



BEYAZ PEYNİR MİKROBİYOTASINDA KÜLTÜROMİK VE SHOTGUN METAGENOMİK TEKNOLOJİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Zeynep Görkem Cerit^{1,2}, Mehmet Cengiz Baloğlu³, Remziye Yılmaz^{1,*}

¹ Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe Kampüsü, 06800, Ankara

² Kastamonu Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Kastamonu

³ Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kastamonu

Geliş / Received: 07.12.2020; Kabul / Accepted: 24.03.2021; Online baskı / Published online: 08.04.2021

Cerit, Z.G., Baloğlu, M.C., Yılmaz, R. (2021). Beyaz peynir mikrobiyotasında kültüromik ve shotgun metagenomik teknolojilerin değerlendirilmesi. *GIDA* (2021) 46(3) 566-582 doi: 10.15237/gida.GD20136

Cerit, Z.G., Baloğlu, M.C., Yılmaz, R. (2021). Evaluation of culturomic and shotgun metagenomic technologies in white cheese microbiota. *GIDA* (2021) 46(3) 566-582 doi: 10.15237/gida.GD20136

ÖZ

Omik teknolojiler; DNA, RNA, genler, proteinler ve metabolitlerin araştırılması için kullanılan araçlar ve metotlardan oluşan sistematik yöntemler bütünüdür. Son yıllarda mikroorganizmaların tanımlanmasında ve işlevlerinin belirlenmesinde genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik alanlarda yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Genomik ve transkriptomik çalışmalar kapsamında mikroorganizmaların genom dizilerinin belirlenmesinde ve gen ifade analizlerinde yeni nesil dizileme sistemleri ile biyoinformatik araçlar birlikte kullanılmaktadır. Bu çalışmada, beyaz peynirin taşıdığı toplam mikrobiyel yükün oluşturduğu beyaz peynir mikrobiyotasının belirlenmesinde, kültürden bağımsız bir yöntem olan shotgun metagenomik ile kültüre dayalı bir yöntem olan ve mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlayan kültüromik metotları üzerinde durulmuştur. Çalışma ile yakın gelecekte beyaz peynir gibi geleneksel gıda ürünlerinin yeni teknikler değerlendirilerek araştırılması gerekliliğinin önemi vurgulanmıştır. Kültüromik, metagenomik gibi yenilikçi teknikler, geleneksel gıda ürünlerinin mikrobiyota tanımlanması üzerinde daha az belirsizlik ile çalışılmasına olanak sağlayabilmektedir.

Anahtar kelimeler: beyaz peynir, mikrobiyota, omik teknolojiler, metagenomik, kültüromik.

EVALUATION OF CULTUROMICS AND SHOTGUN METAGENOMIC TECHNOLOGIES IN WHITE CHEESE MICROBIOTA

ABSTRACT

Omics technologies are a set of systematic methods consisting of tools and applications used to investigate genes, DNA, RNA, proteins and metabolites. In recent years, genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics have been mainly utilized in the identification and determination of microorganisms. Within the scope of genomic and transcriptomics studies, next generation sequencing systems and bioinformatics tools are used together to determine the genome sequences of microorganisms and gene expression analysis, respectively. In this study, shotgun metagenomics, the culture-independent method, and culture-dependent culturomics approach that allows identification of microorganisms are emphasized for the detection of white cheese microbiota. The study has been emphasized the importance of researching traditional food products such as white

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: remziye06@gmail.com

Zeynep Görkem Cerit; ORCID no: 0000-0003-3955-9584

Mehmet Cengiz Baloğlu; ORCID no: 0000-0003-2976-7224

Remziye Yılmaz; ORCID no: 0000-0003-2041-1205

cheese by evaluating new techniques in the future. Innovative techniques such as culturomics and metagenomics can enable the study of traditional food products to be studied with less uncertainty on the microbiota identification.

Keywords: white cheese, microbiota, omic technologies, metagenomics, culturomics.

GİRİŞ

Beyaz peynir mikrobiyotası, peynir üretim sürecinde önemli bir rol oynar ve peynirin kendine özgü tat ve koku gibi organoleptik özelliklerinin oluşmasında etkilidir (Jonhalla vd., 2018). Endüstride beyaz peynir üretimi için kullanılan laktik asit bakterilerinden oluşan starter kültür karışımları, sütte asitlik geliştirilmenin yanında beyaz peynirin tat ve koku bileşiklerini oluşturmada görev alırlar. Endüstriyel beyaz peynir üretiminde çiğ süte uygulanan ısı işlemi ile çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların tamamının yok edilmediği bildirilmiştir (Kable vd., 2016). Bunun yanında beyaz peynir üretim işletmelerinde peynirin temas ettiği ekipmandan peynire çeşitli mikroorganizmalar geçebilmektedir. Bu sebeple peynir mikrobiyotasına starter kültürün yanında peynire işlenen sütün mikrobiyotası ve işletme ekipmanının taşıdığı mikrobiyel yükün de etkisi olabileceği bildirilmiştir (Stellato vd., 2015). Starter kültür olmayan ve çiğ süt ve/veya çevresel kaynaklardan mikrobiyotaya katılan laktik asit bakterilerinin de beyaz peynirin organoleptik özellikleri ve besinsel içeriğinin gelişimine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Wolfe vd., 2014).

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan klasik kültürel yöntemlerin yanı sıra son yıllarda omik teknolojilerde yaşanan gelişmeler mikrobiyota çalışmalarının daha doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlamıştır (Jonhalla vd., 2018; Escobar- Zepeda vd., 2018). Metagenomik, çevresel bir örnekte bulunan tüm genomların doğrudan izole edilerek genetik analizinin gerçekleştirilmesi olarak tanımlanabilir (Escobar-Zepeda, 2015; Chiu vd., 2019). Genetik materyalin dizilmesiyle gerçekleştirilen metagenomik analizlerde yeni nesil sekanslama yöntemleri kullanılmaktadır. Kültüromik ise seçici besiyerlerinde farklı ortam şartlarında geliştirilen ve saf kültür olarak elde edilen izolatların Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile tanımlanmasına olanak sağlayan bir yaklaşımdır (Garcia vd., 2016).

Bu çalışmanın amacı, bütünlük omik yaklaşımı ile beyaz peynir üretim sürecine ilişkin süt, peynir ve çevre mikrobiyotasının dinamikleri hakkında laktik asit bakterileri açısından kapsamlı genel bir bakış sağlamaktır. Ayrıca bir mikrobiyota çalışmasında kültüre dayalı ve kültürden bağımsız iki yöntemin karşılaştırılmasının önemi üzerinde durulacaktır.

Beyaz Peynir

Peynir, sütün enzimler ya da organik asitler kullanılarak pıhtılaştırılması, oluşan pıhtının baskılanarak peynir altı suyunun ayrılmasıyla oluşan, farklı yağ oranlarında ve farklı sertliklerde olabilen, çeşidine göre değişen renk, tat ve koku özelliklerine sahip bir süt ürünüdür. Dünyada 1000'in üzerinde, Türkiye'de ise 50'ye yakın peynir çeşidinin olduğu bildirilmiştir (Togay vd., 2020). TEPGE Süt ve Süt Ürünleri Durum Tahmin Raporu ve Ulusal Süt Konseyi Süt Raporuna göre ülkemizde en çok tüketilen ve pazar payı en yüksek olan peynir çeşidi beyaz peynirdir (Anonymous, 2017; Anonymous, 2018). TÜİK Süt ve Süt Ürünleri Üretim İstatistikleri 2020 Mart ayı raporuna göre Türkiye'de inek sütünden üretilen peynir miktarı bir önceki yılın bahsedilen ayına kıyasla %12,2 artış göstererek 63300 ton, manda, koyun ve keçi sütlerinden üretilen diğer peynirlerin üretimi ise %14,8 azalarak 2700 ton olmuştur (TÜİK, 2020). Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6) uyarınca beyaz peynir "Hammaddenin peynir mayası kullanılarak pıhtılaştırılması ile elde edilen telemenin tekniğine uygun olarak işlenmesiyle üretilen, üretim aşamalarındaki farklılıklara göre taze veya olgunlaştırılmış olarak tanımlanabilen, çeşidine özgü karakteristik özellikler gösteren salamuralı peynir" olarak tanımlanmaktadır. Çizelge 1'de Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (Tebliğ No: 2009/68) uyarınca beyaz peynirin uyması gereken mikrobiyolojik kriterlere yer verilmiştir.

Çizelge 1. Beyaz peynirin mikrobiyolojik kriterleri

Gıda	Mikroorganizmalar	Numune alma planı		Limitler (*)	
		n	N	m	M
Peynir (eritme peynir hariç diğer tüm peynirler)	Enterobacteriaceae	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>S. aureus</i> (**)	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/25 g-mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL	
	<i>E. coli</i> O157:H7	5	0	0/25 g-mL	

(*) : Aksi belirtilmedikçe limit kob/g-mL olarak değerlendirilir.

(**) : Koagülaz pozitif stafilocoklar. n: Analize alınacak numune sayısını

c: "M" değeri taşıyabilecek en fazla numune sayısını

m: (n - c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri

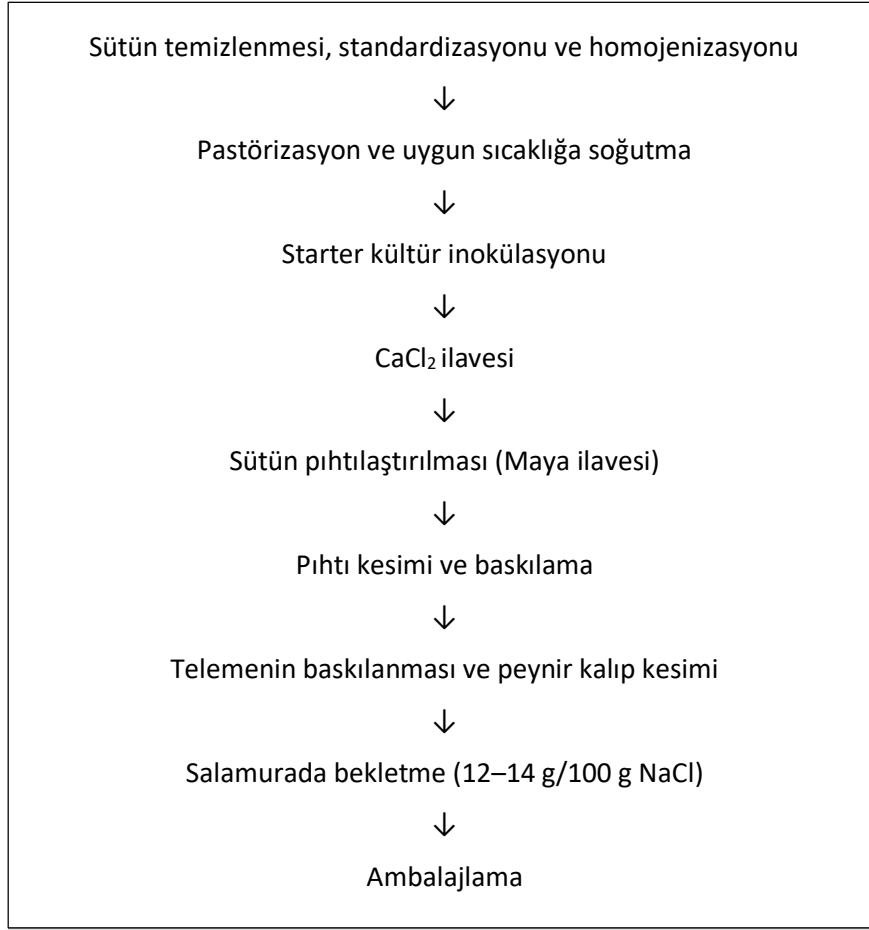
M: "c" sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri ifade etmektedir.

Endüstriyel Beyaz Peynir Üretimi

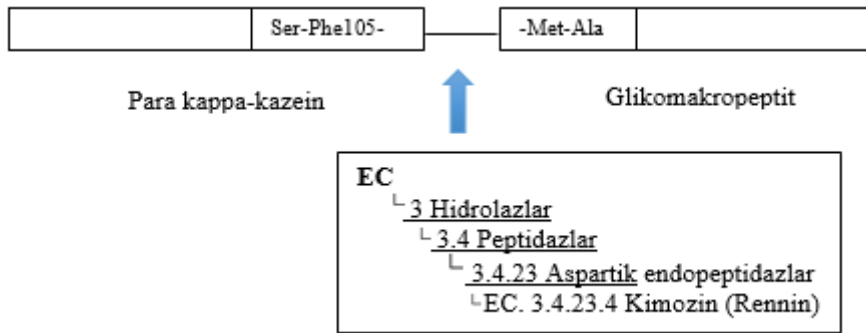
Beyaz peynirin kalitesi peynire işlenen sütün kimyasal kompozisyonuyla yakından ilişkilidir. Bu sebeple süt kimyasal ve mikrobiyolojik açıdan iyi kalitede olmalıdır. Buna göre işletmeye gelen süt; antibiyotik, deterjan ve kimyasal kalıntı içermemeli, mastitisli olmamalı, kolostrum içermemeli, laktasyonun ilk ve son safhalarında elde edilmemelidir. Kimyasal bileşimi normal olmayan, özellikle mastitisli hayvanlardan elde edilen sütlerin serum proteini içeriği yüksek, kazein içeriği ise düşüktür. Düşük kazein içeriğine sahip süttten üretilen peynirin randımanı düşmekte ve peynirde yumuşama problemi oluşmaktadır. Mikrobiyel açıdan peynire işlenen süt, koliform, *Clostridium* ve *Bacillus* cinsi bakterileri içermemelidir (Hayaloğlu vd., 2002).

Şekil 1'de endüstriyel beyaz peynir üretimi akış şeması verilmiştir. Endüstriyel beyaz peynir üretiminde ilk olarak işletmeye gelen çiğ süt kalite kontrolünden geçtikten sonra çiğ süt tanklarına alınır. Süt, üretime alınmadan önce ilk olarak basit filtreler ile gözle görülen kirliliklerden, daha sonra merkezkaç kuvveti ile çalışan seperatörlerle gözle görünmeyen yabancı maddelerden ayrıştırılır. Temizlenen sütün protein ve yağ oranı ayarlanarak sütün standardizasyonu yapılır. Daha sonra süt yüksek basınç altında 60-65°C sıcaklıkta çok ince filtrelerden geçirilerek homojenizasyonu sağlanır. Homojenizasyon ile sütün içerdiği yağ globüllerinin çapı eşitlenir. Ön işlemlerin ardından süt 72-75°C'de 15 saniye ısıl işleme maruz bırakılır ve hızlı bir şekilde 28-30°C'ye soğutulur. Sütün bu sıcaklığa soğutulmasının sebebi beyaz peynir starter kültürlerinin mezofilik özellikte laktik asit

bakterilerinden oluşması ve bu sıcaklıklarda optimum gelişmesidir. Starter eklendikten sonra süte CaCl₂ eklenir. Bunun sebebi pastörizasyonda yüksek sıcaklığın etkisiyle ayrılan Ca⁺²'nin yapıya tekrar kazandırılmasıdır. Starter kültürün etkisiyle pH 5.5'e geldiğinde süte rennet enzimi (peynir mayası) ilave edilir. Bu pH pıhtılaşmayı sağlayan rennet enziminin optimum aktivite gösterdiği pH'tır. Kazeinin dört alt biriminden biri olan kapa kazeinin sütün pıhtılaşmasında önemli bir yeri vardır. Rennet enzimi kapa kazeinin 105. amino asidi fenilalanin ve 106. amino asidi metiyonin arasındaki bağı kırar (Şekil 2). Kırılan zincirde hidrofobik olan kısım para kapa-kazein (para kapa-casein) yapıdan ayrılır ve pıhtıyı oluşturur. Hidrofilik kısım olan glikomakropeptit (GMP) ise serum kısımda çözünerek yapıdan ayrılır. Pıhtı oluştuktan sonra 1 cm³'lük küpler halinde kırılıp baskılanarak fazla suyunu bırakması sağlanır. Pıhtı baskılanırken cendere bezine sarılır ve üzerine ağırlık uygulanır. Cendere bezi beyaz peynirin bir yüzeyinde olan pütürlü şeklin oluşmasını sağlar. Pıhtının fazla suyunun alınmasıyla oluşan teleme 7 cm³'lük küpler halinde kesilir ve 24 saat salamurada (12-14 g/100 g NaCl) bekletilir (Hayaloğlu vd., 2002). Salamurada bekletildikten sonra beyaz peynir, tercihe bağlı olarak olgunlaştırılmadan tüketime sunulabilmektedir. Salamuranın ardından taze beyaz peynir ambalajlanarak yine salamura (6 g/100 g NaCl) içinde satışa sunulur. Olgunlaştırılarak tüketime sunulan beyaz peynirin olgunlaştırılması ise 4-8°C'de 60-90 gün yapılmaktadır (Topçu ve Saldamlı, 2006).



Şekil 1. Beyaz peynir üretimi.



Şekil 2. Kazein zincirinin kırılması.

Beyaz Peynir Mikrobiyotası

Mikrobiyota belirli ortamda bulunan mikrobiyel topluluğun tamamına verilen isimdir (Liu, 2016). Mikrobiyom tanımı, ilk kez Nobel ödüllü mikrobiyolog Joshua Lederberg tarafından 2001

yılında yapılmıştır (Prescott, 2017). Buna göre, insan vücudunda bulunan kommensal, simbiyotik ve patojen mikroorganizmalardan oluşan ekosistemi ifade eden terim “mikrobiyom” olarak tanımlanmıştır. Daha sonra mikrobiyota ve

mikrobiyom terimleri insan ve mikrobiyomu arasındaki etkileşimi açıklamayı hedefleyen İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) tarafından tekrar açıklanmıştır (Proctor vd., 2019). Günümüzde mikrobiyom, belirli bir ortamda bulunan bakteri, arkea, küf ve mayalardan oluşan mikrobiyel topluluğun oluşturduğu mikrobiyotanın toplam genomu olarak ifade edilmektedir (Knight vd., 2018).

Mikrobiyotanın bulunduğu konakçı ortamı insan, hayvan ya da bitki olabileceği gibi çevresel bir örnek de olabilir (Liu, 2016). Bu açıklamadan hareketle, bir peynir çeşidinin taşıdığı mikroorganizma topluluğu “peynir mikrobiyotası” olarak tanımlanabilir. Peynir mikrobiyotası, çok büyük oranda, kullanılan starter kültüre göre şekillenmektedir (Ercolini, 2004). Süt mikrobiyotası, peynir yapımında tüm süreçte önemli bir rol oynar ve peynire özgü lezzet ve doku gelişimine katkıda bulunur (Tilocca vd., 2019).

Starter kültürler ürüne istenilen tat, koku, aroma ve yapı gibi özellikleri kazandırmak amacı ile kullanılan ve bilinen özelliklere sahip karışık mikroorganizma kültürleridir. Bunun yanında, peynir üretiminde işletmeye gelen çiğ sütün taşıdığı mikroorganizmalar da peynir mikrobiyotası ile ilişkilidir. Çünkü çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların tamamı pastörizasyon işlemi ile yok edilememektedir (Kable vd., 2016). Bu faktörlerin yanında peynir üretim işletmesinde peynirin temas ettiği ekipmandan peynire çeşitli mikroorganizmalar geçebilmektedir. Bu yüzden beyaz peynir mikrobiyotasını sadece eklenen starter kültür değil aynı zamanda çiğ süt mikrobiyotası ve işletme ekipmanlarının taşıdığı mikroorganizmalar gibi faktörler de etkilemektedir (Stellato vd., 2015).

Peynir mikrobiyotası, başlatıcı birincil mikroflora ve ikincil mikroflora olarak ikiye ayrılır (Tunail, 2009). Birincil mikroflora olan laktik asit bakterileri laktik asit fermantasyonuyla sütün asitliğini arttırırken olgunlaşma sürecinde de sahip oldukları enzimler sayesinde peynirin görünüş, tat, koku, tekstür gibi karakteristik özelliklerinin oluşumunu sağlarlar. İkincil mikroorganizmalar

ise olgunlaşma sürecinde çeşitli organik asitlerin oluşumuna önemli katkı sağlarlar. İkincil mikroflora peynir yüzeyinde ve/veya içinde gelişebilen başlatıcı kültür dışı laktik asit bakterileri, maya ve küflerden oluşabilmektedir. Günümüzde endüstriyel olarak üretilen beyaz peynirler genellikle taze peynir olarak olgunlaştırılmadan tüketime sunulmaktadır. Bu sebeple beyaz peynirin ikincil mikroflorası bulunmamaktadır (Tunail, 2009). Beyaz peynirin mikrobiyotasının oluşumunda ise starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmaların yanında çevresel mikrobiyotanın, starter kültür olmayan mikroorganizmaların da etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Jonhalla vd., 2018). Literatür incelendiğinde, beyaz peynirde baskın tür olarak *Lactococcus lactis* ve *Streptococcus thermophilus*'un bulunduğu görülmektedir. Bu mikroorganizmalar özellikle peynirin olgunlaşmasının ilk aşamalarında daha belirgindir. Beyaz peynirde önemli tür olarak bildirilen diğer mikroorganizmalar *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium*'dur. *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* ve *Leu. lactis* türleri de beyaz peynirde ağırlıklı olarak bulunan bakterilerdir. Ülkemizde beyaz peynir starter kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde özellikle *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis*'in, bunların yanında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *St. thermophilus*, *L. helveticus* ve *L. plantarum* bakterilerinin beyaz peynir starter kültürü olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Çizelge 2).

Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, gıda endüstrisinde birçok fermente gıda ürününün üretiminde kullanılan önemli bakterilerdir. Laktik asit bakterileri, filogenetik olarak Lactobacillales takımına ait, 6 aile, 30'dan fazla cins ve 300'den fazla türü barındıran bir bakteri grubudur (Endo vd., 2019). *Lactococcus*, *Lacobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri başlıca laktik asit bakterileridir. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırması Çizelge 3'te verilmiştir (KEGG, 2020). Zheng vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, laktik asit bakterilerinden Lactobacillaceae ve Leuconostocaceae ailelerinin

sınıflandırılması tüm genom dizileme teknikleriyle yeniden değerlendirilmiştir. Çalışmanın çıktısı olarak *Lactobacillus* cinsinin 25 cinse ayrılması önerilmiştir. Bunlar daha önceden de var olan fakat çalışmada tanımı tekrar yapılan *Lactobacillus* ve *Paralactobacillus* cinsleri ile 23 yeni cins; *Levilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Holzapfelia*,

Loigolactobacillus, *Dellaqlia*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Pancilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Liquorilactobacillus* ve *Schleiferilactobacillus* olmuştur. Tanımlanan bu yeni cinslerin temsil ettiği eski *Lactobacillus* cinsi bakterilerin sadece cins isimleri değişmiş olup tür ve suş isimleri aynı kalmıştır.

Çizelge 2. Beyaz peynir starter kültürü olarak kullanılabileceği bildirilen mikroorganizmalar (Cerit, 2020)

Starter kültür	Kaynak
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Uysal, 1996
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Gürsoy vd., 2001
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. helveticus</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Dağdemir, 2001
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Hayaloğlu vd., 2002
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Tunail, 2009
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
Mezofilik kültür+ <i>E. faecium</i> EF031 (ek kültür)	Bulat, 2011
Mezofilik kültür+ <i>E. faecium</i> M74 (ek kültür)	
<i>L. lactis</i>	Ertürkmen vd., 2015
<i>E. faecium</i>	
<i>L. plantarum</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis/ cremoris</i>	Chr. Hansen, 2014
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
<i>St. thermophilus</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kesenkaş, 2015
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Danisco, 2019
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>St. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Natural Food Culture, 2019
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>St. thermophilus</i>	

Laktik asit bakterileri Gram pozitif, *Sporlactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmayan, anaerobik, aerobik ya da fakültatif aerobik olan, kok ya da çubuk şekilli, karbonhidrat metabolizmasının ana fermentasyon ürünlerinden biri olan laktik asiti üreten oldukça değerli mikroorganizmalardır (Tunail, 2009). Bu

bakteriler aynı zamanda, asidi tolere edebilen, katalaz ve oksidaz negatif olan, nitrati redükte edemeyen mikroorganizmalardır. Laktik asit bakterileri düşük guanin ve sitozin (G+C) oranına (%35-53) sahiptirler ve genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (Yılmaz vd., 2015).

Çizelge 3. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırması

	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>
Alem	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Şube	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Sınıf	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Takım	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales
Aile	Streptococcaceae	Streptococcaceae	Lactobacillaceae	Enterococcaceae
Cins	Lactococcus	Streptococcus	Lactobacillus	Enterococcus

Laktik asit bakterileri gelişmek için karbonhidratlar, amino asitler, vitamin, mineral ve bazen de yağ asitleri ve peptitler gibi zengin besinlere ihtiyaç duymaktadırlar. Bundan dolayı da besin içeriği yüksek olan ortamlarda bulunurlar. Bunlara, gastrointestinal sistem; mide ve bağırsak, vajinal yollar, ağız boşluğu, bitki yüzeyleri, silaj ve süt ve süt ürünleri gibi çok çeşitli ortamlar örnek olarak verilebilmektedir (Endo vd., 2019). Laktik asit bakterileri buldukları ortamın içeriğindeki hegzosları fermente ederek laktik asit oluştururlar ve fermentasyon sonucu ürettikleri son ürüne göre iki gruba ayrılırlar. Hegzoslardan sadece laktik asit (%90-100) oluşturanlar homofermantatif laktik asit bakterileri, laktik asidin (%50) yanısıra etanol, asetat ve CO₂ oluşturanlar ise heterofermantatif laktik asit bakterileridir.

Laktik asit fermentasyonu sonucu ortaya çıkan laktik asit, asetik asit, asetaldehit ve diasetil gibi aromatik bileşikler sayesinde yoğurt, peynir çeşitleri, kefir, ekşi krema, fermente çiğ sucuk, tarhana gibi kendine özgü tadı ve aroması olan ürünler elde edilmektedir. Bundan dolayı seçilen bazı laktik asit bakterisi suşlarından starter kültürler, aroma geliştirici kültürler ve probiyotik kültürler üretilmektedir. Starter kültür özelliği gösteren laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit ile ortamın asitliği artar ve asidi tolere edemeyen mikroorganizmaların bu ortamda yaşaması güçleşir. Laktik asit bakterileri asidi tolere edebildikleri için bu ortamda rekabetçi konumdadır ve böylelikle patojen ve diğer mikroorganizmaların inhibe edilmesini sağlarlar.

Bunun yanında laktik asit bakterilerinin metabolitlerinden olan hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin ve amonyak gibi maddeler diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. Böylece bir gıda maddesinde laktik asit bakterilerinin varlığı ile istenmeyen mikroorganizmaların inhibe edilmesi sağlanabilmektedir. Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde önemli bir yeri olan fermente gıdaların üretilmesinde starter kültür olarak kullanılmaları, asitlik ve aroma geliştirici olmaları, antimikrobiyal aktiviteleri ve probiyotik olmaları gibi özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde çok önemli bir yer tutmaktadırlar.

Laktik Asit Bakterilerini Tanımlama Yöntemleri

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması süt endüstrisi için büyük önem arz etmektedir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ile süt ve süt ürünlerinin mikrobiyotası hakkında edinilen bilgiler starter kültür ve peynir üretim teknolojilerinin geliştirilmesinde kullanılarak süt endüstrisine ekonomik anlamda katkı sağlayabilmektedir. Ayrıca süt ve ürünlerinin mikrobiyotasının belirlenmesi, süt ürünlerinin kalitatif ve duyusal özelliklerinin ve güvenilirliğinin kontrol edilmesi için oldukça önemlidir (Tilocca vd., 2019).

100 yılı aşkın süredir mikrobiyolojide, mikroorganizmaların katı besiyeri kullanılarak izole edilmesi ve uygulanan bazı testlerle bu izolatların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesiyle tanımlanması

esasına dayalı klasik kültürel yöntemler kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar ile ilgili çalışmalar, 1676 yılında Leeuwenhoek'un ağız mikroorganizmalarıyla ilgili raporundan günümüzde kullanılan moleküler yöntemler ile tanımlama çalışmalarına kadar uzun bir yol kat etmiştir. Mikroorganizmaların izolasyonu ile ilgili çalışmalar ilk olarak bilim insanlarının patates dilimleri ve jelatin gibi katı besi ortamlarında mikroorganizmaları kültüre etmeleriyle başlamıştır. İzolasyon yöntemlerinin bulunması mikroorganizmaların “Görünmeyen organizmalar” olarak adlandırıldığı dönemlerde mikroorganizmaların keşfi, mikroskop altında gözlemlenebilmesi ve onların fizyolojilerinin anlaşılabilmesi adına ilk basamak olmuştur (Escobar- Zepeda vd., 2015).

1970'lerin sonunda ribozomal RNA (rRNA) genlerinin moleküler markırlar olarak kullanılabilmesi görüşünün ortaya atılması ve bununla birlikte Sanger sekanslamasının ortaya çıkışı mikroorganizmaların tanımlanmasında bir devrim yaratmıştır (Escobar- Zepeda vd., 2015). Ardından Polimeraz zincir reaksiyonu, rRNA genlerinin klonlanması ve dizilenmesi, Denature edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE) gibi moleküler yöntemler mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır (Ercolini, 2013; Yılmaz vd., 2015). Metagenomik analizlerin ortaya çıkması, mikroorganizmaların tanımlanmasında önemli bir adım olmuştur. Saf kültürlerin izolasyonuna dayalı tanımlama tekniklerinin aksine metagenomik analizler kültüre edilemeyen mikroorganizmaların da tanımlanabilmesine olanak sağlamaktadır (Zhang vd., 2019).

Laktik Asit Bakterilerinin Klasik Kültürel Yöntemlerle Tanımlanması

Klasik kültürel yöntemlerle tanımlamada ilk aşama mikroorganizmaların saf kültür halinde izole edilmeleridir. Bunun için uygun seçici besiyerlerinden yararlanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin geliştirilmesi ve izolasyonunda MRS Agar ve MRS Broth, M17 Agar ve M17 Broth, Kanamycin Esculin Azide Agar gibi yüksek besleyici özelliğe sahip seçici besiyerleri kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin

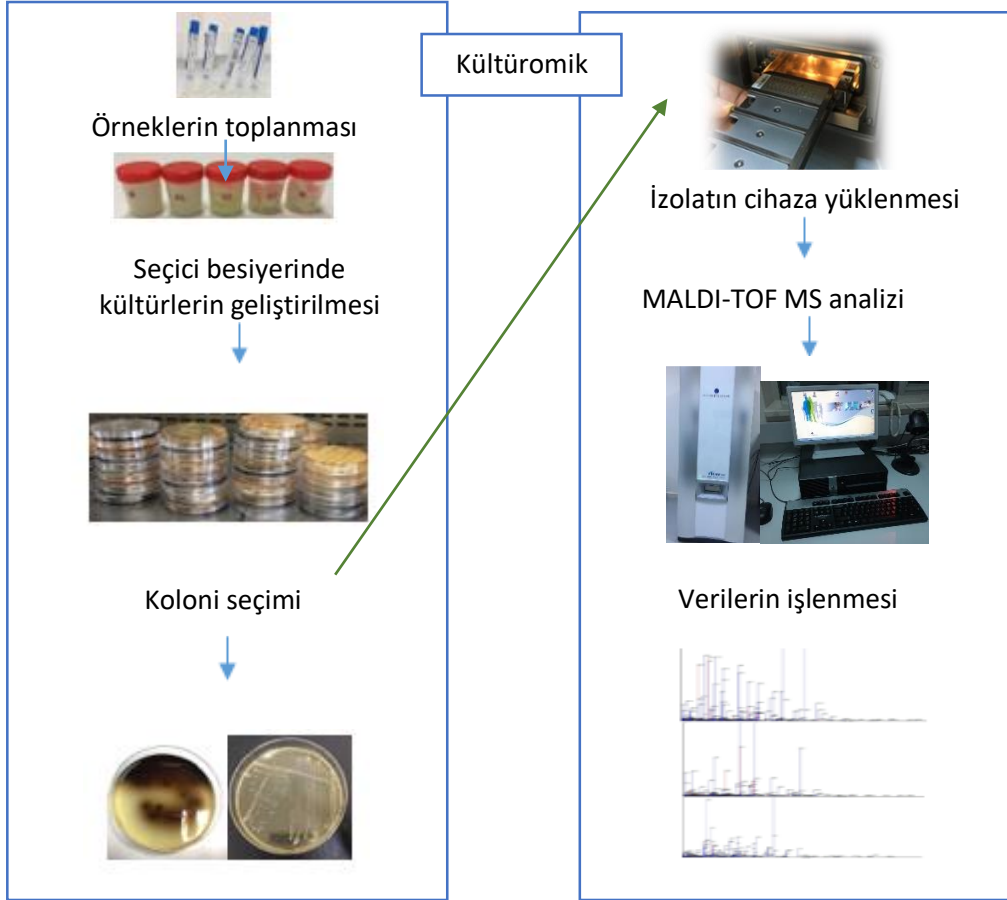
tanımlanmasında ilk olarak seçici besiyerinden uygun makroskopik morfolojiye sahip koloniler seçilerek saf kültür olarak elde edilir. Ardından izolatların mikroskopik morfolojileri incelenerek kaydedilir. Sonrasında izolatların Gram reaksiyonu ve katalaz aktiviteleri belirlenmektedir. Sporsuz çubuk veya kok şeklinde, Gram pozitif ve Katalaz negatif özellik gösteren izolatlar laktik asit bakterileri olarak belirlenmektedir. Klasik kültürel yöntemlerde bakterilerin cins düzeyinde tanımlanması amacıyla bir takım biyokimyasal ve fizyolojik testler uygulanmaktadır. Bunlara; farklı sıcaklık ve pH değerleri ile farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme, glukozdan gaz oluşturma, karbonhidrat fermentasyon testleri, antibiyotik duyarlılığı, arjininden amonyak üretimi, indol, Voges-Proskauer, jelatin hidrolizi ve üreaz testleri, sukrozdan dekstran oluşturma gibi testler örnek gösterilebilir.

Kültüromik yaklaşımı ile Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Kültüromik, seçici besiyerlerinde farklı ortam şartlarında geliştirilen ve saf kültür olarak elde edilen izolatların Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) ile tanımlanmasına olanak sağlayan bir yaklaşımdır (Garcia vd., 2016; Nacef vd., 2017). Şekil 3'te kültüromik yaklaşımı özetlenmiştir. MALDI-TOF MS, mikroorganizmaların proteinlerinin iyonize edilerek bir elektrik alandan geçirilmesi ile protein profillerinin çıkarılması esasına dayanır (Santos vd., 2016). MALDI-TOF MS'te tanımlamanın ilk basamağı saf kültür olarak elde edilen izolatın hedef plaka üzerinde matris solüsyonu ile muamele edilip kristalleştirilmesidir (Harnpicharnchai vd., 2020). Matris solüsyonu ile kaplanan ve kuruması beklenen örnek sonrasında hedef plaka ile cihaza yüklenir. Cihaz içi vakumu sağlandıktan sonra hedef plaka lazer ışınına maruz bırakılır. Kristalle halde bulunan proteinler lazer ışınının etkisiyle iyonlaşır ve protonlanmış iyonlar elde edilir. İyon bulutu bir elektrik alanda hızlandırılarak uçuş tüpünden geçirilir. İyonların uçuş tüpünde geçtikleri süre (Time of Flight, TOF) uçuş süresi analizatörleri ile

hesaplanır. Bu süre iyonların kütleyle ilişkilidir. İyonların uçuş tüpünde aldıkları yol tamamlandığında, her bir izolat için kütle spektrumları elde edilir. Bu spektrumlar veri

tabanında bulunan veriler ile karşılaştırılır ve mikroorganizmaların tanımlanması gerçekleştirilir (Lagier vd., 2018).



Şekil 3. Kültüromik yaklaşımının şematik gösterimi (Orijinal resimler kullanılmıştır).

Kültüromik yaklaşımının, mikrobiyel toplulukta az yoğunlukta bulunan mikroorganizmaların da tanımlanması, hızlı ve ekonomik olması, yalnızca canlı mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlaması ve tanımlanan kültürlerin ileri çalışmalar için saklanmasına izin vermesi gibi avantajları vardır. Ancak kültüromik yöntemi ile sadece kültüre edilebilen mikroorganizmaların tanımlanması mümkün olmaktadır (Nacef vd., 2017).

Metagenomik Analizler

Mikrobiyel topluluk bir ortamda aynı anda birlikte var olan organizmalar grubudur.

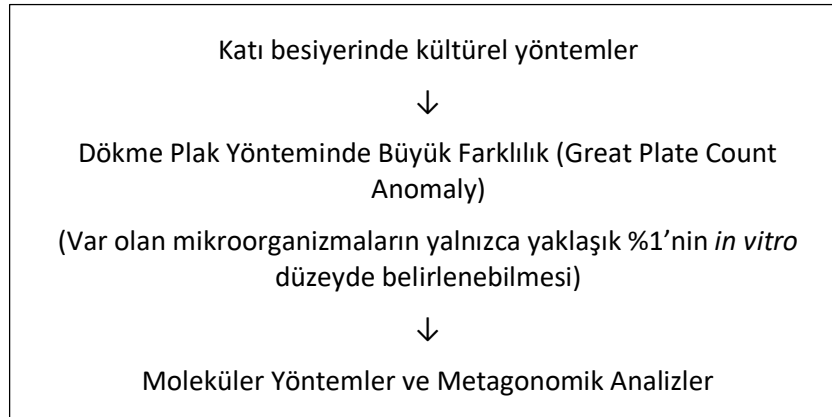
Mikroorganizmaların fizyolojilerini anlamak için kullanılan yöntemlerin, Robert Koch'un katı halde besin öğelerini mikroorganizmaların sayısını belirlemek ve onları mikroskop altında görüntülemek için kullanmasıyla başladığı ifade edilebilir. Ancak, Petri kabında gelişen ve mikroskopta görüntülenen mikroorganizma sayısı arasındaki büyük fark, mikroorganizmaları kültüre etme yöntemlerinin yetersiz kaldığını göstermiştir (Handelsman, 2004; Sielaff vd., 2019). Dökme Plak Yönteminde Büyük Farklılık (Great Plate Count Anomaly) olarak isimlendirilen bu yetersizlik, var olan mikroorganizmaların yaklaşık olarak yalnızca %1'nin *in vitro* olarak

belirlenebildiğini göstermiştir (Escobar-Zepeda vd., 2015; Serra vd., 2019). Elde edilen bu veriyle beraber belli bir ortamda bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi ve tanımlama çalışmalarının yapılabilmesi için yeni yöntemlerin gerekliliği ortaya çıkmıştır (Şekil 4).

Metagenomik, çevresel bir örnekte bulunan tüm genomların doğrudan izole edilerek genetik analizinin yapılması olarak tanımlanabilir (Chiu vd., 2019). Genetik materyalin dizilenmesiyle gerçekleştirilen metagenomik analizler yeni nesil dizileme yöntemleriyle gerçekleştirilir. Yeni nesil dizileme sistemleriyle bitki, bakteri, maya, küf, virüs gibi mikroorganizmaların genomlarının ultra hızlı olarak, yüksek doğrulukla dizilenmesi mümkündür. Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemleri, Illumina Genome Analyzer, Applied BioSystem SOLID, Complete

Genomics, Helios, Pacific Biosciences ve IonTorrent'tir (Jongman vd., 2020; Nair ve Bhat, 2020).

Metagenomik analizler amplicon dizileme ve shotgun olarak ikiye ayrılmaktadır. Amplicon dizilemede, örnekten tüm mikroorganizmaların toplam DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra taksonomik bilgi veren belirli gen bölgeleri hedeflenir. Bunlara, nesiller boyu korunmuş ve taksonomik bilgi veren *16S rRNA*, *18S rRNA* ve *ITS* genleri örnek verilebilir (Parente vd., 2020). Bu hedeflenen genler spesifik primerler yardımıyla PCR ile amplifiye edilirler. Amplifiye edilen gen bölgeleri dizilenir ve biyoinformatik araçlarla bu diziler anlamlı verilere dönüştürülerek mikroorganizmalar tanımlanmış olur (Ranjan, 2016; Breitwieser vd., 2019; Serra vd., 2019).



Şekil 4. Metagenomik analizlerin ortaya çıkışı

Shotgun dizileme ise; örnekte bulunan tüm genomun rastgele parçalarının dizilendiği sistemdir. Shotgun dizileme ve amplicon dizilemenin en önemli farkı tüm genom shotgun dizileme ile mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanmasında amplicon dizilemeyle tanımlamaya kıyasla daha güvenilir sonuçlar elde edilmesidir (Ranjan, 2016; Thoendel vd., 2019). Tüm genom shotgun dizileme ve amplicon dizilemede farklı veri tabanları kullanılmaktadır ve shotgun dizilemede daha büyük ham veri elde edilmektedir (Deurenberg vd., 2017; Escobar-Zepeda vd., 2018; Jagadeesan vd., 2019).

Tüm genom shotgun dizileme daha ayrıntılı incelenecek olursa, ilk aşama yine ortamda bulunan mikroorganizmaların genetik materyalinin doğrudan ekstrakte edilmesidir. Bu elde edilen genetik materyal o ortamda bulunan tüm mikroorganizmaların genomunu kapsamaktadır (Zhou vd., 2019). Toplam genom olarak doğrudan izole edilen DNA'lar dizileme için çok uzundur. Bu yüzden öncelikle DNA'ların küçük fragmentlere (200-600 bp) mekanik ya da enzimatik yollarla ayrılması gerekir. Küçük parçalara ayrılan DNA fragmentlerinin iki ucuna adaptörler eklenir. Bu adaptörler kütüphanenin oluşturulması sırasında DNA fragmentlerinin bir

yüzeyle bağlanması için gereklidir. Daha sonra bu DNA fragmentleri 95°C'ye ısıtılarak denatüre edilir ve tek zincirli hale getirilir. Tek zincirli hale getirilen DNA fragmentlerinin bir yüzeyle tutunması sağlanır. Bu yüzeyle kullanılan yeni nesil sekanslama tekniğine göre değişim göstermektedir (Kader vd. 2016, Jagadeesan vd., 2019). Illumina sistemde bu amaç için oligonükleotitlerle kaplanmış bir akış hücresi kullanılırken, Ion Torrentte boncuklar (bead) kullanılır. Yüzeyle tutunan DNA parçaları kütüphaneleri oluşturur. Devamında bu kütüphanelerden kümeler oluşturulur. Bu amaçla ortama eklenmiş olan nükleotitler, polimeraz enzimi, primerler ve buffer ile DNA'ların eşlenmesi gerçekleşir. Çift zincirli hale gelen DNA'lar tekrar denatüre edilir ve orijinal zincir uzaklaştırılır. Sonra kalan zincirler tekrar eşlenirler bu döngü defalarca tekrarlanır ve bu şekilde kümeler oluşturulmuş olur. Dizileme aşamasına geçildiğinde DNA'ların eşlenmesinde floresanla modifiye edilmiş nükleotitler kullanılır (Ranjan, 2016; Zhang vd., 2019). Böylece her bir nükleotitin eklenmesinde ışık kaynağı ile birlikte hangi nükleotitin eklendiği görüntülenir ve böylece sırayla eklenen nükleotitler dizilenmiş olur. Dizileme işleminden sonra elde edilen verilerin dizi analizi biyoinformatik araçlar yardımıyla gerçekleştirilir. Bu analizlerle hedeflenen ortamda hangi mikroorganizmaları olduğu ve bunların ne oranda bulunduğu tespit edilebilir (Jagadeesan vd., 2019; Weiss vd., 2019).

Gıdalar bakterisi, maya, küf gibi organizmaları birlikte bulundurur ve bu mikroorganizmalar birbirleriyle etkileşimde bulunarak gıdaların fermantasyonundan sorumludur veya bozulmasına sebep olur. Son yirmi yılda geliştirilen kültürden bağımsız metotlar ile gıda üretimi, depolaması ve dağıtım süreçleri fermantasyon ve bozulma dinamikleri incelenmiştir (Cocolin ve Ercolini 2015; Serra vd., 2019). Gıdalarda gerçekleştirilen bu çalışmaların; gıda patojenlerinin tayini, gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmaların tayini, fermantasyon süresince mikroorganizma değişiminin izlenmesi, potansiyel starter ya da yararlı mikroorganizmaların belirlenmesi gibi çıktıları olmaktadır.

Ülkemizde beyaz peynirin mikrobiyel kompozisyonunun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde genellikle klasik kültürel yöntemler ve biyokimyasal testlerin kullanıldığı, bunun yanında son zamanlarda 16S rRNA dizileme yönteminin öne çıktığı görülmektedir (Hayaloğlu vd., 2002; Ertürkmen vd., 2015; Arslan, 2017).

Arslan (2017) yaptığı çalışmada, Erzurum başta olmak üzere Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladığı beyaz peynirlerden laktik asit bakterilerinin izolasyonunu ve *API, 16S rRNA* gen analizi ve rep-PCR yöntemleri ile identifikasyonunu gerçekleştirmiştir. Buna göre *Lactobacillus kefirii*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Pediococcus lolii*, *Prolinoborus fasciculus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Lysinibacillus sordarius*, *P. parvulus*, *L. paraplantarum*, *Staphylococcus hominis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus yunnanensis*, *Microbacterium paraoxydans* ve *Rothia dentocariosa* türlerine ait 42 adet izolat tanımlanmıştır.

Dec vd. (2016) tarafından kümes hayvanlarından izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin tanımlanması amacıyla yapılan çalışmada 16S-ARDRA ve MALDI-TOF yöntemleri kullanılmış ve sonuçta; *L. salivarius*, *L. johnsonii* ve *L. ingluviei* türleri baskın mikroorganizmalar olarak kaydedilmiştir. Ayrıca MALDI-TOF MS'in diğer yöntemlere kıyasla çok daha hızlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Literatür incelendiğinde, çeşitli fermante gıda ürünlerinin mikrobiyotasının belirlenmesi ve fermantasyon sürecinde rolü olan mikroorganizmaların aydınlatılabilmesi amacıyla yüksek çıktılı yeni nesil dizileme yöntemleriyle çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Bu gıda ürünleri; kefir (Nalbantoğlu vd., 2014; Garofalo vd., 2015; Walsh vd., 2016; Verce vd., 2020), pirinç şarabı (Bora vd., 2016), tahıl sirkesi (Wu vd., 2017), üzüm ve şarap (Sternes vd., 2017; Wei vd., 2018; Cerutti vd., 2019), kakao taneleri (Agyirifo, 2019; Serra vd., 2019), kahve (Pothakos vd., 2020), çiğ süt (Kable vd., 2016; Doyle vd., 2017), sucuk (Ferrocino vd., 2018) ve peynirdir (Wolfe vd., 2014; Dalmasso vd., 2016; Dugat-

Bony vd., 2016; Guidone vd., 2016; Escobar-Zepeda vd., 2016; Domingos-Lopes vd., 2017; Duru vd., 2018; Savaşan ve Beyaz, 2019).

Wolfe vd. (2014) yaptığı çalışmada eskitilmiş peynirin kabuk kısmının mikrobiyel çeşitliliğinin belirlenebilmesi, mikroorganizmaların metabolizmalarının ve fonksiyonlarının araştırılabilmesi ve bu peynirin kabuk kısmını oluşturan mikroorganizmalara ait bir model oluşturulabilmesi amacıyla, Avrupa'dan Amerika'ya 10 farklı ülkede starter kültür kullanılarak üretilen ve olgunlaştırılan 137 adet eskitilmiş peynirin kabuk kısmında PCR bazlı ampikon dizileme yapılmıştır. Bakteri komuniteleri için *16S rRNA* ve küf komuniteleri için *ITS* bölgeleri dizilenmiştir. Çalışmanın sonucunda tüm örneklerde %1'den fazla bulunan ve bu oranla baskın mikroorganizma olan 14 adet bakteri ve 10 adet küf cinsi tespit edilmiştir. Tespit edilen cins sayısının sınırlı olmasının, bu mikroorganizmaların starter kültür kaynaklı olmasından ötürü olduğu bildirilmiştir. Ancak bunun yanında bakterilerin %60'ının küflerin ise %25'lik kısmının starter kültür olmayan mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir. Starter kültür kaynaklı olmayan bu mikroorganizmaların çevresel kaynaklardan gelmiş olabileceği bildirilmiştir. Çevresel kaynaklardan gelen bu mikroorganizmaların peynirlerin yapı, tat, koku gibi özelliklerinin oluşmasında katkısının olabileceği bildirilmiştir.

Guidone vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, farklı asidifikasyon yöntemleri ile üretilen yüksek nemli Mozzarella peynirlerinden alınan örneklerin mikrobiyel kompozisyonu yüksek çıktılı yöntemlerle incelenmiştir. Örneklerden yapılan DNA ekstraksiyon işleminin ardından *16S rRNA* genlerinin V1-V3 bölgeleri amplifiye edilmiş ve pirosekanslama yöntemi ile dizilenmiştir. Kalite kontrol ve filtreleme işlemleri QIIME 1.8.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, starter kültür kullanılan peynirlerde *Streptococcus thermophilus* baskın tür olarak gözlenmiştir. Bunun yanında diğer laktik asit bakterileri ve %0,01-1 oranında bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar gözlenmiştir. Sitrik asit kullanılan 5 örnek ve etiket bilgisi olmayan 5

örnekte ise laktik asit bakterileri, psikotrofik mikroorganizmalar ve Enterobacteriaceae ailesine ait mikroorganizmalardan oluşan yüksek mikrobiyel çeşitlilik gözlenmiştir. Sonuç olarak sitrik asit kullanılan ve etiket bilgisi içermeyen peynirlerin mikrobiyel çeşitliliğinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu yöntemle starter kültürlerle üretilen Mozzarella peynirlerinin diğer yöntemlerle üretilen peynirlerden mikrobiyel açıdan farklılığı kanıtlanmış ve peynir endüstrisinde yapılan hilelerin anlaşılabilceği belirtilmiştir.

Verce vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, kefir mikrobiyotasının belirlenmesi amacıyla shotgun dizileme yapılmış ve yeni bir bakteri türü keşfedilmiştir. Bunun için fermantasyonun 2 farklı aşamasında hem kefir tanelerinden hem de kefirin sulu kısmından olmak üzere 4 örnek alınmıştır. Örneklerden DNA ekstraksiyonu yapılmış, shotgun dizileme Ion PGM cihazında gerçekleştirilmiş ve elde edilen diziler BLAST, Kraken ve Kaiju gibi biyoinformatik araçlar kullanılarak anlamlandırılmıştır. Çalışma sonunda kefirde *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus paracasei* ve çeşitli *Lactobacillus* türleri bulunmuştur. Bunun yanında *Bifidobacterium aquikefiri* ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Dekkera bruxellensis* mayaları da tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada Shothun metagenomik dizileme ile *Oenococcus oeni* ve *Oenococcus kitaharae* türleri ile ilişkili yeni bir *Oenococcus* türü tespit edildiği ve bu türün *Candidatus Oenococcus aquikefiri* olarak isimlendirildiği raporlanmıştır.

SONUÇ

Son yıllarda mikroorganizmaların tanımlanmasında klasik kültürel yöntemlerin yanı sıra genetik materyale dayalı moleküler tekniklerin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Kültüre dayalı moleküler yöntemlerin yanında kültürden bağımsız metagenomik teknolojisi çevresel örneğin taşıdığı mikrobiyel yükün toplam genomunun dizilenmesine olanak sağlaması ile mikroorganizmaların tanımlanmasına ve mikrobiyota çalışmalarına yeni bir bakış açısı getirmiştir. Bu nedenle, endüstriyel olarak üretilen beyaz peynir mikrobiyotasının belirlenmesinde

MALDI-TOF MS temelli kültüromik yaklaşımı ve shotgun dizileme temelli metagenomik teknolojilerin birlikte kullanılması önemli görülmektedir. Bunun yanında beyaz peynir işletmesinde üretim süresince peynire doğrudan ve/veya dolaylı yoldan temas eden ekipman mikrobiyotasının belirlenmesi ve bunun beyaz peynir mikrobiyotasına katkısının aydınlatılması endüstriyel açıdan önem arz etmektedir. Ayrıca, amacı geleneksel gıda ürünlerinin mikrobiyal çeşitliliğini keşfetmek ve bu çeşitliliğin insan sağlığı açısından önemini ortaya koyacak ileri çalışmalar için yenilikçi yöntemlerin değerlendirilmesi gereklidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TAGEM ve MAYSA GIDA tarafından TAGEM/18/AR-GE/31 nolu sayılı proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TAGEM Kurumuna ve MAYSA GIDA'ya teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Bu çalışmada tüm yazarların katkısı eşittir.

KAYNAKLAR

Agyirifo, D.S., Wamalwa, M., Otwe, E.P., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., Ngeranwa, J. (2019). Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities, *Heliyon* 5(7): e02170, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02170.

Anonymous (2009). Türk Gıda Kodeksi. Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (2009/68). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 8 Ocak 2010 tarih ve 27456 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2015). Türk Gıda Kodeksi. Peynir Tebliği (2015/6). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 8 Şubat 2015 tarih ve 29261 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2020) Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü (TEPGE) 2017-

2018 Süt ve Süt Ürünleri Durum Tahmin Raporu. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Durum-Tahmin%20Raporlar%20C4%B1/2017-2018%20Durum-%20Tahmin%20Raporlar%20C4%B1/S%20C3%BCt%20Durum%20Tahmin%20Raporu%202017-2018-305.pdf> (Erişim tarihi: 15 Mart 2020).

Anonymous (2020). Ulusal Süt Konseyi 2018 Süt Raporu. https://ulusalsutkonseyi.org.tr/wp-content/uploads/Sut_Raporu_2018_Web_Kapakli.pdf (Erişim tarihi: 15 Mart 2020).

Arslan, S. (2017). Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, Türkiye, 116 s.

Bora, S.S., Keot, J., Das, S. Sarma, K., Barooah, M. (2016). Metagenomics analysis of microbial communities associated with a traditional rice wine starter culture (*Xaj-pitha*) of Assam, India. *3 Biotech*, 6(2): 153, doi: 10.1007/s13205-016-0471-1.

Breitwieser, F. P., Lu, J., Salzberg, S. L. (2019). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief Bioinform*, 20(4): 1125-1136, doi: 10.1093/bib/bbx120.

Cerit, Z.G. (2020). Beyaz peynir ve süt işleme tesisinden izole edilen mikrobiyotanın karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye 165 s.

Cerutti, F., Cravero, D., Costantini, A., Pulcini, L., Modesto, P., Acutis, P.L., Vaudano, E., Peletto, S. (2019). Impact of DNA purification method and primer selection on 16S rRNA gene metabarcoding on wine. *OENO One*, 53 (3). doi: 10.20870/oenone.2019.53.3.2368.

Cocolin, L., Ercolini, D. (2015). Zooming into food-associated microbial consortia: a 'cultural' evolution. *Curr Opin Food Sci*, 2: 43-50, doi: 10.1016/j.cofs.2015.01.003.

- Dalmasso, A., Río, M.D., Civera, T., Pattono, D., Cardazzo, B., Bottero, M.T. (2016). Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. *Lebensm Wiss Technol*, 69: 490-496, doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.004.
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A. (2016). 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiol*, 16 (105), doi: 10.1186/s12866-016-0732-5
- Deurenberg, R.H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M.A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A.M., Raangs, E.C., Rosema, S., Veloo, A.C., Zhou, K., Friedrich, A.W., Rossen, J.W. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol*, 243: 16-24, doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.022.
- Domingos-Lopesa, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol*, 63:178-190, doi: 10.1016/j.fm.2016.11.014.
- Doyle, C.J., Gleeson, D.E., O'Toole, P.W., Cotter, P.D. (2017). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Appl Environ Microbiol*, 83: 2, doi: 10.1128/AEM.02694-16.
- Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A., Bonnarme, P., Irlinger, F. (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int J Food Microbiol*, 238: 265-273, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026.
- Duru, I.C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., Auvinen, P., Smolander, O.P. (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *Int J Food Microbiol*, 281: 10-22 doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017.
- Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., Coppola, S. (2004). PCR-DGGE Fingerprints Of Microbial Succession During A Manufacture Of Traditional Water Buffalo Mozzarella Cheese. *J Appl Microbiol*, 96(2): 263-70, doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02146.x.
- Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing And Metagenomics: Moving Forward In The Culture-Independent Analysis Of Food Microbial Ecology. *Appl Environ Microbiol*, 79 3148–3155, doi: 10.1128/AEM.00256-13.
- Ertürkmen, P., Öner, Z. (2015) "Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi". Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 19: 9-16, doi: 10.19113/sdufbed.25545.
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce De León, A., Sanchez-Flores, A. (2015). The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet*, 6 (348), doi: 10.3389/fgene.2015.00348.
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., Barucha, M. Q. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol*, 57: 116-127, doi: 10.1016/j.fm.2016.02.004.
- Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E.E., Raggi, L. (2018). Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Sci Rep*, 8, doi: 10.1038/s41598-018-30515-5.
- Ferrocino, I., Bellio, A., Giordano, M., Macori, G., Romano, A., Rantsiou, K., Decastelli, L., Cocolin, L. (2018). Shotgun Metagenomics and Volatilome Profile of the Microbiota of Fermented Sausages. *Appl Environ Microbiol*, 84(3): e02120-17. doi: 10.1128/AEM.02120-17.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., Filippis, F.D., Stellato, G., Mauro, S.D., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., Clementi, F. (2015). Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian

- regions. *Food Microbiol*, 49: 123-133, doi: 10.1016/j.fm.2015.01.017.
- Guidone A., Zotta, T., Matera, A., Ricciardi, A., Filippis, F.D., Ercolini, D., Parente, E. (2016). The microbiota of high-moisture mozzarella cheese produced with different acidification methods. *Int J Food Microbiol*, 216: 9–17, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.002.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(4): 669-685, doi: 10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004.
- Harnpicharnchai, P., Jaresitthikunchai, J., Seesang, M., Jindamorakot, S., Tanapongpipat, S., Ingsriswang, S. (2020). Characterization of Yeast and Bacterial Type Strains with Food and Agricultural Applications by MALDI-TOF Mass Spectrometry Biotypin. *Hanguk Misaengmul Saengmyong Konghakhoe Chi*, 48(2): 138-147. doi: 10.4014/mbl.1910.10008.
- Hayaloğlu, A.A., Güven, M., P. F. Fox. (2002). Microbiological, Biochemical and Technological Properties Of Turkish White Cheese 'Beyaz Peynir'. *Int Dairy J*, 12(8): 635-648. doi: 10.4172/2572-4134.1000117.
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M.W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffron, S., Vossen, J.V., Tang, S., Katase, M., McClure, P., Kimura, B., Chai, L.C., Chapman, J., Grant, K. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food microbiol*, 79: 96-115, doi: 10.1016/j.fm.2018.11.005.
- Jonnala, B.R.Y., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., Cotter, P.D. (2018). Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Front Microbiol*, 23(9): 1020, doi: 10.3389/fmicb.2018.01020.
- Jongman, M., Carmichael, P.C., Bill, M. (2020). Technological Advances in Phytopathogen Detection and Metagenome Profiling Techniques, *Curr Microbiol*, 77: 675–681, doi: 10.1007/s00284-020-01881-z.
- Kable, M.E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J.L., Mcleod, J., Heidenreich, J.M., Marco, M.L. (2016). The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. *mBio*, 7, doi: 10.1128/mBio.00836-16.
- Kader, T., Goode, D. L., Wong, S. Q., Connaughton, J., Rowley, S. M., Devereux, L., Byrne, D., B. F., Stephen, Arnau, G. M., Tothill, R. W., Campbell I. G., Gorringer, K. L. (2016). Copy number analysis by low coverage whole genome sequencing using ultra low-input DNA from formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue, *Genome Med*, 8(121), doi: 10.1186/s13073-016-0375-z.
- KEGG GENOME Database (2020). Organisms and ecosystems with genome sequence information. <https://www.genome.jp/kegg/genome.html> (Erişim tarihi: 20 Şubat 2020).
- Knight R., Vrbnac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R.A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhu, Q., Caporaso J. G., Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes, *Nat Rev Microbiol*, 16: 410–422, doi: 10.1038/s41579-018-0029-9.
- Lagier, J., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Lévassieur, A., Rolain, J.M., Fournier, P.E., Raoult, D. (2018). Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*, 16: 540–550, doi: 10.1038/s41579-018-0041-0.
- Liu, X. (2016). Microbiome. *Yale J Biol Med*, 89(3): 275–276, doi: 10.3389/fmicb.2017.02224.
- Nair, H.P., Bhat, S.G. (2020). Metagenomic data on bacterial diversity profiling of Arabian sea sediment by amplicon sequencing, *Data Brief*, 28, doi: 10.1016/j.dib.2019.104791.
- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., Flahaut, C. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *Int J Food Microbiol*, 247: 2-8, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005.

- Nalbantoğlu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K., Can, H., (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiol*, 41: 42-51, doi: 10.1016/j.fm.2014.01.014.
- Parente, E., Ricciardi, A., Zotta, T. (2020). The microbiota of dairy milk: A review. *Int Dairy J*, 107: 104714, doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104714.
- Pothakos, V., Vuyst, L.D., Zhang, S.J., Bruyn, F.D., Verce, M., Torres, J., Callan, M., Moccand, C., Weckx, S. (2020). Temporal shotgun metagenomics of an Ecuadorian coffee fermentation process highlights the predominance of lactic acid bacteria. *Curr Res Biotechnol*, 2:1-15, doi: 10.1016/j.crbiot.2020.02.001.
- Prescott, S.L. (2017). History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. *Hum Microb J*, 4: 24-25, doi: 10.1016/j.humic.2017.05.004.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A.A., McGee, H.S., Perkins, D.L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*, 469(4): 967-977, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.083.
- Santos, I.C., Hildenbrandbc, Z.L., Schug, K.A. (2016). Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, 141: 2827-2837, doi: 10.1039/C6AN00131A.
- Savaşan, S., Beyaz, D. (2019). Erken Olgunlaşma Dönemindeki Geleneksel Peynir Mikrobiyomunun Metagenomik Analizi. *Vet Mikrobiyol*, 30(1): 27-35, doi: 10.35864/EVMD.586548.
- Serra, J.L., Moura, F.G., Pereira, G.V., Soccol, C.R., Rogez, H.L., Darnet, S. (2019). Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. *Lebensm Wiss Technol*, 106: 229-239, doi: 10.1016/J.LWT.2019.02.038.
- Sielaff, A.C., Urbaniak, C., Mohan, G.B., Stepanov, V.G., Tran, Q.H., Wood, J.M., Minich, J.J., McDonald, D., Mayer, T., Knight, R., Karouia, F., Fox, G.E., Venkateswaran, K. (2019). Characterization of the total and viable bacterial and fungal communities associated with the International Space Station surfaces. *Microbiome*, 7, doi: 10.1186/s40168-019-0666-x.
- Stellato, G., Filippis, F.D., Storia, A.L., Ercolini, D. (2015). Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Appl Environ Microbiol*, 81(22): 7893-7904, doi: 10.1128/AEM.02294-15.
- Sternes, P.R., Lee, D., Kutyna, D.R., Borneman, A.R. (2017). A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *GigaScience*, 6: 1-10, doi: 10.1093/gigascience/gix040.
- Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V.M., Spina, A.A., Soggiu, A., Britti, D., Roncada, P., Piras, C. (2019). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *J proteomics*, 210: 103534, doi: 10.1016/j.jprot.2019.103534.
- Togay, S.O., Capece, A., Siesto, G., Aksu, H., Altunatmaz, S.S., Aksu, F., Romano, P., Yuceer, Y.K. (2020). Molecular characterization of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses. *Food Sci Technol*, doi: 10.1590/fst.24319.
- Topçu, A., Saldamli, I. (2006). Proteolytical, Chemical, Textural and Sensorial Changes During the Ripening of Turkish White Cheese Made of Pasteurized Cows' Milk. *Int J Food Prop*, 9: 665-678, doi: 10.1080/10942910500542238.
- TÜİK (2020). Süt ve Süt Ürünleri Raporu Sayı: 33697, https://ulusalsutkonseyi.org.tr/wp-content/uploads/Haber_Bulteni_mart_2020.pdf (Erişim Tarihi: 10 Temmuz 2020).
- Tunail, N. (2009). *Mikrobiyoloji*. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 434 s. ISBN: 978605-603-62-0-0.
- Verce, M., Vuyst, L.D., Weckx, S. (2020). The metagenome-assembled genome of *Candidatus Oenococcus ariquefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*. *Food Microbiol*, 88: 103402, doi: 10.1016/j.fm.2019.103402.

- Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K., O'Sullivan, O., O'Sullivan, M. G., Claesson, M. J., Cotter, P. D. (2016). Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir. *mSystems*, 1(5): e00052-16, doi: 10.1128/mSystems.00052-16.
- Wei, Y. J., Wu, Y., Yan, Y. Z., Zou, W., Xue, J., Ma, W. R., Wang, W., Tian, G., Wang, L. Y. (2018). High-throughput sequencing of microbial community diversity in soil, grapes, leaves, grape juice and wine of grapevine from China. *PLoS one*, 13(3):e0193097, doi:10.1371/journal.pone.0193097.
- Weiss, H., Hertzberg, V.S., Dupont, C., Espinoza, J.L., Levy, S., Nelson, K., Norris, S., The FlyHealthy Research Team (2019). The Airplane Cabin Microbiome. *Environ Microbiol*, 77(1):87-95, doi: 10.1007/s00248-018-1191-3.
- Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M., Dutton, R. J. (2014). Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, 158(2): 422-433, doi: 10.1016/j.cell.2014.05.041.
- Wu, L., Lu, Z., Zhang, X., Wang, Z., Yu, Y., Shi, J., Xu, Z. (2017). Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota. *Food microbiol*, 62, 23-31, doi: 10.1016/j.fm.2016.09.010.
- Yılmaz R., Temiz, A. Açık, L., Çelebi Keskin, A. (2015). Genetic Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated from Raw Milk Samples Collected from Different Regions of Turkey, *Food Biotechnol*, 29(4): 336-355, doi: 10.1080/08905436.2015.1092091.
- Zhang, L., Loh, K., Lim, J.W., Zhang, J. (2019). Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev*, 100: 110-126, doi: 10.1016/J.RSER.2018.10.021.
- Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinckii* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(4): 2782–2858, doi: 10.1099/ijsem.0.004107.
- Zhou, L.M., Proctor, L.M., Creasy, H., Fettweis, J.M., Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Zhou, W., Buck, G.A., Snyder, M.P., Strauss, J.F., Weinstock, G.M., White, O.L., Huttenhower, C. (2019). The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 569: 641-648, doi: 10.1038/s41586-019-1238-8.