



## GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDE METAGENOMİK YAKLAŞIMLAR

Yeşim Aktepe\* , İbrahim Çakır

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu

Geliş /Received: 29.08.2023; Kabul /Accepted: 03.11.2023.2023, Online baskı /Published online: 11.11.2023

Aktepe, Y., Çakır, İ. (2023). Gıda mikrobiyolojisinde metagenomik yaklaşımlar. GIDA (2023) 48 (6) 1230-1243 doi: 10.15237/ gida.GD23101

Aktepe, Y., Çakır, İ. (2023). Metagenomic approaches in food microbiology. GIDA (2023) 48 (6) 1230-1243 doi: 10.15237/ gida.GD23101

### ÖZ

Gıda mikrobiyolojisinde kullanılan klasik kültürel yöntemler ile gıdaların mikrobiyotalarının tam olarak tanımlanamaması sorunu üzerine kültüre bağlı olmayan moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Kültüre bağlı olmayan yöntemlerden olan metagenomik çalışmalarda kültürlenme adımı olmaksızın direkt DNA izolasyonu ile mikroorganizmaların tanımlaması yapılabilmektedir. Bu sayede mikrobiyota içerisinde yer alan fakat kültüre edilemediği için tanımlanamayan mikroorganizmalarında tanımlanması mümkün kılınmaktadır. Gıda mikrobiyolojisi alanında incelenen kültür ortamlarının mikrobiyotasının sahip olduğu mikrobiyel çeşitlilik, ampikon dizileme (hedefli dizileme) ve shotgun metagenomik yaklaşımları kullanılarak belirlenmekte olup her iki yöntemin de avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Metagenomik son yıllarda gıda endüstrisinde özellikle gıda mikrobiyolojisi ve gıda güvenliği alanlarında yardımcı disiplin olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Özellikle fermente gıdaların üretimindeki karmaşık mikrobiyel aktivitenin tespiti üzerine yapılan çalışmalar ve gıdaların bozulmasında yer alan mikrobiyel toplulukların incelenmesini hedefleyen çalışmaların sayısı giderek artmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Metagenomik, kültüre bağlı olmayan yöntemler, fermente gıda

## METAGENOMIC APPROACHES IN FOOD MICROBIOLOGY

### ABSTRACT

Molecular methods that do not depend on culture have been developed to address the problem of not fully identifying the microbiota of foods with the classical cultural methods used in food microbiology. In metagenomic studies, which are culture-independent methods, microorganisms can be identified by direct DNA isolation without the culturing step. In this way, it is possible to identify microorganisms that are present in the microbiota but cannot be identified because they cannot be cultured. The microbial diversity of the microbiota of culture media studied in the field of food microbiology is determined using amplicon sequencing (targeted sequencing) and shotgun metagenomic approaches, and both methods have advantages and disadvantages. In recent years, metagenomics has been frequently preferred as an auxiliary discipline in the food industry, especially in the fields of food microbiology and food safety. In particular, the number of studies aimed at detecting complex microbial activity in the production of fermented foods and the examination of microbial communities involved in food spoilage is increasing.

**Keywords:** Metagenomics, culture-independent method, fermented foods

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author:

✉: yesimaktepe@gmail.com

☎: (+90) 536 438 3752

Yeşim Aktepe; ORCID: 0009-0001-8282-4446

İbrahim Çakır; ORCID: 0000-0001-7775-1871

## GİRİŞ

Moleküler tekniklerin gelişmesi ve yaygın olarak kullanılması ile fermente gıdaların mikrobiyotasını oluşturan mikroorganizmalara ilişkin çalışmalar 21. yüzyılın başından itibaren ciddi bir artış göstermiştir. Klasik moleküler yöntemler, mikroorganizmaların tanımlanması ve karakterizasyonu ile ilgili önemli çıktılar sağlamakla birlikte fermentasyon süreçlerinde birçok mikroorganizma kültür ortamında gelişemediği için yalnızca kültüre bağlı yöntemler kullanılarak bir mikrobiyel ekosistemin dinamiklerinin tam olarak anlaşılamayacağı bildirilmiştir. Bu durum kültüre bağlı olmayan yöntemler üzerinde daha çok araştırma yapılmasına yol açmıştır (Gündoğdu, 2018; Goolam Mahomed vd., 2021; Uçarlı, 2022; Bal vd., 2022; Soman vd., 2022). Gıda mikrobiyolojisinde klasik kültürel yöntemlerin ilk basamağı saf kültür eldesidir. Ancak, laboratuvarlarda kullanılan standart kültüre alma tekniklerinin, belirli bir gıda numunesinin mikroorganizma çeşitliliğinin çok sınırlı bir kısmı hakkında bilgi sahibi olmamızı sağladığı tahmin edilmektedir. Son yıllarda klasik yöntemler ile kültürü yapılamayan mikroorganizmaların gelişmesi noktasında önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, kültürden bağımsız teknikler, bir mikrobiyel ekosistemde yer alan birçok türün içerdiği genetik bilgiye erişmek için daha elverişli bir yöntem olarak görülmektedir (Wang vd., 2021; Billington vd., 2022). Kültüre bağlı olmayan yöntemler, fermente bir gıda ürününde yer alan mikrobiyotanın incelenme şeklini değiştirmeye yardımcı olmuş ve mikrobiyel popülasyonların “konsorsiyumlar” olarak kabul edilmesini sağlamıştır. Yüksek verimli dizileme (High Throughput Sequencing; HTS), polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; PCR-DGGE) gibi teknolojilerinin ortaya çıkması ile son on yılda mikrobiyel ekoloji konulu çalışmalar başta olmak üzere birçok alanda metagenomik uygulanmasını artırmış ve daha fazla araştırma yapılmasını teşvik etmiştir (Ferrocino ve Cocolin, 2017; Hora, 2018; Billington vd., 2022).

Metagenomik analizler, ampikon dizileme ve shoutgun metagenomik olarak iki farklı yaklaşımla

gerçekleştirilmektedir. Çalışmanın ilk adımı olarak çalışmadan beklenen sonuçlar ve çalışmanın bütçesi göz önünde bulundurularak her iki tekniğin avantaj ve dezavantajlarını hesaba katarak uygun yöntemi belirlemektir.

## METAGENOMİK ANALİZ

Metagenomik analiz, mikroorganizma kültürü yapılmaksızın numuneden direkt DNA izolasyonu ile tür tayininin yapılmasına (Hardwick vd., 2018; Koutsoumanis, 2019; Görkem vd., 2021), genetik çeşitliliğinin, popülasyon yapısının, bu mikroorganizmaların ekolojik rollerinin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri ile fonksiyonel özellikleri hakkında da faydalı bilgiler sağladığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Bal vd., 2022; Cerit, 2022; Chen vd., 2022; Uçarlı, 2022).

Metagenomik, iki farklı yaklaşımla mikrobiyotayı ele almaktadır. İlk yaklaşım incelenen mikrobiyotanın üyeleri arasında var olan karmaşık ilişkinin ortaya konmasını hedeflemektedir. İkinci yaklaşımda amaç çalışmalardan elde edilen binlerce farklı genleri içeren bir veri bankasının oluşturulmasıdır (Uçarlı, 2022).

Mikrobiyel çeşitlilik, ampikon dizileme (hedefli dizileme) ve shotgun metagenomik yaklaşımları kullanılarak belirlenmektedir. Her iki yöntemin de birbirine kıyasla avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Metagenomik çalışmaya başlamadan önce hangi tekniğin kullanılacağına tanımlanmak istenilen mikrobiyel topluluğun özelliklerine, çalışmaya ayrılan bütçeye, uygulama aşamasında gerekli teknik uzmanlık gereksinimlerine karar verilerek seçim yapılmalıdır. Örneğin; bir fermente bir gıdanın mikrobiyotasındaki laktik asit bakterilerini (LAB) tanımlamak için hedefli ampikon metagenomik yaklaşımı kullanılması daha uygunken; shotgun metagenomik yaklaşımı ile numunenin içerdiği tüm mikrobiyotanın tanımlanması mümkündür (Hora, 2018; EFSA, 2019; Cerit, 2022).

## Ampikon dizileme

Ampikon dizilemede, prokaryotlar için 16S rRNA geni (EFSA, 2019) ve genler arası

kopyalanmış aralayıcılar (Intergenic Transcribed Spacers; ITS) veya ökaryotlar için büyük ribozomal alt birim (Large Ribosomal Subunit; LSU) geni gibi taksonomik bilgilendirici primerler kullanılarak DNA'nın belirli bölgeleri çoğaltılmaktadır (Hora, 2018; Calle, 2019; Amrouche vd., 2020; Johnny vd., 2021). Prokaryot mikroorganizmaların tanımlanmasında 16S rRNA bölgesi en çok tercih edilen gen bölgesi olmasına karşın, 23S rRNA gen bölgesi kullanılarak da ayırım yapılabilmektedir. Ökaryot mikroorganizmaların analizinde ise, 18S rRNA geni; küf popülasyonları ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise ITS tercih edilmektedir. Fakat ITS dizileri bazı durumlarda tam olarak türler arasında ayırım sağlayamadığı için beta tubulin, calmodulin gibi gen bölgeleri başarılı bir filogenetik ayırım için son yıllarda tercih edilmektedir (Savran ve Erden, 2019; Jagadeesan vd., 2019; Cerit, 2022, Ezeonuegbu vd., 2022). Ribozomal genler son yıllarda filogenetik markör olarak kullanılmaktadır, bu markörler hemen hemen tüm mikroorganizmalarda taksonomik ayırım sağladığı için birçok veri tabanında temsil edilmektedirler (Savran ve Erden, 2019; Uçarlı, 2022). Dezavantajları ise; tür düzeyinde düşük çözünürlük, ribozomal genler toplam genomun %0.1'inden daha azını oluşturduğu için örnekte çok az miktarda bulunması ve markörün amplifikasyonu engellemesi sayılabilir (Savran ve Erden, 2019; Jagadeesan vd., 2019; Uçarlı, 2022).

Aydın vd. (2022), fonksiyonel ve biyoçeşitliliğe sahip kefir üretimi için kefire antosiyanin eklenmesi üzerine yürüttükleri çalışmada siyah havuçtan elde edilen antosiyanin ekstraktları fermantasyon işlemi sırasında kefir karışımına farklı konsantrasyonlarda (%1 ve %5) eklemiştirler. Daha sonra bu kefir örnekleri metagenomik analiz ile mikrobiyolojik özellikleri açısından analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda, antosiyanin ilavesinin kefir mikrobiyomunun topluluk yapısı üzerinde önemli etkileri olduğunu ve bunun da içeceğin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini doğrudan artırdığını göstermiştir. Antosiyanin içeren kefir örneklerinin filogenetik çeşitliliğinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Antosiyanin içermeyen kefirde ağırlıklı olarak *Lactococcus lactis* (%34) ve *Lactobacillus kefir* (%34)

gibi probiyotik bakteriler yer alırken; %1 antosiyanin içeren kefir örneklerinde probiyotik türlerin daha dengeli bir dağılımı tespit edilmiştir.

Gıdaların bozulması sonucu oluşan küf türlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen bir çalışmada çavdar ekmekleri plastik ambalajıyla depolama süresi dolacak şekilde muhafaza edilmiş, depolama süresi sonunda çavdar ekmeğinde gelişen küfler M13 primeri ile RAPD-PCR tekniği ile tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda çavdar ekmeklerinde gelişen küf türleri; *Aspergillus chevalieri*, *A. flavus/oryzae*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *Penicillium citrinum* ve *P. corylophilum* olarak tespit edilmiştir (Emenli ve Gündüz, 2019).

### Shotgun metagenomik

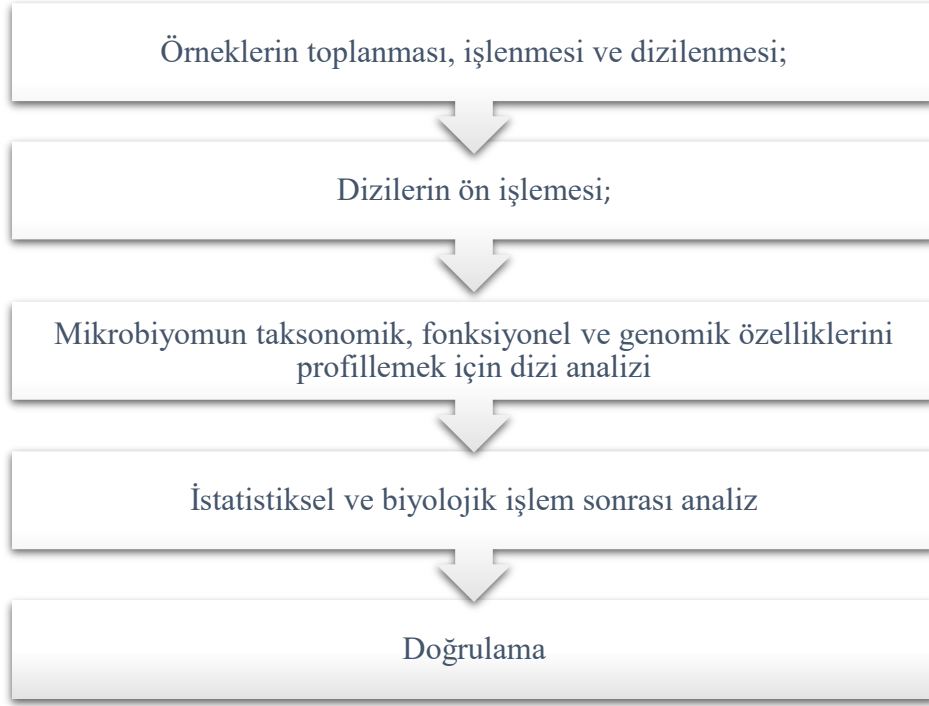
Shotgun metagenomik, bir örneğin içerdiği genomların tamamının ("meta-") hedefsiz olarak ("shotgun") dizilenmesini ifade eden bir kavramdır; Şekil 1'de gösterilmiş olduğu gibi ilk çalışma tasarımı sonrasında beş adımdan oluşmaktadır (Thomas vd., 2012; Hora, 2018; EFSA, 2019; NIST, 2020).

Shotgun dizileme tekniğinin birçok avantajı bulunmaktadır. İncelenen örneğin sahip olduğu mikrobiyotanın analiz edilmesini ve bu mikrobiyotanın fonksiyonel açıdan kullanılabilirliği belirlenebilir. Örneğin sahip olduğu metabolik üretme kapasitesi, örneğin mikrobiyotası tespit edildikten sonra daha net bir şekilde ortaya konacaktır. Shotgun dizileme sayesinde birçok mikroorganizmanın tür düzeyinde daha ayrıntılı sınıflandırılması yapılmakla beraber daha önce tanımlanmamış genleri de tespit edilebilmektedir. Çalışma konusu olan örneğe shotgun dizileme uygulandığında örneğin sahip olduğu mikrobiyotanın genomlarının net bir şekilde tespit edilmesi beklenmektedir (Calle, 2019; EFSA, 2019).

Shotgun dizileme tekniğinin aynı zamanda bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemde her adımı gerçekleştirmek için çok sayıda deneysel ve hesaplamalı işlem gerektiğinden, araştırmacıların bu yöntemleri tercih etme konusunda çekimser kalmasına neden olmaktadır (Choudhari vd., 2022). Shotgun metagenomik analizler, basit

görünmesine rağmen, deneysel işlemlerin deneyim gerektirmesi, biyoinformatik analizler ve bunların sonuçlarının yorumlarındaki karmaşık

işlem süreçleri nedeniyle, bazı sınırlamaları barındırmaktadır (Brown vd., 2019; Ekici, 2019; Ye vd., 2019; Uçarlı, 2022).

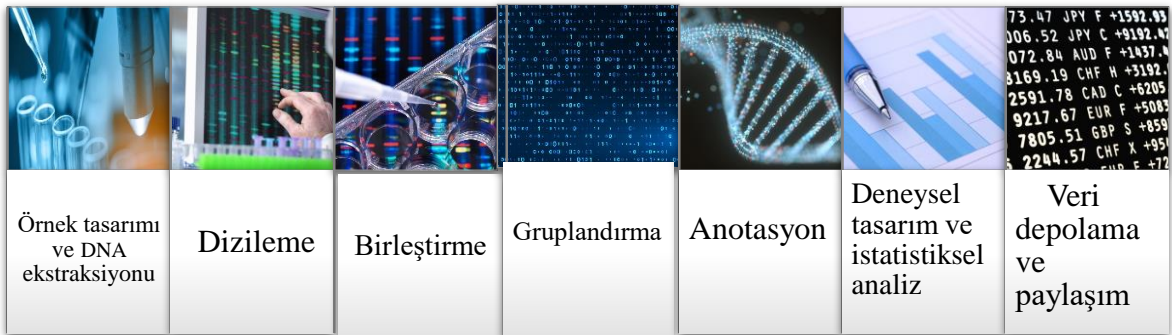


Şekil 1. Shoutgun metagenomik işlem basamakları

### METAGENOMİK ANALİZ AŞAMALARI

Kültüre bağlı olmayan bir çalışma yürütüldüğünde öncelikle uygulanması gereken en önemli adım örnekten nükleik asit izolasyonudur (Thomas vd., 2012; Hora, 2018; Kaygusuz, 2019). İzole edilen DNA'nın örnekte bulunan tüm hücreleri temsil etmesi ayrıca sonraki adımlar olan dizileme ve kütüphane oluşturma için yüksek kaliteye sahip ve

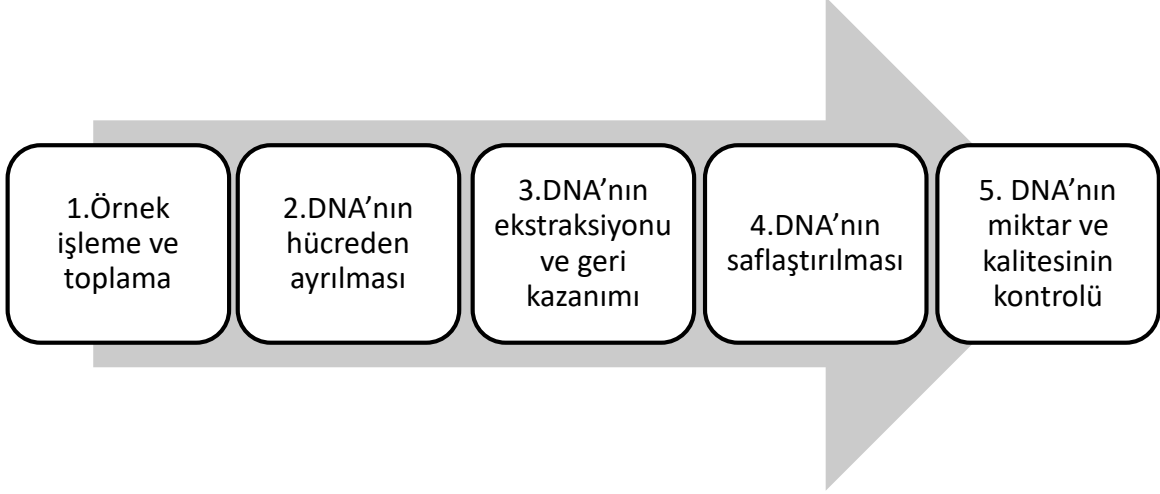
yeterli miktarda olması gerekmektedir (Cerit, 2022). DNA izolasyonu yapılırken DNA'nın hücre bileşenlerinden ve çevresel bulaşlar ile kontamine olmaması gerekmektedir (Tekin ve Kocaman, 2020; Billington vd., 2022). Şekil 2'de metagenomik analizin işlem basamakları gösterilmiştir.



Şekil 2. Metagenomik analiz işlem basamakları

DNA ekstraksiyonu, çalışılan mikroorganizma çeşidine ve türüne göre değişmekle birlikte esas olarak beş temel aşamada gerçekleştirilmektedir

(Şekil 3) (Erdoğan, 2019; Tekin ve Kocaman, 2020).



Şekil 3. DNA ekstraksiyonu işlem basamakları

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin uygulanmaya başlamasıyla birlikte, mikroorganizmaların konakçı hücre ile etkileşimleri sonucu oluşan sağlıklı veya hastalıklı bir durumun ortaya çıkış mekanizması ayrıntılı olarak tespit edilebilmektedir (Albanese ve Donati, 2017).

NGS teknolojileri, mikrobiyotanın sahip olduğu üyelerin belirlenmesi, metabolik aktiviteleri hakkında ayrıntılı bilgi edinilmesi için etkili ve önemli bir aşama olarak karşımıza çıkmaktadır. NGS teknolojilerindeki ilerlemeler, doğruluk oranı yüksek veri sağlamanın yanı sıra hızlı ve uygun maliyetli bir yaklaşım da sağlamaktadır (Thomas vd., 2012). Dizileme teknolojisinde zaman ve maliyet başlıca zorluklar olarak görülmektedir. NGS'nin klasik dizilime göre avantajları ise uygun maliyetli oluşu, klonlama adımı olmadığı için daha az zaman gerektirmesi ve minimum teknik uzmanlık gerektirmesi olarak sayılabilir. Bununla birlikte, NGS teknolojisi sonucunda elde edilen milyonlarca dizinin analizi aşamasındaki fazla iş yükü en büyük dezavantaj olarak kabul edilmektedir. NGS platformları mikrobiyom araştırmalarının başarılı şekilde gerçekleştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır (Arumugam vd, 2019; Karabudak ve Akkuş,

2022). Yeni nesil dizileme teknikleri arasında çalışma başında yapılacak olan seçim çalışmanın amacı ve çalışmadan beklenen çıktılar doğrultusunda yapılmalıdır.

Birleştirme, okunan kısa DNA dizilerinin anlamlı bir şekilde bir araya getirilerek özgün DNA'nın oluşturulduğu adımdır. Bu adımda yüksek polimorfizm olduğunda dizilerin birleştirilmesinde sorunlar yaşanabilmektedir (Thomas vd., 2012). Gruplama ("Binning") adımı birleştirme adımı sonrası elde edilen DNA dizilerini, sahip oldukları genomlara göre gruptandırıldığı aşamadır. Anotasyon yapılan birleştirme sonrasında elde edilen DNA'nın sahip olduğu özelliklerin ortaya konduğu adımdır (Thomas vd., 2012).

Metagenomik çalışmalar için hem verilerin hem de hesaplama sonuçlarının doğru bir şekilde paylaşılabilmesi için var olan meta veriler ve hizmetler (ör. IMG/ M, KAMERA ve MG-RAST) geliştirilmelidir (Khan vd., 2022).

#### **METAGENOMİK ANALİZLERİN GIDA ALANINDA KULLANIMI**

Metagenomik yöntemlerin ilaç, biyoyakıt, biyoteknoloji, tarım, ekoloji ve tıp gibi birçok

farklı alanlarla birlikte gıda mikrobiyolojisi, gıda biyoteknolojisi ve gıda güvenliği alanlarında da kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Kergourly vd.,2015; Bal vd., 2022).

Metagenomik yaklaşımların gıda güvenliği alanında gıdalarda bozulmaya sebep olan mikrobiyotanın tespiti amacıyla kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Gıda güvenliğinde metagenomik yöntemler ile gıda kaynaklı salgın hastalıklarda hangi suşların yer aldığı ve taşıdıkları direnç faktörleri de tespit edilebilmektedir (Jagadeesan vd., 2019).

Gıda işleme ve depolama süreçlerinin gıdaların mikrobiyotası üzerinde etkilerinin aydınlatılması konusunda yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Depolama süresince mikrobiyotada yer alan baskın tür ve alt türlerin tespit edilmesi, depolamadaki değişkenlerden nasıl etkilendiklerinin ortaya konması metagenomik uygulamalarıyla mümkündür. Zhuang vd. (2022) yaptıkları çalışmada Asyada tüketimi oldukça popüler olan bir balık türünün (*Ctenopharyngodon idella*) soğuk depolanması sırasında, depolamanın 4., 8. ve 12. günlerinde mikrobiyotasının değişimini metagenomik yaklaşımla ortaya koymuşlardır.

Metagenomik tabanlı analizlerin, gıda üretim ve işleme ortamlarının mikrobiyolojik yükünün belirlenmesinde de kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Bu tür yaklaşımları benimseyerek, mikrobiyel kontaminasyon kaynaklarını daha doğru bir şekilde belirlemek, bu tür kirleticiler için kritik kontrol noktalarını belirlemek, gelecekte gıda kalitesi ve güvenliği sağlamada önemli katkılar sağlayacağı ifade edilmektedir (Aw vd., 2016; Doyle vd., 2017).

Cerit, (2022) yürüttüğü çalışmada süt ürünleri üretim tesisinden hem alet ekipmandan hem de üretilen ürünlerden numune alarak Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon - Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) analizine dayalı kültüromik ve shotgun metagenomik dizileme yöntemleriyle mikrobiyotanın belirlenmesini gerçekleştirmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, metagenomik analizlerle

elde edilen biyoçeşitliliğin, kültüromik yöntemle edilene kıyasla daha zengin olduğu bildirilmiştir. Metagenomik yöntemler ile örneklerde *Lactococcus* cinsine ait 11 tür, *Streptococcus* cinsine ait 64 tür *Enterococcus* cinsine ait 46 tür, *Lactobacillus* cinsine ait 54 tür ve *Pediococcus* cinsine ait 2 tür tanımlanırken, MALDI-TOF MS yönteminde *Lactococcus* cinsine ait 1 tür, *Enterococcus* cinsine ait 4 tür, *Lactobacillus* cinsine ait 5 tür, *Streptococcus* cinsine ait 1 tür ve *Pediococcus* cinsine ait 1 tür tanımlanabilmiştir.

Gıda üretiminde tarladan sofraya kadar geçen süreçte farklı birçok kaynaktan kontaminasyon oluşabilmekte, bunun sonucunda da gıda güvenliği riski oluşmaktadır (Aw vd., 2016; Billington vd., 2022). Klasik kültürel yöntemler ile bunların tümünü doğru bir şekilde tespit etmek hem zaman hem de iş gücü açısından dezavantaj oluşturmaktadır. Bu tür yaklaşımları benimseyerek, mikrobiyel kontaminasyon kaynaklarını daha doğru bir şekilde belirlemenin, bu tür bulaşanlar için kritik kontrol noktalarını belirlemenin gelecekte gıda kalitesi ve güvenliğini sağlamada önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Benzer şekilde, süt üretiminde çiğ sütün kontaminasyonu ortamdaki çeşitli alet ve ekipmanların mikrobiyel yüküne bakılarak, yaklaşık bir değerde tespit edilebilmektedir. Gelecekte ise çiğ süt üretiminin tüm aşamalarındaki (hayvan, çiftçi, alet ekipman, ortam havası vb.) mikrobiyota tespit edilip kontaminasyon riskinin en aza indirilebileceği düşünülmektedir (Doyle vd., 2017), diğer taraftan hayvancılık ve ürünlerinin üretiminin tüm aşamalarındaki kontaminasyon sonucu bulaşanların tespit edilmesinde tekniğin kullanımı ile mikrobiyel kalitesi yüksek ürün üretimi sağlanabilecektir (Billington vd., 2022). Şarap üretiminde olgunlaştırma aşamasında kullanılan fıçılarda mikrobiyotasının, şarabın olgunlaşma aşamasında değişmesi beklenen değerler üzerine ne gibi katkılar sağladığı; peynir üretiminde olgunlaşma aşamasında iç ve dış faktörlerden kaynaklanan mikroorganizmaların peynir üzerindeki etkilerinin ne olacağı konularında da metagenomik yöntemlerin kullanım potansiyeli bulacağı tahmin edilmektedir (Doyle vd., 2017; Billington vd., 2022).

Kothe vd. (2022) Brezilya'ya özgü geleneksel bir çeşidinin mikrobiyotasının metagenomik analizle ortaya konmasını amaçladıkları çalışmalarında, kültürel yöntemlerle daha önce bu peynir türünde tespit edilemeyen *Debaryomyces hansenii*, *Kodamaea ohmeri*, *Trichosporon* spp. nin varlığı tespit edilmiştir.

Görkem vd. (2021) beyaz peynir örneklerinin mikrobiyotasını kültüre bağlı olan ve kültürden bağımsız teknikleri kullanarak belirlemeye yönelik yürüttükleri çalışma sonucunda; bu tarz geleneksel gıdalarımızın mikrobiyotasının kültürden bağımsız tekniklerle daha net ve ayrıntılı olarak ortaya koyulabileceğini bildirmişlerdir.

Kergourly vd. (2015) ise çalışmalarında peynir örneklerinin genetik ve fonksiyonel metagenomik profilini çıkarmışlardır. Bu çalışma sonucunda, peynir mikrobiyotasını oluşturan işlevsel bir genomik katalog oluşturulmuş ve farklı geleneksel peynirlerin yüzeyinde bulunan mikrobiyotalar tespit edilmiştir.

Savaşan ve Beyaz (2019) çiğ koyun sütü kullanılarak özellikle dağlık bölgelerde sıklıkla üretimi yapılan peynir örneklerinin metagenomik analiz ile mikrobiyotalarının tespit edilmesi amacıyla yürüttükleri çalışmada *Firmicutes* oranının ortalama %91.5 ile en yaygın filum olduğu, *Actinobacteria*'nın ise %0.01 ile en seyrek filum olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada peynir örneklerinin mikrobiyotasında 25 farklı cins tespit edilmiştir. Bu cinslerden 23 tanesinin tüm incelenen örneklerde mevcut olduğu, ayrıca örneklerden en sık izole edilen türün ortalama %84 ile *L. lactis* olduğu belirlenmiştir.

### **GIDA MİKROBİYOTASININ KARAKTERİZASYONDA METAGENOMİK ANALİZLERİN KULLANIMI**

Gıda mikrobiyel ekolojisinin belirlenmesinde, taksonomik öneme sahip genleri hedef alarak analiz yapılan amplikon tabanlı HTS en yaygın olarak kullanılan yaklaşımdır (Chen vd., 2017). Geleneksel ve fermente gıdaların tüketiminin sağlığımız üzerindeki pozitif etkileriyle ilgili literatür bilgileri arttıkça; bu gıdaların tüketimi de

oldukça popüler hale gelmektedir (Bozdemir, 2021). Bu gıdaların mikrobiyotasının tanımlanması ve fermentasyon sırasında oluşan ürünlerin hangi aşamada hangi mikroorganizmalar tarafından üretildiğinin tespiti, bu alanda en önemli araştırma konuları haline gelmiştir. Bu tarz araştırmaların artmasıyla birlikte bir yandan geleneksel gıdaların gelecek nesillere aktarımında daha fazla bilimsel veri üretilirken, diğer taraftan fermente gıda üretimi için yeni starter kültürler geliştirilmesinde önemli ilerlemeler sağlanmaktadır (Kergourly vd., 2015).

Fermente gıdaların mikrobiyotasını tam anlamıyla tanımlamanın bir başka önemli katkısı ise gıdanın üretim şekli hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlamasıdır. Geleneksel yöntemlerle üretilen gıdaların üretimi esnasında tüm aşamalarda gıdanın mikrobiyotasında çeşitliliğe neden olacak aşamalar bulunurken; endüstriyel yöntemlerle üretilen gıdaların mikrobiyotasındaki çeşitliliğin nispeten daha az olduğu görülmektedir (Ercolini, 2013). Fermente gıdaların mikrobiyotasının metagenomik yöntemlerle tespiti ilk olarak 2009 yılında Burkina'da üretimi gerçekleştirilen fermente yulaf ezmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Moğol fermente süt ürünleri, Tayvan maş fasulyesi, İtalyan salamı, Çin soya sosu gibi birçok farklı ülkede ve farklı gıdalarda çalışmalar yapılmıştır (Kergourly vd., 2015).

Gıda endüstrisi için önemi yıllardır bilinen LAB üzerine yapılan araştırmalar her geçen gün artmaktadır. Bu bakterilerin süt ve süt ürünleri, fermente gıdalar ve geleneksel gıdaların üretimindeki rolleri hakkında daha fazla araştırma yapılarak endüstriyel ölçekli kullanımlarında daha etkili sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Bu amaçla metagenomik uygulamaların kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Son yıllarda metagenomik gelişimi ve uygulama sahasının artışıyla birlikte LAB üzerine yapılan çalışmaların genom odaklı hale geldiği görülmektedir. Bu sayede endüstriyel üretimde kullanılan suşların gıda üretimindeki rolleri ve temel mekanizmaları ayrıntılı olarak incelenebilmektedir (Ektik, 2022).

LAB hali hazırda tek kültür olarak tanımlanması ve üretiminde kullanılan gıdada ürettiği metabolitleri

tespit edilebilmektedir. LAB fermente gıda başlığı altında toplanan tüm ürünlerde bulunmaktadır (Avunca, 2022). Geleneksel fermente gıdaların üretiminde tek bir LAB değil çeşitli mikroorganizmalardan oluşan bir mikrobiyota söz konusudur (Kavruk vd., 2021; Tóth vd., 2020). Bu nedenle metagenomik analizler bu karmaşık mikrobiyotaların tanımlanması ve işlevleri hakkında daha fazla bilgi üretilmesine katkı sağlamaktadır.

Ekşi mayanın ekmek üretiminde doğal starter kültür olarak kullanımı bilinen en eski biyoteknolojik uygulamalardan biridir (Karaman ve Sağdıç, 2018; Babaoğlu vd., 2021; Aydın, 2023). Genel olarak ekşi mayanın mikrobiyotası hakkında; LAB ve mayalardan oluştuğu, LAB oransal olarak daha fazla olduğu (Aydın vd., 2022; Aydın vd., 2022a), LAB çeşitliliğinin mayalardan daha fazla olduğu, hamurda oluşan metabolitlerin çoğunun LAB tarafından sentezlendiği bilinmektedir (Palla vd., 2020; Örü ve Ertop, 2021). Fakat ekşi hamur mikrobiyotasının hamurun gelişimi süresince nasıl değiştiği, hamurun olgunlaşması sırasında oluşan metabolitlerin çevresel koşullardan nasıl etkilendiği, maya ve LAB sayıları arasındaki oransal değişimin nasıl olduğu hakkında literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Metagenomik yaklaşım, mikrobiyel topluluğun ve fermentasyon sırasındaki dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını kolaylaştırmıştır (Kergourlay, 2015). Ercillini vd. (2013) yaptıkları çalışmada ekşi mayanın mikrobiyotasını metagenomik yaklaşımla incelemiş; sonuç olarak ise bir gün sonunda bile ekşi hamurun mikrobiyotasının önemli bir şekilde değiştiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada metagenomik yaklaşımlar ve HTS verimli dizileme teknolojilerinin ekşi hamur için modifiye edilmesiyle birlikte süreç hakkındaki soruların cevaplanmaya başladığı ve karmaşık mikrobiyota hakkında daha fazla bilgi üretildiği rapor edilmiştir.

Çin Halk Cumhuriyeti'nde tüketimi oldukça sevilen geleneksel fermente bir gıda olan da-Jiang'ın fermentasyonu sırasında bakterilerin rolünü ve fermentasyondaki önemini belirlemek

için bir çalışma yürütülmüştür (Xiea vd., 2020). Bu çalışmada, 15 ev yapımı da-Jiang örneğinin, yüksek verimli dizileme teknolojisi ile mikrobiyotası analiz edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre örneklerin mikrobiyotasında 248 cinsine ait 841 bakteri türünden, *Leuconostoc*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pantoea*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Tetragenococcus* ve *Weissella* cinslerine ait türlerin baskın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca fermentasyon sırasında bakterilerin fonksiyonel genlerinin, karbonhidrat metabolizması, amino asit metabolizması, membran geçirgenliği, inorganik iyon taşınması ve metabolizması, sinyal iletimi ve koenzim ve vitaminlerin metabolizması ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. *Pseudomonas* cinsinin da-jiang'ın rengiyle; *Pseudomonas floresens*'in tiramin ve histamin üretimi ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiler sayesinde geleneksel da-Jiang'daki mikrobiyel yapı ve enzimler hakkında önemli bilgiler elde edilmiş ve bu mikroorganizmaların biyolojik fonksiyonlarının yanı sıra yüksek kaliteli da-Jiang elde etmek için bir starter kültür olarak kullanılabilecekleri rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda da-jiang mikrobiyotasında fermentasyona hâkim olup laktik asit üretiminde yer alan organizmalar; *Leuconostoc*, *Acinetobacter* ve *Enterobacter* cinsleri olarak tespit edilmiştir (Xiea vd., 2020).

Fermente soya fasulyesi ezmesi olan *doenjang*'ın iki farklı endüstriyel üretim süreci sırasında mikrobiyel çeşitliliğin ve metabolit profillerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla Lee vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada mikrobiyel çeşitliliğin ve ilgili metabolomların fermente ürünlerin nihai tadını, lezzetini ve dokusunu önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, mikrobiyel inokulum çeşitliliği ile fermentatif koşullar altındaki ilgili metabolomlar arasındaki korelasyonlar da ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, endüstriyel süreç (IP) ve modifiye endüstriyel süreç (mIP) olmak üzere iki *doenjang* üretim süreci için karşılaştırmalı metabolomlara karşılık gelen mikrobiyel çeşitlerle birleştiren bir korelasyon modeli oluşturulmuştur. *Doenjang* için yaygın olarak kullanılan endüstriyel üretim sürecinden ikisinin (IP ve mIP) metabolit



profillerini karşılaştırılmış ve biyosürecin her adımında bu ürünleri spesifik mikrobiyel topluluklarla ilişkilendirilmiştir. IP ve mIP'deki mikrobiyota karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş, her basamağa özgü metabolit oluşumları belirlenmiştir. Sonuçta, *doenjang*'ın bileşenlerinin, lezzetinin ve diğer yapısal özelliklerinin her adımdaki mikrobiyel çeşitlilikten önemli ölçüde etkilendiği rapor edilmiştir.

Fermente sebzelerdeki mikrobiyotanın metagenomik yöntemle tanımlanması ve antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi üzerine Yasir vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada turşunun mikrobiyotasını ve fermentasyon sırasında ve sonrasında oluşan ürünlerin üretim yöntemlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma Orta Doğu ve Asya kıtalarında yaygın olarak tüketilen 18 farklı sebze turşusu ile gerçekleştirilmiş olup tanımlama metagenomik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca turşu mikrobiyotasında karbonhidrat, aminoasit, bakteriyosin ve vitaminlerin üretim yolları da tespit edilmiştir. Kimchi, küresel olarak popüler hale gelen, LAB sebzeleri fermente etmesiyle üretilen geleneksel bir Kore fermente gıdasıdır. Yapılan bir çalışmada farklı sebzeler kullanılarak üretilen kimchi'lerin fermentasyon başlangıcından sonuna kadar olan sürede mikrobiyotalarında meydana gelen değişim metagenomik yöntemlerle tespit edilmiş ve farklı sebzelerin mikrobiyota çeşitliliği üzerindeki etkisi bu güncel yöntemle ortaya konmuştur (Lee vd., 2015).

Illegheims vd. (2015) tarafından kakao çekirdeği fermentasyonu sırasındaki mikrobiyotayı net bir şekilde tespit edebilmek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında; fermentasyonda yer alan tüm mikroorganizmaların ürettikleri yan ürünler tespit edilmiş ve en uygun starter kültür seçimi yapılmıştır.

Çin kültürünün sembolize eden geleneksel fermente gıdalardan biri olan suancai, Çin'de yüzyıllardır yaygın olarak tüketilmektedir. Bu çalışmada suancai fermentasyonundaki azot metabolizması ve bu metabolizmanın hangi mikroorganizmalar tarafından yürütüldüğü metagenomik yaklaşımlarla tespit edilmiştir. Bu çalışma

sonucunda suancai üretimi için en etkili starter kültürler belirlenmiş, gıda güvenliği risklerinin en aza indirebileceği ve endüstriyel üretime olumlu katkılar sağlanabileceği ortaya konulmuştur (Song vd., 2021).

Fermente deniz ürünlerinin mikrobiyel çeşitliliği yakın geçmişe kadar, diğer fermente ürünler kadar net olarak tanımlanmamışken, son yıllarda, metagenomik teknikler Asya'da da fermente deniz ürünlerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Fermente edilmiş deniz ürünleri starter kültür kullanılmadan üretildiğinden, mikrobiyotası büyük ölçüde bileşenlerinde bulunan mikrobiyel topluluğa, tesadüfen meydana gelen mikrobiyel türlere ve fermentasyon sırasında uygulanan sıcaklığa bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu tür spontan fermentasyonla üretilen fermente ürünlerin mikrobiyotasının, örneğin şarap veya süt ürünlerindeki kadar standart olmadığı, ancak LAB'nin (özellikle *Lactobacillus* türlerinin) fermentasyon işleminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Kergourlay, 2015).

Wanga vd. (2020) yaptıkları çalışmada, moleküler, duysal ve metagenomik analizlere dayanan Çin balık sosunda (Yu-lu) uçucu lezzetin oluşum mekanizmasına metagenomik teknikler kullanarak yeni bir bakış açısı kazandırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda üründe 12 adet temel uçucu bileşik olduğu; *Halanaerobium*, *Halomonas*, *Tetragenococcus*, *Halococcus* ve *Frackibacter* cinslerinden oluşan 5 mikroorganizmanın balık sosunda lezzet oluşumundan sorumlu olduğu ve mikrobiyel metabolik ağın balık sosunda lezzet oluşumunu sağladığı tespit edilmiştir.

Soyuçok vd. (2021) gerçekleştirdikleri çalışmalarında geleneksel ve fonksiyonel gıdalarımızdan olan tarhananın fermentasyonu süresince mikrobiyotasını 16S metagenomik analizle incelemişler ve hamur oluşumundaki baskın türleri *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* olarak tespit etmişlerdir, fermentasyonun 4. gününden sonra *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinin baskın hale geldiği ancak hamurun kurumasından sonra inaktive olduklarını tespit etmişlerdir. Ilıkkın ve Bağdat, (2021)

karmaşık bir mikrobiyotanın gerçekleştirdiği fermentasyon sonucunda elde edilen sağlığa yararlı içeceklerden olan kefirin üretiminde starter olarak kullanılan kefiran tanelerinin mikrobiyotasını metagenomik tekniklerle incelemişler ve ilk kez Türkiye'de üretilen kefirlerin baskın mikrobiyotasında probiyotik bir mikroorganizma olan *Bifidobacterium longum*'u tespit etmişlerdir. Uçak vd. (2022) ise fermente içeceklerimizden olan güzel aroması ve lezzeti sayesinde özellikle kış aylarında tüketimi oldukça popüler olan bozanın fermentasyonu sürecindeki mikrobiyotasını metagenomik tekniklerle tespit ederek boza üretiminde kullanılabilir en uygun starterlerin belirlenmesini amaçlamışlardır.

## SONUÇ

Mikrobiyotanın anlaşılması amacıyla sağlanan bilimsel çalışmaların en önemlilerinden olan metagenomik, diğer yöntemlere kıyasla kısa zamanda ve yüksek doğruluk oranında yeni genleri, proteinleri ve kültüre edilemeyen organizmaların kesin tanımlarının yapılmasını sağlamakla birlikte, metagenomik çalışmalarda mikrobiyota ile ilgili tüm soruları cevaplayabilecek standart yöntemler veya evrensel araçlar bulunmamaktadır. Her ne kadar metagenetik çalışmalar son yıllarda farklı gıda örneklerinde farklı amaçlar için kullanılıyor olsa da halen geliştirilmesi gereken yönleri bulunmaktadır. Özellikle spontan fermantasyonla üretilen geleneksel gıdaların mikrobiyotasını daha kapsamlı bir şekilde belirlemek ve fermantasyon süreçlerini aydınlatmak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu amaçla, metatranskriptomik ve metabolomik içeren multi-omik yaklaşımlarla mikroorganizmaların birbirleriyle ve çevreleriyle olan etkileşimlerinin aydınlatılması gerekmektedir. Böylece farklı meta verilerin kombinasyonu, mikrobiyel gıdaların hücreden topluluk seviyesine kadar incelenmesini sağlayacak ve bu şekilde genom ölçeğinde topluluk modellerinin geliştirilmesi sağlanacaktır. Diğer taraftan dizileme ve biyoinformatik maliyetlerin yüksek olması metagenomik yöntemlerin yaygınlaşmasını kısıtlayan faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Metagenomik sonucu elde edilen bilgilerin zenginliği, klasik moleküler yöntemlerin yatırım maliyetlerinin

düşmesi ve bilim insanlarının metagenomik yöntemlere ilgisinin artması ile gün geçtikçe daha da yaygınlaşacağı tahmin edilmektedir. Gelecekte metagenomik çalışmaların, PCR çalışmaları gibi rutin laboratuvar uygulamaları haline geleceği, bu nedenle metagenomik yöntemler hakkındaki bilgi birikiminin tabana yayılması ve gıda mikrobiyotası çalışmaları ile ilgilenen bilim insanına aktarılması gerektiği düşünülmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu çalışmada yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## YAZAR KATKILARI

Yazarlar makalenin gerçekleşmesinde, yazılmasında ve yayınlanmasında eşit katkı sağlamışlardır. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

## KAYNAKLAR

- Albanese, D., Donati, C. (2017). Strain profiling and epidemiology of bacterial species from metagenomic sequencing. *Natural Communicationn* 8, 2260, doi: 10.1038/s41467-017-02209-5.
- Amrouche, T., Mounier, J., Pawtowski, A. (2020). Microbiota Associated with Dromedary Camel Milk from Algerian Sahara. *Current Microbiology* 77, 24-31, doi: 10.1007/s00284-019-01788-4.
- Arumugam, R., Uli, J., Annavi, G. (2019). A Review of the Application of Next Generation Sequencing (NGS) in Wild Terrestrial Vertebrate Research. *Annual Research & Review in Biology*, 31(5): 1-9, doi: 10.9734/arrb/2019/v31i530061.
- Avunca, S.C. (2022). Yoğurt Altı Suyu ve Sirke ile Üretilen Fermente Salatalık Turşularında Bulunan Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Sakarya, Türkiye, 64s.
- Aw, T.G., Wengert, S., Rose, J.B. (2016). Metagenomic analysis of viruses associated with field-grown and retail lettuce identifies human and animal viruses, *International Journal of Food Microbiology*, 223; 50-56, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.008.

- Aydın, F. (2023) Ekşi Hamur Mikrobiyotasından İzole Edilen Mayaların Farklı DNA Markör Sistemleri ile Karakterize Edilmesi ve Bazı Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Bolu, Türkiye, 154s.
- Aydın, F., Özer, G., Alkan, M., Çakır, İ. (2022). Start Codon Targeted (SCoT) markers for the assessment of genetic diversity in yeast isolated from Turkish sourdough. *Food Microbiology*, 107, 104081, doi: 10.1016/j.fm.2022.104081.
- Aydın, S., Erözden, AA, Tavşanlı, N., Müdüroğlu, A., Çalışkan, M., Kara, İ. (2022a). Anthocyanin Addition to Kefir: Metagenomic Analysis of Microbial Community Structure. *Current Microbiology*, 79 (11), 327, doi: 10.1007/s00284-022-03017-x.
- Babaoğlu, HÇ. Tontul, SA. Akın, N. (2021). Yer Elması Tozu İlavesinin Ekşi Hamur Fermantasyonu Üzerine Etkisi. *GIDA* 46(2) 367-375, doi: 10.15237/gida.GD20135.
- Bal, D., Balcı, B., Yılmaz, A., Polat, G., Arıcan, E. (2022). Balıkesir/Antandros Antik Kenti Kazısı Toprak Örneklerinin Metagenomik Analizi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(1), 1-12, doi: 10.19113/Sdufenbed.700604.
- Billington, C., Kingsbury, J.M., Rivas, L. (2022). Metagenomics Approaches for Improving Food Safety. *Journal of Food Protection*, 85(3); 448-464, doi: 10.4315/JFP-21-301.
- Bozdemir, M. (2021). Bozadan İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik ve Fonksiyonel Özellikleri. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, Türkiye, 115s.
- Brown, E., Dessai, U., McGarry S., Gerner-Smith P. (2019). Use of Whole-Genome Sequencing for Food Safety and Public Health in the United States. *Foodborne Pathogens And Disease* 16(7): 441-450, doi: 10.1089/fpd.2019.2662.
- Calle, M.L. (2019). Statistical Analysis of Metagenomics Data *Genomics & Informatics*; 17(1):1-9, doi:10.5808/GI.2019.17.1.e6.
- Cerit, G.Z. (2022). Beyaz Peynir ve Süt İşleme Tesisinden İzole Edilen Mikrobiyotanın Karakterizasyonu Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümü Yüksek Lisans Tezi Ankara, Türkiye, 163s.
- Chen, G., Bai, R., Zhang, Y., Zhao, B., Xiao, Y. (2022). Application Of Metagenomics To Biological Wastewater Treatment, *Science Of The Total Environment* 807, 150737, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150737.
- Chen, G., Chen, C., Lei, Z. (2017). Meta-Omics Insights in The Microbial Community Profiling And Functional Characterization of Fermented Foods Trends, *Food Science & Technology* 65, 23-31, doi: 10.1016/j.tifs.2017.05.002.
- Choudhari, J.K., Choubey, J., Verma, M.K., Chatterjee, T., Sahariah, B.P. (2022). Metagenomics: the boon for microbial world knowledge and current challenges, *Bioinformatic methods and Applications*, Dev Bukhsh Singh, Raiesh Kumar Pathak (ed.) 159-175.
- Doyle, C.J., O'toole, P.W., Cotter, P.D. (2017). Metagenome-Based Surveillance And Diagnostic Approaches To Studying The Microbial Ecology Of Food Production And Processing Environments, *Environmental Microbiology* 19(11), 4382-4391, doi: 10.1111/1462-2920.13859.
- EFSA (2019) European Food Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/en/science/scientific-committee-and-panels/biohaz> (Erişim Tarihi: 2.11.2023).
- Ekici, H. (2019). Şalgam Sularının Aroması Üzerine Etkili Mikrofloranın Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile Belirlenmesi ve İstatistiksel Değerlendirilmesi, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 61s.
- Ektik, N. (2022). Klasik (Olgunlaştırılmış) Beyaz Peynir Üretiminin Farklı Aşamalarından Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi Balıkesir

- Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, Türkiye, 113 s.
- Emenli, İ., Gündüz, G. (2019). Gıdalarda Bulunan Küflerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler *GIDA* 44 (4): 692-706, doi: 10.15237/gida.GD19044.
- Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing And Metagenomics: Moving Forward In The Culture-Independent Analysis Of Food Microbial Ecology. *Applied And Environmental Microbiology* 10(79); 3148-3155, doi: 10.1128/AEM.00256-13.
- Erdoğan, I.T. (2019). Yıkanmış Kan Lekelerinden DNA Elde Edilmesi. Üsküdar Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Bilimler Anabilim Dalı Adli Genetik Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye 98 s.
- Ezeonuegbu, B. A., Abdullahi, M. D., Whong, C. M., Sohunago, J. W., Kassem, H. S., Yaro, C. A., Batiha, G. E. S. (2022). Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. *Scientific Reports*, 12(1), 2094, doi: 10.1038/s41598-022-05820-9.
- Ferrocino, I., Cocolin, F. (2017). Current Perspectives in Food-Based Studies Exploiting Multi-Omics Approaches Current Opinion. *Food Science*, 13:10-15, doi: 10.1016/j.cofs.2017.01.002
- Goolam Mahomed, T., Peters, R., Pretorius, G. (2021). Comparison of targeted metagenomics and IS-Pro methods for analysing the lung Microbiome. *BMC Microbiology* 21: 228, doi: 10.1186/s12866-021-02288-x.
- Görkem, Z., Cerit, Z.G., Baloğlu, M.C., Yılmaz, R. (2021). Beyaz Peynir Mikrobiyotasında Kültüromik ve Shotgun Metagenomik Teknolojilerin Değerlendirilmesi. *GIDA*, 46(3) 566-582, doi: 10.15237/gida.GD20136.
- Hardwick, S.A, Chen, W.Y., Wong, T. (2018). Synthetic microbe communities provide internal reference standards for metagenome sequencing and analysis. *Nature Communication* 9, 1-11, doi: 10.1038/s41467-018-05555-0
- Hora, M. (2018). Mikrobiyom kaynaklı antimikrobiyal direnç genlerinin taksonomik orijinlerinin tespiti. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Türkiye, 120 s.
- Ilıkkın, Ö. K., Bağdat, E. Ş. (2021). Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 152, 112375, doi: 10.1016/j.lwt.2021.112375.
- Illegghems, K., Weckx, S., Vuyst, L. (2015). Applying Meta-Pathway Analyses Through Metagenomics To Identify The Functional Properties of The Major Bacterial Communities of A Single Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Process Sample. *Food Microbiology* 50, 54- 63, doi: 10.1016/j.fm.2015.03.005.
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, MW., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffron, S., Van Der Vossen, J., Tang, S., Katase, M., McClure, P., Kimura, B., Ching Chai, L., Chapman, J., Grant, K. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiology*, 79, 96-115, doi: 10.1016/j.fm.2018.11.005.
- Johny, T.K, Puthusseri, R.M, Bhat, S.G. (2021). A primer on metagenomics and next-generation sequencing in fish gut microbiome research. *Aquaculture Research*, 52, 4565-5110, doi: 10.1111/are.15373.
- Karabudak, S., Akkuş, M.S. (2022). Yeni Nesil Dizileme Verilerinin Analizinde Bulut Teknolojisi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 11(1) 1-10, doi: 10.17100/nevbittek.1005534.
- Karaman, K. Sağdıç, O. (2018). Fitaz Aktif Bazı Laktik Asit Bakteri ve Maya İzolatlarının Tam Buğday Ekmeğinde Hamur Reolojisi Üzerine Etkileri. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* 14; 1-9, doi: 10.31590/ejosat.455587.
- Kavruk, M., Zafer Yurt, M.N., Taşbaşı, B.B., Acar, E.E., Soyuçok, A., Altunbaş, O., Özalp, V.C., Sudağdan, M. (2021). Alteration of Boza Microbiota in the Fermentation Process. *Kocatepe Veterinary Journal* 14(2): 238-246, doi: 10.30607/kvj.895295.
- Kaygusuz, S. (2019). Pamuk Yağında DNA İzolasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin

- Karşılaştırılması ve Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizlerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Karaman, Türkiye, 59 s
- Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G.A., Vergès, M.C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology* 213; 31-39, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.010.
- Khan, D., Kabiraj, A., Roy, R.K, Let, M., Majhi, K., Bandopadhyay, R. (2022). Bioremediation of Heavy Metals by Metagenomic Approaches. *Omics Insights in Environmental Bioremediation*, 393–413, doi:10.1007/978-981-19-4320-1\_17.
- Kothe, C. I., Mohellibi, N., Renault, P. (2022). Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. *Food Research International*, 157, 111265, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111265.
- Lee, S., Singh, D., Young, J., Jeon, J.E., Ryu, H.S., Lee, D.W., Kim, B.S., Lee, C.H. (2017). Comparative evaluation of microbial diversity and metabolite profiles in doenjang, a fermented soybean paste, during the two different industrial manufacturing process. *Food Chemistry* 221;1578-1586, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.135.
- Lee, SH., Ji, Jung, Y., Jeon, C.O., (2015). Source Tracking and Succession of Kimchi Lactic Acid Bacteria during Fermentation. *Journal of Food Science*, 80 (8): 1871- 1877, doi: 10.1111/1750-3841.12948.
- NIST (2020) ABD National Institute of Standards and Technology. Standards for Metagenomics (2020). <https://www.nist.gov/programs-projects/standards-metagenomics> (Erişim tarihi: 20.01.2023).
- Örü, F., Ertop, M.G. (2021). Siyez ve Ekmeklik Buğday Kepeğinin Ekşi Hamur Üretiminde Kullanım Olanının Değerlendirilmesi. *GIDA* 46 (2): 396-407, doi: 10.15237/gıda.GD20087.
- Palla, M., Cristani, C., Giovannetti, M., Agnolucci, M. (2020). Large Genetic Intraspecific Diversity of Autochthonous Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from PDO Tuscan Bread Sourdough *Applied Sciences*, 10(3), 1043, doi:10.3390/app10031043.
- Savaşan, S., Beyaz, D. (2019). Erken Olgunlaşma Dönemindeki Geleneksel Peynir Mikrobiyomunun Metagenomik Analizi. *Etlik Veterinerlik Mikrobiyoloji Dergisi*, 30 (1): 27-35.
- Savran, İ., Erden, E. (2019). Meta-Genomik Gen Analizi İçin Filtre Tasarımı. *DÜMF Mühendislik Dergisi* 11:2, 471-480, doi: 10.24012/dumf.496688.
- Soman, R., Kavitha, M.H., Shaji, H. (2022). Metagenomics: a genomic tool for monitoring microbial communities during bioremediation, *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation*, 813-821, doi:10.1016/B978-0-323-90452-0.00006-2
- Song, Q., Zhao, F., Wang, B., Han, Y., Zhou, Z. (2021). Metagenomic insights into Chinese northeast suancai: Predominance and diversity of genes associated with nitrogen metabolism in traditional household suancai fermentation. *Food Research International* 139,109924, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109924.
- Soyuçok, A., Yurt, M.N.Z., Altunbas, O., Ozalp, V.C., Sudagidan, M. (2021). Metagenomic and chemical analysis of Tarhana during traditional fermentation process. *Food Bioscience*, 39, 100824, doi: 10.1016/j.fbio.2020.100824.
- Tekin, K., Kocaman, M. (2020). PCR Öncesi Hazırlık, PCR Kolaylaştırıcıları ve Dengeleyici Katkılar. *Journal of Molecular Virology Immunology*; 1(2): 11-18. doi:10.46683/jmvi.2020.8.
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F. (2012) Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation* 2, 3, doi: 10.1186/2042-5783-2-3.
- Tóth, A.G, Csabai, I., Maróti, G. (2020). A glimpse of antimicrobial resistance gene diversity in kefir and yoghurt. *Nature Research* 10, 22458, doi: 10.1038/s41598-020-80444-5.
- Uçak, S., Yurt, M.N.Z., Tasbasi, B.B., Acar, E.E., Altunbas, O., Soyucok, A., Sudagidan, M. (2022). Identification of bacterial communities of fermented cereal beverage Boza by metagenomic

- analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 153, 112465, doi: 10.1016/j.lwt.2021.112465.
- Uçarlı, C. (2022) Mikrobiyom Analizinde Metagenomik Yaklaşımlar *Mikrobiyota İçimizdeki Evren*, Yılmaz Ö (baş ed.) 142; 159- 171.
- Wang, Y., Yan, Y., Thompson, K.N (2021). Whole microbial community viability is not quantitatively reflected by propidium monoazide sequencing approach. *Microbiome* 9, 17, doi: 10.1186/s40168-020-00961-3
- Wanga, Y., Lia, C., Zhao, Y., Lia, L., Yanga, X., Wua, Y., Chena, S., Cena, J., Yanga, S., Yanga, D. (2020). Novel insight into the formation mechanism of volatile flavor in Chinese fish sauce (Yu-lu) based on molecular sensory and metagenomics analyses. *Food Chemistry* 323, 126839, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126839.
- Xiea, M., Ana, F., Zhaoa, Y., Wu, R., Wu, J. (2020). Metagenomic analysis of bacterial community structure and functions during the fermentation of da-jiang, a Chinese traditional fermented food, *LWT-Food Science and Technology* 129,109450 doi: 10.1016/j.lwt.2020.109450.
- Yasir, M., Zahrani, I.A., Bibi, F., Ghany, M.A., Azhar, E.I. (2022). New insights of bacterial communities in fermented vegetables from shotgun metagenomics and identification of antibiotic resistance genes and probiotic bacterial. *Food Research International* 157,111190, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111190.
- Ye, S.H., Siddle K.J., Park, D.J., Sabet, P.C. (2019). Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification. *Cell* 178, 779-794, doi: 10.1016/j.cell.2019.07.010.
- Zhuang, S., Tan, Y., Hong, H., Li, D., Zhang, L., Luo, Y. (2022). Exploration of the roles of spoilage bacteria in degrading grass carp proteins during chilled storage: A combined metagenomic and metabolomic approach. *Food Research International*, 152, 110926, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110926.