



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Idiazabal gaztaren ikerketa
metagenomikoa: gaztagilearen eta
heltze denboraren eragina
mikrobiotan**

*Gorka Santamarina García,
Igor Hernández, Gustavo Amores
eta Mailo Virto*

29-36 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.03>



Idiazabal gaztaren ikerketa metagenomikoa: gaztagilearen eta heltze denboraren eragina mikrobiotan

Santamarina-García, G., Hernández, I., Amores, G. eta Virto, M.

Laktiker Ikerketa Taldea, Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Unibertsitate ibilbidea 7, 01006 Vitoria-Gasteiz. mailo.virto@ehu.eus

Laburpena

Orain arte garatutako ikerketek, esne gordinaz egindako gazten ezaugarri sentsorial bereziak gazta egiteko eta heltzeko prozesuetan gertatzen diren aldaketa mikrobiarrei egotzi dizkiete. Horregatik, ikerketa honetan Euskal Herriko Idiazabal gazta tradizionalaren mikrobiota aztertu zen DNAREN sekuentziazio masiboaren bidez. Gaztagileak eta heltze denborak gaztaren mikrobiotan duten eragina erakutsi zuten emaitzek. Oro har, bakterio azido laktikoak (BALak) nagusi ziren eta hauen hazkuntza faboratu zen bi prozesuetan. Ingurumen-bakterio eta patogeno gehienak, aldiz, inhibitu egiten ziren, *Staphylococcus aureus* izan ezik. Garrantzitsua da aipatzea orain arte Idiazabal gaztan detektatu ez diren bakterioak identifikatu zirela, aromarekin erlacionatutako konposatuen sintesiarekin lotutakoak.

Hitz gakoak: Ardi-esne gordinezko gazta; heltzea; mikrobiota; 16S rRNAREN sekuentziazioa.

Abstract

*Research to date has attributed the special sensory properties of raw milk cheeses to the microbial shifts that occur during cheese production and ripening. Therefore, in this research the microbiota of the traditional Idiazabal cheese from Basque Country was analyzed by massive DNA sequencing. The results showed how the production and ripening processes determined the microbiota of the cheese. In general, lactic acid bacteria (LAB) were predominant and their growth was favored through both processes. Most environmental and pathogenic bacteria, however, were inhibited, except *Staphylococcus aureus*. It should be noted that some bacteria which until now had not been detected in Idiazabal cheese were identified, some of which are related to the synthesis of flavor compounds.*

Keywords: ewe's raw milk cheese; ripening; microbiota; 16S rRNA sequencing.

1. Sarrera eta motibazioa

Gazta ezagutzen den elikagai bioteknologiko zaharrenetariko bat da (De Renobales et al., 2008). Bere jatorria duela 8000 urte ingurukoa dela uste da, animaliak hezi zirenean haragia, larruak edo esnea lortzeko, besteak beste (Barrientos eta Soria, 2020). Hala ere, zenbait teoria daude gaztaren aurkikuntza azaltzeko. Gehien onartutako hipotesiak azaltzen duen moduan, aurkikuntza akzidentala izan zen. Normalean, animalien urdailekin poltsak egiten ziren elikagaiak eta bestelakoak eramateko. Esnea horrelako poltsa batera gehituzerakoan, urdaileko hormetako digestio-entzimek esnea koagulatu zuten eta beroaren eraginagatik gatzatua eta seruma bereizi ziren. Gaur egun, gazta nutrizio-ezaugarri bikainak dituen oinarrizko elikagaia da, eta, merkatuan eskuragarri dagoen aniztasun handiari esker, zapore, usain eta ehundura anitzez gozatzeko aukera ematen digu (De Renobales et al., 2008). Urteko gazta-ekoizpena 20 milioi tonatik gorakoa dela kalkulaten da, eta zifra horrek gora egin du azken 30 urteetan, % 4ko batez bestekoan urtero (Barrientos eta Soria, 2020; Fox et al., 2016).

Idiazabal gazta ardi Latxa edota Karrantzako ardien esne gordinarekin egiten den gazta gogorra da eta gutxienez, 60 eguneko heltze denbora duena. Idiazabal gazta Euskal Herrian produzitzen da, Erronkari haranean salbu, eta 1987. urtetik Idiazabal Gazta Jatorri Deiturak (JD) bere ekoizpena arautzen du. Gainera, 1996az geroztik, Europar Batasunak babesten dueneko elikagaia da, Europako Jatorri Deitura Babestu (JIB) gisa (DOCE, 1996).

Idiazabal gaztak, bai eta esne gordinarekin egindako beste batzuek, profil aromatiko aberatsagoa eta biziagoa dute esne pasteurizatuarekin egindakoekin alderatuta (Grappin eta Beuvier, 1997; Leroy eta De Vuyst, 2004), baita beste espezie batzuetako gaztekin alderatuta ere (Ordoñez et al., 1998). Ezaugarri sentsorial interesgarri horiek, aurrez, gaztaren heltze prozesuan sortzen diren mikroorganismoen arteko dinamika konplexuei egotzi zaizkie (Peláez eta Requena, 2005). Esne gordinaren kalitatea, kultibo abiarazleen erabilera, erabilitako gaztagi

mota edota heltze denbora dira gaztan garatzen den mikrobiota (mikroorganismo konposizioa) baldintzatzen duten faktoreetako batzuk (Cosentino eta Palmas, 1997). Esneko mikrobiotari dagokionez, askotarikoa eta konplexua da, baina Idiazabal gazta egiteko erabiltzen den esnearen kasuan, *Lactococcus*, *Lactobacillus* eta *Leuconostoc* generoetako bakterio azido laktikoek (BALek) osatzen dute nagusiki (Pérez-Elortondo et al., 1993, 1998). Bakterio horiek esnean dagoen laktosa metabolizatzen dute azido laktikoa sortuz, hortik beraien izendapena. Hala ere, beste konposatu batzuk ere sintetizatzen dituzte, adibidez, azido azetikoak, etanola, diazetiloa... (Thierry et al., 2015); eta konposatu horien arabera gaztaren ezaugarri sentsorialak aldatu egiten dira (Pérez-Elortondo et al., 1999; Thierry et al., 2015). Nahiz eta BALak nagusi izan, badira ekosistema mikrobiar horretan ugaritasun txikiagoko beste mikroorganismo batzuk ere. Ondorioz, azken produktuaren propietate organoleptikoei ere eragin diezaiekete (Centi et al., 2017; Niro et al., 2014; Pérez-Elortondo et al., 1999; Zheng et al., 2018).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. Orain arte egindako ikerketa eta egungo egoera

Idiazabal gazten mikrobiota argitzeko asmoz, hainbat ikerketa garatu izan dira. Horrela, BALen eta garatutako bigarren mailako mikroorganismoen ezaugarriak deskribatu dira eta gaztaren ezaugarri organoleptikoekin erlazionatu dira (Pérez-Elortondo et al. 1998, 1993, 1999). Hala ere, lan horiek duela 20 urte garatu ziren mikrobiologiako oinarriko tekniken bidez, hau da, hazkuntza-medioak erabiliz. Gaur egun, frogatu da bakterio askok egoera bideragarria baina erein ezina (VBNC, ingelesetik, viable but non-culturable) har dezaketela, hazkuntza-medioen bidez isolatzea eta identifikatzea eragotziz (Zhang et al., 2017). Beraz, ez da sakonki ezagutzen gaur egun produzitzen diren Idiazabal gazten mikrobiota.

2.2. Ikerketa metagenomikoa: oinarria eta metodologia

Gaztaren populazio mikrobiarrak identifikatzeko eta karakterizatzeko ikerketa metagenomikoa gauzatu zen. Ikerketa mota hauetan, laginean dagoen material genetiko guztia (metagenoma) erauzten da, ondoren DNAREN zonalde espezifikoak aztertu ahal izateko (Yarza et al., 2014). Horrela, mikrobiologiako metodo tradizionalekin alderatuta, bakterio-espezie gehiago identifikatzea lortzen da, kantitate txiki samarretan daudenak (Ercolini et al., 2012; Masoud et al., 2012; Yarza et al., 2014), VBNC egoeran daudenak (Zhang et al., 2017), baita hazkuntza-metodoen mendekoak zein independenteak diren beste metodoen bidez detektatzen ez direnak ere (Alegría et al., 2012; Masoud et al., 2012; Yarza et al., 2014; Zhang et al., 2017). Hortaz, berriki garatutako DNAREN sekuentziario masiboko metodo hauek ekosistema mikrobiarren ikerketan sekulako iraultza ekarri dute, mikrobio-komunitateak aztertu ahal izan direlako hartzitutako elikagaietan, esaterako, esne gordineko gaztetan (Giello et al., 2017; Masoud et al., 2012; Park et al., 2019).

Espezie bakterianoak identifikatzeko, gene markatzaileen sekuentziario metodoa eskuragarria eta erabiliena da. Zehazki, gehien erabiltzen den gene markatzailea 16S rRNA (RNA erribosomikoa) da, nahiko informatiboa den eta kalitate-kontrola duten datu-baseetan sartuta dagoen gene markatzaile nagusia delako (Yarza et al., 2014). Gainera, kostu txikiko eta abiadura eta doitasun handiko metodoa da (Zhang et al., 2017). 16S rRNA genearen teknikan, behin DNA guztia erauzita dagoenean, PCR (polimerasaren kate-erreakzio) baten bidez genearen V3-V4 zonalde aldakorak anplifikatzen dira *primer* (abiarazle) espezifikoak erabiliz. Ondoren, lortutako sekuentzia anplifikatuak datu-baseetan jasotako erreferentziakoekin alderatzen dira, homologiak bilatuz eta, azken batean, laginean dauden bakterioak identifikatuz (Yarza et al., 2014).

2.3. Ikerketaren helburuak

Idiazabal gazta tradizionalaren konposizio fisiko-kimikoa eta propietate sentsorialak nahiko aztertuak izan dira. Hala ere, mikrobiologiaren ikuspegitik, ikerketa gutxi gauzatu dira produktu hori osatzen duen mikrobiota guztia argitzeko asmoz. Horregatik, eta populazio mikrobiarrek produktuaren amaierako ezaugarrietan izan dezaketen eragina jakinda, ikerketa honen helburua Idiazabal gaztaren mikrobiota aztertzea da, bereziki gazta egiteko prozesuan eta heltze denboran zehar nola aldatzen den aztertuz.

3. Ikerketaren metodologia eta emaitzak

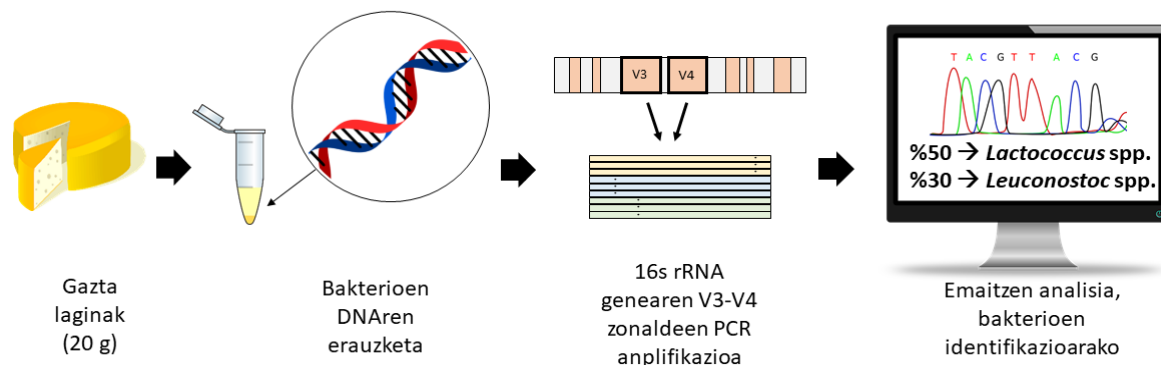
3.1. Metodologia

Arestian aipatutako helburua betetzeko, Jatorri Deiturari atxikitako 4 gaztandegiren (A, B, C eta D) laguntza izan zen. Ekoizle bakoitzeko esne-lagin bat (MA, MB, MC eta MD) eta gazta-lagin bi lortu ziren 6 heltze denboratan (1, 7, 14, 30, 60 eta 120 egun) (n = 52). Beraz, diseinu esperimentalak honako hau izan zen:

$$4 \text{ (ekoizleak)} \times 1 \text{ (esne-lagina)} + 4 \text{ (ekoizleak)} \times 6 \text{ (heltze denborak)} \times 2 \text{ (gazta-laginak)} = 52 \text{ lagin.}$$

Azterketa metagenomikoa burutzeko, 1. irudian deskribatutako prozedurari jarraitu zitzaion. Laburbilduz, lehenik eta behin laginetatik DNA bakterianoa erauzi zen, Erkus et al.-en (2016) protokoloan oinarrituz eta *DNAeasy Blood & Tissue kita* (Qiagen, Valentzia, CA, USA) erabiliz. Ondoren, erauzitako metagenomaren sekuentziak egin zen SGikerreko Sekuentziak Egin Genotipo Azterketen Unitatea-Genomika Zerbitzuan (UPV/EHU). Horretarako, 16S rRNA genearen liburutegia prestatu zen, *Nextera XT library* kitaren bidez eta ondoren, *Illumina MiSeq platform* batean 16S rRNA genearen V3-V4 zonalde hiperaldakorrek amplifikatuak izan ziren, Klindworth et al.-ek (2013) deskribaturiko primerrak erabiliz. Azkenik, emaitzei kalitate-kontrola aplikatu zitzaion eta sailkapen taxonomikoa egin zen *MiSeq Reporter* softwarea (Illumina Inc., San Diego, CA) erabiliz, *Greengenes* datu-basean oinarrituta; bai eta *MG-RAST* tresna (Meyer et al., 2008) erabiliz, *Silva SSU* datu-basean oinarrituta. Amaitzeko, lortutako emaitzak estatistikoki aztertuak izan ziren, *IBM SPSS* (IBM SPSS Inc., Chicago, 2019) eta *R softwarea* (R Core Team, 2020) erabiliz.

1. irudia. Idiazabal gazten ikerketa metagenomikoa gauzatzeko prozedura.



3.2. Bakterioen alfa- eta beta- dibertsitatea

Lehenik eta behin, alfa- eta beta- dibertsitatea aztertu ziren. Indize hauek, hurrenez hurren, lagin bakoitzean eta lagin ezberdinen artean dauden espezie bakterianoen aniztasuna eta aberastasuna neurtzen dituzte. Horrela, alfa indize ezberdinen bidez (*Shannon*, *Simpson*, *Inverse Simpson*, *Evenness*, *Jevenness*, *Berger*, *Chao* eta *ACE*), heltzearen lehen hilabetera arte Idiazabal gaztaren mikrobiota bakterio espezie gutxi batzuek menderatzen zutela ikusi zen, baina ordutik aurrera beste espezie batzuk ugartzen ziren. Emaitza horiek aztertuz, honako hau ondorioztatu zen: heltzearen lehen hilabetera arte gazta egiteko prozesuan kultibo abiarazle moduan gehitzen diren espezie bakterianoak nagusitzen dira, baina, handik aurrera ere nagusi izaten jarraitzen duten arren, esne gordinean aurkitzen diren beste espezie batzuk nabarmentzen hasten dira. Hortik, esne gordina erabiltzearen garrantzia, jatorrizko bakterioak amaierako produktuan agertzen direlako eta ezaugarri sensorialetan eragin dezaketelako.

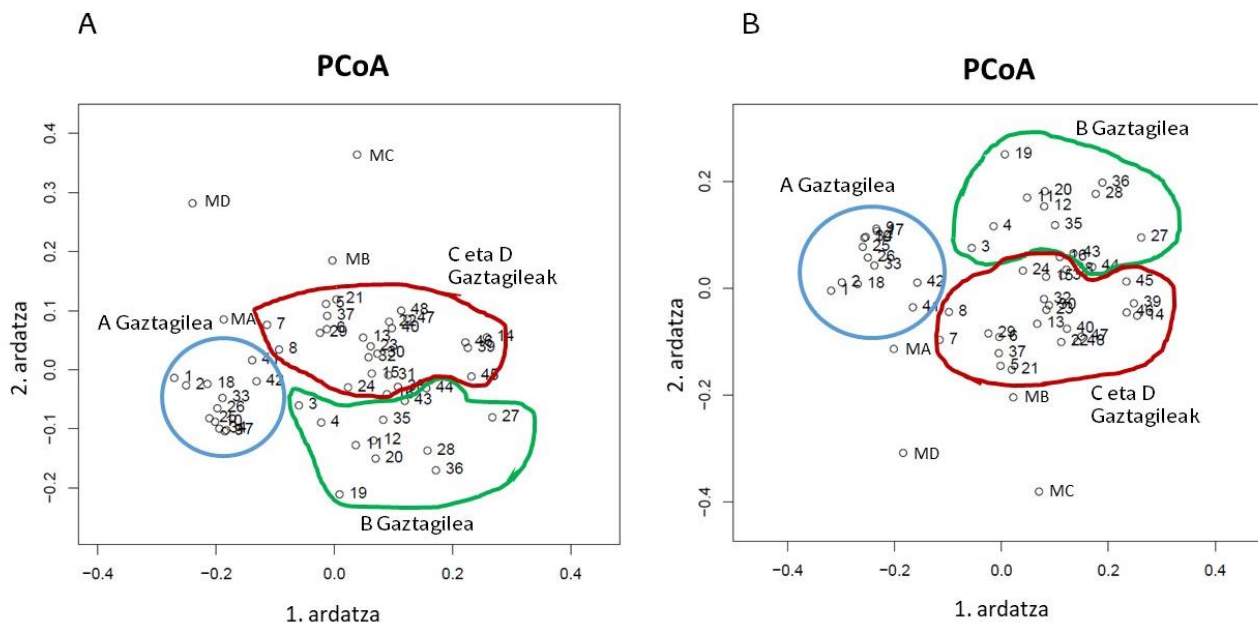
Era berean, beta dibertsitatea aztertu zen, Bray-Curtis eta Jaccard indizeetan oinarritutako koordinatu nagusien analisisien (PCoA) bidez (2. Irudia). Horrela gazten mikrobiota gaztandegiaren arabera argi eta garbi ezberdina zela ikusi zen baita ere. Hain zuzen ere, A eta B ekoizleen gazten mikrobiotak beraien artean eta C eta D ekoizleekiko ezberdintzen ziren. Beraz, emaitza horiek pentsarazten ziguten agian gaztagileak erabakigarriak zirela gaztaren mikrobiotaren konposizioari dagokionez eta hortaz, amaierako Idiazabal gazten ezaugarriak zehaztu ahal zituztela. Horretaz gain, ikusten den bezala, ekoizle baten heltze denbora jakin bateko bi laginen

artean desberdintasunak daude. Hau, gazta beraren erreplikak ez direlako izan daiteke. Hots, lagin bakoitza esne berarekin eta ekoizpenerako jarraibide orokor berdinei jarraituz produzitu diren arren, gazta ezberdinak dira. Beraz, elaborazio baten eta bestearen artean desberdintasun txikiak egotekotan, mikrobiologikoki eragina izan dezakete.

2. irudia. Bakterio generoen beta dibertsitatea Bray-Curtis (A) eta Jaccard (B) indizeetan oinarrituta.

Laginen identifikazioa 1etik 48ra doa. Horrela, 1etik 8ra bitarteko zenbakiak gaztagile bakoitzaren (A, B, C edo

D) lehenengo heltze eguneko lagin bikoiztuei dagozkie. MA: A gaztagilearen esnari dagokio, MB: B gaztagilearen esnari dagokio; MC: C gaztagilearen esnari dagokio eta MD: D gaztagilearen esnari dagokio.



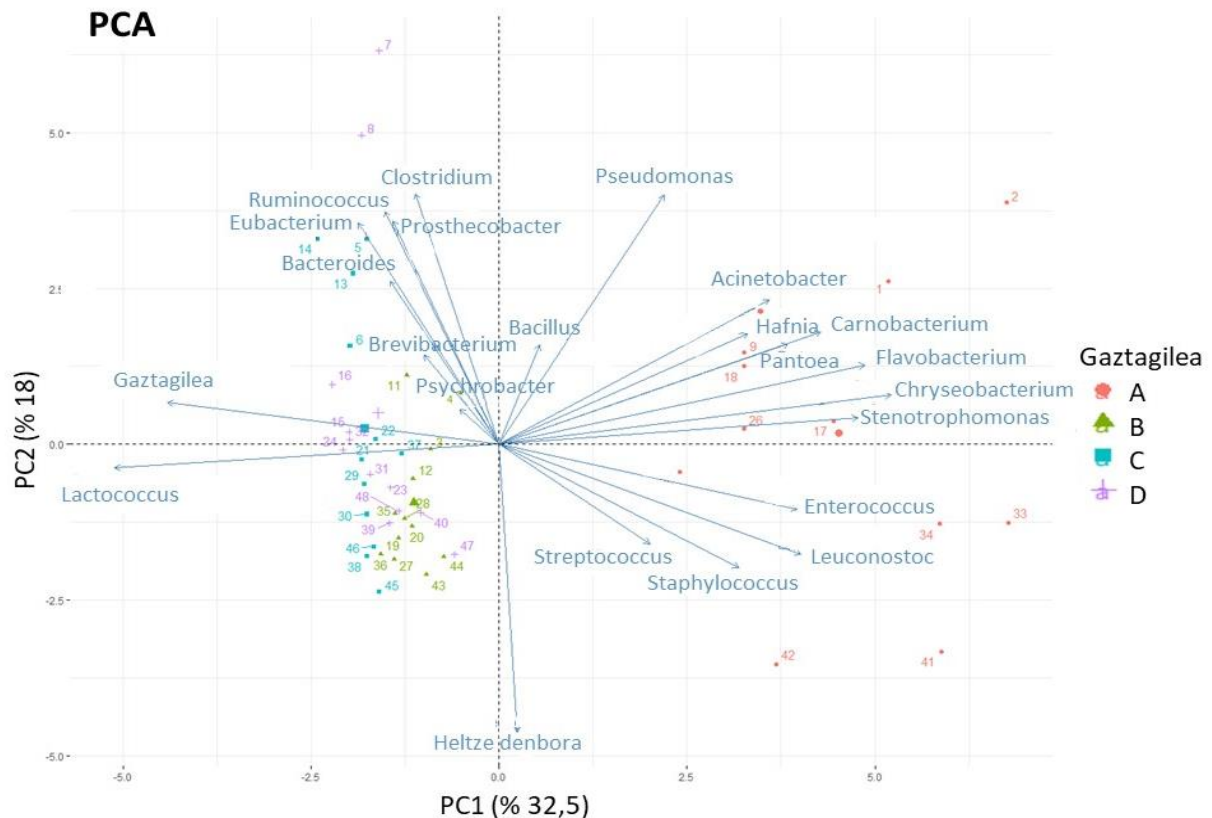
3.3. Gaztagilearen eta heltze denboraren eragina gaztaren mikrobiotan

Estatistikoki, bariantzaren azterketa permutazionala (PERMANOVA) gauzatu zen gaztagileen eta heltze denboraren eragina egiaztatzeko. Emaitzen arabera, bi faktoreek eragin estatistikoki oso esanguratsua zuten gaztaren mikrobiotan ($p < 0.001$). Hau da, bai artaldea maneiatzean, esnea lortzeko jetzialdian eta gazta egitean gaztagile bakoitzak jarraitzen dituen praktikak eta baldintzek (gaztagile faktorea), zein heltze denborak (heltze faktorea) Idiazabal gaztaren mikrobiota zehazten dute.

Horretaz gain, osagai nagusien analisia (PCA) egin zen bi faktoreen eragina aztertzeko (3. irudia). Ikus daitekeenez, gaztagile faktoreak korrelazio handia erakusten du lehen osagai nagusiarekin (PC1), hau da, ia ardatzaren gainean dago. Beraz, PC1 ardatzaren arabera argi eta garbi bereizten dira A ekoizlearen laginak eta gainerakoak. Bigarren osagai nagusiari (PC2ri) erreparatuz, heltze faktorearekin korrelazio handia du, hau da, laginen dispersioan patroi argia ikusten da. Gazta ez hain helduak PC2ren balio positiboetan banatzen dira eta gazta helduenen kasuan, aldiz, balio negatiboetan. Horrela, aldaketa mikrobiarren patroi argiak ikusten dira gaztagilearen eta heltze denboraren arabera.

Zehazki, A ekoizlearen kasuan, lehenengo heltze egunetako gaztak *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Pantoea* eta *Pseudomonas* generoek ezaugarritu zituzten. Heltzeak aurrera egin ahala, amaierako gaztetan *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* eta *Staphylococcus* populazioak nabarmendu ziren. Bestalde, B ekoizlearen gutxien heldutako gaztetan, *Psychrobacter*, *Bacillus* eta *Brevibacterium* generoen presentzia nabaria zen. Hala ere, B, C eta D ekoizleen kasuetan, heltzeak aurrera egin ahala mikrobiota sinplifikatu egin zen *Lactococcus* nagusituz.

3. irudia. Osagai nagusien analisia (PCA) 4 gaztandegietako eta heltze denbora ezberdinak (1, 7, 14, 30, 60 eta 120 egun) lagingak kontuan hartuz.



3.4. Bakterioen dinamikak gazta egiteko prozesuan eta heltze denboran zehar

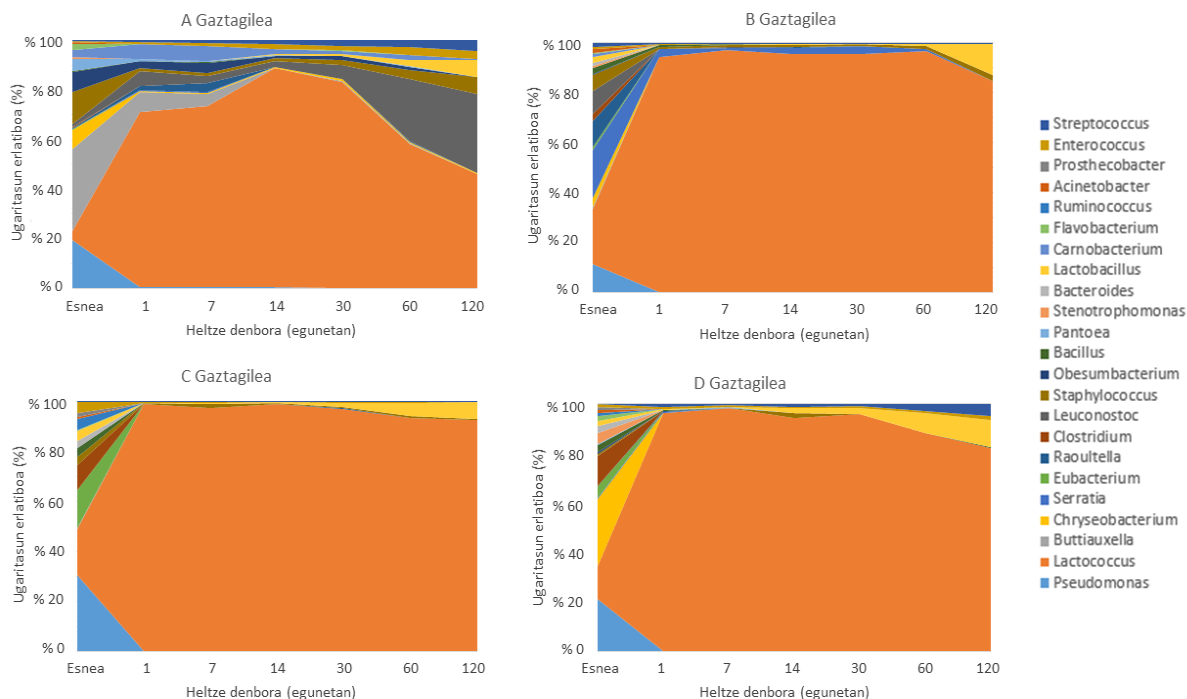
Idiazabal gaztak egiteko esne gordinetan 645 bakterio-genero identifikatu ziren. Hala ere, bakarrak 23 zeuden % 1etik gorako ugaritasunetan. Bakterio horiek honako talde hauetan bana zitezkeen: BALak (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*...); bakterio patogenoak, osasun arazoekin erlazionatu direnak (*Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*...); eta ingurumenetik datozen bakterioak, patogenoak ez direnak, baina ezta onuragarriak ere (*Prosthecobacter*, *Psychrobacter*, *Chromohalobacter*, *Flavobacterium*...).

4. irudian ikus daitekeenez, gazta egiteko prozesuak nagusiki BALen hazkuntza faboratu zuen (batez beste, esnearen % 13,2tik lehenengo eguneko gaztaren % 78,3ra). Hala ere, ingurunekeo bakterio batzuen ugaritzea ere laguntzen zuen. Horrek aurretik Bokulich eta Millsek (2013) adierazitakoa berretsi zuen, hau da, gaztandegi bakoitzak mikrobiota propioa (ingelesez *household microbiota* esaten zaiona) du, zeinak gaztagileen artean bereiztea eragiten duen. Gure kasuan, lehenengo eguneko gaztak bereizten zituzten generoak honako hauek ziren: A ekoizlearen gaztak *Hafnia*, *Buttiauxella*, *Obesumbacterium* eta *Raoultella* osatzen zituzten; B ekoizlearen gaztak *Brevibacterium*, *Psychrobacter* eta *Serratia*ak; *Chromohalobacter*rek C ekoizlearen gaztak eta *Streptococcus*ek D ekoizlearen gaztak. Aipatzekoa da, inguruneetik datozen bakterioen artean, *Brevibacterium*, *Psychrobacter* eta *Hafnia* aromarekin erlazionatutako konposatuen ekoizpenarekin lotu direla, gaztarentzat onuragarriak direnak, eta *Serratia*, aldiz, akats aromatikoekin.

Gaztaren mikrobiotan heltze denborak izan zuen eraginari dagokionez, BALak faboratzen ziren bakterio bakarrak ziren (% 90,7-98,7 bitarteko ugaritasunean 120 eguneko gaztetan), denbora aurrera joan ahala ingurunekeo bakterioak eta patogeno gehienak inhibitzen zirelako. Izan ere, BALen barruan joera bat antzeman zen. A ekoizlearen kasuan, *Lactococcus* generoa heltzearen 14. egunera arte nagusi zela ikusi zen (% 69,3), batez ere kultibo abiarazle gisa gehitu zelako. Hala ere, ordutik aurrera, balioak jaitsi egin ziren (% 45,4) beste BAL batzuen ugaritzea faboratuz (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*...) (4. irudia). Horrek adierazko luke, esne gordinean daudeneko BALak heltzean ugaltu eta azken produktuan nabarmendu daitezkeela.

Bestalde, ingurune bakterioak inhibitzen zirenez eta aromarekin erlazioatutako konposatuen produkzioarekin zerikusia duten bakterioen (*Brevibacterium*, *Psychrobacter* edo *Serratia*) dinamikei erreparatu, ondoriozta genezake heltzearen lehenengo asteetan bakarrik jardungo luketela (% 8,0ko ugaritasunean). Halaber, patogeno gehienak inhibitzen baziren ere, heltze denborak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* eta *Enterococcus faecium* hazten laguntzen zuela ikusi zen. *S. aureus* da batez ere kontrola eskatzen duena elikagaien segurtasun-arazoak saihesteko, ugaritasun erlatibo altuetan (% 6,8) aurkitu zelako A gaztagilean.

4. irudia. Aldaketa mikrobiarrak gazta egiteko prozesuan eta heltze denboran zehar.



Oro har, gazta egiteko prozesuan eta heltze denboran zehar ematen diren ezaugarri kimiko fisikoen bilakaerak azalduko lituzke behatutako dinamika mikrobiarrak. Laburbilduz, gaztaren elaborazioan eta heltzean pH-a 4,5-5,3ko balioetara jaisteak, elaborazioan erabilitako NaCl kontzentrazio handiak eta bakterio gehienek gatzarekiko tolerantzia txikia izateak (halofiloak izan ezik: *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Chromohalobacter*...), ur-aktibitatearen murrizketak eta erredox potentzialaren aldaketak, azalduko lukete ingurune bakterio eta patogeno gehienak inhibitzea eta soilik BALak mantentzea.

4. Ondorioak

Oso ikerketa gutxi garatu dira DNaren sekuentziazio masiboan oinarrituta ardi-esne gordineko gaztetako mikrobiota aztertzeke. Hala ere, egiaztatu da oso tresna erabilgarria dela bakterio-populazioen dinamika aztertzeke gazta egite eta heltze prozesuetan zehar. Era berean, gaztagile bakoitzak jarraitzen dituen praktikak edota baldintzak eta heltze denborak amaierako gaztaren mikrobiota zehazten dutela ikusi da. Oro har, bi prozesuek BALen ugaltzea faboratzen dute, amaierako gaztaren bakterio nagusiak izanik (% 90,7-98,7), baina heltzearen lehenengo asteak arte, aromaren erantzule diren konposatuen sintesiarekin erlazioaturiko bakterioen hazkuntza faboratzen da baita ere (batez beste, % 8,0). Gainerakoak, inguruneak eta patogenoak, inhibititu egiten dira, baina *S. aureus* azterketa eskatzen duen patogeno garrantzitsua da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizuneko ikerketetarako, interesgarria izango litzateke aztertzea gaztagileak aukeratzen dituen zein baldintzak edo praktikak eragiten duten batez ere gaztaren mikrobiotan. Era berean, mikrobiotaren eta gaztaren elikadura-kalitateari eta -segurtasunari eragiten dioten konposatuen arteko erlazioa aztertzea interesgarria izango litzateke, baldintza hoberenak aukeratu ahal

izateko kalitate goreneko Idiazabal gaztak lortzeko. Besteak beste, gaztaren kalitatearen aldetik gantz-azido askeak edota aromarekin erlazionatutako konposatu lurrunkorrek aztertu daitezke, gaztaren ezaugarri organoleptikoei erreparatuz, eta amina biogenoak elikagaien segurtasunaren ikuspegitik.

6. Erreferentziak

- Alegría, Á., Szczesny, P., Mayo, B., Bardowski, J., eta Kowalczyk, M. (2012). Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish Cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1890–1898.
- Barrientos, M., eta Soria, C. (2020). *Dairy, Cheese Production by Country in 1000 MT*. IndexMundi. <https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=cheese&graph=production>
- Bokulich, N. A., eta Mills, D. A. (2013). Facility-specific «house» microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5214–5223.
- Centi, V., Matteucci, F., Lepidi, A., del Gallo, M. eta Ercole, C. (2017). Microbiological and biochemical aspects of inland Pecorino Abruzzese cheese. *Heliyon*, 3(2), e00258.
- Cosentino, S., eta Palmas, F. (1997). Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's-milk-processing plants in Sardinia, Italy. *Journal of Food Protection*, 60(3), 283–287.
- De Renobales, M., Barrón, L. J. R., Pérez-Elortondo, F. J., Virto, M., Albisu, M., Nájera, A. I., eta Ruiz de Gordo, J. C. (2008). La investigación científica en el queso Idiazabal. *Rev. int. estud. vascos.*, 53(2), 395–431.
- DOCE. (1996). Reglamento (CE) n° 1107/96 de la Comisión de 12 de junio de 1996 relativo al registro de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 17 del Reglamento (CEE) n° 2081/92 del Consejo. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* (DOCE). 148, 1-10. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31996R1107>
- Ercolini, D., De Filippis, F., La Stora, A., eta Iacono, M. (2012). «Remake» by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water Buffalo mozzarella cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 8142–8145.
- Erkus, O., de Jager, V. C. L., Geene, R. T. C. M., van Alen-Boerrigter, I., Hazelwood, L., van Hijum, S. A. F. T., Kleerebezem, M., eta Smid, E. J. (2016). Use of propidium monoazide for selective profiling of viable microbial cells during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 228, 1–9.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., eta McSweeney, P. L. H. (2016). Fundamentals of cheese science, second edition. In *Fundamentals of Cheese Science, Second Edition*. New York: Springer US.
- Giello, M., La Stora, A., Masucci, F., Di Francia, A., Ercolini, D., eta Villani, F. (2017). Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of traditional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. *Food Microbiology*, 63, 170–177.
- Grappin, R., eta Beuquier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. In *International Dairy Journal* (Libk. 7, Zenbakia 12, or. 751–761). Elsevier.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., eta Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 1–11.
- Leroy, F., eta De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67–78.
- Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S. J., eta Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 192–202.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., eta Edwards, R. A. (2008). The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 386.

- Niro, S., Fratianni, A., Tremonte, P., Sorrentino, E., Tipaldi, L., Panfili, G., eta Coppola, R. (2014). Innovative Caciocavallo cheeses made from a mixture of cow milk with ewe or goat milk. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1296–1304.
- Ordoñez, A. I., Ibañez, F. C., Torre, P., Barcina, Y., eta Pérez-Elortondo, F. J. (1998). Application of multivariate analysis to sensory characterization of ewes' milk cheese. *Journal of Sensory Studies*, 13(1), 45–55.
- Park, W., Yoo, J., Oh, S., Ham, J. sang, Jeong, S. geun, eta Kim, Y. (2019). Microbiological characteristics of Gouda cheese manufactured with pasteurized and raw milk during ripening using next generation sequencing. *Food Science of Animal Resources*, 39(4), 585–600.
- Peláez, C., eta Requena, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15(6–9), 831–844.
- Pérez-Elortondo, F. J., Albisu, M., eta Barcina, Y. (1993). Changes in the microflora of Idiazabal cheese with the addition of commercial lactic starters. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 48, 10–14.
- Pérez-Elortondo, F. J., Aldámiz, P., Albisu, M., eta Barcina, Y. (1998). Indigenous lactic acid bacteria in Idiazabal ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 8(8), 725–732.
- Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., eta Barcina, Y. (1999). Physicochemical properties and secondary microflora variability in the manufacture and ripening of Idiazabal cheese. *Lait*, 79, 281–290.
- R Core Team. (2020). *R: The R Project for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Thierry, A., Pogačić, T., Weber, M., eta Lortal, S. (2015). Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Arg.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications, Second Edition* (2nd arg., or. 316–330). John Wiley & Sons Ltd., Hoboken.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., eta Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 635–645.
- Zhang, F., Wang, Z., Lei, F., Wang, B., Jiang, S., Peng, Q., Zhang, J., eta Shao, Y. (2017). Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7812–7824.
- Zheng, X., Liu, F., Shi, X., Wang, B., Li, K., Li, B., eta Zhuge, B. (2018). Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. *Food Research International*, 105, 733–742.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau nazioartean garrantzia duen aldizkari batera bidaltzeko prozesuan dago. Egileek eskerrak eman nahi dizkiete Idiazabal JIBra atxikitako gaztagileei ikerketa honetan parte hartzeagatik. Ikerketa hau burutzeko dirulaguntza Eusko Jaurlaritzak eman zuen (Gasteiz, IT944-16). Gorka Santamarina-García eskerrak eman nahi dizkio Euskal Herriko Unibertsitateari doktorego aurreko kontratuagatik. Egileek eskertzen dute SGikerrek (UPV/EHU) emandako laguntza teknikoa.