

GLUTEN GABEKO OGI JASANGARRI BATEN SEGURTASUN AZTERKETA

Giza Nutrizioa eta Dietetikako gradua - 2022/2023
ikasturtea

Gradu Amaierako Lana

ZUZENDARIA: Jonatan Miranda Gómez

EGILEA: Maite Pérez Azurmendi

AURKIBIDEA

1.	LABURPENA	3
2.	SARRERA.....	4
3.	HELBURUAK	10
3.1.	Orokorra	10
3.2.	Espezifikoak	10
4.	METODOAK ETA MATERIALAK.....	11
4.1.	Kultiboak	11
4.2.	PCR.....	11
4.3.	HPLC–MS/MS.....	12
4.4.	Ogien bizitza baliagarria.....	15
5.	EMAITZAK ETA EZTABAIDA	15
6.	ONDORIOAK	21
7.	BIBLIOGRAFIA	23

1. LABURPENA

Egungo Europako politikaren arabera elikagai-hondakinak giza kontsumorako produktuetan berrerabiltzea lehenetsi behar da, elikagai berrien sorreran adibidez. Ogia da lan honen ardatz nagusia, espainiarren elikaduran funtsezko elikagaietako bat baita. “España Circular 2023” estrategiarekin bat eginez, Euskal sagardoaren ekoizpenean eraturako soberakinen -sagar patsaren- aprobetxamendua aztertu da gluten gabeko “ogi borobilaren” eraketan.

TKNIKA-ko laborategietan jorratutako azterketa nutrizionalean arreta berezia jarri da amina biogenoetan (histamina lekuko); izan ere, glutenarekin lotutako nahasmenduak dituzten pertsonengan maila gastrointestinalerako sintomen erantzule izan daitezkeela ikusi da. Hortaz gain, ogien bizitza baliagarria ere neurtu da, parametro hau uraren aktibitatearekin erlazionatuz.

Histaminaren determinaziorako, bakterio azido laktikoen kultiboen prozedura diseinatu da. Gainera, AB-k zuzenean neurtzeko HPLC kromatografoaren protokoloa optimizatu da, histaminaren tontorra identifikatu eta isolatzea lortu delarik. Bizitza baliagarriari dagokionez, “ogi borobila” merkatuko beste 3 ogi baino beranduago iraungitzen dela ondorioztatu da, hau sagarrean aurkitzen diren konposatu fenolikoaren gaitasun antioxidatzaileei esker izan daiteke. Ur aktibitate altuena “ogi borobilean” erregistratu da, ezaugarri hau sagar patsaren zuntz dietetiko solugarriak oreari ura xurgatu eta atxikitzeke ematen dion gaitasunagatik izan daitekeela uste da.

Laburbilduz, gluten gabeko ogi jasagarri baten segurtasuna ezaugarritzeko protokoloak deskribatu eta optimizatu dira, teknika batzuen kasuan emaitza kualitatibo fidagarriak eskuratu direlarik.

Lan honetan bildu den jakintza Euskadiko Lanbide Heziketako irakasle eta ikasleetara zabaldu da, gutxi gorabehera 200 ikaslek proiektu honen berri izan dutelarik. Dietetikako zikloan, batez ere, jarraibide dietetikoetan ingurumenerako onurak kontutan hartzeaz gain, gaixo zeliakoetan dietan histamina kontrolatzeko beharraren mezua jaso da.

2. SARRERA

Ogia eguneko dietan ezinbesteko elikagaia da herrialde mediterraneoetako populazioaren zati handi batentzako. Espainian, hain zuzen ere, 2019. urtean helduen eguneko batz besteko kontsumoa 75 g-koa izan zen ANIBES ikerketaren arabera (Partearroyo et al., 2019). Gaur egun, zereal, forma, kolore eta zapore askotariko ogiak aurki daitezke okindegi eta supermerkatuetan. Kontrara, gluten gabeko ogien kasuan aukera ez da hain anitza. Gainera, dauden aukeren artean gehiengoa ez da guztiz kalitate onekoa. Izan ere, glutena kentzean honen funtzioa (orearen biskositatea, elastikotasuna, uraren xurgapena, etab.) ordezkatzen duten gehigarri ez-osasuntsuak gehitzen zaizkie (guar goma, goma xantana, esaterako) (Rivera et al., 2017). Hortaz gain, garia ordezkatzen duten beste zereal batzuk erabiltzen dira; erabilienak arropa, artoa, artobeltza, tefa eta kamuta direlarik (Molina-Rosell, 2013). Zehazki arroz-irinaren erabilera nabarmen handitu da glutenik gabeko produktuen formulazioan, ezaugarri organoleptikoengatik eta hipoalergenizitateagatik. Hala ere, beharrezkoa da hidrokoloide, emultsionatzaile, edo proteinaren bat gehitzea propietate biskoelastikoak emateko (Molina-Rosell, 2013).

Gehigarri hauen ondorioz, gluten gabeko produktuak ez dira hauen ordeztu produktu glutendunen baliokideak nutrizionalki. Hori, beste batzuen artean, zeliakoen % 20-38k nutrizio-gabeziaren bat pairatzearen arrazoiak izan daitezke (Gutiérrez et al., 2017). Makronutrienteei dagokienez, karbohidrato konplexu eta zuntzean pobrea, eta azukre sinpleetan aberatsa den dieta izan ohi dute. Gainera, glutendun dieta jarraitzen dutenek baino gantzen ingesta altuagoa izaten dute, batez ere gantz azido asezi dagokienean. Mikronutrienteen gabeziarik nabarmenenak burdina, kaltzioa eta magnesioa direla ikusi da, baita D, E eta B taldeko bitamina batzuk ere (Cardo et al., 2021).

Azken hamarkadan, elikagai berrien diseinu eta ekoizpenean baliabideen erabilera eta hondakinak ahalik eta gehien murriztea da helburu nagusia. Proposamen hau gluten gabeko ogiak ere barne hartzen du eta "Euskadiko Ekonomia Zirkularrerako Estrategia 2030"-pean jasotzen da (Ingurumen, Lurralde Plangintza eta Etxebizitza Saila, 2019). Bertan, hainbat onura egozten zaizkio ekoizpen sistema linealetik ekonomia zirkularrerako aldaketari: baliabideen kontsumoa jaitea, hondakin gutxiago ekoiztea eta hondakin horiek hobeto kudeatzea. Hau guztiak klima-aldaketan efektu positiboak izan ditzakeela ere aipatzen da, Europako Batzordearen arabera, urtero Europar Batasunean berotegi-efektuko gasen emisioan % 2 eta 4 arteko murrizketa gertatuko litzatekeela aurreikusiz (Ingurumen, Lurralde Plangintza eta Etxebizitza Saila, 2019).

Elikagai hondakinen galera murriztea ekoizpen-kostuak murrizteko eta elikadura-sistemaren eraginkortasuna handitzeko garrantzitsua izateaz gain, ingurumen-iraunkortasunari laguntzeko beste modu bat ere izan daiteke, Nazio Batuek proposatutako Garapen Jasangarriko helburuekin bat eginez. Ikuspegi honetatik hainbat eragin positibo espero dira: uraren kudeaketan (12. Ekoizpen eta kontsumo arduratsuak), klima-aldaketan (13. Klimaren aldeko ekintza), itsas-baliabideetan (14. Itsaspeko bizitza), eta lurreko ekosistemetan, basogintzan edo biodibertsitatean (15. Lehorreko ekosistemetako bizitza), besteak beste. Zehazki, 12.3 helburua, elikagaien galeraren ingurukoa da: 2030-erako, munduko elikagai-galera per capita erdira murriztea bai txikizkari baita kontsumitzaile mailan (Caldeira et al., 2019).

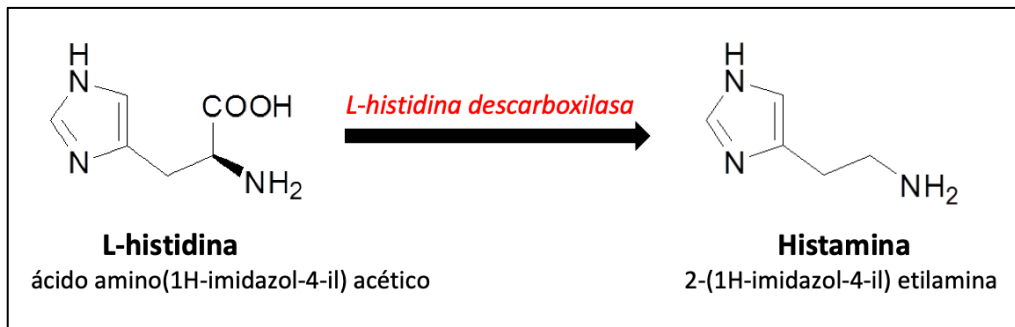
Ekonomia zirkularra materialak, baliabideak eta produktuak ahalik eta gehien partekatu, alokatu, berrerabili, konpondu, berritu eta birziklatzea inplikatzeko dituen produkzio- eta kontsumo-eredu bat da, hauetatik sortuko den produktu berriari balio erantsi bat gehituz. Horrela, produktuen bizi-zikloa zabaltzen da. Europar Batasuneko parlamentuaren arabera ekonomia zirkular baterantz ekiteko arrazoien artean, lehengaien eskariaren igoera eta baliabideen eskasia aurkitzen dira. Funtsezko hainbat lehengai mugatuak dira, eta munduko biztanleria etengabe hazten ari denez, eskaria ere handitzen ari da. Europan 88 milioi tona elikagai galtzen dira alferrik urtero lehen ekoizpenetik kontsumora arte, eta horri lotutako kostuak 143.000 milioi euro direla estimatzen da (España Circular 2030). Elikadura albo-produktuak material jangarrietan bihurtzea da arlo horretako estrategiarik interesgarrienetako bat. Hala ere, albo-produktu hauek kutsatzaile kimikoak edo patogenoak izan ditzakete, kontsumitzaileen osasuna arriskuan jar dezaketenak. Beraz, hauek ondo ezaugarritzea eta hauen kalitatea eta segurtasuna bermatzea oso garrantzitsua da balorizazio-estrategia hori egokiro aprobetxatzeko (Socas et al., 2021).

Elikagai-taldeei dagokienez, galera-maila handiena sustraiei, tuberkuluei eta olio-laboreei dagokie (% 25), eta jarraian, frutei eta barazkiei (% 22), haragiari eta animalia-produktuei (% 12) eta zerealei eta lekaleei (% 9) (Socas et al., 2021). Zehazki, Europan duela gutxi egindako azterlan batek erakutsi du fruta eta barazkiak elikagai-hondakin kopuru handiena sortzen duten elikagai-taldeak direla (Caldeira et al., 2019). Hori dela eta, erabilera asko eman zaizkie hauei: ongarri moduan erabiltzeko konposta, energia iturri gisa erabiltzeko metanoaren ekoizpena, animalientzako pentsuak eta giza elikagaiak. Elikadura albo-produktuak beste erabilera bat ere izan dezakete; hala nola, kosmetika, farmazia, ehungintza, etab. (Socas et al., 2021).

Hau guztia aintzat harturik, gluten gabeko ogiaren konposaketa nutrizionala hobetu eta jasangarritasunari eusteko asmoz, hurbileko osagaien aukeraketa (*Psylliuma* ordezkatuz bertako lihoa edota atzerritik ekarritako arroz irinaren ordez Valentzian landatzen dena adib.) dituen ogi-formulazioa proposatu du EHU-ko Gluten3S ikertaldeak. Gainera, ekonomia zirkularrari eutsiz, Euskal sagardoaren ekoizpenean eratutako soberakinen -sagar patsaren- aprobeixamendua ere biltzen du hemendik aurrera “ogi borobil” bezala aipatuko den formulazioak. Izan ere, datuek erakusten dute sagardoaren ekoizpena bikoiztu egin dela (1987-2002 bitartean), eta hortaz, sagardoa gero eta merkataritza-produktu garrantzitsuagoa bihurtu da, honek suposatzen duen sagar pats hondakin kantitatearekin (Garai et al., 2006). Ekonomia zirkularra sustatuz sagarraren albo-produktuari beste erabilpen bat emateaz gain, osagaien artean hau gehitzeak ogia mineraletan, zuntzean eta konposatu fenolikoetan aberastuko lukeela uste da, balio nutrizional erantsi bat ekarriz (Lazo et al., 2022).

Gluten gabeko ogiaren formulazio eta konposaketa nutrizional optimoa sortzeko, garrantzitsua da gaixotasun zeliakoaren inguruko oinarritzko ezagutzak izatea. Gaixotasun zeliakorako tratamendu bakarra glutenik gabeko dieta zorrotza da, derrigorrez betirako mantendu beharrekoa (Schnedl et al., 2021). Izan ere, honekin modu orokorrean, sintomen agerpena ekiditea lortzen da, ez ordea gaixotasuna sendatzea. Hala ere, gaixo zeliakoen % 30ak glutenik gabeko dieta jarraitu arren sabeleko sintoma iraunkorrak izaten jarraitzen duela ikusi da. Hau “Non-responsive celiac disease” (NRCD) izenez ezagutzen da. Kasu hauetan glutenaz gain beste elikagai/osagai batzuek ere, amina biogenoak kasu, eragin kaltegarria dute, abdomeneko sintomak eraginez (Schnedl et al., 2021).

Amina biogenoak (AB) aminoazidoen deskarboxilaziotik sortzen diren konposatu nitrogenatuak dira: histamina, tiramina, putreszina, kadaberina, espermidina, besteak beste. Sorreran deskarboxilasa entzimaren aktibitatea duten bakterioak daude inplikaturik. Entzima hori bakterio gram positibo zein gram negatiboetan aurki daiteke, genero ezberdinetako espezieetan: hala nola *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Morganella*, *Vibrio* eta *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* eta *Lactococcus* generoetako bakterio azido laktikoak (BAL) (Fernandez et al., 2005). 1. Irudian adierazten da bakterioetan histamina sortzeko gertatzen den erreakzioa.



Irudia 1. Histidinaren deskarboxilazio erreakzioa histaminara

Ikuspegi biologikotik, AB-ak izaki bizidunentzat funtsezko funtzio fisiologikoak dituzten molekula dira. Animalietan, esaterako, zatiketa zelularrean edota nerbio-bulkadaren transmisioan parte hartzen dute. Adibidez, histaminak neurotransmisore gisa jarduten du, eta tiramina beste neurotransmisore batzuen sintesi-prozesuko bitartekari bat da (Fernandez et al., 2005). Hala ere, bere alde txarra ere badute. Zenbait mikroorganismo burututako aminoazido batzuen deskarboxilazioak elikagaietan AB-k kontzentrazio altuetan egotea dakar, eta hauek jatean, zirkulazio sistemikora pasa eta efektu toxikoak eragin ditzakete: ondoeza, goragalea, arnas alterazioak, izerditzea, buruko mina, bihotz-palpitazioak, begietako azkura, erreakzio pseudoalergikoak, urdaileko eta hesteetako arazoak (Fernandez et al., 2005). Berez, gure organismoa gai da monoamino oxidasa (MAO) eta diamino oxidasa (DAO) entzimei esker AB kantitate txiki bat detoxifikatzeko. Baina AB-k kantitate handietan hartuz gero, detoxifikazio bide hauek asetu egiten dira, eta orduan gertatzen dira efektu toxikologikoak. Efektu kaltegarri hauen ondorioz, AB-k elikagaien segurtasunaren (Mannino et al., 2022) eta produktuaren kalitatearen (Ferrario et al., 2012) adierazle gisa kontsideratu daitezke.

Elikagaietan ohikoenak diren AB-ak histamina eta tiramina dira, histidina eta tirosina aminoazidoetatik eratortzen direnak, hurrenez hurren. Elikagai eta edari hartizuetan aurkitzen dira batez ere, zeinetan BAL-ek parte hartzen duten. Kasu hauetan, deskarboxilasaren jarduera elikagaia ekoizteko hartidurarako beharrezkoa den kultibo abiarazlearekin erlazionatuta egon daiteke (Fernandez et al., 2005). Hori dela eta, AB-k batez ere gaztan, haragian, arrainean eta edari alkoholdunetan aurki daitezke (garagardoan, ardoan, sagardoan, esaterako) (Fernandez et al., 2005). Azken hauen kasuan gainera, aipatzekoa da alkohola DAO entzimaren inhibitzailea dela, beraz AB-en detoxifikazio bidea oztopatzen du. Histaminaren kasuan, DAO aktibitatearen galerak histaminarekiko jasanezintasuna dakar. Entzimaren aktibitatearen galeraren jatorrian mutazio genetikoa egon daitezke, bai eta DAO jariaketa blokeatzen duten hesteetako hanturazko gaixotasunak ere (Sánchez et al., 2018). Zenbait entsegu

klinikok frogatu dute histaminarekiko jasanezintasuna eta hesteetako gaixotasunen diagnostikoa duten pazienteek, DAO defizitaren prebalentzia handiagoa dutela kontrol-populazioarekin alderatuta (Sánchez et al., 2018). Gainera, nahiko ohikoa da elikadura-alergiaren bat duten pertsonen, hortaz gain, histaminarekiko jasanezintasuna ere izatea, gutxiegiako DAO jardueragatik, honek dakarren alergia larriagotzearekin.

Beste ikerketa bateko emaitzen arabera, NRCD zuten 20 pazienteetatik 11k histaminarekiko jasanezintasuna erakutsi zuten. Hortaz, histaminarekiko jasanezintasuna % 50ek baino gehiagok zuten, eta badirudi baduela zeresana gaixotasun zeliakoan (Schnedl et al., 2021). Kasu hauetan dietako histamina ingestioa murriztea gomendatzen da (Veciana et al., 2014). Ondorioz, elikagai batzuk baztertu behar izaten dira: hartzitutako elikagaiak, haragi-eratorri onduak, gazta onduak, arrain-kontserbak, chucruta edo sojaren eratorri hartzituak (misoa, tempeha). Arrainen artean, bereziki tunidoak ezabatzea gomendatzen da, histamina kontzentrazio handiak deskribatu baitira halakoetan. Baztertzea komeni diren elikagaien zerrendan, edari alkoholduak ere aurkitzen dira (ardoa eta garagardoa batez ere) (Veciana et al., 2014). Neurritz jan beharreko elikagaien zerrendak elikagai-talde nagusiak biltzen dituzenez, zaila da histamina kontzentrazio baxuko dieta orekatuak jarraitzea. Baztertzea zorrozki aplikatuz gero, elikagai asko kendu beharko lirateke dietatik histamina ekiditeko (Veciana et al., 2014). Zailtasun honi aurre egiteko, histamina kantitatea neurtu beharko litzateke elikagai guztietan, ondoren etiketan adierazteko. Adituen esanetan lagungarria litzateke etiketetan amina horren presentzia aipatzea, alergenoren nagusiekin egiten den bezala (Veciana et al., 2014).

Herrialde gehienetan, histamina ez dago legeak araututako alergenoren artean, eta hortaz, ez da etiketetan adierazi behar. "Histamina gutxiko ardoa" ekoizten duten eta adierazpen horretaz baliatuz produktuaren publizitatea egin nahi duten ardogileek kontuz ibili behar dutela diote R-biopharm laborategi alemaniarreko adituek, "histaminarik gabeko" eta "histamina gutxiko" zehaztapenetarako ez baitago mugabaliarik ezarrita (r-Biopharm, 2017). Gainera, esaldi hauek "ezaugarri osasuntsuen adierazpen" gisa interpretatu daitezke, eta indarrean dagoen *Europako Parlamentuaren nutrizio-adierazpenei eta ezaugarri osasuntsuei buruzko araudiaren* arabera debekatuta dago halakorik adieraztea % 1,2 baino alkohol ehuneko altuagoa duten edarrietan (Eur-lex 1924/2006 zk.).

"Ogi borobilaren" osagai bereizgarrietako bat sagardoaren ekoizpenetik datorren sagar patsa izanik, aipatzekoa da Euskal sagardoaren 24 lagin aztertu ziren ikerketa batean, amina biogenoren batez besteko maila $5,94 \pm 8,42$ mg/litrokoa izan zela. Amina

biogenoen artean putreszina, histamina eta tiramina nagusitu ziren, % 50,0, % 37,5 eta % 33,3ko ehunekotan, hurrenez hurren. Hauek, aurretik amina horiek ardoetan determinatzeko diseinatutako "Errendimendu handiko kromatografia likidoa" (HPLC) teknikaren bidez kuantifikatu ziren (Garai et al., 2006). Ikerketa berean, histamina, tiramina eta putreszinaren maila askoz ere altuagoak zituzten sagardoek, bakterio laktikoen jarduera handia iradokitzen dutela ondorioztatu zen (Garai et al., 2006).

Amina biogenoen muga toxikoa ezartzea zaila den arren, *Europar Batasuneko Batzordearen elikagaien irizpide mikrobiologikoei eta ondorengo aldaketei buruzko erreglamenduak*, arrainen kasuan 100mg/kg-ko histamina edukiaren muga ezartzen du (Eur-Lex 2073/2005 zk.). Hortaz gain, histaminaren efektu toxikoen inguruko datuetatik abiatuta, pertsona osasuntsuentzako efektu kaltegarriak gabeko gehienez 50mg-ko dosi maximoa definitzen du FAOk (Food and Agriculture Organization) (FAO/OME, 2013). Dena den, dosiaren arabera toxikotasuna aldakorra da gizabanako batetik bestera, detoxifikazio-eraginkortasuna desberdina delako pertsonetan (Gagic et al., 2018).

3. HELBURUAK

3.1. Orokorra

Gluten gabeko ogi jasangarri baten segurtasuna ezaugarritzea.

3.2. Espezifikoak

- Oinarrizko gluten gabeko formulazioaren bizitza baliagarria eta balio nutrizionala ezaugarritzea.
- Amina biogenoen edukia analizatzea gluten gabeko “ogi borobilean”.
- Errendimendu handiko kromatografia likidoa lotutako masa-espektrometria (HPLC–MS/MS) metodoaren oinarriak ezagutzea eta teknika honen bitartez ogien amina biogenoak kuantifikatzea. Teknikaren baldintzak optimizatzea eta ogi desberdinetan analisiak egitea.
- “Ogi borobila” merkatuan dauden beste gluten gabeko ogiekin alderatu eta baloratzea ea balio erantsiren bat izan dezakeen gainontzekoen aurrean.
- Ekonomia zirkularrari dagokionez, elikagai hondakinak giza-kontsumorako berrerabiltzeko bete behar diren baldintzak eta legedia ezagutzea.
- TKNIKA erakundearen bitartez “Ogi borobila” ezagutzera ematea.
- Histaminaren inguruko jakinduria eta kontzientzia zabaltzea Lanbide Heziketako irakasle eta ikasleen artean.

4. METODOAK ETA MATERIALAK

Lan honetan, alde batetik bai “ogi borobilaren” (B1) bai eta merkatuko gluten gabeko beste lau ogien (kontrol gisa jokatuko dutenak: R1, R4, R5 eta R6) segurtasun eta nutriente analisia gauzatu da, TKNIKA Euskadiko Lanbide Heziketaren Ikerketa Aplikatuko Zentroarekin lankidetzan. Garrantzia bereziki histaminaren edukian zentratu da. Bibliografiaren arabera, okindegi produktuetan AB-en azterketa egiteko, metodo kolorimetroko entzimatikoa edota kromatografikoak erabili ohi dira (Mannino et al., 2022).

Kasu honetan, ogien histamina kantitatea neurtzeko ondorengo prozedura planteatu da: 1) Orean AB-k sintetizatzen dituzten bakterioen presentzia behatzea kultibo espezifikoak eginez, 2) detektatutako bakterioen histamina sortzeko gaitasuna determinatzea deskarboxilasa entzimaren RNA mezulariaren (RNAm) presentzia behatuz PCR teknikaren bidez eta 3) ogien histamina kantitatea zuzenean neurtzea HPLC–MS/MS bidez. Hortaz gain, ogien bizitza baliagarria eta uraren aktibitatea ere neurtu dira kasu bakoitzerako ekipo espezifikoak erabiliz.

4.1. Kultiboak

Lehenik eta behin, ogiak ekoizteko erabiltzen den orean aurki daitezkeen BAL-en presentzia dagoen behatu da. Nahiz eta ogia labekatzean ama oreko bakterioak suntsitzen diren, AB-ak behin sortuta tenperaturerekiko erresistenteak dira (Mannino et al., 2022). Horregatik, labekatu gabeko orean BAL-k egoteak ogian histamina aurkitzeko aukera dagoela ematen du aditzera. Gaizka Garaik zuzendutako ikerketa baten arabera, zeinak Euskal Autonomia Erkidegoko sagardoetako BAL-en deskarboxilasa jarduera aztertzea ardatz izan zuen, *Lactobacillus diolivorans* izan zen histaminaren ekoizpen potentzial altuena erakutsi zuen bakterio nagusia (Garai et al., 2007). Hori erreferentziatzen harturik, BAL-entzako espezifikoa den Mann Rogosa Sharpe (M.R.S.) medioan hauen presentzia behatu da, ISO (International Organization for Standardization) araudiak hala zehazten baitu (ISO 15214-1998). Araudi honek, bakterio laktiko mesofiloak hazteko ondorengo baldintzak zehazten ditu: pH 5,7 eta tenperatura 30°C.

4.2. PCR

PCR teknikak azkarrak eta fidagarriak direla frogatu da, eta hortaz arrakastaz erabili daitezkeela AB-k sortzen dituzten bakterio-anduiak detektatzeko (Ferrario et al., 2012).

PCR-a material genetikoaren (DNA edo RNA) amplifikaziorako metodo entzimatikoa da, material genetikoaren aukeratutako zati espezifiko baten kopia asko lortzea ahalbidetzen du. Normalean DNA-rekin lan egiten da eta bere amplifikazioa prozesu ziklikoa da. Lehenerik eta behin temperatura igotzen da, jatorrizko DNA-ren bi harizpiak desnaturalizatu eta bereizteko. Ondoren, temperatura jaitsi eta *primer*-a DNA moldeko bere sekuentzia osagarriarekin lerrokatzen da. Horrela, hautatutako zati espezifikoetan DNA polimerasak kate osagarria sintetizatzen du. *Primer*-ak mugatzen dute amplifikatu nahi den DNA-ren eskualdea. Teknika hau termozikladorean gauzatzen da, non temperatura ziklo horiek bata bestearen atzetik egitea ahalbidetzen duen, eta horietako bakoitzean DNA zatiaren kopia kopurua bikoizten den. Horrela, hasierako DNA molekula bakar batetik abiatuta, 35 ziklotan 34 mila milioi kopia lortu daitezke (Coton et al., 2010).

AB-en sorrerarako gutxienez bi gene adierazi behar dira bakterioetan: dagokion aminoazidoaren deskarboxilazioa katalizatzen duen entzima kodetzen duena, eta aminoazido-AB trukeaz arduratzen den proteina garraiatzaile bat kodetzen duena (Fernandez et al., 2005). Kasu honetan, histaminaren sorrera behatu nahi denez, histidina deskarboxilasa (hdc) entzima izan da PCR-aren itua.

Jakina da, izaki bizidunen zeluletan aurkitzen den material genetiko guztia ez dela beti espresatzen, hau da, gene batzuk soilik itzultzen dira proteina funtzionaletara. Ondorioz, ogietan behatu diren bakterioetatik erauzitako material genetikoan hdc-aren genea egoteak ez du zertan esan nahi entzima espresatuko denik eta ondorioz horrek ez du ziurtatzen genea duen bakterioak histamina ekoizten duenik. Horregatik, PCR-a egin aurretik, soilik proteinetara itzultzen den introirik gabeko RNA mezulariaren (RNAm) erauzketa gauzatu da *NucleoSpin Kit*-arekin (ref.: 740955.50). Gero, erauzitako RNA, berriro ere DNA-ra bilakatu da erretrotranskripzio bidez, DNA osagarria lortuz.

Puntu honetan, PCR-an amplifikatuko den sekuentzia bakterioek espresatzen dutela ziurtatuta egongo da.

4.3. HPLC–MS/MS

Amina biogenoak zuzenean determinatzea ez da erraza, alde batetik duten egituragatik, eta bestetik, oso kantitate txikitik egoten direlako ogia bezalako matrize konplexuetan. HPLC–MS/MS elikagaietan egon daitezkeen amina biogenoak kuantifikatzeko teknika erabilia da (Proestos et al., 2008). Hasteko, lagineko aminak

erazi behar dira eta benzoilo kloruro disoluzio bidez estraktua deribatu. Azkenik, analisi kromatografikoa egiten da. Irudiko ekipoa erabiliz, laginean dauden amina guztiak identifikatzeko eta horiek disoluzio-patroiak erabiliz kuantifikatzeko (Fuentes et al., 2017).

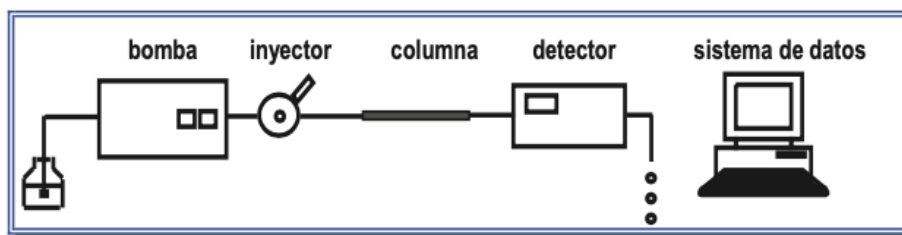


Irudia 2. HPLC Sistema (Agilent Technologies) (García De Marina et al., 2016)

HPLC-a banaketa teknika bat da. Fase mugikor, lagin eta fase geldikorraren arteko elkarrekintzetan oinarritzen da. Funtsean, lagineko konposatu desberdinak banatu egiten dira fase mugikor eta fase geldikorrarekiko duten afinitatearen arabera. Kasu honetan fase mugikorra polarra da, eta geldikorra (ekipoko zutabea) apolarra, C18 (1540 x 4,6 mm & 5 m) zutabea zehazki.

Fase mugikorra da lagina zutabetik igarotzea eragiten duena. Detektatu nahi den histamina, molekula apolarra izanik, ekipoko zutabearekin du afinitatea. Beraz, lagina bertatik igarotzean histamina zutabearen atxikitzen da, gainerako konposatu apolarrekin batera. Zutabearekin afinitate gutxien duen molekula askatzen da lehenengo, eta hau detektagailuak erregistratu eta kromatograma batean irudikatuko du. 3. Irudian ikus daitezke ekipoa osatzen duten atalak.

Fase mugikorra osatzen duten disolbatzaile organiko moduan H₂O purua eta azetonitriloa erabili dira, ura azetonitriloa baino polarragoa delarik. Hauen arteko proportzioa (gradiente) aldatzen joaten da, eta zutabetik igaro ahala afinitatearen arabera, lagineko konposatuak askatzen joaten dira denbora desberdinetan, detektagailuak grafika batean erregistratzen dituelarik. Molekula bakoitza askatu eta detektatzen den momentuari erretentzio denbora (t_R) deritzo.



Irudia 3. HPLC kromatografoaren 5 moduloen eskema (García De Marina et al., 2016)

Ekipoan txertatzeko laginen prestaketarako, 5 g ogi-hauts pisatu dira prezipitatu ontzi batean eta 20 mL azido trikloroazetiko gehitu. Nahasketa 3 minutuz homogeneizatu da ultraturaxean. Jarraian prestakinak zentrifugatu dira 10.000 g-ko abiaduran, 4 °C-tara 10 minutuz. Lortutako gainjalkina Whatman 1 iragazki bidez iragazi da, eta azkenik ur bidestilatuarekin 50 mL-ra arte aforatu.

Laginen analisirako hauek deribatizatu egin behar dira aurrez. Histamina berez UV-izpiak xurgatzen ez dituen eta fluoreszentiarik ez duen analitoa izanik, ezinbesteko urratsa da deribatizazioa egitea, substantzia detektagarriak lortzeko (Gagic et al., 2018). Honetarako hurrengo paragrafoetan azaldutako prozedura jarraitu da.

Aurreko disoluziotik 2 mL hartzen dira eta saiodi batera eramaten dira. Honi NaOH 2M eta benzoilo kloruro disoluzioak gehitu zaizkio, 1 mL bakoitzetik. Hodiak vortex batean mugitu dira minutu batez, eta giro-tenperaturan utzi dira ondoren 15 minutuz. Gero, Whatman 1 iragazkiaren bidez iragazi dira.

Saiodi batera pasa eta 2 mL NaCl disoluzio asetu gehitu zaizkio, ondoren dietileteraren bidez amina biogenoak erauzteko. Horretarako, 2 mL dietileter gehitu, astindu eta 2 faseak bereizten direnean, fase organikoa (goikoa) jaso da. Hau da amina biogenoak aurkitzen diren fasea. Erauzketa hau bi aldiz egin da; hau da, beheran geratzen den ur-faseari beste 2 mL dietileter gehituz eta bertan jasotako fase organikoa lehen erauzketan jasotakoarekin batera jarritz.

Bukatzeko, jasotako emaitzaren dietileterra lurrundu da, fluxu bertikaleko kanpai batean 2 egunez lehortzen utziz. Pausu honen ondoren azpian geratzen den jalkia 500 µL azetonitriloan disolbatu da eta hau da ekipo kromatografikoan injektatzen den bukaerako prestakina.

Ogien laginetan histamina identifikatu eta kuantifikatzeko, lehenik patroi puruaren disoluzio deribatizatuak injektatu dira ekipoan. Zehazki, histaminan 100 ppm, 25 ppm, 18 ppm, 12 ppm eta 6 ppm-ko kontzentrazioa duten patroi disoluzioak prestatu dira.

Horrela, patroiaren analisisan erregistratutako tontorrari dagokion tR identifikatu eta kalibrazio kurbak diseinatzen dira zeinetan ezaguna den patroiaren kontzentrazioa eta erregistratutako tontorraren azalera erlazionatzen diren, ondoren ogien laginen kromatograman lortutako emaitzekin alderatzeko (Fuentes et al., 2017).

4.4. Ogien bizitza baliagarria

Bestalde, “ogi borobilaren” bizitza baliagarria noiz arte luza daitekeen aurreikusi da. Elikagai baten bizitza baliagarria, ekoizten denetik iraungitzen den arteko denborari deritzo, hau da, bere ezaugarriak osotasunean kontserbatzen diren denborari. Hau, kutsadura mikrobiologikoa maila minimotan mantentzeaz gain, bere ezaugarri fisiko-kimikoak (homogeneotasuna, egonkortasuna, egitura) eta organoleptikoak (ehundura, zaporea, aroma, kolorea, usaina) zaintzearen menpe dago (Jaramillo et al., 2020).

Kasu honetan, ogien bizitza baliagarria aurreikusteko asmoz analisi mikrobiologikoa burutu da. BioTrac (Metrohm) ekipoaren bitartez gauzatu dira analisiak, metodo ez-zuzena aplikatuz. Honetan, ogian hazten diren mikroorganismoen CO₂ ekoizpena neurtzen da jarduera metabolikoaren adierazle gisa. Horretarako, barneko zelda batean ogi zati bat jarri da eta aldi berean, zelda hau handiago batean sartu da, zeinetan potasa (KOH) erreaktiboa aurkitzen den. Potasa disoluzioa elektrodo batzuekin kontaktuan dagoenez, CO₂-ak eragiten duen eroankortasun-elektrikoaren aldaketa ekipoak antzeman eta neurtzen du, hau legamia eta lizunen hazkuntzarekin erlazionatuz.

Ogiak izan zitekeen mikroorganismoak aurreikusteko, uraren aktibitatea (Aw) ere neurtu zaio egunak igaro ahala *Equipo Aw-neo* (novasina) erabiliz. Horretarako, ogiak birrinduta txertatu dira ekipoan.

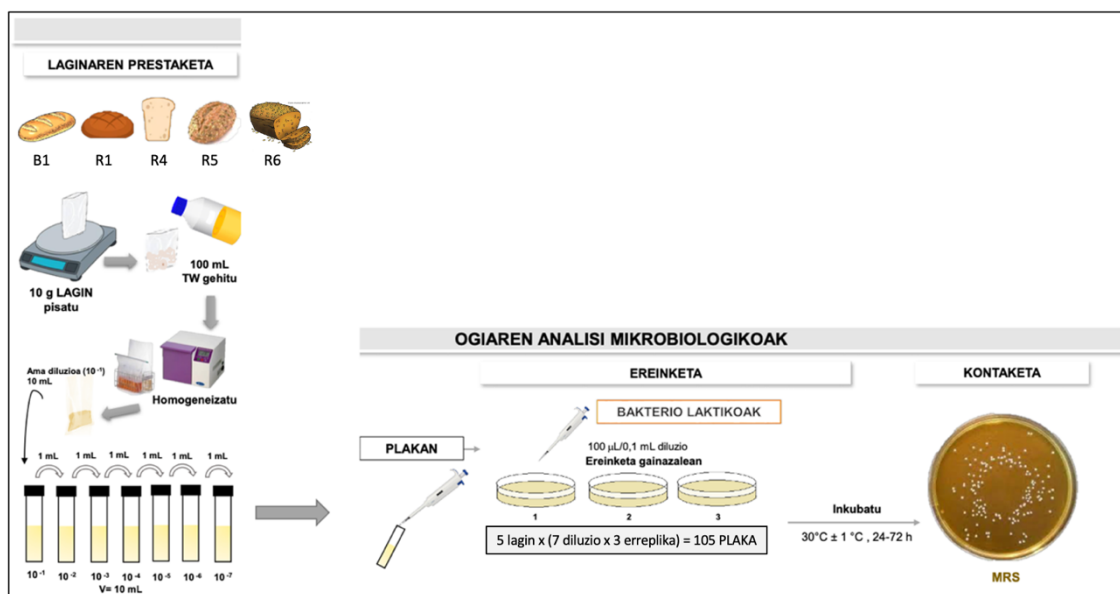
5. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

Hasteko, aipatzekoa da BAL-en kultiboen frogak baztertuak izan direla. Izan ere, “ogi borobilaren” (B1) oreka lortzea posible izan arren, kontrol gisa jokatu duten ogiak (R1, R4, R5 eta R6) komertzialak izanik ezinezkoa izan da labekatu gabeko oreka eskuratzea. Okindegi produktuak laboratzean bakterien hartzitzaileak hil egiten dira eta horregatik kultiboen analisiak oreka abiatzea ezinbestekoa da.

Horregatik, ogiak ekoizteko beharrezkoa den hartzidurarako kultibo abiarazleek BAL-en presentzia badutela suposatzen da, osagaien artean ama oreka baitute. Gluten gabeko

ogietan maiz erabili ohi da ama orea. Arendt eta kolaboratzaileen arabera ama orea arrakastaz aplikatu da gluten gabeko ogien kalitatea hobetzeko bertako BAL-en jarduera metaboliko konplexua dela eta (Arendt et al., 2011). Horregatik, aztertutako ogiek BAL-k dituztela eta ondorioz histamina sortzeko aukera badagoela onartu da.

Hala ere, kultiboak egiteko protokoloa diseinatu eta optimizatu da. 4. Irudian, adierazten den moduan, medioen kultiboa egiteko laginak likidoan prestatu eta diluzio seriatuak ($10^{-1} - 10^{-7}$) egin dira. Hasteko, laginak birrindu, ur peptonatuarekin (TW) nahastu eta *Stomacher*-ean homogeneizatu dira. Nahasketa honetatik abiatuta lortzen dira gainerako diluzioak. Ereinketa gainazalean egin da, Drigalski espatularekin lagina plakan zabalduz. Lehenengo saiakeran entsegu bakoitzetik bi erreplika egin dira, bata aerobiosian eta bestea anaerobiosian inkubatzeko, BAL-ak anaerobio fakultatiboak baitira. Dena den, baldintza anaerobikoetan hazkuntza ia deuseztagarria izan denez, bigarren aldiak aerobiosian soilik inkubatu dira, 3 egunez $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan. Gainera, bigarren aldi honetan 10^{-5} arteko diluzioak besterik ez dira prestatu, lehenengo entseguan hortik aurrerako diluzioetan ez baitziren bakteriorik kontatu.



Irudia 4. BAL-en kultiboak egiteko prozeduraren eskema

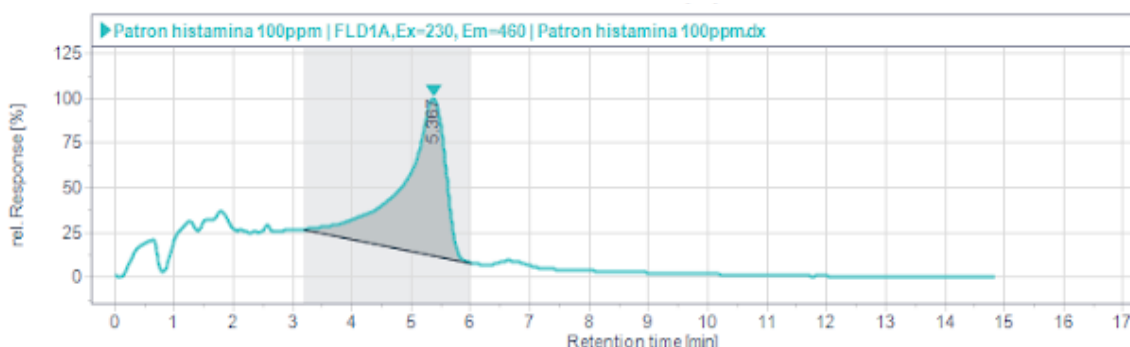
Oreetako BAL-k isolatu ez direnez, ezin izan da hdc entzimaren gena espresatzen duten frogatu. Dena den, PCR-rako HDC1 (5'-ATGTCAGAGTTTGA-TAAAAAG- 3') eta HDC2 (5' -TTAATAATT-GATGTTTCCACC- 3') sekuentziak zehaztu dira primer gisa bibliografian oinarrituz (Coton et al., 2005). PCR-aren barne-kontrolerako RNAr 16S (5' -AGAGTTTGATCCTGCTCAG- 3') primer endogenoa erabiliko litzateke.

Material genetikoaren amplifikaziorako 1.Taulan adierazten den programa ere zehaztu da CFX96 BIO-RAD Thermal Cycler ekiporako.

Taula 1. BIO-RAD Thermal Cycler ekiporako amplifikazio programa

Urratsak	Temperatura	Denbora
Desnaturalizazioa	95 °C	5 min
Amplifikazioa, 35 ziklo	95 °C	45 seg
	48 °C	45 seg
	72 °C	2 min
Amaiera	72 °C	5 min

HPLC-aren protokoloaren optimizazioan, lehenik eta behin analisiak kontzentrazio desberdinetan prestatutako histaminaren patroiekin gauzatu dira. Aurrez aipatutako protokoloa jarraituz histamina banatzeko eta kromatograman tontor isolatu bat lortzeko prozesua gorabeheratsua izan da. Hasiera batean, protokoloa jarraituz prestatutako patroien bolumena eznahikoa zen, izan ere, lagina injektatzeaz arduratzen den orratza ez zen likidoa hartzera iristen. Ondorioz, patroien prestaketa bolumen handiagoetara doitu behar izan da. Gainera, deribatizazio prozedura ere optimizatu behar izan da, temperatura eta argiarekiko kontaktua kontrolatuz. Era berean, dietileter bidez amina biogenoak erauzteko pausua bi aldiz errepikatu ordez, hiru aldiz egin da (ahalik eta amina biogeno gehien hartu direla ziurtatzeko). Histamina identifikatzea lortu da, 5,367 minutuko erretentzio denboran. Dena den, patroien kromatograman interferentziak somatu dira 1.Grafikan ikus daitekeenez.



Grafika 1. Histamina 100 ppm kontzentrazioaren kromatograma

Y: erregistratutako erantzun erlatiboa

X: denbora

Horregatik, gainerako tontor txikiagoak intereseko molekulak ez direla baztertzeko eta lortutako emaitzen zehaztasuna bermatze aldera, kontrol negatibo bat ere prestatu da

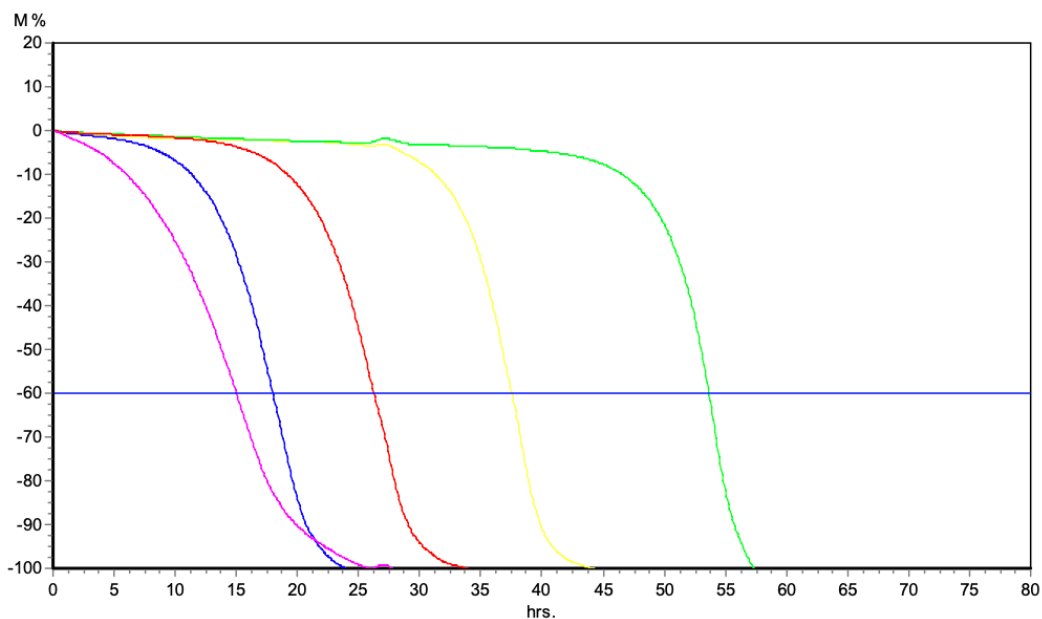
protokoloa optimizatze aldera. Kontrol honek, inongo laginik edo patroirik gabe aurrez aipatutako protokoloko deribatizazio prozesu osoa jasan du. Horrela, kontrol negatiboaren analisisan erregistratu diren tontorrak erreaktiboetako molekulei dagozkiela baieztatu da.

Azkenik, ogien bizitza baliagarriaren analisisan ogi bakoitzeko 2 erreplika jarri dira eta entsegua bi aldiz errepikatu. Kontrol positibo moduan lizunduta zegoen Roquefort gazta erabili da. Roquefortaren zeldak berehala markatu du positibo bizitza baliagarrian, hau da iraungita zegoela detektatu du ekipoak, beraz ondo kalibratuta zegoela baieztatu da. Ogiei dagokionez, bizitza baliagarri luzeena duena R4 izan da, 53,64 orduko bizitza baliagarria erregistratu delarik; hau da, 2,2 egun. "Ogi borobila" da hurrengoa, 37,53 orduara detektatu baita mikroorganismoen hazkuntza tontorra. Jarraian adierazten den 2. Taulan biltzen dira ogi guztien bizitza baliagarriaren denborak.

Taula 2. BioTrac (Metrohm) ekipoarekin lortutako emaitzak

Ogiak	Bizitza baliagarria (orduak)	Bizitza baliagarria (egunak)
B1	37,53	1,6
R1	17,97	0,7
R4	53,64	2,2
R5	26,27	1,1
R6	14,99	0,6

Bildutako datuak 2.Grafikan ikus daitezke irudikatuta. Bertan agerian geratzen da, aztertutako ogiak zein ordenatan iraungitzen diren, denbora gutxien irauten duena R6 ogia izanik.



Grafika 2. Ogien bizitza baliagarriaren adierazpen grafikoa

M%: mikroorganismoen hazkuntza ehunekotan

Hrs: bizitza baliagarria ordutan

Ogi kontrolen batz besteko bizitza baliagarria 28,2 ordukoa izanik, hauen aurrean “ogi borobilak” iraupen luzeagoa duela ondorioztatu da (28,2 o < 37,53 o). Horregatik, gainerako ogiak ekoitzi eta egun berean kontsumitzen ez badira galdutzat ematen diren bitartean, “ogi borobilak”, R4 ogiarekin batera, hurrengo egunean kontsumitzeko seguruak izaten jarraituko dute. Ezaugarri hau “ogi borobilak” formulazioan duen sagar patsari egokitu ahal zaio. Izan ere, sagar albo-produktuen konposatu fenolikoak berreskuratzeke erauzketa teknikak aztertzen dituen berrikuspen baten arabera, 60 konposatu fenoliko baino gehiago identifikatu dira sagarrean, azalean batez ere flabonoideak nagusitzen direlarik (Da Silva et al., 2021). Horregatik, hauek sagar patsean egotea espero da. Konposatu fenolikoek eraztun aromatiko bat edo gehiago eta talde hidroxiloak dituzte beren egitura molekularrean, zeinak propietate antioxidatzaileekin lotuta dauden. Horregatik, “ogi borobilaren” bizitza baliagarria luzatzearen arrazoia izan daitezkeela uste da. Hala ere, elikagai industriak jasan dituen aurrerapen teknologikoen ondorioz, elikagaien bizitza baliagarria, kasu gehienetan, jada ez du osasun-segurtasunak definitzen, aspektu sentorialak baizik. Sarritan, galera sentorialak lehenago agertzen dira produktuaren segurtasuna kaltetzen duten aspektuak baino (Jaramillo et al., 2020).

Ogiek dituzten mikroorganismoen hazkuntza aske dagoen ur kantitatearekin zuzenki erlazionatuta dagoenez, Aw ere neurtu da 3.Taulan biltzen diren datuak lortu direlarik.

Taula 3. Equipo Aw-neo (novasina) ekipoarekin lortutako emaitzak

	Aw	Temp. (°C)
B1	0,9614	27
R1	0,9424	27
R4	0,9445	27
R5	0,9371	27
R6	0,9511	27

Gero eta Aw altuagoa izan, orduan eta ur gehiago dute mikroorganismoek eskuragarri hazkuntzarako, eta beraz azkarrago ugaltu eta produktua lehenago galtzen da. Hori dela eta, bizitza baliagarriaren neurketen arabera Aw altuena R6 ogian espero zen arren, “ogi borobilean” erregistratu da. Honen formulazioak biltzen dituen osagai bereizgarriek, sagar patsa lekuko, oreari ura xurgatu eta atxikitzeke ematen dioten gaitasunagatik izan daiteke. Sagar patsaren zuntz dietetiko solugarriari dagokio zehazki ezaugarri hau (Föste et al., 2020). Gainera, *Psylliuma*-ren ordeztu gehitzen zaion lihoa aurrez hidratatu eta muzilago eta guzti gehitu izanak ere Aw altuagoa izatea eragin dezakeela uste da.

Aurrez aipatu bezala, emaitza eta eztabaida hauek TKNKA-ko langileekin batera lortu dira. TKNKA Euskadiko Lanbide Heziketaren Ikerketa Aplikatu Zentroa da. Eusko Jaurlaritzako Hezikuntza Sailak bultzatutako zentroa da, eta bertan lanbide-heziketako irakasleek teknologiaren, prestakuntzaren eta kudeaketaren eremuekin lotura duten berrikuntza-proiektuak garatzen dituzte. “Biozientziak eta jasangarritasuna” sailean zehazki, mundu osoan 2015. urtetik hasita 2030erako ezarri diren Garapen Jasangarriaren 17 Helburuak lortzeko ahalegina egiten da. Bertako laborategietan eskuratutako ezagutzak gero Euskadiko Lanbide Heziketako ikasleentara helarazten direnez, lan honen inguruko informazioaren hedapena eman da.

Zehazki Lea Artibai, Plaiaundi eta Don Bosco ikastetxeetako “Elikagaien industriako prozesuetako eta kalitateko” goi-mailako zikloetan eta erdi-mailako “Elikagaiak elaboratzeko teknikariak” formatzeko zikloan zabaldu da histaminaren inguruko informazioa. Hortaz gain, Leioako Ostalaritza Eskolako eta Donostiako Cebanc-eko ostalaritzako ikasleei ekonomia zirkularraren aplikazio esparru honen berri eman zaie, ogi jasangarriaren adibideaz baliatuz. Azpimarratzekoa da horien artean etorkizuneko okinak heziko dituztela. Gainera, Cebanc-en eskaintzen diren Dietetikako ikasketetan ere histaminaren inguruko informazioa gehituko da gaixotasun zeliakoa eta gluten gabeko dieten edukiarekin batera. Praktika dietetikoan jasangarritasunari lotutako

gomendioak aintzat hartzeko kontzientzia ere sortu da. Rose eta kolaboratzaileek diotenez, hartzen ditugun elikagaien inguruko erabakiek nabarmen eragiten dute ingurumen-inpaktuan. Inpaktu hori murriztu egin daiteke adibidez landare-jatorriko elikagai gehiago kontsumituz eta elikagai-hondakinak murriztuz. Beraien esanetan, dietista-nutrizionistek osasunerako onurez gain, jarraibide dietetikoetan ingurumenerako onurak ere kontutan hartzea komeni da (Rose et al., 2019).

TKNIKA-tik sortutako ikastaroetan lan honetako emaitzak eta eztabaidak txertatu dira. Hauetan 5 irakaslek parte hartu dute. Aipatutako ziklo bakoitzean 40 ikasle inguru daudela kontsideratuz, gutxi gorabehera 200 ikaslek lan honen berri izan dutela esan daiteke, proiektu honen irisgarritasuna hedatuz.

6. ONDORIOAK

Lan honetan egindako analisisien errepikakortasuna nahikoa izan ez den arren, ondorio orokor batzuetara iristeko eta etorkizuneko analisi eraginkorragoak diseinatzeko lehen pausuak eman dira. Hasteko, ogietan AB-en presentzia detektatzeko prozedura ezberdinak proposatu dira. Horietako bat, AB-k ekoizten dituzten bakterio azido laktikoen kultiboena, labekatu gabeko oreetan egin beharko litzateke. Era berean, oreetan egin beharreko PCR teknika ere deskribatu da.

Bestalde, HPLC bidez ogiko histamina kuantifikatzea lortu ez den arren, teknikaren oinarriak ezagutu dira. Gainera, kromatografoaren bidez analito hau identifikatzea lortu da. Gainera, TKNIKA erakundeari HPLC-aren erabilpen-protokoloa optimizatzen eta ekipoaren doikuntzan lagundu zaio, bertan gauzatuko dituzten hurrengo analisisietarako lana aurreratuz.

Bizitza baliagarriari dagokionean “ogi borobila” nahiko jasangarria dela ondorioztatu daiteke BioTrak ekipoaren analisisietan oinarrituz. Lan honetan ziurtatu da “ogi borobilak” balio erantsi bat duela merkatuko gainontzekoen aurrean denbora luzeagoz irauten baitu. Ingurumen inpaktua gutxitze aldera eta produktuaren garapen mikrobiologikoa aintzat harturik, sortu berri den “ogi borobilaren” kontsumoa noiz arte luzatu daitekeen aurreikusi da.

Azkenik, ekonomia zirkularren aldeko apustuak ekarriko dituen onurez jabetzea eta kontzientzia sortzea lortu da. Hortaz gain, “ogi borobilaren” inguruko ezagutza zabaldu da TKNIKA erakundearen, sagar patsak albo-produktu gisa izan dezakeen erabilera berri

bat frogatuz. Gainera, histamina konposatu kaltegarri gisa ezagutu eta honen ingesta kontrolatzeko beharraren mezua jaso da; batez ere gaixo zeliakoetan. Histamina elikagaien kalitate eta segurtasun adierazle gisa ere identifikatu da. AB hau gluten gabeko produktuen eraketan kontutan hartzeko konposatu bat dela ondorioztatu da. Jakinduria guzti hau Euskadiko Lanbide Heziketako ikasleetara iritsi da, TKNKA-ko irakasleen bitartez.

Laburbilduz, gluten gabeko ogi jasangarri baten segurtasuna ezaugarritzeko protokoloak deskribatu eta optimizatu dira, teknika batzuen kasuan emaitza kualitatibo fidagarriak eskuratu direlarik.

Hala ere, etorkizuneko analisietara begira gluten gabeko ogien kasuan (Gluten3S-ren “ogi borobila” barne) histamina edukia kuantifikatzea proposatzen da. Modu horretan “ogi borobila” NRCD pairatzen duten pertsonentzako egokiagoa izan daitekeen baieztatu ahal izango da.

7. BIBLIOGRAFIA

- Arendt, E. K., Moroni, A. & Zannini, E. (2011). Medical nutrition therapy: use of sourdough lactic acid bacteria as a cell factory for delivering functional biomolecules and food ingredients in gluten free bread. *Microbial cell factories*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S15>
- Caldeira, C., De Laurentiis, V., Corrado, S., van Holsteijn, F. & Sala, S. (2019). Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: a mass flow analysis. *Resources, Conservation, and Recycling*, 149, 479-488. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.06.011>
- Cardo, A., Churrua, I., Lasa, A., Navarro, V., Vázquez-Polo, M., Perez-Junkera, G. & Larretxi, I. (2021). Nutritional Imbalances in Adult Celiac Patients Following a Gluten-Free Diet. *Nutrients*, 13(8), 2877. <https://doi.org/10.3390/nu13082877>
- Coton, E. & Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine-and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.001>
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P. & Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, 27(8), 1078-1085. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012>
- Da Silva, L. C., Viganó, J., De Souza Mesquita, L. M., Baiaño Dias, A. L., De Souza, M. C., Sanches, V. L., Chaves, J. O., Pizani, R. S., Contieri, L. S. & Rostagno, A. M. (2021). Recent advances and trends in extraction techniques to recover polyphenols compounds from apple by-products. *Food Chemistry: X*, 12, 100133. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100133>
- España Circular 2030 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2018). Borrador de la estrategia española de economía circular. 9(2), 6-9 https://www.miteco.gob.es/images/es/180206economiacircular_tcm30-440922.pdf
- Eur-Lex 2073/2005 zk., Europako Parlamentuarena eta Kontseiluarena, (2005, Azaroak 15). *Elikagaiei aplikatutako mikrobiologikoen irizpide buruzko araudia*. Kontsulta 2023ko martxoak 16. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20170101&from=EN>

- Eur-lex 1924/2006 zk., Europako Parlamentuarena eta Kontseiluarena, (2006, Abenduak 20). *Elikagaien nutrizio-adierazpenei eta ezaugarri osasungarriei buruzko araudia*. Kontsulta 2023ko maiatzak 4 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1924-20141213&qid=1683641668064>
- FAO/OME [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization] (2013). Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. *Meeting report*: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/89216/9789240691919_eng.pdf;jsessionid=E82441B4D74DCA1777263CB7FB4E5250?sequence=1
- Fernández García, M. & Álvarez González, M. A. (2005). Las aminas biógenas en los alimentos. *Instituto De Productos Lácteos De Asturias (CSIC)*. 3-7. https://digital.csic.es/bitstream/10261/5771/1/IPLA_AGROCSIC_2.pdf
- Ferrario, C., Pegollo, C., Ricci, G., Borgo, F. & Fortina, M. G. (2012). PCR Detection and Identification of Histamine-Forming Bacteria in Filleted Tuna Fish Samples. *Journal of Food Science*, 77(2), 115-120. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02535.x>
- Föste, M., Verheyen, C., Jekle, M. & Becker, T. (2020). Fibres of milling and fruit processing by-products in gluten-free bread making: A review of hydration properties, dough formation and quality- improving strategies. *Food Chemistry*, 306, 125451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125451>
- Fuentes López, A., Fernández Segovia, I. & García Martínez, E. (2017). Determinación de aminas biógenas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). *Universitat Politècnica de Valencia*. 3-8. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/83318/Fuentes%3bFernández%3bGarc.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gagic, M., Jamroz, E., Krizkova, S., Milosavljevic, V., Kopel, P. & Adam, V. (2018). Current Trends in Detection of Histamine in Food and Beverages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(3), 773-783. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b05515>
- Garai, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Martín-Alvarez, P. J. & Moreno-Arribas, M. V. (2006). Biogenic Amines in Natural Ciders. *Journal of Food Protection*, 69(12), 3006-3012. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.12.3006>

- Garai, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A. & Moreno-Arribas, M. V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 473-478. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02207.x>
- García De Marina Bayo, A. & Yusá Marco, D. J. (2016). HPLC Instrumental (1ª ed.). Valencia: Universitat Politècnica de València. <https://ebuc.unican.es/Record/Xebook1-4623>
- Gutiérrez, A. L., Villota, P., Villanueva Paz, M., Ronda Balbás, F., Harasym, J. & Caballero Calvo, P. A. (2017). Enriquecimiento de pan sin gluten mediante cascarilla de trigo sarraceno. *II Congreso Nacional De Jóvenes Investigadores En Ciencia, Ingeniería Y Tecnología De Los Alimentos*, 123-124. https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/8415/LIBRO%20JICITA_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ingurumen, Lurralde Plangintza eta Etxebizitza Saila. (2019). *Euskadiko Ekonomia Zirkularrerako Estrategia 2030*. 6-8. <https://www.euskadi.eus/libro/euskadiko-ekonomia-zirkularrerako-estrategia-2030-estrategia-ekonomia-circular-2030/web01-a2ingkli/es/>
- ISO 15214-1998. Recuento de lactobacilos mesófilos (2021). http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/Lactobacilos%20mesofilos%20-%20recuento%20ISO%2015214-1998.pdf
- Jaramillo Rodríguez, J. (2020). Protocolo para la vida útil del pan sin relleno. *Universidad de Antioquia*. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/18769/1/JaramilloJuliana_2020_ProtocoloVida%C3%9Atil.pdf
- Lazo Zamalloa, O. & Ramírez López, C. (2022). Aprovechamiento de bagazo de manzana para la extracción y aplicación de pectina de uso alimentario. *Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional de Mexico*. 36-40. <https://www.revistafronterabiotecnologica.cibatlaxcala.ipn.mx/volumen/vol23/pdf/vol-23-6.pdf>
- Mannino, G., Cirilincione, F., Gaglio, R., Franciosi, E., Francesca, N., Moschetti, G., Asteggiano, A., Medana, C., Gentile, C. & Settanni, L. (2022). Preliminary Investigation of Biogenic Amines in Type I Sourdoughs Produced at Home and Bakery Level. *Toxins*, 14(5), 293. <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/5/293>

- Molina-Rosell, C. (2013). Alimentos sin gluten derivados de cereales. *OmniaScience*, 22, 447-461. <https://issuu.com/jcgarciaj/docs/27-537-1-pb/1>
- Partearroyo, T., Samaniego Vaesken, M. D. L., Ruiz, E., Aranceta Bartrina, J., Gil, Á., González Gross, M., ... & Varela Moreiras, G. (2019). Current food consumption amongst the Spanish ANIBES study population. *Nutrients*, 11(11), 2663. <https://doi.org/10.3390/nu11112663>
- Proestos, C., Loukatos, P. & Komaitis, M. (2008). Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chemistry*, 106(3), 1218-1224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.048>
- r-Biopharm (2017). What to consider when producing histamine-free wine. Food allergens, Histamine. Kongsulta 2023ko maiatzak 9. <https://staging.r-biopharm.com/news/what-to-consider-when-producing-histamine-free-wine/>
- Rivera, S., González, L., Fernández, D. & Tornadijo, M. E. (2017). Efecto de diferentes ingredientes funcionales sobre la calidad del pan sin gluten. *II Congreso Nacional De Jóvenes Investigadores En Ciencia, Ingeniería Y Tecnología De Los Alimentos*, 89-90. <https://buleria.unileon.es/handle/10612/8415>
- Rose, D., Heller, M. C., & Roberto, C. A. (2019). Position of the Society for Nutrition Education and Behavior: the importance of including environmental sustainability in dietary guidance. *Journal of nutrition education and behavior*, 51(1), 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.jneb.2018.07.006>
- Sánchez Pérez, S., Comas Basté, O., Rabell González, J., Veciana Nogués, M., Latorre Moratalla, M. L. & Vidal Carou, M. (2018). Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are They Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? *Foods*, 7(205), 11-12 <https://doi.org/10.3390/foods7120205>
- Schnedl, W. J., Mangge, H., Schenk, M. & Enko, D. (2021). Non-responsive celiac disease may coincide with additional food intolerance/malabsorption, including histamine intolerance. *Medical Hypotheses*, 146 <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110404>
- Socas Rodríguez, B., Álvarez Rivera, G., Valdés, A., Ibáñez, E. & Cifuentes, A. (2021). Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization?

Trends in Food Science & Technology. 114, 133-147.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.002>

Veciana Nogués, M.T. & Vidal Carou, M.C. (2014). Dieta baja en histamina. *Nutrición y dietética clínica* liburua. Editorial MASSON. 45. Kapitulu. 443-448.
<https://www.deficitdao.org/wp-content/uploads/2018/12/002a-Dieta-Baja-en-histamina.pdf>