

Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi

Belma ASLIM, Yavuz BEYATLI

Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara–TÜRKİYE

Kadir HALKMAN

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara–TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 01.04.1998

Özet: Bu araştırmada, laktik asit bakterilerinin oluşturduğu bazı metabolik ürünlerin ayrı ayrı ve kombine halde patojen ve kontaminant mikroorganizmalar üzerinde etkileri belirlenmiştir. Bu çalışma için 5 adet *Lactobacillus bulgaricus* ve 5 adet de *Streptococcus thermophilus* suşu kullanılmıştır. Suşların oluşturduğu metabolik ürünlerin (laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit, diasetil) bazı test bakterileri üzerindeki (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) inhibisyon etkileri tespit edilmiştir. Ayrıca suşların rastgele kombinasyonları oluşturularak metabolik ürünleri ve test bakterilerine inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Suşların oluşturduğu metabolik ürünler esas alınarak, bu değerlere yakın konsantrasyonlarda laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit ve diasetil örnekleri hazırlanmış, inhibisyon etkileri *S. aureus*'un ve *E. coli*'nin 2 farklı suşunda ayrı ayrı denenmiştir. Bu deneme sonucu, hidrojen peroksit, asetaldehit, diasetil gibi metabolitlerin inhibisyon etkisi belirlenemezken, laktik asitin 5-20 mg/ml konsantrasyonlarda test bakterileri üzerinde inhibisyon etkisi olduğu saptanmıştır.

Laktik asit (10 mg/ml) yanında, hidrojen peroksit (3 ppm), asetaldehit (15 ppm) ve diasetilden (1.5 ppm) oluşan 2'li, 3'lü ve 4'lü kombinasyonların inhibisyon etkileri test bakterileri üzerinde denenmiştir. Kombine halde iken de hidrojen peroksit, asetaldehit ve diasetilin hiçbir inhibisyon etkisinin olmadığı belirlenirken, diasetilin ancak 10 mg/ml'de, H₂O₂'nin de 0.5-10 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi gösterdiği, asetaldehitin ise 10 mg/ml'de dahi inhibisyon etkisinin olmadığı, tespit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin bu kadar yüksek miktarda diasetil ve H₂O₂ üretmeyeceği düşünülürse, bu çalışmanın sonucunda, yoğurt starter bakterilerinin oluşturduğu miktarlardaki metabolitlerin inhibisyon etkisinin olmadığı, inhibisyon etkisinin çoğunlukla laktik asitten kaynaklandığı söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Yoğurt starter kültürleri, laktik asit, diasetil, hidrojen peroksit, asetaldehit, inhibisyon etki.

The Inhibition effect of Yoghurt Starter Culture Metabolites

Abstract: In this study effect of some separate and combined metabolic compounds produced by lactic acid were tested on food pathogenic and contaminant microorganisms. For this study, five strains of each *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* were used. The inhibition effects of the metabolic products (lactic acid, hydrogen peroxide, acetaldehyde, diacetyl) produced by the strains on test bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) were determined. Also, a random combinations of the strains were prepared and the metabolic compounds produced by these cultures and their antimicrobial activities on tested bacteria were determined. By regarding the metabolic products mainly, the samples of lactic acid, hydrogen peroxide, acetaldehyde and diacetyl concentrations close to these values were prepared and their inhibition effects were examined separately on two different strains of test bacteria. As a result of this experiment, the inhibition effect of metabolites such as

hydrogen peroxide, acetaldehyde and diacetyl could not be determined but it was observed that lactic acid in 5-20 mg/ml concentrations effected test bacteria.

In addition to lactic acid (10 mg/ml), the inhibition effects of hydrogen peroxide (3 ppm), acetaldehyde (15 ppm) and diacetyl (1.5 ppm) in 2, 3 and 4 combinations were tested on test bacteria. Whereas it was observed that hydrogen peroxide, acetaldehyde and diacetyl in a combination form had no inhibition effect, diacetyl only in 10 mg/ml and hydrogen peroxide between 0.5-10 mg/ml concentrations showed inhibition effect. Another striking point was that acetaldehyde even in 10 mg/ml had no inhibition effect. Taking into account that lactic acid bacteria can procedure more diacetyl and hydrogen peroxide. The results of this study indicated that the metabolites formed by yoghurt starter bacteria had no inhibition effect and it can be said that the inhibition effect was mainly caused by lactic acid.

Key Words: Yoghurt, starter cultures, lactic acid, hydrogen peroxide, acetaldehyde, diacetyl, inhibition effect.

Giriş

Süt ürünlerinde yaklaşık 100 yıldan bu yana endüstriyel boyutta üretilmiş starter kültürler kullanılmaktadır. Her ne kadar yoğurt ve peynirle ilgili arkeolojik bulgular günümüzden 6000 yıl öncesine gitmekte ise de bilinçli starter kullanımı 19. Yüzyılın sonlarında başlatılmıştır. Bu gün başta laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, faj dirençliliği, aroma oluşturma gücü vb. gibi özelliklere göre seçilmiş starter kültürler süt ürünleri endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (1, 2).

Süt ürünlerinde starter kültürlerin kullanılmalarında temel amaç kendine özgü duysal özellikler taşıyan ürünün elde edilmesidir. Bununla birlikte, ürün elde edilirken ortaya çıkan laktik asit gibi doğrudan ürün ile ilgili metabolitlerin ve ürün eldesinde doğrudan etkili olmayan veya duysal olarak farkedilmeyen H₂O₂ gibi metabolitlerin ürüne bulaşabilen çeşitli kontaminant mikroorganizmaların gelişmesi üzerinde çeşitli düzeylerde inhibisyon etkisi olduğu da belirtilmektedir (3, 4, 5). Çeşitli araştırmalarda, fermente süt ürünlerinde patojen mikroorganizmaların gelişebildiği ve *Staphylococcus aureus* 'da olduğu gibi toksin salgılayabildikleri ve canlılıklarını uzun süre koruyabildikleri, bu kontaminantların laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan metabolitlerle inhibe edileceği gösterilmiştir. Buna göre ürünün özgün yapısının elde edilmesi yanında bu tip metabolitleri yüksek düzeyde üreten suşların kültür bünyesinde yer alması gerekmektedir (6, 7, 8).

Starter kullanılarak elde edilen tüm süt ürünlerinde laktik asit temel metabolit durumundadır. Laktik asit gerek ürün eldesinde gerek duysal özelliklerde kendini açıkça belli etmektedir. Laktik asit bakterileri laktik asit üretimi sırasında ortamdaki laktozu, permeaz enzim sistemi ile hücre zarından içeriye alarak, β -galaktozidaz enzimi ile glukoz ve galaktoz 6-fosfat'a hidroliz ederler. Glukoz doğrudan glikolize girerek piruvata dönüştürülür, piruvattan da laktat dehidrogenaz enzimi ile laktik asit meydana getirilir (9, 10).

Bazı laktik asit bakterilerinin glukozlu substrat ve oksijenli ortamda, NADH oksidaz aktivitelerinde artış olduğu ve bu enzimin aktivitesi sonucu ortamda belirli miktarda hidrojen peroksit oluşturdukları belirlenmiştir (11).

Fermente süt ürünlerinde lezzet ve aromanın oluşumunda, starter kültürlerin faaliyeti etkili olmaktadır. Fermente süt ürünlerinde asetaldehit ve diasetil kaekteristik aroma bileikleridir (12). Sütte bulunan sitrat veya ara ürün olan piruvat fazlasından yararlanılarak diasetil oluşturulmaktadır. Sitrat metabolizmasında sitrat liyaz enzimi önemli rol oynar. Diğre bir aroma bileşeni olan asetaldehitin başlıca kaynağının da laktozun indirgenmesi olduğu, ayrıca valin gibi aminoasitlerin tranformasyonu da oluşacağı düşünülmektedir (10).

Laktik asit bakterilerinin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkileri üzerinde çok sayıda araştırmaya rastlamak mümkündür.

Okereke ve Montville (1991) laktik asit, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosinin inhibitör etkisi oluşturduğunu bildirirlerken, bazı laktik asit bakterilerinin oluşturduğu H₂O₂'nin inhibitör etkisinin olmadığını gözlemişlerdir (13). Varasimhan ve arkadaşları (1988) 0.50 ppm ve 100 ppm arasında diasetili, 3 gram pozitif, 3 gram negatif bakteri (pH: 6.5 ve 6.8) ve *Saccharomyces cerevisiae* zerine (pH: 5.0, 5.5 ve 6.0) denemişler, pH 6.0'da 100 ppm diasetilin test edilen bütün bakterilerde, ve pH 5.0'de yine 100 ppm diasetilin *S. cerevisiae*'da en yüksek inhibisyon etkisinin olduğunu gözlemişlerdir (14).

Bu araştırmada yoğurt starter kültürlerinin oluşturduğu metabolitlerin etkisi 2'er adet *S. aureus* ve *E. coli* zerinde denenmiştir. Test bakterisi olarak bu iki bakterinin seçilme nedeni, bunların süt ürünlerinde yaygın kontaminant olduğunun bilinmesidir. Her ne kadar *S. aureus*'un yoğurtdaki önemi tartışma konusu ise de, özellikle Türkiye için küçük kaliteli peynir mandıralarında starter kültür olarak doğrudan ve sadece yoğurt kullanıldığından ve *S. aureus* peynirlerde önemli bir kontaminant olması nedeniyle, bu çalışmada test bakterisi olarak *S. aureus*'da kullanılmıştır.

Çalışmada önce 5'er adet *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*'un ayrı ayrı ürettiği laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit ve diasetil miktarları ile bunların 4 test bakterisi üzerindeki inhibisyonu belirlenmiş, sonra starter kültürler ile rastgele oluşturulan 5 kombinasyonda da aynı testler yapılmıştır. 2. aşamada starter bakterilerin gerek tek balarına gerek kombine halde oluşturdukları söz konusu metabolitlerin üretim miktarları dikkate alınarak, bunların saf kimyasallar halinde tek balarına ve kombinasyonlar halinde test bakterileri üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu metabolitlerin yoğurt starter kültürleri tarafından retilmiyecek kadar yüksek konsantrasyonlarda da inhibisyon etkileri araştırılmış, böylece bu metabolitlerin inhibisyon etkileri açıklığa kavuturulmutur.

Bunların dışında söz konusu metabolitlerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresince ne denli kayba uğradıkları araştırılmıştır, böylece bulunan sonuçlardan bir bütün halinde yararlanılmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Bu çalışmada kullanılan yoğurt starter kültürlerinden *Lactobacillus bulgaricus*'un LX1; LX2 LX3; LX4; LX5 suları ve *Streptococcus thermophilus*'un SW1; SW2; SW3; SW4; SW5 suları

Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarları kültür kolleksiyonlarından, test bakterisi olarak kullanılan *Escherichia coli* I (25922 kod no), *E. coli* II (N-R-R, L B 704 kod no) *Staphylococcus aureus* I (25923 kod no) ve *S. aureus* II (4-43 kod no) ise Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü Başkanlığı'ndan ve Hacettepe Üniv. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

Metot

a. Metabolit Üretimlerinin Belirlenmesi

5'er adet *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşu ayrı ayrı %10 kuru maddeli skim milk besiyerine %1 (v/v) oranında aşılansak 41°C'de önce 16 saat süre ile aktifleştirilmiş, sonra 24 saat geliştirilmiş ve suşların metabolit üretimleri belirlenmiştir.

Kültürlerin laktik asit üretimleri fenol fitaleyn indikatörü ilave edildikten sonra 0.1 N NaOH ile titre edilerek yapılmıştır (15, 16). Asetaldehit üretim miktarları ise Lindsay ve Day (17) tarafından gösterilen metoda göre 0.1 N iyotla titre edilerek belirlenmiştir. Hidrojen peroksit miktarı spektrofotometrede 350 nm dalga boyunda tespit edilirken (18, 19), diasetil üretim miktarları destilasyonla toplanan destilatlarda spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda, ölçülmüştür (20, 21).

Rastgele olarak belirlenen 5 adet *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* karışık kültüründe bu metabolitlerin belirlenmesi için yukarıda belirtildiği gibi ayrı ayrı üretilen suşlar %10 kuru maddeli skim milk besiyerinde son hacim %1 (v/v) oranında olacak şekilde karışık olarak aşılansak ve 41°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yine yukarıda verilen yöntemlerle laktik asit, asetaldehit, diasetil ve hidrojen peroksit üretimleri saptanmıştır.

Bütün denemeler iki tekerrürlü olarak yapılmış, her deneme aktifleştirilen bakteri kültürlerinde standart kültürel yöntemle canlı hücre sayımı yapılmıştır (22). Bu sayımlar sonucu kültürlerde 9.90×10^7 - 9.32×10^8 kob/ml düzeyinde hücre olduğu görülmüştür.

b. Mikrobiyal İnhibisyonun Belirlenmesi

Starter kültürler tarafından oluşturulan mikrobiyal inhibisyonunun belirlenmesi amacıyla test bakterisi olarak 2'şer adet *E. coli* ve *S. aureus* kullanılmıştır. Test bakterileri denemeden önce nutrient broth besiyerinde 37°C'de 24 saat süre ile aktifleştirilmişlerdir. Tüplere 20 ml olarak hazırlanan nutrient agar besiyerleri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 43°C'de su banyosunda soğutulmuşlar, bunların üzerlerine aktif test bakterilerinden ayrı ayrı %1 (v/v) oranında (200µl) ilave edilmiş, besiyeri ile bakterinin karışımı sağlandıktan sonra steril petri kutularına dökülmüştür. Agarlı besiyerinin jelleşmesinden sonra besiyerinde 10 mm çapında kuyular açılmış ve kuyuların dipleri 10 µl steril nutrient agar besiyeri ile kapatılmıştır. Aktif *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* kültürleri yine ayrı ayrı %10 (v/v) kuru maddeli skim milk besiyerinde %1 (v/v) oranında aşılansak, 24 saat geliştirildikten sonra 6000 devir/dakika hızla 15 dakika süre ile santifüj yapılmıştır. Süpernatantlar 0.45 µm porlu steril filitre (milipor) ile süzölmüştür. Steril olarak hazırlanan her bir filtratdan 2 paralel olarak açılan kuyulara 100 µl ilave edilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda, kuyucukların etrafında oluşan zonların yarı

çapları kompas yardımıyla ölçülmüştür (23). Aynı işlemler kombine kültürler içinde tekrarlanmıştır.

c. Kimyasal Madde Halindeki Metabolitlerin İnhibisyonunun Belirlenmesi

Yoğurt starter kültürlerinin inhibisyon etkisinin belirlenmesi yanında, söz konusu metabolitlerin kimyasal madde olarak test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkileri tek tek ve karışık kimyasallar halinde de belirlenmiştir. Bu amaçla yoğurt starter kültürlerinin ürettiği metabolit konsantrasyonları esas alınmakla birlikte, bu konsantrasyonların en uç sınırları arasındaki miktarlarda uygulanmıştır. Buna göre laktik asit 5-20 mg/ml; H_2O_2 0.5-3 ppm; asetaldehit 1-100 ppm; diasetil 0.2-100 ppm arasındaki konsantrasyonlarda yukarıda açıklanan kuyu diffüzyon yöntemine göre test bakterileri üzerinde denenmiştir.

Ayrıca, laktik asit (10 mg/ml) + asetaldehit (15 ppm); laktik asit (10 mg/ml) + H_2O_2 (3 ppm); laktik asit (10 mg/ml) + diasetil (1.5 ppm); laktik asit (10 mg/ml) + asetaldehit (15 ppm) + diasetil (1.5 ppm); laktik asit (10 mg/ml) + asetaldehit (15 ppm) + H_2O_2 (3 ppm); laktik asit (10 mg/ml) + H_2O_2 (3 ppm) + diasetil (1.5 ppm); laktik asit (10 mg/ml) + asetaldehit (15 ppm) + H_2O_2 (3 ppm) + diasetil (1.5 ppm) olacak şekilde ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlar halinde de bu kimyasalların etkisi araştırılmıştır.

Bu denemede kombinasyona giren kimyasalların konsantrasyonları literatür verileri ve kültürlerin ürettiği metabolit konsantrasyonları dikkate alınarak belirlenmiştir. Her kombinasyona temel metabolit olan 10 mg/ml laktik asit ilave edilirken, ayrıca şahit olarak laktik asit tek başına denenmiştir. Bu çalışmada 2 tekerrür ve her petride de 2 kuyucuk olacak şekilde 2 paralelli olarak yapılmıştır.

Bunların dışında diasetilin 1-10 mg/ml, H_2O_2 'in 0.5-10 mg/ml ve asetaldehitin 1-10 mg/ml şeklindeki yüksek konsantrasyonlardaki etkileri de yine aynı test bakterileri üzerinde araştırılmıştır.

d. Kimyasallarda Kayıp

Saf kimyasal halde denen laktik asit, asetaldehit, H_2O_2 ve diasetil belirli konsantrasyonlarda kuyucukları ilave edildikten sonra bunların inkübasyon süresi içinde ne denli kayba uğradıkları araştırılmıştır. Bu amaçla laktik asit (1-10 mg/ml), asetaldehit (1-10 ppm), H_2O_2 (1-10-100 ppm) ve diasetilin (1-10-100 ppm) farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örnekleri ağzı açık olarak, 37°C'de ve 0°C'de 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yukarıda belirtilen yöntemlerle konsantrasyonlar yeniden belirlenmiş (15-21), böylece iki farklı sıcaklıkta 24 saat sonunda oluşan kayıplar saptanmıştır.

e. İstatistiksel Analizler

Tek yönlü ve çift yönlü varyans analizi ve Scheffe testinde MS windows içinde SPSS paket (SPSS for windows, Jun 17. 1993, version: 06.00.00) programından faydalanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Yoğurt starter bakterilerinin tek başlarına ve kombine halde ürettikleri laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit ve diasetil miktarları sıra ile tablo 1 ve tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit ve diasetil üretimleri

Suş no	% Asitlik (mg/ml)	Hidrojen peroksit µg/ml	Asetaldehit µg/ml	Diasetil µg/ml
LX1	0.60±0.02 (6.0)	0.49±0.00	9.61±0.36	-
LX2	0.87±0.02 (8.7)	0.50±0.00	11.75±0.36	-
LX3	1.09±0.01 (10.9)	0.50±0.01	6.76±0.27	-
LX4	1.20±0.02 (12.0)	0.30±0.02	9.97±0.00	-
LX5	0.67±0.04 (6.7)	0.51±0.01	10.33±0.32	-
SW1	0.60±0.02 (6.0)	0.28±0.00	-	0.43±0.02
SW2	0.53±0.01 (5.3)	0.33±0.00	-	0.50±0.00
SW3	0.67±0.04 (6.7)	0.26±0.00	-	0.55±0.00
SW4	0.58±0.00 (5.8)	0.32±0.01	0.26±0.09	0.80±0.03
SW5	0.57±0.01 (5.7)	0.36±0.00	-	1.07±0.04
min-max	5.30-12.00 mg/ml	0.26-0.51 µg/ml	0.26-11.75 µg/ml	0.43-1.07 µg/ml

Tablo 2. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*'un rastgele kombinasyonlarında belirlenen metabolik ürünler

Suş no	% Asitlik (mg/ml)	Hidrojen peroksit µg/ml	Asetaldehit µg/ml	Diasetil µg/ml
SW5+LX3	1.41±0.04 (14.1)	0.14±0.01	8.55±0.71	1.19±0.02
SW4+LX1	1.16±0.04 (11.6)	0.05±0.01	6.76±0.27	0.90±0.07
SW3+LX5	0.82±0.03 (8.2)	0.22±0.02	13.54±0.00	0.47±0.03
SW2+LX4	0.91±0.01 (9.1)	0.06±0.00	9.61±0.36	0.53±0.02
SW1+LX2	1.10±0.06 (11.0)	0.24±0.01	12.11±0.71	0.52±0.02
min-max	8.20-14.10 mg/ml	0.05-0.24 µg/ml	6.76-13.54 µg/ml	0.47-1.19 µg/ml

Ashour ve arkadaşları (24), *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'un tek kültürlerinin asit üretimini %0.73-0.86 arasında, karışık kültürlerinin asit üretimini ise, %1.02-1.20 arasında bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar tek kültürlerin asetaldehit üretimini 1.5-1.9 ppm arasında bulurken, karışık kültürlerin ise 4.6-10.30 ppm arasında asetaldehit ürettiğini tespit etmişlerdir.

Hamdan ve arkadaşları 45°C'de 7 saat inkübasyon sonunda *L. bulgaricus* suşlarının 10 ppm asetaldehit ürettiğini, *S. thermophilus* ile oluşturulan kombine kültürlerde ise, asetaldehit üretiminin 20 ppm'e kadar çıktığını gözlemlemişlerdir (25).

Yu ve arkadaşları da *S. thermophilus* suşlarının en fazla %0.75 laktik asit ürettiğini belirtirken, başka bir çalışmada da *S. thermophilus* suşlarının %0.7-0.8 arasında asit ürettiği saptanmıştır (26, 27). Yoğurtlarda diasetilin oluşmasında *S. thermophilus* suşlarının sorumlu olduğu ve diasetil miktarının 0.4-0.99 ppm arasında tespit edildiği bildirilmektedir (10, 28). Bottazi ve Dellaglio'da steril süte *S. thermophilus* suşlarını aşıladıklarında 0.10-2.10 ppm arasında diasetil ürettiklerini belirlemişlerdir (29).

Çalışmamızda 5 adet *L. bulgaricus* ve 5 adet *S. thermophilus* suşunun oluşturduğu asitliğin laktik asit cinsinden %0.53-1.20 arasında olduğu (5.3-12 mg/ml) belirlenmiştir. Bu değerlerin literatür verilerine göre biraz yüksek olduğu dikkat çekmiştir.

Suşların hidrojen peroksit üretimlerinin 0.26-0.51 µg/ml, diasetil üretimlerinin 0.43-1.07 µg/ml ve asetaldehit üretimlerinin ise 0.26-11.76 µg/ml arasında olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). *L. bulgaricus* suşlarının hiçbirinin diasetil üretmediği, *S. thermophilus* suşlarında ise bir suş haricinde (SW4) diğerlerinin asetaldehit üretmediği görülmüştür. Suşların asetaldehit üretimi ve diasetil üretimi literatür sonuçlarına yakınlık gösterirken, H₂O₂ üretim sonuçlarının literatür sonuçlarından daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Rastgele olarak oluşturulan 5 kültür kombinasyonunun söz konusu metabolitleri üretme düzeyleri Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 1 ve 2'nin beraberce değerlendirilmesi ile kombine kültürlerde tek kültüre kıyasla laktik asit ve asetaldehitin daha fazla, hidrojen peroksitin ise çok daha az üretildiği ve diasetil üretiminde ise kayda değer bir farklılık olmadığı görülmektedir. Literatürde gerek laktik asit gerekse asetaldehit üretiminin kombine kültürlerde, daha yüksek olduğu belirtilirken, bu çalışmada elde edilen bulgular genel olarak literatür verilerine benzerlik göstermiştir. Ancak bazı suşların asetaldehit üretiminin kombine kültürlerinde tek kültürlerle göre düşük miktarda olduğu görülmüştür. (LX1; SW4+LX1). Düşmeye neden olarak kombinasyondaki SW4 suşunun diğer *S. thermophilus* suşlarından farklı olarak asetaldehit üretmesi gösterilebilir.

5'er adet *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'un 4 farklı test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkilerinin de farklı olduğu bulunmuştur (Tablo 3). İnhibisyon etkisinin gerek suşlar gerekse uygulanan test bakterileri bakımından farklılık gösterip göstermediği çift yönlü varyans analiziyle test edildiğinde *Lactobacillus bulgaricus* bakımından F değeri 300.327 bulunmuş bu değer tablo değerinden ($F_{3,48} \approx 2.80$) yüksek olduğu için suşlara göre inhibisyon etkisinin önemli derecede farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır. Yapılan Scheffe testi ile 5 *L. bulgaricus* suşu birbirlerinden farklılık göstermesine rağmen, LX3 suşunun diğer 4 suşdan daha farklı sonuç verdiği tespit edilmiştir. Uygulanan test bakterilerine göre de inhibisyon etkinin farklı olup

Tablo 3. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının oluşturduğu inhibisyon çapı (mm)

Suş no	<i>E. coli</i> I	<i>E. coli</i> II	<i>S. aureus</i> I	<i>S. aureus</i> II
LX1	6.00±0.02	5.00±0.00	9.65±0.05	9.25±0.35
LX2	7.80±0.02	5.80±0.00	8.30±0.10	10.20±0.20
LX3	6.40±0.00	8.00±0.05	11.40±0.20	14.95±0.00
LX4	6.15±0.01	5.75±0.02	8.95±0.05	9.65±0.05
LX5	7.75±0.75	6.90±0.10	8.90±0.20	10.95±0.25
SW1	4.35±0.05	4.60±0.00	6.00±0.00	6.15±0.05
SW2	4.00±0.00	4.00±0.00	5.70±0.00	5.95±0.00
SW3	4.60±0.00	7.95±0.02	7.20±0.40	7.95±0.05
SW4	4.00±0.00	4.00±0.00	6.20±0.10	7.00±0.00
SW5	6.10±0.10	4.80±0.00	7.00±0.00	8.00±0.00

olmadığı test edildiğinde F değeri 52.182 bulunmuş yine bu değer tablo değerinden ($F_{4,48} \cong 2.56$) yüksek olduğu için 4 test bakterisi üzerindeki inhibisyon etkinin farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır. Yapılan Scheffe testine göre *E. coli*'nin iki farklı suşunun birbirine yakın sonuçlar verdiği belirlenirken, *S. aureus* II'nin bütün test bakterilerinden daha farklı sonuçlar verdiği görülmüştür. Çift yönlü varyans analizi *S. thermophilus* suşlarına da uygulandığında *L. bulgaricus* suşlarındaki gibi sonuçlarda anlamlı derecede farklılık bulunmuştur ($F=173.938$, tablo değeri $F_{3,52} \cong 2.78$). Scheffe testine göre SW3 ve SW5'in diğer suşlardan daha farklı sonuçlar verdiği, test bakterileri üzerindeki etkininde *E. coli*'nin iki suşu ile *S. aureus*'un iki suşunun kendi aralarında yakınlık gösterirken birbirlerinden farklı sonuçlar verdiği saptanmıştır ($F=86.903$, tablo değeri $F_{4,52} \cong 2.56$).

Genellikle bütün starter suşları en yüksek inhibisyon etkilerini *S. aureus* II üzerinde oluşturulmuşlardır. Tek kültürlerin sırasıyla *E. coli* I'de 4.00-7.80 mm, *E. coli* II'de 4.00-8.00 mm, *S. aureus* I'de 5.70-11.40 mm, *S. aureus* II'de 5.95-14.95 mm'lik inhibisyon zonu oluşturdukları görülmüştür. Kombine kültürlerin inhibisyon etkilerinde çok fazla artış görülmezken, sonuçlar tek kültürlerin sonuçlarına yakınlık göstermektedirler (Tablo 4). Bununla birlikte bazı suşların tek başlarına oluşturdukları inhibisyon etki ile kombine halde oluşturdukları inhibisyon etkinin farklı olduğu görülmüştür. Örneğin laktobasiller içinde LX3'ün streptokoklar içinde SW3 ve SW5'in diğerlerine göre test bakterileri üzerinde genel olarak daha fazla inhibisyon etkileri görülmüşken, SW5+LX3 ile SW3+LX5 kombinasyonları için aynı yüksek etki saptanamamıştır. Yine genel olarak incelendiğinde SW4+LX1 kombinasyonlarının diğerlerine göre daha yüksek inhibisyon etkisi var iken, bu kombinasyonu oluşturan starter bakterileri tek başlarına oldukça zayıf etki göstermişlerdir. Bu sonuçlar starter bakterilerinin beraberken olan etkilerinin ayrı ayrı olduklarına göre çok daha farklı olabileceğinin açık bir göstergesidir ve literatürde bu konuda pek çok veriye rastlanabilir (30, 31).

Çeşitli araştırmalarda laktik asit bakterilerinin üretikleri organik asitlerin, hidrojen peroksidin ve diasetilin antimikrobiyal etkisi olduğu gösterilmiştir (3, 4, 32, 33, 34). Dahiya ve Speck (35), *L. bulgaricus* ve *L. lactis*'in 6-12 µg/ml arasında H_2O_2 ürettiklerini ve bu miktarların *S. aureus*'u inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Reddy ve arkadaşları (36), *L. bulgaricus* suşunun *S. aureus* patojen bakterisi üzerinde 9-12 mm'lik, *E. coli*'de ise 5-8 mm'lik inhibisyon zonu meydana getirdiğini bildirilmişlerdir. Abdel Bar ve arkadaşları (37) ise, *L. bulgaricus* suşunun *S. aureus* test bakterisinde 29.5 mm'lik, *Pseudomonas fragi* test bakterisinde de 34.67 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğunu bulmuşlardır.

Tablo 4. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*'un rastgele kombinasyonlarının oluşturduğu inhibisyon çapları (mm)

Suş no	<i>E. coli</i> I	<i>E. coli</i> II	<i>S. aureus</i> I	<i>S. aureus</i> II
SW5+LX3	6.35±0.25	7.75±0.25	10.55±0.25	10.25±0.05
SW4+LX1	7.00±0.50	7.00±0.70	11.90±0.20	14.75±0.25
SW3+LX5	6.35±0.05	5.70±0.10	11.40±0.20	11.60±0.00
SW2+LX4	6.35±0.05	6.80±0.00	10.30±0.00	10.50±0.00
SW1+LX2	7.80±0.00	7.25±0.25	9.70±0.00	10.80±0.10

Reinheimer ve arkadaşları (23), laktik asit bakterilerinin *E. coli*'de 0.7-5.8 mm'lik, *Enterobacter aerogenes*'de 0.4-7.3 mm, *Klebsiella* spp.'de 0.5-8.9 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar denemede kullandıkları suşların 0.5-1.2 mg/ml arasında H₂O₂ ürettiğini, yaptıkları deneysel çalışmalar sonucunda bu suşların oluşturduğu inhibisyon etkinin genellikle laktik asitten kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin patojen ve kontaminant mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu iddia edilen, metabolik ürünler tespit edilmiştir. Bu çalışmada suşların oluşturduğu metabolik ürünlerin tespit edilen miktarları kadar miktarlar test bakterileri üzerinde denenerek hangi metabolitin inhibisyon etki yaptığı ve kombine halde iken inhibisyon etkinin durumunun ne olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca çalışmalarda bu metabolitlerin bazıları uçucu olduğu için denemlerdeki inhibisyon süresi içinde kayba uğrayabileceği düşünülmüş ve bu kaybın düzeyi belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için başlangıç anında konsantrasyonları saptanmış olan laktik asit, diasetil, asetaldehit ve H₂O₂ ağızı açık olarak 0 ve 37°C'lerde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmış bu süre sonunda konsantrasyonlar yeniden belirlenmiş, kayıplar % olarak tablo 5'de verilmiştir. Tablo 5.'de görüldüğü gibi laktik asit dışında diğer kimyasalların

Kimyasal metabolitler	%	
	37°C	0°C
Laktik asit (mg/ml)		
1 mg/ml	0.00	0.00
10 mg/ml	0.00	0.00
Asetaldehit (µg/ml)		
1 µg/ml	39.40	0.00
10 µg/ml	37.62	30.41
Hidrojen peroksit (µg/ml)		
1 µg/ml	42.30	42.30
10 µg/ml	18.03	11.86
100 µg/ml	2.00	0.30
Diasetil (µg/ml)		
1 µg/ml	53.65	51.21
10 µg/ml	58.33	56.41
100 µg/ml	62.47	66.17

Tablo 5. Kimyasal metabolitlerde 37°C'de ve 0°C'de 24 saat sonunda belirlenen kaybın yüzde cinsinden oranları

Tablo 6. Laktik asit, hidrojen peroksit, asetaldehit, diasetilin farklı konsantrasyonlarda oluşturduğu inhibisyon etkisi (çap, mm)

Kimyasal madde	%			
	<i>E. coli</i> I	<i>E. coli</i> II	<i>S. aureus</i> I	<i>S. aureus</i> II
Laktik asit miktarı				
5 mg/ml	6.20±0.20	6.80±0.20	7.20±0.00	10.00±0.00
10 mg/ml	8.75±0.05	8.70±0.00	10.05±0.15	11.85±0.25
15 mg/ml	11.00±0.30	12.15±0.25	11.70±0.10	14.00±0.10
20 mg/ml	12.85±0.15	14.00±0.00	13.45±0.05	16.00±0.00

* : Hidrojen peroksitin 0.5, 1.2, 3 ppm

** : Asetaldehit 1.5, 10, 15, 20, 30, 50, 100 ppm

*** : Diasetil 0.2, 0.5, 1, 1.5, 10, 30, 50, 100 ppm konsantrasyonlarındaki uygulamalarda inhibisyon etkisi görülmemiştir.

inkübasyon sıcaklığı ve başlangıç konsantrasyonuna göre değişmek üzere kayba uğradıkları, bu kaybın diasetilde diğerlerine göre fazla olduğu saptanmıştır.

Hidrojen peroksit 0.5-3 µg/ml, asetaldehit 1-100 µg/ml ve diasetilin 0.2-100 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının test bakterileri üzerinde hiç bir inhibisyon etki göstermediği belirlenmiştir. Bu metabolitler inhibisyon etki göstermedikleri için tabloya dahil edilmemiştir. Laktik asitin ise 5-20 mg/ml konsantrasyonlarındaki uygulamalarının herbirinde inhibisyon etki belirlenmiştir (Tablo 6). Laktik asit konsantrasyonu arttıkça doğal olarak inhibisyon etki de artmıştır. Test bakterilerinden *E. coli*'nin 2 suşu arasında inhibisyon bakımından kayda değer bir farklılık gözlenmezken, *S. aureus*'un II. suşu I. suşundan daha fazla duyarlılık göstermiştir.

Laktik asit (10 µg/ml) yanında H₂O₂ (3 ppm), asetaldehit (15 ppm) ve diasetil (1.5 ppm)'den oluşan 2'li, 3'lü ve 4'lü kombinasyonların yine test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkileri Tablo 7'de verilmiştir. Tablo 7'de görüldüğü gibi kombine halde de H₂O₂ asetaldehit ve diasetilin test bakterilerinin inhibisyonu üzerinde önemli bir etkisi gözlenmemiştir.

Asetaldehit, diasetil ve H₂O₂'in laktik asit ile yapılan 2'li, 3'lü ve 4'lü kombinasyonları ayrı ayrı olarak tek yönlü varyans analizi yöntemi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir. Sırasıyla 0.6072,

Tablo 7. Kombine olarak metabolitlerin *E. coli* ve *S. aureus* suşları üzerindeki inhibisyon etkisi (çap, mm)

Kimyasal metabolit miktarları	<i>E. coli</i> I	<i>E. coli</i> II	<i>S. aureus</i> I	<i>S. aureus</i> II
İkili kombinasyon				
Laktik asit + Asetaldehit (10 mg/ml) + (15 ppm)	8.75±0.25	9.15±0.15	9.60±0.40	14.40±0.00
Laktik asit + H ₂ O ₂ (10 mg/ml) + (3 ppm)	11.30±0.70	9.85±0.15	11.05±0.35	16.70±0.00
Laktik asit + Diasetil (10 mg/ml) + (1.5 ppm)	9.00±0.00	9.00±0.00	9.50±0.00	16.55±0.15
Kontrol Laktik asit (10 mg/ml)	9.50±0.10	9.75±0.35	10.85±0.05	16.80±0.10
Üçlü kombinasyon				
L. asit + Dias. + Aset. (10) + (1.5) + (15)	9.50±0.50	9.75±0.25	10.40±0.00	15.75±0.25
L. asit + Aset. + H ₂ O ₂ (10) + (15) + (3)	8.95±0.05	9.45±0.15	10.00±0.00	15.65±0.65
L. asit + Dias. + H ₂ O ₂ (10) + (1.5) + (3)	9.70±0.30	9.75±0.45	10.00±0.00	15.35±0.05
Kontrol Laktik asit (10 mg/ml)	9.90±0.10	9.90±0.10	10.00±0.00	15.50±0.50
Dörtlü kombinasyon				
L. asit ± Dias. + Aset. + H ₂ O ₂ (10) + (1.5) + (15) + (3)	10.20±0.20	9.55±0.25	9.55±0.15	14.50±0.20
Kontrol Laktik asit (10 mg/ml)	9.70±0.30	9.65±0.05	10.35±0.05	15.50±0.10

0.0238, 0.0510 olarak bulunan F değerleri tablo değerlerinden (sırasıyla tablo değerleri, $F_{3,29} \cong 2.93$, $F_{3,28} \cong 2.95$, $F_{1,14} \cong 4.60$) daha küçük olduğu için kombinasyonların kontrol olarak denenen laktik asitten farklı inkübasyon etkilerinin olmadığı görülmüş ve buradan asıl inhibisyon etkiyi laktik asitin yaptığı, asetaldehit, diasetil ve H_2O_2 'in inhibisyon etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Vandenbergh diasetilin gram pozitif bakterilerden daha çok gram (-) bakterilere 500-2500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları arasında etkili olduğunu bildirmiştir (33). Jay ise, 200-300 $\mu\text{m/ml}$ konsantrasyonlarındaki diasetilin gram (-) bakterileri ve mayaları öldürdüğünü, 350 $\mu\text{g/ml}$ ve daha üstündeki miktarlarda da diasetilin laktik asit bakterilerini etkilediğini gözlemiştir (38). Başka bir araştırmacıda 100 ppm diasetilin 3 gram (-) bakteriye, 3'de gram (+) bakteriye ve *Saccharomyces cerevisiae*'ya inhibisyon etkisinin olduğunu bulmuştur (14).

L. bulgaricus'un threonin aldolaz enziminin aktivitesi sonucu oluşan asetaldehitin 44 ppm'de *E. coli*'nin hücre bölünmesini inhibe ettiği bildirilmektedir (39).

Gerek *L. bulgaricus* gerekse diğer laktik asit bakterilerinin katalaz enzimi oluşturmadığı için, gelişim esnasında meydana getirdikleri H_2O_2 'in de *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp. gibi patojen ve kontaminant bakterilere karşı inhibisyon etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (4, 33, 35, 40).

Yaptığımız, çalışmada, literatür bilgilerinden farklı olarak laktik asit bakterilerinin oluşturduğu diasetil, asetaldehit ve hidrojen peroksitin inhibisyon etkilerinin olmadığı, bu sonucun kombinasyonlar halinde denendiğinde de değişmediği ve inhibisyon etkinin genellikle laktik asitten kaynaklandığı bulunmuştur. Bunun haricinde laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosin benzeri metabolitlerin de inhibisyon etkilerinin olabileceği düşünülebilir.

Yapılan denemelerde diasetilin ancak 10 mg/ml'de, H_2O_2 ise 0.5-10 mg/ml'de inhibisyon etki gösterdiği, asetaldehitin ise 10 mg/ml'de dahi inhibisyon etkisinin olmadığı görülmüştür (Tablo 8). Laktik asit bakterilerinin bu kadar yüksek miktarlarda diasetil ve H_2O_2 üretmeyeceği

Tablo 8. Yüksek konsantrasyonlarda diasetil, H_2O_2 ve asetaldehitin test bakterileri üzerine etkisi (çap, mm).

	<i>E. coli</i> I	<i>E. coli</i> II	<i>S. aureus</i> I	<i>S. aureus</i> II
Diasetil (mg/ml)				
1	-	-	-	-
10	6.20±0.10	4.50±0.50	-	-
H_2O_2 (mg/ml)				
0.5	4.50±0.05	4.70±0.00	6.80±0.10	6.90±0.05
1	5.90±0.00	6.20±0.00	9.60±0.10	10.00±0.00
10	9.70±0.20	10.42±1.28	14.90±0.90	16.80±0.20
Asetaldehit (mg/ml)				
1	-	-	-	-
10	-	-	-	-

düşünülecek olursa (Tablo 1), ürettikleri miktarlardaki metabolitlerin inhibisyon etkisi gösteremeyeceği savunulabilir.

Sonuç olarak yoğurt starter kültürleri tarafından oluşturulan metabolitlerin arasında sadece laktik asitin bu bakteriler tarafından üretilen miktarlarda inhibisyon etkisi olduğu, asetaldehit, diasetil ve H_2O_2 'in yine bu bakteriler tarafından üretilen hatta bunun çok üzerindeki miktarlarda dahi inhibisyon etkilerinin olmadığı söylenebilir.

Kaynaklar

1. Tunail, N. ve Köşker, Ö., Süt Mikrobiyolojisi. Ankara Ün. Ziraat Fak. yayınları, 1116, 1986.
2. Halkman, A. K., Tarım Mikrobiyolojisi. Ankara Ün. Ziraat Fak. Yayınları, 1214, 1991.
3. Barefoot, S. S. and Nettles, C. G., Antibiosis revisited. Bacteriocins produced by dairy starter cultures. J. Dairy Sci., 76, 2366-2379, 1993.
4. Daeschel, M. A., Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol., 164-167, Jan 1989.
5. Lewus, C. B and Montville, T. J., Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. J. Mic. Meth., 13, 145-150, 1991.
6. Attaie, R., Whalen, P. J., Shahani, K. M. and Amer, M. A. (vic), Inhibition growth of Staphylococcus aureus during production of acidophilus yoghurt, J. Food Prot., 50(3), 224-228, 1987.
7. Jay, J. M., Modern Food Microbiology, Wayne State Univ., Chapman and Hall, New York and London, 1992.
8. Tamime, A. Y. and Deeth, H. C., Yoghurt: Technology and biochemistry. J. Food Prot., 43(12), 939-977, 1980.
9. Hutkins, R.W. and Ponne, C., Lactose uptake drive by galactose efflux in Streptococcus thermophilus evidence or a galactose-lactose antiporter. Appl. Environ. Microbiol., 57(4), 941-944, 1979.
10. Rasic, J.L. and Kurman, J. A., Yoghurt Technology, Manufacture and Preparation, D. K-27, 20, Vanlose, Copenhagen, 1978.
11. Murphy, G. M. and Candan, S., Comparisan of aerobic growth of Lactobacillus plantarum in glucose medium. Arch. of Mic., 138(1), 4, 1984.
12. Tazanetaki, E. L. and Mastrojonnaki, A. V., Diacetyl and acetaldehyde concentrations during ripening of kefolotyri cheese. J. Food Sci., 53(2), 663-664, 1988.
13. Okereke, A. and Montville, T. J., Bacteriocin inhibition of Clostridium botulinum spores by lactic acid bacteria, J. Food Prot., 54(5), 349-353, 1991.
14. Varasimhan, R., Radmanabon, V. D. and Ulganathan, V., Role of diacetyl in microbial control. J. Ind. Vet., 63(3), 216-220, 1988.
15. Harrigan, W. F. and McCance, M. E., Laboratory methods in food and dairy microbiology. Revised Ed. Academic Press. London, 1977.
16. Demirci, M. ve Gündüz, H., Süt teknolojisi el kitabı, Hasad Yayıncılık, 1994.

17. Lindsay, R. C. and Day, E. A., Rapid quantitative method for determination of acetaldehyde in lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 48, 665-669, 1965.
18. Patrick, W. A. and Wagner, H. B., Determination of hydrogen peroxide in small concentrations. *Analytical Chem.*, 21(10), 1279-80, 1949.
19. Oram, J. D. and Reiter, B., The inhibition of Streptococci by lactoperoxidase, thiocyanat and hydrogen peroxide. The effect of inhibitory system on susceptible and resistant strains of group N-Streptococci. *J. Biochem.*, 100, 373, 1966.
20. Pack, M. Y., Sandine, W. E., Elliker, P. R., Day, E. A. and Lindsay, R. C., Owades and Jacovac method for diacetyl determination in mixed strain starters. *J. Dairy Sci.*, 47, 981-986, 1964.
21. Cogan, T. M., Modification of the Prill-Hammer Method for determining diacetyl. *J. Dairy Sci.*, 55(3), 382-384, 1972.
22. Grgn, V. ve Halkman, A. K., Mikrobiyolojide Sayım Yntemleri, Gıda Tekn. Der. Yayın no: 7, 2. Baskı, 1990.
23. Reinheimer, J. A., Demkow, M. R. and Condioti, M. C., Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures, *The Aust. J. Dairy Technol.*, 5-9, May 1990.
24. Ashour, M., El-Zayat, A. I. and Rabie, A. H., The action of *Streptococcus thermophilus* and/or sodium formate on the organoleptic features of fermented skim milk produced by *Lactobacillus bulgaricus* Egyptian *J. Food Sci.*, 13(2), 137-143, 1985.
25. Hamdan, Y. I., Kunsman, J. E. and Deane, D. D., Acetaldehyde production by combined yoghurt culture, *J. Dairy Sci.*, 54(7), 1080-82, 1971.
26. Yu, J. H., Satio, M. and Lee, K. H., Studies on flavour compounds in milk fermented by *Lactobacillus bulgaricus* and (or) *Streptococcus thermophilus*. I changes in volatile carbonyl compounds. *Korean J. of Animal Sci.*, 27(4), 42-46, 1985.
27. Boutista, E. S., Dahiya, R. S. and Speck, M. L., Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk, *J. Dairy Res.*, 33, 299-307, 1966.
28. Bottazi, V. and Vescovo, M., Carbonyl compounds produced by yoghurt bacteria, *Neth. Milk Dairy J.*, 23, 71-78, 1969.
29. Bottazi, V. and Dellaglio, F., Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococcus. *J. Dairy Res.*, 34, 109-113, 1967.
30. Aslim, B., Kombine *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kültürlerin metabolik ürünleri ve antagonistik etkilerinin incelenmesi. *Trk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 55 (1), 17-23, 1998.
31. Muhammed, F.O. and Younis, Y.A., Effect of yoghurt cultures on some pathogenic microorganisms in fermented milk. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 18 (2), 369-375, 1990.
32. Spelhoug, S.R. and Harlander, S.K., Inhibition of food borne bacterial pathogenes by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.*, 52(12), 856-862, 1989.
33. Vandenbergh, P.A., Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 221-238, 1993.

34. Lindgren, S.E. and Dobragosa, W.J., Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev., 87, 1990.
35. Dahiya, R.S., and Speck, M.L., Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on Staphylococcus aureus. J. Dairy Sci., 51, 1568, 1968.
36. Reddy, G.V., Shahani, K.M., Friend, B.A. and Chandan, R.C., Natural antibiolytic activity of Lactobacillus acidophilus and bulgaricus III. Production and partial purification of bulgarican from Lactobacillus bulgaricus. J. Cultured Dairy Prot., 7-11, May 1984.
37. Abdel-Bar, M.M. and Abdel, N.M., Purification and characterization at an antimicrobial substance produced by Lactobacillus bulgaricus. Dissertation Abs. -Int. -B. Sci. And Eng., 46, 1, 12, 202, 1985.
38. Jay, J.M., Antimicrobial properties of diacetyl, Appl. Environ. Microbiol., 44, 525-532, 1982.
39. Egyad, L.G., Studies on cell division: The effect of aldehydes ketons and α -keto-aldehydes on the proliferation of E. coli. Curr. Med. Biol., 1, 14-20, 1967.
40. Price, R.J. and Lee, J.S., Inhibition of Pseudomonas species by hydrogen peroxide producing lactobacilli, J. Milk Food Technol., 33, 13, 1970.