

## TECHNOLOGIE „FOOD-OMICS” W PROFILOWANIU METAGENOMU ŻYWNOSCI

Edyta Juszcuk-Kubiak<sup>1\*</sup>, Monika Greguła-Kania<sup>2</sup>, Barbara Sokołowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie

<sup>2</sup> Instytut Hodowli Zwierząt i Ochrony Bioróżnorodności, Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w listopadzie 2020 r.

**Streszczenie:** Nowoczesne badania w dziedzinie nauk o żywności i żywieniu przechodzą od klasycznych metodologii do zaawansowanych strategii molekularnych, w których kluczową rolę odgrywa technologia sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Foodomika, która została niedawno zdefiniowana jest nowym, globalnym podejściem wykorzystującym zaawansowane technologie „omics” w analizach żywności. W ostatnich latach technologie „food-omics” są szeroko stosowane w mikrobiologii żywności w kierunku identyfikacji, kwantyfikacji i śledzenia mikrobiologicznych konsorcjów żywnościowych oraz oceny jakości i bezpieczeństwa żywności. Metagenomika, zwana genomiką populacji drobnoustrojów jest opartą na sekwencji niezależną od hodowli analizą zbiorowych genomów mikroorganizmów obecnych w danym środowisku. Ta szybko rozwijająca się technika dostarczyła nowych informacji na temat różnorodności taksonomicznej i dynamiki społeczności mikroorganizmów na poziomie rodzaju, gatunku a nawet szczepu. Zintegrowane podejście metagenomiczne okazało się potężnym narzędziem w profilowaniu ekologii mikrobiologicznej złożonych ekosystemów takich jak żywność fermentowana. Obecne kierunki badań koncentrują się na zrozumieniu i możliwości kontroli procesu fermentacji w celu zapewnienia stałych właściwości sensorycznych produktów, zwiększenia bezpieczeństwa i ograniczenia psucia się żywności. Celem niniejszego przeglądu jest przedstawienie najnowszych osiągnięć w zakresie wykorzystania technologii „food-omics” w analizach bioróżnorodności i funkcjonalności metagenomu produktów żywnościowych, bezpieczeństwa żywności i kontroli jakości oraz bieżących wyzwań i potencjalnych zastosowań.

1. Wstęp. 2. Metodologie i technologie w dziedzinie „food-omics”. 3. Zastosowanie technologii „food-omics” w analizach żywności. 3.1. Metagenomika jako narzędzie do monitorowania procesu fermentacji. 3.2. Monitorowanie warunków przechowywania żywności. 3.3. Monitorowanie bezpieczeństwa żywności. 4. Podsumowanie

### “FOOD-OMICS” APPLICATIONS IN THE FOOD METAGENOM PROFILING

**Abstract:** Modern research in food science and nutrition is transferring from classical methodologies to advanced molecular strategies in which next-generation sequencing (NGS) technology plays a crucial role. In this context, Foodomics has been recently defined as a new and global field using advanced “omics” technologies in food analysis. In recent years, “food-omics” technologies are widely applied in food microbiology to identify, quantify and to track food microbial consortia in the food chain, as well as in the food safety and quality assessment. Metagenomics, referred to as community genomics is a sequence-based analysis of the collective genomes of microorganisms present in a given environment. This rapidly developing technique has provided new knowledge about taxonomic diversity and the dynamics of microbial communities at the genus, species and even strain level. An comprehensive metagenomic approach has proven to be a powerful tool in profiling the microbial ecology of complex ecosystems such as fermented foods. Currently, research focuses on understanding and controlling the fermentation process to ensure the consistent sensory properties of food products, increase safety and reduce food spoilage. The goal of this review is to provide an overview of the latest achievements of the “food-omics” technologies applied to biodiversity and functionality of food microflora, food safety and quality control. Furthermore, we discuss current challenges and future applications of “food-omics” technologies in the food industry.

1. Introduction. 2. Methodologies and technologies in the field of food-omics. 3. Application of “food-omics” technology in food analysis. 3.1. Metagenomics as a tool for monitoring the fermentation process. 3.2. Monitoring food storage conditions. 3.3. Food safety monitoring. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** bezpieczeństwo i jakość żywności, „food-omics”, metagenomika, sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

**Keywords:** food safety and quality, „food-omics”, metagenomics, next generation sequencing (NGS)

### 1. Wstęp

Technologia sekwencjonowania następnej generacji (NGS, Next Generation Sequencing), zwana również wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem (HTS, High

Throughput Sequencing) wraz wielkoskalowymi technikami „omics” stała się powszechnie wykorzystywanym narzędziem w dziedzinie nauk o żywności i żywieniu. W 2009 roku grupa Cifuentesa zaproponowała nową koncepcję oraz praktyczne podejście „foodomiki”

\* Autor korespondencyjny: Edyta Juszcuk-Kubiak, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie, ul. Rakowiecka 36, Warszawa; tel. 22 606 36 26, fax. 22 849 04 26; e-mail: edyta.juszcuk-kubiak@ibprs.pl

do wdrożenia metod „omics” w analizach żywności [8]. Obecnie, foodomika jest definiowana jako nowa, globalna dyscyplina, która łączy dziedziny badań żywności i żywienia przy użyciu zaawansowanych technologii omicznych, tj. genomika, transkryptomika, proteomika, metabolomika oraz bioinformatyka, umożliwiając przeprowadzenie kompleksowej oceny mikrobiologicznej produktów spożywczych [90]. Zainteresowanie technologiami „food-omics” zbiega się z wyraźną zmianą trendu w medycynie i biotechnologii w kierunku popularyzacji zdrowego żywienia i zapobiegania chorobom cywilizacyjnym, a także z promocją tak zwanej żywności funkcjonalnej [10].

Metagenomika, jako dyscyplina foodomiki, zwana również genomiką populacji mikroorganizmów, umożliwia dokładną charakterystykę mikrobioty (d. mikroflory) spożywczej pod kątem genetycznym dając podstawę do dalszych analiz filogenetycznych i funkcjonalnych, bez konieczności ich hodowli w oparciu o klasyczne metody [20]. Już w tej chwili możliwe jest dokonanie precyzyjnej i szybkiej identyfikacji drobnoustrojów na poziomie rodzaju, a nawet gatunku oraz określenie ich zasobów genetycznych. W ostatnich latach technologia HTS w oparciu o analizy metagenomiczne jest szeroko stosowane w analizach mikrobiologii żywności, obejmujących profilowanie metagenomu produktów spożywczych, typowanie szczepów oraz monitorowanie procesów przechowywania i produkcji żywności [5, 35]. Zintegrowane techniki metagenomowe ujawniły nowy wgląd w dynamikę ekosystemów fermentacyjnych oraz charakterystykę różnorodności i interakcji gatunków mikroorganizmów w trakcie tego procesu. Wykazano, że wzajemne interakcje mikrobioty jelit i mieszanych konsorcjów mikrobioty ziaren kefirowych mogą mieć pozytywny wpływ na jakość produktów fermentowanych poprzez wymianę „informacji” i metabolitów. Zjawisko wyczuwania liczebności (quorum sensing) może odgrywać istotną rolę w złożonych społecznościach mikroorganizmów biorących udział w procesie fermentacji [81]. W oparciu o profilowanie mikrobioty fermentowanych produktów opisano szereg nowych szczepów starterowych, które mają istotne znaczenie w przemyśle spożywczym przy opracowaniu nowej gamy produktów mlecznych, tj. sery i kefir [1, 14]. W odniesieniu do bezpieczeństwa żywności, zastosowanie zintegrowanych analiz metagenomów fermentacyjnych znacząco przyczyniło się do zrozumienia biologicznych i biochemicznych procesów produkcyjnych lokalnej fermentowanej żywności [21, 30]. Jednym z kluczowych zastosowań zintegrowanych technologii „food-omics” w przemyśle spożywczym jest zrozumienie pierwotnej przyczyny skażeń żywności oraz szybkiej i precyzyjnej charakterystyki patogenów w celu zapewnienia odpowiedniej kontroli bezpieczeństwa i jakości żywności w całym łańcuchu żywnościowym [20, 45].

W niniejszym przeglądzie przedstawiamy najnowsze postępy w badaniach metagenomu produktów żywnościowych z wykorzystaniem technologii „food-omics” w celu wyjaśnienia w jaki sposób to podejście może być cennym narzędziem w dokładniejszej charakterystyce żywności i jej biotransformacji oraz opracowaniu strategii kontroli jakości i bezpieczeństwa żywności. Ponadto, omawiamy aktualne wyzwania oraz przyszłe zastosowania zintegrowanych technologii „food-omics” w przemyśle spożywczym.

## 2. Metodologie i technologie w dziedzinie „food-omics”

W ostatniej dekadzie wysokoprzepustowe sekwencjonowanie (HTS) przekształciło się z narzędzia badawczego w rutynowe stosowanie w wielu dziedzinach, w tym diagnostyce, badaniach epidemiologicznych, analizach mikrobiologicznych żywności, monitorowaniu skażeń żywności oraz analizach autentyczności produktów spożywczych [6, 35]. Dostępność tak potężnego zestawu narzędzi oferuje ogromne możliwości analizy metagenomów żywności w celu zapewnienia wydajności procesu, jakości produktu i bezpieczeństwa żywności.

Modelowy eksperyment metagenomiczny zakłada charakterystykę różnorodności taksonomicznej mikroorganizmów (bakterie, grzyby) poprzez klasyfikację zakonserwowanych sekwencji markerów (np. rDNA). Analogiczne podejście można również zastosować do charakterystyki chemotypów, wykorzystując zdolność mikroorganizmów do produkcji różnych klas metabolitów wtórnych, dzięki niezwykle różnorodnym genom szlaku biosyntezy [6]. Przygotowanie eksperymentu z zakresu metagenomiki przebiega w kilku etapach: (1) izolacja DNA, (2) tworzenie bibliotek dla docelowych grup taksonomicznych, (3) sekwencjonowanie z wykorzystaniem platformy, (4) analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania, oraz (5) szczegółowy raport. Zalety badań profilowania metagenomu opartego na HTS w porównaniu do metod tradycyjnych, obejmują: (1) możliwość identyfikacji tysięcy mikroorganizmów w czasie pojedynczej analizy; (2) możliwość identyfikacji bioróżnorodności gatunkowej, jak i obfitości ich wzrostu; (3) możliwość identyfikacji nowych gatunków i szczepów mikroorganizmów, których identyfikacja w laboratorium jest niemożliwa; (4) bardzo szybki screening złożonych konsorcjów mikrobioty oraz (5) lepsze zrozumienie procesów fizjologicznych w celu kontroli mikrobioty.

Metagenomika to termin, który jest często używany do opisanie 3 różnych podejść: (1) określenie całej sekwencji genomu pojedynczego hodowanego izolatu, zwane jako „sekwencjonowanie całego genomu” (WGS), (2) „metagenomika”, w której NGS generuje

sekwencje całej genomowej zawartości społeczności, zwane jako „losowe sekwencjonowanie” (WMG) oraz (3) sekwencjonowanie amplikonu w oparciu o określone rodziny genów markerowych [35]. Analizy amplikonu wykorzystują markery genetyczne w oparciu o regiony hiperzmiennie (16S, bakterie) i transkrybowanej transkrypcji wewnętrznej (ITS, grzyby) a wyniki wysokoprzepustowego sekwencjonowania generowane są z dużą liczbą odczytów danej sekwencji w ciągu jednej analizy. Masowe równoległe sekwencjonowanie tych amplikonów (metabarkoding, profilowanie mikrobiologiczne) generuje szereg informacji na temat złożonej mikrobioty różnych nisz ekologicznych. Jedną z korzyści metody opartej na amplikonach jest możliwość śledzenia kolejnych populacji drobnoustrojów w czasie na różnych poziomach taksonomicznych. W porównaniu z losowym sekwencjonowaniem metagenomu (WMG), metody oparte na 16S rDNA i ITS, umożliwiają szczegółowy wgląd w dynamikę różnorodności populacji mikroorganizmów w odpowiednim czasie lub pod wpływem zmian warunków środowiska. Zazwyczaj sekwencjonowanie amplikonu ogranicza się do identyfikacji na poziomie rodzaju, chociaż niektóre analizy osiągnęły przypisanie na poziomie gatunku, dzięki dedykowanym klasyfikatorom gatunku i zastosowaniu dłuższych technologii odczytu [75].

Metagenomika, oparta na losowym sekwencjonowaniu genomu (WMS) ma kilka zalet w porównaniu z podejściem opartym o amplikony. Wyjątkową zaletą WMS jest możliwość monitorowania dynamiki populacji mikroorganizmów i ich potencjału metabolicznego bezpośrednio w matrycy, a tym samym identyfikacji i charakterystyki szerokiej gamy genów, w tym nowych genów i operonów całej społeczności drobnoustrojów. Co więcej, możliwe jest otrzymanie kompletnych genomów mikrobiologicznych z metagenomów, uzyskując w ten sposób rozdzielczość na poziomie szczepu. Sekwencjonowanie całego genomu (WGS) jest szeroko stosowane do badań pod kątem wykrywania, identyfikacji i charakterystyki patogenów, dostarczając cennego i szybkiego obrazu obecności markerów genetycznych, określających serotyp, zjadliwość czy oporność patogenu [26]. Chociaż sekwencjonowanie WMS zapewnia znacznie dokładniejszą charakterystykę taksonomiczną i genetyczną populacji mikroorganizmów, koszt analiz jest wciąż znacznie wyższy w porównaniu z podejściem opartym na amplikonie.

Najczęściej stosowane platformy do sekwencjonowania metagenomu w oparciu o 16S rDNA i ITS, to sekwenator Miseq (Illumina) oraz Ion Torrent Personal Machine (PGM) firmy Life Technologies. Platformy wysokoprzepustowe nowej generacji, tj. NexSeq 500, i seria Hiseq (Illumina) oraz Ion Torrent (Life Technologies) umożliwiają sekwencjonowanie genomów zarówno organizmów prokariotycznych jak i

eukariotycznych. Sekwenatory Illumina i Ion różnią się znacznie pod względem chemii do sekwencjonowania, wydajności (długość odczytu, pokrycie), dokładności i kosztu analiz. Wybór platformy zależy od celu analiz i potrzeb użytkownika oraz od przepustowości sekwencjonowania. Ważnymi platformami do analiz sekwencjonowania metagenomów są również platformy PacBio RS II (Pacific Biosciences) i Nanopore MinION (Oxford Nanopore Technologies) należące do sekwenatorów trzeciej generacji (Third Generation Sequencing, TGS). PacBio wykorzystuje technologię sekwencjonowania pojedynczych cząsteczek w czasie rzeczywistym (SMRT), podczas gdy MinION technologię nanoporów [75]. Co ważne odczyty generowane przez PacBio i MinION są znacznie dłuższe niż generowane przez sekwenatory Illumina i Ion, co powoduje, że obie platformy są dedykowane do sekwencjonowania genomu *de novo* i kompletnego składania genomów bakteryjnych. Strategie sekwencjonowania trzeciej generacji (TGS) nie są jednak rutynowo stosowane w analizach mikrobiomów. Niedawno do sekwencjonowania pełnej długości amplikonów 16S rDNA wykorzystano platformę MinION trzeciej generacji wygenerowaną z syntetycznej społeczności dziesięciu gatunków drobnoustrojów o różnej liczebności [52]. Profilowanie całego amplikonu 16S rDNA na podstawie MinION prawidłowo identyfikowało gatunki, a profile taksonomiczne korelowały z określonym poziomem ich liczebności. Ta technika oferuje pewne ulepszenia pod względem głębokości danych uzyskanych w porównaniu z obecnymi strategiami 16S rDNA, umożliwiając charakterystykę mikroorganizmów na poziomie gatunku. Wkrótce można się spodziewać, że platformy TGS zyskają szersze zastosowanie związane z mikrobiologią żywności.

Dzięki rozwojowi technologii „omics” metagenomika oparta na sekwencjonowaniu DNA, została poszerzona o analizy profilowania metatranskryptomu (RNA-seq), metaproteomu i metabolomu. Metatranskryptomika obejmuje sekwencjonowanie cDNA, wygenerowane z transkryptów mRNA w pojedynczej próbie zmieszanej społeczności mikroorganizmów w celu globalnej analizy ekspresji genów. Kompleksowe analizy metagenomu z zastosowaniem RNA-seq umożliwiają funkcjonalną identyfikację szlaków metabolicznych o istotnym znaczeniu dla produkcji nie opisanych wcześniej metabolitów. Profilowanie ekspresji genów umożliwia również poznanie zmian ekspresji genów mikroorganizmów w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, tj. temperatura, wilgotność, składniki pokarmowe [15]. W przemyśle spożywczym techniki oparte na profilowaniu metagenomów, mogą znaleźć zastosowanie w optymalizacji procesów produkcyjnych oraz w monitorowaniu autentyczności i bezpieczeństwa żywności.

W mikrobiologii żywności metabolomikę i meta-proteomikę stosuje się odpowiednio do identyfikacji i oceny ilościowej metabolitów i białek drobnoustrojów w matrycy żywności. Spośród enzymów o dużym znaczeniu biotechnologicznym, szczególnie poszukiwane są lipazy i esterazy, pektynazy czy endonukleazy. Takim bogatym źródłem identyfikacji nowych metabolitów jest metagenom żywności [15]. Analizy oparte o spektrometrię mas (MALDI-TOF MS) czy chromatografię cieczową (LC) umożliwiają analizę proteomu i metabolomu mikroorganizmów w celu identyfikacji ważnych szlaków metabolicznych, w tym metabolitów wtórnych o potencjalnym zastosowaniu w biotechnologii, rolnictwie i przemyśle spożywczym.

### 3. Zastosowanie technologii „food-omics” w analizach żywności

#### 3.1. Metagenomika jako narzędzie do monitorowania procesu fermentacji

##### Fermentowane produkty na bazie mleka

Metagenomika jest cennym narzędziem do identyfikacji społeczności mikroorganizmów w procesie fermentacji żywności. W przemyśle spożywczym technika ta została wykorzystana w opracowaniu profili taksonomicznych mikrobioty jogurtów, kefirów czy serów, a także do monitorowania etapów ich dojrzewania [14]. Analizy taksonomiczne i funkcjonalne mikrobioty uczestniczącej w tradycyjnych procesach fermentacyjnych umożliwiły identyfikację rdzennych kultur starterowych oraz dowiodły, że manipulując procesami produkcji w sposób istotny można stymulować środowisko mikrobioty w kierunku uzyskania fermentowanego produktu o pożądanym walorach organoleptycznych przy jednoczesnym zachowaniu wymaganych właściwości produktu. Wykazano, że różne rodzaje serów dojrzewających różnią się profilem gatunkowym mikroorganizmów, który jest istotnie skorelowany z poszczególnymi etapami ich dojrzewania. Na przykład, metagenom serów dojrzewających półtwardych cechował się wyższym składem ilościowym *Lactococcus lactis* i *Staphylococcus xylosum* w porównaniu do serów dojrzewających twardych, dla których charakterystyczny skład mikrobioty stanowiły *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* i *Lactobacillus helveticus* [89].

Ponadto kilka badań dotyczyło oceny różnorodności taksonomicznej oraz metabolicznej mikrobioty serów w obrębie trzech badanych typów skórki; skórka z porostem pleśni (Brie i Camembert), naturalna skórka sera z mleka niepasteryzowanego (St. Nectaire i Tomme de Savoie), skórka serów pielęgnowanych i przemysłowych (Taleggio, Gruyere i Epoisses), pobranych ze 137 różnych typów sera pochodzących z 10 krajów

Europy i Stanów Zjednoczonych [89]. W produkcji serów tradycyjnie dojrzewających na ich powierzchni tworzy się biofilm, zwany skórka, składający się z gatunków bakterii i grzybów pochodzących z surowego mleka, kultur starterowych oraz „starzejącego” się środowiska [46]. Analizy oparte na wysokoprzepustowym sekwencjonowaniu (HTS) w oparciu o 16S rDNA i ITS, wykazały, że profil taksonomiczny mikrobioty jest istotnie zróżnicowany w serach w zależności od typu skórki, pH i wilgotności środowiska produkcji, niezależnie od pochodzenia geograficznego. Wzory składu taksonomicznego i sukcesji metagenomu serów wykazały obecność 24 rodzajów bakterii (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*) i grzybów (*Saccharomycetales*, *Microascales*, *Hypocreales*, *Eurotiales*) oraz stwierdzono, że co najmniej 60% bakterii i 25% grzybów nie należało do kultur starterowych [89]. Ponadto, zidentyfikowano dwa rodzaje bakterii, *Yaniella* i *Nocardioopsis*, o których nigdy nie informowano w ekosystemach mikrobiologicznych żywności. Stwierdzono również, że halotolerancyjne  $\gamma$ -*Proteobacteria*, tj. *Vibrio*, *Halomonas* i *Pseudoalteromonas*, związane ze środowiskiem morskim były szeroko rozpowszenione w biofilmach serów wytwarzanych we wszystkich regionach geograficznych. Kilka taksonów grzybowych (*Scopulariopsis*, *Aspergillus*) i bakteryjnych (*Actionobacteria*, *Staphylococcus*) dominujących w skórkach serów St. Nectaire i Tomme de Savoie, wykazało pozytywną korelację z parametrami wilgotności w trakcie procesu dojrzewania. Sery Taleggio, Gruyere i Epoisses, znane z ich ostrych aromatów, były wzbogacone w wiele ścieżek metabolicznych zaangażowanych w produkcję związków smakowych, obejmujących szlak cysteiny i metioniny powiązany z wytwarzaniem lotnych związków siarki oraz szlak degradacji waliny, leucyny i izoleucyny powiązany ze specyficznym aromatem tych serów [55]. *Pseudoalteromonas*, obficie zidentyfikowane w serach Brie i Camembert oraz Taleggio posiadały gen kodujący gamma-liazę metioninową (*mgl*) przekształcającą L-metioninę w metanotiol, powodując powstawanie lotnych związków siarki nadających tym serom specyficzny aromat. Ponadto, w genomie *Pseudoalteromonas haloplanktis* zidentyfikowano geny kodujące lipazy i proteazy przystosowane do zimna, uczestniczące w lipolizie i proteolizie oraz  $\gamma$ -liazę metioniny ważnego enzymu w produkcji siarki. Enzymy te uważane są za korzystne w serze dojrzewającym i przechowywanym w niskich temperaturach, ponieważ przyczyniają się do powstawania korzystnych związków smakowych [89].

W odniesieniu do bioróżnorodności mikroorganizmów lub potencjału funkcjonalnego analiza przestrzennego rozkładu aktywnej mikrobioty trzech włoskich serów Fiore Sardo, Pecorino Siciliano i Pecorino Toscano wykazała istotną korelację między mezofilnymi LAB (*Lactobacillus plantarum*) i wtórną proteolizą,

a także syntezą składników lotnych, tj. estry, alkohole, aldehydy i związki siarki [16]. Analizy metatranskryptomomiczne odegrały kluczową rolę w zrozumieniu procesów fermentacji i dojrzewania sera Camembert i Reblochon [46]. Badania funkcjonalne w oparciu o RNA-seq wykazały, że geny związane ze szlakami metabolicznymi odpowiedzi na stres były różnie wyrażane podczas dojrzewania sera. Obserwowany profil ekspresji genów był istotnie zróżnicowany w pierwszych dwóch tygodniach okresu dojrzewania. Geny szlaku katabolizmu aminokwasów *Debaryomyces hansenii* i *Geotrichum candidum*, były skorelowane z parametrami smaku i tekstury sera. Dodatkowo, analizy 16S rDNA wykazały, że podczas degradacji matrycy mlecznej dominującymi gatunkami mikrobioty serów były *L. lactis*, *Corynebacterium casei*, *Debaryomyces hansenii* oraz *Geotrichum candidum*. Ponadto, uzupełniające badania Monnet i wsp. [59] wyjaśniły rolę szczepu *Geotrichum candidum* w różnych fazach dojrzewania sera typu Reblochon. Szczep *Geotrichum candidum* był ważny w pierwszej fazie procesu dojrzewania, w której ekspresja genów związanych z katabolizmem aminokwasów była istotnie wysoka. Podejście metatranskryptomomiczne umożliwiło stworzenie funkcjonalnych profili genów i szlaków metabolicznych skorelowanych z parametrami smaku, zapachu i tekstury sera [12].

Podejście metagenomiczne w oparciu o analizy HTS znalazły zastosowanie również w odniesieniu do bioróżnorodności i funkcji mikrobioty podczas naturalnej fermentacji serów rzemieślniczych, objętych chronioną nazwą pochodzenia (ChNP), których produkcja odbywa się bez udziału kultur starterowych. Analizy w oparciu o WMS i 16S rDNA zostały użyte do przesłania profilu populacji bakteryjnej meksykańskiego sera Cotija, otrzymywanego na bazie surowego mleka krowiego [21]. Dojrzewanie Cotija odbywa się w otwartym środowisku, w którym wilgotność i temperatura są ważnymi parametrami fermentacji. Ponadto, drewniane powierzchnie używane do zagniatania skrzepu podczas solenia są źródłem rezydentnej mikrobioty, występującej w serze. Około 80% bakteryjnej populacji Cotija składało się z *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Weissella paramesenteroides*, a drewniane powierzchnie były najprawdopodobniej źródłem obecnych gatunków *Leuconostoc* i *Weissella*. Analizy szlaków metabolicznych wykazały, że gatunki te są odpowiedzialne za rozwój autentycznych związków smakowo-zapachowych wynikających z ich aktywności lipolitycznej i proteolitycznej podczas procesu dojrzewania. Klasyfikacja sieci metabolicznych ujawniła dodatnie korelacje mikrobioty sera z katabolizmem fenyloalaniny i aminokwasów oraz produkcją enzymów biorących udział w katabolizmie wolnych kwasów tłuszczowych, tj. reduktaza karbonylowa i monooksydaza fenolowa. Ścieżki metaboliczne w odniesieniu do smaku i aro-

matu, zostały również wychwycone w oparciu o analizy WMS, w badaniach mikrobioty innego, rzemieślniczego sera chińskiego Kazak, wytwarzanego podczas spontanicznej fermentacji świeżego mleka krowiego w torbach ze skóry koziej. Dominujące *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Kurthia* i *Moraxella* wykazały dodatnie korelacje ze szlakiem metabolizmu aminokwasów, tj. kwas glutaminowy, histydyna, izoleucyna i prolina. Wśród grzybów *Dipodascus* korelował ze stężeniem kwasu 9-oktadecenowego, *Pichia* i *Penicillium* z kwasem 9-heksadecenowym, a *Issatchenkia* i *Candida* były skorelowane z poziomem leucyny i fenyloalaniny oraz z syntezą lotnych związków (estry, alkohole, aldehydy) [96].

Analizę 16S rDNA wykorzystana do identyfikacji, typowania i charakterystyki mikrobiomu tradycyjnego wędzonego polskiego sera, Oscypka, produkowanego z surowego mleka bez kultur starterowych [1]. Dominującą grupę bakterii stanowiły *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Enterococcus*, natomiast *Bifidobacteriaceae* oraz *Moraxellaceae* (głównie *Enhydrobacter*) stanowiły niski odsetek (0,7% i 4%) całkowitej puli społeczności bakteryjnej Oscypka. Ponadto w świeżym serze zanurzonym w solance zidentyfikowano kilka rodzajów bakterii związanych ze środowiskiem morskim, tj. *Sanguibacter*, *Flavobacteriaceae*, *Tetragenococcus* oraz *Chromohalobacter* spp. Niektóre z tych grup obejmowały patogeny oraz bakterie przyczyniające się do psucia produktów żywnościowych. Podczas procesu produkcji sera zaobserwowano zmiany w składzie populacji *Lactobacillales* (*Firmicutes*), *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Flavobacteriaceae*, *Leuconostoc* i *Bifidobacteriaceae* (*Actinobacteria*), których liczba zmniejszyła się istotnie po etapie solanki i wędzenia; odwrotne zależności zaobserwowano dla *Lactococcus*. Obserwowany spadek liczby *Enterococcus* podczas wędzenia sera sugeruje, że proces ten ma istotny wpływ na poprawę jakości i bezpieczeństwa tradycyjnie wytwarzanego produktu. Przypuszcza się, że podczas procesu wędzenia powstające lotne związki fenolowe o właściwościach bakteriostatycznych, mogą hamować wzrost populacji tych drobnoustrojów. Ponadto, selektywne obniżenie liczby tych drobnoustrojów może wynikać z zakwaszenia środowiska podczas procesu lub wytwarzanych metabolitów przeciwdrobnoustrojowych przez szczepy LAB [1]. Na uwagę zasługuje również obecność populacji *Actinobacteria* (0,97%), należących do rodziny *Bifidobacteriaceae* i gatunku *Bifidobacterium*, które mogą stanowić duży potencjał biotechnologiczny jako kultury pomocnicze w procesie tradycyjnego wytwarzania Oscypka.

Dostępność tych informacji może być przydatna nie tylko pod względem wyboru kultur starterowych specyficznych dla serów wytwarzanych w warunkach rzemieślniczych, a także do podkreślenia konieczności przestrzegania niektórych środków higieny, które

powinny być podjęte w celu poprawy bezpieczeństwa produktu.

### Fermentowane napoje na bazie roślinnej

W ostatnich latach, w przemyśle winiarskim nastąpił gwałtowny wzrost zastosowania wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania (HTS) do szczegółowej oceny złożonych społeczności mikrobiomu winorośli i wina. Szczególny nacisk kładziony jest zrozumienie dynamiki procesu fermentacji, jej kontroli oraz identyfikacji nowych kultur starterowych [48]. Winogrona i moszcz winny zawierające złożony mikrobiom, odgrywają kluczową rolę w fermentacji wina, wpływając na jego smak i aromat, a tym samym na ostateczną jakość i styl. Globalne badania z wykorzystaniem metagenomiki zostały wykorzystane w celu profilowania różnorodności mikroorganizmów, zarówno grzybowych jak i bakteryjnych związanych ze spontanicznymi fermentacjami wina, biorąc pod uwagę zarówno odmiany winorośli oraz region ich uprawy [60]. Stwierdzono, że wina produkowane w różnych regionach charakteryzują się odmiennym składem taksonomicznym mikrobioty, korelującym z odmiennym profilem metabolitów wtórnych odzwierciedlającym specyficzny *terroir* wina danego regionu [66]. Rozkład biogeograficzny związany z winem został zbadany w winnicach z różnych regionów Kalifornii [2], Nowej Zelandii [86] oraz w tradycyjnych, biodynamicznych i zintegrowanych winnicach z południa Afryki [77]. Analizy 18S rDNA wykazały, że wzory geograficzne metagenomu wina są bardziej zróżnicowane dla populacji grzybów. Wykazano znaczący związek *Aspergillus* i *Penicillium* spp. z winem Chardonnay z Napie. Natomiast *Saccharomycetes* i *Erysiphe necator* stanowiły istotną populację mikrobioty wina produkowanego w centralnej części wybrzeża Kalifornii [3]. Charakterystyczne profile biogeograficzne zarówno dla społeczności grzybowych, jak i bakteryjnych występujące w początkowych etapach fermentacji moszczu winogron mogą przyczynić się do wytworzenia cennego stylu oraz unikalnych walorów sensorycznych win regionalnych [70].

Analizy 16S rDNA i ITS zostały również wykorzystane do określenia różnorodności i dynamiki metagenomu wina, sześciu portugalskich apelacji (Minho, Douro, Dão, Bairrada, Estremadura, Alentejo) w odniesieniu do poszczególnych etapów fermentacji oraz ich potencjału funkcjonalnego [60]. Skład populacji mikroorganizmów w trakcie początkowego procesu fermentacji był istotnie skorelowany z filosferą winorośli oraz składem metagenomu gleby. Rodzaje *Botryotinia*, *Phomopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula* czy *Sphingomonas* były charakterystyczne dla mikrobiomu winorośli oraz winnic. Analizy 16S rDNA wykazały, że wśród społeczności bakterii *Enterobacteriaceae* (*Tatumella* sp.) stanowiły dominującą mikro-

biotę we wszystkich apelacjach, z wyjątkiem Alentejo, dla którego dominującą populacją były *Halomonadaceae* (*Halotalea* i *Zymobacter*). Społeczności grzybowe charakteryzowały się zarówno obecnością mikroorganizmów środowiskowych i fitopatogenów w moszczu winogron, jak też drożdży związanych z fermentacją alkoholową, tj. *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Sporothrix* czy *Schizosaccharomyces*. Ponadto, zmiany różnorodności biologicznej w trakcie procesu fermentacji ujawniły większą dynamikę struktury społeczności grzybowej w porównaniu z populacjami bakterii. Analizy HTS genu 18S rDNA podczas spontanicznej fermentacji moszczu winogronowego Aglianico i Greco di Tufo wykazały, że dynamika społeczności grzybów podczas fermentacji obejmuje spadek liczby grzybów i drożdży innych niż *Saccharomyces* [14]. Na początku fermentacji znaleziono złożony mikrobiom charakteryzujący się dominacją *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zemplinina* oraz *Pichia fermentans*. Natomiast *Saccharomyces cerevisiae* stał się dominujący po 6 dniach fermentacji wina, przy czym *C. zemplinina* występowała nadal na wysokim poziomie. Ponadto, zaobserwowano dodatnie korelacje *S. cerevisiae* z poziomem cukru oraz stężeniem etanolu i glicerolu oraz stwierdzono, że obecność *Candida*, *Hanseniaspora* i *Issatchenkia* w mieszanych współfermentacjach z *S. cerevisiae* poprawia profil smaku i aromatu wina [2, 14]. Analiza 16S rDNA i ITS mikrobioty podczas fermentacji wina z suszonych winogron (słodkie VINO Santo Trentino) wykazała, że na wczesnych etapach fermentacji stężenie glukozy i etanolu oraz pH moszczu odgrywają istotną rolę w kształtowaniu populacji mikrobiomu, przy czym kwasowość moszczu odgrywa dominującą rolę, zarówno przy wyborze początkowej populacji grzybów, jak i definiowaniu ich właściwości fermentacyjnych [82]. Biorąc pod uwagę, że bakterie i grzyby mogą wpływać na siebie poprzez konkurencję metaboliczną/synergicznie lub modyfikację środowiska wykazano, że silne korelacje pomiędzy *Candida ethanolica*, *Pichia fermentans* a *Hymenobacter* oraz *Psychrobacterium* i *Ralstonia* przyczyniają się do pożądanых właściwości organoleptycznych końcowego produktu.

Profilowanie 16S rDNA oraz metabolomika zostały wykorzystane do analizy zależności między bioróżnorodnością i dynamiką mikrobioty a profilem metabolicznym fermentowanego chińskiego wina ryżowego Shaoxing [49] oraz Wuyi Hong Qu [32]. Wino Shaoxing produkowane jest z ryżu z dodatkiem pszenicy Qu jako środka scukrzającego oraz drożdży (*S. cerevisiae*) jako startera fermentacyjnego. Ze względu na szczególnie proces warzenia, obejmującego fermentację wstępną w wyższej temperaturze (28–30°C) przez okres 4 dni oraz fermentację wtórną w niższej temperaturze (16–18°C) przez długi czas (20 dni), wina ryżowe mają unikalne cechy smakowe. Mikrobiota fermentacyjna

buduje złożoną symbiotyczną relację podczas procesu warzenia i odgrywa ważną rolę w produkcji związków smakowych wina decydując o jego ogólnej jakości. Analizy metagenomiczne 16S rDNA wykazały bogatą różnorodność bakteryjną w fermentowanych zacierach oraz istotne zróżnicowanie profilu taksonomicznego mikrobioty w początkowych i końcowym etapie procesu [32, 49]. Jako główne taksony w procesie fermentacji wina Shaoxing sklasyfikowano 10 dominujących rodzajów bakterii (*Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Thermoactinomyces*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*). Analizy metaboliczne wykazały, że związki karbonylowe obecne w winie były dodatnio skorelowane z *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* i *Weissella*, natomiast *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Thermoactinomyces*, *Lactobacillus* i *Lactococcus* uczestniczyły w syntezie estrów, fenoli, alkanów oraz związków zawierających azot i siarczki. Ponadto, *Pseudomonas*, *Enterobacter* korelowały z większością zidentyfikowanych związków aromatycznych i przyczyniały się do wzbogacenia smaku i aromatu wina [49].

Podobne zależności sukcesji mikrobioty fermentacyjnej i dynamiki szlaków metabolicznych w oparciu o technologię HTS i metabolomikę, wykazano w trakcie procesu fermentacji chińskiego wina ryżowego Wuyi Hong Qu [31, 32]. Bakterie *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Raoultella*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* i *Weissella* oraz grzyby należące do *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Rhizopus*, *Monascus*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Candida* i *Aspergillus* zostały zidentyfikowane jako dominująca mikrobiota fermentacyjna wina. Dynamika mikrobiologiczna wykazała, że skład taksonomiczny mikrobioty zmniejszał się wraz z postępującym procesem fermentacji z sukcesywną dominacją *Lactobacillus* i *S. cerevisiae* w końcowej fazie procesu [31]. Ponadto analiza współwystępowania ujawniła korzystne i antagonistyczne relacje pomiędzy różnymi rodzajami lub gatunkami drobnoustrojów. Bakterie kwasowe, w tym *Gluconacetobacter* spp., *Lactobacillus acidipiscis*, *Lactobacillus alimentarius*, i *Lactococcus piscium* okazały się prawie antagonistyczne dla *Bacillus simplex*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* i *Brevibacillus* spp. Natomiast, korelacja pomiędzy bakteriami a grzybami wykazała, że *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Weissella confused*, *Lactobacillus brevis* i *Pediococcus pentosaceus* korzystnie współwystępowały z *Candida ploysorbophila*, *Candida glabrata*, *Meyerozyma guilliermondii* i *Rhizopus oryzae*. Trzy rodzaje bakterii, a mianowicie *Gluconacetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* oraz trzy rodzaje grzybów *Pichia*, *Wickerhamomyces* i *Saccharomyces*, zostały określone jako podstawowe mikroorganizmy funkcjonalne w produkcji lotnych metabolitów wtórnych (estry, alkohole, lotne kwasy), skorelowanych z poprawą jakości aromatycznej Wuyi Hong Qu [32].

Zintegrowane podejście „food-omics” zostało również wykorzystane do analizy profilu sukcesji i aktywności metabolicznej mikrobioty, tradycyjnej chińskiej herbaty Pu-erh, wytwarzanej z liści drzewa herbacianego *Camellia sinensis* i *Camellia assamica*, wyłącznie w prowincji Yunnan [47, 97]. Rola herbaty Pu-erh jako napoju przeciwutleniającego, przeciwnowotworowego, o właściwościach hipolipidemicznych, zmniejszającym toksyczność oraz wspomagającym trawienie, jest dobrze znana [6]. W przeciwieństwie do najczęściej spożywanej czarnej herbaty, która powstaje w procesie utlenienia katechin, herbata Pu-erh wytwarzana jest poprzez spontaniczną fermentację drobnoustrojową i staje się coraz bardziej popularna w Europie i Stanach Zjednoczonych [47]. Przetwarzanie surowej herbaty Pu-erh obejmuje naturalne wysychanie, prażenie, walcowanie, suszenie na słońcu i prasowanie [100]. Liście Pu-erh są następnie poddawane starzeniu w celu promowania naturalnej, stałej fermentacji substratu. Przetwarzanie dojrzałej herbaty zwykle obejmuje dodatkowy etap zwany palowaniem (kompostowaniem) wykonywanym przed suszeniem w celu ułatwienia procesu starzenia. Etap ten zwany fermentacją w stanie stałym, obejmuje obróbkę liści w ciepłym i wilgotnym środowisku trwającą około 65 dni, a szczególnie smak i właściwości herbaty wynikają ze złożonych interakcji mikrobiologicznych i procesu utleniania [95]. Analiza metagenomiczna wykazała, że dominującymi taksonami bakteryjnymi podczas 30 dniowego procesu fermentacji Pu-erh były *Proteobacteria* (48,42%), *Firmicute* (19,91%), *Actinobacteria* (16,91%), *Sinicobacteria* (9,95%) i *Bacteroidetes* (3,79%), a najczęściej obserwowane taksony grzybowe należały do rodzaju *Aspergillus*, *Debaryomyces*, *Rasamsonia* i *Thermomyces* [95]. Wśród *Proteobacteria* dominowały *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter* oraz *Klebsiella*. W porównaniu ze społecznością grzybów, względna liczebność bakterii (27–37%) w trakcie spontanicznej fermentacji Pu-erh była niższa w porównaniu do mikroorganizmów eukariotycznych (48–55%). Sieci genów 16S i ITS wykazały, że bakterie i grzyby wykluczają się wzajemnie, np.: *Bacillaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Comamonadaceae* wykazywały ujemną korelację z grzybami *Aspergillus*, *Rasamsonia*, *Panicillium*, *Debaryomyces* i *Saccharomycetes* [99]. Większość białek sklasyfikowanych w oparciu o profilowanie metaproteomu (MALDI-TOF MS) stanowiły oksydoreduktazy, transferazy, dehydrogenazy, peroksydazy, metylotransferazy, hydrolazy, które zostały przypisane do *Proteobacteria* (75%) i *Ascomycota* (96,6%). Szlaki funkcjonalne zostały również powiązane z metabolizmem aminokwasów, biosyntezą metabolitów wtórnych czy metabolizmem węglowodanów. Wykazano, że specyficzny aromat oraz unikalna jakość smakowa herbaty Pu-erh, jest istotnie

skorelowana z różnorodnością i aktywnością mikrobiologiczną, zarówno mikrobioty bakteryjnej jak i grzybowej podczas poszczególnych etapów fermentacji [47]. Analiza metabolomiczna wykazała, że polifenole, pigmenty herbaciane i alkaloidy są w dużej mierze syntezowane podczas fermentacji w wyniku zwiększonej aktywności peroksydazy, oksydazy i lakazy. Rodzaj *Aspergillus* był funkcjonalnym taksonem odpowiedzialnym za ich biokonwersję na wczesnych etapach fermentacji, podczas gdy *Bacillus*, *Rasamsonia*, *Lichtheimia* i *Debaryomyces* katalizowały szereg reakcji związanych z powstawaniem aromatu w późnym stadium dojrzałej fermentacji Pu-erh. Analiza sieci interakcji biologicznych, wykazała wzrost ekspresji szlaków skorelowanych z jakością zapachu herbaty, w tym związanych z biotransformacją karwonu oraz pochodnych kwasu fenolowego. Wysoki poziom ekspresji metylotransferazy był istotnie skorelowany z *Pseudomonas* (49,34%) i *Aspergillus* (43,35%) na wczesnym etapie fermentacji. Ponadto, badania w oparciu o analizy metabolomu wykazały, że zawartość kofeiny w liściach fermentowanej herbaty zmniejsza się około 30% podczas biodegradacji w teofilinę, katalizowanej z udziałem *Aspergillus niger*, *Aspergillus sydowii*, *Candida albicans*, *Candida famata* i *Pseudomonas* sp. [98].

Funkcjonalne analizy metagenomiczne ujawniły również nowy wgląd w dynamikę mikrobiologiczną, różnorodność i interakcje mikrobioty biorącej udział w procesie fermentacji ziarna kakaowego [33]. W szczególności wykryto obecność rzadkich taksonów obejmujących oportunistyczne gatunki, tj. *Erwinia tasmaeniensis*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *Oenococcus oeni* oraz społeczności fagowe *Myoviridae* i *Siphoviridae* przypisane do sekwencji *Lactobacillus* i *Enterobacter*. Dzięki rekonstrukcji szlaków metabolicznych wykazano dominujący udział LAB, w tym *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus plantarum* w heterolaktycznej fermentacji i szlaku asymilacji cytrynianu. Rola *Enterobacteriaceae* w konwersji substratów została wykazana poprzez obecność genów kodujących enzymy szlaku syntezy mleczanu, octanu, etanolu oraz detoksykacji metyloglikosalu. Ponadto wyniki badań potwierdziły kluczową rolę utleniającego etanol *Acetobacter pasteurianus*, umożliwiając przyszłą ukierunkowaną selekcję współistniejących szczepów jako funkcjonalne kultury starterowe do kontrolowanych procesów fermentacji ziaren kakaowych.

Na skalę przemysłową, technologia HTS w oparciu o sekwencjonowanie ampliconu 16S i 18S rDNA została wykorzystana w celu zoptymalizowania i kontroli procesu fermentacji Kombucha, azjatyckiego fermentowanego napoju na bazie zielonej i czarnej herbaty [11]. Obecnie ten naturalnie musujący napój stał się popularny w Europie i Ameryce Północnej, jako suplement wykazujący właściwości zdrowotne (detok-

sykacja, przeciwnowotworowe), które mogą pochodzić z samej herbaty lub metabolitów wytwarzanych przez mikrobiotę podczas procesu fermentacji [7]. Pomimo zarzutów kampanii marketingowych dotyczących bezpieczeństwa mikrobiologicznego Kombucha, w literaturze wciąż brakuje badań potwierdzających właściwości zdrowotne tego produktu. Tradycyjnie uzyskiwany przez fermentację słodzonej czarnej lub zielonej herbaty (8–12 dni w warunkach tlenowych i statycznych) w obecności rdzennej społeczności mikroorganizmów tworzących naturalny pływający celulozowy biofilm, zwany „błonką”, produkt końcowy jest szczególnie bogaty w kwasy organiczne i CO<sub>2</sub>; każda fermentacja prowadzi do nowej warstwy biofilmu, która jest wykorzystywana do przyszłych fermentacji jako starter [56]. Mikrobiologiczną dynamikę zmian monitorowano zarówno w oparciu o fermentację czarnej i zielonej herbaty oraz biofilmu [11]. Dominujące rodzaje bakterii należały do *Acetobacteraceae* i w mniejszym stopniu do *Lactobacteriaceae*, podczas gdy główne drożdże sklasyfikowano do *Dekkera*, *Hanseniaspora* i *Zygosaccharomyces*. *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconobacter oxydans* i *Acetobacter peroxydans* reprezentowały gatunki dominujące, a *Oenococcus oeni*, był silnie skorelowany z fermentacją zielonej herbaty. Zaobserwowano, że kinetyka wzrostu jest bardzo podobna dla wszystkich grup mikroorganizmów, zarówno w fermentacji Kombucha czarnej, jak i zielonej herbaty, ale z wyższymi wartościami w porównaniu do stabilnego biofilmu.

### Fermentowane produkty na bazie roślinnej

Technologie „food-omics” okazały się potężnym narzędziem do badania złożonej mikrobioty środowiskowej i śledzenia procesów fermentacji azjatyckiej żywności pochodzenia roślinnego, tj. pasty sojowe [84], tofu [23], Kinema [42] czy Kimchi [36]. Produkty te należą do tradycyjnych fermentowanych produktów, powstających w spontanicznej fermentacji z użyciem naturalnych kultur starterowych o złożonych kompozycjach mikrobiologicznych. Spożywane jako dodatek do warzyw, ryb, mięs lub jako składnik przyprawowy cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na obecność różnych prozdrowotnych związków bioaktywnych wytwarzanych podczas procesu ich fermentacji. Rosnące zainteresowanie produktami pochodzenia roślinnego na których oparta jest dieta wegańska spowodowała intensyfikację technik „omics” w kierunku poznania funkcjonalnej roli mikrobioty fermentacyjnej i jej interakcji w generowaniu unikalnych walorów smakowych i aromatycznych oraz ich właściwości zdrowotnych.

Spółeczność bakteryjna „meju” koreańskiego produktu fermentowanego pochodzącego z soi, została scharakteryzowana w jednym z pierwszych badań ekologii mikrobiologicznej żywności przy zastosowaniu podejścia 16S rDNA [41]. Meju przypominające



japońskie „natto” i „miso” oraz indonezyjskie „tempeh” jest podstawą wielu azjatyckich produktów, w których sfermentowane pasty sojowe miesza się z przyprawami, warzywami i ryżem, np.: Cheonggukjang [63], Doenjang [61] i Kochjang [62]. Analiza populacji bakteryjnej z wykorzystaniem 16S rDNA dla wszystkich trzech produktów wykazała ogólna dominację *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*), a następnie *Enterococcus* spp. (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*), *Lactobacillus* spp. oraz gatunki innych rodzajów LAB (*Leuconostoc*, *Weissella*, *Tetragenococcus*). Ponadto, podczas fermentacji Doenjang, *Lactobacillus* był istotnie skorelowany ze wzrostem kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA), natomiast *Tetragenococcus* dominował w fazie wzrostu mleczanu, octanu, putrescyny i tyraminy [37]. Przypuszcza się, że *Tetragenococcus* może być przede wszystkim odpowiedzialny za produkcję kwasów organicznych i amin biogennych.

Innym koreańskim produktem, który był aktywnie badany, jest Kimchi [36, 39]. W fermentacji Kimchi sekwencjonowanie metagenomu ujawniło zaangażowanie złożonej kohorty bakteryjnej i zmianę ekspresji genów na różnych etapach fermentacji. Dominującą populacją metagenomu podczas procesu fermentacji Kimchi były *Proteobacteriae* i *Firmicute*. Ponadto, skład ilościowy mikroflory zmieniał się podczas poszczególnych etapów fermentacji; we wczesnej fazie fermentacji dominowały *Enterobacter*, *Vibrio* i *Pseudomonas*, podczas gdy *Lactobacillus*, *Weissella* i *Leuconostoc* stanowiły dominującą mikroflorę na późniejszych etapach procesu [36]. Ponadto analiza oparta na RNA-seq ujawniła, że geny związane z wytwarzaniem smaku były kodowane przez *L. mesenteroides* na początkowych etapach procesu fermentacji, co sugeruje, że gatunek ten może odgrywać znaczącą rolę w procesie kształtowania się pożądanych cech organoleptycznych. Profile ekspresji genów wskazywały zmniejszenie metabolizmu białek w czasie, w połączeniu ze wzrostem syntezy witamin, tolerancji na stres i metabolizmu węglowodanów, szczególnie szlaków fermentacji kwasu mlekowego. Kwantyfikacja metabolitów tworzonych podczas fermentacji Kimchi wykazała, że wzrost mleczanu, octanu i etanolu we wczesnej fazie fermentacji był istotnie skorelowany z aktywnością metaboliczną LAB, które również były dominującymi producentami mannitolu.

Ciekawe wyniki, w oparciu o zintegrowane analizy metagenomiczne i metabolomiczne zostały opublikowane w przypadku fermentowanych produktów sojowych, tj. sufu [85], Kinema [42] i sos sojowy [84]. W oparciu o WMS przeanalizowano profil sukcesji i potencjału funkcjonalnego metagenomu pasty sojowej Kinema, otrzymywanej w procesie spontanicznej fermentacji gotowanych żółtych nasion soi [42]. Analiza społeczności bakteryjnej wykazała, że *B. subtilis*, *B. amy-*

*loliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus pumilus* i *L. lactis* były dominującymi gatunkami, a ich różnorodność wahała się nieznacznie w całym okresie fermentacji, wskazując na aktywne występowanie sukcesji bakteryjnej. Ponadto, wykryto obecność patogennych gatunków *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus penneri*, *E. faecalis* i *Staphylococcus saprophyticus*, których liczebność zmieniała się w zależności od pory roku. Funkcjonalne profilowanie metagenomu ujawniło obecność genów biorących udział w metabolizmie alaniny, glutaminianu, argininy, proliny, powiązanych z biosyntezą związków aromatycznych w trakcie fermentacji. Geny sklasyfikowane do *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Streptococcus* były istotnie skorelowane z metabolizmem kofaktorów witamin, niezbędnych do funkcjonowania enzymów i metabolizmu komórkowego, które ostatecznie poprawiają jakość odżywczą fermentowanego produktu. Większość enzymów metabolizmu węglowodanów (hydrolazy, glikozylotransferazy, esterazy) przypisanych do *Firmicutes* (91,29%), *Actinobacteria* (7,41%) i *Proteobacteria* (3,75%), było zaangażowane w biosyntezę disacharydów, oligosacharydów oraz degradację hemicelulozy, polisacharydów i pektyn. Ponadto, rekonstrukcja szlaków metabolicznych wykazała obecność biokatalizatorów, prawdopodobnie zaangażowanych w transformację polimerów białkowych i węglowodanowych w bioaktywne cząsteczki o korzystnych prozdrowotnych właściwościach. W genomie *Enterococcus* sp., *B. cereus*, *Lactobacillus lactis* i *Carnobacterium maltaromaticum* zidentyfikowano geny kilku pożądanych enzymów, tj.  $\beta$ -galaktozydaza,  $\beta$ -glukozydaza,  $\beta$ -ksylozydaza i dekarboksylaza glutaminianowa. Katalityczna funkcja dekarboksylazy glutaminianowej została potwierdzona dla biosyntezy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) [42]. Ponadto, w zacierach sosu sojowego, szlaki genowe *Enterococcus*, *Pediococcus* były dodatnio skorelowane z obecnością fosfofruktokinazy, kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy mleczanowej, kluczowych enzymów szlaku produkcji kwasu mlekowego [84].

Sufu, zwany także „serem orientalnym” jest produktem fermentacji soi, który w zależności od szczepu zastosowanego jako starter oraz koloru i smaku jest klasyfikowany jako czerwone i białe sufu [85]. Analizy w oparciu o 16S rDNA wykazały, że *Lactococcus*, *Actinobacter*, *Tetragenococcus*, *Pseudomonas* i *Lactobacillus* były dominującymi bakteriami i kluczowymi czynnikami podczas fermentacji sufu, lecz profile taksonomiczne różniły się między handlowym czerwonym, a białym sufu. W szczególności *Lactococcus*, *Streptococcaceae* i *Lactobacillales* dominowały w próbkach czerwonego sufu, podczas gdy *Enterococcus*, *Tetragenococcus* i *Bacillales* były powszechne w próbkach białego. Profile metabolomiczne fermentacji sufu, wykazały dodatnią korelację *Lactococcus* z produkcją

lotnych związków smakowych (etanol, octan etylu, benzaldehyd) oraz kwasów organicznych (mrówkowy, jabłkowy). *Tetragenococcus* i *Comamonas* były istotnie skorelowane ze szlakiem syntezy i transformacji aminokwasów, a *Streptococcaceae* i *Moraxellaceae* promowały wzrost stężenia kwasu mrówkowego. Ponadto, *Moraxellaceae* reprezentowany głównie przez *Actinobacter* był pozytywnie powiązany z metabolitami smakowymi, szczególnie estrami [85].

Analizy 16S rDNA zastosowano również do prześledzenia struktury mikrobioty sfermentowanych oliwek stołowych w stylu hiszpańskim i greckim [9]. Fermentacja w stylu greckim obejmuje naturalne, nieprzetworzone oliwki, które są bezpośrednio solone po zbiorach; fermentacja w stylu hiszpańskim obejmuje poprzedni etap mycia owoców rozcieńczonych roztworem NaOH (2–3%). Początkowy etap fermentacji, zarówno greckiej, jak i hiszpańskiej charakteryzował się wysokim poziomem halofilnych bakterii *Chromohalobacter* i *Halomonas*, *Marinilactibacillus*, które stanowiły około 60% całkowitej populacji bakterii, podczas gdy pod koniec procesu fermentacji *Lactobacillus* reprezentował główną populację bakteryjną obecną na powierzchni oliwek. Wśród *Lactobacillus* dominujące gatunki stanowiły *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus pentosus*, podczas gdy *Chromohalobacter salarius* i *Marinilactibacillus piezotolerans* zidentyfikowano wśród rodzajów halofilnych. Fermentacja w stylu hiszpańskim była związana z większą liczbą Enterobacteriaceae, takich jak *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia* i *Klebsiella*. Różnice te mogą tłumaczyć szczególne właściwości bezpieczeństwa i zachowania tych dwóch form fermentowanych surowców.

Analizy metagenomiczne wykorzystano również w prześledzeniu procesów fermentacji zakwasów piekarskich, które od bardzo dawna odgrywają istotną rolę w produkcji żywności opartej na bazie mąki. Zakwas jest szeroko stosowany jako starter do wyrobu chleba w całej Europie [29], a także jako idealne inokulum w wytwarzaniu chińskiego chleba na parze [93]. W technologii chleba ocena różnorodności, struktury i dynamiki populacji mikroorganizmów jest zwykle przeprowadzana podczas procesu fermentacji zakwasu. Stabilne ekosystemy zakwasów mogą być zamieszkałe przez proste lub bardzo złożone konsorcja reprezentowane przez różne gatunki LAB i drożdże [18, 29]. Najbardziej rozpowszechnione gatunki LAB należą do rodzajów *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Weissella*, podczas gdy reprezentujące gatunki drożdży należą do kladów *Kazachstanstania* i *Saccharomyces* [17]. Procesy fermentacyjne poprawiające jakość powstałego produktu pod względem tekstury, smaku, wartości odżywczej oraz wydłużenia okresu przydatności do spożycia są ściśle związane ze stabilnością i aktywnością metaboliczną mikrobioty spontanicznych zakwasów.

Szeroko zakrojone analizy w oparciu o 16S rDNA i ITS mikrobioty spontanicznych zakwasów wykazały, że na bioróżnorodność i stabilność konsorcjum zakwasów mają wpływ mikrobiologiczny i chemiczny skład surowców, interakcje między populacjami mikroorganizmów oraz różne parametry fermentacji, w tym temperatura, wielkość inokulum, wydajność ciasta i czas fermentacji [51]. Badania mające na celu prześledzenie dynamiki zmian mikrobioty podczas 72 h procesu fermentacji, wykazały wysokie tempo zmienności w obrębie struktury taksonomicznej populacji drożdży i bakterii. Ponadto, dynamika społeczności mikroorganizmów w spontanicznie rozpoczynających się zakwasach wykazała, że konsorcjum zakwasów osiąga stabilizację poprzez trójfazową ewolucję, charakteryzującą się przewagą nietypowych LAB, typowych LAB i wysoce dostosowanych LAB zakwasów [58]. W oparciu o meta-analizę 583 zakwasów, uwzględniającą zarówno warunki procesu jak i różnorodność mikrobioty wykazano, że najbardziej rozpowszechnioną grupę bakterii w zakwasach były LAB reprezentowane przez *Lactobacillus sanfranciscensis* (47%) oraz *Lactobacillus plantarum* (44%) [87]. Spontaniczna fermentacja na bazie trzech rodzajów mąki (orkiszowa, pszenna, żytnia) wykazała, że dominującą populacją we wszystkich rodzajach zakwasów po 72 h fermentacji były *Firmicutes*, reprezentowane wyłącznie przez Lactobacillales, a dwa pozostałe i mniej liczne typy bakterii stanowiły Proteobacteria i Bacteroidetes. Po 24 h fermentacji zakwasu żytniego dominującym rodzajem był *Weissella* sp., który na dalszych etapach procesu fermentacji został zdominowany przez *Lactobacillus*, podobnie jak w pszenicy i zakwasie orkiszowym. *Lactobacillus* dominował we wszystkich zakwasach po 72 h fermentacji [4]. Analiza metagenomiczna różnorodność LAB i drożdży tradycyjnych zakwasów z zachodniego regionu Mongolii wykazała, że dominującymi gatunkami populacji mikroorganizmów były *Lactobacillus plantarum* i *S. cerevisiae* [93], podczas gdy Liu in. [51] wykazał, że kluczowym gatunkiem LAB chińskich zakwasów był *Lactobacillus sanfranciscensis*. W sumie, meta-analiza wykazała, że ponad 90% opisanych bakterii w zakwasach należało do LAB, reprezentujących 24 gatunki, z czego 17 z nich stanowiły pałeczki kwasu mlekowego.

### Fermentowane produkty na bazie mięsa i owoców morza

Kolejnym obszarem szerokiego wykorzystania badań z zakresu metagenomiki jest sektor przemysłu mięsnego. Badania koncentrują się głównie na określeniu składu gatunkowego mikrobiomu kiełbas. Przeprowadzono kilka niezależnych badań w oparciu o analizy 16S rDNA, dotyczących określenia składu taksonomicznego oraz dynamiki zmian mikrobioty w fermentowanych produktach mięsnych [69, 73]. Wyka-

ziano, że ponad 30 różnych rodzajów *Staphylococcaceae* i *Lactobacillaceae* jest obecnych podczas dojrzewania sfermentowanych kielbas, z dominacją *Lactobacillus sakei* podczas spontanicznej fermentacji, jak również innych bakterii, tj. *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc carnosum*, *S. xylosus* i *Staphylococcus succinus* [30]. Rozwój koagulozoujemnych *Staphylococcus* i *Kocuria* podczas fermentacji prowadzi do proteolizy i lipolizy mięsa, podczas gdy *Lactobacillus* są odpowiedzialne za spadek pH, produkcję kwasu mlekowego oraz wytwarzanie niewielkich ilości kwasu octowego, etanolu, acetoiny, dwutlenku węgla i kwasu pirogronowego [73].

Podejście metagenomowe w połączeniu z analizami metabolicznymi zostało wykorzystane do prześledzenia etapów spontanicznej i inokulowanej fermentacji tradycyjnych włoskich kielbas [25]. Skład taksonomiczny mikrobioty kielbas podczas inokulowanej fermentacji wykazał dominację *L. sakei* i *S. xylosus*, jako kultur starterowych oraz spadek proporcji *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus equorum* i *Actinobacter* sp. Wzrost dominacji *L. sakei* był istotnie skorelowany z szybszym tempem zużycia substratów fermentacyjnych, obniżeniem pH oraz wzrostem ilości kwasu octowego i związanego z nim zapachu (ostry, kwaśny, serowy, octowy) obniżającego walory organoleptyczne produktu. Podczas fermentacji spontanicznej kielbas, najliczniejszą grupę metagenomu stanowiły *L. sakei* (56%) i *L. curvatus* (20%) oraz szereg mniej licznych taksonów zidentyfikowanych jako *S. xylosus*, *Leuconostoc* sp., *L. lactis*, a także *Actinobacterium*, *Pseudomonas* i *Priopionibacterium*. Rdzenna mikrobiota spontanicznie fermentowanych kielbas charakteryzowała się obecnością genów szlaku biosyntezy *ex novo* kwasów tłuszczowych, syntezowanych z metabolizmu pirogronianów i aminokwasów. Zgodnie z tym, podwyższony poziom estrów o długich łańcuchach, tj. oktonian etylu i dekanonian pod koniec procesu dojrzewania był pozytywnie skorelowany z owocowym i słodkim zapachem kielbas [25].

Fermentowane owoce morza zwane Jeotgal są powszechnie spożywane w Azji zwłaszcza w Korei Południowej. Do niedawna różnorodność mikrobiologiczna fermentowanych produktów z owoców morza pozostawała w przeważającej mierze nie opisana. NGS oraz analizy taksonomiczne w oparciu o 16S rDNA i ITS umożliwiły identyfikację metagenomu krewetek, mątw czy krabów [39]. We wszystkich analizowanych produktach zidentyfikowano dwa rodzaje bakterii z grupy LAB, *Lactobacillus* i *Weissella*, które były obecne w różnych proporcjach w zależności od rozpatrywanego produktu. Tylko w jednym produkcie, opartym na fermentacji ostryg dominującą mikrobiotą była halofilna bakteria *Salinivibri*, stanowiąca 89% analizowanego metagenomu [43]. Badania te, są sprzeczne z wynikami Jung i in. [36], w których wykazano, że w Saeu-jot (jeotgal oparty na fermentacji krewetek)

LAB stanowiły niewielką populację oraz były stabilne podczas całego procesu fermentacji. W początkowym etapie fermentacji krewetek dominowały *Proteobacteria* (*Photobacterium*, *Vibrio*), które na dalszych etapach procesu fermentacji zostały zdominowane przez *Firmicutes*, tj. *Staphylococcus*, i *Alcalibacillus* oraz *Halanaerobium*. Co ciekawe, analizy metagenomu doprowadziły również do stwierdzenia, że szeroko rozpowszechnioną bakterią w koreańskich sfermentowanych produktach z owoców morza są *Archaeobacteriae*.

W oparciu o 16S rDNA wykazano dynamiczną sukcesję społeczności bakteryjnej oraz ich korelacji z jakością fermentowanego chińskiego sosu rybnego [19]. Tworzenie unikalnych smaków i składników odżywczych sosu było ściśle powiązane z aktywnością mikrobioty fermentacyjnej. Dominującą biotą bakteryjną fermentacji sosu rybnego były *Firmicutes* (*Halanaerobium*, *Bacillus*, *Tetragenococcus*) i *Proteobacteria*, głównie tym *Shewanella*, a różnorodność i bogactwo społeczności bakteryjnej stopniowo rosło wraz z wydłużeniem czasu fermentacji. Na poziomie typu *Proteobacteria* wykazywała tendencję wczesnego spadku, a później wzrostu, podczas gdy *Firmicutes* wykazywały tendencję odwrotną. Wiele innych rodzajów bakterii, w tym *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Tissierella*, *Carnobacterium* i *Gallicola* zostało sklasyfikowanych na późnym etapie fermentacji. *Halanaerobium* był dodatkowo skorelowany z produkcją trimetyloaminy, natomiast *Tetragenococcus* wykazał nie tylko potencjał do produkcji kwasu, ale również do redukcji szkodliwych substancji, takich jak amoniak i aminy.

### 3.2. Monitorowanie warunków przechowywania żywności

Większość badań w oparciu o technologie „omics” koncentruje się na dynamice mikrobioty żywności, ale niewiele wiadomo na temat zmienności produkcji partii i zmian mikrobiologicznych zachodzących podczas przechowywania. W celu wydłużenia okresu trwałości wielu łatwo psujących się produktów spożywczych w przemyśle stosuje się różne metody przedłużania ich trwałości, tj. chłodzenie, pakowanie próżniowe, pakowanie w modyfikowanej atmosferze, dodatek nizinny [24]. Wiadomo, że mikrobiota produktów spożywczych ulega znacznej zmianie składu gatunkowego i ilościowego pod wpływem modyfikacji temperatury, pH oraz stężeń NaCl a wahania w składzie mikrobiomu mają istotny wpływ na końcową jakość uzyskiwanego produktu [6]. Przechowywanie w warunkach chłodniczych jest powszechnym podejściem umożliwiającym zachowanie świeżości i wartości odżywczych żywności. Jednak zastosowanie niskich temperatur, opakowań i środków przeciwdrobnoustrojowych może mieć wpływ na sukcesję i aktywność metaboliczną „efemerycznych

mikroorganizmów powodujących psucie” (ESO), a ich rzeczywisty wkład w psucie zależy w dużej mierze od warunków przechowywania. Narzędzia metagenomiczne mogą poprawić zrozumienie ekologii mikrobiologicznej linii przetwarzania żywności [39]. Producenci żywności będą mogli zweryfikować lub usprawnić bieżące zarządzanie zagrożeniami mikrobiologicznymi, wykorzystując podejście metagenomiczne do monitorowania zarówno liczebności jak i aktywności metabolicznej mikrobioty w celu zaplanowania odpowiednich warunków przetwarzania i przechowywania produktów żywnościowych.

W oparciu o 16S rDNA wykazano, że długotrwałe chłodzenie istotnie zwiększyło skład gatunkowy *Pseudomonas* i *Enterobacteriaceae* w analizowanym metagenomie szpinaku [54]. Podobne obserwacje wykazano dla przechowywanych w chłodni steków wołowych, w których analiza 16S rDNA wykazała istotną korelację zmniejszenia różnorodności naturalnej mikrobioty bakteryjnej i wzrostu gatunków bakterii odpowiedzialnych za psucie, w tym *Pseudomonas* i *Brochothrix thermosphacta* [13]. Ponadto, analiza ITS w oparciu o 18S rDNA wykazała, zróżnicowanie taksonomiczne populacji grzybów podczas przechowywania w chłodni zbiorów jabłek [78] oraz sałaty [44]. W porównaniu z próbkami z punktu skupu, jabłka przechowywane w chłodni wykazały wzrost względnej liczebności kilku rodzajów grzybów, w szczególności *Aspergillus*, *Botrytis*, *Mucor* i *Penicillium*.

Podejście metagenomiczne poprzez precyzyjne sklasyfikowanie społeczności mikrobiologicznej zostało wykorzystane do opracowania strategii eliminowania wad produktów spożywczych związanych z obecnością mikrobioty ESO [20]. Połączone analizy WMS oraz 16S rDNA umożliwiły identyfikację termofilnej bakterii *Thermus thermophilus*, będącej przyczyną defektu serów, tzw. różowego przebarwienia [71]. Dogłębna analiza genomu *T. thermophilus* ujawniła obecność genów biorących udział w biosyntezie karotenoidów, w tym genów odpowiedzialnych za syntezę likopenu (*crtB* i *crtI*). Ponadto, analiza WMS chińskiego wina ryżowego ujawniła, że *L. brevis* koduje geny potencjalnie zaangażowane w psucie, w tym geny związane z syntezą biotyny, fermentacją malolaktyczną i wytwarzaniem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Ponadto, przy użyciu sekwencjonowania 16S rDNA wykazano, że bakterie *Leuconostoc gasicomitatum* są odpowiedzialne za psucie się marynowanych produktów drobiowych, a proces marynowania istotnie zmniejszył udział *B. thermosphacta* oraz gatunków *Clostridium* i *Enterobacteriaceae* w analizowanej próbce [13]. W innych badaniach, wykazano, że zmniejszenie soli w mięsie przeznaczonym na kiełbasy zmniejsza bioróżnorodność mikrobioty bakteryjnej, co przyczynia się do szybszego psucia produktu. Dzięki wyższym

stężeniom NaCl wraz z połączeniem pakowania próżniowego wykazano zwiększoną liczebność subpopulacji *Enterococcaceae* i *Leuconostocaceae* skorelowaną z wydłużeniem okresu trwałości kiełbas [27]. Ponadto, analiza 16S rDNA wykazała, że zastosowanie nizyny jako środka konserwującego istotnie hamuje wzrost *Kocuria rizophila*, *S. xylosum*, *L. carnosum* i *Carnobacterium divergens* powodujących psucie chłodzonych ryb i produktów mięsnych [24]. W jednym przypadku technologię WGS wykorzystano do identyfikacji patogenów przenoszonych przez żywność w mikrobiomie łańcucha produkcji wołowiny [91]. Chociaż przetwarzanie produktu zmniejszyło całkowitą liczbę bakterii w mięsie, zauważono, że spowodowało wzrost względnej liczebności *Salmonella enterica*, *E. coli* i *Clostridium botulinum*, potencjalnie ze względu na ich zdolność do przetrwania interwencji przeciwbakteryjnych [91].

### 3.3. Monitorowanie bezpieczeństwa żywności

Ze względu na środowisko produkcji żywności i zagrożeń spowodowanych skażeniami, wdrożenie analiz metagenomicznych umożliwi identyfikację i monitorowanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych żywności, w tym świadomych i biologicznych strategii kontroli patogenów w środowisku łańcucha pokarmowego [5, 45]. Źródło skażeń mikrobiologicznych w przemyśle spożywczym, to przede wszystkim mikrobiota pierwotna produktów zwierzęcych i roślinnych (mięso, jaja, mleko, warzywa, owoce), mikrobiota surowców dodatkowych (cukier, przyprawy, sól), mikrobiota środowisk urządzeń i higiena personelu produkcyjnego. Żywność jest źródłem składników odżywczych dla człowieka, ale również idealnym środowiskiem rozwoju wielu mikroorganizmów. Część z tych drobnoustrojów to mikroorganizmy charakterystyczne dla danego produktu (saprofityczne), które stanowią mikrobiotę rodzimą oraz naniesioną, pochodzącą ze środowiska zewnętrznego. Mikrobiota ta powoduje pogorszenie cech smakowych lub zapachowych produktu, jego struktury, konsystencji i barwy oraz obniżenie wartości odżywczej. Drugą grupę stanowią mikroorganizmy chorobotwórcze (patogeny), wywołujące zatrucia i zakażenia pokarmowe. Podejście w oparciu o WMS umożliwia identyfikację patogenów żywności o określonych cechach wirulencji. Na przykład, stosując wysokoprzepustowe sekwencjonowanie metagenomu (WMS) szpinaku zidentyfikowano szczep *E. coli* produkujący toksynę Shiga [45] oraz sklasyfikowano genom (WGS) patogennej *Listeria monocytogenes* wyizolowanej z mikrobiomu lodów [65]. Testy oparte o analizy WMS umożliwiły również identyfikację, pochodzenie i wzorzec dystrybucji genów kodujących oporność na antybiotyki w wielu różnych środowiskach, tj. zwierzęta, obornik, zbiorniki wodne czy gleba [68]. Stosowanie antybiotyków w produkcji zwierzęcej spo-

wodowało rozprzestrzenianie się w środowisku genów oporności na antybiotyki, szczególnie ludzkich patogenów, które mogą być obecne w łańcuchu produkcji żywności [64]. Na przykład, Maury i wsp. [57] w oparciu o RNA-seq zidentyfikowali dodatkowe nowe czynniki zjadliwości *L. monocytogenes*, porównując genom szczepów klinicznych i szczepów związanych z żywnością. Szeroko zakrojone badania ognisk skażenia żywności dotyczą identyfikacji patogenów tj., *Salmonella enterica*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* czy *Clostridium botulinum* [15]. Analizy metagenomowe zostały wykorzystane do zbadania wpływu leczenia antybiotykami na profil mikrobiomu trzody chlewnej, dla której wykazano przesunięcie filotypów bakteryjnych spowodowane wzrostem *E. coli* [53]. Natomiast, badania wykonano dla mikrobiomu kurcząt po kuracji penicylinowej, wykazały przesunięcia mikrobioty jelitowej w kierunku wzrostu *Firmicutes* i zmniejszenia udziału *Bacteroides*; podobne zależności w dysbiozie mikrobioty jelitowej zaobserwowano wśród ludzi otyłych [79]. Analogicznie, proteomika została również dobrze udokumentowana, aby zapewnić cenne podejście do wykrywania i identyfikacji patogenów przenoszonych przez żywność. Analiza w oparciu o MALDI-TOF MS z powodzeniem została wykorzystana do scharakteryzowania różnych podtypów *E. coli* [22] oraz *L. monocytogenes* bezpośrednio z selektywnie wzbogaconego bulionu [34]. W innym badaniu, Gilquin i wsp. [28] zastosowali test proteomiczny do wykrywania pięciu patogenów w żywności, w tym *Clostridium perfringens*, *S. aureus*, *Shigella dysenteriae* oraz *E. coli* i *Campylobacter jejuni*. Wyniki badań proteomicznych mogą stanowić ogromne wsparcie w zrozumieniu mechanizmów oporności na antybiotyki i tworzenie biofilmów patogenów pokarmowych.

Analizy metagenomiczne mogą znaleźć zastosowanie do badań na różnych etapach łańcucha produkcyjnego lub w różnych obszarach zakładu produkcyjnego, w których konieczne jest podjęcie działań zmierzających do poprawy stosowanych praktyk higienicznych. Zakłady produkcyjne można postrzegać jako swego rodzaju ekosystemy mikrobiologiczne, gdzie konieczne jest regularne monitorowanie miejsc szczególnie narażonych na występowanie siedlisk mikroorganizmów lub źródeł ich potencjalnego skażenia. Drobnoustroje w zakładach przetwórczych występują najczęściej w zorganizowanych, przytwierdzonych do podłoża skupiskach, zwanych biofilmem. Dzięki takiej organizacji bakterie zyskując odporność na środki czyszczące i dezynfekujące, mogą stanowić źródło skażenia środowiska produkcyjnego i zanieczyszczenia produktów żywności [5]. Ponadto, podkreśla się, że środowisko produkcyjne jest źródłem ciągłej „inokulacji” szczepów podczas fermentacji i dojrzewania, które mogą mieć istotne cechy technologiczne i wpływać na cechy produktu końcowego [30]. Techniki oparte na 16S rDNA i ITS wykazały, że

*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Debaryomyces* i *Lactococcus* zdominowały powierzchnie linii technologicznych zakładów mleczarskich [83], a bakterie i drożdże stanowiące mikrobiotę zakwasów chlebowych były obecne na powierzchniach produkcyjnych w piekarniach [92].

Należy pamiętać, że jakość końcowego produktu spożywczego zależy nie tylko od higieny środowiska przetwarzania, ale także od jakości użytych surowców. Na przykład, podejście oparte o 16S rDNA wykazało, że mleko o większej liczbie komórek somatycznych było związane z wyższą liczebnością niektórych taksonów bakteryjnych, w tym *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* oraz *Thermoanaerobacterium*, rodzajem zidentyfikowanym po raz pierwszy w metagenomie próbki mleka [76]. Obecność organizmów psujących (*Acinetobacter*, *Thermoanaerobacterium*) jak również bakterii chorobotwórczych (*Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*) w surowcu, może zanieczyszczać rezydentny mikrobiom zbiorczego mleka oraz stanowić zagrożenie dla całej linii produkcyjnej. Wpływ ekologii środowisk przetwórczych na jakość żywności wykazano w bardziej rozbudowanych badaniach z udziałem cystern mlecznych [38]. Analiza 16S rDNA wykazała, że na mikrobiom mleka w silosach wpływa mikrobiom masowych cystern oraz, że różne zbiorowiska bakteryjne ewoluowały w obrębie różnych silosów mlecznych. Ponadto badania wykazały, że skład taksonomiczny mikrobiomu mleka zmieniał się sezonowo, ponieważ większa różnorodność genetyczna bakterii była związana z sezonem wiosennym [72].

Podobne obserwacje dotyczą zakładów przetwórstwa mięsnego. Środowisko produkcji ma istotny wpływ na ekologię mikrobiologiczną tusz zwierzęcych. Tusze zwierzęce charakteryzowały się dużą różnorodnością mikrobiologiczną, w wśród której stwierdzono dobrze znane rodzaje bakterii skorelowane z psuciem mięsa. Badania z wykorzystaniem wysokopręstowego sekwencjonowania (HTS) zostały użyte do śledzenia źródeł zanieczyszczeń świeżego mięsa, gotowanych kiełbas, filetów z łososia a także gotowej do spożycia żywności [15]. Większość gatunków bakterii zidentyfikowanych w wymazach środowiskowych z rzeźni, wykryto również w befszytkach wołowych, np.: *S. equorum*, *Propionibacterium acnes*, *Psychromonas arctica*, czy *Psychrobacter* sp. [39]. Obecność mikroorganizmów powodujących psucie w bezpośrednim otoczeniu linii technologicznej istotnie obniża okres przydatności matrycy spożywczej już na początku jej produkcji.

Przemysł spożywczy w coraz większym stopniu będzie wykorzystywał technologię NGS do szerokiej gamy analiz związanych z kontrolą jakości żywności, w tym oceny autentyczności, pochodzenia, składu oraz bezpieczeństwa na wszystkich etapach produkcji żywności. Przede wszystkim jest to podyktowane koniecznością monitorowania procedur fermentacyjnych

i kontroli żywności wzbogacanej kulturami bakterii probiotycznych oraz suplementami diety. Zastosowanie zintegrowanej technologii „food-omics” będzie miało istotne znaczenie w celu zwiększenia bezpieczeństwa dostępnej na rynku spożywczym fermentowanej żywności, poprzez ocenę przetrwania patogenów, toksynogenów lub identyfikację gatunków odpowiedzialnych za psucie się fermentowanych produktów. Na przykład, analizy 16S rDNA i metabolomu zostały wykorzystane do identyfikacji mikroorganizmów odpowiedzialnych za syntezę amin biogennych w chińskim winie ryżowym. Stwierdzono silną korelację między poziomem produkowanych amin biogennych a względną liczebnością kilku taksonów bakteryjnych, tj. *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* i *Lactococcus* [50]. W innych badaniach zagrożenie związane z wykryciem *P. mirabilis* i *Staphylococcus* spp. zostało wskazane w analizie 16S rDNA zastosowanej do izolatów fermentowanej żywności sojowej oraz fermentowanych próbek wieprzowiny [79]. Poważnym wyzwaniem dla sektora spożywczego jest również zapewnienie bezpieczeństwa żywności minimalnie przetworzonej, żywności gotowej do spożycia (tzw. łatwej), importowanej i etnicznej [88].

Uwierzytelnienie żywności poprzez ocenę składu produktów spożywczych jest ważne dla ograniczenia zanieczyszczeń krzyżowych, fałszerstw żywnościowych oraz ochrony jakości żywności na każdym etapie łańcucha dostaw. Technologie „food-omics” mogą znaleźć zastosowanie w uwierzytelnianiu roślinnych produktów żywnościowych, autentyczności produktów, wykrywania śladowych ilości DNA gatunków obcych oraz w identyfikacji często błędnie oznakowanych gatunków ryb i suplementów ziołowych [52]. Wraz ze wzrostem światowego handlu produktami żywnościowymi i suplementami diety, dokładne i szybkie uwierzytelnienie jest niezbędne do prawidłowego etykietowania produktów w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Analizy proteomiczne umożliwiły szybkie i bezpośrednie porównanie i klasyfikację 33 chorwackich białych win [74]. Profilowanie metaproteomu win wykazało obecność 20 białek. Co ciekawe, tylko pięć z nich było bezpośrednio skorelowanych z odpowiednią odmianą winogron, pozostałe profile białkowe zostały przypisane do rdzenia zróżnicowanej mikrobioty bakterii i grzybów. Natomiast profilowanie metabolomu zostało wykorzystane do autoryzacji drożdży piwowskich [94], włoskiego sera mozzarella bawolego lub krowiego [67], a także do określenia pochodzenia geograficznego Kimchi [40].

Nie mniej jednak, analizy metagenomiczne w oparciu o WGS nie mogą być obecnie stosowane do identyfikacji i kwantyfikacji patogenów w celach regulacyjnych z powodu ograniczeń dostępnej technologii i niekompletności baz danych genomów bakteryjnych. Maksymalne korzyści z wykorzystania WGS patogenów zostaną osiągnięte jeśli zsekwencjonowane

genomy zostaną zdeponowane w publicznych bazach danych. Aby rozwinąć to podejście, w ramach Konsorcjum Sekwencjonowania Łańcucha Dostaw Żywności (CSFSC) została opracowana spójna baza danych sekwencji genomowych i metagenomowych społeczności mikroorganizmów oraz niestandardowe symulowane zestawy danych sekwencji żywności *in silico* [52, 75]. Surowe dane sekwencjonowania można również przesłać do międzynarodowego zasobu archiwum publicznego „Sequence Read Archive (SRA) lub za pośrednictwem Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.gov/sra>), Europejskiego Instytutu Bioinformatyki (EBI, <https://www.ebi.ac.uk/ena>) oraz DNA Data Bank of Japan (DDBJ, <https://www.ddbj.nig.ac.jp>) [90]. W połączeniu z szeroką gamą narzędzi bioinformatycznych możliwe będzie opracowanie czułych i szybkich protokołów do analizy autentyczności żywności i kwantyfikacji przetworzonych produktów spożywczych.

#### 4. Podsumowanie

Podobnie jak w innych dziedzinach nauki, techniki oparte na sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS) ostatecznie zrewolucjonizują mikrobiologię żywności. Profilowanie metagenomów, wykrywanie patogenów, eksploracja danych genetycznych, łączenie genotypów i fenotypów, określenie losów starterów i patogenów w produkcji i dojrzewaniu żywności oraz przewidywanie okresu przydatności produktów będą domeną tych wysokowydajnych technologii. Analizy te muszą być jednak połączone z integrowanymi metodami „omics”, które łączą metagenomikę z metatranskryptomiką i metaproteomikę z metabolomiką. W przyszłości technologie „food-omics” będą wdrożone do śledzenia surowców i produktów spożywczych na różnych etapach łańcucha produkcyjnego i w różnych obszarach zakładów produkcyjnych, gdzie konieczne jest podjęcie działań zmierzających do poprawy stosowanych praktyk higienicznych, optymalizacji procesów produkcyjnych, opracowania i ulepszenia strategii zarządzania bezpieczeństwem i jakością żywności. Sektor przemysłu spożywczego już w tej chwili musi sprostać wyzwaniom stawianym przez konsumentów, którzy coraz częściej oczekują zapewnienia dostępu do rzetelnych informacji na temat jakości i bezpieczeństwa oferowanego produktu. Jednak, cały proces monitorowania łańcucha żywnościowego musi być szybki i niedrogi, aby technologie oparte na NGS mogły być powszechnie stosowane.

Podsumowując, metagenomika w połączeniu z technologiami „food-omics” umożliwi precyzyjne zaprojektowanie skutecznych strategii analiz i konserwacji żywności w celu osiągnięcia równowagi pomiędzy zapewnieniem bezpieczeństwa produktów a utrzymaniem wysokich standardów ich jakości.

## Podziękowania

Artykuł powstał w ramach projektu o numerze 1/ZM-136-01/20 oraz SPUB-16/E-171/SPUB/SN/2019 finansowanego przez Ministerstwo Nauki Szkolnictwa Wyższego.

## Piśmiennictwo

- Alegria A., Szczesny P., Mayo B., Bardowski J., Kowalczyk M.: Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and independent approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1890–1898 (2012)
- Bokulich N.A., Collins T.S., Masarweh C., Allen G., Heymann H., Ebeler S.E.: Associations among wine grape microbiome, metabolome and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio*, **7**, e00631–16 (2016)
- Bokulich N.A., Thorngate J.H., Richardson P.M., Mills D.A.: Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E139–48 (2014)
- Boreczek J., Litwinek D., Żylińska-Urban J., Izak D., Buksa K., Gawor J., Gromadka R., Bardowski J.K., Kowalczyk M.: Bacterial community dynamics in spontaneous sourdoughs made from wheat, spelt and rye wholemeal flour. *Microbiology Open*, **9**, e1009 (2020)
- Bridier A.: Exploring foodborne pathogen ecology and antimicrobial resistance in the light of shotgun metagenomics. *Methods Mol. Biol.* **1918**, 229–245 (2019)
- Cao Y., Fanning S., Proos S., Jordan K., Srikumar S.: A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Front. Microbiol.* **8**, 1829 (2017)
- Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., et al.: Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int. J. Food Microbiol.* **220**, 63–72 (2016)
- Cifuentes A.: Food analysis and foodomics. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 7109 (2009)
- Cocolin L., Alessandria V., Botta C., Gorra R., De Filippis, Ercolini D., Rantsiou K.: NaOH-debittering induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation. *Plos One*, **8**, e69074 (2013)
- Cook P., Nightingale K.K.: Use of omics methods for the advancement of food quality and food safety. *Anim. Front.* **8**, 31–41 (2018)
- Coton M., Pawtowski A., Taminiau B., Burgaud G., Deniel F., Coulloume-Labarthe L.: Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **93**, fix048 (2017)
- De Filippis F., Genovese A., Ferranti P., Gilbert J.A., Ercolini D.: Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Sci. Rep.* **6**, 21871 (2016)
- De Filippis F., La Stora A., Villani F., Ercolini D.: Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. *Plos One*, **8**, e70222 (2013)
- De Filippis F., Parente E., Ercolini D.: Metagenomics insights into food fermentations. *Microb. Biotechnol.* **10**, 91–102 (2017)
- De Filippis F., Parente E., Ercolini D.: Recent past, present, and future of the food microbiome. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **9**, 589–608 (2018)
- De Pasquale I., Di Cagno R., Buchin S., De Angelis M., Gobbetti M.: Spatial distribution of the metabolically active microbiota within Italian PDO ewes' milk cheeses. *Plos One*, **11**, e0153213 (2016)
- De Vuyst L., Harth H., Van Kerrebroeck S., Leroy F.: Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. *Adv. Appl. Food Microbiol.* **37**, 11–29 (2017)
- De Vuyst L., Harth H., Van Kerrebroeck S., Leroy F.: Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *Int. J. Food Microbiol.* **239**, 26–34 (2016)
- Du F., Zhang X., Gu H., Song J., Gao X.: Dynamic changes in the bacterial community during the fermentation of traditional Chinese fish Sauce (TCFS) and their correlation with TCFS quality. *Microorganisms*, **19**, 371 (2019)
- Ercolini D.: High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3148–3155 (2013)
- Escobar-Zepeda A., Sanches-Flores A., Quirasco Boruch M.: Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol.* **57**, 116–27 (2016)
- Fagerquist C.K., Zaragoza W.J., Sultan O., Woo N., Quinones B., Cooley M.B., Mandrell R.E.: Top-down proteomic identification of Shiga toxin 2 subtypes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-tandem time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2928–2940 (2014)
- Fei Y., Li L., Chen L., Zheng Y., Yu B.: High-throughput sequencing and culture-based approaches to analyze microbial diversity associated with chemical changes in naturally fermented tofu whey, a traditional Chinese tofu-coagulant. *Food Microbiol.* **76**, 69–77 (2018)
- Ferrocino I., Greppi A., La Stora A., Rantsiou K., Ercolini D., Cocolin L.: Impact of nisin-activated packaging on microbiota of beef burgers during storage. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 549–559 (2016)
- Ferrocino I., Bellio A., Giordano M., Macori G., Romano A., Rantsiou K., Decastelli L., Cocolin L.: Shotgun metagenomics and volatilome profile of the microbiota of fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e02120–17 (2018)
- Forbes J.D., Knox N., Ronholm J., Pagotto F., Relmer A.: Metagenomics: The next culture-independent game changer. *Front. Microbiol.* **8**, 1069 (2017)
- Fougy L., Desmonts M.H., Coeuret G., Fassel Ch., Hamon E., Hezard B., Champonier-Verges M.Ch., Chaillou S.: Reducing Salt in Raw Pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3928–3939 (2016)
- Gilquin B., Jaquinod M., Louwagie M., Kieffer-Jaquinod S., Kraut A., Ferro M., Becher F., Brun V.: A proteomics assay to detect eight CBRN-relevant toxins in food. *Proteomics*, **17**, 1–2 (2017)
- Gobbetti M., Minervini F., Pontonio E., Di Cagno R., De Angelis M.: Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *J. Food Microbiol.* **239**, 3–18 (2016)
- Greppi A., Ferrocino I., La Stora A., Rantsiou K., Ercolini D., Cocolin L.: Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *Int. J. Food Microbiol.* **212**, 67–75 (2015)
- Hong X., Chen J., Liu L., Wu H., Tan H., Xie G., Xu Q., Zou H., Yu W., Wang L., Qin N.: Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese rice wine. *Sci. Rep.* **6**, 26621 (2016)
- Huang Z.R., Honga J.L., Xua J.X., Lia L., Guoa W.L., Yang Y., Chenc S.J.: Exploring core functional microbiota responsible for the production of volatile flavour during the traditional brewing of Wuyi Hong Qu glutinous rice wine. *Food Microbiol.* **76**, 487–496 (2018)

33. Illegghems K., Weckx S., De Vuyst L.: 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 Microbiol.* **50**, 54–63 (2015)
34. Jadhav S., Seviour D., Bhave M., Palombo E.A.: Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Proteomics.* **97**, 100–106 (2014)
35. Jagadeesan B., Gerner-Smidt P., Allard M.W., Leuillet S., Winkler A., Xiao Y., Chaffron S.: The use of next generation sequencing for improving food safety: translation into practice. *Food Microbiol.* **79**, 96–115 (2016)
36. Jung J., Choi S., Jeon C.O., Park W.: Pyrosequencing-based analysis of the bacterial community in Korean traditional seafood, ojingeo jeotgal. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1428–1433 (2013)
37. Jung W.Y., Jung J.Y., Lee H.J.: Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of Doenjang: a traditional Korean fermented soybean paste. *Front. Microbiol.* **7**, 827 (2016)
38. Kable M.E., Srisengfa Y., laird M., Zaragoza J., Mcleod J., Heidenreich J.: The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio*, **7**, 1–13 (2016)
39. Kergourlay G., Taminiau B., Daube G., Vergès M.Ch.: Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *In. J. Food Microbiol.* **231**, 31–39 (2015)
40. Kim J., Jung Y., Bong Y.S., Lee K.S., Hwang G.S.: Determination of the geographical origin of Kimchi by (1) H NRM based metabolite profiling. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1752–1757 (2012)
41. Kim Y.S., Kim M.C., Kwon S.W., Kim S.J., Park I.C., Ka J.O., Weon H.Y.: Analyses of bacterial communities in meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods. *J. Microbiol.* **49**, 340–348 (2011)
42. Kumar J., Sharma N., Kaushal G., Samurailatpam S., Sahoo D., Rai A.K., Singh S.P.: Metagenomic insights into the taxonomic and functional features of *Kinema*, a traditional fermented soybean product of Sikkim Himalaya. *Front. Microbiol.* **10**, 1744 (2019)
43. Lee S.H., Jung J.Y., Jeon C.O.: Effects of temperature on microbial succession and metabolite change during saeu-jeot fermentation. *Food Microbiol.* **38**, 16–25 (2014)
44. Leff J.W., Fieser N.: Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *Plos One*, **8**, e59310 (2013)
45. Leonard S.R., Mammel M.K., Lacher D.W., Elkins Ch.A.: Application of metagenomic sequencing to food safety: detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on fresh bagged spinach. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 8183–8191 (2015)
46. Lessard M.H., Viel C., Boyle B., St-Gelais D., Labrie S.: Metatranscriptome analysis of fungal straits *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics*, **15**, 235 (2014)
47. Li Z., Feng C., Luo X., Yao H., Zhang D., Zhang T.: Revealing the influence of microbiota on the quality of Pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis. *Food Microbiol.* **76**, 405–415 (2018)
48. Liu D., Zhang P., Chen D., Howell K.: From the vineyard to the winery: how microbial Ecology drives regional distinctiveness of wine. *Front. Microbiol.* **10**, 2679 (2019)
49. Liu S., Chena Q., Zoub H., Yud Y., Zhou Z., Mao J., Zhange S.: A metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development in Shaoxing mechanized huangjiu fermentation mashes. *Int. J. Food Microbiol.* **303**, 9–18 (2019)
50. Liu S.P., Yu J.X., Wei X.L., Ji Z.W., Zhou Z.L.: Sequencing-based screening of functional microorganism to decrease the formation of biogenic amines in Chinese rice wine. *Food Control.* **64**, 98–104 (2016)
51. Liu T., Li Y., Yang Y., Yi H., Zngang L.: The influence of different lactic acid bacteria on sourdough flavor and a deep insight into sourdough fermentation through RNA sequencing. *Food Chem.* **307**, 125529 (2020)
52. Lo Y.T., Shaw P.Ch.: DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chem.* **240**, 767–774 (2017)
53. Looft T., Jahnson T.A., Allen H.K., Bayles D.O., Alt D.P., Stedtfeld R.D.: Infeed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1691–1696 (2012)
54. Lopez-Velasco G., Welbaum G.E., Boyer R.R., Mane S.P., Ponder M.A.: Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1203–1214 (2011)
55. Marino M., Innocente N., Maifreni M., Mounier J., Cobo-Diaz J.F., coton E.: Diversity within Italian chesse making brine-associated bacterial communities evidenced by massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *Front Microbiol.* **8**, 2119 (2017)
56. Marsh A., O’Sullivan O., Hill C., Cotter P.D.: Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol.* **38**, 171–178 (2014)
57. Maury M., Tsai Y.H., Chalier C., Touchon M., Chenal-Francisque V.: Uncovering *Listeria Monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* **48**, 308–313 (2016)
58. Minervini F., Celano G., Lattanzi A., De Angelis M., Gobetti M.: Added ingredients affect the microbiota and biochemical characteristics of durum wheat type-I sourdough. *Food Microbiol.* **60**, 112–123 (2016)
59. Monnet C., Dugat-Bony E., Swennen D., Beckerich J.M., Irlinger F.: Investigation of the activity of the microorganisms in a Reblochon-style cheese by metatranscriptomic analysis. *Front. Microbiol.* **7**, 536 (2016)
60. Morgan H.H., du Toit M., Setati M.E. The grapevine and wine microbiome: insights from high-throughput amplicon sequencing. *Front Microbiol.* **11**, 8–820 (2017)
61. Nam Y.D., Lee S.Y., Lim S.I.: Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 36–42 (2012)
62. Nam Y.D., Park S.I., Lim S.I.: Microbial composition of the Korean traditional food “kochujang” analyzed by a massive sequencing technique. *J. Food Sci.* **77**, 250–256 (2012)
63. Nam Y.D., Yi S-H., Lim S.I.: Bacterial diversity of Cheonggukjang a traditional Korean fermented food analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control*, **28**, 135–142 (2012)
64. Noyes N.R., Yang X., Linke L.M., Magnuson R.J., Dettenwanger A., Cook S., Geornaras I.: Resistome diversity in cattle and the environment decreases during beef production. *ELife*, **5**, e13195 (2016)
65. Ottesen A., Ramachandran P., Reed E., White J.R., Hasan N., Subramanian P., et al.: Enrichment dynamics of *Listeria monocytogenes* and the associated microbiome from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak. *BMC Microbiol.* **16**, 275 (2016)
66. Pinto C., Pinho D., Sousa S., Pinheiro M., Egas C., Gomes A.C.: Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS One*, **9**, e85622 (2014)



67. Pisano M.B., Scano P., Murgia A., Cosentino S., Caboni P.: Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. *Food Chem.* **192**, 618–624 (2016)
68. Pitta D.W., Dou Z., Kumar S., Indugu N., Toth J.D., Vecchiarelli B.: Metagenomic evidence of the prevalence and distribution patterns of antimicrobial resistance genes in dairy agroecosystems. *Foodborne Pathog. Dis.* **13**, 296–302 (2016)
69. Polka J., Rebecchi A., Pisacane V., Morelli L., Puglisi E.: Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiol.* **46**, 342–356 (2015)
70. Portillo M.D.C., Franquès J., Araque I., Reguant C., Bordons A.: Bacterial diversity of grenache and carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **219**, 56–63 (2016)
71. Quigley L., O'Dullivan D.J., Daly D., O'Sullivan O., Burdikova Z., Vana R., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., McSweeney P.L.: Thermus and the pink discoloration defect in cheese. *mSystems*, **1**, e00023–16 (2016)
72. Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F.: The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 664–698 (2013)
73. Rantsiou K., Coccolin L.: New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausage as determined by molecular methods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 255–267 (2006)
74. Rešetar D., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Katalinić J.P., Pavelić S.K.: Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry linear time-of-flight method for white wine fingerprinting and classification. *Food Control*, **64**, 157–164 (2016)
75. Rhoads A., Au K.F.: PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **13**, 278–289 (2015)
76. Rodrigues M.X., Lima S.F., Canniatti-Brazaca S.G., Bicalho R.C.: The microbiome of bulk tank milk: characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *J. Dairy Sci.* **100**, 2536–2552 (2017)
77. Setati M.E., Jacobson D., Andong U.C., Bauer F.F.: The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One*, **7**, e52609 (2012)
78. Shen Y., Nie J., Kuang L., Zhang J., Li H.: DNA Sequencing, genomes and genetic markers of microbes on fruits and vegetables. *Microb. Biotechnol.* **0**, 1–40 (2020)
79. Shing P., Karimi A., Devendra K., Waldroup P.W., Cho K.K., Kwon Y.M.: Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens. *Poult. Sci.* **92**, 272–276 (2013)
80. Singh T.A., Devi K.R., Ahmed G., Jeyaram K.: Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India. *Food Res. Intern.* **55**, 356–362 (2014)
81. Smid E., Lacroix C.: Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **25**, 148–154 (2013)
82. Stefanini I., Cavalieri D.: Metagenomic approaches to investigate the contribution of the vineyard environment to the quality of wine fermentation: potentials and difficulties. *Front. Microbiol.* **9**, 991 (2018)
83. Stellato G., De Filippis F., La Stora A., Ercolini D.: Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 7893–7904 (2015)
84. Sulaiman J., Gan H.M., Yin W.F., Chan K.G.: Microbiol succession and the functional potential during the fermentation of Chinese soy sauce brine. *Front. Microbiol.* **5**, 556 (2014)
85. Tan G., Hu M., Pan Z., Li M., Li L., Yang M.: High-throughput sequencing and metabolomics reveal differences in bacterial diversity and metabolites between red and white Sufu. *Front. Microbiol.* **11**, 758 (2020)
86. Taylor M.W., Tsai P., Anfang N., Ross H.A., Goddard M.R.: Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ. Microbiol.* **16**, 2848–2858 (2014)
87. Van Kerrebroek S., Maes D., De Vuyst L.: Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **68**, 152–159 (2017)
88. Walsh A.M., Crispie F., Daari K., O'Sullivan O., Martin J.C., Arthur C.T., Claesson M.J., Scott K.P., Cotter P.D.: Strain-level metagenomic analysis of the fermented dairy beverage nunu highlights potential food safety risks. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e01144–17 (2017)
89. Wolfe B.E., Button J.E., Santarelli M., Dutton R.: Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, **158**, 422–433 (2014)
90. Xu Y.J.: Foodomics: a novel approach for food microbiology. *TrAC*, **96**, 14–21 (2017)
91. Yang Y., Noyes N.R., Doster E., Martin J.N.: Use of metagenomic shotgun sequencing technology to detect foodborne pathogens within the microbiome of the beef production chain. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 2433–2443 (2016)
92. Zarraindia I., Owens S.M., Weisenhorn P., West K., Hampton-Marcell J., Lax S., Bokulich N.A.: The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*, **6**, e02527–14 (2015)
93. Zhang G., Zhang W., Sadiq F.A., Arbab S.K., Guoqing He G.: Microbiota succession and metabolite changes during the traditional sourdough fermentation of Chinese steamed bread. *CyTA – Journal of Food*, **17**, 172–179 (2019)
94. Zhang J., Plowmar J.E., Tiam B., Clerens S., On S.L.W.: An improved method for MALDI-TOF analysis of wine-associated yeasts. *J. Microbiol. Meth.* **172**, 105904 (2020)
95. Zhao M., Su X.Q., Nian B., Chen L.J., Zhang D.L., Duan S.M., Ma Y.: Integrated meta-omics approaches to understand the microbiome of spontaneous fermentation of traditional Chinese Pu-erh tea. *Msystems*, **4**, e00680 (2019)
96. Zheng X., Liu F., Shi X., Wang B., Li K., Li B.: Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. *Food Res. Intern.* **105**, 733–742 (2018)
97. Zhou B., Ma C., Ren X.Y., Xia T., Zheng Ch., Liu X.: Correlation analysis between filamentous fungi and chemical compositions in a Pu-erh type tea after a long-term storage. *Food. Sci. Nutr.* **8**, 2501–2511 (2020)
98. Zhou B., Ma C., Ren X., Xia T., Li X., Wu Y.: Production of theophylline via aerobic fermentation of Pu-erh tea using tea-derived fungi. *BMC Microbiol.* **19**, 261 (2019)
99. Zhu M., Li N., Zhou F., Ouyang J., Lu D., Xu W., Li J., Lin H., Zhang Z., Xiao J., Wang K., Huang J., Liu Z., Wu J.: Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea. *Food Chem.* **312**, 126043 (2020)
100. Zhu Y.C., Luo Y.H., Wang P.P., Zhao MY., Li L., Hu X.S., Chen F.: Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation. *Food. Chem.* **194**, 643–649 (2016)