
Soumis le : 25 Septembre 2013

Forme révisée acceptée le : 22 Avril 2014

Email de l'auteur correspondant :

chediaaouadhi@yahoo.fr

Nature & Technology

Effet des facteurs environnementaux sur l'inactivation des spores de *Bacillus sporothermodurans* par la nisine

Chedia Aouadhi^{a, b}, Zeineb Rouissi^a, Slah Mejri^b and Abderrazak Maaroufi^a

¹Laboratoire d'Epidémiologie et Microbiologie Vétérinaire, Groupe de Bactériologie et Développement Biotechnologique, Institut Pasteur de Tunis (IPT), Université El Manar, BP 74, 13 place Pasteur, Belvédère, 1002 Tunis, Tunisie.

²Laboratoire de ressources Animales et Alimentaires, Institut National Agronomique de Tunisie, Université Carthage, 43, Rue Charles Nicole, Cité Mahrajène, Le Belvédère, 1082 Tunis, Tunisie

Résumé

Les spores fortement thermorésistantes de *Bacillus sporothermodurans*, présentent dans le lait UHT, sont responsables de son instabilité en affectant ses qualités organoleptiques. La destruction de ces germes devient un défi très difficile dans l'industrie laitière. Il est donc devenu nécessaire de développer des méthodes d'inactivation de ces germes pour assurer la qualité du lait. C'est dans ce cadre que s'intègre notre travail dont l'objectif général est d'étudier l'inactivation des spores de *B. sporothermodurans* par la nisine. En étudiant l'effet de différentes concentrations de la nisine sur l'inactivation de spores de *B. sporothermodurans*, nous avons remarqué que la nisine, à haute concentration (5×10^3 UI/ml), a un effet sporicide. De plus, son efficacité dépend des facteurs physico-chimiques. En effet, elle augmente proportionnellement avec l'augmentation de l'acidité du milieu. La présence de la nisine (100 UI/ml) dans le milieu améliore l'efficacité du traitement thermique dans l'inactivation des spores très thermorésistantes de *B. sporothermodurans*. Cette étude montre le potentiel d'utilisation de la nisine en combinaison avec la température ou avec l'acidification de milieu pour inactiver les spores très thermo-résistantes de *B. sporothermodurans*.

Mots clés: Inactivation, pH, température, spores, *Bacillus sporothermodurans*, nisine

Abstract

Highly heat-resistant of *Bacillus sporothermodurans* spores, present in UHT milk, are responsible for its instability and affecting its organoleptic qualities. The destruction of these micro-organisms is a very difficult challenge in the dairy industry. Therefore, it has become necessary to develop more efficient processes to inactivate these organisms and ensure milk quality. In this context that our work fits with the overall objective is to study the inactivation of *B. sporothermodurans* spores by nisin. By studying the effect of different concentrations of nisin on the inactivation of *B. sporothermodurans* spores, we noticed that nisin at high concentration (5×10^3 UI/ml) has Sporicidal effect. In addition, its effectiveness depends on the physico-chemical factors. Indeed, it increases with increasing the acidity of the medium. The presence of nisin (100 UI/ml) improves the effectiveness of temperature in the inactivation of highly heat-resistant spores of *B. sporothermodurans*.

Keywords: Inactivation, pH, temperature, spores, *Bacillus sporothermodurans*, nisin

1. Introduction

Les bactéries aérobies sporulées du genre *Bacillus* font partie de la flore contaminant du lait cru. Elles sont responsables de la détérioration de la qualité du lait et de

ses produits [1]. Afin d'éliminer ces contaminants, divers procédés technologiques ont été mis au point. Le traitement à ultra haute température (UHT) devrait résulter un produit laitier commercialement stérile (lait UHT). Mais depuis 1985, un problème concernant cette

dernière a été rapporté [2-3]. Cette non-stérilité a semblé être causée par la présence des spores bactériennes très résistantes au traitement UHT, appartenant à l'espèce *Bacillus sporothermodurans* [2,4]. Ces spores ont été détectées pour la première fois dans le lait UHT en Europe [2]. Actuellement, ce problème est répandu dans divers pays dans le monde [2,5].

En fait, la destruction des spores devient un défi très difficile, pour cela de nouvelles stratégies doivent être mises en place tout en assurant la qualité organoleptique et microbiologique des aliments. Toutefois, de nombreuses études ont rapporté l'effet des bactériocines sur les cellules végétatives et les spores dans les produits alimentaires [6,7]. Ces agents ont de nombreux avantages dans la transformation des aliments, y compris la production de produits plus stériles sans dégât dans les propriétés organoleptiques. La nisine est la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire (E234). Elle est commercialisée sous une forme semi-purifiée. Elle a accompli le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) aux États-Unis [8]. L'utilisation de la nisine comme bio-préservatrice a été largement enquêtée dans une grande variété d'aliments frais et transformés [9,10]. La nisine possède un spectre d'activité très large incluant des souches de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus* et *Staphylococcus* [11]. Les spores du genre *Bacillus* et *Clostridium* sont particulièrement sensibles à la nisine, avec les spores en phase d'excroissance étant plus sensibles que les cellules végétatives en phase de croissance [9]. Généralement, la nisine agit sur l'excroissance des spores de *Bacillus* mais elle n'affecte pas leur germination [12,13]. Dans des conditions normales, les bactériocines produites par des bactéries à Gram positif n'ont pas d'effet bactéricide sur des espèces à Gram négatif. Cependant, la nisine présente une activité inhibitrice contre des souches de *Helicobacter pylori* et *Neisseria* [14] et de *Salmonella* en présence d'EDTA [15].

Dont le but d'améliorer la destruction des spores et des cellules végétatives, la nisine a été utilisée en combinaison avec les traitements thermique et non thermique [7, 16,17]. En effet, l'utilisation de la nisine en combinaison avec d'autres bactériocines comme la monolaurine et le sorbate de potassium peut induire une sensibilisation importante des bactéries pathogènes et des spores bactériennes que celle obtenue en présence d'un seul antimicrobien [13, 18, 19]. De plus, son efficacité dépend de plusieurs paramètres à savoir le pH et la composition du milieu du traitement [6, 20, 21].

Bien que l'inactivation des bactéries pathogènes et des spores de certaines espèces de *Bacillus* et *Clostridium* a été largement étudiée, l'inactivation de *B. sporothermodurans* par les antimicrobiens n'a pas été encore testée. C'est dans ce cadre s'intègre notre travail dont son objectif général était d'évaluer l'activité inhibitrice d'un antimicrobien vis-à-vis les spores très thermorésistantes de *B. sporothermodurans*. Dans une étude antérieure, nous avons étudié l'influence des différentes concentrations de la nisine sur la destruction des spores de *B. sporothermodurans*. Alors que ce travail est consacré à l'évaluation de l'effet de certains facteurs physicochimiques sur l'inactivation de ces spores par la nisine.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souche utilisée et préparation des spores

Au cours de cette étude, la souche de *B. sporothermodurans* LTIS27, isolée par Aouadhi et al. [22] à partir du lait UHT, a été utilisée. Cette dernière est maintenue en culture dans le milieu BHI (Brain Heart Infusion) (10 g/l de protéose-peptone, 12,5 g/l d'infusion de cervelle de veau, 5 g/l d'infusion de cœur de bœuf, 2 g du glucose, 5 g/l du chlorure de sodium et 2,5 g/l d'hydrogénophosphate de sodium) supplémenté par la vitamine B₁₂ (1mg/l) (BHI-vit B₁₂). Vingt-quatre heures avant l'utilisation, la culture est inoculée dans le bouillon BHI-vit B₁₂ puis elle est incubée à 37°C pendant 16h avec

une agitation vigoureuse pour obtenir une suspension bactérienne. Cette dernière est utilisée dans la préparation des spores à une concentration de 10^8 spores/ml comme décrit par Aouadhi et al. [17]. En effet, la pré-culture obtenue est diluée au dixième (1/10) dans le bouillon de sporulation qui a été décrit par Herman et al. [23] (25 g/l du bouillon nutritif, 1 mg/l de vitamine B₁₂ (Sigma), 8 mg/l du MnSO₄H₂O et 1 g/l du CaCl₂H₂O) et incubée à 37°C pendant 7 jours. Ensuite, les cultures sont centrifugées à 8000 rpm pendant 10 min. Le culot obtenu est suspendu et lavé vigoureusement trois fois avec l'eau distillée stérile. Après le dernier lavage, le culot bactérien est suspendu dans 5 ml d'eau distillée stérile et traité à la chaleur (100°C pendant 30 min) pour détruire les cellules végétatives. Les suspensions sporales sont lavées et centrifugées quatre fois. Les spores, après dernier lavage, sont suspendues dans l'eau distillée stérile et stockées à une concentration de 10^7 à 10^8 spores/ml à 4°C.

2.2. Effet de la nisine sur les spores

La solution mère de la nisine (10^4 UI/ml) est préparée par dissolution de 10 mg de la nisine (Sigma Aldrich) dans 1 ml de HCl 0,02 N stérile. L'effet de cet antimicrobien sur les spores (5×10^7 spores/ml) a été testé. Les spores, après préparation, sont suspendues dans l'eau distillée stérile contenant différentes concentrations de nisine. Après 24h d'incubation à 37°C, le dénombrement des spores est réalisé sur le milieu BHI-vitB₁₂. Les résultats étaient exprimés comme étant les réductions de log décimal du nombre initial des spores ($\log N_0/N_1$), avec N_0 et N_1 étaient le nombre initial des spores et le nombre des spores après traitement respectivement [17]. Le contrôle positif correspond à l'eau distillée inoculée sans nisine. Alors que le contrôle négatif correspond à l'eau distillée non inoculée afin de déterminer la stérilité du milieu.

2.3. Effet des facteurs physico-chimiques sur l'inactivation des spores par la nisine

Afin d'évaluer l'effet du pH sur l'inactivation des spores de *B. sporothermodurans* LTIS27 par la nisine, les spores (5×10^7 spores/ml) sont suspendues dans l'eau distillée stérile en présence de la nisine (100 UI/ml) et à différents pH (5, 6, 7 et 8). Le dénombrement des spores a été réalisé après 24h d'incubation à 37°C. L'ajustement du pH se fait par l'addition de solution de HCl (2N) ou NaOH (2N).

Pour étudier l'effet de la température sur l'inactivation par la nisine, les spores de *B. sporothermodurans* sont traitées par la chaleur à 60°C et 80°C pendant 10 ou 30 min en présence de la nisine (100 UI/ml). Le dénombrement des spores a été réalisé après chaque traitement.

2.4. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats obtenus est réalisée moyennant le logiciel statgraphics (STATGRAPHICS Centurion XV version 15.2.06). En effet, le test de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher est utilisé pour discriminer entre les moyennes de différents facteurs avec un seuil de signification fixé à 5%.

3. Résultats et discussion

Afin d'avoir une idée sur le mode d'action de la nisine sur les spores de *B. sporothermodurans*, nous avons testé, dans une étude antérieure, l'effet de différentes concentrations de cet antimicrobien sur l'inactivation des spores de souche LTIS27 [17]. En effet, cette étude a montré que l'inactivation des spores dépend de la concentration de la nisine. Elle augmente de 0,4log en présence de 50UI/ml de la nisine à 4log en présence de 5×10^3 UI/ml. De plus, la nisine, seulement à haute concentration, possède un effet sporicide sur les spores de *B. sporothermodurans*. Dans le but de réduire la concentration de cet antimicrobien en gardant son effet sporicide, nous avons, au cours de cette étude, testé l'effet

de la nisine à faible concentration (100 UI/ml) avec d'autres facteurs (température et pH).

3. 1. Effet de la température sur l'inactivation des spores par la nisine

L'effet de la température (60 et 80°C pendant 10 ou 30 min) sur l'inactivation des spores de *B. sporothermodurans* LTIS27 par la nisine (100 UI/ml) a été étudié. La figure 1 illustre que la destruction des spores de *B. sporothermodurans* dépend de la température. En effet, elle augmente avec l'augmentation de son niveau. Par exemple, à 60°C pendant 10°C, le taux d'inactivation n'a pas dépassé 1,3log, alors qu'après un traitement pendant 10 min à 80°C, le taux d'inactivation peut atteindre 3,6log. Ces données mettent en évidence l'effet synergique entre le traitement thermique et la nisine. Ceci peut être expliqué par deux hypothèses. D'une part, le traitement thermique déstabilise la structure des membranes et rend les spores de *B. sporothermodurans* plus sensible à l'action de la nisine. D'autre part, le traitement avec les agents antimicrobiens de la paroi cellulaire affaiblit la sensibilité des spores résistantes à la température. En effet, Sobrino-Lopez et Martin-Belloso [26] ont rapporté que la combinaison de la nisine avec les traitements thermique et non thermique peut agir en synergie pour réduire la population de différents micro-organismes, y compris les spores bactériennes. De même, Beard et al. [27] ont montré que l'addition de la nisine dans de produits laitiers réduit la résistance thermique des spores de *G. stearothermophilus*. Par ailleurs, Delves-Broughton et al. [9] ont révélé que les spores sont devenues plus sensibles à la nisine après un traitement thermique. Par exemple, les spores du *Clostridium* PA3679 qui ont survécu à haute température (121,1°C pendant 3 min) sont 10 fois plus sensibles à la nisine que celles qui n'ont pas été endommagées par la chaleur. En outre, Penna et Moraes [28] ont signalé que la nisine a réduit le temps de réduction décimale (D) de spores de *B. cereus* jusqu'à 40%. De même, la valeur apparente D de

G. stearothermophilus à 130°C a été réduite jusqu'à 21% en raison de la présence de 4000 UI/ml de la nisine [29]. Ceci permet de déduire que l'utilisation de la nisine en combinaison avec le traitement thermique augmente la durée de vie du lait, même si les conditions de réfrigération ne sont pas bien respectées. Elle rend possible la substitution du traitement thermique conventionnel par des traitements plus doux et, par conséquent, une meilleure qualité sensorielle. Dans une étude détaillée, un lait, contenant 40 UI/ml de la nisine et traité à 72°C pendant 15s, a montré une augmentation du maintien de sa qualité organoleptique et microbiologique pendant 7 jours par rapport au témoin, et a également montré un nombre significativement plus faible de *Lactobacillus* lorsqu'il est conservé à 10°C [30]. De même, une étude ultérieure a montré qu'aucune croissance microbienne n'a pu être détectée dans le lait traité simultanément avec la nisine (75-150 UI/ml) et la chaleur (117°C pendant 2s) après stockage à 10 ou 20°C pendant un an [31].

En analysant la figure 1 qui met en évidence la relation entre l'inactivation des spores de *B. sporothermodurans* LTIS27 par la nisine et la durée du traitement (10 ou 30 min), nous avons remarqué qu'un traitement thermique pendant 10 min à 60°C a induit un taux d'inactivation de l'ordre 1,3log. Alors qu'après 30 min du traitement, le taux d'inactivation n'a pas dépassé 2log. Bien que la durée du traitement ait augmenté le taux d'inactivation des spores, il est clair qu'elle n'avait pas un effet significatif en comparaison avec celui de la température.

De toute évidence, nous pouvons conclure que l'efficacité de la nisine dans l'inactivation des spores de *B. sporothermodurans* dépend des facteurs environnementaux.

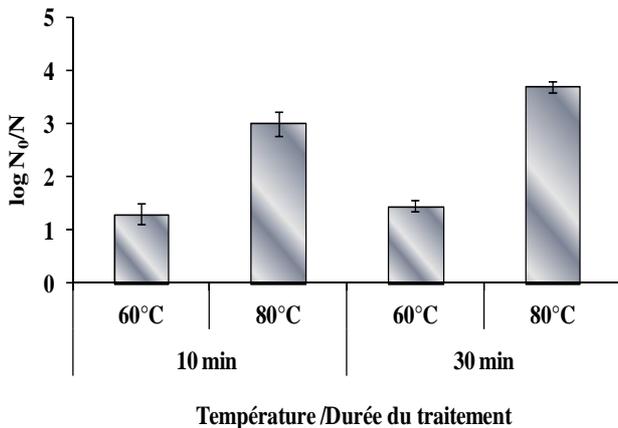


Fig. 1. Effet de la température et de la durée du traitement sur l'inactivation des spores *Bacillus sporothermodurans* LTIS27 par la nisine. Les valeurs données sont les moyennes des trois expériences indépendantes (barres d'erreur représentent les écarts-types).

3. 2. Effet du pH sur l'inactivation des spores par la nisine

L'effet du pH sur l'inactivation des spores de *B. sporothermodurans* par la nisine (100UI/ml) est résumé dans la figure 2. Nous pouvons remarquer que le pH a un effet significatif dans l'inactivation des spores par la nisine. En effet, la diminution du niveau du pH permet l'amélioration de l'inactivation des spores par la nisine. Par exemple, à pH 7, le taux d'inactivation des spores était de l'ordre de 0,9log, alors qu'à pH 5, il peut atteindre 2,92log. L'augmentation de la sensibilité des spores à la nisine à un pH acide a aussi été observée chez certaines espèces de *Bacillus*. En effet, Mansour et al. [6] ont constaté que le pH a un effet significatif sur l'inactivation des spores de *B. licheniformis* et le nombre des spores diminue avec la diminution du pH. De plus, l'utilisation de la manolaurine ou la nisine seule n'avait aucun effet sur les spores mais leur combinaison avec le pH améliore leur efficacité antimicrobienne [13]. De même, Cristina et al. [20] ont montré que l'effet inhibiteur de la nisine sur certaines espèces bactériennes à savoir *B. subtilis*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* et *Str. thermophilus* augmente

avec l'augmentation de l'acidification du milieu du traitement. En effet, ces auteurs ont constaté que la faible valeur du pH et la nisine agissent en synergie pour détruire complètement les bactéries utilisées. Cependant, Hurst et Hoover [32] ont montré que le niveau élevé du pH (10) en combinaison avec la nisine (100 ug/ml) peut être utilisé pour détruire les bactéries pathogènes à savoir les espèces de *Salmonella* et *Staphylococcus aureus* dans la viande.

L'efficacité de l'action de la nisine à un faible pH contre les spores peut être expliquée par sa grande solubilité à pH acide [33,34] ou à l'augmentation de sensibilité des micro-organismes lorsque les conditions environnementales hostiles (faible pH) ont été associées avec des inhibiteurs [35,36].

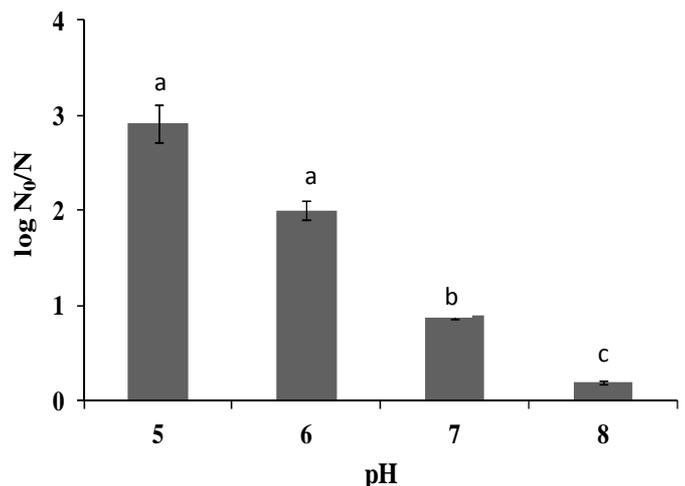


Fig. 2. Effet du pH sur l'inactivation des spores de *Bacillus sporothermodurans* LTIS27 par la nisine (100UI/ml). Les valeurs données sont les moyennes des trois expériences indépendantes (barres d'erreur représentent les écarts-types). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0,05).

4. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent bien que l'efficacité de l'inactivation des spores très thermorésistantes de *B. sporothermodurans* par un

agent antimicrobien est en relation étroite avec les facteurs environnementaux. D'une part, elle augmente proportionnellement avec l'augmentation de l'acidité du milieu. D'autre part, l'application du traitement thermique en combinaison avec la nisine a amélioré l'inactivation des spores de *B. sporothermodurans*.

Remerciement

Les auteurs tiennent à remercier le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique en Tunisie pour son soutien financier.

Références

- [1] E. M. Crielly, N. A. Logan, and A. Anderton, 1994. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 256-263.
- [2] P. Hammer, F. Lembke, G. Suhren, and W. Heeschen, 1995. Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk - a preliminary report. *Kiel Milchwirtsch Forschungsber*, 47, 303-311.
- [3] N. Klijn, L. Herman, L. Langeveld, M. Vaerewijck, A. Wagendorp, I. Huemer and A. Weerkamp, 1997. Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. *International Dairy Journal*, 7, 421-428.
- [4] B. Pettersson, F. Lembke, P. Hammer, E. Stackebrand and G. Fergus, 1996. *Bacillus sporothermodurans* a new species producing highly heat resistant endospores. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 759-764.
- [5] O. Guillaume-Gentil, P. Scheldeman, J. Marugg, L. Herman, H. Joosten and M. Heyndrickx, 2002. Genetic heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4216-4224.
- [6] M. Mansour, M. Linder, J. B. Millière and G. Lefebvre, 1998. Combined effects of nisin, lactic acid and potassium sorbate on *Bacillus licheniformis* spores in milk. *Lait*, 7, 117-128.
- [7] E.P. Black, M. Linton, R.D. McCall, W. Curran, G.F. Fitzgerald, A.L. Kelly and M.F. Patterson, 2008. The combined effects of high pressure and nisin on germinate on and inactivation of *Bacillus* spores in milk. *Journal of Applied Bacteriology*, 105, 78-87.
- [8] Food and Drug Administration, 1998. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Federation Register*, 53, 11247-11251.
- [9] J. Delves-Broughton, P. Blackburn, R. J. Evans and J. Hugenholtz, 1995. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 193-202.
- [10] D.S. Jung, F.W. Bodyfelt and M.A. Daeschel, 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 75, 387-393.
- [11] J. Meghrous, C. Lacroix and R.E. Simard, 1999. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 16, 105-114.
- [12] I.M. Gut, A.M. Prouty, J.D. Ballard, W.A. van der Donk and S.R. Blanke, 2008. Inhibition of *Bacillus anthracis* Spore Outgrowth by Nisin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 52, 4281-4288.
- [13] M. Mansour, D. Amri, A. Bouttefroy, M. Linder and J.B. Milliere, 1999. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 311-324.
- [14] M.C. Martinez-Cuesta, J. Kok, E. Herranz, C. Pelaez, T. Requena and G. Buist, 2000. Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3174-3179.

- [15] K.A. Stevens, B.W. Sheldon, N.A. Klapes and T.R. Klaenhammer, 1991. Nisin treatment for inactivation of salmonella species and other gram negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3613-3615.
- [16] J.I. Lee, H.J. Lee and M.H. Lee, 2002. Synergistic effect of nisin and heat treatment on the Growth of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Protection*, 65, pp. 408–410.
- [17] C. Aouadhi, H. Simonin, S. Mejri, A. Maaroufi, 2013. The combined effect of nisin, moderate heating and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus sporothermodurans* spores. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 147-155.
- [18] M. Mansour and J.B. Milliere, 2001. An inhibitory synergistic effect of a nisin-monolaurin combination on *Bacillus sp.* vegetative cells in milk. *Food Microbiology*, 18, 87–94.
- [19] E. Gonzalez-Fandos and J.L. Dominguez, 2007. Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, 18, 842-846.
- [20] T. Cristina, S. de Lima Grisi, K. Gorlach-Lira, 2005. Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella sp.* in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*), *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 151-156.
- [21] F. Ben Hammou, S. N. Skali, M. Idaomar and J. Abrini, 2010. Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C, *African Journal of Biotechnology*, 9, 1190-1195.
- [22] C. Aouadhi, A. Maaroufi and S. Mejri, 2013. Incidence and characterization of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia. *International Journal of Dairy Technology*, doi: 10.1111/1471-0307.12088.
- [23] L.M. Herman, M.J. Vaerewijck, R.J. Moermans, and G.M. Waes, Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1, 10 and 100 milliliters of raw milk by PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 63, 3139–3143.
- [24] A. S. Mazzotta, A. D. Crandall and T. J. Montville, 1997. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 654–2659, July
- [25] L. De Vuyst and E. J. Vandamme, 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De Vuyst, L., Vandamme, E. J. (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional, London, pp.151–221.
- [26] A. Sobrino-Lopez and O. Martin-Belloso, 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18, 329–343.
- [27] B. M. Beard, B. W. Sheldon and P. M. Foegeding, 1999. Thermal resistance of bacterial spores in milk-based beverage4s supplemented with nisin. *Journal Food Protection*, 62, 484–491.
- [28] V. T. C. Penna and D. Moraes, The influence of nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 65, 415–418.
- [29] L. R. Wandling, B. W. Sheldon and P. M. Foegeding, 1999. N isin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. *Journal of Food Protection*, 62, 492–498.
- [30] T. I. Wirjantoro and M. J. Lewis, 1996. Effect of nisin and high temperature pasteurization on shelf life of whole milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 49, 99–102.
- [31] T. I. Wirjantoro, M. J. Lewis, A. S. Grandison, G C. Williams and J. Delves-Broughton, 2001. The effect of nisin on the keeping quality of reduced heat-treated milks. *Journal of Food Protection*, 64, 213–219.

- [32] T. Li, J. Tao, F. Hong, 2005. Study on The Inhibition Effect of Nisin, *The Journal of American Science*, 1, 333-335.
- [33] A. Hurst and D.G. Hoover, 1993. Nisin. In *Antimicrobials in Foods* ed. Davidson, P.M. and Branen, A.H. pp. 369–395. New York: Academic Press.
- [34] M.A.S.S. Ferreira and B.M. Lund, 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 433–438.
- [35] L.L. Wang and E.A. Johnson, 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 624–629.
- [36] K. Winkowsky, R.D. Ludescher and T.J. Montville, 1996. Physiochemical characterization of the nisin–membrane interaction with liposomes derived from *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 323–327.