



VANİLİN VE NİSİNİN *LISTERIA MONOCYTOGENES* ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Gökçe Polat Yemiş*

Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

Geliş / Received: 10.05.2022; Kabul / Accepted: 01.08.2022; Online baskı / Published online: 12.08.2022

Polat Yemiş, G. (2022). Vanilin ve nisin *Listeria monocytogenes* üzerine inhibisyon etkisinin yanıt yüzey yöntemi ile belirlenmesi. *GIDA* (2022) 47 (4) 679-689 doi: 10.15237/gida.GD22048

Polat Yemiş, G. (2022). Determination of inhibitory effect of vanillin and nisin on *Listeria monocytogenes* by response surface methodology. *GIDA* (2022) 47 (4) 679-689 doi: 10.15237/gida.GD22048

ÖZ

Bu çalışmada, vanilin ve nisin ılımlı sıcaklık koşullarında *Listeria monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisi yanıt yüzey yöntemi ile incelenmiştir. *L. monocytogenes* inhibisyonunda vanilin konsantrasyonu (0.5–1.5 mg/mL), nisin konsantrasyonu (5–10 IU/mL), sıcaklık (45–55°C) ve süre (2–6 dak.) bağımsız değişkenlerinin etkisini belirlemek için merkezi kompozit tasarımı kullanılmıştır. Elde edilen ikinci dereceden model ile, vanilin konsantrasyonu, nisin konsantrasyonu ve sıcaklığın inhibisyon üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu buna karşın sürenin ise önemsiz olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, 1.5 mg/mL vanilin, 10 IU/mL nisin, 55°C sıcaklık ve 5.77 dakikalık uygulamanın *L. monocytogenes* inaktivasyonu için optimum koşullar olduğu ve bu koşullar ile 7.16 logaritmik azalmanın sağlanabileceğini ortaya koymuştur. İlimli sıcaklık koşullarında nisin ve vanilin birlikte kullanımı gıdalarda *L. monocytogenes* kontrolü açısından gelecek vaat etmektedir.

Anahtar kelimeler: *Listeria monocytogenes*, vanilin, nisin, antibakteriyel aktivite, yanıt yüzey yöntemi

DETERMINATION OF INHIBITORY EFFECT OF VANILLIN AND NISIN ON *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

ABSTRACT

In this study, the effects of vanillin and nisin on the inactivation of *Listeria monocytogenes* under mild temperature conditions were investigated using the response surface methodology (RSM). A central composite design (CCD) was used to determine the effects of independent variables, including vanillin concentration (0.5–1.5 mg/mL), nisin concentration (5–10 IU/mL), temperature (45–55°C), and time (2–6 min.) on inhibition of *L. monocytogenes*. The proposed quadratic model revealed that vanillin concentration, nisin concentration and temperature had a significant effect on inhibition, whereas time was insignificant. The optimum conditions for the combined treatment for microbial reduction (7.16 log) were determined which were 1.5 mg/mL vanillin, 10 IU/mL nisin at 55°C for 5.77 min. The combined use of nisin and vanillin in foods under mild temperature conditions is promising for controlling *L. monocytogenes* in foods.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, nisin, vanillin, antimicrobial activity, response surface methodology

* Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding Author

✉: gokceyemis@sakarya.edu.tr.

☎: (+90) 264 295 7038,

☎: (+90) 264 295 5601

Gökçe Polat Yemiş; ORCID no: 0000-0002-1367-0535

GİRİŞ

Listeria monocytogenes, insanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden olan en önemli gıda kaynaklı patojenlerden biridir. *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdalardan kaynaklanan listeriozis vakalarına oldukça sık rastlanmaktadır. Listeriozis, sıklıkla kontamine süt, yumuşak ve yarı yumuşak peynir, iyi pişmemiş et ve iyi yıkanmamış çiğ sebzelerin tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Hamile kadınlar, yeni doğanlar, yaşlılar ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler risk grubunda yer almaktadır. Gıdalardaki yüksek *L. monocytogenes* varlığı ve ölüm oranının hayli yüksek olması, etkenin halk sağlığı açısından ne denli büyük bir risk olduğunu ortaya koymaktadır. *L. monocytogenes*'in düşük sıcaklıklarda üreyebilme yeteneği, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığını koruyabilmesi nedeniyle gıda kaynaklı hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Bucur vd., 2018; Disson vd., 2021).

Son yıllarda, tüketicilerin sentetik katkı maddeleri ile ilgili önyargıları ve katkı maddesi içermeyen ürünlere yönelik artan tüketici talepleri nedeniyle gıda muhafaza yöntemlerinde yeni teknikler ve özellikle doğal antimikrobiyel bileşiklere olan ilgiyi artırmıştır. Gıdaların mikrobiyolojik güvenliğini sağlamak ve yüksek ısı işlem sonucu ortaya çıkabilecek kalite kayıplarını önlemek amacıyla doğal antimikrobiyel bileşiklerin gıda muhafazasında ısı işlem ile birlikte kullanımı engeller teknolojisi kapsamında alternatif bir yöntem olarak oldukça önem kazanmıştır. Nisin, laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir bakteriyosindir ve gıda sistemlerinde kullanılan GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsündeki önemli doğal koruyuculardan birisidir. *Listeria* türleri başta olmak üzere özellikle Gram pozitif bakteriler ile *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinin sporlarına karşı geniş spektrumda antimikrobiyel etkiye sahiptir (Abdollahzadeh vd. 2014; Moshtaghi vd., 2018). Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzenaldehyd), vanilya bitkisinin çekirdek ve kabuğunun ana bileşeni olan düşük molekül ağırlıklı bir fenolik bileşiktir ve pastacılık ürünleri, dondurma, alkolsüz içecekler ve unlu mamuller gibi geniş bir

ürün yelpazesinde aroma verici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra vanilinin antimikrobiyel ve antioksidan özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Fitzgerald vd., 2004, Olatunde vd., 2022). Antimikrobiyel bileşiklerin tek başlarına kullanılması durumunda bakteriler üzerinde letal etkiye ulaşabilmesi için yüksek miktarda kullanımının gerekliliği, yüksek konsantrasyonlarda kullanılması durumunda ise gıdanın organoleptik özelliklerinde değişimlere yol açması nedeniyle, gıda patojenlerinin inaktivasyonunda antimikrobiyel bileşiklerin kombine kullanımları ile fiziksel uygulamaların (ısı işlem, ultrases, yüksek hidrostatik basınç vb.) antimikrobiyel bileşiklerle oluşturduğu sinerjistik etkili uygulamalar üzerine araştırmalar dikkat çekmektedir (Gurtler vd., 2019; Arioli vd., 2019; Takundwa 2021). İlımlı ısı işlem ve antimikrobiyel bileşiklerin birlikte kullanımı ile hedeflenen letal etki düzeyi artırılmakta, bunun yanı sıra maliyet, besin ve kalite kayıpları da önlenmektedir.

Bu araştırmada, GRAS statüsünde yer vanilin ve nisin, ılımlı sıcaklık koşullarında *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisi yanıt yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Araştırma kapsamında kullanılan nisin ve vanilin Sigma-Aldrich (St. Louis. MO) firmasından temin edilmiştir. Vanilin stok çözeltisi %0.5 oranında yeast ekstrakt içeren Tryptic Soy Broth (TSBYE) içerisinde hazırlanmıştır. Nisin stok çözeltisi ise 25 mL nisin eluent çözeltisi (0.5 mL 1M HCl ve 24.5 mL saf su) içinde süspansiyon edilmiştir. Elde edilen stok çözeltilerin asitliği pH 5.0, 6.0, ve 7.0'ye ayarlanmış ve 0.45 µm por çaplı steril membran filtreden (Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edilmiştir. Stok çözeltiler 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Bakteri kültürü

Araştırmada. *L. monocytogenes* ATCC 19111 (Microbiologics) bakteri kültürü kullanılmıştır. %15 gliserol içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerinde -20 °C'da dondurularak muhafaza edilen bakteri kültürü, TSBYE

besiyerinde 37 °C'da 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiştir.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu

Vanilin ve nisinin *L. monocytogenes* üzerine antibakteriyel aktivitelerinin farklı pH değerlerinde (pH 5.0, pH 6.0, ve pH 7.0) kantitatif olarak ölçümü için mikro tüp dilüsyon yöntemi ile 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir (Polat Yemiş vd., 2011). Bu amaçla 0.5–10 mg/mL konsantrasyonlarda vanilin ve 5–200 IU/mL konsantrasyonlarda nisin içeren pH'sı 5.0, 6.0 ve 7.0'a ayarlı steril TSBYE besiyeri kuyucuklara aktarılmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu mikropak içindeki her bir kuyucuğa daha önce hazırlanan bakteri kültüründen son konsantrasyon ~5 log kob/mL olacak şekilde eklenmiştir. Plaklar 37°C'da 24 saat inkübasyona tabi tutulmuş ve inkübasyon sonunda bakteri gelişiminin baskılandığı dozlar minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak

değerlendirilmiştir. Denemeler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Farklı sıcaklık koşullarında vanilin ve nisinin *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin yanıt yüzey yöntemi ile belirlenmesi

L. monocytogenes inhibisyonunda etkili faktörler ve bu faktörlerin yer aldığı optimum koşullar yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile belirlenmiştir. Bu amaçla Design Expert 7.00 (Stat-Ease, Inc., MN) istatistik paket programı kullanılmıştır. Vanilin konsantrasyonu (X_1), nisin konsantrasyonu (X_2), sıcaklık (X_3) ve süre (X_4) bağımsız değişken, inhibisyon oranı ise bağımlı değişken olarak seçilmiştir. Çalışma aralıkları pH 5.0'da belirlenen MİK değerleri temel alınarak ön denemelerle belirlenmiştir. Ön denemelerde elde edilen veriler doğrultusunda yanıt yöntemi merkezi kompozit tasarımında dört faktör-üç seviyeli deneysel aralıklar belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Yüzey yanıt yöntemi merkezi kompozit tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve deneysel aralıklar

Table 1. Independent variables and experimental ranges used in the RSM-CCD (Response Surface Methodology-Central Composite Design)

Bağımsız değişkenler <i>Independent variables</i>	Birim <i>Unit</i>	Kodlanmış ve gerçek değerler <i>Coded and real values</i>		
		-1	0	+1
Vanilin konsantrasyonu (X_1) <i>Vanillin concentration (X₁)</i>	mg/mL mg/mL	0.5	1.0	1.5
Nisin konsantrasyonu (X_2) <i>Nisin concentration (X₂)</i>	IU/mL IU/mL	5.0	7.5	10.0
Sıcaklık (X_3) <i>Temperature (X₃)</i>	°C °C	45	50	55
Süre (X_4) <i>Time (X₄)</i>	dakika <i>min</i>	2	4	6

TSBYE besiyeri ortamında belirlenen konsantrasyonlarda nisin ve vanilin içeren ve asitliği pH 5.0 değerine ayarlanmış örnekler 0.45 µm por çaplı steril membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Su banyosunda istenen sıcaklık değerlerine getirilen 10 mL vida kapaklı

tüplerdeki örneklere ayrı ayrı son konsantrasyon ~7 log kob/mL olacak şekilde 24 saatlik aktif kültür inoküle edilmiştir. İnokülasyon işlemi gerçekleştirilmiş örneklere sıcaklık kontrollü bir su banyosu yardımıyla belirlenen sıcaklık ve sürelerde ısı işlem uygulanmıştır. Tüm ısı işlem

sürecinin sıcaklık değişimi, aynı koşullarda hazırlanmış tüp içerisinde kalibre edilmiş bir thermocouple yardımıyla izlenmiştir. Termal inaktivasyon işlemi sırasında belirli zaman aralıklarında alınan örnekler aseptik koşullarda steril tüplere aktarılmış ve buzlu su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde soğutulmuştur (Polat Yemiş vd., 2011). Daha sonra örnekler Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck) ile belirli aralıkta seyreltilmiştir. Tüm seyreltilerden TSA besiyerine standart yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'da 48 saat inkübasyon sonrasında besiyerinde oluşan koloniler sayılmıştır. Elde edilen sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir. Denemeler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme

Araştırma sonucunda elde edile veriler Design-Expert paket programına yüklenmiş, olası regresyon modellerinin ve modelde yer alan katsayıların önem derecesi (significance test) varyans analizi (ANOVA) ile ortaya konmuştur. Elde edilen değerlerin linear, kuadratik ve kübik modele uygunlukları için F, P, R², R²_{düzeltilmiş} ve R²_{tahminlenmiş} değerleri kıyaslanmıştır. MİK ve MBK sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi SPSS (ver.20.0. SPSS Inc.. Chicago IL) istatistik paket programı kullanılarak varyans analiz tekniği (ANOVA) ile yapılmış ve farklılık görülen gruplarda farklılığın hangi düzeyde olduğu LSD (Asgari Önemli Fark) testi uygulanarak (P<0.05) belirlenmiştir.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Nisin ve vanilinin minimum inhibisyon konsantrasyonu

Nisin ve vanilinin farklı pH değerlerinde *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel etkisi kantitatif olarak mikro tüp dilüsyon yöntemi ile belirlenmiş ve elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Her iki bileşik de *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Asitlik artışına paralel olarak MİK değerleri de artış göstermiştir. pH'nın fenolik bileşiklerin antibakteriyel aktivitesi üzerindeki etkisi detaylı olarak çalışılmamıştır. Bununla birlikte, fenolik bileşiklerin çözünürlüğünün ve stabilitesinin

düşük pH değerlerinde arttığı bilinmektedir (Friedman ve Jürgens 2000, Puupponen-Pimiä vd., 2005). Bu literatür bilgisini doğrular nitelikte vanilin ve nisin, düşük pH değerinde (pH 5.0) daha yüksek antibakteriyel aktivite göstermiştir. Vanilinin *L. monocytogenes* de dahil olmak üzere Gram-pozitif bakteriler, Gram-negatif bakteriler, mayalar ve küflere karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu daha önce yapılan araştırmalar ile de ortaya konmuştur (Delaquis vd., 2005; Char vd., 2009; Polat Yemiş vd. 2011; Polat Yemiş vd. 2012; Schenk vd., 2018; Ferrario vd., 2020; Li vd. 2021; Cava-Roda vd. 2021, Yang vd., 2021; Orizano-Ponce vd., 2022). Araştırma kapsamında vanilinin MİK değerleri pH 5.0, 6.0 ve 7.0 için sırasıyla 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL ve 3.0 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Araştırma bulgularına paralel şekilde, Cava-Roda vd. (2012), sütte *L. monocytogenes* kontrolünde vanilin, tarçın uçucu yağı ve karanfil uçucu yağı karışımlarının antimikrobiyel aktiviteleri üzerine yaptıkları araştırmalarında, vanilinin MİK değerini *L. monocytogenes* için 3000 ppm (pH 7.0) ve 2800 ppm (pH 6.0) olarak belirlemişlerdir. Delaquis vd. (2005), *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* ve *L. seeligeri*'nin farklı suşlarına karşı vanilinin etkisini inceledikleri araştırmalarında, pH 5.0, 6.0 ve 7.0'de 30 mM vanilin eklenmiş besiyeri ortamında bakterisidal etkinin düşük pH değerlerinde arttığını tespit etmişlerdir. Araştırma bulgularımız, Delaquis vd. (2005)'nin araştırma sonuçları ile uyumludur. Vanilin gibi fenolik bileşiklerin bakteri hücrelerinin hücre zarlarını etkilediği bilinmektedir. Fitzgerald vd. (2004), vanilinin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde sitoplazmik membran bütünlüğünün kaybına neden olarak hücresel sızıntıya yol açtığını ve inhibisyonun, kısmen protein, nükleik asitler, inorganik iyonlar ve ATP gibi hücre içi moleküllerin kaybına yol açan artan membran geçirgenliğinden kaynaklandığını belirlemişlerdir. Nisinin *L. monocytogenes*'e karşı MİK değerleri ise pH 5.0, 6.0 ve 7.0 için sırasıyla 10 IU/mL, 80 IU/mL ve 85 IU /mL olarak belirlenmiştir. Nisin molekülü asidik karakterde olması sebebiyle düşük pH değerlerinde yüksek çözünürlük göstermekte ve daha yüksek aktivite sergilemektedir. Nisinin pH 5.0'da daha etkili sonuç göstermesi bu literatür bilgisini

doğrulamaktadır. Nisinin bakterisidal etkisini, hücre membranının yapı ve fonksiyonunu değişiklik meydana getirmesi sonucu hücre içi

moleküllerin dışarıya sızmasına yol açarak ve hücre duvarı sentezini durdurarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Perez-Ramos vd. 2021).

Çizelge 2. Nisin ve vanilinin *L. monocytogenes*'e karşı farklı pH koşullarında minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)

Table 2. Minimum inhibitory (MIC) concentrations of nisin and vanillin against *L. monocytogenes* at different pH conditions

	MİK*/MIC*	
	Nisin (IU/mL)/Nisin (IU/mL)	Vanilin (mg/mL)/Vanillin (mg/mL)
pH 5.0	10.00±00 ^b	0.50±00 ^c
pH 6.0	80.00±00 ^a	2.00±00 ^b
pH 7.0	85.00±5.00 ^a	3.50±0.50 ^a

*Aynı sütundaki farklı harfler (a-c) ile gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05)

*Mean values in each column with different lower case letter superscripts are significantly different (p<0.05)

Değişkenlerin *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin incelenmesi ve optimum noktaların belirlenmesi

Araştırma kapsamında, bağımsız değişkenlerin (nisin konsantrasyonu, vanilin konsantrasyonu, sıcaklık ve süre) bireysel ve birbirleriyle olan ilişkileri ile maksimum indirgemenin sağlandığı koşulların saptanacağı optimizasyon modeli oluşturulmuştur. Yanıt yüzey yöntemi merkezi kompozit tasarım yoluyla dört faktör-üç seviyeli olarak kullanılan deneysel tasarım ve bu koşullar altında elde edilen inhibisyon değerleri Çizelge 3'de verilmiştir. Çizelge 3'den de görüleceği üzere indirgeme değeri 0.39–7.30 log kob/mL aralığında değişim göstermiştir. En düşük indirgeme 1. denemede (vanilin: 0.5 mg/mL, nisin: 5 IU/mL sıcaklık: 45°C ve süre: 2 dak.) 0.39 log kob/mL düzeyinde, en yüksek indirgeme ise 16. denemede (vanilin: 1.5 mg/mL, nisin: 10 IU/mL, sıcaklık: 55°C ve süre: 6 dak.) 7.30 log kob/mL düzeyinde gerçekleşmiştir.

Elde edilen veriler Design-Expert paket programına yüklenmiş, olası regresyon modellerinin ve modelde yer alan katsayıların önem derecesi (significance test) varyans analizi (ANOVA) ile ortaya konmuştur. Elde edilen değerlerin linear, kuadratik ve kübik modele uygunlukları için F, P, R², R² düzeltilmiş ve R² tabminlenmiş değerleri kıyaslanmıştır (Çizelge 4). Kullanılan program bütün bu elde edilen kriterleri göz önünde bulundurarak en uygun model olarak kuadratik modeli önermiştir. Mikrobiyel indirgemeye ilişkin önerilen bu kuadratik model

için aşağıda verilen ikinci dereceden polinomial eşitlik kullanılmıştır.

$$Y = k_0 + k_1X_1 + k_2X_2 + k_3X_3 + k_4X_4 + k_5X_1^2 + k_6X_2^2 + k_7X_3^2 + k_8X_4^2 + k_9X_1X_2 + k_{10}X_1X_3 + k_{11}X_1X_4 + k_{12}X_2X_3 + k_{13}X_2X_4 + k_{14}X_3X_4$$

Bu eşitlikte Y logaritmik indirgemeyi, X₁, X₂, X₃ ve X₄ bağımsız değişkenleri, k₀ sabit, k₁, k₂, k₃ ve k₄ söz konusu değişkenler için doğrusal etkileri yansıtan katsayıları. k₅, k₆, k₇ ve k₈ söz konusu değişkenlerin kuadratik etkileri yansıtan katsayıları. k₉, k₁₀, k₁₁, k₁₂, k₁₃ ve k₁₄ ise değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren katsayıları belirtmektedir.

Önerilen bu kuadratik modele ANOVA analizi yapılarak, işlem değişkenleri ile her bir yanıt arasındaki ilişkiyi ifade eden regresyon modelleri oluşturulmuştur. Bu amaçla her bir değişkenin “doğrusal” (lineer) etki terimleri, daha sonra “ikinci dereceden” (kuadratik) ve “ikili fraksiyon etkileşimi” (interaksiyon) terimleri irdelenmiştir. Tasarımın önerdiği bu kuadratik modele ilişkin katsayılar ve bunların önem dereceleri toplu halde Çizelge 5'te verilmiştir. Önerilen modelin önemli (p<0.0001) olduğu görülmüştür. Bu katsayılar kullanılarak aşağıdaki matematiksel eşitliğe (Eşitlik-1) ulaşılmıştır.

$$Y \text{ (log indirgeme)} = 124.66 - 4.06X_1 - 4.89X_2 - 4.95X_3 - 2.25X_4 + 0.12X_1X_2 + 0.08X_1X_3 + 0.08X_1X_4 + 0.08X_2X_3 + 0.07X_2X_4 + 0.05X_3X_4 + 0.18X_1^2 + 0.42X_2^2 + 0.05X_3^2 - 0.02X_4^2 \text{ (Eşitlik-1)}$$

Çizelge 3. Yanıt yüzey yöntemi merkezi kompozit tasarım yoluyla dört faktör-üç seviyeli olarak kullanılan deneysel tasarım ve bu koşullar altında elde edilen deneysel inhibisyon değerleri

Table 3. Four factor, five-level central composite design used for RSM and experimental results for under the conditions

Standart Trial no	sıra	Faktör 1 (X ₁)	Faktör 2 (X ₂)	Faktör 3 (X ₃)	Faktör 4 (X ₄)	İndirgeme
		Factor 1 (X ₁)	Factor 2 (X ₂)	Factor 3 (X ₃)	Factor 4 (X ₄)	(log kob/mL)*
		Vanilin (mg/mL)	Nisin (IU/mL)	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Reduction (log cfu/mL)*
		Vanillin (mg/mL)	Nisin (IU/mL)	Temperature (°C)	Time (min)	
1		0.50	5.00	45.00	2.00	0.39±0.03
2		1.50	5.00	45.00	2.00	0.53±0.05
3		0.50	10.00	45.00	2.00	0.67±0.09
4		1.50	10.00	45.00	2.00	0.88±0.06
5		0.50	5.00	55.00	2.00	2.11±0.10
6		1.50	5.00	55.00	2.00	2.98±0.08
7		0.50	10.00	55.00	2.00	3.16±0.12
8		1.50	10.00	55.00	2.00	4.20±0.20
9		0.50	5.00	45.00	6.00	0.86±0.02
10		1.50	5.00	45.00	6.00	1.24±0.05
11		0.50	10.00	45.00	6.00	1.35±0.19
12		1.50	10.00	45.00	6.00	1.99±0.23
13		0.50	5.00	55.00	6.00	4.59±0.19
14		1.50	5.00	55.00	6.00	5.89±0.09
15		0.50	10.00	55.00	6.00	6.03±0.15
16		1.50	10.00	55.00	6.00	7.30 ±0.06
17		0.50	7.50	50.00	4.00	1.43±0.15
18		1.50	7.50	50.00	4.00	1.90±0.09
19		1.00	5.00	50.00	4.00	1.35±0.07
20		1.00	10.00	50.00	4.00	2.10±0.13
21		1.00	7.50	45.00	4.00	0.82±0.02
22		1.00	7.50	55.00	4.00	4.87±0.45
23		1.00	7.50	50.00	2.00	1.07±0.04
24		1.00	7.50	50.00	6.00	2.03±0.10
25		1.00	7.50	50.00	4.00	1.38±0.07
26		1.00	7.50	50.00	4.00	1.20±0.20
27		1.00	7.50	50.00	4.00	0.99±0.35
28		1.00	7.50	50.00	4.00	1.42±0.16

*İndirgeme değerleri ortalama ± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir (n=2)

*Reduction values represent means ± standard deviations (n=2)

Çizelge 4. Önerilen modellerin karşılaştırılması

Table 4. Statistical summary of the models proposed

Model	F değeri	P değeri	R ²	R ² düzeltilmiş	R ² tahminlenmiş
	F value	P value	R-square	Adj R-square	Pred R-square
Linear/Linear	25.29	0.0001	0.8148	0.7826	0.7236
Kuadratik/Quadratic	35.72	0.0001	0.9897	0.9787	0.9650
Kübik/Cubic	0.57	0.7726	0.9946	0.9710	0.3986

Çizelge 5. Kuadratik modele ilişkin katsayılar ve önem dereceleri
Table 5. Coefficients and significance levels for the quadratic model

Modeldeki terim Model term	Katsayı (k) Coefficient (k)	F değeri F value	P değeri P>F P value P>F
Model/Model		89.66	<0.0001
Model uyumsuzluğu/Lack of fit			0.2797*
Intercept	124.66		
X ₁	-4.06	29.84	0.0001
X ₂	-4.89	44.75	< 0.0001
X ₃	-4.95	784.13	< 0.0001
X ₄	-2.25	174.63	< 0.0001
X ₁ X ₂	0.12	0.19	0.6736*
X ₁ X ₃	0.08	8.13	0.0136
X ₁ X ₄	0.08	1.49	0.2444*
X ₂ X ₃	0.08	8.88	0.0107
X ₂ X ₄	0.07	1.19	0.2951*
X ₃ X ₄	0.05	59.15	< 0.0001
X ₁ ²	0.18	0.073	0.7910*
X ₂ ²	0.42	0.39	0.5435*
X ₃ ²	0.05	52.12	< 0.0001
X ₄ ²	-0.02	0.17	0.6909*

*P>F değeri 0.05'den büyük olan değerler önerilen modelde önemsiz olduğunu göstermektedir. X₁: Vanilin konsantrasyonu, X₂: Nisin konsantrasyonu, X₃: Sıcaklık, X₄: Süre

*P>F values greater than 0.05 indicate insignificant terms in the proposed model. X₁: Vanillin concentration, X₂: Nisin concentration, X₃: Temperature, X₄: Time

Çizelge 5'te de görüleceği üzere, vanilin konsantrasyonu (X₁), nisin konsantrasyonu (X₂), sıcaklık (X₃) ve sürenin (X₄) lineer, sıcaklığın (X₃²) ikinci dereceden, 'vanilin konsantrasyonu*sıcaklık' interaksyonu (X₁*X₃), 'nisin konsantrasyonu*sıcaklık' interaksyonu (X₂*X₃) ve 'sıcaklık*süre' interaksyonunun (X₃*X₄) model açısından istatistiksel olarak önemli (p<0.05) olduğu saptanmıştır. Buna karşın, 'vanilin konsantrasyonu*nisin konsantrasyonu' interaksyonu (X₁*X₂), 'vanilin konsantrasyonu*süre' interaksyonu (X₁*X₄), 'nisin konsantrasyonu*süre' interaksyonu (X₂*X₄), 'vanilin konsantrasyonu (X₁²), nisin konsantrasyonu (X₂²) ve sürenin (X₄²) ikinci dereceden etkilerinin model açısından istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla yukarıda önerilen kuadratik modele ilişkin eşitlikte önemsiz olan unsurlar çıkartılarak daha basit bir hale dönüştürülmüştür. Bu amaçla backward elimination (α = 0.05) işlemi yapılarak model sadeleştirilmiştir. Sadeleşmiş bu modele ilişkin katsayılar ve bunların önem dereceleri

toplu halde Çizelge 6'da verilmiştir. Bu katsayılar kullanılarak aşağıdaki matematiksel eşitliğe (Eşitlik-2) ulaşılmıştır.

$$Y (\log \text{ indirgeme}) = 128.56 - 3.18X_1 - 3.20 X_2 - 5.18X_3 - 2.20X_4 + 0.08X_1X_3 + 0.08X_2X_3 + 0.05 X_3X_4 + 0.05X_3^2 \text{ (Eşitlik-2)}$$

Önerilen modelin deneysel veriyi ne ölçüde karşıladığı R², R²_{düzeltilmiş}, R²_{tahminlenmiş}, varyasyon katsayısı (VK), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Predicted Residual Error Sum of Squares-PRESS) ve yeterli kesinlik ölçülmüştür. R² tek başına modeli doğruluğunu ortaya koyan bir kriter olmayıp, genel anlamda deneysel verileri açıklayabilme oranını ifade etmektedir. Bu nedenle çoğu zaman modelin doğruluğu için R² değeri ile beraber R²_{düzeltilmiş}, R²_{tahminlenmiş}, varyasyon katsayısı (VK), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Predicted Residual Error Sum of Squares-PRESS) ve yeterli kesinlik değerinin birlikte göz önünde bulundurulması önerilmektedir (Bas ve Boyacı, 2007; Koç, 2010).

Bu bağlamda hem kuadratik hem de indirgenmiş kuadratik modelin tanımlayıcı istatistiksel değerleri Çizelge 7'de verilmiştir. Genellikle önerilen modelin tahminlemelerde kullanılmasında bu tanımlayıcı istatistiksel değerlerin yeterli kesinlik, PRESS ve $R^2_{\text{tahminlenmiş}}$ kriterlerinin dikkate alınması önerilmektedir. Bu kriterlerden yeterli kesinlik değerinin en az 4 ve üstünde olması gerektiği bilinmektedir (Montgomery, 2013). Yeterli kesinlik değeri kuadratik model

için 34.373 iken indirgenmiş kuadratik modelde 47.653 bulunmuştur. Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (PRESS) değerinin düşük olması istenmekte, bu değer indirgenmiş kuadratik modelde daha düşük olduğu görülmüştür. İyi bir tahminlemede R^2 , $R^2_{\text{düzeltilmiş}}$, $R^2_{\text{tahminlenmiş}}$ değerlerinin yüksek olması istenmektedir. Yine $R^2_{\text{tahminlenmiş}}$ değerinin indirgenmiş kuadratik modelde daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Çizelge 6. İndirgenmiş kuadratik modele ilişkin katsayılar ve önem dereceleri
Table 6. Coefficients and significance levels for the reduced-quadratic model

Modeldeki terim <i>Model term</i>	Katsayı (k) <i>Coefficient (k)</i>	F değeri <i>F value</i>	P değeri P>F <i>P value P>F</i>
Model/Model		180.44	< 0.0001
Model uyumsuzluğu/Lack of fit			0.3490*
Intercept	128.56		
X_1	-3.18	34.41	< 0.0001
X_2	-3.20	51.60	< 0.0001
X_3	-5.18	904.25	< 0.0001
X_4	-2.20	201.38	< 0.0001
X_1X_3	0.08	9.37	0.0064
X_2X_3	0.08	10.24	0.0047
X_3X_4	0.05	68.21	< 0.0001
X_3^2	0.05	164.07	< 0.0001

* X_1 : Vanilin konsantrasyonu, X_2 : Nisin konsantrasyonu, X_3 : Sıcaklık, X_4 : Süre

* X_1 : Vanillin concentration, X_2 : Nisin concentration, X_3 : Temperature, X_4 : Time

Çizelge 7. Kuadratik ve indirgenmiş kuadratik modellere ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler
Table 7. Descriptive statistical data on quadratic and reduced-quadratic models

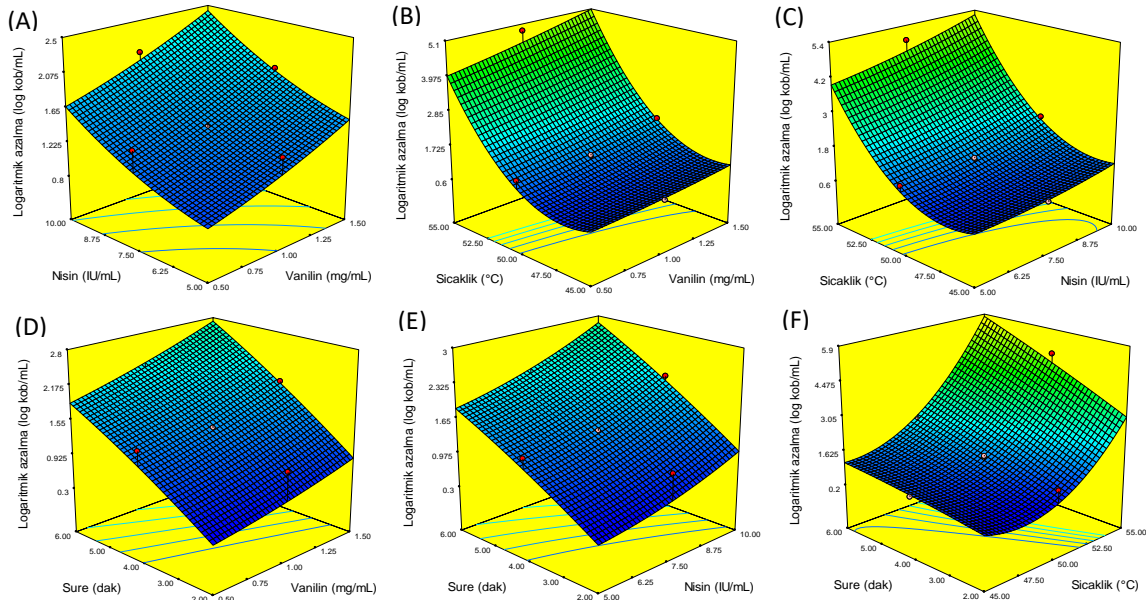
Parametreler <i>Parameters</i>	Kuadratik model <i>Quadratic model</i>	İndirgenmiş kuadratik model <i>Reduced quadratic model</i>
Standart sapma/Standard deviation	0.27	0.25
Ortalama/Mean	2.31	2.31
VK/C.V.%	11.80	10.99
PRESS/PRESS	3.31	2.23
Yeterli kesinlik/Adeq Precision	34.373	47.653
R^2 /R-square	0.9897	0.9870
$R^2_{\text{düzeltilmiş}}$ /Adj R-square	0.9787	0.9815
$R^2_{\text{tahminlenmiş}}$ /Pred R-square	0.9650	0.9764

L. monocytogenes inaktivasyonu üzerine ana bağımsız değişkenlerin (vanilin konsantrasyonu, nisin konsantrasyonu, sıcaklık ve süre) birbirleriyle olan etkileşimleri Şekil 1'de üç boyutlu olarak verilmiştir. Her bir bağımsız değişkenin katsayısının önem derecesi hem kuadratik model için (Çizelge 5) hem de

indirgenmiş kuadratik model için (Çizelge 6) p değerlerine bakılarak değerlendirilmiştir. Göz önünde bulundurulan tüm bağımsız değişkenlerin *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisi olduğu saptanmıştır. Bağımsız değişkenler arasında vanilin konsantrasyonu (X_1), nisin konsantrasyonu (X_2) ve sıcaklık (X_3)

interaksiyonlarının inaktivasyon üzerine en etkili değişkenler olduğu belirlenmiştir. Vanilin ve nisin konsantrasyonunun göz önünde bulundurulduğu yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, konsantrasyondaki artışa bağlı olarak *L. monocytogenes* inaktivasyonunun arttığı görülmektedir (Şekil 1A). Vanilin konsantrasyonu*sıcaklık (X_1*X_3) ve nisin konsantrasyonu*sıcaklık (X_2*X_3) arasındaki interaksiyonu gösteren üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde (Şekil 1B, Şekil 1C) ise, sıcaklık artışının *L. monocytogenes* inaktivasyonunda geometrik bir artışa neden olduğu gözlenmektedir. Bu durum literatürde belirtildiği gibi, sıcaklığın artması ile biyoaktif

bileşiklerin çözünürlüğünün artması ve hücre membranı üzerine etkilerinin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan araştırmalarda ise, hücre zarı hasar görmüş bakterilerin ısı direncinin azaldığı belirlenmiştir. Uygulanan ılımlı ısı işlem, vanilin ve nisin bakterisit etkisini sinerjistik olarak artırmıştır. Daha önce yapılan araştırmalarda, elde ettiğimiz bulgularla uyumlu şekilde ılımlı ısı uygulamasının vanilin, nisin, karvakrol, D-limonen gibi doğal antimikrobiyel bileşiklerin *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkilerini artırdığı belirlenmiştir (Char vd., 2010; Esteban ve Palop, 2011; Mate vd., 2017; Arioli vd., 2019; Aras vd., 2020; Chang vd. 2022).



Şekil 1. *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin (vanilin konsantrasyonu, nisin konsantrasyonu, sıcaklık ve süre) birbirleriyle olan etkileşimleri

Figure 1. Interactions of the independent variables (vanillin concentration, nisin concentration, temperature and time) on *L. monocytogenes* inactivation

L. monocytogenes inaktivasyonunun optimum koşulları Design Expert programının (7.0.0) 'sayısal optimizasyon' uygulaması kullanılarak belirlenmiştir. Programın bu uygulaması *L. monocytogenes* inhibisyonunu maksimize eden 24 farklı olası optimum koşul olabileceğini önermiştir. Tüm gıda proseslerinde temel prensip, uygulanacak işlem koşulları mikrobiyolojik güvenliği sağlarken, besinsel

öğelerin maksimum seviyede korunduğu sıcaklık ve süre seçimidir. Elde edilen veriler doğrultusunda 1.5 mg/mL vanilin konsantrasyonu, 10 IU/mL nisin konsantrasyonu, 55°C sıcaklık ve 5.77 dakikalık uygulamanın *L. monocytogenes* inaktivasyonu için optimum koşullar olduğu ve bu koşullar ile 7.16 logaritmik azalmanın sağlanabileceği söylenebilir.

L. monocytogenes gibi termal direnci yüksek patojen mikroorganizmalarla kontamine olmuş ürünlerde pastörizasyon için uygulanan sıcaklık-zaman normları gerekli güvenliği sağlamada yeterli olmayabilmektedir. Buna karşın ısıya dirençli mikroorganizma hedef alınarak yoğun ısı işlem uygulanmış ürün, tüketiciye ulaştığında ise taze ürünün duyu ve besinsel kalite özelliklerinde kayıplar meydana gelmektedir. Araştırma bulguları sonucunda, *L. monocytogenes* inaktivasyonu için vanilin ve nisin ilavesinin daha düşük sıcaklıklarda pastörizasyon işleminin etkinliğini artırarak gıdalarda besin ve kalite kayıplarının önüne geçilebilecek etkin bir uygulama olduğu düşünülmektedir.

ÇIKAR İLİŞKİSİ

Yazarın bu makale ile ilgili olarak üçünü şahıslarla ilgili bir çıkar ve çatışma ilişkisi yoktur.

KAYNAKLAR

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1):177-183.

Aras, S., Kabir, M.N., Chowdhury, S., Fouladkhah, A.C. (2020). Augmenting the pressure-based pasteurization of *Listeria monocytogenes* by synergism with nisin and mild heat. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2): 563.

Arioli, S., Montanari, C., Magnani, M., Tabanelli, G., Patrignani, F., Lanciotti, R., Mora, D., Gardini, F. (2019). Modelling of *Listeria monocytogenes* Scott A after a mild heat treatment in the presence of thymol and carvacrol: Effects on culturability and viability. *Journal of Food Engineering*, 240: 72-82.

Bas, D. and Boyaci, I.H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response resurface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836-845.

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C.U., Nicolay, A.I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions

encountered in food and food processing environments. *Frontiers Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2018.02700.

Cava-Roda, R., Taboada-Rodriguez, A., Lopez-Gomez, A., Martinez-Hernandez, G.B., Marin-Iniesta, F. (2021). Synergistic antimicrobial activities of combinations of vanillin and essential oils of cinnamon bark, cinnamon leaves, and cloves. *Foods*, 10(6):1406.

Cava-Roda, R.M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M.T., Marín-Iniesta, F. (2012). Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food Bioprocess Technology*, 5:2120–2131.

Chang, Y. Bai, J., Yu, H., Yang, X., Chang, P-S., Nitin, N. (2022). Synergistic inactivation of *Listeria* and *E. coli* using a combination of erythorbyl laurate and mild heating and its application in decontamination of peas as a model fresh produce. *Food Microbiology*, 102.

Char, C., S. Guerrero, and S. M. Alzamora. (2009). Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. *Food Control*, 20:67–74.

Char, C. D., S. N. Guerrero, and S. M. Alzamora. (2010). Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. *Food Bioprocess Technology*, 3:752–761.

Delaquis, P., K. Stanich, and P. Toivonen. (2005). Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Protection*, 68:1472–1476.

Disson, O., Moura, A., Lecuit, M. (2021). Making sense of the biodiversity and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 29(9):811-822.

Esteban, M-D., Palop, A. (2011). Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of heat-treated *Listeria monocytogenes* cells. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1):89-95.

Ferrario, M, Fenoglio, D., Chantada, A., Guerrero, S. (2020). Hurdle processing of turbid

- fruit juices involving encapsulated citral and vanillin addition and UV-C treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108811.
- Fitzgerald, D. J., M. Stratford, M. J. Gasson, J. Ueckert, A. Bos, and A. Narbad. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantatum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97:104-113.
- Friedman, M., & Jürgens, H.S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2101-2110.
- Koç, B., Kaymak Ertekin, F. 2010. Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. *GIDA*, 35(1), 1-8.
- Li, Q., Zhu, X., Xie, Y., Zhong, Y. (2021). *o*-Vanillin, a promising antifungal agent, inhibits *Aspergillus flavus* by disrupting the integrity of cell walls and cell membranes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105: 5147-5158.
- Mate, J., Peeriago, P.M., Ros-Chumillas, M., Grullon, C., Huertas, J.P., Palop, A. (2017). Fat and fibre interfere with the dramatic effect that nanoemulsified *d*-limonene has on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 62:270-274.
- Montgomery, D. C. 2013. Design and analysis of experiments. Eighth Edition, John Wiley and Sons, Incorporated, New York, 1-757.
- Olatunde, A., Mohammed, A., Ibrahim, M.A., Tajuddeen, N., Shuaibu, N. (2022). Vanillin: A food additive with multiple biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. doi:10.1016/j.ejmcr.2022.100055.
- Orizano-Ponce, E., Char, C., Sepulveda, F., Ortiz-Viedma, J. (2022). Heat sensitization of *Escherichia coli* by the natural antimicrobials vanillin and emulsified citral in blended carrot-orange juice. *Food Microbiology*, 107. doi:10.1016/j.fm.2022.104058.
- Perez-Ramos, A., Madimoussa, D., Coucheney, F., Drider, D. (2021). Current knowledge of the mode of action and immunity mechanisms of LAB-bacteriocins. *Microorganisms*, 9(10). doi: 10.3390/microorganisms9102107.
- Polat Yemiş, G., Pagotto, F., Bach, S., & Delaquis, P. (2011). Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of *Cronobacter* species. *Journal of Food Protection*, 74(12), 2062-2069.
- Polat Yemiş, G., Pagotto, F., Bach, S., & Delaquis, P. (2012). Thermal tolerance and survival of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula supplemented with vanillin, ethyl vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Science*, 77(9), M523-M527.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H.L., & Oksman-Caldentey, K.J. (2005). Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 8-18.
- Schenk, M., Ferrario, M, Guerrero, S. (2018). Antimicrobial activity of binary and ternary mixtures of vanillin, citral, and potassium sorbate in laboratory media and fruit purées. *Food and Bioprocess Technology*, 11:324-333.
- Takundwa, B.A., Bhagwat, P., Pillai, S., Ijabadeniyi, O.A. (2021). Antimicrobial efficacy of nisin, oregano and ultrasound against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on lettuce. *LWT*, 139, doi:10.1016/j.lwt.2020.110522.
- Yang, J., Chen, Y_Z, Yu-Xuan, W., Tao, L., Zhang, Y-D., Wang, S-R., Zhang, G-C., Zhang, J. (2021). Inhibitory effects and mechanisms of vanillin on gray mold and black rot of cherry tomatoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 175.