

Ağız Mikrobiyotasından İzole Edilen Bakterilerin Laktik Asit Üretim Yeteneklerinin
Araştırılması

Yağmur Toptaş

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül 2011

Investigation of Lactic Acid Production Abilities of Bacteria Isolated from Oral Microbiota

Yağmur Toptaş

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

September 2011

Ağız Mikrobiyotasından İzole Edilen Bakterilerin Laktik Asit Üretim Yeteneklerinin
Araştırılması

Yağmur Toptaş

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Eylül 2011

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Yağmur TOPTAŞ'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Ağız mikrobiyotasından izole edilen bakterilerin laktik asit üretim yeteneklerinin araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

İkinci Danışman : Öğr. Gör. Dr. Gülçin AKCA

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye: Prof. Dr. Semra İLHAN

Üye: Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN

Üye: Öğr. Gör. Dr. Gülçin AKCA

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Laktik asit ticari olarak geçerli bir üründür. Günümüzde fermentasyon süreci ile laktik asit üretimi *Lactobacillus* üyeleri kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Ağız, laktik asit bakterileri gibi birçok mikroorganizma için uygun bir ortamdır. Bu çalışmada hasta ağızlarından izole edilen laktik asit bakterilerinin laktik asit üretme yetenekleri değerlendirilmiştir. İzolatların biyokimyasal karakterizasyonundan sonra daha sonraki çalışmalar için laktik asit üretim potansiyeline sahip iki izolat seçilmiştir. Bu suşlar kullanılarak, karbon kaynağı, karbon miktarı, azot kaynağı, azot miktarı, sıcaklık, inokulum miktarı, inkübasyon süresinin laktik asit üretimine etkileri test edilmiştir. Laktik asit üretimi için bulunan optimum koşullar şunlardır: 28 numaralı izolat için; karbon kaynağı sükroz, karbon kaynağı miktarı 50 g/l, azot kaynağı diamonyum hidrojen sitrat, azot miktarı 8 g/l, sıcaklık 42 °C, inokulum miktarı $4,5 \times 10^8$ CFU/ml, inkübasyon süresi 72 saat olurken; 73 numaralı izolat için karbon kaynağı sükroz, karbon kaynağı miktarı 50 g/l, azot kaynağı diamonyum hidrojen sitrat, azot miktarı 2 g/l, sıcaklık 37 °C, inokulum miktarı 3×10^8 CFU/ml, inkübasyon süresi 72 saattir. 28 numaralı izolat için, optimizasyon öncesi ve sonrasında sırasıyla 27 ve 45,3 g/l laktik asit değerleri okunurken; 73 numaralı izolat için ise bu değerler sırası ile 15 ve 51,7 g/l olmuştur. Laktik asit üretim yetenekleri optimize edilen 28 ve 73 no'lu izolatlar, API CHL 50 ve diğer biyokimyasal test sonuçlarına göre *Lactobacillus brevis* ve *Streptococcus sp.* olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre seçilen iki izolatın sükrozdan laktik asitin çok iyi birer mikrobiyal üreticisi olduğu sonucunu çıkartabiliriz. Sükrozun laktik aside dönüşümünde yüksek potansiyele sahip olduğundan dolayı bu izolatlar yeni bir teknoloji geliştirmek için endüstriyel olarak değerlendirilebilir.

Anahtar kelimeler: Oral laktik asit bakterileri, ağız mikrobiyotası, besiortamı optimizasyonu, laktik asit.

SUMMARY

Lactic acid is a commercially viable product. Today, the production of lactic acid through fermentation process is possible using the members of the genus *Lactobacillus*. Mouth is suitable environment for many microorganisms such as lactic acid bacteria. In this study, lactic acid production abilities of some lactic acid bacteria isolated from mouths of patients were investigated. After biochemical characterization of isolates, it is chosen two isolates having lactic acid production potential for further studies. Using these strains, the effects of carbon source, amount of carbon, nitrogen source, amount of nitrogen, temperature, amount of inoculums and incubation time on lactic acid production were systematically tested. Optimal conditions for lactic acid production have been found to be: sucrose as a carbon source, amount of sucrose 50 g/l, diammonium hydrogen citrate as a nitrogen source, amount of nitrogen 8 g/l, temperature 42 °C, amount of inoculums $4,5 \times 10^8$ CFU/ml and incubation time 72 hours for isolate 28#; whereas, the optimal conditions were sucrose as a carbon source, amount of sucrose 50 g/l, diammonium hydrogen citrate as a nitrogen source, amount of nitrogen 2 g/l, temperature 37 °C, amount of inoculums 3×10^8 CFU/ml and incubation time 72 hours for isolate 73#. For 28#, 27 and 45,3 g/l for lactic acid amount were found, respectively before and after optimization. For 73#, 15 and 51,7 g/l for lactic acid amount were found, respectively before and after optimization. 28# and 73# isolates optimized lactic acid production abilities were identified as *Lactobacillus brevis* and *Streptococcus* sp. according to API CHL 50 and biochemical test results.

From the results obtained in this study, we can conclude that two isolates are excellent microbial producers of lactic acid from sucrose. Due to its high potentiality in conversion of sucrose to lactic acid, these selected isolates can be exploited industrially for developing a novel technology.

Key words: Oral lactic acid bacteria, mouth microbiota, medium optimization, lactic acid.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin ilk gününden itibaren tecrübe ve bilgisiyle beni her zaman destekleyen ve yönlendiren, tez çalışmam boyunca her türlü öneri, eleştiri ve rehberlikleriyle katkı sağlayan çok değerli Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a, bu çalışmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli Danışman Hocam Sayın Öğr. Gör. Dr. Gülçin AKCA'ya,

Çalışmalarında kullandığım cihazlar için Prof. Dr. Semra İLHAN ve Doç. Dr. Cansu Filik İŞÇEN'e,

Çalışmalarım sırasında beni destekleyen, her zaman yanımda olup yardım eden laboratuvar arkadaşlarıma,

Hayatımın başlangıcından beri hep yanımda olup beni destekleyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak benim bugünlere gelmemi sağlayan annem Narin Toptaş, babam Ömer Toptaş'a ve tüm aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ağız Mikrobiyotası.....	3
2.1.1. Ağız Mikrobiyotasının Oluşumu.....	6
2.2. Dental Plak	7
2.2.1. Dental plak oluşumu.....	7
2.2.2. Dental plağın mikrobiyal kompozisyonu.....	8
2.3. Halitozis.....	11
2.3.1. Halitozisin oluşumu	11
2.3.2. Halitozisin kaynakları.....	12
2.3.2.1. Ekzojen nedenler.....	12
2.3.2.1. Endojen nedenler.....	12
2.3.2.1. Psikojenik nedenler.....	14

2.4. Antiseptikler	14
2.4.1. Antiseptik maddelerde olması gereken özellikler.....	15
2.4.2. Klorheksidin.....	15
2.4.3. Kullanım alanları.....	16
2.4.4. Antiseptik özellikleri.....	17
2.5. Laktik Asit Bakterileri	17
2.5.1. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri.....	20
2.5.2. <i>Streptococcus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri.....	22
2.6. Laktik Asit.....	23
2.6.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	23
2.7. Laktik Asit Fermentasyonu	25
2.7.1. Mikrobiyal laktik asit üretimi.....	25
2.7.2. Kimyasal yolla laktik asit üretimi.....	33
2.8. Laktik Asitin Kullanım Alanları.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	35
3.1.1. İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	35
3.1.1.1. Gram boyama.....	37
3.1.1.2. Katalaz testi.....	37
3.1.1.3. Tuz toleransı.....	37
3.1.1.4. Glukozdan CO ₂ üretimi.....	37
3.2. Mikroorganizmaların Saklanması.....	38
3.3. Kullanılan Diğer Kimyasallar.....	38

3.4. İzolatların Laktik Asit Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	40
3.5. Laktik Asit Ölçüm Yöntemi.....	39
3.6. Laktik Asit Üretimi İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi.....	40
3.6.1. Karbon kaynağının laktik asit üretimine etkisi.....	41
3.6.2. Karbon miktarının laktik asit üretimine etkisi.....	41
3.6.3. Azot kaynağının laktik asit üretimine etkisi.....	41
3.6.4. Azot miktarının laktik asit üretimine etkisi.....	42
3.6.5. İnkübasyon sıcaklığının laktik asit üretimine etkisi.....	42
3.6.6. İnokulum miktarının laktik asit üretimine etkisi.....	43
3.6.7. İnkübasyon süresinin laktik asit üretimine etkisi.....	43
3.7. İzolatların API Test Kitleriyle Tanımlanması.....	43
3.8. Ticari Oral Antiseptiklerin Laktik Asit Bakterilerinin Üremesine Etkisi.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. LAB'nin İzolasyonu ve Tanımlanması.....	45
4.2. LAB İzolatlarının Laktik Asit Üretim Yetenekleri Açısından Karşılaştırılması.....	45
4.3. Laktik Asit Üretiminin İyileştirilmesi.....	47
4.3.1. Karbon kaynağının laktik asit üretimine etkisi.....	47
4.3.2. Karbon miktarının laktik asit üretimine etkisi.....	48
4.3.3. Azot kaynağının laktik asit üretimine etkisi.....	49
4.3.4. Azot miktarının laktik asit üretimine etkisi.....	50
4.3.5. İnkübasyon sıcaklığının laktik asit üretimine etkisi.....	52
4.3.6. İnokulum miktarının laktik asit üretimine etkisi.....	53

4.3.7. İnkübasyon süresinin laktik asit üretimine etkisi.....	54
4.4. Ticari Oral Antiseptiklerin Laktik Asit Bakterilerine Üremesine Etkisi..	55
4.5. API CHL 50 ve Biyokimyasal Testlerin Sonuçları.....	56
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Klorheksidinin yapısal formülü.....	15
Şekil 2.2. Laktik asidin iki optik izomeri.....	24
Şekil 2.3. Homolaktik asit bakterilerinin fermentasyon yol izi.....	31
Şekil 2.4. Homolaktik asit bakterilerinin fermentasyon yol izi.....	32
Şekil 4.1. Laktik asit ölçümünde kullanılan standart eğri.....	45
Şekil 4.2. 28 numaralı izolatın farklı karbon kaynakları ile laktik asit üretiminin karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.3. İmmobilize 73 numaralı izolatın farklı karbon kaynakları ile laktik asit üretiminin karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.4. 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine sükroz miktarının etkisi.....	48
Şekil 4.5. 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine sükroz miktarının etkisi.....	49
Şekil 4.6. Farklı azot kaynaklarının 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine etkisi.....	49
Şekil 4.7. Farklı azot kaynaklarının 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine etkisi.....	50
Şekil 4.8. Di-amonyum hidrojen sitrat miktarının 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine etkisi.....	51
Şekil 4.9. Di-amonyum hidrojen sitrat miktarının 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine etkisi.....	51
Şekil 4.10. 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine sıcaklığın etkisi.....	52
Şekil 4.11. 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine sıcaklığın etkisi.....	52

Şekil 4.12. 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine inokulum miktarının etkisi.....	53
Şekil 4.13. 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine inokulum miktarının etkisi.....	53
Şekil 4.14. 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine sürenin etkisi.....	54
Şekil 4.15. 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine sürenin etkisi.....	54
Şekil 4.16. Ticari oral antiseptiğin ve ağız kokusu spreyin 28 numaralı izolata etkisi.....	56
Şekil 4.17. Ticari oral antiseptiğin ve ağız kokusu spreyin 73 numaralı izolata etkisi.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Ağız boşluğu içerisinde yer alan bakteri grupları.....	5
Çizelge 2.2. Dental plaktan kültüre edilebilen mikroorganizma toplulukları.....	10
Çizelge 2.3. <i>Lactobacillus</i> türlerinin bulunduğu ortamlar.....	21
Çizelge 2.4. Laktik asidin bazı fiziksel özellikleri.....	25
Çizelge 2.5. Laktik asit bakterilerinin laktik asit yol izine göre sınıflandırılması.....	26
Çizelge 3.1. Rogosa agar besiyeri içeriği.....	36
Çizelge 3.2. MRS sıvı besiyeri içeriği.....	36
Çizelge 3.3. Laktik asit üretiminde kullanılan ortam içeriği.....	39
Çizelge 4.1. İzolatların ürettikleri laktik asit miktarı.....	45
Çizelge 4.2 Optimizasyon öncesi ve sonrası laktik asit miktarları.....	55
Çizelge 4.3.Ticari oral antiseptiklerin izolatların gelişimi üzerine etkileri.....	55

1.GİRİŞ

Ağız bakteriler için uygun bir ortamdır. Uygun ısı, nem ve bol besin maddeleri içermesi nedeni ile bakteriyel gelişim için uygun bir habitatır. Oral mikrobiyota sürekli değişim gösterebilir. Bu duruma bireyin beslenme alışkanlıklarını değiştirmesi, metabolik rahatsızlıkları, çeşitli patojenlere ve nozokomiyal enfeksiyonlara maruz kalmaları gibi etkenler neden olabilmektedir.

Sağlıklı bireylerin ağız, müköz membranları ve deri yüzeyinde yer alan mikroorganizma populasyonları, normal mikrobiyotayı oluşturmaktadır. Bu mikrobiyota, kendi içerisinde “rezident” kalıcı ve “tranzident” geçici olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

Birçok insanın muzdarip olduğu oral ya da oral olmayan etkenlerden kaynaklanan ve “halitosis” olarak bilinen ağız kokusu patolojik bir problemden çok sosyal bir problem olarak algılanmaktadır. Dünya nüfusunun en az %50’si istenmeyen kronik ağız kokusundan dert yanmaktadır ve bunların yarısı da bunu ciddi bir problem olarak görmekte ve durumdan kişisel olarak rahatsız olmaktadır.

Oral mikrobiyotanın dinamik bir yapıya sahip olması ağız sağlığı açısından önemlidir. Ağızda diş çürümelerine neden olan mikroorganizmaların bazıları, laktik asit bakterileri gibi, diş çürüğüne neden olmalarının yanı sıra sahip oldukları metabolik özellikler nedeni ile probiyotik gruba dahil edilirler. Bununla birlikte laktik asit bakterilerinin diş çürüğüne neden olan bazı bakterilerin dental plak oluşumunu engellediği ve böylece diş çürümesini önleyici bir özellik taşıdıkları yönünde bulgular artmaktadır. Laktik asit bakterilerinin probiyotik özellik taşıması yanında güvenli kullanım potansiyelleri nedeni ile laktik asit üretimi için alternatif bir kaynak olarak oral mikrobiyotanın önem taşıdığı düşünülmektedir.

Sunulan tez çalışması kapsamında Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne çeşitli diş rahatsızlıkları ile gelen hastalardan alınan tükürük örneklerinden izole edilen, laktik asit üreticisi potansiyel suşların laktik asit üretme yetenekleri araştırılmıştır. Elde edilen potansiyel üreticiler için optimizasyon çalışmaları yapılarak laktik asit üretim verimleri artırılmaya çalışılmıştır. Tez çalışmasının bir sonucu olarak endüstriyel laktik asit üretimi için alternatif bir laktik asit üreticisi ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Ağız Mikrobiyotası

İnsan ağız mikrobiyotası, vücudun en karmaşık mikroorganizma ekosistemlerinden biridir. Ağız mikrobiyotası; bakteriler, mantarlar, mikoplazmalar, protozoonlar ve virüsler gibi farklı organizma gruplarından oluşmaktadır (Samaranayke, 2002).

Ağız bakteriler için uygun bir ortam olarak düşünülebilir; çünkü uygun ısı, nem ve bol besin maddeleri içerir. Bireylerin beslenme alışkanlıklarını değiştirmeleri, fizyolojik ve immünolojik durumları, farklı mikroorganizmalara maruz kalmaları; konağın, hayatı boyunca oral mikrobiyota ekolojisinin dinamik ve değişken yapısını oluşturur (Samaranayke, 2002).

Ağız mikrobiyotası üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur. İnsan mikrobiyotasındaki mikroorganizmaların izolasyonu ve türünün belirlenmesinde, üzerinde durulması gereken konular aşağıdaki gibi belirlenmiştir (Cengiz, 2004):

1. Örneklerin toplanma şekli,
2. Örneklerin toplanmasında kullanılan yöntemler,
3. Örneklerin laboratuvara nakil koşulları,
4. Örneklerin kültür edilme koşulları.

Ağız mikrobiyotası, farklı bireylerin ağızlarında aynı bölgelerde değişebildiği gibi, aynı bireylerin farklı dişlerinden alınan plak örneklerinde bile sayısal ve niteliksel değişiklikler göstermektedir. Ağız içerisinde bulunan bakteri

kolonizasyonunun farklı anatomik bölgelerde de değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Cengiz, 2004; Marsh and Martin 2000; Nolte, 1973).

Ağız boşluğu içinde bulunan bakteri toplulukları genel olarak Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler olarak sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1).

Çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler ağız içinde mikroorganizmaların yaşam ve üremelerini etkilemektedir. Bunlar;

1. Organik ve inorganik besin maddelerinin alınımı,
2. Bu besin maddelerinin oksijen ve karbonhidrat seviyeleri,
3. pH,
4. Tükürükte antimikrobiyal maddelerin varlığı ve tükürüğün kalitesi,
5. Ağız anatomisi,
6. Oral yüzeylere etki eden aşındırıcı kuvvetler,
7. Su ve ısı, olarak sıralanabilir (Cengiz, 2004).

Sağlıklı bireylerin ağız, müköz membranları ve deri yüzeyinde yer alan mikroorganizma populasyonları, normal mikrobiyotayı oluşturmaktadır. Bu mikrobiyota, kendi içerisinde kalıcı ve geçici olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Kalıcı mikrobiyota, belirli bir bölgede varolan ve yaşamlarını denge içinde sürdüren mikroorganizmaları içerirken; geçici mikrobiyota, ağız, mukoz membran, cilt ve vücudun diğer bölgelerinde değişik zamanlarda yerleşen, patojen olmayan veya potansiyel patojen olan mikroorganizmaları içermektedir (Cengiz, 2004).

Çizelge 2.1. Ağız boşluğu içerisinde yer alan bakteri grupları (Marsh and Martin, 2000; Samaranayke, 2002).

Gram (+)	Gram (-)
Koklar	Koklar
<i>Abiotraphia</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Streptococcus</i>	
<i>Staphylococcus</i>	
<i>Stomatococcus</i>	
Çubuklar	Çubuklar
<i>Actynomyces</i>	<i>Aggregatibacter</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bacterioides</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>Cantonella</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Centipeda</i>
<i>Rothia</i>	<i>Desulfovibrio</i>
	<i>Desulfobacter</i>
	<i>Eikenella</i>
	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Haemophilus</i>
	<i>Johsonii</i>
	<i>Leptotrichia</i>
	<i>Porphyromonas</i>
	<i>Prevotella</i>
	<i>Selenomonas</i>
	<i>Simonsiella</i>
	<i>Treponema</i>
	<i>Wolinella</i>

2.1.2. Ağız mikrobiyotasının oluşumu

Ağız mikrobiyotasını oluşturan mikroorganizmaların türleri, doğum, çocukluk ve erişkinlik dönemlerinde farklılık göstermektedir.

Anne karnındaki fetusta bakteri bulunmaz. Bu nedenle yeni doğanın ağız mikrobiyotası doğum sırasında oluşur. Doğum kanalından çıkış sırasında, annenin vajinal mikrobiyotasında bulunan mikroorganizmalar, yenidoğanın ağız mikrobiyotasını oluşturur. Bu mikrobiyota doğumun şekline göre de değişiklik gösterebilir (Cengiz, 2004; Marsh and Martin, 2000).

Doğum sonrası, süt ve süt ürünleriyle beslenmeden dolayı, ağızda sayıca laktobasil ve streptokok üyeleri fazla bulunmaktadır. Yeni doğanın ağızda diş bulunmadığından, oksijen yüzeylere rahatça ulaşabilmektedir. Bu durum anaerob organizmaların aleyhine bir durum oluşturmaktadır. Ortam zorunlu anaeroblar için uygun değildir. Ancak dil papillaları arasında oksijenden yoksun bölgeler bulunabilir. Bu bölgelerde anaerob mikroorganizmalara rastlanabilir (Cengiz, 2004).

Ağız ortamındaki değişiklik ilk süt dişlerinin çıkması ile başlar. Süt dişlerinin çıkmasıyla birlikte ağız içinde, oksijenin kısmen ya da hiç ulaşamadığı bölgeler oluşur. Bununla birlikte anaerob bakteri topluluğu hızla artmaya başlar ve dişler ağızda bulunduğu sürece sayıca üstünlüklerini sürdürürler (Cengiz, 2004).

Ağız içindeki mikroorganizmalarda en önemli artış kalıcı dişlerin sürmesi ile görülür. Bu dişlerin yüzeylerindeki, kolayca aşınmayan derin fissürler ve aproksimal boşluklar, süt dişlerinden fazladır. Dişeti cepleri kalıcı dişlerde süt dişlerinden daha derindir ve anaerobik mikroorganizmalar için uygun üreme alanı oluşturur (Cengiz, 2004).

Tükürükte bulunan mikroorganizmaların yarısı, diş eti cebinde bulunan mikroorganizmaların 2/3'ü anaerobtur. Tükürükte bulunan mikroorganizmaların sayısı özellikle dilden kaynaklanır; ml'de 43 milyon- 5,5 milyar arası değişmektedir (Celini, et al., 1995).

Periodontal hastalıkların ortaya çıkmasında diş yüzeylerinde oluşan biyofilmler önemli rol oynamaktadır. Plak biyofilmi içerisinde yer alan birçok farklı bakteri türü, inflamasyonun başlamasından ve devamından sorumludur. Gingivitlerde hem supragingival hem de subgingival plak oluşumu rol oynarken, periodontit olguları subgingival plak oluşumu ile ilişkilidir (Socransky and Haffajee, 2002).

2.2. Dental Plak

Dental plak, ağzın sert doku yüzeyleri üzerine bağlanan, içerisinde canlı ve ölü bakterileri ve bakteri ürünlerini içeren mikrobiyal bir oluşumdur. Dental plağın su oranı %80-85 arasında değişir. Plağın en fazla kalınlığı, düz yüzeylerde 300 µm, ara yüzlerde 5 mm ve fissürlerde 2 mm olarak bildirilmiştir (Grönroos, 2000; Samaranayake, 2002).

Dental plak 500'den fazla tür içermektedir. Dental plağın oluşumunun hızı ve miktarı, çürük lezyonları, diş pozisyonundaki düzensizlikler gibi fiziksel etkenlere bağlıdır (Marsh and Martin, 2000).

2.2.1. Dental plak oluşumu

Mikroorganizmanın ağız içerisinde herhangi bir yüzeye bağlanması ile dental plak oluşumu başlar. Dental plak oluşumu, farklı basamaklar içeren bir süreçtir ve başlangıç kolonizasyonu, hızlı bakteriyel üreme ve yeniden yapılanma olmak üzere üç aşamada incelenebilir (Newburn, 1989).

Başlangıç kolonizasyonu diş temizliğinden iki saat sonra başlar (Cengiz, 2004). İlk tutunan bakteriler ile sonradan tutunanlar arasındaki koagregasyon, dental plak üzerindeki bakteri sayısını ve çeşitliliğini etkiler (Cengiz, 2004; Guo et al., 2004). Hızlı bakteri üreme süresinin ilk tutunmadan yaklaşık 8 saat-2 gün, yeniden yapılanmanın ise yaklaşık 2 gün sonra başladığı bildirilmiştir (Marsh and Martin, 2000).

2.2.2. Dental plağın mikrobiyal kompozisyonu

Dental plak içinde yer alan mikroorganizmalar, organik bir matriks ile çevrelenmiştir. Dental plaktaki mikrobiyal kompozisyon, bireyler arasında ve ağız içindeki değişik bölgelere göre farklılık gösterir. Dental plak içerisinde bulunan ve kültüre edilebilen mikroorganizmalar Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (Yanar, 2006).

Dental plak mikroorganizmalarının yüksek bir genetik heterojenitesi vardır. Plak içerisinde 30–300 arasında türe rastlandığı belirtilmektedir (Redmo Emanuelson and Thornqvist, 2000; Rudney, 2000). Dental plak mikrobiyotası dişin farklı yüzeylerine göre değişmektedir. Fissürlerin mikrobiyotası Gram (+) karakterde ve streptokoklar baskındır. Zorunlu anaerob bakteriler ve Gram (-) türler genellikle düşük sayıda bulunur ve nadir olarak izole edilirler. Dişeti oluşunda daha farklı türde ve çoğunlukla Gram (-) zorunlu anaerob bakterilere rastlanır. Aproksimal bölgelerdeki plakta bu iki grubun karışık olarak bulunduğu bir mikrobiyota mevcuttur (Rosan and Lamont, 2000).

Mikrobiyal dental plak bakterileri monosakkaritleri, disakkaritleri ve polisakkaritleri kullanabilir. Fruktoz ve glikozdan oluşan monosakkaritler asidojenik bakteriler tarafından fermente edilerek organik asitler oluştururlar. Bakteriyel enzimler disakkaritlerden sakkaroz sentez ederek polisakkaride dönüştürür. Polisakkaritler bakterilerin ve ürünlerinin diş yüzeyinde birikmesine,

etkilerinin belirli bir seviyeye ulaşmasına neden olur. Monosakkaritler bakteriler tarafından kullanıldığında mikrobiyal dental plak pH değerinin değişimine sebep olmaktadır (Marsh and Martin, 1996).

Çizelge 2.2. Dental plaktan kültüre edilebilen mikroorganizma toplulukları (Marsh and Martin, 2000).

Mikroorganizma	Ortalama (Kültüre edilebilir mikrobiyota %)	Görülme Aralığı	İzolasyon Sıklığı (%)
<i>Streptokoklar</i>	41	0–81	88
Mutans streptokoklar	<1	0–48	50
<i>S.sanguis</i> -grup	1	0–4	63
<i>S.oralis</i> -grup	2	0–30	75
<i>S. anginosus</i> -grup	2	0–51	63
<i>S.salivarius</i>	0	0–41	38
<i>Stafilokoklar</i>	8	1–13	100
<i>S. aureus</i>	6	0–13	88
<i>S. epidermidis</i>	0	0–7	13
Gram pozitif çubuklar	33	1–74	100
Aktinomiçesler	21	0–54	88
<i>A. israelii</i>	3	0–47	63
<i>A. naeslundii</i>	3	0–48	63
<i>A. odontolyticus</i>	0	0–48	25
<i>Propionobacterium</i>	<1	0–5	50
<i>Veillonella</i>	8	3–20	100
Gram (-) çubuklar	0	0–6	38
Mayalar	0.002	0–0.5	63

2.3. Halitozis

Halitozis, Latince’de nefes anlamına gelen halitus, durum anlamına gelen osis kelimelerinin birleşmelerinden oluşmuştur. Kötü nefes ile aynı anlamda kullanılabilen halitozis terimi gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve böbrekler gibi bazı sistemik durumlardan kaynaklanan ağız kokularını ifade eder. (Messadi, et al., 2003).

Bazı hekimler gerçek bir hastalık olmayıp bir semptom olarak kabul edilen kötü nefes veya diğer oral malodorların tanımında halitozis ve bad breath terimlerinin birbirlerinin yerine kullanılabileceğini söylemişlerdir. Bu durumu anlatmak için hangi terim kullanılırsa kullanılsın, sonuçta hastalar veya etrafındaki kişiler genellikle bu durumu, toplumsal açıdan kabul edilemez bir problem olarak tanımlamaktadırlar (Mc Dowell and Kassebaum, 1993).

Ağızdaki mikroorganizmaların halitozis oluşumundaki rolü çok önemlidir. Mikroorganizmaların yokluğunda koku bileşenleri oluşmaz (Bilgehan, 1987). Halitozis oluşumuna Gr (+) ve Gr (-) bakterilerin etkisi olmaktadır. Gr (+) bakteriler şeker zincirlerindeki glikoproteinleri açığa çıkararak Gr (-) proteolitik bakterilerin, proteinlerin bozulmasını sağlayacak şekilde koku oluşumuna karıştırmaktadırlar (Scully and Felix, 2005).

2.3.1. Halitozisin oluşumu

Halitozisi oluşturan gazlar, büyük oranda volatil sülfür bileşenlerinden oluşmaktadır. Bunlar hidrojen sülfid, metil merkaptan ve dimetil sülfiddir. Bununla birlikte halitozisin oluşumunda sülfür bileşenlerinden başka volatil aromatik bileşenleri (indole, skatole), organik asitler (asetik asit, propionik asit)

ve aminler (kadaverin, putresin) bulunmaktadır (McDowell and Kassebaum, 1993).

Halitozisin oluşumunda, tükürük, O₂ konsantrasyonunun azalması, bakterilerin üremesi ve bakterilerin metabolizmaları için yeterli alt yapının bulunması etkindir (McDowell and Kassebaum, 1993).

2.3.2. Halitozisin kaynakları

Halitozis kaynakları üç ana grupta incelenebilir.

1. Ekzojen nedenlere bağlı halitozisler
2. Endojen nedenlere bağlı olan halitozisler:
 - a) Ağız kaynaklı nedenler
 - b) Ağız dışı nedenler
 - c) İlaç kullanımına bağlı nedenler
3. Psikojenik:
 - a) Pseudo halitozis,
 - b) Halitophia (Lee et al., 2004).

2.3.2.1. Ekzojen nedenler

Ekzojen nedenle oluşan halitozisler geçicidir ve genellikle alınan yiyeceklerle ilgilidirler. Alkollü içecekler, sigara kullanımı geçici halitozise neden olur. Soğan ve sarımsak gibi sülfür oranı yüksek olan yiyeceklerdeki sülfür intestinal sistemden kan dolaşımına geçerek, akciğerlerden, soluk verme sırasında koku olarak hissedilir (Lee et al., 2004).

2.3.2.2. Endojen nedenler

Endojen kaynaklı halitozis, ağız veya ağız dışı kaynaklı nedenlerden oluşabilir (Özden Ş., 2009).

Ağız kaynaklı nedenler:

Dil, ağız kuruluğu, periodontitisler ve diğer enflamasyonlu durumlar, oral kandida ve oral kanserlerdir (Özden Ş., 2009).

Ağız dışı nedenler:

Ağız kokusunun ana kaynağı ağız boşluğu olmasına rağmen, pek çok sistemik durum da ağız kokusuna neden olabilir. Kronik sinüzit, burun kaynaklı halitozisin nedeni olabilir (Messadi et al., 2003).

Farinkste görülen çeşitli enfeksiyonlar, ülserasyonlar, şişlikler veya neoplazik oluşumlar halitozise sebep olabilir. Posterior farinks ve özefagus birleşiminde oluşan birikintiler dolayısıyla kötü koku oluşabilmektedir (Messadi et al., 2003).

Akciğer absesi, nekrotize pnömoni, akciğer kanseri ve tüberkülozda halitozis önemli bir semptom olarak bulunabilir. Akciğerler genellikle metabolizmadan kaynaklanan kötü kokunun kaynağıdır. Bu metabolik ürünler dolaşım vasıtasıyla akciğerlere ulaşır, soluk verilen havayla dışarı atılır. Bunların arasında aromatik gıdalar (sarımsak, soğan, alkol, yüksek yağ oranlı gıdalar) ve ketozis (diabetik ketozis) bulunur. Nitratlar, alkol, kloral hidrat, ve iodin içerikli ilaçlar da aynı etkiyi yaparlar (Messadi et al., 2003).

Özefagal reflü, pilorik stenoz gibi özefagal kapanıştaki zayıflama, inhibisyonda ağız kokusu görülmektedir. Özefagal sfinkterlerde gevşemelere, mide içeriği boşaltımının tam yapılamamasına, gıda, likit, tükürük retansiyonuna ve dolayısıyla halitozise neden olmaktadır (Messadi et al., 2003).

2.3.2.3. Psikojenik nedenler

Psikojenik halitosis, pseudo halitozis veya halitophia olarak ortaya çıkmaktadır. Pseudohalitozis’de hasta halitozis’den şikayetçidir, fakat hastanın ağız kokusu başkaları tarafından hissedilmemektedir. Halitophia’da ise hasta sürekli olarak ağız kokusu olacağından endişe duymaktadır (Lee et al., 2004).

2.4. Antiseptikler

Antiseptik kelimesi, Yunanca’da kokuşmaya karşı anlamına gelen iki kelimeden oluşmaktadır. Genellikle patojen mikroorganizmaları öldürmek ve çoğalmalarını önlemek amacıyla vücut yüzeylerine lokal olarak kimyasal maddelerin uygulanması işlemine de antisepsi denir. Antisepsi için kullanılan kimyasal maddelere antiseptik adı verilir (Özer, 2003).

Antiseptiklerin etki mekanizmaları, mikroorganizmaları etkiledikleri bölgeye göre gruplandırılır:

1. Hücre duvarını etkileyen bazı kimyasal maddeler, hücre duvarında bulunan proteinlerle birleşerek hücre içinde bulunan protein, DNA ve RNA sentezini inhibe ederler.
2. Sitoplazma zarını inhibe eden kimyasal ajanlar, sitoplazma zarının yarı geçirgenliğini bozarak etki gösterirler.
3. Hücre proteinlerini denatüre eden kimyasal maddeler ise proteinlerin üç boyutlu şeklini, tersiyer yapısını değiştirerek bakterisit etki gösterirler.
4. Enzimlerin işlevlerini bozarak etki gösteren kimyasal maddeler, enzimi oluşturan yapılarda değişikliğe neden olan maddelerdir.

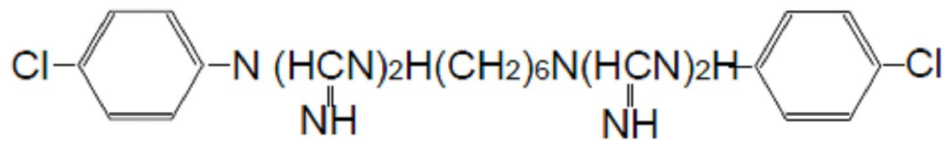
5. Sporlara etkili dezenfektanlar, spor oluşumunun çeşitli aşamalarında etki gösteren kimyasal maddelerdir (Bilgehan, 2002; McDonnell and Russell, 1999; Nolte, 1982).

2.4.1. Antiseptik maddelerde olması gereken özellikler

1. Deriyi tahriş etmemelidir.
2. Vücut doku hücrelerine öldürücü etki göstermemelidir.
3. Açık yaralara uygulandığında lökositlere toksik etkide bulunmamalıdır.
4. Ortamda kan, cerahat, serum, mukus, tükürük gibi organik maddelerin varlığında dahi etkinliğini koruyabilmelidir.
5. Geniş spektrumlu olmalıdır. (Nolte, 1982).

2.4.2. Klorheksidin

Katyonik, bis-biguanide biyosit olup, birçok mikroorganizmaya karşı etkilidir. Düşük toksisitesiye ve geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahiptir (Denton, 1991).



Şekil 2.1. Klorheksidin yapısı (1-1 Hexamethylenebis [5-(4-chlorophenyl) biguanide])

Bazı virüslere ve mantarlara karşı da etkili olan klorheksidin kokusuz, acı tadında ve beyaz kristalize toz halinde bulunmaktadır (Weller, 2000). İlk olarak 1954 yılında tanımlanmıştır (Davies et al., 1954). Bu biyositin primer etkisi hücre membranını parçalamak, konsantrasyona dayalı olarak büyümeyi durdurmak ve hücre ölümüne neden olmak şeklindedir, sekonder olarak proteolitik ve glikositik enzimlerin inhibe edilmesi yolu ile de etkili olmaktadır (Hugo and Longworth, 1966). Katyonik özelliğinden dolayı oral mukozaya ve diş yüzeylerine adezyon göstermektedir. Bu özelliği sayesinde pelikül formasyonunu azaltmakta ve yüzeyden kontrollü olarak salınarak ortamdaki varlığını uzun süre devam ettirebilmektedir (Bonesvoll et al., 1974).

Oral kavitede plak formasyonunun engellenmesi, gingivitisin iyileştirilmesi, ağız cerrahisi sonrası gelişebilecek sekonder enfeksiyona karşı korunma amacıyla kullanımı sonrası elde edilmiş başarıların yer aldığı sayısız çalışma gerçekleştirilmiştir (Aktaş, 2005).

2.4.3. Kullanım alanları

Klorheksidin tuzları antimikrobiyal etkinliklerinden dolayı tüm dünyada büyük miktarda kullanılmaktadır. Dezenfeksiyon etkinliklerinin yanında antimikrobiyal koruyucu olarak da kullanılmaktadır (Weller, 2000). Özellikle glukonat ve asetat tuzları %0.01 oranında göz damlalarında antimikrobiyal koruyucu olarak ve %0,002-0,006 oranında kontak lenslerin dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Deri dezenfektanlarında, topikal antiseptik kremlerde, ağız gargaralarında, diş jellerinde ve ürolojide kateter sterilizasyonunda ve mesane irrigasyonunda kullanılmaktadır. Ayrıca medikal yara bandajlarında, tozlarında, spreylerinde ve kremlerinde de kullanım alanı bulunmaktadır (Stabholz, 1986; Weller, 2000).

Dental işlemlerden önce kullanılmasının çekim sonrası bakteriyemiyi azaltabileceği savunulmaktadır (Dajani et al., 1997).

Oral kandidiazis tedavisinde de etkinliği saptanan klorheksidin, geniş spektrumlu etkisiyle *Candida albicans* üzerinde de antifungal etki sağlar. Kandidiyal mikroorganizmaların oral yüzeylere yapışmasını engelleyerek tedaviye katkıda bulunur. Klorheksidinin adezyonu engelleme özelliğinin amphoterisin B ve nistatinden daha fazla olduğu bulunmuştur. Nistatin ve klorheksidinin beraber kullanımının ayrı ayrı kullanımına göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Ellepola and Samaranayake, 2001).

2.4.4. Antiseptiklerin antimikrobiyal özellikleri

Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği vardır. Düşük oranlarda dahi klorheksidin tuzları bakterisit etki gösterebilmektedir. Ne var ki, *Proteus* ve *Pseudomonas* klorheksidine karşı daha az duyarlıdırlar. Klorheksidin asite dirençli boyanan basillere, bakteri sporlarına ve bazı mantar türlerine karşı da etkili değildir. Klorheksidin tuzları, adenovirüs, herpes virüs ve influenza virüs gibi lipofilik çoğu virüse karşı da etkilidir (Weller, 2000). En yüksek antimikrobiyal etkisini pH 5-7 arasında gösterir. pH 8 ve üzerinde bileşenlerine ayrılarak etkinliğini kaybeder.

2.5. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat metabolizmaları sırasında şekeri parçalayarak başlıca laktik asit oluşturan mikroorganizmaları kapsarlar (Tekinşen ve Atasever, 1994). Gram pozitif boyanan laktik asit bakterileri, birkaç ayrıcalık gösteren üye dışında hareketsizdir. *Sporolactobacillus imilinus* hariç hişbiri spor oluşturmaz. Fizyolojik karakterleri bakımından birbirine yakın olan, fakat morfolojileri oldukça farklı olan cinsleri içerirler. Morfolojileri kok veya çubuktan oluşan farklı uzunlukta zincir şeklinedir (Tunail ve Köşker,1989). Laktik asit bakterileri Gram pozitif bakteriler içerisinde düşük düzeyde guanin ve sitozin (G+C) oranına sahip olan bir bakteri grubudur (Ludwig et al., 1993) ve bu grup içerisinde yer alan bakterilerin genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (Davidson et al., 1996).

Axelsson'un 1992'de yapmış olduğu sınıflandırma dahilinde laktik asit bakterilerine dahil cinsler şunlardır: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Glabicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenecoccus*, *Vagococcus* ve *Weissella*.

Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan bu bakterilere; süt ve süt ürünlerinde, fermente gıdalarda, bazı bitkilerde, insan ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinde rastlamak mümkündür (Tekinşen et al., 1994). Buldukları ortamda yer alan karbonhidrat kaynaklarından laktik asit gibi organik asitler üreterek pH düşüşüne neden olurlar. Çoğu mikroorganizmalar bu asitlere ve pH düşüşüne hassastırlar. Yine bu bakteriler tarafından üretilen hidrojen peroksit de birçok bakteri üzerine inhibitör etki gösterir (Okereke and Montville, 1991).

Laktik asit bakterilerinin 'hem' grubu (sitokrom ve katalaz) yoktur. Hem grubunun eksikliğine karşın aerob koşullarda gelişip üreyebilirler. Diğer bir deyişle, katalaz enzimleri olmaksızın aerob ortamlarda üreyebilen nadir organizmalardır. Bütün üyeleri anaerop ya da mikroaerofildir (Halkman, 1991).

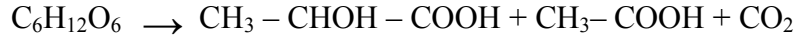
Laktik asit bakterileri fermentasyonda oluşan ürünlerin cins ve miktarına göre sınıflandırıldıklarında homofermentatif ve heterofermentatif olarak ikiye ayrılırlar (Drinan et al., 1976).

Homofermentatif laktik asit bakterileri glukozu, Fruktoz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu %95-100 oranında laktik asit üretirler. Bunun yanında besiyerinin özelliğine göre az miktarda formik asit, asetik asit ve etanol oluştururlar. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise, Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu %50 laktik asit üretirken, bunun yanısıra yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Drinan et al, 1976; Prescott and Dunn, 1987; Halkmann, 1991; Yetişmeyen, 1995).

Homofermentatif yol:



Heterofermentatif yol:



Homofermentatif bakteriler, glukoz molekülü başına 2 mol ATP üretirken, heterofermentatif olanlar 1 mol ATP üretir. ATP verimindeki bu fark, homofermentatif bakterilerin aynı miktar glukozdan iki kat daha fazla biyokütle oluşturmalarını sağlar (Brock and Madigan, 1991).

Laktik asit bakterilerinin hiçbir üyesi, içinde yalnız glukoz ve amonyum bulunan bir mineral besi ortamında gelişmez. Pek çoğu vitaminlerden bir ya da birden fazlasına gerek duyarlar. Ayrıca, amino asit istekleri de çok fazladır (Vural, 1998; Klaenhammer and Kullen, 1999).

Laktik asit bakterileri, laktik asitten başka hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, bakteriyosin gibi maddeler de oluştururlar (Reiter and Harnulv, 1984; Carminati et al., 1988; Daeschel, 1989; Spelhaug and Harlader, 1989; Fitzsimmons and Berry, 1994).

Diş yüzeyine afiniteleri yoktur ve mikrobiyal dental plakta az miktarda bulunurlar (Balakrishnan and Simmonds, 2000; Carlsson et al., 1975). Görülme sıklığı çürük lezyon sayısına ve retansiyon yerine bağlı olarak artış gösterir. Derin dentin çürüklerinde % 85 oranında yer aldıkları belirtilmektedir (Boyar and Bowden, 1985).

2.5.1. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Lactobacillus cinsinin üyeleri çubuk ya da kokobasil şeklinde; aerotolerant ya da anaerob, % 5'lik CO₂ varlığında gelişme gösterirler. Bazıları asidürik ya da asidofiliktir. Genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinirler. (Hammes and Vogel, 1995).

Glukoz fermentasyonlarına göre *Lactobacillus* türleri homofermentatif ve heterofermentatif olarak ikiye ayrılırlar. Homofermentatif olanların ürünü baskın olarak laktik asitken (>%85), heterofermentatifler laktik asitin yanında karbondioksit ve etanol veya asetik asit üretirler.

Nükleik asit bileşimi açısından, %33-55 G+C içerirler. Genellikle iyi tanımlanmış olanlarında G+C içeriğinin %10'dan fazla olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle %33-55 G+C içeriği laktobasiller arasında geniş bir çeşitlilik olduğunu gösterir (Stiles and Holzapfel, 1997).

Lactobacillus türleri, çevrede yaygın olarak bulunur (Holt et al., 1994). Sıklıkla karbonhidratça zengin ortamlarda bulunurlar (Hammes and Vogel, 1995). *Lactobacillus*ların yaygın olarak bulunduğu ortamlar Çizelge 2.3. 'te verilmiştir.

İnsanda laktobasiller, tükürükten, diş yüzeyinden, dil yüzeyinden, vestibüler mukozadan ve sert damaktan izole edilirler (Newbrun, 2000). Araştırmacılar laktobasillerin çürüğün başlamasından çok çürüğün ilerlemesinden sorumlu olduğunu bildirmektedirler (Miller, 1890).

Çizelge 2.3. *Lactobacillus* türlerinin bulunduğu ortamlar (Stiles and Holzapfel, 1997).

<p>İnsan</p> <p>Ağız boşluğu</p> <p>Bağırsak sistemi</p> <p>Vajina</p> <p>Diğer Habitatlar</p> <p>Bitki ve bitki materyalleri</p> <p>Toprak, kanalizasyon ve gübre</p> <p>Fermente yiyecekler (süt, et, sebze)</p> <p>Tahıl ürünleri</p> <p>Silaj</p> <p>Rumen</p> <p>Gıda Bozulmaları</p> <p>Bira</p> <p>Meyve</p> <p>Süt</p> <p>Et ve et ürünleri</p> <p>Fermente içkiler</p>
--

Lactobacillus türleri karbonhidrat içeren yiyeceklerde, asidik ortamlarda (pH 4.0) laktik asit üretebilirler. Bundan dolayı ortamdaki diğer bakteriler genellikle ölür ya da büyümeleri düşük pH'dan dolayı inhibe olur (Stiles and Holzapfel, 1997).

2.5.2. *Streptococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

İnsan ve hayvanlarda lokal ve genel birçok hastalığın nedeni olan ve onların müköz membranlarında da normal olarak yaşayabilen bakterilerdir. Süt ve süt ürünlerinde de bazı saprofitik türlerine rastlanır. *Streptococcus*'lar türleri doğada çok yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır. Hem insanlarda hem de hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olurlar. Bir kısmı normal sağlıklı hayvanların florasında bulunurken bazıları da streptokok enfeksiyonlarının etkenidir (Joklik et al.,1992).

Streptokoklar, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, yuvarlak veya oval yapılı mikroorganizmalardır. Tipik zincirler oluşturmakla karakterizedirler. Oluşan zincirler, 70-80 kottan meydana gelmiş uzun (*S. equi*, *S. agalactiae*) veya 10-15 kottan oluşmuş kısa (*S. dysgalactiae*, *S. uberis*) zincirler tarzında görülebilir. Genelde kapsülsüz olan Streptokoklarda, dokularda ve kan serumu ile zenginleştirilmiş besi yerlerinde üreyenlerde belirgin bir kapsül oluşumu saptanabilir. Sıvı besiyerlerinde gelişen zincirler dipte ekmek kırıntısı şeklinde tortu oluşturur. Optimum çoğalma derecesi 37 °C'dir. Hem aerobik hem de anaerobik koşullarda üreyebilirler (Bayar, 2007).

Streptokokların kapsüllü ve kapsülsüz türleri vardır. Genelde kapsülsüzdürler, kapsül bulunuyor ise esas maddesini hiyaluronik asit oluşturur. Spor yapmayan streptokokların bazı türlerinin ender olarak pigment yaptıkları bilinmektedir (Gündüz, 2010).

Streptokoklar farklı türleri ile ağız boşluğunun büyük bir nüfusunu oluştururlar. Her birinin ekolojik yaşam alanları farklılık gösterir. *Streptococcus sanguinis* ve *Streptococcus mutans* diş plağında bulunurken, *Streptococcus salivarius* dil yüzeyinde, *Streptococcus mitis* diğer mukozal dokularda yaşamaktadır (Rosan, 1994).

Streptokok cinsinin üyeleri homofermentatiftirler (Hardie and Whiley, 1995).

2.6. Laktik Asit

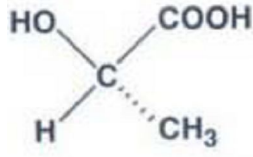
Laktik asit, ilk kez 1780 yılında İsveç’li kimyager Scheele tarafından ekşi sütte bulunmuştur. Kokusuz, ekşi tatta, zayıf bir organik asittir. Su, alkol ve eterle çözünebilir laktik asit; kloroformla çözünmez. Laktik asitin D(-) ve L(+) olmak üzere iki optik izomeri vardır. Bu iki optik izomerden L(+) izomeri insan vücudunda metabolize edilebilirken, D(-) izomeri izole edilemez (Abdel-Naby et al., 1992).

Streptokoklar oluşturdukları laktik asitle ortamı 4.3-4.5 pH’ya kadar düşürebilmekte, laktobasillerde 3.2-3.5 pH’ya düşürebilmektedir. Laktobasiller daha fazla asit oluşturduklarından asite karşı daha dayanıklıdırlar (Rasic and Kurmann, 1987).

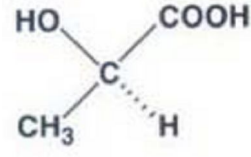
Yapılan çalışmalarla laktik asit bakterilerinin laktik asit üretimi plasmid DNA ile kontrol edildiği belirlenmiştir (Kempler and McKay, 1979; Prestini et al., 1983; Herman and McKay, 1985; Kok and Venema, 1988).

2.6.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

Laktik asit üç karbonlu, kapalı formülü $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$ olan bir organik asittir. Merkez karbon atomuna bağlı $-\text{COOH}$, $-\text{H}$, $-\text{OH}$ ve $-\text{CH}_3$ olmak üzere 4 farklı grup içermektedir. Laktik asit iki farklı optik izomere sahiptir (Şekil 2.2).



L (+) laktik asit



D (-) laktik asit

Şekil 2.2. Laktik asitin iki optik izomeri

Birbirinin optik izomeri olan bu yapılardan L(+)-laktik asit polarize ışığı sağa döndürürken, D(-)-laktik asit sola döndürür ve bu iki optik izomer arasında fiziksel ve kimyasal özellikler açısından önemli bir fark bulunmamaktadır (Göksungur, 1998).

Laktik asit, çok düşük bir uçuculuğa sahiptir, kaynama noktası 0,5 mm Hg' da 82 °C; 14 mm Hg' da 122° C'dir.

Laktik asit yaklaşık olarak 54 °C'de eriyen saf kristal formda elde edilebilmektedir. Bu kristal yapının elde edilebilmesi için özel metotlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Laktik asit hem karboksil grubu hem de hidroksil grubu içerdiği için kendisiyle laktoil-laktik asit ve dilaktid gibi esterleri oluşturmak üzere reaksiyona girip kondanse olabilmektedir. Laktik asit çözeltisi buharlaştırıldığında laktik asidin bir kısmı bu bileşenlere ve en az iki laktik asit birimi içeren polimerlere dönüşmekte, böylece viskoz kristalize olmayan bir şurup elde edilmektedir (King and Cheetham, 1987).

Çizelge 2.4. Laktik asitin bazı fiziksel özellikleri (Vick Roy, 1985).

Molekül ağırlığı	90,08 g/mol	
Erime noktası	D(-) veya L(+) için	52,8-54 °C
	DL (bileşimine göre değişir)	16,8-33 °C
Kaynama noktası D,L	0,5 mmHg'da 82°C- 14 mmHg'da 122°C	
Ayrışma katsayısı, (25 °C'de K_a)	$1,37 \times 10^{-4}$	
Yanma ısısı, (ΔH_c)	1361 kJ mol ⁻¹	
Özgül ısı, (20 °C'de C_p)	190 J mol ⁻¹ °C ⁻¹	

2.7. Laktik Asit Fermentasyonu

2.7.1. Mikrobiyal laktik asit üretimi

Laktik asit fermentasyonu 2 farklı yol izi izleyerek gerçekleşebilir. Bu mikroorganizma türüne bağlı olarak heterolaktik laktik asit fermentasyonu ve homolaktik laktik asit fermentasyonu şeklindedir. Çizelge 2.5'te laktik asit bakterilerinin laktik asit fermentasyonu yol izine göre sınıflandırılmaları verilmiştir.

Çizelge 2.5. Laktik asit bakterilerinin laktik asit yol izine göre sınıflandırılması.

Homolaktik Fermentatif	Heterolaktik Fermentatif
<i>Lactobacillus. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. delbr. subsp. delbrueckii</i>	<i>L. coryneformis</i>
<i>L. delbr. lactis</i>	<i>L. curvatos</i>
<i>L. delbr. subsp. bulgaricus</i>	<i>L. casei</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. paracasei</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. buhneri</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. kefir</i>
	<i>L. reuteri</i>
	<i>Leuconostoc sp.</i>

Homolaktik *Lactobacilli* türleri şekerli Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) glikoliz yol izine göre kullanırlar ve standart fermentasyon koşulları altında tek ürün olarak laktik asit ortaya çıkar. Bu bakteriler pentoz ve glukonatı fermente etmezler.

EMP glikoliz yol izi 11 basamaklı reaksiyonlar dizisinin sonunda laktik asit oluşmasıdır (Tüzün, 2002).

1. İlk reaksiyon glikoz molekülünün 6 yerinden fosfatlanmasıyla başlar ve glikoz 6-fosfat meydana gelir. Buradaki enzimler : heksokinaz ve/veya glikokinaz, koenzim ATP ve kofaktör Mg^{++} dır.

2. Glikoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşmesi bir izomerleşme reaksiyonudur. Enzim, fosfoheksozimeraz veya fosfoglikoizomerazdır. Glikoz-6-fosfatın halkalı yarı asetal bağı açılıp zincir şeklinde dönüşür, zincir şekli aldoz-ketoz dönüşümüne göre fruktoz-6-fosfata izomerleşir, sonra yarı ketal bağı kapanarak fruktoz-6-fosfat meydana gelir.
3. Fruktoz-6-fosfatın fruktoz 1,6 difosfata dönüşmesi reaksiyonu fruktoz-6-fosfatın bir kez daha fosfatlanmasıdır. Enzim, fosfofrutokinaz, koenzim ATP ve kofaktör Mg^{++} .
4. Fruktoz 1,6 difosfatın Gliseraldehit-3-fosfat ve Dihidroksiasetonfosfata bölünmesi reaksiyonunun olası mekanizması : Fruktoz 1,6 difosfatın bir dengeye kadar zincir şekline dönüşmesi ve bu zincirin bölünerek Gliseraldehit-3-fosfat ve Dihidroksiasetonfosfat meydana gelmesi şeklinde açıklanabilir. Enzim : Aldolaz.
5. Triozfosfatların birbirine dönüşmesi reaksiyonunda enzim Triozfosfat izomerazdır. Reaksiyonun mekanizması diğer şekerlerdeki aldoz ketoz dengesinde olduğu gibi endiol üzerinden geçer.
6. Gliseraldehit-3-fosfatın 1,3 difosfogliseric asite dönüşmesi. Buraya kadarki reaksiyonlarda fosfatlanma, izomerleşme ve bölünme gibi reaksiyonlar gerçekleşmiştir. Bunlarda belirgin bir elektron aktarılması yoktur. İlk kez bu reaksiyonda elektron aktarılması olur ve gliseraldehit-3-fosfatın aldehit grubu iki elektronunu NAD^{+} 'ye aktararak kendisi karboksilik asit basamağına yükseltgenir ve reaksiyon sırasında inorganik fosfat bağlayarak 1,3 difosfogliseric asit meydana gelir.

Bu reaksiyon biyokimyanın en ilginç reaksiyonlarından biridir. Çünkü burada gliseraldehit-3-fosfat molekülünün aldehit grubundan hidrür iyonu

ayrılarak yüksek enerjili iki bileşik yani 1,3 difosfogliserik asit ve NADH meydana gelmektedir. ΔG pozitif olarak oldukça yüksektir ve kimyasal termodinamik bakımından böyle bir reaksiyonun gerçekleşmesi olası değildir. Biyokimyasal olarak böyle bir reaksiyonun gerçekleşmesi ancak enzimin özel yapısı ile mümkün olmaktadır. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enziminin aktif merkezinde sistein kalıntısının $-SH$ grubu vardır ve başka bir aktif merkezine NAD^+ kovalent bağlarla bağlanmıştır.

7. 1,3 fosfogliserik asitin 3-fosfogliserik asite (3-PGA) dönüşmesi. 1,3 difosfogliserik asit karboksilik asit ile fosforik asit anhidrididir. Bu reaksiyonda anhidrit bağından fosfat grubu ayrılıp ADP ye bağlanır ve 3 fosfogliserik asit + ATP meydana gelir. Enzim ; fosfogliseril kinaz, koenzim ; ADP ve kofaktör Mg^{++} dir.

8. 3-Fosfogliserik asidin (3-PGA) 2-Fosfogliserik asite (2-PGA) dönüşmesi reaksiyonunun enzimi fosfogliseril mutazdır. Bu enzimin aktif merkezinde serin kalıntısına bağlı fosfat grupları bulunur. Bu 3-PGA nın 2- yerini fosfatlayarak 2,3 difosfogliserik asit-enzim kompleksi oluşturur. Bunun 3- yerinden fosfat grubu ayrılarak 2-PGA meydana gelir.

9. 2-Fosfogliserik asitten (2-PGA) fosfofenol pirüvat (PEP) oluşması reaksiyonunun enzimi enolaz (veya fosfopirüvat hidrolaz), kofaktörler Mg^{++} veya Mn^{++} dir.

10. Fosfofenolpirüvatın (PEP) pirüvik asite dönüşmesi. Enzim; pirüvik kinaz, koenzimler Mg^{++} ve K^+ . Bu reaksiyonda PEP ten ayrılan fosfat anyonu ADP'ye bağlanarak yüksek enerjili bir koenzim olan ATP meydana gelir.

11. Pirüvik asitin L(+) laktik asite dönüşmesi. Glikoliz reaksiyonunun son basamağı olan bu dönüşümün enzimi laktik dehidrojenaz (laktat dehidrojenaz), koenzim NADH dir. Pirüvik asitin keto- grubuna 2 elektron + 2 proton aktarılarak laktik asit meydana gelir. Reaksiyon çok ekzotermiktir ve laktik asit lehinedir.

Fakültatif olarak heterofermentatif mikroorganizmalar da heksozu aynı yol izine göre kullanırlar; ancak bu mikroorganizmalar pentoz ve bazı farklı maddeleri fosfoketolazdan bağımsız bir yol izini kullanarak parçalarlar. Zorunlu heterolaktik laktik asit bakterileri ise sadece fosfoketolazdan bağımsız bir yol izini kullanırlar ve bu nedenle ortaya laktik asitin yanında büyük miktarlarda yan ürünler çıkar (Eldeleklioğlu, 2009).

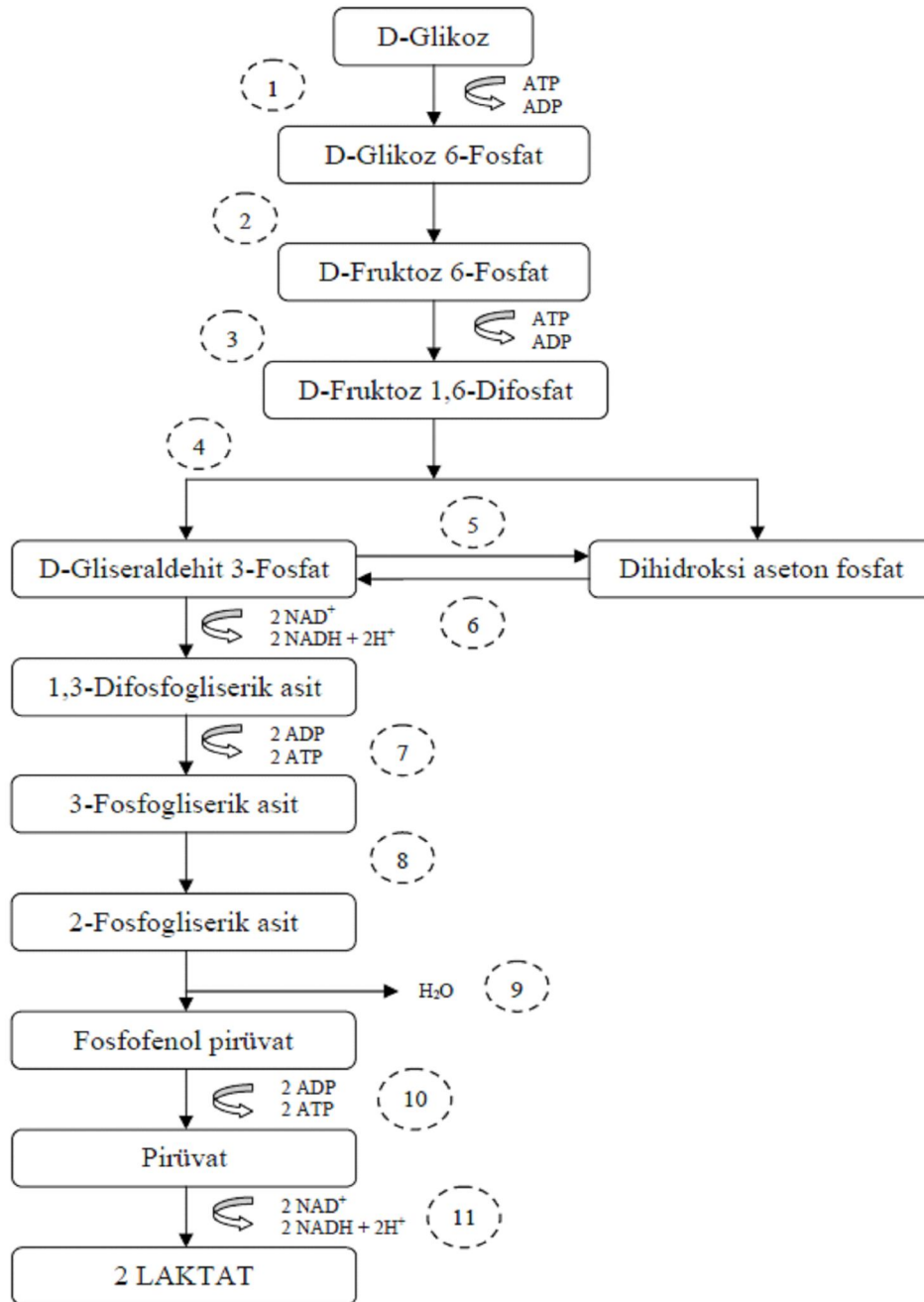
Laktik asit üretiminde kullanılacak mikroorganizmanın seçiminde fermente edilecek karbonhidratın önemi büyüktür. Sanayide ticari önemi olan bakteriler homofermentatif olanlardır. Substrat olarak genellikle organik gıda sanayi atıkları ve yan ürünleri tercih edilir. Endüstriyel organizmaların, ucuz atık maddeleri veya yan ürünleri en az düzeyde azotlu kompleks besin maddelerine ihtiyaç duyarak, hızlı ve tamamına yakın fermente etmesi istenir (Vick Roy,1985).

Ticari laktik asit üretiminde en çok rafine sakkaroz içeren sentetik ortam, hidrolize nişastadan elde edilen maltoz ve dekstroz, peynir altı suyu, pancar ve kamış melası kullanılmaktadır (Vick Roy,1985).

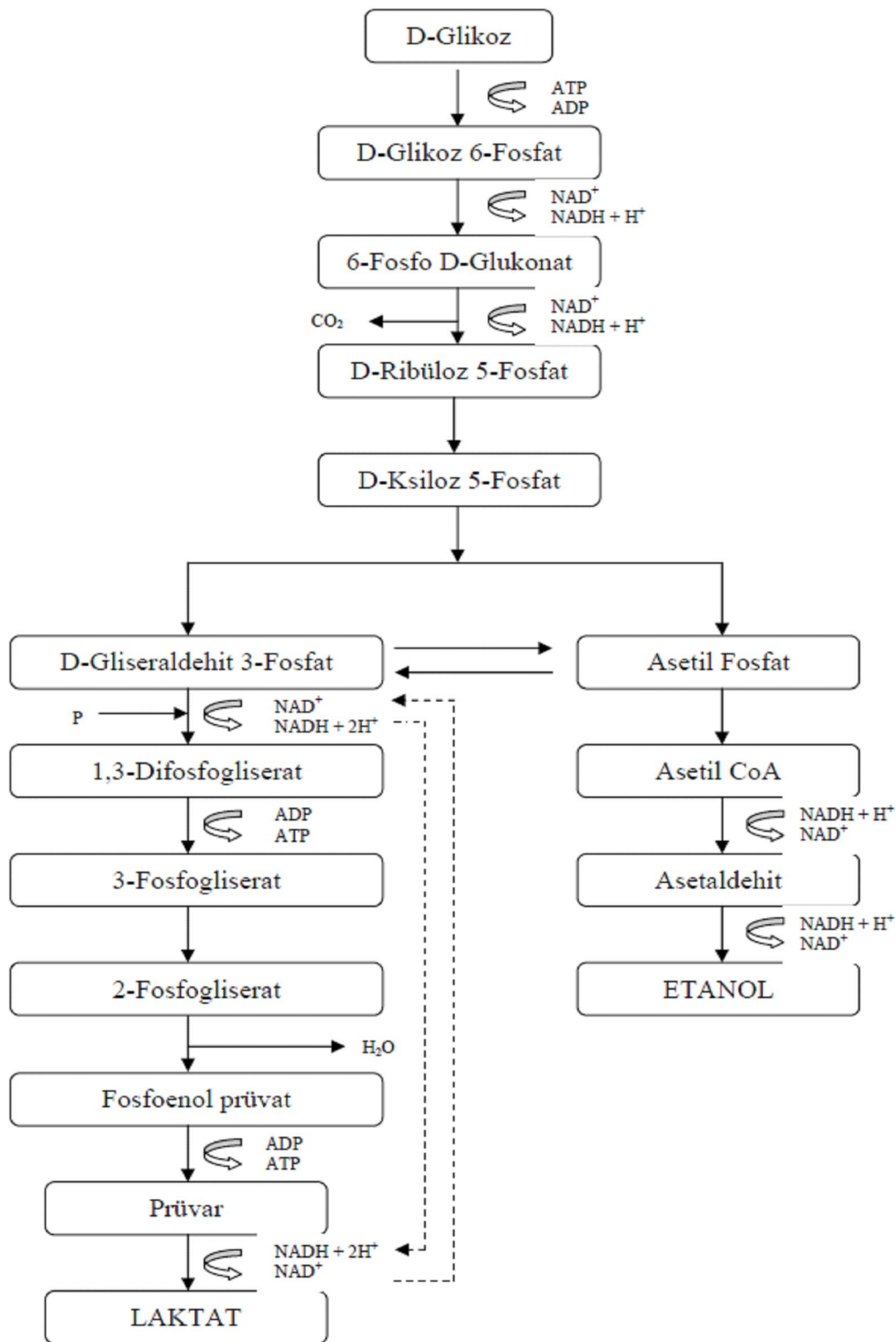
Laktik asit bakterileri belirli bir düzeyin üzerindeki asitliği tolere edemezler ve çalışmalarını durdururlar. Fermentasyonun tamamlanabilmesi ve yüksek verimlilik için oluşan laktik asitin nötralize edilerek pH'nın 5.5-6.5 arasında kalması sağlanır. Nötralizasyon için en çok kalsiyum karbonat, sodyum hidroksit, kalsiyum hidroksit ve amonyum hidroksit kullanılır (Atkinson ve Mavituna, 1983).

Ortamdaki şeker konsantrasyonu fermentasyon başlangıcında %5-20 arasında ayarlanır ve genellikle %20 üzerine çıkmaz. Daha yüksek şeker konsantrasyonunda ürün inhibisyonu olur ve fermentasyon esnasında oluşan kalsiyum laktat karıştırılması güç katı bir yapı meydana getirir. Ticari laktik asit

retiminde %90'nın üzerinde laktik asit verimi amaçlanır ve ortamda kullanılmadan kalan Şeker konsantrasyonunun %0,1'in altında kalması istenir (Atkinson ve Mavituna,1983; Vick Roy,1985).



Şekil 2.3. Homolaktik asit bakterilerinin fermentasyon yol izi (Panesar et al., 2007).



Şekil 2.4. Heterolaktik asit balterilerinin fermentasyon yol izi (Panesar et al., 2007).

Laktik asit üreten bakteriler (LAB), yüksek üreme hızları ve ürün verimleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Buna karşın LAB' ların, kısıtlı B vitamini ve aminoasit sentez edebilirliği nedeniyle karmaşık besinsel gereksinimleri mevcuttur ve maya ekstresi gibi belirli besinleri ortamlarında istemektedirler. Bu ilavelerle meydana gelen karmaşık ortam alt akım maliyetini ve dolayısı ile bakteriyel laktik asit üretiminin toplam maliyetini artırmaktadır (Zhang et al., 2007).

2.7.2. Kimyasal yolla laktik asit üretimi

Laktik asitin kimyasal olarak sentezlenmesinde kullanılan ticari proses laktonitril oluşumuna dayanmaktadır. Hidrojen siyanit, baz bulunan bir ortamda asetaldehide ilave edilerek laktonitril oluşumu sağlanmaktadır. Reaksiyon yüksek atmosfer basıncında ve sıvı fazda gerçekleşmektedir. Elde edilen laktonitril daha sonra distilasyonla saflaştırılmaktadır. Ardından HCl ya da H₂SO₄ kullanılarak laktik asit ve amonyum tuzuna dönüştürülmekte ve saf laktik asit elde edilmektedir. Metanol kullanılarak laktik asitten elde edilen metil laktat ortamdan uzaklaştırılır ve distilasyonla saflaştırılmasının ardından asit katalizör varlığında laktik aside hidrolize edilir (Narayanan et al., 2004).

2.8. Laktik Asitin Kullanım Alanları

Laktik asit; hem kimyasal sentezle hem de mikrobiyal olarak üretilmektedir (Reddy et al., 2008). Üretilen laktik asitin yaklaşık % 90'lık kısmı laktik asit bakterileri kullanılarak elde edilmekteyken, kalan kısmı laktonitril hidrolizi ile sentetik olarak üretilmektedir (John et al., 2007). Kimyasal sentezle üretim sonucu rasemik DL-laktik asit elde edilirken, optikçe spesifik [L(+),D(-) ve DL karışımı] formu spesifik mikrobiyal suşlar kullanılarak üretilmektedir (Reddy et al., 2008).

1982'den beri laktik asit pazarı, gıda ve içecek sanayisi tarafından oluşturulmaktadır ve bugün de bu durum devam etmektedir. Üretilen laktik asitin %50'den fazlası hazır gıda ürünlerinde emülsifiye edici ajan olarak kullanılmaktadır (Reddy et al., 2008).

Laktik asit bakterileri, özellikle pH'yı düşürmeleri, rekabetçi olarak davranmaları ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üretmeleri nedeniyle gıda muhafazasında çok fazla yararlanılan mikroorganizmalardır (Sorensen,1994).

Teknik kalitedeki laktik asit, asitliyi düzenleyici olarak sebze ve deri endüstrisinde kullanılmaktadır. Tekstilde ve gıda alanında ucuz inorganik asitlerle yarışabilmek için düşük maliyette teknik laktik aside ihtiyaç duyulmaktadır (Narayanan et al., 2004).

Laktik asidin kullanıldığı diğer alanlar ise eczacılık ve kozmetiktir. Pek çok losyonun, anti akne zeltilerinin, nemlendiricilerin formülasyonlarında, diyaliz uygulamalarında kullanılmaktadır. Kalsiyum laktat diş rmelerinde ve kalsiyum destekli tedavilerde kullanılmaktadır (Narayanan et al., 2004; Sokullu, 2007).

Laktik asit fermentasyonu bitkisel ürünlerde doğal olarak bulunan siyanojenik glikozitler gibi kimi toksik maddelerin yıkımına da neden olmaktadır. Ayrıca laktik asit fermentasyonu hububatlardaki tanin içeriğinin de azalmasını sağlamaktadır. Bu şekilde hububatların protein içeriğinin sindirilebilirliği ve mineral absorblama özellikleri arttırılmaktadır (Adams and Nout, 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Herhangi bir ilaç kullanmamış ve diş çürüğü tedavisi nedeniyle Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Hastanesi'ne başvurmuş kişiler içinde gönüllü olanlardan işlem öncesi ağız içi dental plaklarından steril pamuklu eküvyonlar ile kazınarak alınan örnekler, bekletilmeden içlerinde steril 1 ml MRS (Man, Rogosa and Sharpe) (Merck) sıvı besiyeri içeren ağız kapaklı tüplere konulmuştur. Tüpler 1 dakika süre ile vorteks (Biosan) ile karıştırıldıktan sonra içlerinden 0,1 ml miktarda alınarak Rogosa agara (Merck) ekim yapılmış ve 37 °C'de 48-72 saat süre %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. Süre bitiminde üreyen kolonilerden morfolojik olarak uyumlu olanlar tek koloni yöntemi ile ayrı Rogosa agar besiyerlerine (Çizelge 3.1) ekilerek saflaştırma prosedürü izlenmiştir.

3.1.2. İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Elde edilen izolatların çalışmanın amacına yönelik olarak laktik asit üretiminde kullanım potansiyelleri araştırılacaktır. İzolatların laktik asit üreticileri için bilinen biyokimyasal özellikleri de belirlenerek seçimi yapacak izolatlar için bir ön bilgi oluşturulmuştur.

Biyokimyasal testler için izolatların üretiminde Rogosa Agar (MERCK) kullanılmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Rogosa agar besiyeri içeriği.

Rogosa Agar İçeriği	Miktar
Kazein pepton	10,0 g
Maya özütü	5,0 g
Glukoz D(+)	20,0 g
Amonyum sitrate	2,0 g
Tween 80	1,0 ml
Sodyum asetat	5,0 g
Magnezyum sülfat	0,575 g
Demir sülfat	0,034 g
Mangan sülfat	0,12 g
Agar	15,0 g

Besiyeri 1000 ml suda çözülerek otoklavda 121 °C 15 dakika süre bekletilerek steril edildikten sonra aseptik koşullarda steril petrilere dökülmüştür.

Çizelge 3.2. MRS Sıvı besiyeri içeriği.

MRS Sıvı Besiyeri Borth İçeriği	Miktar
Kazein pepton	10,0 g
Et ekstratı	8,0 g
Maya özütü	4,0 g
Glukoz D(+)	20,0 g
Di potasyum hidrojen fosfat	2,0 g
Sodyum asetat	5,0 g
Di-amonyum hidrojen sitrat	2,0 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Mangan sülfat	0,04 g
Distile H ₂ O	1000 ml
Tween 80	1,0 ml

3.1.2.1. Gram boyama

Laktik asit bakterileri izolatlarının MRS agarda geliştirilmiş 18-24 saatlik genç kültürlerinin Gram boyamaları yapılmıştır. Gram pozitif ve basil olan izolatlar seçilmiştir (Temiz, 2000; Tamer ve ark., 1989).

3.1.2.2. Katalaz testi

Laktik asit bakterileri izolatları MRS agarda geliştirilmiş aktif kültürler üzerine %3 hidrojen peroksit damlatılarak gaz kabarcıkları çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Katalaz negatif olan izolatlar seçilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

3.1.2.3. Tuz toleransı

Laktik asit bakterileri izolatları %6,5 NaCl eklenmiş MRS brothta 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Besiyerinde üreme gösteren izolatlar seçilmiştir (Mugula et al., 2003).

3.1.2.4. Glukozdan CO₂ üretimi

MRS broth bulunan tüplere Durham tüpleri koyularak CO₂ oluşumu gözlenmiştir. CO₂ oluşturan izolatlar seçilmiştir (Sneath et al., 1986).

3.2 Mikroorganizmaların Saklanması

Çalışma süresince elde edilen izolatların saklanması için 1,5 ml' lik kapaklı tüplere MRS sıvı besiyerine ve %25 gliserol ilave edilerek, otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre bekletilerek steril edilmiştir. Aseptik koşullarda aktif bakteri hücreleri bu tüplere eklenmiş ve -20 °C'de saklanmaktadır.

3.3.Kullanılan Diğer Kimyasallar

p- Fenilfenol çözeltisi (%1.5 ağırlık/hacim): 1,5 g p-fenilfenol tartılarak bir miktar %95' lik etil alkolde (hacim/hacim) çözdürülmüştür. Ardından yine %95'lik etil alkolle (hacim/hacim) 100 ml' lik hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4 °C' de saklanmıştır.

Bakır sülfat çözeltisi (%4.0 ağırlık/hacim): 4,0 g CuSO₄ tartılarak bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra distile suyla 100 ml hacime tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti +4 °C' de saklanmıştır.

Derişik sülfürik asit: % 95-98 saflıktaki H₂SO₄ kullanılmıştır.

3.4. İzolatların Laktik Asit Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

Sunulan tez çalışması kapsamında izolasyonları 3.1.'de anlatıldığı biçimde gerçekleştirilen 49 izolatın laktik asit üretme yeteneklerini belirleyebilmek için bir tarama çalışması yapılmıştır. Bu amaçla izolatlar MRS sıvı besiyerinde geliştirmiştir. MRS sıvı besiyeri ticari olarak temin edilmiştir. Çizelge 3.2'de bu hazır besiyerinin içeriği verilmektedir. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri, otoklavda 121 °C 15 dakika süre ile bekletilerek steril edilmiştir.

MRS besiyerinde 37 °C’de 24 saat süre ile %5 CO₂ içeren inkübatörde statik koşullarda üretilen izolatlar aşı kültür olarak kullanılmıştır. Laktik asit üretim ortamı içeriği Çizelge 3.3’de verilmektedir. MRS sıvı besiyerinde geliştirilen kültürlerden 0,1 ml alınarak (McFarland 0,5) laktik asit üretim ortamına aktarılmıştır. CO₂ ‘li etüvde %5 CO₂ konsantrasyonunda 42 °C sıcaklıkta 24 saat, statik koşullarda inkübasyon sonrası spektrofotometrede laktik asit ölçümü yapılmıştır.

Çizelge 3.3 : Laktik asit üretiminde kullanılan ortam içeriği.

Kazein pepton	10,0 g
Et ekstratı	8,0 g
Maya özütü	4,0 g
Glukoz D(+)	50,0 g
Tween 80	1,0 ml
Di potasyum hidrojen fosfat	2,0 g
Sodyum asetat	5,0 g
Di amonyum hidrojen sitrat	2,0 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Mangan sülfat	0,04 g
CaCO ₃ *	25,0 g
Distile su	1000 ml

* CaCO₃ ayrı olarak steril edilip ortama sonradan eklenmiştir.

pH değeri 1 M’lık NaOH ile 6.0’ya ayarlanmıştır.

3.5. Laktik Asit Ölçüm Yöntemi

Üretilen laktik asit miktarının belirlenmesi için Taylor (1996)’ın önerdiği kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Standart eğri için 0-30 µg/ml (5 µg artışlarla)

laktik asit çözeltileri kullanılmıştır. H_2SO_4 (6 ml) bulunan tüplere 1 ml laktik asit çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Asit miktarı burada %82 olarak belirlenmiştir. Karıştırılan çözelti 95-100 °C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Tüpler bu işlemten sonra oda sıcaklığındaki su banyosuna alınmıştır. Oda sıcaklığına gelen solüsyona 100 µl $CuSO_4$ ve 200 µl p-fenilfenol eklenerek karıştırılmıştır. Karıştırılan çözeltiler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 570 nm dalga boyunda Shimadzu 2550 UV-visible spektrofotometrede okunmuştur (Madrid et al., 1999).

3.6. Laktik Asit Üretimi İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi

İzolatların laktik asit üretim yeteneklerinin belirlenmesi için yapılan tarama çalışmasının sonuçlarına göre seçilen izolatların laktik asit üretimi için en uygun koşullar araştırılmıştır. Tarama çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, yüksek miktarda üretim yapan bir izolat ile nispeten daha az seviyede üretim yapan başka bir izolat seçilmiştir. Burada amaç yüksek üretim yeteneğine sahip olan izolatın daha verimli bir biçimde laktik asit üretebilmesi için gerekli koşulların belirlenebilmesidir. Ayrıca, optimizasyon çalışmalarında seçilen parametrelerin etkinliğini görebilmek için daha az üretim yeteneğinde olan diğer izolat için de optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Laktik asit üretim yeteneklerinin belirlenmesi için 3.5'de belirtildiği biçimde tarama çalışması yapılan 49 izolat arasından 28 numaralı izolat en yüksek üretim yeteneğine sahip ve 73 numaralı izolat ise daha düşük üretim yeteneğine sahip olduğu belirlenen izolat olarak seçilmiştir.

En uygun laktik asit üretimi koşullarını belirleyebilmek için karbon kaynağı, karbon kaynağı miktarı, azot kaynağı, azot kaynağı miktarı, inkübasyon sıcaklığı, inokulum miktarı ve inkübasyon süresi çalışılmıştır.

3.6.1. Karbon kaynağının laktik asit üretimine etkisi

Bu çalışmada karbon kaynağının etkisini belirlemek için glukoz, laktoz, ksiloz ve sükroz karbon kaynağı olarak denenmiştir. Çalışma deney tüplerinde, 5 ml hacimde pH 6.0'da 50 g/l karbon kaynağı olacak şekilde, 25 g/l CaCO₃ ilave edilerek yapılmıştır. CO₂'li etüvde %5 CO₂ konsantrasyonunda 42 °C' de 24 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda laktik asit ölçümü yapılmıştır. Kontrol grubu olarak bakteri inokülasyonu yapılmayan besiyeri kullanılmış diğer koşullar sabit tutulmuştur.

3.6.2. Karbon miktarının laktik asit üretimine etkisi

3.6.1. de yapılan çalışmanın sonucuna göre karbon kaynağı sükroz olarak seçilmiştir. Karbon kaynağının etkisini belirleyebilmek için, 25-50-75-100 g/l sükroz miktarları çalışılmıştır. Çalışma deney tüplerinde, 5 ml hacimde pH 6.0 'da 25 g/l CaCO₃ ilave edilerek yapılmıştır. CO₂'li etüvde %5 CO₂ konsantrasyonunda 42 °C' de 24 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda laktik asit ölçümü yapılmıştır. Kontrol grubu olarak bakteri inokülasyonu yapılmayan besiyeri kullanılmış diğer koşullar sabit tutulmuştur.

3.6.3. Azot kaynağının laktik asit üretimine etkisi

Azot kaynağının etkisini belirlemek için NH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄ ve di-amonyum hidrojen sitrat ve maya özütü azot kaynakları olarak denenmiştir. Laktik asit üretim ortamında maya özütü besiyeri içeriği olarak bulunmaktadır (Çizelge 3.3). Maya özütü dışındaki diğer azot kaynaklarının etkisini araştırırken besiyerinde maya özütü de kullanılmıştır. Maya özütü ile yapılan denemelerde ise başka bir azot kaynağı kullanılmamıştır. Çalışma deney tüplerinde, 5 ml hacimde

pH 6.0'da 50 g/l sükröz ve 25 g/l CaCO₃ ilave edilerek yapılmıştır. CO₂'li etüvde %5 CO₂ konsantrasyonunda 42 °C' de 24 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda laktik asit ölçümü yapılmıştır. Kontrol grubu olarak bakteri inokülasyonu yapılmayan besiyeri kullanılmış diğer koşullar sabit tutulmuştur.

3.6.4. Azot miktarının laktik asit üretimine etkisi

3.6.3.'de yapılan çalışmanın sonucuna göre azot kaynağı di-amonyum hidrojen sitrat olarak belirlenmiştir. 1,2,4,6,8 g/l di-amonyum hidrojen sitrat miktarları çalışılmıştır. Çalışma deney tüplerinde, 5 ml hacimde pH 6.0'da 50 g/l sükröz ve 25 g/l CaCO₃ ilave edilerek yapılmıştır. CO₂'li etüvde %5 CO₂ konsantrasyonunda 42 °C' de 24 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda laktik asit ölçümü yapılmıştır. Kontrol grubu olarak bakteri inokülasyonu yapılmayan besiyeri kullanılmış diğer koşullar sabit tutulmuştur.

3.6.5. İnkübasyon sıcaklığının laktik asit üretimine etkisi

İnkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için 37, 40, 42, 45 °C sıcaklıkları çalışılmıştır. Çalışma deney tüplerinde, 5 ml hacimde pH 6.0 'da 50 g/l sükröz, 25 g/l CaCO₃, 28 numaralı izolat için belirlenen 8 g/l, 73 numaralı izolat için belirlenen 2 g/l di-amonyum hidrojen sitrat ilave edilerek yapılmıştır. CO₂'li etüvde %5 CO₂ konsantrasyonunda 24 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda laktik asit ölçümü yapılmıştır. Kontrol grubu olarak bakteri inokülasyonu yapılmayan besiyeri kullanılmış diğer koşullar sabit tutulmuştur.

3.6.6. İnokulum miktarının laktik asit üretimine etkisi

İnokulum miktarının etkisini belirlemek için Mc Farland 0,5 standartı ile yoğunluğu ayarlanmış 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 ml bakteri kültürü inokulum miktarı olarak çalışılmıştır. Diğer çalışma koşulları pH 6,0, 50 g/l sükroz, 25 g/l CaCO₃, 28 numaralı izolat için 8 g/l, 73 numaralı izolat için 2 g/l di-amonyum hidrojen sitrat, %5 CO₂ konsantrasyonu, 24 saattir. Kontrol grubu olarak bakteri inokülasyonu yapılmayan besiyeri kullanılmış diğer koşullar sabit tutulmuştur.

3.6.7. İnkübasyon süresinin laktik asit üretimine etkisi

İnkübasyon süresinin laktik asit üretimine etkisini belirlemek için önceki optimizasyon çalışmalarında belirlenen koşullarda 16., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde alınan örneklerin spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbansları belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak bakteri inokülasyonu yapılmayan besiyeri kullanılmış diğer koşullar sabit tutulmuştur.

3.7. İzolatların API Test Kitleriyle Tanımlanması

LAB izolatlarından seçilen iki izolatın çeşitli karbonhidrat kaynaklarını kullanım kabiliyetlerini belirlemek amacıyla API CHL 50 (BioMe'rieux, Fransa) test kitleri kullanılmıştır.

API CHL 50 kitlerinde tanımlanması yapılacak olan LAB, MRS agarda 24 saat süreyle aktifleştirilmiştir. Katı besi ortamında geliştirilmiş olan kültürler öze yardımıyla 5 ml'lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda McFarland 2 yoğunluğunu sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon kitlerdeki kuyucuklara eklenmiştir. Kuyucuklar doldurulduktan sonra yüzeyleri mineral yağ ile kaplanmış ve kapakları kapatılan kitler 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinde 24. ve 48. saatler sonunda kuyucuklarda meydana gelen

renk değişimlerine göre sonuçlar değerlendirilmiştir. API CHL 50 testindeki kuyucuklarda bulunan karbon kaynakları şöyledir: gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, adonitol, inositol, galaktoz, glukoz, fruktoz, mannoz, sorboz, ramnoz, dulcitol, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sukroz, trehaloz, inulin, melezitoz, rafinoz, nişasta, glikojen, ksilitol, gentiobiyoz, D-turanoz, D-lyxose, D-tagatoz, eskulin, α -metil-D-mannosid, α -metil-glukozid, N-asetil-glukozamin, amigidalin, arbutin, D-arabitol, L-arabitol, glukonat, 2-keto-glukonat, 5-keto-glukonat, mannitol, sorbitol, D-fukoz, L-fukoz, b-metil-D-ksilosid.

3.8. Ticari Oral Antiseptiklerin Laktik Asit Bakterilerinin Üremesine Etkisi

Oral mikrobiyatada bulunan laktik asit üreticilerinin önemli bir özelliği de halitosis adı verilen ağız kokusuna neden olmasıdır. Bu nedenle sunulan tez çalışması kapsamında oral mikrobiyatadan izole edilen laktik asit üreticilerine karşı ticari olarak satılan oral antiseptiklerden model seçilen bir örnek ve ağız kokusu giderici olarak seçilen bir örneğin laktik asit üreticileri üzerine antibakteriyal etkinliği araştırılmıştır.

Seçilen izolatlar hazırlanan Rogosa agar besiyerlerine 0,1 ml yayma ekim yöntemi ile ekilmiştir. Piyasadan satın alınan %0,12 oranında kloroheksidin glukonat içeren ağız antiseptiği ve ağız kokusu gidericisinden alınan 0,05 ml örnekler boş antibiyotik disklerine (7,5 mm) emdirilmiştir. Ağız antiseptiği emdirilen, diskler izolatların ekildiği petrilere aseptik koşullarda yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda oluşan zonların çapları ölçülmüştür.

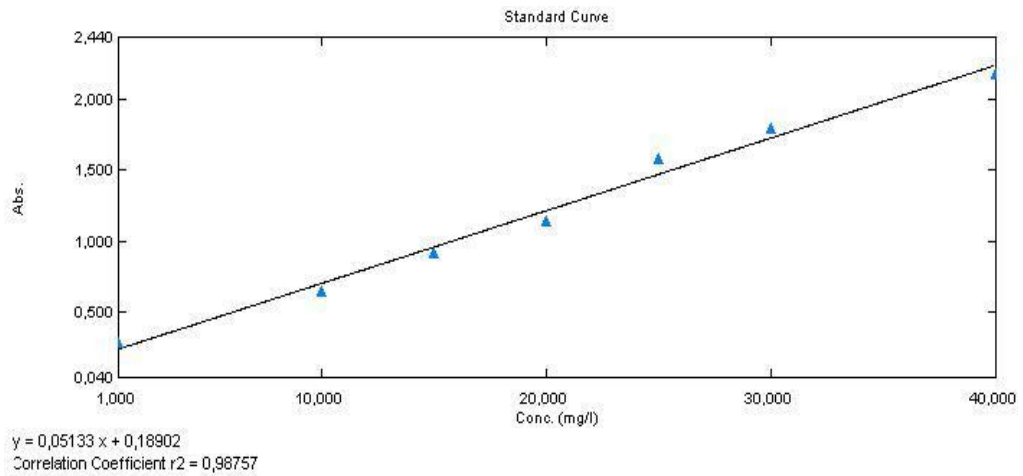
4. BULGULAR

4.1. LAB nin İzolasyonu ve Tanımlanması

3.1.2.'de belirtildiği gibi izolasyonu yapılan izolatların laktik asit bakterilerini tanımlamak için uygulanan gram boyama, katalaz testi, tuz toleransı belileme ve glukozdan CO₂ üretim yetenekleri taranmıştır. Tarama sonucunda elde edilen izolatların Gram (+), katalaz negatif oldukları belirlenmiştir. Ayrıca %6,5 NaCl konsantrasyonuna toleranslarının bulunduğu belirlenmiştir. Seçilen izolatlardan 28 numaralı izolat glukozdan CO₂ oluştururken, 73 numaralı izolat CO₂ üretmemektedir.

4.2. LAB İzolatlarının Laktik Asit Üretim Yetenekleri Açısından Karşılaştırılması

Çizelge 3.3'de belirtilen laktik asit üretim ortamı kullanılarak izolatların laktik asit üretim yetenekleri taranmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Sonuçlara göre 28 ve 73 numaralı izolatlar tez kapsamında yapılacak diğer çalışmalar için seçilmiştir.



Şekil 4.1. Laktik asit ölçüm yönteminde kullanılan standart eğri.

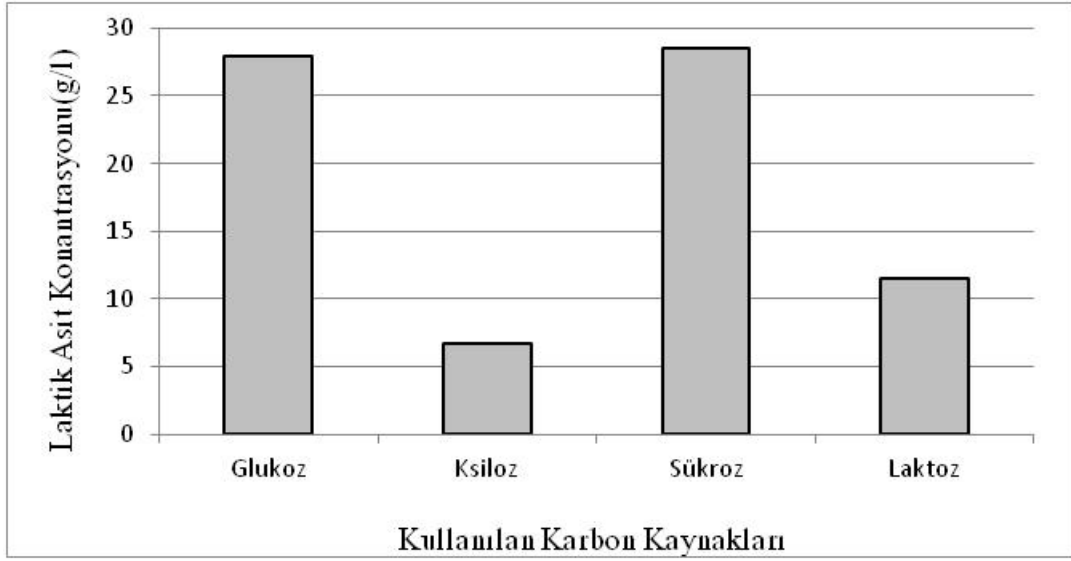
Çizelge 4.1. İzolatların ürettikleri laktik asit miktarı.

İzolot No	Laktik asit (g/l)	İzolot No	Laktik asit (g/l)
1	24,5	41	4,5
3	21,5	42	3,0
4	24,5	44	23,5
5	23,5	46	2,8
6	21,5	49	2,4
7	23,0	52	2,7
11	22,5	56	24,5
15	25,0	58	1,0
16	2,0	59	13,0
17	1,0	60	8,0
18	26,0	61	2,6
19	21,0	63	2,6
20	42,0	66	24,5
21	22,0	67	24,0
22	23,0	68	21,0
25	23,5	71	4,3
26	2,5	72/1	3,4
27	22,0	72/2	12,0
28	27,0	73	15,0
29	25,0	75	16,5
30	13,0	76	22,0
31	4,0	80/1	2,0
33	26,0	80/2	3,0
36	25,0	88	2,4
40	3,3		

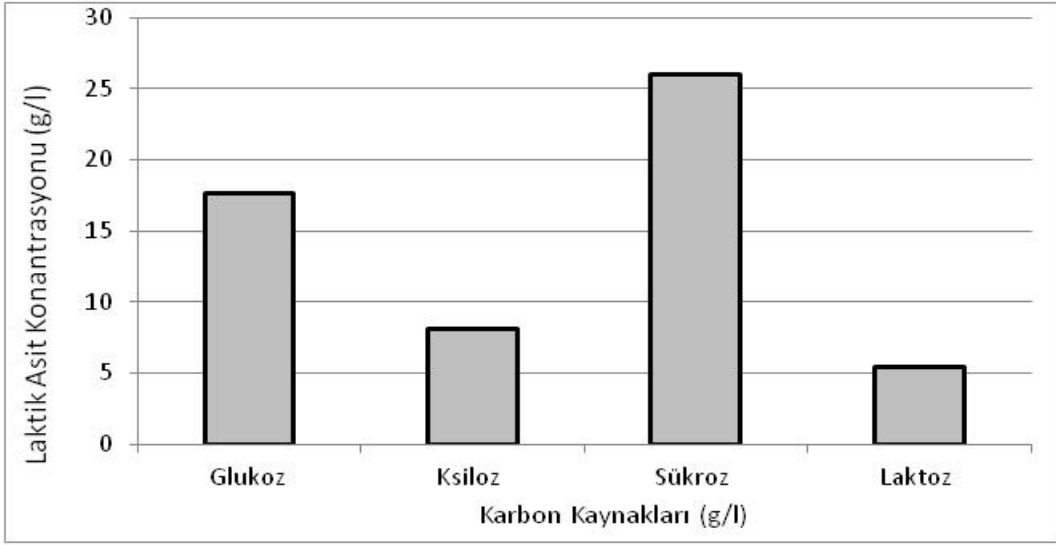
4.3. Laktik Asit Üretimini İyileştirilmesi

4.3.1. Karbon kaynağının laktik asit üretimine etkisi

28 ve 73 numaralı izolatların laktik asit üretimleri farklı karbon kaynakları ile denenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 4.2 ve 4.3’de verilmiştir.



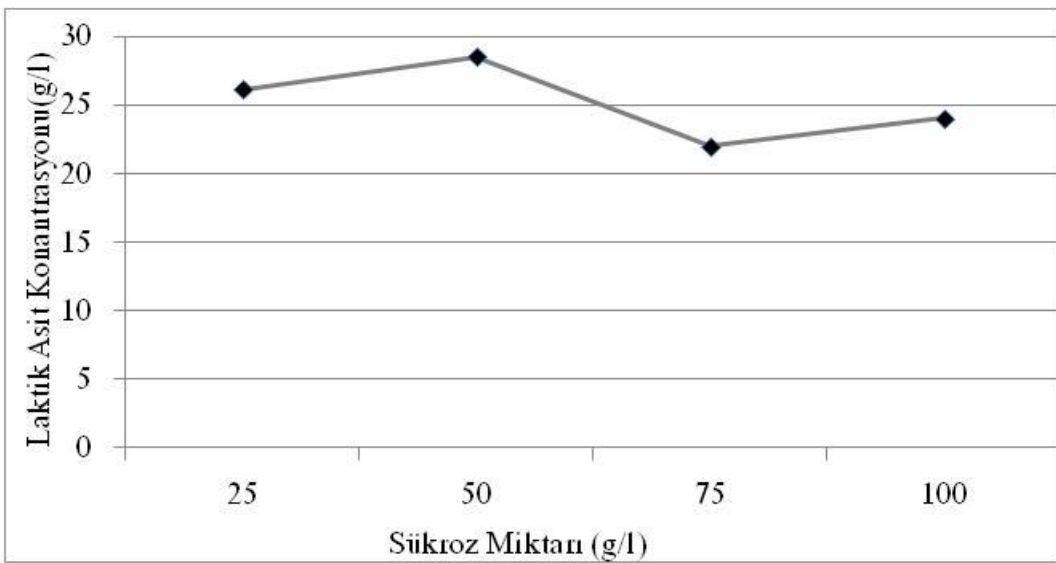
Şekil 4.2. 28 numaralı izolatın farklı karbon kaynakları ile laktik asit üretiminin karşılaştırılması.



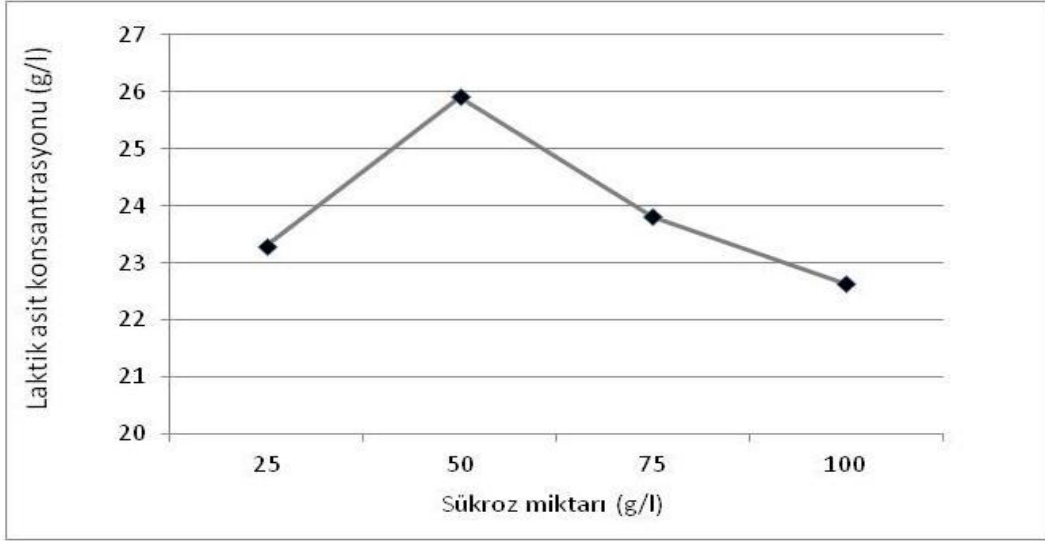
Şekil 4.3. 73 numaralı izolatın farklı karbon kaynakları ile laktik asit üretiminin karşılaştırılması.

4.3.2. Karbon kaynağının miktarının laktik asit üretimine etkisi

Taranan karbon kaynaklarından en uygun olanı seçilmiş ve seçilen karbon kaynağının çeşitli miktarlarının 28 ve 73 numaralı izolatların laktik asit üretimine etkisinin sonuçları Şekil 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.



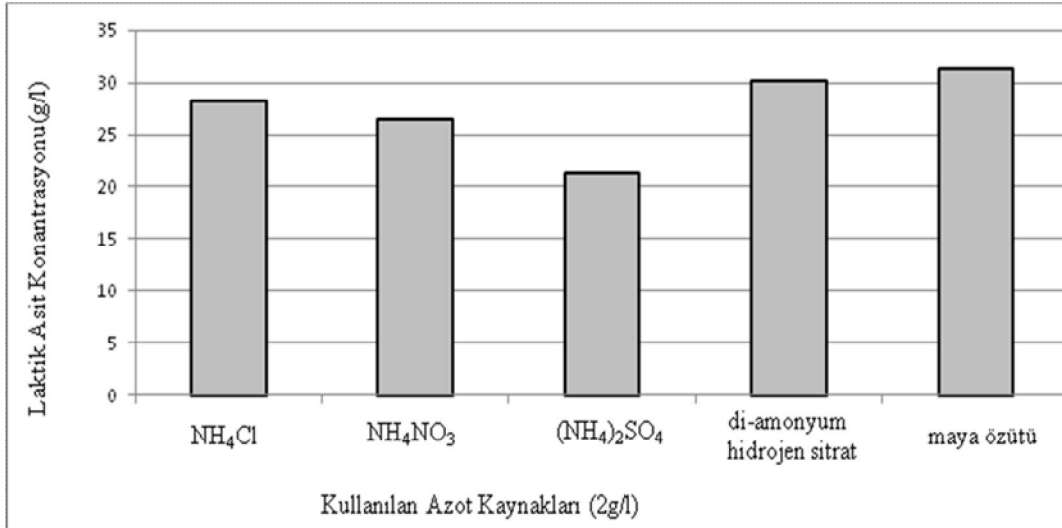
Şekil 4.4. 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine sükroz miktarının etkisi.



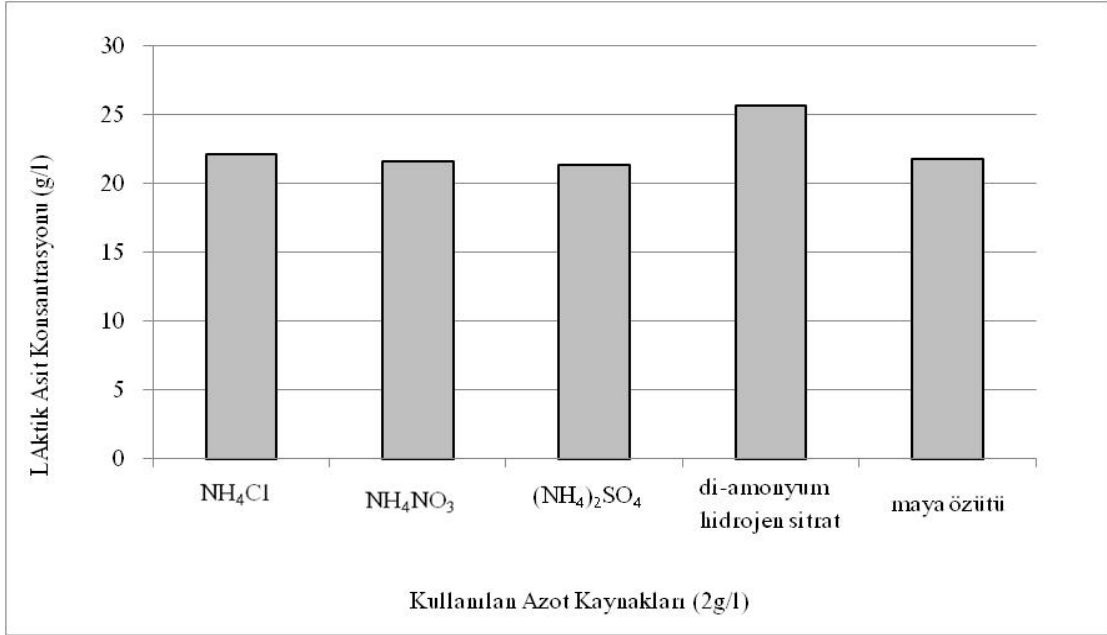
Şekil 4.5. 73 nolu izolatin laktik asit üretimine sükroz miktarının etkisi.

4.3.3. Azot kaynağının laktik asit üretimine etkisi

28 ve 73 numaralı izolatların laktik asit üretimleri farklı azot kaynakları ile denenmiş ve sonuçlar Şekil 4.6 ve 4.7’de verilmiştir.



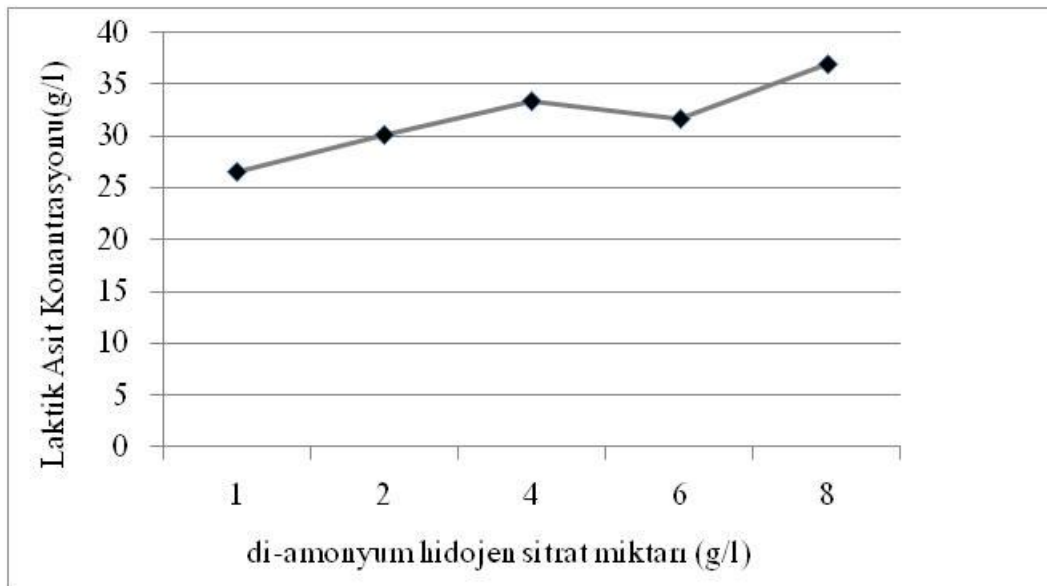
Şekil 4.6. Farklı azot kaynaklarının 28 numaralı izolatin laktik asit üretimine etkisi.



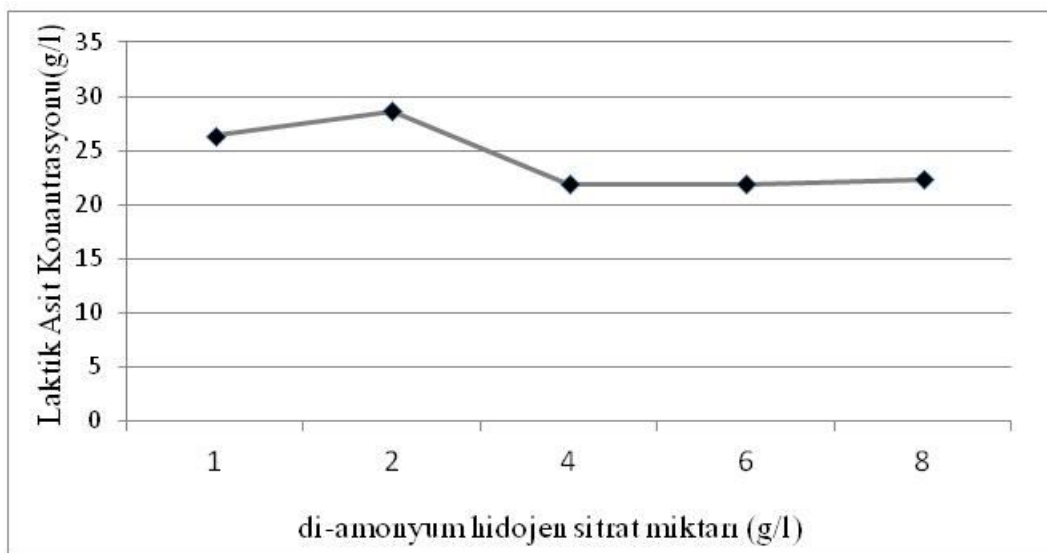
Şekil 4.7. Farklı azot kaynaklarının 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine etkisi.

4.3.4. Azot kaynağının miktarının laktik asit üretimine etkisi

28 ve 73 numaralı izolatların seçilen azot kaynağının farklı miktarları ile laktik asit ölçümü yapılmış, sonuçlar Şekil 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.



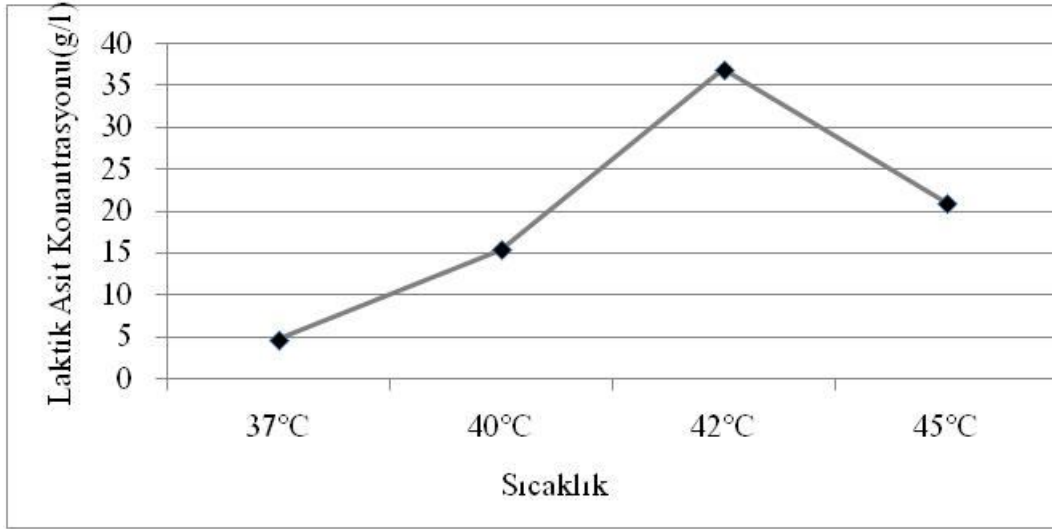
Şekil 4.8. Di-amonyum hidrojen sitrat miktarının 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine etkisi.



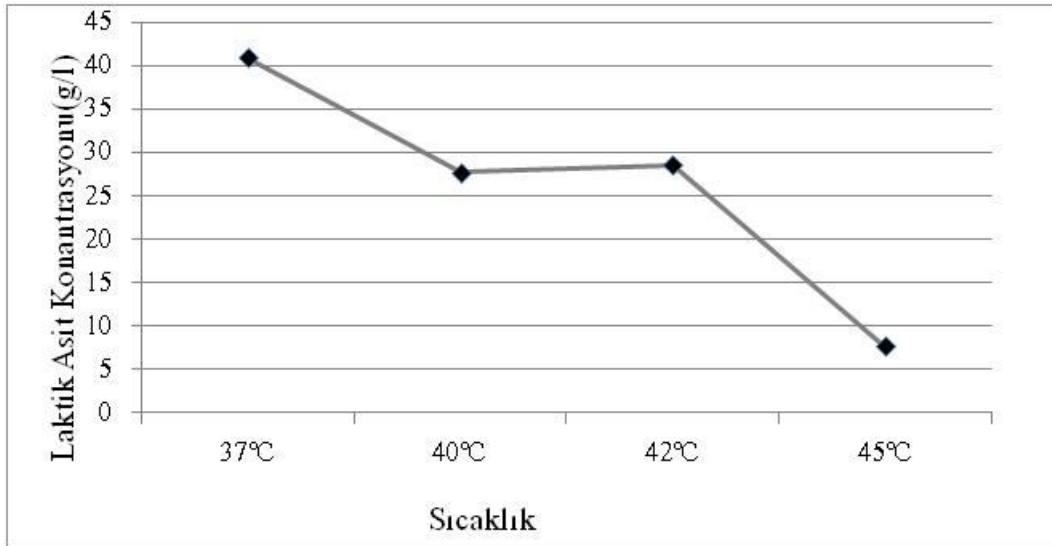
Şekil 4.9. Di-amonyum hidrojen sitrat miktarının 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine etkisi.

4.3.5. İnkübasyon sıcaklığının laktik asit üretimine etkisi

28 ve 73 numaralı izolatların laktik asit üretimleri farklı sıcaklıklarda yapılmış, sonuçlar Şekil 4.10 ve 4.11’de verilmiştir.



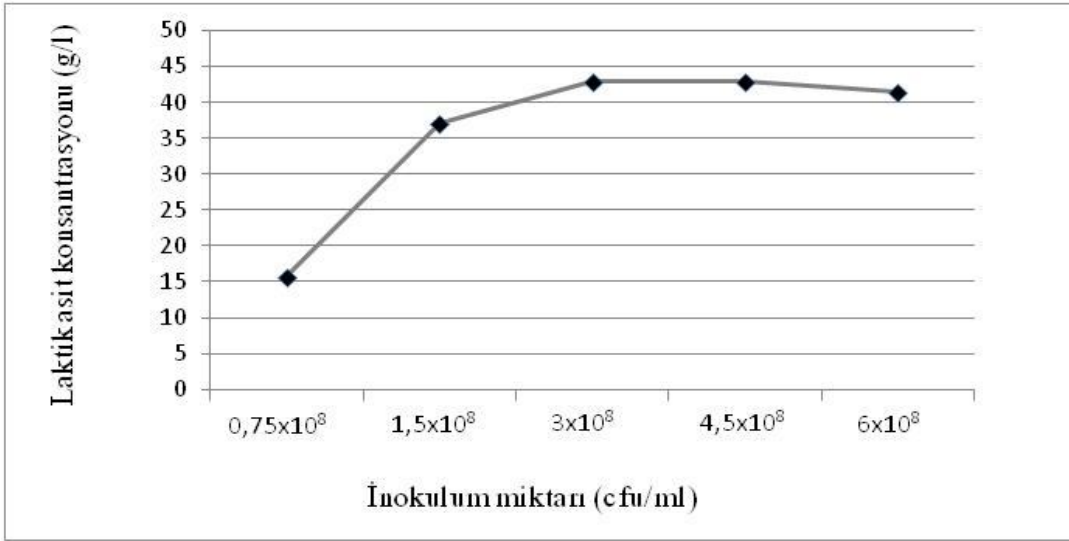
Şekil 4.10. 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine sıcaklığın etkisi.



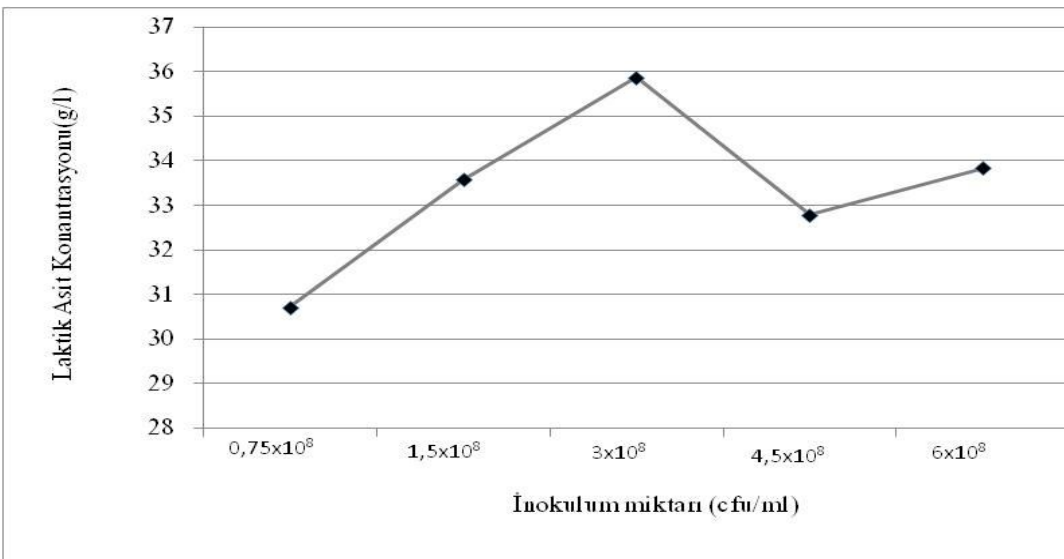
Şekil .4.11. 73 nolu izolatın laktik asit üretimine sıcaklığın etkisi

4.3.6. İnokulum miktarının laktik asit üretimine etkisi

28 ve 73 numaralı izolatların laktik asit üretimleri farklı inokulum miktarlarında yapılmış ve Şekil 4.12 ve 4.13'te verilmiştir.



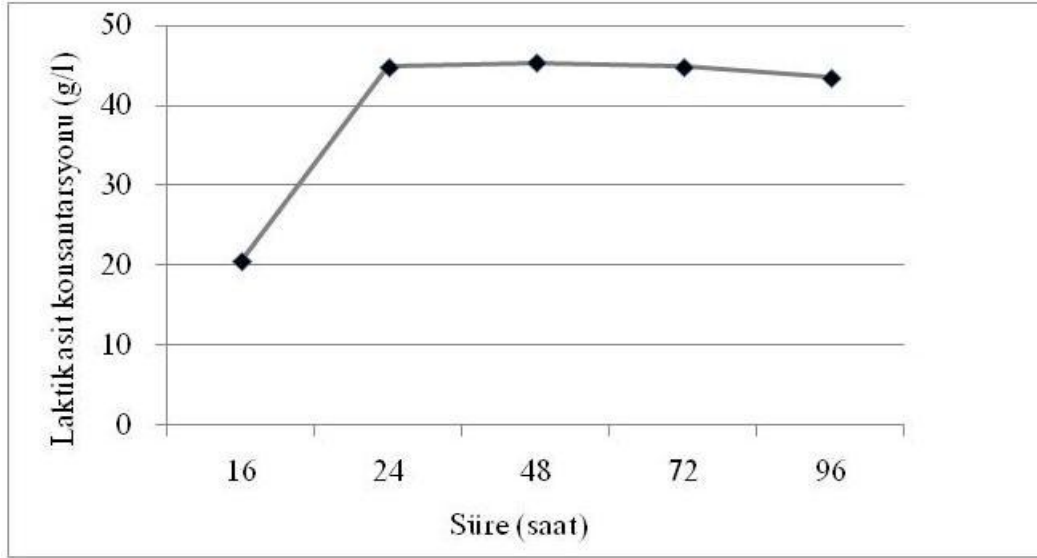
Şekil 4.12. 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine inokulum miktarının etkisi.



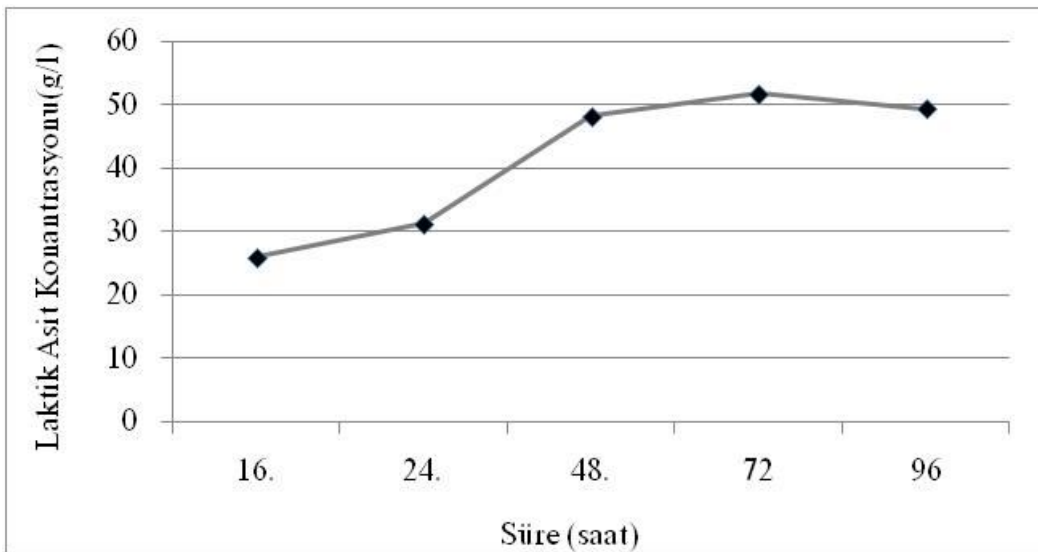
Şekil 4.13. 73 numaralı izolatın laktik asit üretimine inokulum miktarının etkisi.

4.3.7. İnkübasyon süresinin etkisi

28 ve 73 numaralı izolatların laktik asit üretim miktarlarının ölçümleri farklı sürelerde yapılmış ve sonuçları Şekil 4.14 ve 4.15’de verilmiştir.



Şekil 4.14. 28 numaralı izolatın laktik asit üretimine sürenin etkisi.



Şekil 4.15. 73 nolu izolatın laktik asit üretimine sürenin etkisi.

Sonuç olarak, tez çalışmasında kullanılan iki izolatın laktik asit üretim ortam koşullarının iyileştirilmesi sayesinde ürettikleri laktik asit miktarlarında artış olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular Çizelge 4.2’te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Optimizasyon öncesi ve sonrası laktik asit miktarları.

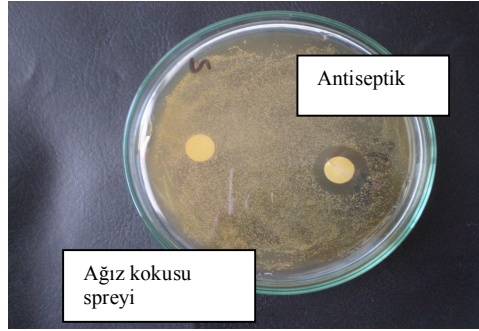
İzolat no	Optimizasyon öncesi laktik asit miktarı (g/l)	Optimizasyon sonrası laktik asit miktarı (g/l)
28	27,0	45,3
73	15,0	51,7

4.4. Ticari Oral Antiseptiklerin Laktik Asit Bakterilerinin Üremesine Etkisi

Oral mikrobiyatadan izole edilen laktik asit üreticilerine karşı ticari olarak satılan oral antiseptiklerden model seçilen 1 örnek ve ağız kokusu giderici olarak seçilen 1 örneğin laktik asit üreticileri üzerine antibakteriyal etkinliği disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’te ve Şekil 4.16 ve 4.17’de verilmektedir.

Çizelge 4.3. Ticari oral antiseptiklerin izolatların gelişimi üzerine etkileri.

İzolat no	Antiseptik (mm)	Ağız kokusu gidericisi (mm)
28	15,81	-
73	16,97	-



Şekil 4.16. Ticari oral antiseptiğin ve ağız kokusu giderici spreyin 28 numaralı izolata etkisi.



Şekil 4.17. Ticari oral antiseptiğin ve ağız kokusu giderici spreyin 73 numaralı izolata etkisi.

4.5. API CHL 50 ve Biyokimyasal Testlerin Sonuçları

Yapılan çalışmada seçilen ve laktik asit üretimleri optimize edilen 28 ve 73 numaralı izolatların sırasıyla *Lactobacillus brevis* ve *Streptococcus sp.* oldukları belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ağız boşluğu, çeşitli nişlerde dağılıma gösteren farklı bir mikrobiyotadan meydana gelmiş olup insan mikrobiyomunun önemli bir parçasıdır. Bu organizmaların çoğu komensalizm gösterirken bu birlikteliği oluşturan bakteriyel komünite dinamiklerindeki değişiklikler, ağız boşluğunda patolojik bulguların ortaya çıkmasına neden olur. Ağız, 700'den fazla türü içinde bulunduran en az 6 milyar bakteriyi bünyesinde barındırmaktadır (Aas et al., 2005). Ancak bu mikroorganizmaların çoğu yeni bakteriyolojik ve moleküler teknikler sayesinde son zamanlarda tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Ağız florası dış çevreye fazlaca bağlı olduğundan mikrobiyal bileşenleri değişken olup dinamik bir yapıya sahiptir. Bu dinamizm ise yaş, diyet, sistemik hastalıklara göre değişkenlik göstermektedir (Rasiah et al., 2005). Ağızdaki besin ile spesifik bağlanma reseptörlerinin varlığının yanı sıra redoks potansiyeli ağız içi bakteriyel kolonizasyonun oluşumuna katkı sağlamaktadır (Samaranayake, 2006a). Fakat ağız boşluğundaki bakteriyel biyofilm komüniteleri genellikle dilin mukozal yüzeyinde, protez gibi yapay yüzeylerde ve diş çatlaklarında bulunmaktadır (Samaranayake, 2006b). Ağız nişi sağlıklıdan hastalıklı duruma geçerken tek bir organizmadan ziyade organizma konsorsiyumundan bahsetmek daha doğru olacaktır. Örneğin periodontal hastalıklardan kronik dişeti iltihabında bu patolojik olgunun etken mikroorganizmaları; *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus milleri*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* spp. olabilmektedir (Parahitayawa et al., 2010).

Ağzın yerli mikroorganizmaları çeşitli yüzeylere afiniteleri açısından önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Ağzın yerli bakterilerinin aksine Lactobacilli grubunun ise dış yüzeyine afiniteleri yoktur ve ağızda çok az sayıda kolonize olmakta, oral mikrofloranın %1'inden az kısmını oluşturmaktadırlar, glikozdan laktik asit ve asetik asit üreten çeşitleri mevcuttur, asidofil ve asidojenik olup Gram (+) fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen basillerdir (Peker, 2007).

Ağız mikrobiyotasında laktik asit üreten bir başka grup da Streptokok grubu bakterilerdir. *Streptococcus*, birçok şekeri fermente ederek organik asit üretir. Glikoz bakteri hücresinin içine alınıp glikoliz yoluyla piruvik asite çevrilir. Streptokoklar, ortamda şekerin fazla bulunduğu durumlarda piruvik asiti laktatdehidrojenaz (LDH) ile laktik asite çevirirler. Laktik asit diş çürüğü oluşumunda en kuvvetli ve en etkili asittir. Glikozun sınırlı miktarda bulunduğu durumlarda piruformat liyaz (PFL) enzimi aracılığı ile formik asit, asetik asit ve etanol üretirler (Marsh et. al., 1996).

Laktik asit D ve L olmak üzere iki optik izomerden oluşmaktadır. Laktik asitin her iki izomerik formu polimerize edilebilmektedir ve kompozisyona bağlı olarak farklı oranlara sahip polimerler üretilebilmektedir. Her yıl dünya genelinde üretilen 80.000 ton laktik asitin yaklaşık %90'ı bakteriyal fermentasyon ile üretilmektedir. Geri kalanı ise laktonitrilin hidrolizi ile sentetik olarak üretilmektedir. Fermentatif üretim seçilen bir laktik asit bakteri izolatının sadece tek bir izomeri üretmesi ve optik olarak saf ürün elde edilmesini sağlayarak avantaj sağlamaktadır, oysaki sentetik üretim her zaman laktik asitin rasemik karışımı ile sonuçlanmaktadır (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000).

Laktik asit bakterileri B vitaminleri ve amino asitleri sentezleme yetenekleri sınırlı olduklarından kompleks besin gereksinimlerine sahiptirler. Bu nedenle bu organizmalar bitki, süt, kefir, insan ve hayvan vücutlarında özellikle mukozal yüzeylerde olduğu gibi besince zengin ortamlarda bulunmaktadır. Kompleks bir doğal çevre mikroorganizmaların birçok farklı karbohidratı metabolize etmesini sağlamaktadır (Viniğra- Gonzalez and Gomez, 1984). Bu tez çalışmasında, besince zengin olan ağız içi boşluğında, diş çürüğüne sahip hastaların tükürüklerinden bakteri izole edilmiş ve bunların laktik asit üretim yetenekleri araştırılmıştır. Taranan 49 izolatın her birinin laktik asit üretim yeteneğine sahip olduğu bulunmuş; ancak bazı izolatların laktik asit üretimi açısından daha yüksek potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Tarama çalışması sonuçlarına göre temsili olarak yüksek miktarda laktik asit üreten izolatlardan biri olan 28 numaralı izolat ile nispeten daha düşük oranda laktik asit üreten 73 numaralı izolat seçilmiş olup deneyin bundan sonraki aşamalarında bu izolatlar kullanılarak optimizasyona tabi tutulmuştur.

Fermentatif laktik asit üretimini önemli ölçüde etkileyen parametreler mikroorganizma türü, karbon ve azot kaynağı ve miktarları, fermentasyon tipi, pH, sıcaklık, inokulum miktarı, inkübasyon süresi olabilmektedir (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000). Yapılan tez çalışmasında seçilen izolatlarla laktik asit üretimi üzerine; karbon kaynağı ve miktarı, azot kaynağı ve miktarı, sıcaklık, inokulum miktarı ve fermentasyon süresinin etkileri değerlendirilmiştir.

Laktik asit bakterileri homo-, hetero- ve karışık asit fermentasyonla sonuçlanan çeşitli yol izleri ile şekerleri fermente ederler (Guo et al., 2010). Karbon kaynağı ve miktarı laktik asit üretiminde kilit role sahiptir. Bazı çalışmalarda hem selüloz hem de hemiselüloz eş zamanlı olarak laktik asit üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılmış ancak bu çalışmalarda selülozun selülaz tarafından hidrolize uğratılması gerekmiştir. Böylelikle selüloz ve hemiselüloz; glukoz ve ksiloz gibi fermente edilebilir monosakkaritlere parçalanabilmiştir (Rivas et al., 2005). Bazı deneysel çalışmalarda da besiortamının ucuz besin ve selülitik enzim içermesine rağmen hemiselülozsuz mısır püskülünden laktik asit üretimi için fermentasyonun yanı sıra bir de sakkarifikasyonla uğraşmak zorunda kalınmıştır (Miura et al., 2004; Rivas et al., 2005). Laktik asit üretiminde karbon kaynağı olarak sükrozun kullanılmasının süreci olumlu yönde etkilediği literatürde bildirilmiştir. Buna istinaden yapılan bir çalışmada 89,93 g/l oranında sükroz kullanıldığında 88,0 g/l miktarında laktik asit elde edilmiştir (Kotzamanidis et al., 2002). Bu tez çalışmasında laktik asit üretimi açısından değerlendirilen karbon kaynakları arasından sükrozun diğer kaynaklara nazaran süreçte daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bulgulara göre her iki laktik asit bakteri izolatu için 50 g/l sükrozun laktik asit üretiminde optimum değer olduğu bulunmuştur. Guo ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise 120 g/l sükroz karbon kaynağı olarak kullanıldığında 72 saatlik bir fermentasyon sonrasında 97,5 g/l laktik asit konsantrasyonu elde edilmiştir (Guo et al., 2010). Yine Bulut ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 50 g/l sükroz kullanarak 21 g/l laktik asit elde etmişlerdir (Bulut et al., 2004). 26 *Rhizopus oryzae* izolatu arasından 100 g/l sükroz içeren besiortamında 10 gün sonrasında sadece ikisi 77,3 g/l'ye kadar laktik asit üretebilmişlerdir (Watanabe and Oda, 2008). Buna karşın sükroza toleranslı *Lactobacillus* sp. izolat FCP2 125 g/l

sükroz içeren ortamda büyütülmüş ve 5 gün sonunda 104 g/l laktik asit üretilmiştir (Timbuntam et al., 2006). Mısır püskülü gibi tarımsal atık olarak da bilinen kaynaklar besi ortamında kullanılıp laktik asit üretim yeteneklerinin değerlendirildiği çalışmalarda bu karbon kaynağının asit hidrolizi ile ön işleme tabi tutularak daha sonrasında da enzimatik hidrolize uğratılması gerekmektedir. Böylelikle selüloz ve hemiselülozdan çeşitli monosakkaritler ortaya çıkacaktır ve bu basit şekerler laktik asite fermente edilebilecektir (Guo et al., 2010). Melas gibi endüstriyel atık olarak bilinen bazı kaynaklar da laktik asit üretim aşamasında karbon ihtiyacını karşılamak için literatürde birçok çalışmada değerlendirilmiştir (Kotzamanidis et al., 2002). Ancak melasın karbon kaynağı olarak kullanılmasından önce ön işleme tabi tutulma ihtiyacı araştırmacıları sükroz, glikoz gibi rafine şekerlerin kullanımına yönlendirmektedir.

Laktik asit bakterilerinin büyümeleri için aminoasit ve vitaminler gerekmektedir, bu nedenle doğru azot kaynağının seçilmesi çok önemlidir. Azot; aminoasit, lipid, enzim kofaktörleri ve diğer maddelerin oluşumu için gereklidir (Wood and Holzapfel, 1995). Fermentasyonla laktik asit sentezi hücre büyümesi ile ilişkili olduğu için büyümeyi teşvik eden azotun, yeterli konsantrasyonda olmaması durumunda ürün oluşumu meydana gelmemektedir (Pritchard and Coolbear, 1993). Diğer yandan yüksek konsantrasyonda azot hücrelerin ölümüne neden olabilmektedir (De Lima et al, 2009). Bu tez çalışmasında laktik asit üretimi açısından NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, di- amonyum hidrojen sitrat ve maya özütü azot kaynakları olarak denenmiştir. 73 no'lu izolat için azot kaynağı olarak di amonyum hidrojen sitrat kullanıldığında açığa çıkan laktik asit konsantrasyonu 25,6 g/l olurken, 28 no'lu izolat için ise azot kaynağı olarak maya özütü kullanıldığında en yüksek laktik asit üretimi gözlenmiş olup bu

değerde 31,3 g/l bulunmuştur. Maya özütü amino asit ve vitamin açısından zengin bir kaynak olduğu için laktik asit üretimini teşvik ettiği düşünülmektedir. Maya özütünün B vitamini açısından zengin bir kaynak olduğu bilinmekte ve laktik asit üretimini de bu nedenle arttırdığı düşünülmektedir (Neklyudov et al., 1993). Maya özütü fermentasyon çalışmalarının bir çoğunda katkı maddesi olarak kullanılsa da yüksek maliyetinden dolayı büyük ölçekli üretimlerde tercih edilmemektedir (Yoo et al., 1997). Ancak laktik asit üretiminde azot kaynağı olarak maya özütü pahalı bir kaynak olacağı düşüncesiyle 28 no'lu izolat içinde yine yüksek laktik asit üretimi sağlayan bir diğer azot kaynağı olan di-amonyum hidrojen sitrat seçilmiştir (Coelho, 2010). Azot kaynağı olarak maya özütü yerine daha ucuz bir kaynak kullanımının tercih edilmesi literatürdeki çalışmalarda da yer almaktadır. Yu ve arkadaşları azot kaynağı olarak kullandıkları mısır şurubunun sadece maya özütünün yerini almakla kalmayıp optimize ortamda laktik asit üretimini arttırdığını bulmuşlardır (Yu et al., 2008). Bu tez çalışmasında azot kaynağı olarak di-amonyum hidrojen sitrat seçilmiş olup 1-8 g/l miktarlarının laktik asit üretimine etkisi değerlendirilmiş ve optimum azot kaynağı miktarı 28 no'lu izolat için 8 g/l, 73 no'lu izolat için 2 g/l bulunmuştur. Bolner de Lima ve arkadaşları laktik asit üretimi ile ilgili yaptıkları çalışmada ise 15 g/l mısır şurubu ve 5 g/l maya otolizatını birlikte kullanmış ve maksimum D(+) laktik asit üretimini 41,42 g/l olarak bulmuştur (Bolner de Lima et al.,2009). Hetenyi ve arkadaşlarının yaptığı deneylerde maya özütü ile 16 g/l gluteni besi ortamına eklediklerinde saatte 3,54 g/l verimliliğini elde etmişlerdir (Hetenyi et al., 2010). Liu ve arkadaşları termofil bir laktik asit üreticisi olan *Lactobacillus plantarum*'u kullanıp çalışmada mısır şurubu, NH₄Cl, NH₄NO₃, di-amin sitrat ve arpa filizi gibi alternatif azot kaynaklarını etkisini değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre 16 g/l arpa filizi ile 12 g/l mısır

şurubunu besi ortamına kattıklarında en yüksek laktik asit üretimini bulabilmişlerdir (Liu et al., 2010).

Laktik asit üretimi üzerine sıcaklığın etkisi önemli bir fiziksel parametre olmasına rağmen bu faktör az sayıda çalışmada değerlendirilmiştir. Genel olarak laktik asit bakterilerini 5-45 °C 'de üreyebildikleri bilinmektedir (Bolner de Lima et al.,2010). Bu nedenle optimum mikrobiyal büyümenin olduğu sıcaklığı belirlemek önem arz etmektedir. Bazı çalışmalarda organizmanın büyüdüğü sıcaklıkla laktik asitin üretiminin optimum sıcaklığı farklı bulunmuştur. 15 °C'de büyüdüğü bilinen *Lactobacillus amylophilus* 'un laktik asit üretimi açısından optimum sıcaklığı 35 °C bulunmuştur (Yumoto and Ikeda,1995). Bu tez çalışmasında seçtiğimiz 28 numaralı izolat için optimum üreme sıcaklığı 37 °C iken laktik asit üretimi için optimum sıcaklık 42 °C olarak belirlenmiştir. 73 numaralı izolat için üreme ve laktik asit üretim sıcaklığının optimum değeri 37 °C olarak belirlenmiştir. Bolner de Lima ve arkadaşlarının bir *Lactobacillus* türü ile yaptıkları bir çalışmada optimum sıcaklık olarak 39,6 °C bulunmuş ve maksimum laktik asit üretimi de bu sıcaklıkta üretilen bakteri ile yapılmış, 52,37 g/l laktik asit üretimi bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise termofilik amilolitik olan *Lactobacillus amylovorus* 'un laktik asit üretim yeteneği 30-50 °C arasında değerlendirilmiş, 30-45 °C aralığında giderek artan bir laktik asit profili gözlenmiş, 50 °C ise hızla azalışa geçmiştir (Trontel, 2010).

Laktik asit üretimini etkileyen faktörlerden bir tanesi de inokulum miktarıdır. İnokulum miktarı substrat olarak şekerin kullanılmasına olanak sağlamaktadır, inokulum miktarı arttıkça oligosakkarit düşüşü de hızlanmaktadır. Böylelikle de ortaya

çıkan laktik asit miktarı artmaktadır. Yüksek inokulum miktarı oligosakkarit tüketimini hızlandırmış, indirgen şeker konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Bunun yanı sıra artan inokulum miktarı fermentasyon süresini de kısaltmıştır (Ye et al., 2008). Bu tez çalışmasında $0,75 \times 10^8$ - 6×10^8 arasındaki CFU/ml hücre yoğunlukları denenerek laktik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda; 28 no'lu izolat için $4,5 \times 10^8$, 73 no'lu izolat için de 3×10^8 bulguları elde edilmiştir. Gupta ve arkadaşları laktik asit fermentasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada inokulum miktarı olarak $1,8 \times 10^9$ - $3,02 \times 10^{10}$ arasında değişen başlangıç hücre konsantrasyonuna sahip bakteri kültürü kullanmışlardır. 8 saatlik fermentasyon süresi sonunda $3,02 \times 10^{10}$ hücre yoğunluğuna sahip bakteri kültürü ile yapılan inokulumda laktik asit üretimi açısından azalma başlamıştır.

Laktik asit üretiminde bir diğer önemli parametre inkübasyon süresinin etkisidir. Bustos ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 20., 31., 44., 52., 96. saatlerde sonlandırılan fermentasyon sürelerinde laktik asit miktarları ölçülmüş, maksimum laktik asit konsantrasyonu 58,9 g/l bulunmuş ve bunu 96.saatte gerçekleştirmişlerdir. Yaptığımız tez çalışmasında 16., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde fermentasyonu sonlandırarak laktik asit ölçümü yapılmıştır. Bu sonuçlara göre her iki izolatımızda laktik asit üretimlerinde 72. saate kadar olan ölçümlerde laktik asit miktarında bir artış, 72. saatten sonra ise laktik asit miktarında sabit sonuçlar elde edilmiştir.

Laktik asit üretiminde kullanılan fermentasyon tipi de önemlidir. Genellikle kesikli üretimler tercih edilirken sürekli kültür örnekleri de literatürde mevcuttur. Kesikli ve sürekli fermentasyon türleri karşılaştırıldığında, bir çok çalışmada, kesikli

fermentasyon daha yüksek laktik asit konsantrasyonu elde edilmesini sağlamıştır (Hoshino et al., 1991). Kesikli modda bütün substrat kullanılırken sürekli fermentasyonda rezidual konsantrasyon kalmaktadır. Kesikli fermentasyonda daha yüksek laktik asit üretilme sebebi bu olabilir. Yapılan bu tez çalışmasında ise kesikli fermentasyon kullanılmıştır.

Tween 80 laktik asit üretiminde önemli bir bileşendir. Tween 80'in fermentasyon ortamına eklenmesi laktik asit üreten bakterilerin büyümesi ve dolayısıyla laktik asit üretimini arttırmaktadır. Laktik asit mikroorganizmaları Tween 80'i esansiyel büyüme faktörlerinden doymamış yağ asidi olarak kullanmaktadır (Oh et al., 1995; Belhocine ,1987). Diğer yandan yüksek konsantrasyonda Tween 80 (%1.6 v/v'nin üzeri) laktik asit üretimini azaltabilmektedir. Bunun nedeni sürfektan olarak bilinen Tween 80'nin hücre membranındaki lipitleri çözmesi, membran yapısına zarar vermesi ve daha sonra hücre ölümüne neden olmasından dolayı olabilir (Ben-Kun et al., 2009). Bu tez çalışmasında ise Tween 80, 1 ml/l olacak oranda kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız besiyeri bileşenlerinden biri de $MnSO_4$ 'tır. Mn^{2+} , laktat dehidrogenaz aktivitesini arttırdığı için, $MnSO_4$ laktik asit üretimi için önemli bir bileşendir (Büyükkileci ve Harsa, 2004; Fitzpatrick et al., 2001). Besi yeri ortamına çalışma boyunca 0,04g/l $MnSO_4$ eklenmiştir.

$CaCO_3$, laktik asit fermentasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu bileşenin besi ortamını tamponladığı bilinmektedir. Laktik asit üretimi esnasında $CaCO_3$, kalsiyum laktata dönüşmektedir ve böylelikle ortamı nötr pH'da tutmaktadır. Bu

çalışma boyunca %2,5 (w/v) CaCO₃ kullanılmıştır. Bolner de Lima ve arkadaşları yaptıkları çalışmada üretim ortamında %10 (w/v)'un üzerindeki CaCO₃'ün bakteriyel büyümeyi olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (Bolner de Lima et al., 2009). Kotzamanidis ve arkadaşlarının yaptıkları melastan laktik asit üretimi çalışmasında laktik asit üretimi üzerine CaCO₃ konsantrasyonunun etkisi değerlendirilmiş ve buna göre %5 (w/v) e kadar olan CaCO₃ konsantrasyonlarında giderek artan laktik asit üretimi sergilenmiştir. %5 ile %7 (w/v) CaCO₃ konsantrasyonunda laktik asit miktarı sabit kalmış, bu değerden sonra azalma göstermiştir. %7 (w/v)'den fazla CaCO₃'nin besi ortamına eklenmesiyle gelişen laktik asit üretimindeki azalma, laktik asitin biyosentezinden sorumlu enzim aktivitelerinin inhibisyonundan kaynaklanabilir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonda CaCO₃ mikroorganizma büyümesini inhibe etmektedir (Kotzamanidis et al., 2002).

Seçilen izolatlarla laktik asit optimizasyonu sonrasında, piyasada bulunan antiseptik solüsyonların ağız mikrobiyotasındaki laktik asit üreten bakteriler üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla etken maddesi klorheksidin olan ve piyasada satılan bir antiseptik solüsyonu steril disklere emdirilip bakteri izolatlarının bulunduğu besiyerlerine yerleştirilmiş, böylelikle antiseptiğin antimikrobiyal özelliği incelenmiştir. Bu etken madde katyonik özelliğinden dolayı oral mukozaya ve diş yüzeylerine adezyon göstermektedir (Bonesvoll et al., 1974). Klorheksidini diğer antiseptiklerden ayıran en önemli özelliği, ağız boşluğuna uygulandığında dokulara tutunarak uzun süreli salınım profiline sahip olmasıdır. Bu şekilde antiseptik etkinliği artmaktadır (Aktaş, 2005). Bu şekilde gerçekleştirilen disk difüzyon yöntemine göre, elde edilen inhibisyon

zon ölçümleri; 28 no'lu izolat için 15,81 mm olurken 73 no'lu izolat için ise 16,97 mm olmuştur.

Laktik asit birçok endüstriyel dalda kullanım alanına sahip önemli bir madde olup mikrobiyal fermentasyon ya da kimyasal sentez yoluyla üretilmektedir. Fermentatif üretim kimyasal üretime tercih edilirken üretim aşamasında ayırma ve saflaştırma gibi problemler de beraberinde gelmektedir. Bu sorunların üstesinden bazı konfigürasyon üniteleri önerilerek gelinip verimli ve ekonomik bir laktik asit üretimi hedeflenmektedir. Bu bağlamda laktik asit üretimi açısından etkin mikroorganizmaların muhtelif ortamlardan izole edilmesi ve organizmanın büyütüldüğü besiortamının laktik asit üretimi açısından optimize edilmesi ilk aşamada büyük avantaj sağlayacaktır. Böylelikle seçilen izolatın laktik asit üretimi konusunda endüstriyel bir suş olabileceği, durumu daha da çarpıcı hale getirmektedir. Bu tez çalışmasında diş çürüğüne sahip hastaların tükürüklerinden izole edilen mikroorganizmaların laktik asit üretim yetenekleri değerlendirilmiş ve bu yönde etkin izolatlar seçilip üretim ortamları optimize edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen veriler literatürle kıyaslandığında umut vaat edicidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Aas, J.A., Paster, B.J. and Stokes L.N., 2005, Defining the normal bacterial flora of the oral cavity, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5721–5732 p.

Abdel-Naby, M., Mok, C. and Lee, C., 1992, Production of organic acids from enzymatic hydrolyzate of starch by immobilized lactic acid bacteria, *UNIDO Proceedings*, 227-243 p.

Adam, M.R. and Nout, M.J.R., 2001, Fermentation and food safety, *Practical Applications: Prospects and Pitfalls*, 400, 254-255 p.

Aktaş, A., 2005, %0,2 klorheksidin diğlukonat gargara ile 30 mg klorheksidin di asetat yüklenmiş bukkoadeziv tabletin oral flora üzerine etkilerinin klinik ve mikrobiyolojik olarak incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, doktora tezi.

Balakrishnan, M., Simmonds, S. R. and Tagg J. R., 2000, Dental caries is a preventable infectious disease, *Australian Dental Journal*, 45, 235-245 p.

Bayar, S., 2007, Süt örneklerinden *Staphylacoccus* ve *Streptococcus* türlerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi, Kahramanmaraş Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, yüksek lisans tezi.

Belhocine, D., 1987, Investigation on lactose valorization by lactic acid fermentation, PhD dissertation, Universty of Rennes I, France.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Ben-Kun, Q., Ri-Sheng, Y., Min, L. and Sheng-Song, D., 2009, Effect of Tween 80 on production of lactic acid by *Lactobacillus casei*, Songklanakarın J. Sci. Technol. 31, 85–89 p.

Bilgehan, H., 2002, Klinik mikrobiyolojik tanı, Barış Yay Fakülteler Kitapevi, 3. baskı, İzmir.

Bolner de Lima, C.J., Coelho, L.H. and Contiero, J., 2010, The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and ph control, Food Technology and Biotechnology, 48,175-181 p.

Bolner de Lima, C.J., Coelho, L.H., Bilanco, K.C. and Contiero, J., 2009, Response surface optimization of D(-)-lactic acid production from *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as nitrogen sources, African Journal of Food Science, 3, 257-261 p.

Bonesvoll, P., Lökken, P. and Rölla, G., 1974, Influence of concentration, t,me, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses, Archives of Oral Biology, 19, 1025-1028 p.

Boyar, R.M. and Bowden, G.H., 1985, The microflora associated with the progression of incipient carious lesions in teeth of children living in a water fluoridated area, Caries Research, 19, 298-306 p.

Brock, T.D. and Madigan, M.T., 1991, Biology of microorganisms, prentice hall, Englewood Ciffs, New Jersey, 847 p.

Bulut, S., Elibol, M. ve Özer, D., 2004, Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*, Biochemical Engineering Journal, 21(1), 33–37 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Bustos, G., Moldes, A.B., Alonso, J.L. and Vazquez, M., 2004, Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology, Food Microbiology, 21, 143-148 p.

Büyükkileci, A.O. ve Harsa, S., 2004, Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441), Journal of Chemical Technology Biotechnology, 79, 1036–1040 p.

Carlsson, J., Grahnen, H. and Jonsson G., 1975, Lactobacilli and Streptococci in the mouth of children. Caries Research, 9, 333-339 p.

Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M.G., 1988, Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*, Journal of Food Protection, 52 (9), 614-617 p.

Celini, L., Allocati, N., Piatelli, A., Petrelli, I. And Dainelli, B., 1995, Microbiological evidence of *Helicobacter pylori* from dental plaque in dyspeptic patients, New Microbiologica, 18, 187-192 p.

Cengiz, A.T. 2004, Tıp ve Dişhekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ,Güneş Kitapevi ltd, Ankara.

Coelho, L.F., 2010, Improvement of L (+) – lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B103, Journal of the Science of Food and Agriculture, 90,1944-1950 p.

Daeschel, M.A., 1989, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, Food Technology, January, 164-167 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Dajani, A.S., Taubert, K.A., Wilson, W., Bolger, A.F., Bayer, A., Ferrieri, P., Gewitz, M.H., Shulman, S.T., Nouri, S., Newburger, J.W., Hutto, C., Pallasch, T.J., Gage, T.W., Levison, M.E., Peter, G. and Zuccaro, G., 1997, Prevention of bacterial endocarditis, Recommendations by the American Heart Association., JAMA, 277, 1794-1801 p.

Davies, G.E., Francis, J., Martin, A.R., Rose, F.L. and Swain, G., 1954, 1:6-di-4 chlorophenyldiguanidoheksane (Hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency, British Journal of Pharmacology, 9,192-196 p.

Denton, G.W., 1991, Chlorhexidine, Disinfection, sterilization and preservation, 4. ed., Le and Febiger, Philadelphia, 274-289 p.

Drinan, D.F., Tobin, S. and Cogan, T.M., 1976, Citric acid metabolism in hetero and heterofermentative lactic acid bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 31(4), 481-486 p.

Eldeleklioğlu, B., 2009, Peynir altı suyundan laktik asit üretimi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, yüksek lisans tezi.

Ellepola, A.N.B. and Samaranayake, L.P., 2001, Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review, Oral Diseases, 7, 11-17 p.

Fitzpatrick, J.J., Ahrens, M. and Smith, S., 2001, Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate, Process Biochemistry, 36, 671-675 p.

Fitzsimmons, N. and Berry, D.R., 1994, Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: Evidence for the involvement of a peroxidase system, Microbios, 80, 125-133 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Göksungur, Y., 1998, Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu, doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 155 s.

Grönroos, L., 2000, Quantitative and qualitative characterization of mutans Streptococci in Saliva and in the Dentition, Department of Pedodontics and Orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital, Academic Dissertation.

Gündüz, A., 2010, Model sistemlerde laktik asit bakterileri (*Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactococcus lactis*) üzerine stress faktörlerin etkisinin belirlenmesi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, yüksek lisans tezi.

Guo, J.H., Jia R., Fan, M.W., Bian, Z., Chen, Z. and Peng, B., 2004, Construction and immunogenic characterization of a fusion anti-caries vaccine against pac and glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*, Journal of Dental Research, 83, 266-270 p.

Guo, Y., Yan, Q., Jiang, Z., Teng, C. and Wang, X., 2010, Efficient production of lactic acid from sucrose and corncob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 37, 1137–1143 p.

Gupta, S., Cox, S. and Abu-Ghannam, N., 2010, Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats, Biochem. Eng. J., 52, 199-204 p.

Halkman K., 1991, Tarım mikrobiyolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, 1214, 82 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Hammes, W.P. and Vogeli, R.F., 1995, The genus *Lactobacillus*, in the lactic acid bacteria, the genera of the lactic acid bacteria, 2, 19-55 p.

Herdie, J.M. and Whiley, R.A., 1995, The Genus *Streptococcus*, in the Lactic Acid Bacteria, 2, 55-125 p.

Hermann, R.E. and McKay, L.L., 1985, Isolation and partial characterization of plasmid DNA *Streptococcus thermophilus*, Applied and Environmental Microbiology, 50(4), 1103-1106 p.

Hetenyi, K., Nemeth, A. and Sevelle, B., 2010, Use of sweet sorghum juice for lactic acid fermentation: preliminary steps in a process optimization, Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 124, 195-201 p.

Hofvendalh, K. and Hahn-Hagerdal, B., 2000, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, Enzyme and Microbial Technology, 26, 87-107 p.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994, Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology, 9.

Hoshino, K., Taniguchi, M., Marumoto, H., Shimizu, K. and Fuji, M., 1991, Continuous lactic acid production from raw starch in a fermentation system using a reversibly soluble-autoprecipitating amylase and immobilized cells of *Lactobacillus casei*, Agricultural and Biological Chemistry, 55, 479-485 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Hugo, W.B. and Longworth, A.R., 1966, The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 18, 569-578 p.

John, R.P., Sukumaran, R.K., Madhavan Nampoothiri, K. and Pandey, A., 2007, Statistical optimization of simultaneous saccharification and l (+) lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal*, 36, 262-267 p.

Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B., Wilfert C.M., 1992, *Zinsser Microbiology*, 20 ed., Prentice-Hall International Inc, USA.

Kempler, G.M. and McKay, L.L., 1979, Characterization of plasmid DNA in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, Evidence for plasmid linked citrate utilization, *Applied and Environmental Microbiology*, 37(2), 316-323 p.

King, R.D. and Cheetham, P.S.J., 1987, *Organic acids by fermentation*, Food Biotechnology, Elsevier Applied Science, 1, 333 p.

Klaenhammer, R.T. and Kullen, J.M., 1999, Selection and design of properties, *International Journal of Food Microbiology*, 50, 45-57 p.

Kok, J. and Venema, G., 1988, Genetics of proteinases of lactic acid bacteria, *Biochimie*, 70, 475-488 p.

Kotzamanidis, C.H., Roukas, T. and Skaracis, G., 2002, Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 441-448 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Lee, P.P.C., Mak, W.Y. and Newsome, P., 2004, The aetiology and treatment of oral halitosis an update, Hong Kong Medical Journal, 10, 414-418 p.

Liu, B., Yang, M., Qi, B., Chen, X., Su, Z. and Wan, Y., 2010, Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method, Biochemical Engineering Journal, 52, 212-219 p.

Madrid, J., Martinez-Teruel, A., Hernandez, F. And Megias, M. D., 1999, A comparative study on the determination of lactic acid silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods, Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 1722-1726 p.

Marsh, P.D. and Martin, M.V., 2000, Dental Plaque Formation, Journal of Oral Microbiology, 4. Ed., Microbes and Infection, 2, 1599-1607 p.

Marsh, P.D. and Martin, M.V., 1996, Oral Microbiology, epidemiological typing systems, Infection Control and Hospital Epidemiology, 17, 595-604 p.

McDonnell, G. and Russell AD., 1999, Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, Clinical Microbiology Reviews, 12, 147-179 p.

Mcdowell, J.D. and Kassebaum, D.K., 1993, Diagnosing and treating halitosis, The Journal of the American Dental Association, 124, 55-64 p.

Messadi, D.V. and Younai, F. S., 2003, Halitosis, Dermatol Clin., 21, 147-155 p. Microbiological Evidence Of *Helicobacter pylori* from Dental Plaque in Dyspeptic Patients, New Microbiologica, 18, 187-192 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Miller, W.D., 1890, The microorganisms of the human mouth, S.S White Dental Mfg.Co., Philadelphia, PA.

Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J.B., Bin, C.H. and Okabe, M., 2004, Production of L-lactic acid from corncob, Journal of Bioscience and Bioengineering, 97(3), 153–157 p.

Mugula, J.K., Nnko, S.A.M., Narvhus, J.A. and Sorhaug, T., 2003, Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food, International Journal of Food Microbiology, 80, 187-199 p.

Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A., 2004, L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization, Electronic Journal of Biotechnology, 7 (2), 167-179 p.

Neklyudov, A.D.; Fedorova, N.V.; Ilyukhina, V.P. and Lisitsa, E.P., 1993, Enzyme profile of autolyzing yeasts of the genus *Saccharomyces*, Applied and Biochemistry Microbiology, 29, 547-554 p.

Newbrun, E., 2000, Cariology- 3.Ed., Quintessence Publishing Co.Inc., Chicago.

Newburn, E. 1989, Cariology 3. Edition, Quintessence Publishing Chicago.

Nolte, A.W., 1982, Oral microflora, Oral microbiology with basic microbiology and immunology, Mosby Company, ABD, 193 – 222 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Nolte, W.A., 1973, Oral Microbiology, The C. V. Mosby Company Saint Luis, Second edition, Çev. Prof. Dr. Özlem Anđ.

Oh, S., Rheem, S., Sim, J., Kim, S. and Baek, Y., 1995, Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract glucose medium by using response surface methodology, Applied and Environmental Microbiology, 61, 3809–3814 p.

Okereke, A. and Montville, T.J., 1991, Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria, The Journal of Food Protection, 54, 349-353 p.

Özden, Ş., 2009, Ankara ili huzurevlerinde yaşayan bireylerde halitozis sıklığının ve bunu etkileyen faktörlerin belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, doktora tezi.

Özer, M., 2003, Diş hekimliğinde farklı anabilim dallarında dezenfeksiyon ve sterilizasyon., 3. sterilizasyon dezenfeksiyon kongresi, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 462-474 s.

Panesar, S.P., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N. and Bunko, K., 2007, Bioutilization of whey for lactic acid production, Food Chemistry, 105, 1-14 p.

Parahitiyawa, N.B., Scully, C., Leung, W.K., Yam, W.C., Jin, L.J. and Samaranayake, L.P., 2010, Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions, Oral Diseases, 16, 136-145 p.

Peker, M.S., 2007, Streptococcus mutans'ın anne-çocuk geçişinin AP-PCR metoduyla saptanması ve diş çürüğü ile ilişkisi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Prescott, C.S. and Dunn, G.C., 1987, Industrial microbiology, Published on distributors, Delhi, India, 882 p.

Prestini, P., Bottazzi, V., Vescova, M. and Morelli, L., 1983, Relationship among plasmid DNA, lactose fermentation and proteolytic activity in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus bulgaricus*, *Annali della Facolta di Ageria*, 23(1), 71 p.

Rasiah, I.A., Wong, L., Anderson, S.A. and Sissons, C.H., 2005, Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms, *Archives of Oral Biology*, 50, 779–787 p.

Rasic, J.L. and Kurman, J.A., 1978, Yogurt technology, manufacture and preparation, 20, 466 p.

Reddy, G., Altaf, Md., Naveena, B.J., Venkateshwar, M. and Vijay Kumar, E., 2008, Amylolytic bacterial lactic acid fermentation, A review, *Biotechnology Advances*, 26, 22-34 p.

Redmo Emanuelson, I.M. and Thornqvist, E., 2000, Genotypes of mutants *Streptococci* tend to persist in their host several years, *Caries Research*, 34, 133- 139 p.

Reiter, B. and Harnuly, G., 1984, Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and partial applications, *Journal of Food Protection*, 47 (9), 724-732 p.

Rivas, B., Moldes, A.B., Dominguez, J.M. and Parajo, J.C., 2004, Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation, *Enzyme and Microbial Technology*, 34(7), 627–634 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Rosan, B., 1994, The Streptococci, Oral Microbiology and Immunology, London, 129-146 p.

Rosan, B., and Lamont, R.J., 2000, Dental Plaque Formation, Advances Dental Research, 14, 29-39 p.

Rudney, J.D., 2000, Dental plaque formation, Advances Dental Research, 14, 29-39 p.

Samaranayake, L.P., 2006a, Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilm. Essential microbiology for dentistry, Elsevier: Philadelphia, 255–266 p.

Samaranayake, L.P., 2006b, Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilms. Essential microbiology for dentistry, 3rd edn. Elsevier: Philadelphia, pp. 255–266.

Samaranayake, L.P., 2002, Essential microbiology for Dentistry, 2nd Edition, Elsevier Ltd.

Scully, C. and Felix, D.H., 2005, Oral Malodor, British Dental Journal, 199, 498-500 p.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., 1986, Regular non-sporing Gram-positive rods, Bergey's manual of determinative bacteriology, 2, 1208-1234 p.

Socransky, S.S. and Haffajee, A.D., 2002, Dental biofilms: difficult therapeutic targets, Periodontol 2000, 28, 12-55 p.

Sokullu, E., 2007, *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ile l(+) laktik asit üretiminin optimizasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, yüksek lisans tezi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Sorensen, L.B., 1994, Discription of hurdles, Food preservation by combined processes, final report, Food Linked Agro-Industrial Research Concerted Action, 7, 7-27 p.

Spelhaus, S. R. and Harlander, S. K., 1989, Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*, Journal of Food Protection, 52(12), 856-862 p.

Stabholz, A., Sela, M.N., Friedman, M., Golomb, G. and Soskolne, W.A., 1986, Clinical and microbiological effects of sustained release chlorhexidine in periodontal pockets, Journal of Clinical Periodontology, 13, 783-788 p.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H., 1997, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29 p.

Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E. Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin R. 1989, 3. Ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvarı Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 240s.

Taylor, K. A. C. C., 1996, A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid, Applied Biochemical Biotechnology, 56, 49-58 p.

Tekinşen, O.C. ve Atasever, M., 1994, Süt ürünleri üretiminde starter kültür, Selçuk Ü. Vet Fak. Yayını, 150 s.

Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi. Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Timbuntam, W., Sriroth, K. and Tokiwa, Y., 2006, Lactic acid production from sugarcane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp., *Biotechnology Letters*, 28(11), 811–814 p.

Trontel, A., Barsic, V., Slavica, A., Santek, B. and Novak, S., 2010, Modelling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531 in batch process, *Food Technol and Biotechnology*, 48, 352-361 p.

Tunail, N. ve Köşker, Ö., 1989, Süt mikrobiyolojisi, A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları, 1116, 138 s.

Tüzün, C., 2002, *Biyokimya*, 4. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.

Vick Roy, T.B., 1985, Lactic acid, *Comprehensive Biotechnology*, 3, 761-776 p.

Viniegra-Gonzalez, G. and Gomez, J., 1984, Lactic acid production by pure and mixed bacterial culture, In: Wise DL, editor. *Bioconversion Systems*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 17-39 p.

Vural, T., 1998, Probiyotikler, XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı. 33-34 s.

Watanabe, T. and Oda, Y., 2008, Comparison of sucrose-hydrolyzing enzymes produced by *Rhizopus oryzae* and *Amylomyces rouxii*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(12), 3167–3173 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Weller, P.J., 2000, Chlorhexidine Handbook of pharmaceutical excipients,, III. edt, Pharmaceutical Press, Washington D.C., 121-125 p.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, 1995, W.H., The genera of lactic acid bacteria, Blackie Academic and Professional.

Yanar, S., 2006, Çocuklarda oral helicobacter pylori varlığının gastric *Helicobacter pylori* eradikasyonunun başarısına ve diş çürüğüne etkisinin araştırılması, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Pedodonti Anabilim Dalı Doktora Tezi.

Ye, Z, Lu, M., Zheng, Y., Li, Y. and Cai, W., 2008, Lactic acid production from dining-hall food waste by *Lactobasillus plantarum* using response surface methodology, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83, 1541-1550 p.

Yetişmeyen, A., 1995, Süt teknolojisi, A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları, 1420, 229 s.

Yoo, I. K., Chang, H.N., Lee, E.G., Chang, K.C. and Moon, S.H., 1997, Effect of B vitamin supplementation on the lactic acid fermentation bu *Lactobacillus casei*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 84, 172-175 p.

Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X. and Feng, X. 2008, Response surface optimization of L-(+) lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466, Biochemical Engineering Journal, 39, 496–502 p.

Yumoto, I. and Ikeda, K., 1995, Direct fermentation of starch to L (+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. Biotechnology Letters, 17, 543–546 p.

Zhang, Z.Y., Jin, B. and Kelly, J.M, 2007, Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi, *Biochemical Engineering Journal*, 35, 251-263 p.