

**BACILLUS SUBTILIS İÇEREN YENİLEBİLİR KAPLAMA  
UYGULAMASININ ÇİLEĞİN RAF ÖMRÜNE ETKİSİ**

**Gülşah Karabulut, Büşra Efendioğlu, Büşra Kurtuluş, Ebru Turan,  
Hilal Kuyumcu, Şule Esen, Arzu Çağrı Mehmetoğlu\***

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

Geliş / Received: 12.06.2017; Kabul / Accepted: 24.11.2017; Online baskı / Published online: 11.12.2017

Karabulut, G., Efendioğlu, B., Kurtuluş, B., Turan, E., Kuyumcu, H., Esen, Ş., Çağrı Mehmetoğlu, A. (2018). *Bacillus subtilis* içeren yenilebilir kaplama uygulamasının çileğin raf ömrüne etkisi. GIDA (2018) 43 (1): 53-63 doi: 10.15237/gida.GD17054

**ÖZ**

Çilek (*Fragaria x ananassa*) meyvesinin su kaybına, fiziksel ve mikrobiyel bozulmalara karşı hassas olması pazarlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada, çileklerin raf ömrünü artırmak amacıyla kontrol (saf su), peynir altı suyu proteini (PASP), *Bacillus subtilis* içeren saf su (9 log KOB/mL), *B. subtilis* içeren PASP kaplama (9 log KOB/mL) olmak üzere 4 farklı uygulama yapılmıştır. Çileklerde kaplamadaki bakteri korunumu, küf inhibisyonu, ağırlık kaybı, pH, renk ve duyu özelliklerindeki değişimler 25 °C'de 5 günlük depolama boyunca analiz edilmiştir. Çileklerde *B. subtilis* korunumu saf su ile uygulandığında %77; PASP kaplama ile uygulandığında ise %83'tür. Küf inhibisyonu kontrole kıyasla *B. subtilis* içeren su uygulamasında %21; *B. subtilis* içeren PASP kaplama uygulamasında ise %16'dır. Depolama, tüm uygulamalarda çilek örneklerinin pH ve renk değerlerini önemli ölçüde değiştirmezken; kaplama uygulanan çileklerde ağırlık kaybını azaltmıştır. Ayrıca duyu analizinde *B. subtilis* kaplanan çileklerde yüksek kabul edilebilirlik saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Peynir altı suyu proteini, yenilebilir kaplama, antagonist, *Bacillus subtilis*, çilek

**EFFECTS OF EDIBLE COATING INCORPORATED WITH  
BACILLUS SUBTILIS ON SHELF LIFE OF STRAWBERRY**

**ABSTRACT**

Susceptibility of strawberry (*Fragaria x ananassa*) to physical and microbial spoilage reduces its profit share in marketing. In this study, four different applications were investigated to improve shelf life of strawberries: whey protein concentrate (WPC), *Bacillus subtilis* with distilled water, WPC with *B. subtilis*, control (distilled water) coatings. During storage, viability of *B. subtilis* in coating, inhibition of mold, weight loss, pH, color and sensory properties were analyzed for 5 days at 25 °C. Viability of *B. subtilis* on the samples coated by water or WPC maintained 77% and 83%, respectively. The mold growth on strawberry coated with *B. subtilis* or coating containing *B. subtilis* was reduced 21% and 16%, respectively. The treatments did not change pH and color of strawberry; but coating application decreased weight loss of strawberry. Moreover, the highest acceptability was scored for the strawberry coated with *B. subtilis* in sensory analysis.

**Keywords:** Whey protein, edible coating, antagonist, *Bacillus subtilis*, strawberry

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ acagri@sakarya.edu.tr

☎ (+90) (264) 295 5920

☎ (+90) (264) 295 5601

## GİRİŞ

Çilek (*Fragaria x ananassa*) meyvesi depolama sırasındaki mekaniksel yaralanmalara, su kaybına, fiziksel ve mikrobiyel bozulmalara karşı oldukça hassastır (Shafiee vd., 2010). Türkiye, çilek üretiminde 415.150 ton ile dünyada üçüncü; Avrupa'da ise ilk sırada yer almasıyla büyük öneme sahiptir (TÜİK, 2016). Ancak çilek meyvesinin hızla olgunlaşarak yaşlanma dönemine geçmesi pazarlanmasında zorluklara neden olmaktadır (Fan vd., 2009). Bu durumu önlemek amacıyla kullanılan yenilebilir kaplama uygulamaları meyvelerde tekstürel kaliteyi iyileştirmekte, nem ve oksijen geçişine bariyer sağlamakta, solunumu baskılamakta ve mikrobiyel gelişimi önleyebilmektedir (Bourtoom, 2008). Özellikle protein temelli kaplamalar ürüne parlaklık kazandırması, duyuşal özelliklerini değiştirmeden besin değerini artırması ve mükemmel bir oksijen bariyeri olmasıyla avantaj taşımaktadır (Tomasula, 2009).

Çileklerin hasat sonrası mikrobiyolojik olarak bozulmasındaki temel faktör *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* spp. and *Mucor* spp. gibi küf suşlarıdır (Romanazzi vd., 2016). Taze meyve ve sebzeleri mikrobiyel bozulmalara karşı koruyarak raf ömrünü uzatmak için kullanılan yöntemlerin birçoğu kimyasal maddelerin kullanımına dayanmaktadır. Günümüzde dirençli patojen suşların artışına ve sağlık problemlerine neden olduğu bilinen kimyasal maddelerin kullanımına karşı yenilikçi biyokontrol uygulamaları üzerine yapılan çalışmalara duyulan ilgi artmaktadır (Vicente, 2002). Biyokontrol ajanları; patojenlerle besin ve yer mücadelesine girerek, antibiyotik benzeri litik enzimler üreterek ve biyofilm mekanizmalarıyla patojenlerin gelişmelerini ve çoğalmalarını engelleyebilmektedirler (Droby vd. 2009). Biyokontrol ajanlarının sentetik kimyasalların yerine gıda ürünlerinde başarılı bir şekilde uygulanması üzerine yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Janisiewicz ve Korsten, 2002). Örneğin; üzüm, çilek, portakal gibi küflenme riski olan meyvelerde *Clonostachys rosea*, *Cryptococcus laurentii*, *Metschnikovia pulcherrima*, *C. laurentii* ve *Rhodotorula glutinis* gibi farklı tür antagonist mikroorganizmaların başarılı bir şekilde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Cota

vd., 2008; Janisiewicz vd., 2008; Zhang vd., 2008; Zhang vd., 2010). Bu tür mikroorganizmaların kullanıldığı meyvelerde küf gelişimi başta olmak üzere mikrobiyel yönden kontrol sağlanmış olmakla birlikte duyuşal ve kimyasal özelliklerde de olumlu değişimler gözlenmiştir.

Antagonist ajanlardan biri olan *Bacillus subtilis* bakterisi 24'ten fazla antifungal madde üreterek çok çeşitli yapılarıdaki küf suşlarını engelleyebilme özelliğiyle dikkat çekmektedir (Chen vd., 2008). Yapılan çalışmalarda *B. subtilis*'in çileklerde yaygın bozulma etmeni *B. cinerea* ve *R. stolonifer*'e besi ortamında sırasıyla %43 ve %49 oranlarında antifungal etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Chen vd., 2008; Chaurasia vd., 2005). Benzer şekilde *B. subtilis*'in çilek meyvesinin yüzeyine tek başına ve mum kaplama ile birlikte uygulandığında küf gelişimini sırasıyla %79 ve %84 oranlarında inhibe ettiği rapor edilmiştir (Oregel-Zamudio vd., 2017).

Gıdalarda biyokontrol ve yenilebilir kaplamaların engeller teknolojisi kapsamında kullanımı yenilikçi bir uygulamadır. Filmler biyokontrol ajanlarının stres koşullarına toleransını artırabilmekte ve ajanlar uygulandığı gıdanın yüzeyine daha iyi tutunabilmektedir (Marín vd., 2016). Literatürde *B. subtilis* ile kombine PASP (peynir altı suyu proteini) temelli yenilebilir kaplama uygulanan çileklerin raf ömrü ve duyuşal kalitesinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bu boşluğu kapatmak için çalışmamızda (1) *B. subtilis*'in çilek yüzeyindeki canlılığının korunumu; (2) kaplama yapısındaki bakterinin antifungal etkisi; (3) çileklerde raf ömrü ve depolama boyunca fiziksel ve duyuşal özelliklerdeki değişimler incelenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çilek meyvelerinin (*Fragaria x ananassa*) benzer boyut, şekil, ağırlık, renk ve fiziksel ve mikrobiyel hasarı olmayanlar Sakarya Toplu Pazar'dan (Sakarya, Türkiye) seçilerek alınmıştır. Besiyerleri ve kimyasallar Merck'ten (Darmstadt, Almanya) alınmıştır. PASP konsantresi (%85 protein) Milkaş Gıda San. ve Dış Tic. Ltd. Şti.'den (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir.

### Kültürler

Çalışmada kullanılan antagonist kültür *B. subtilis* Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan (Sakarya, Türkiye) tedarik edilmiştir. *B. subtilis*'in çoğaltılması ve korunması amacıyla Nutrient Agar (NA) besiyerinde gelişen koloniler Nutrient Broth (NB) içerisine aktarılmıştır. Kültürler 30 °C'de 24 saat inkübasyon ile 2 kez aktifleştirilmiştir.

Çilekten küf suşlarının izole edilmesinde, oda koşullarında (25 °C) doğal olarak küflenmeye bırakılan çilek örneklerinin 10 gramı 90 mL peptonlu su içerisinde karıştırıcı (IKA,MS3 basic, Amerika) yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenat 10 mL NB besiyerine inoküle edilerek 25 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kullanılan kültürler %30 (h/h) gliserol içeren NB besiyerinde -80 °C'de depolanmıştır.

### Yöntem

#### *Bacillus subtilis* içeren film ve çileklerin kaplanması

Öncelikle kullanılan *B. subtilis* ZBP4 kültürü 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası 9000 rpm 15 dakika 4 °C'de santrifüjlenerek (Hettich, Universal-320R, Almanya) dipte kalan pelet 2 kez steril destile su ile yıkanmıştır. Bakteri konsantrasyonu 9 log KOB/mL olarak ayarlanarak kaplama ve film uygulamalarında kullanılmıştır.

Kaplama ve film hazırlığı için Cagri vd. (2001) kullanıkdıkları yöntem modifiye edilmiştir. PASP'nin %5 (a/h)'lik yüksek proteinli konsantresi 160 mL destile steril su ile hazırlanmıştır. pH'sı 0.5 N NaOH kullanılarak pH'nın 8'e ayarlanması sonrası 90 ± 2 °C'de 30 dakika çalkalayıcı su banyosunda tutulmuştur. Isıtmanın son 5 dakikasında plastikleştirici olarak %2 (a/h) gliserol eklenmiştir. Bakteri içeren kaplama üretimi için santrifüj işlemiyle elde edilen *B. subtilis* (9 log KOB/mL) bakterisi soğutulan karışıma eklenerek karıştırıcı ile iyice karıştırılmıştır. Film eldesi için elde edilen kaplama ve bakteri içeren kaplama solüsyonları steril tepsilerde (150 x 180 cm<sup>2</sup>) 25 °C, %50 bağıl nemdeki iklimlendirme kabininde 2 gün kurutulmuştur.

Kaplama uygulaması için çilek örneklerinde kontrol (saf su), PASP kaplama, bakteri içeren PASP kaplama ve bakteri içeren saf su olmak üzere 4 farklı uygulama denenmiştir. Steril kabin içerisinde ızgaralar üstüne yerleştirilen çilek örneklerinin her yüzüne farklı kaplama solüsyonları püskürtülerek kuruması için yaklaşık 45 dakika oda koşullarında bekletilmiştir. Sonrasında 1000 gramlık porsiyonlara ayrılarak (her bir pakette yaklaşık 50-60 çilek bulunacak şekilde) market koşullarındaki satış paketlerine benzer ortam oluşturmak amacıyla alt ve üst kısımları delikli plastik kaplar ile paketlenmiştir. Çilek örnekleri 25 °C'de 5 gün boyunca depolanarak analiz edilmiştir.

#### *B. subtilis* canlılığı ve kaplamanın çilek üzerinde antifungal etkisi

Depolamanın 0., 2. ve 5. günlerinde bakteri içeren kaplama ve bakteri içeren saf su uygulamalarından alınan çilek örneğinin 10 gramı 90 mL %0,1 (h/h) peptonlu su içerisinde parçalayıcı (Interscience, Bagmixer 400, Fransa) ile 2 dakikada homojen hale getirilmiştir. Peptonlu su ile gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra MYP (Mannitol-Egg-yolk-Polymyxine Agar) besiyerlerinde 30 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Kaplamaların antifungal etkisi in vitro ve in vivo ortamlarda incelenmiştir. In vitro uygulamada filmler steril olarak 6 mm çapında yuvarlak disk şeklinde kesilmiştir. Tartarik asit (%10, h/h) kullanılarak pH 3.5'e ayarlanmış PDA (Potato Dekstroz Agar) besiyerinin ortasına aktifleştirilmiş 4 log KOB/mL çilekten izole edilmiş küften 10 µL inoküle edilerek küf suşuna 3 mm uzaklıktaki bir kısma film örneği yerleştirilmiştir. Kontrol gruplarında sadece küf inoküle edilmiştir. Petrilerin 5 gün 25 °C'de inkübasyonu sonrası küflerin misel çapları cetvelle (1/10 mm) ölçülerek 5 ölçümün ortalaması hesaplanmıştır. Sonuçlar % inhibisyon formülüne göre verilmiştir (Denklem 1).

$$\%I = ((C-T) / C) * 100 \quad (1)$$

%I= Yüzde inhibisyon.  
C= Yalnızca küf gelişiminin olduğu petrilerde küf misel çaplarının ortalaması (mm).

T= Antagonist maya içeren filmlerin bulunduğu besiyerindeki küf misel çaplarının ortalaması (mm).

In vivo uygulamada *B. subtilis*'in biyokontrol etkinliği çilek örneklerindeki küf gelişimi üzerinden OGYE (Oxytetracyclin-Glucose-Yeast Extract Agar) besiyeri kullanılarak 25 °C'de 5 gün inkübasyon sonucunda test edilmiştir. Sonuçlar log KOB/gram çilek olarak verilmiştir.

#### Fiziksel analizler

Çilek örneklerinde depolamanın 0., 2. ve 5. günlerinde ağırlık kaybı, pH ve renk analizleri yapılmıştır. Ağırlık kaybı çileklerin 1000 gramlık paketlerinin hassas terazide (0,001 hassasiyetli) tartılmasıyla analiz edilmiştir. pH ölçümü için farklı uygulamalardan alınan çilek örneğinin 10 gramı homojenizatör yardımıyla karıştırılıp pH metre ile ölçüm gerçekleştirilmiştir (Oregel-Zamudio vd., 2017). Renk ölçümü Lovibond RT 300 Series Reflectance Tintometer (İngiltere) marka kolorimetre cihazı ile her bir çilek örneğinin, beyaz standart yüzey üzerinde L\* (açıklık), a\* (kırmızılık) ve b\* (sarılık) renk parametreleri ölçülmüştür.

#### Duyusal analiz

Örneklerin duyuusal analizi Sakarya Üniversitesi'nde öğrenci 100 panelistle gerçekleştirilmiştir. Panelistlerden 9 nokta hedonik skala ile çilek örneklerinin renk, parlaklık, koku, ilk tat, son tat, tatlı, ekşi, pürüzsüzlük ve yumuşaklık değerlerini beğeni derecesine göre; 9: mükemmel, 1: aşırı kötü olacak şekilde puanlamaları istenmiştir. Analiz sonuçları; sorulara verilen puanların ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

#### İstatistiksel analiz

Farklı yenilebilir film ve çilekteki kaplama uygulamalarının mikrobiyolojik, fiziksel ve duyuusal özelliklerinden elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20 paket programıyla değerlendirilmiştir. Ortalamalar arası fark Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %95 önem seviyesinde analiz edilmiştir. Her bir analiz gününde farklı uygulamalar 2 tekerrür olacak şekilde analiz edilmiştir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### *Bacillus subtilis* canlılığı

Çilek yüzeyindeki *B. subtilis*'in (9 log KOB/mL) 25 °C'de 5 günlük depolama süresi boyunca saf su ve kaplama uygulamalarındaki canlılığı Şekil 1'e göre istatistiksel açıdan önemli derecede azalmaktadır ( $P < 0.05$ ). Depolamanın sonunda *B. subtilis* kaplama ile uygulandığında canlılığın korunumu  $7.27 \pm 0.20$  log KOB/gram (%korunum; %81) iken su ile uygulandığında  $6.96 \pm 0.85$  log KOB/gram (%77)'dir. Aksine yapılan bir çalışmada, *Cryptococcus laurentii* (9 log KOB/mL) içeren sodyum aljinat ile kaplanan çileklerde antagonistin canlılığı 20 günlük depolama sonunda en az %49.7 oranında korunabildiğini belirtmişlerdir (Fan vd., 2009).

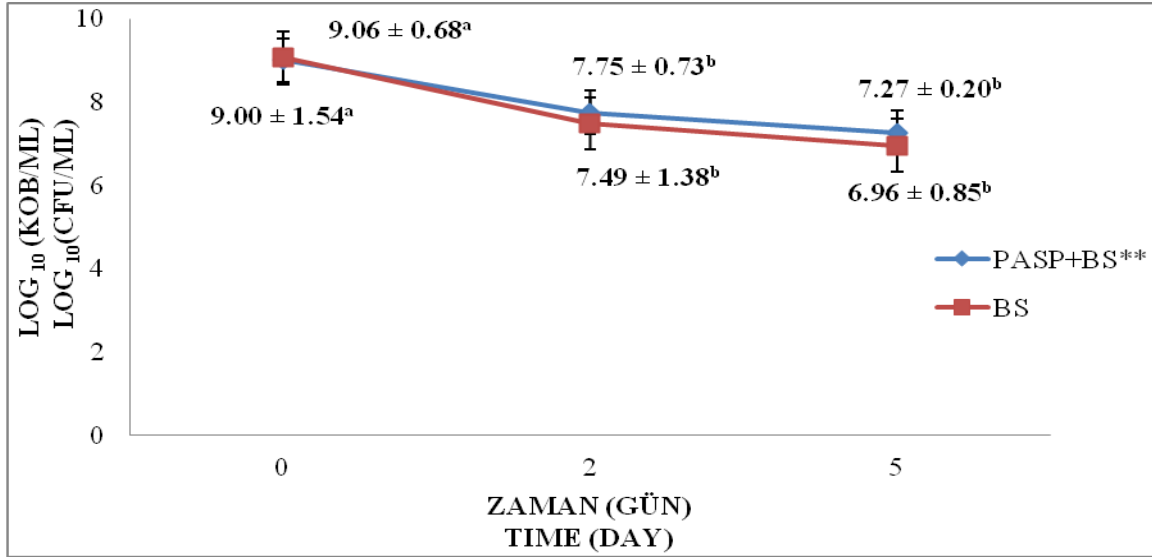
Çalışmamızda kullanılan *B. subtilis* bakterisi ekzopolisakarit yapısında olan biyofilmi üretebilmesi ve spor formunda bir bakteri olmasıyla olumsuz çevre koşullarına karşı yüksek direnç göstermektedir (Chai vd., 2008). Ancak antagonist mikroorganizmaların canlılığı uygulandığı gıdanın bileşimi, ortam pH'sı, sıcaklık ve depolama-koruma koşulları gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Sharma, 2014). Yenilebilir kaplamalar ile antagonistlerin kombinasyonu bakterilerin çevre koşullarına direncini arttırmakta ve ayrıca gıdaya mikrobiyel kontaminasyonu önleyebilmektedir (Marín vd., 2016). Aynı zamanda PASP kaplamalar bariyer özelliği sayesinde çileklerin nem kaybını, mikrobiyel kontaminasyonunu önleyebilmekte ve mekaniksel hasarı azaltarak olumsuz çevre koşullarına karşı koruyucu bir görev görmektedir (Pavlath ve Orts, 2009). Buna rağmen depolama boyunca ortamda azalan besin *B. subtilis* canlılığını ve aktivitesini etkileyebilmektedir (Droby vd., 2009). Ayrıca çileğin pH değeri (3.5) *B. subtilis* (minimum gelişme pH değeri 4.5) gelişimini sınırlandırıcı bir faktör olabilmektedir (Ayhan, 2000).

### Kaplamanın çilek üzerinde antifungal etkisi

In vitro analizde bakteri içeren su ve bakteri içeren PASP kaplama uygulamalarının küf gelişimine karşı inhibisyonu sırasıyla %54.35 ve %38.98 oranlarında görülmüştür (Çizelge 1). Uygulamaların çilek yüzeyindeki küf gelişimine etkisi ise Şekil 2'de gösterilmiştir. Buna göre;

PASP kaplama, bakteri içeren su, bakteri içeren PASP kaplama uygulanan çilek örneklerinde depolamanın 0-2. gününde küf sayısı önemli derecede artarken 2-5. günde önemli bir azalma görülmüştür ( $P < 0.05$ ). Bunun nedeni olarak *B. subtilis*'in ortam hâkimiyetini 2. günden sonra sağlayarak maksimum düzeyde antagonistik toksin üretmesi sayesinde (Avcı vd., 2017) küf

gelişimini engelleyebilmesi olduğu düşünülmektedir. Depolamanın sonunda kontrol örneklerinde ise küf sayısı depolama boyunca istatistiksel olarak 2.29 KOB/gram'dan 2.73 KOB/gram'a önemli derecede artış göstermiştir ( $P < 0.05$ ). Ancak *B. subtilis* ve *B. subtilis* içeren kaplama uygulanan çilek örneklerindeki küf gelişimi sırasıyla %21 ve %16 oranlarında düşmüştür.



Şekil 1. Çilek yüzeyine su ve kaplama ile birlikte uygulanan *B. subtilis*'in 25°C'de 5 gün depolama boyunca canlılığı.

Figure 1. Viability of *B. subtilis* with water and *B. subtilis* with coating on strawberry during 5 days storage at 25 °C.

\*\* BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama.

a-d: Aynı uygulamalar için günler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0.05$ ; n=6).

\*\* BS: *B. subtilis* with water, PASP+BS: *B. subtilis* with coating.

a-d: Means in same applications with different days are significantly different ( $P < 0.05$ ; n=6).

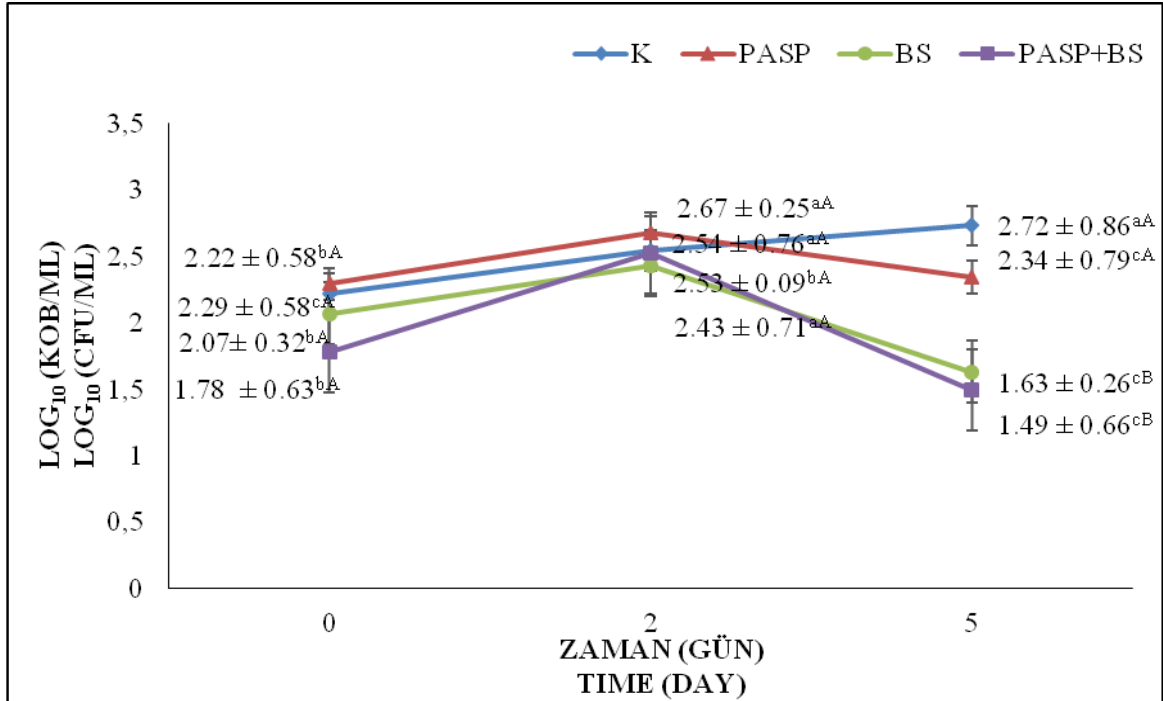
Çizelge 1. *B. subtilis* içeren PASP film ve *B. subtilis* içeren suyun disk difüzyon yöntemiyle PDA besiyerinde (Tartarik asit (%10, h/h) kullanılarak pH 3.5'e ayarlanmış Potato Dekstroz Agar) çilekte gelişebilen küf suşlarına karşı 25°C'deki 5 gün inkübasyon sonundaki inhibisyonu (%).

Table 1. Inhibition of *B. subtilis* with whey protein film and *B. subtilis* with water on PDA media (adjusted pH 3.5 with tartaric acid (10%, v/v)) to molds growing on strawberries after incubating 5 days at 25 °C (%).

Uygulamalar* / Applications*	Küf misel çapları (mm) / Misel diameter of mold (mm)	İnhibisyon (%) / (% Inhibition)
C	41.66 ± 2.35 <sup>a</sup>	-
TBS	25.33 ± 0.27 <sup>b</sup>	38.98
TPASP+BS	19.00 ± 0.81 <sup>c</sup>	54.35

\* C: Kontrol, TBS: *B. subtilis* içeren saf su, TPASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama. a-d: Aynı günler için uygulamalar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0.05$ ; n=6).

\* C: Control, TBS: *B. subtilis* with water, TPASP+BS: *B. subtilis* with coating. a-d: Means in same days with different applications are significantly different ( $P < 0.05$ ; n=6).



Şekil 2. Çilekte farklı kaplama uygulamalarının 25°C'de 5 gün depolama boyunca küf gelişimine etkisi.

Figure 2. Effect of different strawberry coating applications on growth of mold during 5 days storage at 25°C.

\*\* K: Kontrol, BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP: Kaplama, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama.

a-d: Aynı uygulamalar için günler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

A-D: Aynı günler için uygulamalar arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

\* K:Control, BS: *B. subtilis* with water, PASP: Coating, PASP+BS: *B. subtilis* with coating.

a-d: Means in same applications with different days are significantly different ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

A-D: Means in same days with different applications are significantly different ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

Antagonist özellik gösteren *B. subtilis* bakterisi çilek meyvesinde yaygın bozulma etmeni olan *R. stolonifer* ve *B. cinerea* küflerine karşı etkili ikincil metabolitler üretebilmektedirler (Toure vd., 2004; Chen vd., 2008). Bu metabolitlerden zwittermisin-A, kanosamin, lipopeptitlerden surfaktin, iturin, botrycidin, alirin ve fengisin küf sporlarının çimlenmesini ve hiflerin uzamasını önleyerek küf gelişimini engellemektedir (Toure vd., 2004). Örneğin Toure vd. (2004) *B. subtilis*'in (6 log KOB/mL) *B. cinerea* (5 log konidia) küfü üzerindeki antagonistik etkisini in vitro ortamda %70; elma yüzeyindeki in vivo ortamda ise depolamanın 21. gününde %40 olarak saptamışlardır. Antifungal etkide temel etken olarak besin yanışı ya da konakçı direncinden çok bakterinin ürettiği antifungal metabolitler görülmüştür. Benzer şekilde *B. subtilis*'in çilek meyvesinde saf su veya mum kaplama ile birlikte

uygulanmasında *R. stolonifer* küfünün gelişimini sırasıyla %79 ve %84 oranlarında önleyebildiği görülmüştür (Oregel-Zamudio vd., 2017). Çalışmamızda küf gelişiminin daha fazla oranda önlenmesi *B. subtilis* ve PASP kaplamanın kombine kullanımıyla antifungal metabolitlerin etkisinin yanı sıra PASP kaplamanın oksijen bariyeri olmasıyla ilişkilendirilebilir.

#### Ağırlık kaybı

Ağırlık kaybı depolamanın 2. gününde PASP kaplamanın tek başına ve bakteriyel uygulandığı örneklerde sırasıyla %1.52 ve %1.60 ile en düşük değerleri gösterirken diğer uygulamalar önemli ölçüde daha fazla ağırlık kaybına neden olmuştur ( $P < 0.05$ ) (Çizelge 2). Depolamanın 5. gününe gelindiğinde en düşük ağırlık kaybı PASP kaplamanın bakteriyel uygulanmasında olurken; PASP'nin kullanılmadığı bakteri ve kontrol

uygulamalarında ağırlık kaybı sırasıyla  $3.18 \pm 0.02$  ve  $3.50 \pm 0.01$  ile en yüksek değerleri göstermiştir ( $P < 0.05$ ). Çalışmamızda PASP kaplamanın yarı geçirgen bariyer özelliği göstermesi birçok gıda uygulamasında da görüldüğü üzere ağırlık kaybını azaltmaktadır (Dhall, 2013). Yapılan bir çalışmada kandelila mumu ve/veya *B. subtilis* kaplanmış çileklerde ağırlık kaybı depolamanın 2. gününde

kaplama ve bakteri içeren kaplama uygulamalarında sırasıyla %10 ve %20 ile kontrol örneklerinden önemli derecede düşük bulunmuştur. Mum kaplamanın su buharı bariyer özelliğinin PASP'dan üstün olması çilekte meydana gelen su buharlaşmasına daha iyi engel olmasının kanıtıdır.

Çizelge 2. Çilekte farklı kaplama uygulamalarının 25 °C'deki 5 günlük depolama boyunca pH ve ağırlık kaybına (%) etkisi.

Table 2. Effects of different strawberry coating applications on pH and (%) weight loss during 5 days storage at 25 °C.

Uygulamalar* Applications*	pH pH			Ağırlık kaybı (%) (%)Weight loss	
	0.Gün Day 1	2.Gün Day 2	5.Gün Day 5	2.Gün Day 2	5. Gün Day 5
K	$3.53 \pm 0.00^{aA}$	$3.57 \pm 0.04^{aA}$	$3.42 \pm 0.02^{bA}$	$2.06 \pm 0.01^{bA*}$	$3.50 \pm 0.01^{aA}$
PASP	$3.54 \pm 0.08^{aA}$	$3.55 \pm 0.08^{aA}$	$3.48 \pm 0.02^{bA}$	$1.52 \pm 0.02^{bD}$	$3.01 \pm 0.01^{aC}$
BS	$3.56 \pm 0.02^{aA}$	$3.54 \pm 0.12^{aA}$	$3.41 \pm 0.03^{bA}$	$2.02 \pm 0.01^{bB}$	$3.18 \pm 0.02^{aB}$
PASP+BS	$3.56 \pm 0.08^{aA}$	$3.57 \pm 0.18^{aA}$	$3.46 \pm 0.09^{bA}$	$1.60 \pm 0.01^{bC}$	$2.96 \pm 0.01^{aD}$

\* K: Kontrol, PASP: Kaplama, BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama. a-d: Aynı uygulamalar için günler arasındaki fark istatistikî açıdan önemlidir ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ). A-D: Aynı günler için uygulamalar arasındaki fark istatistikî açıdan önemlidir ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

\* K:Control, BS: *B. subtilis* with water, PASP: Coating, PASP+BS: *B. subtilis* with coating. a-d: Means in same applications with different days are significantly different ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ). A-D: Means in same days with different applications are significantly different ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

### pH

Çizelge 2'e göre çilek örneklerindeki uygulamalar arasında pH değerleri açısından önemli bir fark ortaya çıkarmamıştır ( $P > 0.05$ ). pH depolamanın 2. gününde tüm uygulamalarda 3.54-3.57 arasındaki değerlerde ve önemli derecede değişim göstermezken ( $P > 0.05$ ); 5. gününde 3.41'e kadar önemli derecede düşmüştür ( $P < 0.05$ ). Benzer şekilde Oregel-Zamudio vd. (2017) mum ve *B. subtilis* içeren mum ile kaplanan çileklerde depolamanın 4. gününden sonra pH düşüşü rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda çilekte yaygın olarak bulunan organik asitlerden sitrik asit miktarının çileklerin depolanması boyunca arttığı bildirilmiştir (Famiani vd., 2015). Sonuç olarak çilekteki pH düşüşünün nedeni organik asit miktarındaki artıştan kaynaklanabilmektedir.

### Renk

Çilek örneklerinin L\* değerleri Çizelge 3'de verildiği üzere yaklaşık 33.33 iken depolama süresi ve farklı uygulamalar arasında önemli bir fark

bulunmamaktadır ( $P > 0.05$ ). Depolama sonunda çilek örneklerinin a\* (kırmızılık) değerleri PASP kaplama, bakteri ve bakteri içeren kaplama gruplarında sırasıyla 27.31, 26.11 ve 31.13 ile kontrol örneğinden önemli derecede daha yüksek çıkmıştır ( $P < 0.05$ ). Örneklerin b\* değerlerine bakıldığında ise PASP uygulanan çilekler depolama sonunda 20.48 ile diğer uygulamalardan daha yüksek değer göstermiştir. Depolama kontrol grubu örneklerin a\* ve b\* değerlerini düşürürken ( $P < 0.05$ ), diğer uygulamalarda önemli bir değişim ortaya çıkarmamıştır ( $P > 0.05$ ). Çilek meyvesine kırmızı rengi veren antosiyanin pigmentinin depolama süresine bağlı stabilitesi düşüktür. pH değişimleri, enzimatik esmerleşme veya oksidasyon antosiyanin miktarını etkilemektedir (Holcroft ve Kader, 1999). Aynı zamanda çilek meyvesindeki nem kaybı da a\* değerlerinin yükselmesine neden olmaktadır (Nunes vd., 2005). Kaplanan çileklerde nem kaybının ve gaz geçişinin kontrolü sayesinde dış renk değişimleri en aza indirgenebilmektedir (Del-Valle vd., 2005). Kaplama gruplarında b\*

değerlerinin daha yüksek olması PASP doğal renginden kaynaklanabilir. Çalışmamızın verilerine benzer şekilde Del-Valle vd. (2005) çilek örneklerine uyguladıkları kaktüs müsülajlı kaplamanın L\* değerinin depolama boyunca değişmediği ve yaklaşık 33 ile kontrol örneklerin-

den önemli derecede farklı olmadığını belirtmişlerdir. Örneklerin a\* değerlerinde ise depolamanın sonunda kaplama ve kontrol örneklerinde %40 düşüş gerçekleşirken b\* değerlerinde değişim olmamıştır.

Çizelge 3. Çilekte farklı kaplama uygulamalarının 25°C'deki 5 günlük depolama boyunca renk parametrelerine etkisi.

Table 3. Effect of different strawberry coating applications on color parameters during 5 days storage at 25°C.

Uygulamalar* Applications*	Renk Color		
	0.Gün Day 0	2.Gün Day 2	5.Gün Day 5
K	34.51 ± 4.60 <sup>aA</sup>	34.25 ± 2.30 <sup>aA</sup>	34.05 ± 2.82 <sup>aA</sup>
PASP	29.94 ± 2.81 <sup>aA</sup>	32.05 ± 3.62 <sup>aA</sup>	30.99 ± 2.10 <sup>aA</sup>
BS	31.78 ± 3.52 <sup>aA</sup>	32.56 ± 3.09 <sup>aA</sup>	32.17 ± 1.94 <sup>aA</sup>
PASP+BS	33.09 ± 3.20 <sup>aA</sup>	33.09 ± 3.21 <sup>aA</sup>	34.19 ± 2.19 <sup>aA</sup>
K	27.79 ± 3.79 <sup>aA</sup>	23.59 ± 5.27 <sup>abB</sup>	22.09 ± 2.62 <sup>bB</sup>
PASP	33.33 ± 5.10 <sup>aA</sup>	27.55 ± 3.03 <sup>aA</sup>	27.31 ± 2.16 <sup>aA</sup>
BS	30.99 ± 4.51 <sup>aAB</sup>	29.62 ± 5.51 <sup>aA</sup>	26.11 ± 3.30 <sup>aA</sup>
PASP+BS	31.75 ± 4.30 <sup>aA</sup>	30.51 ± 6.20 <sup>aA</sup>	31.13 ± 4.60 <sup>aA</sup>
K	12.54 ± 4.65 <sup>aC</sup>	11.74 ± 4.46 <sup>aB</sup>	12.14 ± 3.61 <sup>aC</sup>
PASP	29.21 ± 6.89 <sup>aA</sup>	17.93 ± 3.03 <sup>bA</sup>	20.48 ± 3.96 <sup>abAB</sup>
BS	17.15 ± 3.57 <sup>aB</sup>	18.20 ± 4.20 <sup>aA</sup>	17.67 ± 2.85 <sup>aB</sup>
PASP+BS	29.67 ± 5.16 <sup>aA</sup>	21.39 ± 5.72 <sup>aA</sup>	21.45 ± 4.53 <sup>aA</sup>

\* K: Kontrol, PASP: Kaplama, BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama. a-d: Aynı uygulamalar için günler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ). A-D: Aynı günler için uygulamalar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

\* K: Control, BS: *B. subtilis* with water, PASP: Coating, PASP+BS: *B. subtilis* with coating.

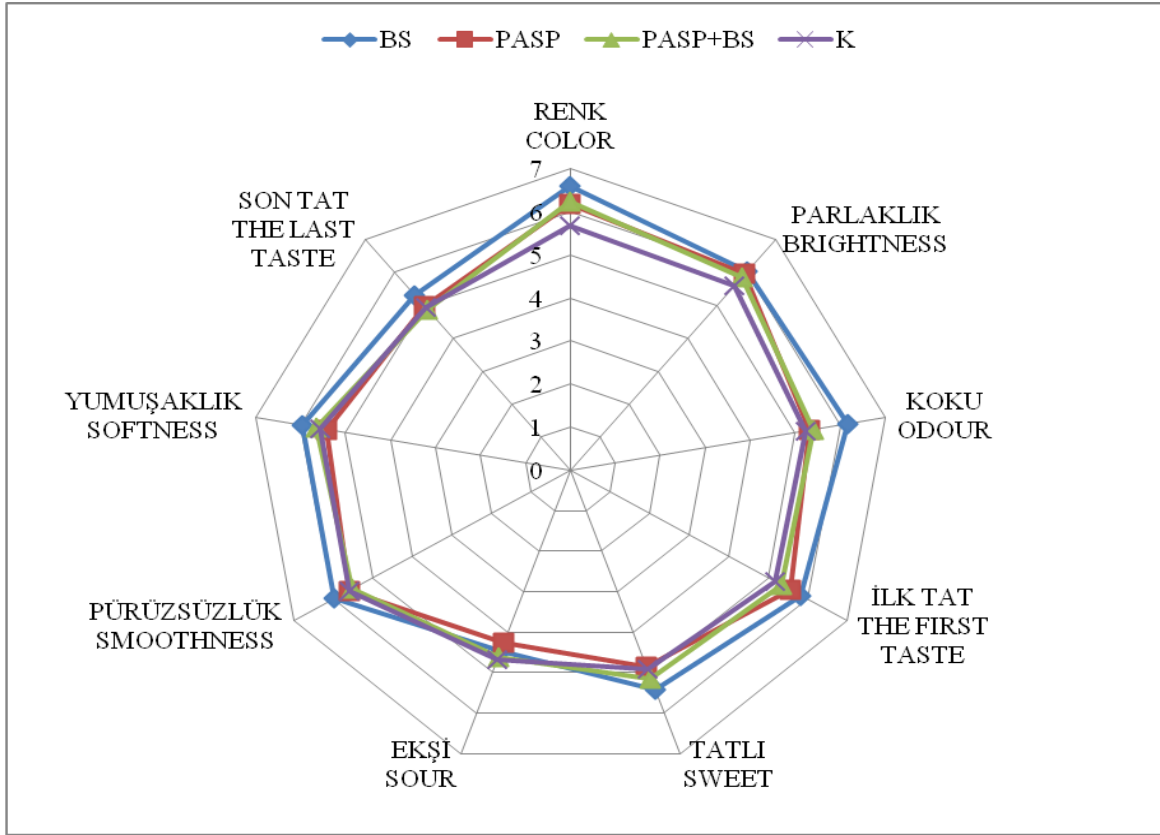
a-d: Means in same applications with different days are significantly different ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ). A-D: Means in same days with different applications are significantly different ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

### Duyusal Analiz

Duyusal analiz sonuçlarına göre farklı uygulamalar arasında parlaklık, koku, ilk tat, tatlılık, ekşilik pürüzsüzlük, yumuşaklık, son tat parametreleri göz önünde bulundurulduğunda istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır (Şekil 3). Ancak renk açısından kontrol uygulaması en düşük puanı alırken diğer uygulamalar arasında önemli bir farka rastlanmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Kontrol grubunun renk açısından düşük puan alması a\* değerinin diğer uygulamalardan daha düşük değerde olmasıyla yakından ilişkilendirilebilir. Analize istinaden en çok tercih edilen örnek grubu 5.71 genel kabul edilebilirlik puanıyla bakteri içeren su uygulaması yapılan çilek örnekleri olmuştur.





Şekil 3. Çilekte farklı kaplama uygulamalarının duyu özelliklerine etkisi.

Figure 3. Effect of different strawberry coating applications on sensory properties.

\*\* K: Kontrol, BS: *B. subtilis* içeren saf su, PASP: Kaplama, PASP+BS: *B. subtilis* içeren kaplama.

\*\* K:Control, BS: *B. subtilis* with water, PASP: Coating, PASP+BS: *B. subtilis* with coating.

## SONUÇ

Çilek örneklerinde *B. subtilis* içeren kaplama uygulaması daha yüksek bakteri korunumu ve ağırlık kaybını önlemesiyle öne çıkarken; *B. subtilis* içeren su uygulaması duyu analizinde ve küf inhibisyonunda daha olumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca, kaplama uygulamasının çileklerin renk parametrelerinin ve pH değerlerinin korunumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların nedenleri: (1) PASP kaplamanın bariyer özelliğinin meyve yüzeyindeki küf gelişimi için zorunlu oksijen miktarını kısıtlaması; (2) kaplama uygulamasının çilekleri mikrobiyel kontaminasyona karşı koruması; (3) biyokontrol ajanı *B. subtilis*'in küf gelişimine karşı kaplama ile sinerjistik etki göstermesi olarak sayılabilir. Sonuç olarak; *B. subtilis*'in PASP kaplama ile kombinasyonu çileklerin kalitesini koruyup ve raf ömrünü

uzatabilen yenilikçi bir uygulama olarak değerlendirilebilir. Gelecekte farklı antagonist mikroorganizmaların canlılık ve aktivitelerinin en yüksek seviyede olabileceği uygun kaplama solüsyonları ve ortam koşullarının belirlenmesi üzerine yapılacak detaylı çalışmalar yapılacaktır.

## TEŞEKKÜR

Kendi izole ettiği *Bacillus subtilis* ZBP4 kültürünü bizimle paylaştığı için Yrd. Doç. Ayşe AVCI'ya çok teşekkür ederiz.

## KAYNAKÇA

Avcı, A., Çağrı-Mehmetoğlu, A., Arslan, D. (2017). Production of antimicrobial substances by a novel *Bacillus* strain inhibiting *Salmonella* Typhimurium. *LWT - Food Sci Technol*, 80: 265-270.

- Ayhan, K. (2000), Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. *Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaası, Ankara, 522 s.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int Food Res J*, 15(3): 237-248.
- Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *J Food Sci*, 66(6): 865-870.
- Chai, Y., Chu, F., Kolter, R., Losick, R. (2008). Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 67(2): 254-263.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol Res*, 160(1): 75-81.
- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., Yu, Z. (2008). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol Lett*, 30(5): 919-923.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S., Macedo, P.E., Antunes, R.F. (2008). Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biol Control*, 46(3): 515-522.
- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., Galotto, M.J. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria × ananassa*) shelf-life. *Food Chem*, 91(4): 751-756.
- Dhall, R.K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53(5): 435-450.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biol Technol*, 52(2): 137-145.
- Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Cruz-Castillo, J.G., Walker, R.P. (2015). The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents-a review. *Rev Chapingo Ser Horti*, 21(2): 97-128.
- Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., Zhang, B. (2009). Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria × ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biol Technol*, 53(1): 84-90.
- Holcroft, D.M., Kader, A.A. (1999). Controlled atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. *Postharvest Biol Technol*, 17(1): 19-32.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annu Rev Phytopathol*, 40(1): 411-441.
- Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Conway, W.S., Yoder, K.S. (2008). Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biol Technol*, 49(3): 374-378.
- Marín, A., Cháfer, M., Atarés, L., Chiralt, A., Torres, R., Usall, J., Teixidó, N. (2016). Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Biol Control*, 96: 108-119.
- Nunes, M.C.N., Brecht, J.K., Morais, A.M., Sargent, S.A. (2005). Possible influences of water loss and polyphenol oxidase activity on anthocyanin content and discoloration in fresh ripe strawberry (cv. Oso Grande) during storage at 1 degrees C. *J Food Sci*, 70(1): 79-84
- Oregel-Zamudio, E., Angoa-Pérez, M.V., Oyoque-Salcedo, G., Aguilar-González, C.N., Mena-Violante, H.G. (2017). Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. *Sci Horti (Amst)*, 214: 273-279.
- Pavlath, A.E., Orts, W. (2009). Edible films and coatings: why, what and how? In *Edible films and*

- coatings for food applications, Springer New York, England, pp. 1-23.
- Romanazzi, G., Smilanick, J.L., Feliziani, E., Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biol Technol*, 113: 69-76.
- Shafiee, M., Taghavi, T.S., Babalar, M. (2010). Addition of salicylic acid to nutrient solution combined with postharvest treatments (hot water, salicylic acid, and calcium dipping) improved postharvest fruit quality of strawberry. *Sci Horti (Amst)*, 124(1): 40-45.
- Sharma, N. (2014). *Biological Controls for Preventing Food Deterioration: Strategies for Pre-and Postharvest Management*. John Wiley Sons Ltd. ,Oxford, UK, 306 p.
- Tomasula, P.M. (2009). Using dairy ingredients to produce edible films and biodegradable packaging materials. *Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses*, 589-624.
- Toure, Y., Ongena, M.A.R.C., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol*, 96(5): 1151-1160.
- TÜİK. (2016). Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim tarihi: 2017 Eylül).
- Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., Del Rio, M.A., Pérez-Gago, M.B. (2008). Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropyl methylcellulose - lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. *J Agric Food Chem*, 56(23): 11270-11278.
- Vicente, K.J. (2002). Ecological interface design: Progress and challenges. *Hum Factors*, 44(1): 62-78.
- Zhang, H., Ma, L., Wang, L., Jiang, S., Dong, Y., Zheng, X. (2008). Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. *Biol Control*, 47(1): 60-65.
- Zhang, H., Ma, L., Jiang, S., Lin, H., Zhang, X., Ge, L., Xu, Z. (2010). Enhancement of biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* by salicylic acid against gray mold spoilage of strawberries. *Int J Food Microbiol*, 141(1): 122-125.