygulanmasının daha etkili olduğu önerilmiştir [81]. Isıl işlem, asitlendirme ve nisin kombine uygulanması sonucu antimikrobiyel sinerjistik etkinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise; *C. sporogenes* sporlarında D değerlerinin önemli ölçüde düşürüldüğü ve spor inaktivasyonun etkin şekilde başarıldığı rapor edilmiştir [82]. Süt ürünlerinde sorun oluşturan *Bacillus sporothermodurans* sporları ısıya karşı oldukça dirençlidirler. Yapılan bir çalışmada *B. sporothermodurans* sporlarının 15-184 IU/mL nisin konsantrasyonu, 73-106°C ısı işlem kombinasyonu ile beraber kullanıldığında antimikrobiyel etkinin arttığı bildirilmiştir [83]. *Salmonella enteridis* ve *S. senftenberg*'in inhibisyonu için önce 55°C'de 15 dakika gibi bir ısı işlem, sonrasında nisin ve karvakrolun beraber kullanıldığı bir engeller uygulamasında sonuçlar antimikrobiyel içermeyen kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde inhibisyon derecesini yükselttiğini göstermiştir [84]. Aynı sinerjistik etki *Bacillus cereus* sporlarında etkili bir şekilde sağlanmış, hücrelerin çimlenme ve sporülasyon yeteneği ciddi oranda zayıflatılmıştır [85]. Tüm bu özetlenen bilgiler ışığında nisin ile termal inaktivasyon kinetiğinin optimizasyonu gerçekleştirildiğinde, ulaşılacak letal etkinin yüksek olacağı açıktır.

Vurgulu elektrik alan uygulaması (PEF) iki elektrotun arasında oluşturulan yüksek gerilim darbelerinin neden olduğu termal olmayan alternatif bir mikrobiyal inaktivasyon yöntemidir [86]. Burada uygulanan çok yüksek frekansta doğrudan elektrik akım uygulaması bakteri hücre zarı geçirgenliğinde hasara yol açmakta ve hücre ölümüne neden olmaktadır. PEF yöntemi volumetrik etkisinden ötürü akışkan özellikteki gıdalarda gerek yalnız başına gerek sinerjistik sonuç alınan antimikrobiyel ajan, kimyasallar veya fiziksel diğer işlemlerin kombine uygulamalarıyla mikrobiyal güvenlik amacı ile kullanılmaktadır. Engeller teknolojisi kapsamında uygulanan PEF'de, hasar almayan bakteri sporları devamında uygulanan bakteriyosinlerin antimikrobiyel etkisinden kurtulamaz (Şekil 3). Bu sinerjistik etkinlik PEF'e bağlı elektrik alan kuvveti, vurgu sayısı ve vurgu süresi gibi faktörlerin optimize edilmesine bağlı olarak değişiklik gösterir [87, 89].



Şekil 3. PEF yönteminin nisin ile birlikte kullanıldığında mikrobiyal popülasyonlar üzerinde oluşturduğu sinerjistik antimikrobiyel etki mekanizması [51]

PEF yönteminin nisin ile sinerjistik antimikrobiyel etkisinin esas alındığı birçok bilimsel çalışma bu yöntemin gıda muhafazasında ve biyogüvenliğinde kullanılmasına ışık tutmaktadır [3, 4, 90-93]. Nisin gibi antimikrobiyellerin orta derece ısı işlemlerle birlikte gerçekleştirilen PEF uygulamalarında özellikle meyve suyu gibi düşük asitli gıdalarda gelişebilen mikroorganizmaların vejetatif formları üzerinde etkili kontrol sağlanabilmektedir [4]. Ayrıca nisin ve PEF kombin uygulaması, kollajen jel yapılarında soruna neden olan *Staphylococcus epidermis* üzerinde yarattığı sinerjistik antimikrobiyel etkisinden dolayı doku mühendisliğinde de kullanım alanı bulmuştur [90] Nisin ve PEF kombin uygulamasının sinerjistik etkisi, fosfat tamponlu ortamda *Micrococcus luteus*'a, birada *Lb. plantarum*'a, yağsız sütte *S. aureus*'a ve *B. cereus*'un vejetatif hücrelerine de yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [94, 97].

Birçok çalışmada PEF uygulamasına maruz bırakılmış Gram negatif bakteri hücrelerinin nisine karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir [92, 93, 98, 99]. Portakal suyunda *Salmonella* inhibisyonu için yapılan PEF uygulamasını takiben meyve suyuna 27.5 IU/mL nisin ve 690 IU/mL lizozim ilave edilmesi ile oluşturulan sinerjistik antimikrobiyel etki sayesinde hücre canlılığında 2.75 logaritma azalma elde edilmiştir. Nisin ve lizozimin beraber kullanılması PEF ile hücre duvarı hasar gören hücreler üzerinde bakterisidal etkiyi artırmıştır [98]. Benzer bir başka çalışmada ise tarçından ekstrakte edilmiş sinamon ve nisin karışımı PEF ile beraber uygulandığında güçlü patojenitesi bulunan *E.coli* O157:H7 üzerinde 6-8 logaritma azalma sağlamıştır [99]. 1000 IU/mL nisin konsantrasyonu ile 11.25 kv/cm şiddette 3 atım ile gerçekleştirilen bir nisin-PEF uygulamasında elde edilen 4 logaritma azalmanın benzerine ulaşmak için 500 IU/mL nisin konsantrasyonu kullanıldığında ise aynı şiddette 5 atımlı PEF yapılması gerekmiştir [100]. Görüldüğü gibi sinerjistik antimikrobiyel etkinin elde edilebilmesi için kullanılan engellerden birinin gücü düşürüldüğünde diğerinin dengeli bir şekilde yükseltilmesi aynı efektif sonucu almayı sağlamaktadır. Bir diğer çalışmada ise portakal suyunda nisin ve PEF'in (40 Kv/cm, 100 mikrosaniye) sinerjistik antimikrobiyel etkisi *E. coli* K12, *L. innocua* ve *Pichia fermentas*'da sırasıyla 5.6, 7.9 ve 7.8 logaritma azalma olarak belirlenmiştir [3]. Sonuç olarak gıda kaynaklı patojenik veya saprofit mikroorganizmalara karşı PEF uygulamasından nisin ile oluşturduğu olumlu sinerjistik etkisinden dolayı faydalanılabilmektedir. Benzer sinerjistik antimikrobiyel etki diğer bakteriyosin kombinasyonları ile de gözlenmiştir. Fakat burada önemli olan husus kullanılacak olan bakteriyosinin antimikrobiyel engel oluşturabilmesi için PEF uygulamasına karşı dirençli olabilmesi, PEF uygulamasından sonra canlı kalan endosporlar üzerinde inhibitif etki gösterebilmesidir.

Mikrobiyal inaktivasyon amacıyla sıklıkla kullanılan ısı işlemlerin gıdalar üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkileri azaltmak için geliştirilen alternatif muhafaza yöntemlerinden bir diğeri de Yüksek Hidrostatik Basınç (HHP) uygulamasıdır. HHP uygulaması, katı ve sıvı gıdaların ambalajlı veya ambalajsız olarak 100-1000

MPa basınca maruz bırakılması işlemi olup, bu basıncın mikroorganizmaların hücre zarında görev bozuklukları (malfonksiyonlar) membran proteinlerinin denatürasyonuna bağlı olarak, aminoasit alımının inhibisyonuna neden olmaktadır. Hücre morfolojisi basınç uygulamasıyla değişir ve hücre bölünmesi yavaşlar. Hücre için önemli enzimlerin denatüre olması ve ribozomun zarar görmesi mikroorganizmanın inaktivasyonuna neden olmaktadır [101]. Nisinin HHP uygulaması ile birlikte gösterdiği sinerjistik antimikrobiyel etki ise söz konusu iki engelin hücre zarında meydana getirdikleri kümülatif hasardan ileri gelmektedir [102, 106]. HHP uygulamasının antimikrobiyel etkinliği uygulanan bakteri popülasyonunun özelliklerine ve hücrelerin buldukları gelişim evrelerine göre değişkenlik gösterir. Nisin Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyel etkili olmamasına rağmen, HHP uygulamasından sonra ortama eklendiğinde Gram negatif bakteriler üzerinde güçlü inhibitif etki göstermektedir [107, 110]. Nisin ve pediosin karışımının HHP ile kombinasyonlu uygulanması sonucu *Clostridium* sporları üzerinde de inhibitif etkiye ulaşmıştır [111]. HHP uygulamasının etkinliği ayrıca uygulanan gıdanın biyolojik yapısı ile de ilgilidir. Et ve süt ürünleri kompleks kompozisyonuna sahip olmaları ve nötral pH'larda bulunmalarından dolayı HHP uygulamalarına karşı güçlü bariyer özelliği gösterirler. Fosfat tamponu içerisinde bulunan *E. coli* MG1655 suşunda 400 MPa HHP uygulaması ile canlılık oranında 7 logaritma azalma sağlanırken; aynı suş ile süt ortamında 700 MPa HHP uygulaması ile sadece 3 logaritma azalma sağlanabilmiştir. Süt ortamına ilave edilen 400 IU/mL nisin ve 400 µg/mL lizozimin oluşturduğu sinerjistik antimikrobiyel etki ile inhibisyon oranı artmıştır [112]. Benzer şekilde süt ortamında HHP uygulamalarına karşı direnç gösteren bakterilerin inaktivasyonunun nisin ilavesi ile artırıldığı başka çalışmalarla da gösterilmiştir [110]. Bu çalışmaların en önemli bulgusu HHP uygulamasının yüksek şiddetlerde kullanmak yerine, nisin gibi sinerjistik etkinin oluşturulabileceği alternatif antimikrobiyellerle birlikte kullanılmasıdır. Salatalık suyunda yapılan bir çalışmada, 350 MPa 10 dakika HHP ve 100 IU/mL nisin uygulamasıyla mikroflorada 4.5 logaritma azalma elde edilmiştir [102]. *Bacillus subtilis*'un inaktivasyonu için 100-500 MPa 15 dakika HHP ve 200 IU/mL nisin ile birlikte kullanılmış, hücrelerde meydana gelen ultramakroskopik yapıdaki moleküler değişimler geçirimli elektron mikroskopu aracılığıyla gözlemlenmiştir. Nötral pH'da gerçekleştirilen bu çalışma ile nisin+HHP uygulaması *B. subtilis* popülasyonu 2.5 logaritma azaltmış, hücrelerin membran geçirgenliğini %60 artırmıştır. Ayrıca HHP uygulaması hücre membranındaki fosfolipid molekülleri jelimsi bir yapıya dönüştürmüş, böylece nisin hücre içerisine girebildiği bildirilmiştir [103]. 7 logaritma düzeyinde *L. monocytogenes* inoküle edilmiş jambonlarda HHP ve nisin uygulaması ile 3.85 logaritma azalma kaydedilmiş, HHP ve nisin birlikte uygulamasının et ürünlerinin depolamasında mikrobiyal güvenliği desteklediği ifade edilmiştir [104]. *Salmonella enteritidis* suşunun inaktivasyonu, 200 IU/mL nisin ve 200 MPa HHP uygulamalarının ancak ikisi birden kullanıldığında başarılabilmiştir [105] Sıralanan bu bilimsel veriler, HHP ile nisin birlikte kullanılması

durumunda gıda sistemlerinde mikrobiyal riskin önlenmesi açısından önemli olduğunu ispatlamaktadır.

Bir diğer yenilikçi engel uygulaması ise; vurgulu (atımlı) ışık uygulamasıdır. Bu yöntemde infrared bölgeye yakın geniş spektrumlu dalga boyları ($200 \text{ nm}^{-1} \text{ mm}$) kullanılmaktadır. Peynir örneklerinde nisin ile vurgulu ışık uygulamalarının *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* üzerindeki sinerjistik antimikrobiyel etkisi araştırılmıştır [113]. Araştırmacılar peynir örneklerine nisin ilavesini gerçekleştirdikten sonra PL uygulamasının sinerjistik bir etki yaratmadığını, aksine bakterilerin UV ışıklarını absorbe etmelerinde zayıfladıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmada PL ve bakteriyosin kullanım sırasının önem arz ettiği vurgulanmış; *L. innocua*'da 3.73 ± 0.96 logaritma azalmaya 9.22 J/cm^2 şiddetinde PL uygulamasından sonra yapılan nisin ilavesi ile ulaşılmıştır. Aynı örneklerde sadece PL uygulaması gerçekleştirildiğinde ulaşılan mikrobiyal inaktivasyon oranı 3.01 ± 0.48 logaritma olarak rapor edilmiştir. PL uygulamasının antilisteral etkinliğini artırmak için beraberinde nisin kullanıldığı bir başka çalışmada 4°C 'de 48 h depolanan sosis örneklerinde toplam 4.03 logaritma azalma gözlemlendiği kaydedilmiştir. Nisin ve PL'in birlikte uygulandığı bu engeller sistemi hazır gıdaların üretiminde etkin bir antilisteral adım olarak önerilmiştir [114].

SONUÇ

Tüketicilerin koruyucu içeren gıdalara karşı hassasiyeti, gıdaların korunmasında doğal yolların kullanılmasını ön plana çıkarmıştır. Diğer taraftan gıdalarda patojen mikroorganizmaların engellenmesi de tüketici sağlığı veya gıda güvenliği açısından oldukça önemlidir. Nisin, gıda sistemlerinde güvenle koruyucu olarak kullanılan önemli alternatif doğal koruyuculardan birisidir. Nisinin çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemler ile birlikte kullanılması gıda sistemlerinde mikrobiyal inhibisyonu geliştirmektedir. Özellikle nisin etkilili olmadığı bakteriler bu şekilde durdurulabilmektedir.

Gıdaların üretiminde uygulanan muhafaza yöntemleri ile birlikte nisin kullanılması, muhafaza yöntemlerinden kaynaklanan olumsuzlukların giderilmesi açısından da katkı sağlamaktadır. Özellikle gıda sisteminde nisin kullanılması durumunda muhafaza yönteminin düşük uygulama değerlerinde mikrobiyal inhibisyon başarılılabilmektedir. Söz konusu uygulama ile gıdalarda ısı işlem esnasında karşılaşılan sorunların da önüne geçilebilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Komora, N., Bruschi, C., Magalhães, R., Ferreira, V., Teixeira, P., 2017. Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *International Journal of Food Microbiology* 20(245): 79-87.
- [2] Malekmohammadi, S., Kodjovi, K.K., Sherwood, J., Bergholz, T.M., 2017. Genetic and environmental factors influence *Listeria monocytogenes* nisin

- resistance. *Journal of Applied Microbiology* DOI: 10.1111/jam.13479. Baskıda.
- [3] McNamee, C., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J., Scannell, A.G., 2010. PEF based hurdle strategy to control *Pichia fermentans*, *Listeria innocua* and *Escherichia coli* k12 in orange juice. *International Journal of Food Microbiology* 138(1-2): 13-8.
- [4] Saldaña, G., Minor-Pérez, H., Raso, J., Alvarez, I., 2011. Combined effect of temperature, pH, and presence of nisin on inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Foodborne Pathogens and Disease* 8(7): 797-802.
- [5] Hurst, A., 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology* 27(2): 85-123.
- [6] Abee, T., Rombouts, F.M., Hugenholtz, J., Guihard, G., Letellier, L., 1994. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4): 1962-1968.
- [7] Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 69(2): 193-202.
- [8] de Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* properties, biosynthesis, fermentation and applications. *In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. 151-221.
- [9] Ruhr, E., Sahl, H.G., 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. *Journal of Bacteriology* 27(5): 841-845.
- [10] Kordel, M., Sahl, H.G., 1986. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep 5 and nisin. *FEMS Microbiology Letters* 34(2): 139-144.
- [11] Gao, F.H., Abee, T., Konings, W.N., 1991. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8): 2164-70.
- [12] Garcerá, M.J., Elferink, M.G., Driessen, A.J., Konings, W.N., 1993. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of proton motive force and lipid composition. *European Journal of Biochemistry* 212(2): 417-22.
- [13] Driessen, A.J., van den Hooven, H.W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H.G., Konings, R.N., Konings, W.N., 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34(5): 1606-14.
- [14] Demel, R.A., Peelen, T., Siezen, R.J., De Kruijff, B., Kuipers, O.P., 1996. Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *European Journal of Biochemistry* 235 (1-2):267-74.
- [15] Martin, I., Ruyschaert, J.M., Sanders, D., Giffard, C.J., 1996. Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of

- an introduced tryptophan. *European Journal of Biochemistry* 239(1): 156-164.
- [16] Breukink, E., van Kraaij, C., van Dalen, A., Demel, R.A., Siezen, R.J., de Kruijff, B., Kuipers, O.P., 1998. The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry* 37(22): 8153-81562.
- [17] Van Den Hooven, H.W., Spronk, C.A., Van De Kamp, M., Konings, R.N., Hilbers, C.W., Van De Van, F.J., 1996. Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *European Journal of Biochemistry* 235(1-2): 394-403.
- [18] Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., Sahl, H.G., 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology* 30(2): 317-327.
- [19] Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.G., de Kruijff, B., 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286(48): 2361-2364.
- [20] Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.G., 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry* 276(3): 1772-1779.
- [21] Hsu, S.T., Breukink, E., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M., van Nuland, N.A., 2002. Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry* 41(24): 7670-7676.
- [22] Bonev, B.B., Breukink, E., Swiezewska, E., De Kruijff, B., Watts, A. 2004. Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. *The FASEB Journal* 18(15): 1862-1869.
- [23] Bauer, R., Dicks, L.M., 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology* 110(2): 201-216.
- [24] Hasper, H.E., Kramer, N.E., Smith, J.L., Hillman, J.D., Zachariah, C., Kuipers, O.P., de Kruijff, B., Breukink, E., 2006. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*. 313(5793): 1636-1637.
- [25] Morris, S.L., Walsh, R.C., Hansen, J.N., 1984. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *Journal of Biological Chemistry* 259(21): 13590-13594.
- [26] Buchman, G.W., Banerjee, S., Hansen, J.N., 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 263(31): 16260-16266.
- [27] Chan, W.C., Dodd, H.M., Horn, N., Maclean, K., Lian, L.Y., Bycroft, B.W., Gasson, M.J., Roberts, G.C., 1996. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Applied and Environmental Microbiology* 62(8): 2966-2969.
- [28] Harris, L.J., Fleming, H.P., Klaenhammer, T.R., 1991. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL 500 to nisin. *Journal of Food Protection* 54: 836-840.
- [29] Jydegaard, A.M., Gravesen, A., Knøchel, S., 2000. Growth condition-related response of *Listeria monocytogenes* 412 to bacteriocin inactivation. *Letters in Applied Microbiology* 31(1): 68-72.
- [30] Gill, A.O., Holley, R.A., 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 180(3): 251-259.
- [31] Kurt, S., Zorba, O., 2010. Biogenic amine formation in Turkish dry fermented sausage (sucuk) as affected by nisin and nitrite. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(15): 2669-2674.
- [32] Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59(2): 171-200.
- [33] Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70(2-4): 331-345.
- [34] Liu, W., Hansen, J.N., 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(8): 2551-2558.
- [35] Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8): 2873-2878.
- [36] Buncic, S., Fitzgerald, S., Bell, C.M., Hudson, R.G., 1995. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety* 15(3): 247-264.
- [37] Nykänen, A., Weckman, K., Lapveteläinen, A., 2000. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology* 61(1): 63-72.
- [38] Long, C., Phillips, C.A., 2003. The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken. *Food Microbiology* 20(5): 495-502.
- [39] Ukuku, D.O., Fett, W.F., 2004. Effect of nisin in combination with EDTA, sodium lactate, and potassium sorbate for reducing *Salmonella* on whole and fresh-cut cantaloupe. *Journal of Food Protection* 67(10): 2143-2150.
- [40] Bari, M.L., Ukuku, D.O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., Kawamoto, S., 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection* 68(7): 1381-1387.
- [41] Boziaris, I.S., Humpheson, I., Adams, M.R., 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology* 43(1-2): 7-13.
- [42] Yethon, J.A., Whitfield, C., 2001. Lipopolysaccharide as a target for the development of novel therapeutics in Gram-negative bacteria.

- Current Drug Targets. Infectious Disorders* 1(2): 91-106.
- [43] Belfiore, C., Castellano, P., Vignolo, G., 2007. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiology* 24(3): 223-229.
- [44] Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R., 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57(12): 3613-3615.
- [45] Cutter, C.N., Siragusa, G.R., 1995. Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *Journal of Food Protection* 58(9): 1028-1030.
- [46] Boziaris, I.S., Adams, M.R., 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. *International Journal of Food Microbiology* 53(2-3):105-113.
- [47] Jill, K.B., Davidson, J.M., 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology* 90(1): 63-74.
- [48] Periago, P.M., Palop, A., Fernandez, P.S., 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science and Technology International* 7(6): 487-492.
- [49] Olasupo, N.A., Fitzgerald, D.J., Narrad, A., Gasson, M.J., 2004. Inhibition of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* by nisin in combination with some naturally occurring organic compounds. *Journal of Food Protection* 67(3): 596-600.
- [50] Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223-253.
- [51] Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120(1-2): 51-70.
- [52] Lee, S.Y., Jin, H.H., 2008. Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. *Letters in Applied Microbiology* 47(4): 315-321.
- [53] Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80(2): 159-166.
- [54] Yoon, J.I., Bajpai, V.K., Kang, S.C., 2011. Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food and Chemical Toxicology* 49(1): 109-114.
- [55] Rattanachaiyunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010. Synergistic antimicrobial effect of nisin and p-cymene on *Salmonella enterica* serovar *Typhi* in vitro and on ready-to-eat food. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 74(3): 520-524.
- [56] Pajohi, M.R., Tajik, H., Farshid, A.A., Basti, A.A., Hadian, M., 2011. Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and nisin alone and in combination on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a food model and bacterial ultrastructural changes. *Foodborne Pathogen and Disease* 8(2): 283-290.
- [57] Pajohi, M.R., Tajik, H., Farshid, A.A., Hadian, M., 2011. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. *Journal of Applied Microbiology* 110(4):943-951.
- [58] Periago, P.M., Palop, A., Fernandez, P.S., 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science Technology International* 7(6): 487-492.
- [59] 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 Microbiology* 21(3): 283-289.
- [60] Yuste, J., Fung, D.Y., 2004. Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. *Journal of Food Protection* 67(2): 371-377.
- [61] Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R., 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forsch Komplementmed.* 16(2): 79-90.
- [62] Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91(3): 453-462.
- [63] Brewer, R., Adams, M.R., Park, S.F., 2002. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Letters in Applied Microbiology* 34(1):18-21.
- [64] Tokarsky, O., Marshall, L.D., 2008. Immunosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 — Perspectives for use in the meat processing industry. *Food Microbiology* 25(1): 1-12.
- [65] Garcia, P., Martinez, B., Rodriguez, L., Rodriguez, A., 2010. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 141(3): 151-155.
- [66] Chai, C., Lee, K.S., Imm, G.S., Kim, Y.S., Oh, S.W., 2017. Inactivation of *Clostridium difficile* spore outgrowth by synergistic effects of nisin and lysozyme. *Canadian Journal of Microbiology* (Baskıda) doi: 10.1139/cjm-2016-0550.
- [67] Liu, F., Liu, M., Du, L., Wang, D., Geng, Z., Zhang, M., Sun, C., Xu, X., Zhu, Y., Xu, W., 2015. Synergistic antibacterial effect of the combination of ϵ -polylysine and nisin against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Food Protection* 78(12): 2200-2206.
- [68] Moreira, M.R., Álvarez, M.V., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., 2016. Effects of pulsed light treatments and pectin edible coatings on the quality of fresh-cut apples: a hurdle technology approach. *Journal of The Science of Food and Agriculture* doi: 10.1002/jsfa.7723.

- [69] Luo, K., Oh, D.H., 2016. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on fresh-cut bell pepper treated with slightly acidic electrolyzed water combined with ultrasound and mild heat. *Food Microbiology* 53(Pt B): 165-171.
- [70] Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Medina, M., 2016. Natural antimicrobials and high-pressure treatments on the inactivation of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in cold-smoked salmon. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 96(7): 2573-2578.
- [71] Liato, V., Labrie, S., Viel, C., Benali, M., Aïder, M., 2015. Study of the combined effect of electro-activated solutions and heat treatment on the destruction of spores of *Clostridium sporogenes* and *Geobacillus stearothermophilus* in model solution and vegetable puree. *Anaerobe*. 35(Pt B): 11-21.
- [72] García-García, R., Escobedo-Avellaneda, Z., Tejada-Ortigoza, V., Martín-Belloso, O., Valdez-Fragoso, A., Welti-Chanes, J., 2015. Hurdle technology applied to prickly pear beverages for inhibiting *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 60(6): 558-564.
- [73] Tango, C.N., Mansur, A.R., Kim, G.H., Oh, D.H., 2014. Synergetic effect of combined fumaric acid and slightly acidic electrolyzed water on the inactivation of food-borne pathogens and extending the shelf life of fresh beef. *Journal of Applied Microbiology* 117(6): 1709-1720.
- [74] Park, S.Y., Song, H.H., Ha, S.D., 2014. Synergistic effects of NaOCl and ultrasound combination on the reduction of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in raw laver. *Foodborne Pathogens and Disease* 11(5): 373-378.
- [75] Budu-Amoako, E., Ablett, R.F., Harris, J., Delves-Broughton, J., 1999. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat. *Journal of Food Protection* 62(1): 46-50.
- [76] Modi, K.D., Chikindas, M.L., Montville, T.J., 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Letters in Applied Microbiology* 30(3): 249-253.
- [77] Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., Ray, B., 1992. Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins pediocin AcH and nisin. *Letters in Applied Microbiology* 15(6): 239-243.
- [78] Boziaris, I.S., Humpheson, I., Adams, M.R., 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology* 43(1-2): 7-13.
- [79] Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., Maqueda, M., 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4623-4626.
- [80] Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E., 2005. Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 99(6): 1364-1372.
- [81] Ros-Chumillas, M., Esteban, M.D., Huertas, J.P., Palop, A., 2015. Effect of Nisin and Thermal Treatments on the Heat Resistance of *Clostridium sporogenes* Spores. *Journal of Food Protection* 78(11): 2019-2023.
- [82] Naim, F., Zareifard, M.R., Zhu, S., Huizing, R.H., Grabowski, S., Marcotte, M., 2008. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: from kinetics to process validation. *Food Microbiology* 25(7): 936-941.
- [83] Aouadhi, C., Mejri, S., Maaroufi, A., 2015. Inhibitory effects of nisin and potassium sorbate alone or in combination on vegetative cells growth and spore germination of *Bacillus sporothermodurans* in milk. *Food Microbiology* 46: 40-45.
- [84] Esteban, M.D., Aznar, A., Fernández, P.S., Palop, A., 2013. Combined effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*. *Food Science Technology International* 19(4): 357-364.
- [85] Faïlle, C., Membre, J.M., Kubaczka, M., Gavini, F., 2002. Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation. *Journal of Food Protection* 65(12): 1930-1936.
- [86] Vega-Mercado, H., Martín-Belloso, O., Qin, B.L., Chang, F.J., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., 1997. Non-thermal food preservation: pulsed electric fields. *Trends in Food Science and Technology* 8(5): 151-157.
- [87] Wouters, P., Álvarez, I., Raso, J., 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology* 12(3-4): 112-121.
- [88] Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O., 2002. Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends in Food Science and Technology* 13(6-7): 195-204.
- [89] Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D., 2002. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology* 12(3-4): 103-111.
- [90] Griffiths, S., Maclean, M., Macgregor, S.J., Anderson, J.G., Helen Grant, M., 2011. Decontamination of collagen biomatrices with combined pulsed electric field and nisin treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 96(2): 287-293.
- [91] Galvagno, M.A., Gil, G.R., Iannone, L.J., Cerrutti, P., 2007. Exploring the use of natural antimicrobial agents and pulsed electric fields to control spoilage bacteria during a beer production process. *Revista Argentina de Microbiología* 39(3): 170-176.
- [92] Santi, L., Cerrutti, P., Pilosof, A.M., de Huergo, M.S., 2003. Optimization of the conditions for electroporation and the addition nisin for

- Pseudomonas aeruginosa* inhibition. *Revista Argentina de Microbiología* 35(4): 198-204.
- [93] Terebiznik, M.R., Jagus, R.J., Cerrutti, P., De Huergo, M., Pilosof, A.M., 2002. Inactivation of *Escherichia coli* by a combination of nisin, pulsed electric fields, and water activity reduction by sodium chloride. *J of Food Prot.* 65(8): 1253-1258.
- [94] Dutreux, N., Notermans, S., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., 2000. Effects of combined exposure of *Micrococcus luteus* to nisin and pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 60(2-3): 147-152.
- [95] Ulmer, H.M., Heinz, V., Gänzle, M.G., Knorr, D., Vogel, R.F., 2002. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *Journal of Applied Microbiology* 93(2):326-335.
- [96] Sobrino-Lopez, A., Martin Belloso, O., 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection* 69(2):345-353.
- [97] Pol, I.E., Mastwijk, H.C., Bartels, P.V., Smid, E.J., 2000. Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1): 428-430.
- [98] Liang, Z., Mittal, G.S., Griffiths, M.W., 2002. Inactivation of *Salmonella typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 65(7): 1081-1087.
- [99] Lu, J., Mittal, G.S., Griffiths, MW. 2001. Reduction in levels of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection* 64(7): 964-969.
- [100] Terebiznik, M.R., Jagus, R.J., Cerrutti, P., De Huergo, M., Pilosof, A.M., 2000. Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 63(6): 741-746.
- [101] Farkas, D.F., Hoover, D.G., 2000. High pressure processing. In: Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing Technologies. *Journal of Food Science* 12(3): 47-64.
- [102] Zhao, L., Wang, Y., Wang, S., Li, H., Huang, W., Liao, X., 2014. Inactivation of naturally occurring microbiota in cucumber juice by pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology* 174: 12-18.
- [103] Qi, W., Qian, P., Yu, J., Zhang, X., Zhang, C., Lu, R., 2011. Synergistic inactivation of *Bacillus subtilis* by high hydrostatic pressure and nisin at neutral pH. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 51(1): 35-42.
- [104] Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., 2012. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 154(3): 107-112.
- [105] Lee, J., Kaletunç, G., 2010. Inactivation of *Salmonella enteritidis* strains by combination of high hydrostatic pressure and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 140(1): 49-56.
- [106] López-Pedemonte, T., 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. *Journal of Dairy Science* 86(10): 3075-3081.
- [107] Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B., 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 60(11): 4174-4177.
- [108] Hauben, K.J.A., Wuytack, E.Y., Soontjens, C.C.F., Michiels, C.W., 1996. High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *Journal of Food Protection* 59(4): 350-355.
- [109] Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 64(3): 325-332.
- [110] Black, E.P., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., 2005. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6(3): 286-292.
- [111] Kalchayanand, N., Dunne, C.P., Sikes, A., Ray, B., 2004. Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5(3): 277-283.
- [112] Garcia-Graells, C., Masschalck, B., Michiels, C.W., 1999. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *Journal of Food Protection* 62(11): 1248-1254.
- [113] Proulx, J., Sullivan, G., Marostegan, L.F., VanWees, S., Hsu, L.C., Moraru, Cl., 2017. Pulsed light and antimicrobial combination treatments for surface decontamination of cheese: Favorable and antagonistic effects. *Journal of Dairy Science* 100(3): 1664-1673.
- [114] Uesugi, AR., Moraru, Cl., 2009. Reduction of *Listeria* on ready-to-eat sausages after exposure to a combination of pulsed light and nisin. *Journal of Food Protection* 72(2): 347-53.