

Derleme Makale/Review Paper

Geleneksel tarhana fermentasyonu mikrobiyomunun incelenmesi için kullanılabilecek omik yaklaşımlar

Omic approaches that can be used for the analysis of the microbiome in traditional tarhana fermentation

Özlem Işık Doğan^{1,3*}, Remziye Yılmaz^{2,3}

¹Dr., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA, TÜRKİYE

²Prof. Dr., Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA, TÜRKİYE

³Gıda Mühendisliği Bölümü, FoodOmics Laboratuvarı, Hacettepe Üniversitesi, ANKARA, TÜRKİYE

(Yazar sıralamasına göre)

ORCID ID: 0000-0001-7139-0147, Dr

ORCID ID: 0000-0003-2041-1205, Prof. Dr.

*Sorumlu yazar/Corresponding author: ozlemisik@tarimorman.gov.tr

Geliş Tarihi : 21.02.2024

Kabul Tarihi : 05.08.2024

Öz

Amaç: Geleneksel Türk gıdası olan tarhana; tahıllar, yoğurt, sebzeler ve çeşitli baharatlardan elde edilen karışımın laktik ve alkolik fermentasyonu sonucu hazırlanmaktadır. Tarhana, kültürel mirasın bir parçası olarak yıllar boyunca kullanılan malzemeler ve fermentasyon prosesi açısından hazırlandığı yörelere özgü farklılıklar kazanmıştır. Fermentasyon mikrobiyomu tarhananın besinsel ve duyuşal özelliklerini etkilerken, oluşan ürünün pre-biyotik ve post-biyotik karakterlerini de fermentasyon süreci belirlemektedir.

Sonuç: Bilimsel gelişmelere paralel olarak içerdiği analitik tekniklerle biyolojik sistemlerin fonksiyonlarını hatasız ve kesin şekilde ortaya koymayı sağlayan omik yaklaşımlar, fermentasyon prosesinin incelenmesi ve anlaşılmasında yeni olanaklar sağlamaktadır. Bu derleme çalışması ile tarhana fermentasyonunun araştırılmasında kullanılabilecek omik teknolojiler incelenmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Tarhana; fermentasyon; omik bilimi

Abstract

Objective: Tarhana is a traditional product prepared by mixing cereals, dairy products, various vegetables, and spices, followed by the lactic and alcoholic fermentation of the resulting dough. As a part of the cultural heritage, it has gained region specific differences in terms of the materials used and the fermentation process over the years. While the fermentation microbiome affects the nutritional and sensory properties of tarhana, the fermentation process determines the pre-biotic and post-biotic characteristics of the resulting product.

Conclusion: In parallel with scientific developments, Omics approaches, which enable to reveal the functions of biological systems accurately and precisely with the analytical techniques they contain, provide new opportunities in examining and understanding the fermentation process. With this review study, we tried to examine Omic Technologies that can be used in researching tarhana fermentation.

Keywords: Tarhana; fermentation; omics science

1. Giriş

Son yirmi yılda geleneksel fermente gıdalar; kendi mikrobiyotasına bağlı olarak sağlığa olumlu etki eden potansiyel olarak faydalı mikroorganizmalar, mikrobiyal metabolitler ve diğer biyoaktif maddeleri içermeleri sebebi ile yeniden araştırma konusu olmuştur. Bu inceleme; geleneksel bir fermente ürün olan tarhana için kullanılan hammaddeler ve fermentasyon ile elde edilen ürünlerde, mikroorganizma ve metabolik profilin yeni omik yaklaşım ile araştırılması olanaklarını özetlemektedir. Bu kapsamda fermentasyon mikrobiyotasının belirlenmesinde kullanılabilecek kültüromik ve metagenomik yaklaşımlar ile fermentasyon sırasında oluşan metabolitlerin incelenmesinde yararlanılabilecek metabolik yaklaşımlar incelenmiştir. Ayrıca elde edilen verilerin bütüncül yaklaşımlarla değerlendirilmesinde kullanılabilecek araçlardan bahsedilmiştir.

2. Fermentasyon

Fermentasyon prosesi; bozulabilir hayvansal ve bitkisel gıdaları korumak, gıda materyalinin hacmini azaltmak, çiğ ürünlerdeki istenmeyen özellikleri uzaklaştırmak, gıda ürününün besinsel değerini arttırmak ve daha güvenli bir gıda sağlamak özellikleri ile M.Ö. 6000 yıllarından bu yana dünyanın birçok yerinde gıda üretiminde önemli bir yer teşkil etmiştir (Caplice ve Fitzgerald, 1999; Dağlıoğlu, 2000). Fermentasyon prosesinin temel amacı gıdaları korumak olsa da günümüzde bu proses kazandırdığı tat, aroma ve tekstür özellikleri nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Mikroorganizmaların fermentasyon prosesindeki rolü bilinmeden önce, zanaatkarlar tarafından yerel tariflerle küçük işletmelerde üretilen fermente gıdalar; 19. yüzyılda endüstri devrimi ve mikrobiyoloji alanında görülen gelişmelerle daha kontrollü ve etkin bir şekilde üretilmeye başlanmıştır (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

Geleneksel bir gıda, belirli bir coğrafik bölgede yaşayan insanların tarihi-kültürel mirasının bir parçasıdır. Tarhana geleneksel bir Türk fermente tahıl ürünüdür. Tarhana tahıl unları, yoğurt, çeşitli sebzeler gibi bileşenler ile vitaminler, mineraller, organik asitler ve serbest amino asitler gibi önemli besin öğeleri içerdiğinden her yaş grubunun beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Geleneksel olarak farklı bölgelerde farklı tariflerle, farklı

fermentasyon sürelerinde ve sıcaklıklarında üretilen tarhana fermentasyonunda hem laktik asit bakterileri (LAB) hem de mayalar görev almakta ve laktik asit ve alkolik fermentasyon aynı anda gerçekleşmektedir.(Dağlıoğlu, 2000).

Geleneksel fermente ürünlerin oluşumunda daha çok hammaddeden ya da çevreden kaynaklanan doğal suşlar görev almaktadır. Bu doğal suşlar hem starter kültürlerden hem de starter olmayan laktik asit bakterilerinden oluşmaktadır. Tarhana gibi birçok farklı bileşen içeren fermente bir gıdanın besleyici ve duyuşsal karakterlerinin oluşmasında kompleks bir mikrobiyota rol oynayacağından bu özelliklerin değerlendirilmesinde mikrobiyotanın tam ve net olarak ortaya konularak fermentasyon sürecinde gerçekleşen ilişkilerin incelenmesi önem arz etmektedir.

2.1. Tahıl fermentasyonları

Tahıl temelli gıdalar dünya nüfusunun üçte birinin beslenmesinde yer almakta ve bu tür gıdaların en popüler olanları ekmek ve bira olarak sayılabilmektedir (Tangüler, 2014). Depolanmış durumdaki tahıl taneleri, düşük su aktivitesiyle kontrol edilen dinlenme durumunda gıda ürünleri olduğundan, mikroorganizma faaliyetleri açısından uygun substratlar değildirler. Tahıllarda bulunan fermente edilebilir karbonhidratların ortaya çıkması için ihtiyaç duyulan hidrolitik aktivitelerin yönetilmesinde kullanılan dört temel yaklaşım maltlama, koji teknolojisi, harici enzim kaynakları ve hamur fermentasyonu olarak sayılabilmektedir (Hammes vd., 2005).

Tahıllara mikrobiyal fermentasyon işlemi uygulanması ile bu ürünlerin besinsel değeri, lezzeti, görünüş özellikleri ve mikrobiyolojik güvenliği artmaktadır (Hammes vd., 2005; Petrova, 2020). Bu yolla fitik asit gibi besleyici özellikte olmayan bileşenler azalarak minerallerin biyo-alımı artarken, doğal bir şekilde esansiyel amino asitler ve vitaminler sentezlenmektedir (O’Callaghan vd., 2019; Petrova, 2020; Şimşek vd, 2017). Bunun yanı sıra kullanılan tahılın türü, fermente edilen karbonhidratların miktarı ve kalitesi, nitrojen kaynakları ve mikroorganizmaların kullandığı diğer besin öğelerini etkilemektedir.

3. Tarhana

Tarhana geleneksel bir Türk fermente gıda ürünüdür. Tarhana hamuru; un, yoğurt, tuz, ekmek mayası, çeşitli sebzeler ve baharatların karıştırılıp yoğurulmasından sonra 1-7 gün arasında laktik ve alkolik fermentasyona bırakılmasıyla hazırlanır (Dağlıoğlu, 2000; Özdemir vd., 2018). Bileşime yoğurt eklenmesiyle temelde laktik asit fermentasyonu gerçekleşirken; bazı yörelerde ekmek mayası ilave edilmesiyle gerçekleşen alkolik fermentasyon ise son üründe arzu edilen tarhanaya özgü bileşiklerin oluşmasını sağlar. Fermentasyon süresi sonunda elde edilen ürün 'ıslak tarhana' olarak adlandırılır ve güneş altında ya da kurutucularda topak, külçe ya da ince tabaka haline getirilerek nem içeriği %6-10 aralığına gelecek şekilde kurutulur. Ardından, 1 mm'den küçük olacak şekilde toz haline getirilerek saklanır (Tangüler, 2014). Tarhana asidik ve ekşi bir tada sahiptir. Fermentasyon sonunda kurutulmadan, kurutma sonrasında toz haline getirilmeden ya da toz formuna getirildikten sonra çorba haline getirilerek tüketilebilir. (Özdemir vd., 2018)

Tarhana, TS 2282 (2004)'ye göre "buğday unu, kırması, ırmik veya bunların karışımı ile yoğurt, biber, tuz, soğan, domates, tat ve koku verici, sağlığa zararsız bitkisel maddelerin karıştırılıp yoğurulduktan ve fermente edildikten sonra kurutulması, öğütülmesi ve elenmesiyle elde edilen bir besin maddesidir" şeklinde tanımlanmıştır. Türk Standartlarına göre göce tarhanası, ırmik tarhanası, un tarhanası ve karışık tarhana olmak üzere 4 gruba ayrılan tarhana çeşitlerinin sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibidir:

- Protein miktarı kuru maddede en az %12 olmalı,
- Rutubet miktarı en fazla %10 olmalı,
- Tuz miktarı kuru maddede en fazla %10 olmalı,
- %67'lik etil alkole geçen asitlik derecesi en az 15 en fazla 40 olmalı,
- Külün %10'luk hidroklorik asitle çözünmeyen kısmı, tuz hariç en fazla %0,2 olmalı,
- Tarhanalar kendine özgü sarıdan kırmızıya değişen renk tonlarında, koku, tat ve görünüşte olmalı, acılaşmış, kokuşmuş, küflenmiş olmamalı, yabancı bir tat ve koku içermemelidir (TS 2282, 2004).

Tarhananın Türk mutfağı açısından tarihinin Orta Asya'da 'kurut' adı verilen, çökelek, tuz, un, kurutulmuş et ile hazırlanan kışlık bir yiyeceğe dayandığı belirtilmektedir. Orta Asya'dan Anadolu'ya gelişinin Türkler ve Moğollar sayesinde olduğu ve Osmanlı Devleti döneminde ise başka ülkelere ve kültürlerle yayıldığı kabul edilmektedir (Coşkun, 2014). Tarhana benzeri ürünler Mısır, Suriye ve Lübnan'da kishk, Irak'da kushuk, Yunanistan'da trahana ve Macaristan ve Finlandiya'da tahonya/talkuna olarak adlandırılmaktadır (Dağlıoğlu, 2000).

Tarhana hamurunun içeriği ve hazırlanmasında standart bir prosedür olmayıp, yörelere özgü geleneksel tariflerle üretilmekte; besinsel ve kimyasal özellikleri de bu prosedürlere göre değişmektedir. Bunun yanında fermentasyon süresi, fermentasyon sonrası kurutma işleminin süresi ve sıcaklığı da son ürünün özelliklerini etkilemektedir (Dağlıoğlu, 2000).

Tarhana son dönemlerde ticari olarak üretilip satışa sunulsa da halen çoğunlukla geleneksel tariflerle ev ölçekli olarak üretilmektedir. Örneğin; Çorum, Amasya, Kahramanmaraş, Nevşehir, Gaziantep, Aydın, Afyon, Muğla gibi şehirlerde kabuğu uzaklaştırılmayan buğday kırması kullanılırken, birçok başka şehirde buğday unu ile tarhana hazırlanmaktadır. Diğer yandan Tekirdağ, Edirne, Sinop, Tokat gibi bazı şehirlerde hamura süt katılırken, bazı Ege Bölgesi şehirlerinde hamura un yanında bazı kuru baklagiller eklenmekte ve bazı diğer şehirlerde de hamura ekşi maya katılmaktadır (Köten vd., 2019).

Tarhana hamurunda bulunan gıda bileşenlerinin çeşitliliği tarhananın B vitaminleri, mineraller, organik asitler ve serbest amino asitler açısından zengin olmasını sağlamaktadır. Ayrıca, tarhana üretimi sırasında organik asitlerin oluşumu ve nem oranının %10'nun altına düşmesi bakteriyostatik etki göstermekte ve raf ömrünün uzamasını sağlamaktadır. Tarhananın raf ömrü çeşide göre değişse de genel olarak 2-3 yıl bozulmadan kaldığı daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Tangüler, 2014).

3.1. Tarhana fermentasyonu

Homo- ve heterofermantatif laktik asit bakterileri (LAB) ile mayaların birlikte gerçekleştirdiği fermentasyon ile hazırlanan tarhananın besinsel özellikleri, aroma ve lezzeti bu mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu

oluşmaktadır. Gıda zincirleri gibi besinsel etkileşimler birçok grup organizmanın sınırlı kaynaklar üzerinde bile hayatta kalmasını sağlamak ve doğal döngüleri yürüterek komünitenin çeşitliliğini arttırmaktadır (Ponomarova vd., 2017). Tarhana hamuru fermantasyonunun doğal fermantasyon yolu ile gerçekleşmesi, sürecin hammaddelerde bulunan mikroorganizma çeşitliliği ve bunların ilk yükünden etkilenmesine neden olmaktadır. Bu sebeple bazı yörelerde tarhanaların üretiminde bir önceki seneden kalan tarhana hamura eklenerek fermantasyon kontrol edilmeye çalışılmaktadır (Şimşek vd., 2017).

Tarhana hamuru mikrobiyotasında baskın olarak yer alan LAB; *Lactiplantibacillus plantarum*, *Companilactobacillus alimentarius*, *Companilactobacillus farciminis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* ve *Weissella cibaria* ve mayalar da *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Candida glabrata* ve *Pichia kudriavzevii* olarak belirlenmiştir. Fermantasyon sırasında mikroorganizmaların proteolitik, lipolitik ve amilolitik enzim aktiviteleri sonucu oluşan metabolitler, meydana gelen gıda ürünün özelliklerini belirlemektedir. Fermantasyon prosesinin başlangıcında tarhana hamurunda yer alan yoğurt ve sebzeler sebebiyle önemli miktarda organik asit bulunmakla birlikte tarhananın aroma ve lezzeti fermantasyon sonucu oluşan organik asitler, serbest amino asitler ve karbonil bileşiklerinden etkilenmektedir (Özdemir vd., 2018).

Settanni (2011), 40°C’de fermente edilen hamurlarda fermantasyon sonunda *Pediococcus acidilactici* türü laktobasillere baskınken, 30°C’de fermente edilen hamurlarda *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Levilactobacillus brevis* suşlarının diğer türlere baskın olduğunu belirlemiştir. Başka bir çalışmada ise farklı bölgelerden alınan tarhana hamurlarında yer alan homofermantatif kokların, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus thermophilus* ve *Enterococcus faecium*; homofermantatif çubukların, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lacticaseibacillus casei* ve *Lactiplantibacillus plantarum* ve heterofermantatif çubukların, *Limosilactobacillus fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc*

citreum ve *Weissella cibaria* suşları olduğu saptanmıştır. Ayrıca, tarhanada yer alan LAB çeşitliliğinin hammadde, fermantasyon süresi ve üretimde kullanılan teknikten etkilendiği belirlenmiştir (Sengun vd., 2009).

4. Fermente gıdalarda laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalar arasındaki etkileşimler

Birçok fermente gıdanın üretiminde, mayalar ve LAB arasındaki metabolik etkileşimlerden yararlanılmaktadır. Fermente gıdaların mikrobiyotasında bulunan LAB, organik asitler üreterek pH değerini düşürüp patojen mikroorganizmaların gelişimini önlerken maya gelişimini ise teşvik etmektedir. Mayalar ise LAB için amino asitler ve vitaminler gibi zorunlu gelişim metabolitlerini sağlamak, metabolizma sonucu üretilen toksik son ürünleri uzaklaştırmak, pH değerini düşürerek istenmeyen mikroorganizmaları yok etmek, karbondioksit ve alkol üreterek ya da organik asitleri kullanarak pH değerini yükseltmeleri sonucu starter kültür gelişimini desteklemek gibi özellikler göstermektedir. Örneğin, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Lacticaseibacillus casei* ürün mikrobiyotasında birlikte bulunduğu; *Saccharomyces cerevisiae*, *Lacticaseibacillus casei* gelişimi için elzem olan riboflavini sağlamaktadır (Viljoen, 2006).

Doğal fermente tahıl temelli gıdalarda metabolik aktivite; LAB, mayalar ve küfler gibi farklı türler ya da mikrobiyal grupların tek tek ya da kompleks metabolik kapasitelerini ve prosesin teknolojik özelliklerini yansıtarak meydana gelen gıdanın duyuşal özelliklerini etkilemektedir (Chaves-López vd., 2020). Tarhana fermantasyonu sırasında da karışık kültürler arasında gerçekleşen mikrobiyal etkileşimler son ürünün özellikleri üzerinde çok çeşitli etkilere sahip olabilmektedir. Tarhana fermantasyonu mikrobiyotasının ve fermantasyon sırasında oluşan metabolitlerin incelenmesinde kullanılabilecek bazı omik yaklaşımlar şu şekildedir.

4.1. Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon spektrometresi (MALDI TOF MS)

Mikroorganizmaların geniş çeşitliliği ve bilimin farklı dallarındaki gelişmelerle birlikte mikrobiyolojik tanımlama analizlerinde farklı metotların gelişmesi sağlanmıştır. Bu yöntemler en başta fenotipik olarak mikroskobik/makroskobik

metotlar olmak üzere kültür temelli metotlar ve fizyolojik/biyokimyasal metotlar olarak sıralanabilir. Kültüromik yaklaşımın ortaya çıkmasıyla ise modern mikrobiyotara araştırmalarında iddiasız ve karmaşık mikrobiyolojik gelenek yerine genomik ve yapısal çalışmalar kullanılmaya başlanmıştır. Kültüromik yaklaşımın genomik araçları metagenomik çalışmalar alanında yer alırken; yapısal çalışmalar MALDI TOF MS cihazıyla gerçekleştirilmektedir (Lv vd., 2019).

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan metotlar basit, güvenilir, yüksek derecede spesifik olmalı, çeşitli mikroorganizma gruplarının analizinde birlik göstermeli ve mümkün olduğunca uygun maliyetli olmalıdır (Nacef vd., 2017). Rutin olarak kullanılan geleneksel kültüre bağlı yöntemler en az iki gün sürerken; yüksek derecede hassas ve spesifik yöntemler olan genotipik tanımlama analizleri de yüksek maliyetli olmanın yanında büyük ölçüde uzmanlık gerektirmektedir. Bu iki farklı yaklaşımın arasında MALDI TOF MS ile bakteriyel tanımlama hem güvenilirliği hem de rutin analizlere eklenebilmesiyle önem taşımaktadır.

Mikroorganizmaların kütle spektroskopisine dayanan tanımlanması, belirli bir anda bir hücrede bulunan proteinlerin tam seti anlamına gelen proteoma bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ribozomal proteinlerin farklı kütleleri, güdümsüz hiyerarşik kümelenme yaklaşımlarının uygulanmasını ya da model inşa metotlarının uygulanmasını sağlayan spesifik parmak izleri oluşturmayı sağlamaktadır. Ancak, bir hücrenin proteomu farklı büyüme koşullarına göre farklılıklar gösterdiğinden bu yöntemle çalışılırken tekrar edilebilir sonuçlar alabilmek için inkübasyon sıcaklığı, besiyeri ve inkübasyon süresi gibi değişkenlerin mümkün olduğunca sabit tutulması gerekmektedir (Pavlovic vd., 2013).

Tipik bir kütle spektroskopisi; bir iyon kaynağı, bir kütle analiz edici ve bir dedektör olmak üzere 3 parçadan oluşmaktadır. MALDI, biyomolekülleri bozulmaya uğratmadan, onları küçük organik bileşiklerin (2,5-dihidroksibenzoik (DHBA) α -siyano-4-hidroksisinamik asit (CHCA) ya da 3,5-dimetoksi-4- hidroksisinamik asit (sinapinic acid, SA) kristallerine gömerek iyonize etmektedir. Bu küçük organik molekül UV lazerden radyasyonu absorbe eder ve enerjisini proteinlere taşır. Böylece proteinler bozulmadan iyonize olur. MALDI'deki

iyonizasyon aşaması birincil ve ikincil iyonizasyon olarak 2 adımlı bir mekanizma olarak açıklanabilir. Lazer atışındaki enerji sadece matriks tarafından absorbe edilirken; matriks buharlaşır ve iyonları analite transfer eder. Bu da analitin desorpsiyonuna neden olur. Bu iyonizasyon her tür molekülden sadece tek yüklü iyonlar oluşturur. Gaz fazına geçtikten sonra, yüklü moleküller elektrik alan içerisinde hızlanır ve kütle/yük oranına göre kütle analiz edicide ayrılır ve son olarak dedektör tarafından değerlendirilir. Tespit edilen her molekül; moleküler kütlesi, yükü, kütle/yük oranı ve sinyalin bağlı yoğunluğu açısından değerlendirilir (Pavlovic vd., 2013).

4.2. Metagenomik amplikon dizileme analizleri

Kompleks bakteriyel komünitelerin ortaya konmasında standart mikrobiyolojik ekim yöntemlerinin yetersiz kaldığı gerçeği, "Great Plate Count Anomaly" olarak isimlendirilmekte ve dünya üzerindeki bakterilerin yaklaşık sadece %1'nin *in vitro* olarak kültüre edilebildiğini ifade etmektedir (Satam vd., 2023). Metagenom terimi ilk kez 1998 yılında, daha önce tek genomların çalışılmasında kullanılan yaklaşımların çevresel toprak örneklerindeki mikroorganizmaların toplam genomunun ifade edilmesi için kullanılmıştır (Bharucha vd., 2020; Thomas vd., 2014). Bir başka deyişle metagenomik bir örnekte bulunan hem dominant hem de düşük yoğunluktaki bütün organizmaların genomik materyalinin aynı anda tanımlanması için kullanılan dizileme yöntemleridir (Bharucha vd., 2020; Escobar-Zepeda vd., 2016). Metagenom verileri, yüksek çıktılı dizileme metotları (HTS) kullanılarak elde edilir.

Carl Woese'nin 1985 yılında ribozomal RNA (rRNA) genlerinin evrimsel kronometreler olduğunu gösteren öncü çalışmasının ardından, 5S ve 16S rRNA gen dizilerinin doğrudan analiz edilmesiyle kültüre etme yöntemleri kullanılmadan çevresel bir örnekteki mikroorganizma çeşitliliğinin ortaya konması sağlanmıştır (Satam vd., 2023). Bu çalışmalar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) teknolojisinin ilerlemesi ve neredeyse tüm genin çoğaltılması için primerlerin dizayn edilebilmesiyle çok daha ileri bir noktaya gelmiş ve 1990'ların ortalarında sırasıyla 'pyrosequencing' ve 'paralelmiş bağlanma aracılığı ve boncuk-temelli dizileme' metotlarının oluşturulmasıyla Yeni Nesil Sekanslama (NGS) teknolojileri geliştirilmiştir (Kergourlay vd., 2015;

Satam vd., 2023). Bu teknolojiye görülen ilerlemeler son yıllarda mikrobiyal ekosistemlerin incelenmesinde önemli bir aşama olan HTS yöntemlerinin oluşturulmasını sağlamıştır.

Birçok metagenomik çalışma rastgele çoğaltılmış DNA parçalarının dizilenmesinden ziyade bakteriyel türlerin tanımlanmasında önemli bir araç olan 16S rRNA geninin analizine dayanmaktadır. Gıda mikrobiyotasında önemli bir yer tutan mayalar ve küflerin tanımlanmasında ise kromozomlarda yer alan ribozomal rRNA'ların küçük alt birim ve büyük alt birim genleri arasında yer alan 'internal transcribed spacer (ITS)' bölgesi hedeflenmektedir. Çevresel bir örneğin mikrobiyotası hakkında derinlemesine bilgi sahibi olmayı sağlayan bu yöntemin gıda alanında kullanımı ise geleneksel fermente gıdaların karakterizasyonu, bir gıda ürünüde mikrobiyal komünitenin gelişim ve değişiminin gözlenmesi, bakteriyel bozulmanın tespiti ve durdurulması olarak sayılabilir (Kergourlay vd., 2015).

Örnek hazırlama aşaması, herhangi bir metagenomik çalışmanın ilk ve en önemli kısmıdır. Ekstrakte edilen DNA, örnekte bulunan tüm hücreleri temsil etmeli ve ardından gelen kütüphane hazırlama ve dizileme aşamalarında kullanılacak olan yeterli miktarda yüksek kalitede nükleik asitler içermelidir. Günümüzde ekstraksiyonun yapılacağı çevresel örnek tipine göre farklı ekstraksiyon kitleri bulunmaktadır. Hedef komünitenin bir bitki ya da hayvan gibi host ile ilişkili olma durumuna göre fraksiyonlama ya da seçici lizis işlemi uygulanabilmektedir (Thomas vd., 2014). Böylece host genomun geniş olduğu durumlarda, bu genomun mikrobiyal komüniteyi alt etmesi önlenmektedir.

DNA elde edilmesinin ardından, cihaz tipine bağlı olarak değişen şekilde, DNA ön işleme adımı uygun bir kütüphane içerisine uygulanır. Genel olarak ilk önce yüksek molekül ağırlıklı DNA uygun platforma spesifik boyutta kesilir (Dijk vd., 2014). Daha sonra kör uçlu DNA parçaları elde etmek için DNA uçlarına bir parlatma işlemi uygulanır ve spesifik adaptörler bu parçalara bağlanır. Fonksiyonel bir kütüphane, 3' ve 5' uçlarına bağlanmış spesifik adaptör dizileri gerektirmektedir (Buermans ve den Dunnen, 2014). Adaptör bağlama aşamasından sonra hazırlanan kütüphane hemen dizileme işlemine alınabileceği gibi PCR kullanılarak bir ön çoğaltma işlemi de uygulanabilir.

Metagenomik yöntemlerin klasik yöntemlere göre sahip olduğu tüm üstünlüklere karşın çalışmalar sırasında doğru ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken hususlar bulunmaktadır. Öncelikle, belirli bir gıda ürünüde yer alan mikroorganizmaların ve bunların miktarlarının doğru bir profilini oluşturmak için çalışılan numunenin ürünü doğru şekilde yansıttığından emin olunmalıdır. Örnek alındıktan sonra hem nükleik asit ekstraksiyonundan önce hem de sonrasında taşıma, depolama, aerobik ya da anaerobik saklama koşullarına dikkat edilerek mikroorganizma miktarlarının koşullardan etkilenmemesi sağlanmalıdır. Ayrıca analizler sırasında farklı mikrobiyal türler, hücre duvarı yapısındaki farklılıklardan dolayı litik ajanlardan farklı hassasiyette etkilendiğinden ekstrakte edilen nükleik asitlerin saflığı farklı olabilmektedir. Bunların yanında gıda gibi ürünlerinde matriks oldukça kompleks olabildiğinden PCR amplifikasyon aşamasını etkileyen safsızlıklar, analizleri etkileyebilmektedir. Ayrıca, PCR ile amplifikasyon aşaması sonuçlarda sapma yaratarak mikroorganizmaların miktarlarını orijinal örnektekinden farklı gösterebilmektedir (Ercolini, 2013). Dizileme aşamasında göz önüne alınması gereken bu konularla birlikte, elde edilen verilerin uygun biyoinformatik programlarla doğru ve güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi metagenomik çalışmaların kritik bir aşamasıdır.

4.3. Metabolomik yaklaşımlar ve tarhananın organik asit ve etanol içeriği

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat metabolizması sırasında şekerleri kullanarak organik asit oluşturmakta ve oluşan çeşitli metabolitler bu mikroorganizmaların gelişimi sırasında kullanılmaktadır. Dolayısıyla LAB fermentasyonu; insan sağlığına faydalı gıda biyoaktif bileşenlerinin, fonksiyonel ve organoleptik özelliklerinin ve biyolojik kullanılabilirliğinin zenginleşmesi için kullanışlı bir teknik olarak kabul edilmektedir (Zheng vd., 2023). Metabolomik ise biyolojik örneklerde yer alan çok sayıda metabolitlerin tespit edilmesi ve karşılaştırılması için kullanılan analitik teknikleri kapsamaktadır (Garcia-Canas ve Simo, 2019; Manchester ve Anand, 2017). Fermente gıdalarda bakteriyel aktivite sonucu oluşan metabolitlerin miktar ve değişimlerinin belirlenmesi için çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Balcázar-Zumaeta vd., 2023; Ran vd., 2023; Xu vd., 2023; Zheng vd., 2023). Tarhana fermentasyonu sırasında LAB ve

maya metabolizmaları ve bunların ilişkileri ile oluşan organik asitler ve etanol miktarları ve bunların fermantasyon süreci boyunca değişimleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Gaz Kromatografisi (GC) gibi analitik tekniklerle incelenebilmektedir (Ran vd., 2023).

Mikrobiyal metabolizmanın tipik bir ürünü olan organik asitler, yapıları karbon iskeletine dayanan ve doğal olarak çeşitli bitkisel ve hayvansal maddelerin yapısında bulunan moleküllerdir. Fermente gıdaların aroma ve lezzetinin; gıdada oluşan organik asitler, serbest amino asitler, ve asetaldehit ve diasetil gibi karbonil bileşiklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Özdemir vd., 2018).

Tarhana hamurunda LAB tarafından oluşturulan laktik, asetik ve propiyonik asit gibi organik asitlerin antimikrobiyal etkisi olduğu bilinmektedir. Bu antogonistik etki asitlerin, membran potansiyelinin korunması ile etkileşime giren ve aktif transportu engelleyen bakteriyel sitoplazmik membran üzerindeki aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Asetik asit mayalar, küfler ve bakteriler için inhibe edici özellikte iken, propiyonik asit mayalar ve bakterilere karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. Bunlara karşın asetaldehit ve etanolün fermente gıdalarda oluşan miktarı, antimikrobiyal etki açısından minimal değerdedir (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

Tarhana fermantasyonu sırasında hamurda yer alan ana organik asitin laktik asit olduğu; asetik, propiyonik, sitrik ve pürivik asitlerin küçük miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Tarhana hamurunda yer alan laktik, asetik ve propiyonik asit varlığı; yoğurtta yer alan homo- ve heterofermantatif LAB ile unda yer alan laktik, asetik ve propiyonik asit bakterileri ve oluşan laktik asiti substrat olarak kullanan propiyonik asit bakterilerine bağlanmıştır. Ayrıca LAB laktozdan laktik asit üretirken minör miktarlarda asetik, bütirik, propiyonik, izovalerik, kaprik ve kaproik asitlerin de meydana geldiği belirtilmiştir (Özdemir vd., 2018).

Omik bilimi, kapsadığı analitik tekniklerin hatasız ve kesin sonuçları sayesinde çalışılan bir biyolojik sistemin fonksiyonlarının anlaşılmasını sağlamaktadır (Balcázar-Zumaeta vd., 2023). Bu

çalışmanın amacı farklı geleneksel tarhana çeşitlerinin fermantasyon süreçleri boyunca mikrobiyota değişimlerinin incelenmesi ve bu değişimlerin örneklerde tespit edilen metabolitlerle ilişkisinin değerlendirilmesi süreçlerinde çeşitli omik teknolojilerin kullanım fırsatlarının incelenmesidir.

5. Sonuç

Hazırlanan bu çalışmada önerilen araştırma yönteminin ilk basamağı farklı geleneksel reçetelere uygun olarak ve yerel hammaddeler kullanılarak tarhana hamurlarının hazırlanması ve fermantasyona bırakılmasıdır. Fermantasyon süreçlerinin izlenmesi amacıyla da pH, titrasyon asitliği ve diğer kimyasal analizler yapılması tavsiye edilir. Ardından fermantasyonun amaca uygun olarak belirlenen aşamalarında hamurlardan örnekler alınarak klasik mikrobiyolojik yöntemlerle farklı besiyerlerine ekimler yapılarak mikroorganizma yüklerindeki değişimler gözlenirken MALDI TOF MS analizleri için de saf izolatlar elde edilebilmektedir. Bu saf kültürler MALDI TOF MS sistemi ile kültüromik yaklaşımlar kullanılarak tanımlanabilir. Bunun yanında tarhana hamurlarının bakteriyel ve fungal mikrobiyotalarının fermantasyon prosesi boyunca değişimi metagenomik yaklaşımlar kapsamında yüksek çıktılı dizileme yöntemleri ve biyoinformatik analizlerle ortaya koyulabilmektedir. Tarhana hamurlarının mikrobiyotalarındaki değişimlere paralel olarak bu hamurlarda oluşan metabolitlerin değişimlerinin izlenmesi için HPLC ve GC cihazları metabolik yaklaşım kapsamında kullanılarak organik asit ve etanol miktarları belirlenebilecektir. Elde edilen verilerin bütünleştirici analizlerle değerlendirilebilmesi için kullanılabilecek çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu kapsamda metagenomik verilerin incelenmesi için temel bileşen analizleri, metabolitlerin tarhana çeşidi ve örnek alınan zamana göre değişimlerinin değerlendirilmesi için ısı haritaları oluşturulması ve mikrobiyota-metabolit ilişkilerinin ortaya koyulabilmesi için korelasyon analizleri önerilmektedir. Böylece, geleneksel reçete ve hammaddeler kullanılarak hazırlanan tarhana çeşitlerinin kimyasal, mikrobiyolojik ve metabolik açıdan karakterizasyonu ve incelenen parametrelerin fermantasyon boyunca değişimleri belirlenebilecektir.

6. Kaynaklar

- Balcázar-Zumaeta, C. R., Castro-Alayo, E. M., Cayo-Colca, I. S., Idrogo-Vásquez, G., & Muñoz-Astecker, L. D. (2023). Metabolomics during the spontaneous fermentation in cocoa (*Theobroma cacao* L.): An exploratory review. *Food Research International*, 163(September 2022).
- Bharucha, T., Oeser, C., Balloux, F., Brown, J. R., Carbo, E. C., Charlett, A., Chiu, C. Y., Claas, E. C. J., de Goffau, M. C., de Vries, J. J. C., Eloit, M., Hopkins, S., Huggett, J. F., MacCannell, D., Morfopoulou, S., Nath, A., O'Sullivan, D. M., Reoma, L. B., Shaw, L. P., Field, N. (2020). STROBE-metagenomics: a STROBE extension statement to guide the reporting of metagenomics studies. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(10), e251–e260.
- Buermans, H. P. J., & den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), 131–149.
- Chaves-López, C., Rossi, C., Maggio, F., Paparella, A., & Serio, A. (2020). Changes Occurring in Spontaneous Maize Fermentation: An Overview. *Fermentation*, 6(1), 36.
- Coşkun, F. (2014). Tarhananın Tarihi ve Türkiye ' de Tarhana Çeşitleri History of Tarhana and Varieties of Tarhana in Turkey. 2014(3), 69–79.
- Dağlıoğlu, O. (2000). Tarhana as a traditional Turkish fermented cereal food. Its recipe, production and composition. *Nahrung/Food*, 44(2), 85–88.
- Dijk, E., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics : TIG*, 30(9), 418–426.
- Ercolini, D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), 3148–3155.
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, 57, 116–127.
- Garcia-Canas, V., & Simo, C. (2019). Food Metabolomics—An Overview. Reference Module in Food Science.
- Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter, M. F. H., & Vogelmann, S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3), 4–11.
- Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., & Champomier Vergès, M.-C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 31–39.
- Köten, M., Karahan, A. M., Karahan, L. E., & Yazman, M. M. (2019). Tarhananın Besinsel Önemi ve Fonksiyonel Bileşenlerce Zenginleştirilmesi. *Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi*, 4(3), 120–129.
- Lv, J., Li, C., Li, S., Liang, H., Ji, C., Zhu, B., & Lin, X. (2019). Effects of temperature on microbial succession and quality of sour meat during fermentation. *Lwt*, 114(July), 108391.
- Manchester, M., & Anand, A. (2017). Metabolomics: Strategies to Define the Role of Metabolism in Virus Infection and Pathogenesis. In *Advances in Virus Research* (pp. 57–81).
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 2–8.
- O'Callaghan, Y. C., Shevade, A. V., Guinee, T. P., O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2019). Comparison of the nutritional composition of experimental fermented milk:wheat bulgur blends and commercially available kishk and tarhana products. *Food Chemistry*, 278, 110–118.
- Özdemir, N., Yazıcı, G., Şimşek, Ö., Özkal, S. G., & Çon, A. H. (2018). The effect of lactic acid bacteria and yeast usage on aroma development during tarhana fermentation. *Food Bioscience*, 26, 30–37.

- Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R., & Busch, U. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *The Open Microbiology Journal*, 7(1), 135–141.
- Petrova, P. (2020). Lactic Acid Fermentation of Cereals and Pseudocereals: Ancient Nutritional Biotechnologies. *Nutrients*, 12(2017), 1–26.
- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D. C., Müllleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., Andrejev, S., Kafkia, E., Typas, A., Sauer, U., Ralser, M., & Patil, K. R. (2017). Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Systems*, 5(4), 345–357.e6.
- Ran, J., Su, Y., Wang, P., Yang, W., Li, R., Jiao, L., & Zhao, R. (2023). Effect of *Lactobacillus acidophilus* fermentation on bioaccessibility: The relationship between biotransformation and antioxidant activity of apple polyphenols based on metabolomics. *Lwt*, 190(September), 115360.
- Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, Thakare RP, Banday S, Mishra AK, Das G, Malonia SK. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel)*. 12(7).
- Sengun, I. Y., Nielsen, D. S., Karapinar, M., & Jakobsen, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 105–111.
- Settanni, L., Tanguler, H., Moschetti, G., Reale, S., Gargano, V., & Erten, H. (2011). Evolution of fermenting microbiota in tarhana produced under controlled technological conditions. *Food Microbiology*, 28(7), 1367–1373.
- Şimşek, Ö., Özel, S., & Çon, A. H. (2017). Comparison of lactic acid bacteria diversity during the fermentation of Tarhana produced at home and on a commercial scale. *Food Science and Biotechnology*, 26(1), 181–187.
- Tangüler, H. (2014). Traditional Turkish Fermented Cereal Based Products: Tarhana, Boza and Chickpea Bread #. In *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* (Vol. 2, Issue 3). www.agrifoodscience.com,
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2014). Metagenomics: A guide from sampling to data analysis. *The Role of Bioinformatics in Agriculture*, Figure 1, 357–383.
- TS 2282, (2004). <https://intweb.tse.org.tr/standard/standard/Standard.aspx?0811180511151080511041191101040550480650820770551030760760560841031181101012207604307611410608204706805310105511211010305711511510311605506908508305308510710810207412008308210208409008007005711012>
- Viljoen, B. (2006). Yeast Ecological Interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents. In A. Querol & G. Fleet (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages* (1st ed., pp. 83–110). Springer Berlin Heidelberg.
- Xu, W., Dong, Q., Zhao, G., & Han, B. (2023). Analysis of metabolites of bactrain camel milk in Alxa of China before and after fermentation with fermenting agent TR1 based on untargeted LC-MS/MS based metabolomics. *Heliyon*, 9(8), e18522.
- Zheng, Z., Wei, L., Zhu, M., Qian, Z., Liu, J., Zhang, L., & Xu, Y. (2023). Effect of lactic acid bacteria co-fermentation on antioxidant activity and metabolomic profiles of a juice made from wolfberry and longan. *Food Research International*, 174.